I434921

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I434921 B**

(45)公告日： 中華民國 103 (2014) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：099119620 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 06 月 15 日

(51)Int. Cl.： ***C10G50/00 (2006.01)*** ***C07C2/46 (2006.01)***

C07C11/18 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*

(30)優先權：2009/06/17 美國 61/187,959

(71)申請人：戴尼斯科美國公司 (美國) DANISCO US INC. (US)

美國

(72)發明人：麥奧利菲 喬瑟夫C MCAULIFFE, JOSEPH C. (AU)；派拉莫諾夫 賽吉E PARAMONOV, SERGEY E. (RU)；山佛 卡爾J SANFORD, KARL J. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 200925264A

審查人員：李嘉修

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：328 共 0 頁

(54)名稱

從生物異戊二烯組合物製造燃料成分之方法及系統

METHODS AND SYSTENS FOR PRODUCING FUEL CONSTITUENTS FROM BIOISOPRENE COMPOSITIONS

(57)摘要

本發明提供使用源自可再生碳之生物異戊二烯製造多種烴燃料及燃料添加劑之方法、組合物及系統。

The invention provides for methods, compositions and systems using bioisoprene derived from renewable carbon for production of a variety of hydrocarbon fuels and fuel additives.

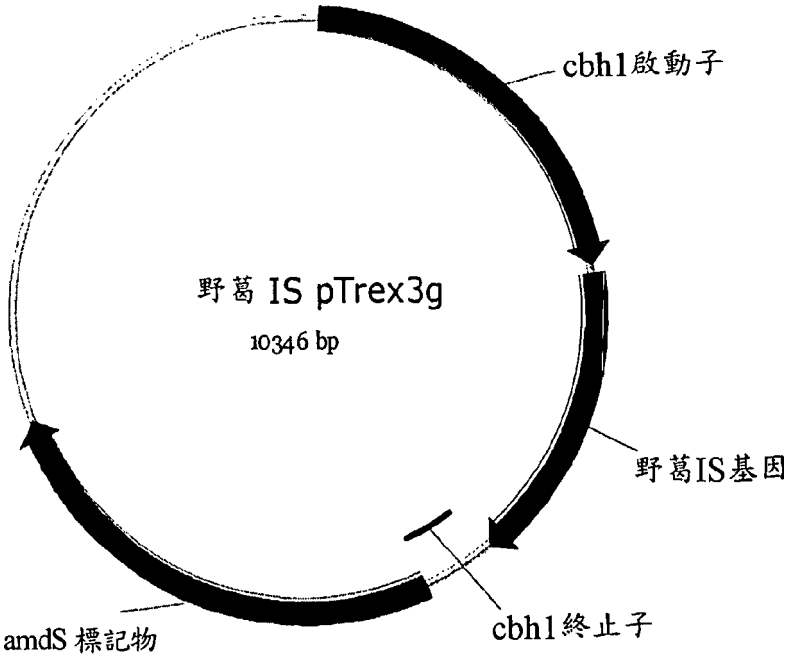


圖14

六、發明說明：

本申請案主張2009年6月17日申請之美國臨時專利申請案第61/187,959號之優先權，該案之揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

可再生運輸燃料之發展為21世紀之關鍵挑戰之一。當前市場上主要為源自蔗糖及澱粉之酵母醱酵的乙醇，且較小部分為源自三酸甘油酯之生物柴油(脂肪酸酯)。乙醇之限制在於作為液體燃料，相對於烴具有較低能量密度。另外，乙醇因其對水之親和力及腐蝕性質而不可在習知基礎結構中運輸。使可再生碳源(生質、糖、油)轉化成烴燃料之製程提供具吸引力的生物乙醇替代物。

異戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)為主要用於製造合成橡膠之關鍵的工業化學品。當前，異戊二烯係直接地藉由石腦油及其他輕質石油餾份裂化或間接地經由化學合成而源自石化來源(參見，例如H. Pommer及A. Nurrenbach, Industrial Synthesis of Terpene Compounds, *Pure Appl. Chem.*, **1975**, *43*, 527-551；H. M. Weitz及E. Loser, Isoprene, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*，第7版，Electronic Release, Wiley-VCH Verlag GMBH, Weinheim, **2005**；及H.M. Lybarger, Isoprene in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*，第4版，Wiley, New York (1995), *14*, 934-952)。所得粗異戊二烯流通常經歷大量純化製程以移除眾多化學上類似之雜質，其中許多雜質可干擾異戊二烯

後續轉化成聚合物及其他化學品。

相比之下，源自生物來源之異戊二烯含有極少烴雜質，且代之以含有許多氧化化合物，諸如乙醇、乙醛及丙酮。許多此等化合物可藉由與水接觸或通過氧化鋁或其他吸附劑而輕易地移除。

工業上依賴於石化原料來製造異戊二烯，且在異戊二烯可轉化成聚合物及其他化學品之前需要大量純化組列。需要具成本效益之方法，以利用生物異戊二烯之高純度及/或獨特雜質概況將以生物方法製造之異戊二烯轉化成有價值之化學產品。

本文中所引用之所有專利、專利申請案、文獻及論文皆以全文引用的方式併入本文中。

【發明內容】

揭示自高純度異戊二烯製造燃料成分之方法及系統，及自高純度異戊二烯製造之燃料組合物。

在一態樣中，本發明提供一種自生物異戊二烯組合物製造燃料成分之方法，其包含使生物異戊二烯組合物中大部分異戊二烯化學轉化成非異戊二烯化合物。在一實施例中，藉由使生物異戊二烯組合物經受適於異戊二烯二聚化之熱或催化條件以製造異戊二烯二聚體，接著催化氫化該異戊二烯二聚體以形成飽和C10燃料成分而使該生物異戊二烯組合物發生化學轉化。在另一實施例中，如下使生物異戊二烯組合物發生化學轉化：(i)部分地氫化生物異戊二烯組合物以製造異戊烯，(ii)使異戊烯與選自由異戊烯、

丙烯及異丁烯組成之群的單烯烴二聚化以形成二聚烯(dimate)，及(iii)完全氫化二聚烯以製造燃料成分。在一些實施例中，在化學轉化期間生物異戊二烯組合物中至少約95%之異戊二烯轉化成非異戊二烯化合物。在一些實施例中，將生物異戊二烯組合物加熱至約150℃至約250℃以製造不飽和環狀異戊二烯二聚體且催化氫化該不飽和環狀異戊二烯二聚體以製造飽和環狀異戊二烯二聚體燃料成分。在一些實施例中，該方法包含：(i)使生物異戊二烯組合物與催化劑接觸以催化異戊二烯環二聚化，從而製造不飽和環狀異戊二烯二聚體；及催化氫化該不飽和環狀異戊二烯二聚體以製造飽和環狀異戊二烯二聚體燃料成分。在一些實施例中，催化異戊二烯環二聚化之催化劑包含選自由鎳催化劑、鐵催化劑及鉻催化劑組成之群的催化劑。在一些實施例中，部分地氫化生物異戊二烯組合物之步驟包含使該生物異戊二烯組合物與氫氣及催化異戊二烯部分氫化之催化劑接觸。在一些實施例中，催化異戊二烯部分氫化之催化劑包含鈀催化劑。在一些實施例中，使異戊烯與單烯烴二聚化之步驟包含在催化單烯烴二聚化之催化劑存在下使異戊烯與單烯烴接觸。在一些實施例中，催化單烯烴二聚化之催化劑包含酸催化劑。在一些實施例中，該方法進一步包含在使生物異戊二烯組合物化學轉化成燃料成分之前自該生物異戊二烯組合物純化異戊二烯。

在一態樣中，本發明提供一種自生物異戊二烯組合物製造燃料成分之系統，其中該生物異戊二烯組合物中大部分

異戊二烯化學轉化成非異戊二烯化合物，該系統包含生物異戊二烯組合物，及(a)(i)一或多種能夠使生物異戊二烯組合物中之異戊二烯二聚化之化學品，或能夠使生物異戊二烯組合物中之異戊二烯二聚化之熱源，及(ii)能夠氫化異戊二烯二聚體以形成飽和C10燃料成分之催化劑；或(b)(i)能夠部分地氫化生物異戊二烯組合物中之異戊二烯以製造異戊烯之化學品，(ii)能夠使異戊烯與選自由異戊烯、丙烯及異丁烯組成之群的單烯烴二聚化以形成二聚烯之化學品，及(iii)能夠完全氫化二聚烯以製造燃料成分之化學品。

在該系統之一些實施例中，生物異戊二烯組合物包含大於約2 mg之異戊二烯，且以組合物中所有C5烴之總重量計，包含大於或約99.94重量%之異戊二烯。在該系統之一些實施例中，一或多種能夠使異戊二烯二聚化之化學品包含催化異戊二烯環二聚化之催化劑，該催化劑包含選自由釕催化劑、鎳催化劑、鐵催化劑及鉻催化劑組成之群的催化劑。在該系統之一些實施例中，氫化不飽和異戊二烯二聚體之催化劑包含選自由鈀催化劑、鎳催化劑、釕催化劑及銠催化劑組成之群的催化劑。在該系統之一些實施例中，能夠部分地氫化異戊二烯之化學品包含鈀催化劑。在該系統之一些實施例中，能夠使異戊烯與單烯烴二聚化之化學品包含酸催化劑。

在一態樣中，本發明提供一種包含由本文所述之方法製造之燃料成分的燃料組合物。在一些實施例中，燃料組合

物實質上不含異戊二烯。在一些實施例中，燃料組合物之$\delta^{13}C$值大於-22‰或在-32‰至-24‰之範圍內。

在一些態樣中，本發明提供一種自異戊二烯製造燃料成分之系統，其包含：(a)工業上有益量之高純度異戊二烯；及(b)自高純度異戊二烯之至少一部分製造的燃料成分；其中該工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分經歷化學轉化。

在該系統之一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含大於約2 mg之異戊二烯，且以組合物中所有C5烴之總重量計，包含大於或約99.94重量%之異戊二烯。在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含大於約2 mg之異戊二烯，且包含一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含大於約2 mg之異戊二烯，且包含一或多種選自由以下組成之群的第二化合物：乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二烯、C5異戊二烯醇、2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛(citronellal)、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸

3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯(limonene)、香葉醇(geraniol)(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(citronellol)(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶；其中該第二化合物之量相對於該異戊二烯之量為大於或約0.01%(w/w)。在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含大於約2 mg之異戊二烯，且包含小於或約0.5 μg/L之化合物(組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在一些較佳實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯係由生物過程製造。

在系統之一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的化合物：環狀異戊二烯二聚體及三聚體、線性異戊二烯寡聚物、芳族及脂環族異戊二烯衍生物及氧化異戊二烯衍生物。在一些實施例中，氧化異戊二烯衍生物為選自由源自異戊二烯之醇、酮、酯及醚組成之群的化合物。

在一些實施例中，燃料成分包含環狀異戊二烯二聚體，且化學轉化包含異戊二烯二聚反應。在一些實施例中，藉由加熱工業上有益量之高純度異戊二烯進行二聚反應。在一些實施例中，異戊二烯二聚反應製造包含不飽和異戊二烯二聚體之產物，且化學轉化進一步包含不飽和異戊二烯二聚體之氫化反應。在一些實施例中，系統進一步包含催化不飽和異戊二烯二聚體之氫化反應的催化劑。在一些實

施例中，催化不飽和異戊二烯二聚體之氫化反應的催化劑包含選自由鈀催化劑、鎳催化劑、釕催化劑及銠催化劑組成之群的催化劑。

在一些實施例中，藉由使工業上有益量之高純度異戊二烯與催化異戊二烯環二聚化之催化劑接觸來進行二聚反應。在一些實施例中，催化異戊二烯環二聚化之催化劑包含選自由釕催化劑、鎳催化劑、鐵催化劑及鉻催化劑組成之群的催化劑。在一些實施例中，催化異戊二烯環二聚化之催化劑為鎳催化劑，且燃料成分包含異戊二烯之一或多種八員環二聚體。

在一些實施例中，燃料成分包含異戊二烯之線性及/或環狀三聚體，且化學轉化包含異戊二烯之催化三聚。

在一態樣中，本發明提供一種自異戊二烯製造燃料成分之方法，其包含：(a)獲得工業上有益量之高純度異戊二烯；及(b)使該工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分。在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含生物異戊二烯。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯係由包含以下之步驟獲得：(i)在適於製造異戊二烯之培養條件下培養包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸的細胞，其中該等細胞(1)製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，(2)使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過約0.002莫耳%轉化成異戊二烯，或(3)使異戊二烯之平均體積生產力大於約0.1 mg異戊二烯/$L_{培養液}$/h；及(ii)製造異戊二烯。在一些

實施例中，細胞進一步包含編碼異戊二烯合成酶多肽或MVA途徑多肽之異源核酸。

在本文所述方法之一些實施例中，使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分包含：(i)將工業上有益量之高純度異戊二烯加熱至約150℃至約250℃；(ii)使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分轉化成不飽和環狀異戊二烯二聚體；(iii)氫化不飽和環狀異戊二烯二聚體以製造飽和環狀異戊二烯二聚體；及(iv)製造燃料成分。在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯中至少約20%至約100%之異戊二烯轉化成不飽和環狀異戊二烯二聚體。

在方法之一些實施例中，使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分包含：(i)使工業上有益量之高純度異戊二烯與催化異戊二烯環二聚化之催化劑接觸；(ii)使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分轉化成環狀異戊二烯二聚體；及(iii)製造燃料成分。

在方法之一些實施例中，使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分包含：(i)使工業上有益量之高純度異戊二烯與催化異戊二烯環二聚化之催化劑接觸；(ii)使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分轉化成不飽和環狀異戊二烯二聚體；(iii)氫化不飽和環狀異戊二烯二聚體以製造飽和環狀異戊二烯二聚體；及(iv)製造燃料成分。在方法之一些實施例中，催化異戊二烯環二聚化之催化劑包含選自由鎳催化劑、鐵催化劑及鉻

催化劑組成之群的催化劑。

在方法之一些實施例中，使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分包含：(i)使高純度異戊二烯組合物與催化劑系統接觸；(ii)使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和異戊二烯二聚體及/或三聚體；及(iii)氫化不飽和二聚體及/或三聚體以製造飽和C10及/或C15烴。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成氧化異戊二烯衍生物；及視情況，(c)氫化任何不飽和氧化異戊二烯衍生物以製造飽和氧化物(oxygenate)。在一些實施例中，氧化異戊二烯衍生物為選自由源自異戊二烯之醇、酮、酯及醚組成之群的化合物。

在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包含在使工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分之前，純化該工業上有益量之高純度異戊二烯。

在一態樣中，提供一種自異戊二烯製造燃料成分之連續製程，其包含：(a)連續製造工業上有益量之高純度異戊二烯；及(b)連續使該工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分。在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含含異戊二烯之氣相。在一些實施例中，該方法進一步包含將包含異戊二烯之氣相通至使

工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分的反應器中。在一較佳實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含生物異戊二烯。

亦提供一種包含由本文所述之任何方法製造之燃料成分的燃料組合物。在一些實施例中，燃料成分包含小於或約0.5 μg/L之在經歷根據本文所述方法之步驟之後來自非異戊二烯之C5烴的產物。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種在經歷根據本文所述方法之步驟之後來自一或多種化合物之產物，該一或多種化合物係選自由以下組成之群：乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二烯、C5異戊二烯醇、2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。

在一些實施例中，燃料組合物包含$\delta^{13}C$值大於-22‰之燃料組成。在一些實施例中，燃料組合物之$\delta^{13}C$值在-22‰

至-10‰或-34‰至-24‰之範圍內。在一些實施例中，燃料組合物之f_M值大於0.9。亦提供本文所述之任何燃料組合物與基於石油之燃料之摻合物，以總燃料組合物之總重量或總體積計，該基於石油之燃料之量為約1%至約95%(以重量計或體積計)。

【實施方式】

本發明特別提供自異戊二烯製造燃料成分之組合物及方法。本文中提供燃料成分或添加劑，例如環狀異戊二烯二聚體及三聚體、線性異戊二烯寡聚物、芳族及脂環族異戊二烯衍生物及氧化異戊二烯衍生物。可藉由化學轉化包含工業上有益量之高純度異戊二烯之起始物質來製造燃料成分。在一態樣中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含生物異戊二烯。在另一態樣中，工業上有益量之高純度異戊二烯可為生物異戊二烯。在另一態樣中，工業上有益量之高純度異戊二烯可為藉由培養表現異源異戊二烯合成酶之細胞而製造之高純度異戊二烯組合物。在其他態樣中，高純度異戊二烯進行寡聚以形成不飽和異戊二烯寡聚物，諸如環狀二聚體或三聚體及線性寡聚物。可氫化不飽和寡聚物以製造飽和烴燃料成分。在某一實施例中，在酸催化劑存在下高純度異戊二烯與醇之反應製造燃料氧化物。在另一態樣中，部分地氫化高純度異戊二烯以製造異戊烯。在一些實施例中，源自高純度異戊二烯之異戊烯產物進行二聚化以形成異癸烯。在一些實施例中，在酸催化劑存在下源自高純度異戊二烯之異戊烯產物與醇反應以製造燃料氧

化物。

源自可再生碳之生物異戊二烯可經由化學催化而轉化成多種烴燃料。本文中提供自醱酵回收異戊二烯，隨後經由化學催化成分子量較高之化合物而轉化成烴燃料之方法。此等方法包括(但不限於)自醱酵釋出氣體中回收並純化異戊二烯，隨後進行氣相或液相催化以提供具有燃料價值之化合物。連續與分批模式之製程均涵蓋於本發明之範疇內。

如本文進一步詳述，生物異戊二烯組合物與石油異戊二烯組合物之區別在於生物異戊二烯組合物實質上不含石油異戊二烯組合物中通常存在之任何污染性不飽和C5烴，諸如(但不限於)1,3-環戊二烯、反-1,3-戊二烯、順-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔及順-戊-3-烯-1-炔。若有任何污染性不飽和C5烴存在於本文所述之生物異戊二烯起始物質中，則其以低於石油異戊二烯組合物中之含量存在。因此，本文所述之源自生物異戊二烯組合物之任何燃料產物基本上不含，或以低於源自石油異戊二烯之燃料產物中之含量含有任何污染性不飽和C5烴或源自該等污染性不飽和C5烴之產物。另外，生物異戊二烯組合物中之硫含量低於石油異戊二烯組合物中之硫含量。源自生物異戊二烯組合物之燃料產物所含硫之含量低於源自石油異戊二烯之燃料產物中。

生物異戊二烯與石油異戊二烯之區別在於生物異戊二烯

係以石油異戊二烯組合物中不存在或以低得多的含量存在之其他生物副產物(與生物異戊二烯一起獲得之源自生物來源及/或相關生物過程的化合物)，諸如醇、醛、酮及其類似物製造。生物副產物可包括(但不限於)乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二烯、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)、2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、2,3-環庚烯醇吡啶或線性異戊二烯聚合物(諸如源自多個異戊二烯單元的聚合之線性異戊二烯二聚體或線性異戊二烯三聚體)。源自生物異戊二烯之燃料產物含有一或多種生物副產物或源自任何生物副產物之化合物。另外，源自生物異戊二烯之燃料產物可含有在後續化學轉化期間自此等生物副產物形成之化合物。該等化合物之實例包括源自親二烯物與異戊二烯或其燃料衍生物之狄爾斯-阿爾德環化加成(Diels-Alder

cycloaddition)、異戊二烯或燃料衍生物之氧化的化合物。

另外，生物異戊二烯與石油異戊二烯之區別在於碳指紋。在一態樣中，生物異戊二烯相比石油異戊二烯具有較高放射性碳-14(^{14}C)含量或較高$^{14}C/^{12}C$比率。生物異戊二烯係自可再生碳源製造，因此生物異戊二烯中之^{14}C含量或$^{14}C/^{12}C$比率與當前大氣中相同。另一方面，石油異戊二烯係源自數千年至數百萬年前沈積之化石燃料，因此^{14}C含量或$^{14}C/^{12}C$比率由於放射性衰變而降低。如本文更詳細論述，源自生物異戊二烯之燃料產品相比源自石油異戊二烯之燃料產品具有較高^{14}C含量或$^{14}C/^{12}C$比率。在一實施例中，源自本文所述之生物異戊二烯之燃料產品具有類似於大氣中之^{14}C含量或$^{14}C/^{12}C$比率。在另一態樣中，生物異戊二烯可以分析方法由穩定的碳同位素比率($^{13}C/^{12}C$)與石油異戊二烯相區分，該碳同位素比率可以符號$\delta^{13}C$所表示之「δ值」形式報導。舉例而言，對於源自石油精煉廠之C_5流之萃取蒸餾的異戊二烯，$\delta^{13}C$為約-22‰至約-24‰。此範圍為源自石油之輕質不飽和烴之典型範圍，且源自基於石油之異戊二烯之產物通常含有$\delta^{13}C$相同之異戊二烯單元。藉由使源於玉米之葡萄糖($\delta^{13}C$為-10.73‰)與最少量之其他含碳營養素(例如酵母提取物)醱酵而製造之生物異戊二烯製得可聚合成$\delta^{13}C$為-14.66‰至-14.85‰之聚異戊二烯的異戊二烯。預期自該生物異戊二烯製造之產物相比源自基於石油之異戊二烯之產物具有較小負值之$\delta^{13}C$值。

由此等方法製成之化合物包括環狀異戊二烯二聚體及三聚體、線性寡聚物、芳族及脂環族衍生物。二異戊烯係由包含部分氫化生物異戊二烯組合物之方法製成。異戊二烯之此等化學衍生物適用作液體運輸燃料(IsoFuels™)且適用作燃料添加劑。

本文中亦提供製造異戊二烯之氧化衍生物之方法，該等衍生物包括醇、酮、酯及醚。亦可在液相或氣相中使用均相及異相催化劑進行合成異戊二烯之氧化衍生物的方法。此化學類別之化合物亦適用作液體運輸燃料，且可在燃料摻合物中用作燃料氧化物以減少排放且用作燃料改質劑，例如用作柴油之十六烷值增進劑。

儘管異戊二烯可藉由分餾石油而獲得，但此物質之純化昂貴且耗時。C5烴流之石油裂化僅製造約15%異戊二烯。異戊二烯亦天然地由多種微生物、植物及動物物種製造。詳言之，已鑑別兩種生物合成異戊二烯之途徑：甲羥戊酸(mevalonate，MVA)途徑及非甲羥戊酸(non-mevalonate，DXP)途徑。生物反應器中經遺傳工程改造之細胞培養物已較有效地製造較大量、較高純度及/或具有獨特雜質概況之異戊二烯，例如，如以下文獻中所述：2007年12月13日申請之美國臨時專利申請案第61/013,386號及第61/013,574號；WO 2009/076676；2008年7月2日申請之美國臨時專利申請案第61/134,094號、第61/134,947號、第61/134,011號及第61/134,103號；WO 2010/003007；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,163號；

WO 2010/031079；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,186號；WO 2010/031062；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,189號；WO 2010/031077；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,200號；WO 2010/031068；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,204號；WO 2010/031076；2008年12月30日申請之美國臨時專利申請案第61/141,652號；PCT/US09/069862；2008年12月15日申請之美國專利申請案第12/335,071號(US 2009/0203102 A1)；及2009年4月23日申請之美國專利申請案第12/429,143號(US 2010/0003716 A1)，該等文獻以全文引用的方式併入。

定義

除非本文另有規定，否則本文中所用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般技術者通常所理解相同之含義。儘管類似或等效於本文所述之任何方法及物質均可用於實施本發明，但本文中描述較佳方法及物質。因此，藉由參考通篇說明書更全面地描述下文緊接著定義之術語。所引用之所有文獻均在相關部分以引用的方式併入本文中。然而，對任何文獻之引用均不視為承認其為關於本發明之先前技術。

除非本文另有明確指示，否則本文中所用之單數術語「一」及「該」包括複數個提及物。

本說明書通篇所給出之每個最大數值限制欲包括每個較

低數值限制，如同該等較低數值限制明確寫入本文中一般。本說明書通篇所給出之每個最小數值限制將包括每個較高數值限制，如同該等較高數值限制明確寫入本文中一般。本說明書通篇所給出之每個數值範圍將包括處於該較寬數值範圍內的每個較窄數值範圍，如同該等較窄數值範圍皆明確寫入本文中一般。

術語「異戊二烯」係指2-甲基-1,3-丁二烯(CAS編號78-79-5)，其為自3,3-二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)消除焦磷酸而得到之直接及最終揮發性C5烴產物，且並不涉及IPP分子與DMAPP分子之鍵聯或聚合。除非本文另有指示，否則術語「異戊二烯」一般不欲受其製造方法限制。

本文中所用之「以生物方法製造之異戊二烯」或「生物異戊二烯」為由任何生物方式製造之異戊二烯，諸如由經遺傳工程改造之細胞培養物、天然微生物、植物或動物製造之異戊二烯。生物異戊二烯組合物通常比自石化來源製造之異戊二烯含有較少烴雜質，且常常需要最少處理來達到聚合級。生物異戊二烯組合物亦具有不同於以石化方法製造之異戊二烯組合物的雜質概況。

本文中所用之IsoFuels™係指包括源自異戊二烯之液體運輸燃料之燃料。BioIsoFuels™係指包括源自生物異戊二烯之液體運輸燃料之燃料。

本文中所用之術語「寡聚」係指組合兩個或兩個以上單體單元之化學過程。異戊二烯之「寡聚」製造源自兩個或兩個以上異戊二烯分子之異戊二烯衍生物，諸如線性異戊

二烯二聚體、環狀異戊二烯二聚體、線性異戊二烯三聚體、環狀異戊二烯三聚體及其類似物。

「完全氫化」定義為通常在氫化催化劑存在下氫氣(H_2)與前驅化合物內所有不飽和官能基(諸如碳碳雙鍵)加成得到完全飽和之產物化合物。舉例而言，異戊二烯之完全氫化形成異戊烷，藉此每莫耳異戊二烯消耗2莫耳H_2。

「部分氫化」定義為通常在氫化催化劑存在下氫氣(H_2)與前驅化合物內至少一個、但並非所有不飽和官能基(諸如碳碳雙鍵)加成。部分氫化之產物可進一步完全氫化，得到完全飽和之產物化合物。二烯之部分氫化形成一或多種單烯烴。舉例而言，異戊二烯之部分氫化可得到3種異構異戊烯(2-甲基丁-1-烯、2-甲基丁-2-烯及3-甲基丁-1-烯)，藉此每莫耳異戊二烯消耗1莫耳H_2。

「選擇性氫化」定義為通常在氫化催化劑存在下氫氣(H_2)與前驅化合物內至少一個、但並非所有不飽和官能基(諸如碳碳雙鍵)加成，藉此在所選條件下某些不飽和官能基相較其他不飽和基團優先氫化。舉例而言，異戊二烯之選擇性氫化可優先形成2-甲基-2-丁烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁烯或其混合物。

本文中所用之術語「多肽」包括多肽、蛋白質、肽、多肽片段及融合多肽。

本文中所用之「分離之多肽」並非多肽文庫，諸如2、5、10、20、50種或50種以上不同多肽之文庫的一部分，且自與之一起天然存在之至少一種組分分離得到。分離之

多肽可例如藉由表現編碼該多肽之重組核酸而獲得。

「異源多肽」意謂胺基酸序列與同一宿主細胞中天然表現之另一多肽之胺基酸序列不一致的多肽。詳言之，異源多肽與同一宿主細胞中天然所見之野生型多肽不一致。

「密碼子簡併」係指在不影響經編碼多肽之胺基酸序列的情況下允許核苷酸序列變化之遺傳密碼趨異性(divergence)。熟練技術人員充分瞭解使用特定針對既定胺基酸之核苷酸密碼子的特定宿主細胞所展現之「密碼子偏向性(codon-bias)」。因此，當合成使宿主細胞中之表現改良之核酸時，在一些實施例中需要設計該核酸，使得其密碼子使用頻率接近於宿主細胞之較佳密碼子使用之頻率。

本文中所用之「核酸」係指兩種或兩種以上以單股或雙股形式共價連接在一起之去氧核糖核苷酸及/或核糖核苷酸。

「重組核酸」意謂相關核酸不含一或多種核酸(例如基因)，該一或多種核酸在產生相關核酸之生物體的天然存在之基因組中側接相關核酸。因此，該術語包括例如併入載體中、併入自主複製之質體或病毒中、或併入原核細胞或真核細胞之基因組DNA中，或不依賴於其他序列以獨立分子(例如cDNA、基因組DNA片段，或藉由PCR或限制性核酸內切酶分解而製造之cDNA片段)之形式存在的重組DNA。

「異源核酸」意謂核酸序列與同一宿主細胞中天然所見之另一核酸之序列不一致的核酸。詳言之，異源核酸與同

一宿主細胞中天然所見之野生型核酸不一致。

本文中所用之「載體」意謂能夠傳遞一或多種相關核酸且理想地於宿主細胞中表現該一或多種相關核酸之構築體。載體之實例包括(但不限於)：質體、病毒載體、DNA或RNA表現載體、黏質體及噬菌體載體。

本文中所用之「表現控制序列」意謂引導相關核酸轉錄之核酸序列。表現控制序列可為啟動子，諸如組成性或誘導性啟動子；或可為強化子。「誘導性啟動子」為在環境或發育調控下具活性之啟動子。表現控制序列可操作地連接於待轉錄之核酸區段。

術語「選擇性標記物」或「可選擇標記物」係指能夠於宿主細胞中表現，使得易於選擇含有所引入之核酸或載體之宿主細胞的核酸。可選擇標記物之實例包括(但不限於)抗生素抗性核酸(例如康黴素(kanamycin)、胺苄青黴素(ampicillin)、羧苄青黴素(carbenicillin)、慶大黴素(gentamicin)、潮黴素(hygromycin)、腐草黴素(phleomycin)、博萊黴素(bleomycin)、新黴素(neomycin)或氯黴素(chloramphenicol))及/或賦予宿主細胞以代謝優勢(諸如營養優勢)之核酸。例示性營養選擇性標記物包括此項技術中已知之標記物，如*amd*S、*arg*B及*pyr4*。

組合物及系統

源自石化來源之異戊二烯通常為不純C5烴餾份，該物質在適於聚合或其他化學轉化之前需要大量純化。若數種雜質之結構類似於異戊二烯且可充當聚合催化劑毒物，則該

等雜質尤其成問題。該等化合物包括(但不限於)1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯及反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔及順-戊-3-烯-1-炔。如下文詳述，以生物方法製造之異戊二烯在未經歷大量純化之情況下可實質上不含任何污染性不飽和C5烴。一些以生物方法製造之異戊二烯組合物含有乙醇、丙酮及C5異戊二烯醇。此等組分相比源自石化來源之異戊二烯組合物中存在之異構C5烴餾份較容易自異戊二烯流中移除。另外，此等雜質可在生物過程中加以管理，例如經由製造菌株、碳原料之遺傳修飾，替代性醱酵條件，回收過程改變，及其他或替代性純化方法加以管理。

在一態樣中，本發明提供自異戊二烯製造燃料成分之組合物及系統，其包含：(a)工業上有益量之高純度異戊二烯起始組合物；及(b)自高純度異戊二烯起始物質之至少一部分製造的燃料成分；其中該工業上有益量之高純度異戊二烯起始組合物之至少一部分經歷化學轉化。使高純度異戊二烯起始物質進行化學反應以製造工業上有益量之適用於製造燃料之產物。在一態樣中，工業上有益量之高純度異戊二烯包含生物異戊二烯。在一態樣中，工業上有益量之高純度異戊二烯可為生物異戊二烯。

例示性起始異戊二烯組合物

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始組合物包含大於或約2、5、10、20、30、40、50、60、

70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000 mg之異戊二烯。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含大於或約2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 g之異戊二烯。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含大於或約0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000 kg之異戊二烯。在一些實施例中，起始組合物中異戊二烯之量為約2至約5,000 mg，諸如約2至約100 mg、約100至約500 mg、約500至約1,000 mg、約1,000至約2,000 mg、或約2,000至約5,000 mg。在一些實施例中，起始組合物中異戊二烯之量為約20至約5,000 mg、約100至約5,000 mg、約200至約2,000 mg、約200至約1,000 mg、約300至約1,000 mg、或約400至約1,000 mg。在一些實施例中，起始組合物中異戊二烯之量為約2至約5,000 g，諸如約2至約100 g、約100至約500 g、約500至約1,000 g、約1,000至約2,000 g、或約2,000至約5,000 g。在一些實施例中，起始組合物中異戊二烯之量為約2至約5,000 kg、約10至約2,000 kg、約20至約1,000 kg、約20至約500 kg、約30至約200 kg、或約40至約100 kg。在一些實施例中，異戊二烯超過或約為起始組合物之揮發性有機部分的20、25、30、40、50、60、70、80、90或95%(w/w)。

在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，高純度異戊二烯起始組合物包含大於或約98.0、98.5、99.0、99.5或100重量%之異戊二烯。在一些實施例

中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，高純度異戊二烯起始組合物包含大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之偵測器回應值計，起始組合物中異戊二烯之相對偵測器回應值大於或約為98.0、98.5、99.0、99.5或100%。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之偵測器回應值計，起始組合物中異戊二烯之相對偵測器回應值大於或約為99.90、99.91、99.92、99.93、99.94、99.95、99.96、99.97、99.98、99.99或100%。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，起始異戊二烯組合物包含約98.0至約98.5重量%、約98.5至約99.0重量%、約99.0至約99.5重量%、約99.5至約99.8重量%、約99.8至100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，起始異戊二烯組合物包含約99.90至約99.92重量%、約99.92至約99.94重量%、約99.94至約99.96重量%、約99.96至約99.98重量%、約99.98至100重量%之異戊二烯。

在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，高純度異戊二烯起始組合物包含小於或約2.0、1.5、1.0、0.5、0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-

戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之偵測器回應值計，起始組合物中非異戊二烯之C5烴的相對偵測器回應值小於或約為2.0、1.5、1.0、0.5、0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001%。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之偵測器回應值計，起始組合物中1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔之相對偵測器回應值小於或約為2.0、1.5、1.0、0.5、0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001%。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，高純度異戊二烯起始組合物包含約0.02至約0.04重量%、約0.04至約0.06重量%、約0.06至0.08重量%、約0.08至0.10重量%或約0.10至約0.12重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。

在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物包含小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(起始組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在一些實施例中，起始異

戊二烯組合物包含約0.005至約50 μg/L，諸如約0.01至約10、約0.01至約5、約0.01至約1、約0.01至約0.5或約0.01至約0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(起始組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L之非異戊二烯之烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含約0.005至約50 μg/L，諸如約0.01至約10、約0.01至約5、約0.01至約1、約0.01至約0.5或約0.01至約0.005 μg/L之非異戊二烯之烴。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L之蛋白質或脂肪酸(諸如與天然橡膠天然相關之蛋白質或脂肪酸)。

在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物包含小於或約10、5、1、0.8、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之α-炔烴、間戊二烯、乙腈或1,3-環戊二烯。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含小於或約5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之硫或丙二烯。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含小於或約30、20、15、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之所有炔烴(諸如1-戊炔、2-戊炔、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-

烯-1-炔及順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含小於或約2000、1000、500、200、100、50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之異戊二烯二聚體，諸如環狀異戊二烯二聚體(例如源自兩個異戊二烯單元的二聚化之環狀C10化合物)。

在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物包括乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二烯、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在特定實施例中，起始異戊二烯組合物包含大於或約0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、60、80、100或120 μg/L之乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二烯、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含約0.005至約120 μg/L，諸如約0.01至約80、約0.01至約60、約0.01至約40、約0.01至約30、約0.01至約20、約0.01至約10、約0.1至約80、約0.1至約60、約0.1至約40、約5至約80、約5至約60或約5至約40 μg/L之乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二

烯、C5異戊二烯醇，或前述任意兩者或兩者以上。

在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物包括以下一或多種組分：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、2,3-環庚烯醇吡啶或線性異戊二烯聚合物(諸如源自多個異戊二烯單元的聚合之線性異戊二烯二聚體或線性異戊二烯三聚體)。在多個實施例中，以重量百分比為單位，此等組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為大於或約0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%(w/w)。在一些實施例中，以異戊二烯之偵測器回應值計，第二化合物之相對偵測器回應值大於或約為0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%。在多個實施例中，以重量百分比為單位，此等組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為約0.01至約

105%(w/w)，諸如約0.01至約90、約0.01至約80、約0.01至約50、約0.01至約20、約0.01至約10、約0.02至約50、約0.05至約50、約0.1至約50或0.1至約20%(w/w)。

在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物之至少一部分處於氣相中。在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物之至少一部分處於液相(諸如冷凝物)中。在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物之至少一部分處於固相中。在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物之至少一部分吸附於固體支撐物，諸如包括二氧化矽及/或活性碳之支撐物。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物與一或多種溶劑混合。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物與一或多種氣體混合。

在其他實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始組合物係由生物過程製造。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯起始組合物為藉由培養製造大於約400奈莫耳異戊二烯/公克細胞(細胞濕重)/小時(nmol/g_{wcm}/h)之異戊二烯的細胞而製造之生物異戊二烯組合物。在一實施例中，藉由培養使細胞培養基中超過約0.002%之碳轉化成異戊二烯之細胞來製造生物異戊二烯組合物。在其他實施例中，細胞具有如下異源核酸：(i)編碼異戊二烯合成酶多肽，例如來自諸如葛屬(*Pueraria*)之植物的天然存在之多肽；及(ii)可操作地連接於啟動子，例如T7啟動子。來自例如楊屬之其他異戊二烯合成酶多肽、及天然存在之異戊二烯合成酶以及親本異戊二烯合成酶之變異體可用於製造生物異戊二

烯。可使用之異戊二烯合成酶及其變異體之實例描述於美國申請案第12/429,143號中，該案以全文併入本文中。

在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油(glycerol)、丙三醇(glycerine)、二羥基丙酮、單碳源(one-carbon source)、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。在某一實施例中，細胞進一步包含編碼IDI多肽之異源核酸。在一些實施例中，細胞進一步包含編碼MDV途徑多肽之異源核酸。在某一實施例中，起始異戊二烯組合物為所述異戊二烯組合物或藉由培養以下文獻中所述之任何細胞來製造：2008年7月2日申請之美國臨時專利申請案第61/134,094號，WO 2010/003007，及2008年12月15日申請之美國專利申請案第12/335,071號(US 2009/0203102 A1)，其以全文引用的方式併入。

在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物包含由製造異戊二烯之培養中細胞產生之氣相(釋出氣體)。在一些實施例中，氣相具有非可燃濃度之異戊二烯。在一些實施例中，氣相包含小於約9.5%(體積)之氧氣。在一些實施例中，氣相包含大於或約9.5%(體積)之氧氣，且氣相中異戊二烯之濃度低於可燃下限或高於可燃上限。在一些實施例

中，氣相中非異戊二烯之部分包含約0%至約100%(體積)之氧氣，諸如約10%至約100%(體積)之氧氣。在一些實施例中，氣相中非異戊二烯之部分包含約0%至約99%(體積)之氮氣。在一些實施例中，氣相中非異戊二烯之部分包含約1%至約50%(體積)之CO_2。

在一些實施例中，高純度異戊二烯起始組合物包括以下一或多者：醇、醛、酮或酯(諸如本文所述之任何醇、醛、酮或酯)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包括(i)醇及醛，(ii)醇及酮，(iii)醛及酮，或(iv)醇、醛及酮。在一些實施例中，任何異戊二烯組合物均進一步包括酯。

在一些實施例中，源自生物來源(諸如細胞培養物)之高純度異戊二烯起始組合物含有以下一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物含有1 ppm或1 ppm以上之下列一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物(諸如純化前之釋出氣體)中以下一或多者之濃度為約1至約10,000 ppm：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物(諸如已經歷一或多個純化步驟之後的釋出氣體)包括以下一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲

基-1-丁醇或吲哚，其濃度為約1至約100 ppm，諸如約1至約10 ppm、約10至約20 ppm、約20至約30 ppm、約30至約40 ppm、約40至約50 ppm、約50至約60 ppm、約60至約70 ppm、約70至約80 ppm、約80至約90 ppm、或約90至約100 ppm。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物含有小於1 ppm之甲硫醇(有效催化劑毒物，及最終燃料產物中硫之來源)。可使用標準方法，諸如本文所述之彼等方法或其他標準方法(諸如質子轉移反應-質譜法)分析來自細胞培養物之揮發性有機化合物(諸如細胞培養物之頂部空間氣體中之揮發性有機化合物)(參見，例如Bunge等人，*Applied and Environmental Microbiology*, 74(7):2179-2186, 2008，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於揮發性有機化合物之分析)。

本發明亦涵蓋源自共同製造異戊二烯與氫氣之生物來源(諸如細胞培養物)之高純度異戊二烯起始組合物的用途。在一些實施例中，起始生物異戊二烯組合物包含異戊二烯及氫氣，其比率範圍為每3莫耳%之氫氣至少1莫耳%之異戊二烯至每4莫耳%之氫氣至少1莫耳%之異戊二烯。在一些實施例中，起始生物異戊二烯組合物包含異戊二烯及氫氣，其莫耳比為約1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2或9:1。在一些實施例中，組合物進一步包含1至11莫耳%之異戊二烯及4至44莫耳%之氫氣。在一些實施例中，組合物進一步包含氧氣、二氧化碳或氮氣。在一些實施例中，組合物進一步包含0至21莫耳%之氧氣、18至44莫耳%

之二氧化碳及0至78莫耳%之氮氣。在一些實施例中，組合物進一步包含1.0×10^{-4}莫耳%或1.0×10^{-4}莫耳%以下之非甲烷揮發性雜質。在一些實施例中，非甲烷揮發性雜質包含以下一或多者：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、2,3-環庚烯醇吡啶或線性異戊二烯聚合物(諸如源自多個異戊二烯單元的聚合之線性異戊二烯二聚體或線性異戊二烯三聚體)。在一些實施例中，非甲烷揮發性雜質包含以下一或多者：異戊二烯組合物包括以下一或多者：醇、醛或酮(諸如本文所述之任何醇、醛或酮)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包括(i)醇及醛，(ii)醇及酮，(iii)醛及酮，或(iv)醇、醛及酮。在一些實施例中，非甲烷揮發性雜質包含以下一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。

在製造異戊二烯之細胞之培養物中製造異戊二烯之技術

描述於以下文獻中：2007年12月13日申請之美國臨時專利申請案第61/013,386號及第61/013,574號；WO 2009/076676；2008年7月2日申請之美國臨時專利申請案第61/134,094號、第61/134,947號、第61/134,011號及第61/134,103號；WO 2010/003007；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,163號；WO 2010/031079；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,186號；WO 2010/031062；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,189號；WO 2010/031077；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,200號；WO 2010/031068；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,204號；WO 2010/031076；2008年12月30日申請之美國臨時專利申請案第61/141,652號；PCT/US09/069862；2008年12月15日申請之美國專利申請案第12/335,071號(US 2009/0203102 A1)；及2009年4月23日申請之美國專利申請案第12/429,143號(US 2010/0003716 A1)，該等文獻之教示內容以引用的方式併入本文中以達成教示由此類製程製造並回收異戊二烯之技術的目的。在任何狀況下，2007年12月13日申請之美國臨時專利申請案第61/013,386號及第61/013,574號；WO 2009/076676；2008年7月2日申請之美國臨時專利申請案第61/134,094號、第61/134,947號、第61/134,011號及第61/134,103號；WO 2010/003007；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,163號；WO 2010/031079；2008年9月15日申請之美國臨時專利申

請案第61/097,186號；WO 2010/031062；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,189號；WO 2010/031077；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,200號；WO 2010/031068；2008年9月15日申請之美國臨時專利申請案第61/097,204號；WO 2010/031076；2008年12月30日申請之美國臨時專利申請案第61/141,652號；PCT/US09/069862；2008年12月15日申請之美國專利申請案第12/335,071號(US 2009/0203102 A1)；及2009年4月23日申請之美國專利申請案第12/429,143號(US 2010/0003716 A1)教示在細胞培養物中製造較高量之異戊二烯的組合物及方法。2008年12月15日申請之美國專利申請案第12/335,071號及US 2009/0203102 A1進一步教示自已培養細胞共同製造異戊二烯與氫氣之組合物及方法。詳言之，此等組合物及方法增加異戊二烯製造速率且增加所製造之異戊二烯之總量。舉例而言，已製造出產生4.8×10^4 nmol/g_{wcm}/h的異戊二烯之細胞培養系統(表1)。此等系統之效率係由細胞自細胞培養基中消耗之碳有約2.2%轉化成異戊二烯來證實。如實例及表2中所示，每公升培養液產生約3 g異戊二烯。必要時，可使用其他條件，諸如本文所述之彼等條件獲得甚至更高量之異戊二烯。在一些實施例中，使用可再生碳源製造異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯製造與細胞生長相分離。在一些實施例中，異戊二烯及任何氧化劑之濃度均處於非可燃範圍內以降低或消除在製造或回收異戊二烯期間可能起火之風險。該等組合物

及方法為理想的，因為其使每個細胞之異戊二烯產率較高、碳產率較高、異戊二烯純度較高、生產力較高、能量使用較少、製造成本及投資較低及副反應最少。異戊二烯製造之此有效且大規模的生物合成過程向合成異戊二烯基產品(諸如橡膠)提供異戊二烯來源且提供替代使用天然橡膠之理想且低成本的方法。

如下文進一步論述，可藉由將編碼異戊二烯合成酶多肽(例如植物異戊二烯合成酶多肽)之異源核酸引入細胞中來大幅增加細胞所製造之異戊二烯之量。異戊二烯合成酶多肽使二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)轉化成異戊二烯。如實例中所示，使異源山葛(*Pueraria Montana*)(野葛(kudzu))異戊二烯合成酶多肽於多種宿主細胞，諸如大腸桿菌(*Escherichia coli*)、檸檬泛菌(*Panteoa citrea*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)及里氏木黴(*Trichoderma reesei*)中表現。與不含異源異戊二烯合成酶多肽之相應細胞相比，所有此等細胞皆製造較多異戊二烯。如表1及表2中所說明，使用本文所述之方法製造大量異戊二烯。舉例而言，與不含異源異戊二烯合成酶核酸之相應對照枯草桿菌(*B. subtilis*)細胞相比，含有該異源核酸之枯草桿菌細胞在14公升醱酵槽中製造約10倍多的異戊二烯(表2)。在醱酵槽中大腸桿菌製造300毫克異戊二烯/公升培養液(mg/L，其中培養液體積包括細胞培養基體積與細胞體積)且枯草桿菌製造30 mg/L之異戊二烯，此指示可產生大量異戊二烯(表2)。必要時，可在甚至更大規模

下製造異戊二烯，或可使用本文所述之其他條件來進一步增加異戊二烯之量。表1及表2中所列之載體、及實驗條件在下文及實例章節中更詳細地描述。

表1：在震盪燒瓶中使用本文所述之細胞培養物及方法所得到之異戊二烯之例示性產率。量測異戊二烯產量之檢驗描述於實例I部分II中。對於此檢驗，在一或多個時間點自震盪燒瓶中移出樣品且培養30分鐘。接著量測此樣品中所製造之異戊二烯之量。異戊二烯製造之頂部空間濃度及比速率列於表1中且於本文中進一步描述。

菌株	於頂部空間小瓶中製造異戊二烯*	
	頂部空間濃度 $\mu g/L_{氣體}$	比速率 $\mu g/L_{培養液}/h/OD$ ($nmol/g_{wcm}/h$)
大腸桿菌BL21/pTrcKudzu IS	1.40	53.2 (781.2)
大腸桿菌BL21/pCL DXS yidi野葛IS	7.61	289.1 (4.25×10^3)
具有野葛IS及整個MVA途徑之大腸桿菌BL21/MCM127	23.0	874.1 (1.28×10^4)
大腸桿菌BL21/pET N-HisKudzu IS	1.49	56.6 (831.1)
檸檬泛菌/pTrcKudzu IS	0.66	25.1 (368.6)
大腸桿菌w/楊屬IS [Miller (2001)]	-	5.6 (82.2)
地衣桿菌(*Bacillis licheniformis*)Fall US 5849970	-	4.2 (61.4)
具有野葛異戊二烯合成酶之解脂耶氏酵母	約0.05 μg/L	約2 (約30)
具有野葛異戊二烯合成酶之里氏木黴	約0.05 μg/L	約2 (約30)
具有野葛IS及下游MVA途徑之大腸桿菌BL21/pTrcKKD$_y$I$_k$IS	85.9	3.2×10^3 (4.8×10^4)

*在密封頂部空間小瓶中針對1 mL、1 OD_{600}、培養1小時進行校正，液體與頂部空間氣體體積比為1:19。

表2：在醱酵槽中使用本文所述之細胞培養物及方法所得到之異戊二烯之例示性產率。量測異戊二烯產量之檢驗描述於實例I部分II中。對於此檢驗，獲取醱酵槽之釋出氣體之樣品且分析異戊二烯之量。峰值頂部空間濃度(醱酵期間之最高頂部空間濃度)、力價(每公升培養液所製造之異戊二烯之累積總量)及異戊二烯製造之峰值比速率(醱酵期間之最高比速率)列於表2中且於本文中進一步描述。

菌株	於醱酵槽中製造異戊二烯		
	峰值頂部空間濃度** ($\mu g/L_{氣體}$)	力價 ($mg/L_{培養液}$)	峰值比速率 $\mu g/L_{培養液}/h/OD$ ($nmol/g_{wcm}/h$)
具有野葛IS之大腸桿菌BL21/pTrcKudzu	52	41.2	37 (543.3)
大腸桿菌FM5/pTrcKudzu IS	3	3.5	21.4 (308.1)
大腸桿菌BL21/三合一菌株(DXS、yidi、IS)	285	300	240 (3.52×10^3)
大腸桿菌FM5/三合一菌株(DXS、yidi、IS)	50.8	29	180.8 (2.65×10^3)
具有野葛IS及整個MVA途徑之大腸桿菌/MCM127	3815	3044	992.5 (1.46×10^4)
大腸桿菌BL21/pCLPtrc Upper Pathway gi1.2整合下游途徑pTrcKudzu	2418	1640	1248 (1.83×10^4)
具有4×50 μM IPTG之大腸桿菌BL21/MCM401	13991	23805	3733 (5.49×10^4)
具有2×1000 μM IPTG之大腸桿菌BL21/MCM401	22375	19541	5839.5 (8.59×10^4)
大腸桿菌BL21/pCLPtrc UpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS	3500	3300	1088 (1.60×10^4)
野生型枯草桿菌	1.5	2.5	0.8 (11.7)
桿菌屬(*Bacillus*)pBS野葛IS	16.6	約30 (經100小時)	5 (73.4)
馬堡桿菌(*Bacillus Marburg*)6051 [Wagner及Fall (1999)]	2.04	0.61	24.5 (359.8)
馬堡桿菌6051 Fall US 5849970	0.7	0.15	6.8 (100)
大腸桿菌BL21/pCLPtrcUpperPathway及gil.2KKDyI及pTrcAlba-mMVK	2.03×10^4	3.22×10^4	5.9×10^3 (8.66×10^4)
大腸桿菌BL21/pCLPtrcUpper Pathway及gi1.2KKDyI及pTrcAlba-mMVK與pBBRCMPGI1.5pgl	3.22×10^4	6.05×10^4	1.28×10^4 (1.88×10^5)

**針對1 vvm之釋出氣體流動速率(1體積釋出氣體/公升$_{培養液}$/分鐘)進行校正。

另外，可藉由增加細胞所表現之1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)多肽及/或異戊烯基二磷酸異構酶(IDI多肽之量來增強含有異源異戊二烯合成酶核酸之細胞製造異戊二烯。舉例而言，可將DXS核酸及/或IDI核酸引入細胞中。DXS核酸可為異源核酸、或內源核酸之複本。類似地，IDI核酸可為異源核酸、或內源核酸之複本。在一些實施例中，藉由將內源DXS及/或IDI啟動子或調控區置換為增強DXS及/或IDI核酸之轉錄之其他啟動子及/或調控區來增加DXS及/或IDI多肽之量。在一些實施例中，細胞含有編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸(例如植物異戊二烯合成酶核酸)、及編碼異戊二烯合成酶多肽之內源核酸之複本。

經編碼之DXS及IDI多肽為生物合成異戊二烯之DXP途徑之一部分(圖19A)。DXS多肽使丙酮酸及D-甘油醛-3-磷酸轉化成1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸。在不欲受任何特定理論約束下，咸信增加DXS多肽之量會增加通過DXP途徑之碳流量，從而使得異戊二烯產量較高。IDI多肽催化異戊烯基二磷酸(IPP)與二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)相互轉化。在不欲受任何特定理論約束下，咸信增加細胞中IDI多肽之量會增加轉化成DMAPP(繼而轉化成異戊二烯)之IPP的量(及轉化率)。

舉例而言，使用具有野葛異戊二烯合成酶、釀酒酵母(*S. cerevisia*) IDI及大腸桿菌DXS核酸之大腸桿菌細胞的醱酵來製造異戊二烯。異戊二烯含量經15小時時期自50 μg/L變

為300 μg/L(實例7部分VII)。

在一些實施例中，異源或額外內源異戊二烯合成酶、IDI及DXS核酸之存在使得細胞與僅具有此等異源或額外內源核酸中之一或兩者的相應細胞相比，生長更具再現性或保持活力更長時間。舉例而言，含有異源異戊二烯合成酶、IDI及DXS核酸之細胞與僅具有異源異戊二烯合成酶及DXS核酸或僅具有異源異戊二烯合成酶核酸之細胞相比，生長情況更好。又，異源異戊二烯合成酶、IDI及DXS核酸成功地可操作地連接於由大腸桿菌細胞維持之高複本質體上之強啟動子，表明大量此等多肽可於細胞中表現，而對細胞不產生過量毒性。在不欲受特定理論約束下，咸信異源或額外內源異戊二烯合成酶及IDI核酸之存在可降低一或多種具潛在毒性之中間物的量，否則若細胞中僅存在異源或額外內源DXS核酸，則該一或多種中間物會積累。

在一些實施例中，藉由增加細胞所表現之MVA多肽之量來增強含有異源異戊二烯合成酶核酸之細胞製造異戊二烯(圖19A及圖19B)。例示性MVA途徑多肽包括以下任何多肽：乙醯基-CoA乙醯轉移酶(AA-CoA硫解酶)多肽、3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA合成酶(HMG-CoA合成酶)多肽、3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA還原酶(HMG-CoA還原酶)多肽、甲羥戊酸激酶(MVK)多肽、磷酸甲羥戊酸激酶(PMK)多肽、二磷酸甲羥戊酸去羧酶(MVD)多肽、磷酸甲羥戊酸去羧酶(PMDC)多肽、異戊烯基磷酸激酶(IPK)多肽、IDI多

肽，及具有兩種或兩種以上MVA途徑多肽之活性的多肽(例如融合多肽)。舉例而言，可將一或多種MVA途徑核酸引入細胞中。在一些實施例中，細胞含有上游MVA途徑，其包括AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合成酶及HMG-CoA還原酶核酸。在一些實施例中，細胞含有下游MVA途徑，其包括MVK、PMK、MVD及IDI核酸。在一些實施例中，細胞含有整個MVA途徑，其包括AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合成酶、HMG-CoA還原酶、MVK、PMK、MVD及IDI核酸。在一些實施例中，細胞含有整個MVA途徑，其包括AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合成酶、HMG-CoA還原酶、MVK、PMDC、IPK及IDI核酸。MVA途徑核酸可為異源核酸、或內源核酸之複本。在一些實施例中，藉由將MVA途徑核酸之內源啟動子或調控區置換為增強MVA途徑核酸的轉錄之其他啟動子及/或調控區來增加一或多種MVA途徑多肽之量。在一些實施例中，細胞含有編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸(例如植物異戊二烯合成酶核酸)、及編碼異戊二烯合成酶多肽之內源核酸之複本。

舉例而言，含有編碼野葛異戊二烯合成酶多肽之核酸及編碼釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)MVK、PMK、MVD及IDI多肽之核酸的大腸桿菌細胞以6.67×10^{-4} mol/L$_{培養液}$/OD_{600}/h之速率產生異戊二烯(參見實例8)。另外，具有編碼糞腸球菌(*Enterococcus faecalis*)AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合成酶及HMG-CoA還原酶多肽之核酸的大腸桿菌細胞之14公升醱酵製造22公克甲羥戊酸(MVA途徑之中間物)。

在震盪燒瓶中，此等細胞製造2-4 g/L之甲羥戊酸。此等結果指示異源MVA途徑核酸在大腸桿菌中具活性。含有上游MVA途徑與下游MVA途徑以及野葛異戊二烯合成酶之核酸的大腸桿菌細胞(菌株MCM 127)與僅具有下游MVA途徑及野葛異戊二烯合成酶之核酸的大腸桿菌細胞(菌株MCM 131)相比，製造顯著更多的異戊二烯(874 μg/L)(參見表3及實例8部分VIII)。

在一些實施例中，至少一部分細胞於連續培養物(諸如未經稀釋之連續培養物)中歷經至少約5、10、20、50、75、100、200、300次或300次以上之細胞分裂，維持異源異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，包含異源異戊二烯合成酶、或內源異戊二烯合成酶之複本、DXS、IDI、及/或MVA途徑核酸之核酸亦包含選擇性標記物，諸如康黴素、胺苄青黴素、羧苄青黴素、慶大黴素、潮黴素、腐草黴素、博萊黴素、新黴素或氯黴素抗生素抗性核酸。

如實例7部分VI中所指示，可藉由將酵母提取物添加至細胞培養基中來進一步增加所製造之異戊二烯的量。在此實例中，所製造之異戊二烯之量與細胞培養基中酵母提取物之量就測試濃度而言成線性比例關係(圖48C)。另外，自含有酵母提取物及葡萄糖之細胞培養基製造約0.11公克異戊二烯/公升培養液(實例7部分VIII)。此兩個實驗均使用具有野葛異戊二烯合成酶、釀酒酵母(*S. cerevisia*)IDI及大腸桿菌DXS核酸之大腸桿菌細胞製造異戊二烯。在葡萄

糖存在下增加酵母提取物之量與在酵母提取物存在下增加葡萄糖之量相比可製造更多異戊二烯。又，增加酵母提取物之量使得細胞歷經較長持續時間製造高含量之異戊二烯且改良細胞之健康狀況。

亦使用三種類型之水解生質(甜菜渣、玉米乾草及軟木漿)作為碳源來製造異戊二烯(圖46A-C)。具有野葛異戊二烯合成酶、釀酒酵母IDI及大腸桿菌DXS核酸之大腸桿菌細胞自此等水解生質碳源製造之異戊二烯與自等效量葡萄糖(例如1%葡萄糖，w/v)製造之異戊二烯一般多。必要時，可在本文所述之組合物及方法中使用任何其他生質碳源。生質碳源為理想的，因為其比許多習知細胞培養基便宜，進而有助於經濟地製造異戊二烯。

另外，轉化糖顯示發揮碳源之功能以供產生異戊二烯(圖47C及圖96-98)。舉例而言，自表現MVA途徑多肽及野葛異戊二烯合成酶之細胞製造2.4 g/L之異戊二烯(實例8部分XV)。亦使用甘油作為碳源以自表現野葛異戊二烯合成酶之細胞產生2.2 mg/L之異戊二烯(實例8部分XIV)。除異戊二烯合成酶核酸以外亦表現DXS核酸、IDI核酸及/或一或多種MVA途徑核酸(諸如編碼整個MVA途徑之核酸)可增強自甘油製造異戊二烯。

在一些實施例中，細胞培養基中包括油。舉例而言，含有野葛異戊二烯合成酶核酸之枯草桿菌細胞當於含有油及葡萄糖來源之細胞培養基中培養時製造異戊二烯(實例4部分III)。在另一實例中，含有上游及下游MVA途徑與野葛

異戊二烯合成酶之大腸桿菌fadR atoC突變型細胞當於含有棕櫚油及葡萄糖來源之細胞培養基中培養時製造異戊二烯(實例27部分II)。在一些實施例中，細胞培養基中包括一種以上油(諸如2、3、4、5種或5種以上油)。在不欲受任何特定理論約束下，咸信(i)油可增加細胞中可用於轉化成異戊二烯之碳的量；(ii)油可增加細胞中乙醯基-CoA之量，進而增加通過MVA途徑之碳流量；及/或(ii)油可向細胞提供額外營養素，此為理想的，因為在此類細胞中許多碳轉化成異戊二烯而非其他產物。在一些實施例中，在含有油之細胞培養基中培養之細胞天然地使用MVA途徑製造異戊二烯，或經遺傳修飾而含有整個MVA途徑之核酸。在一些實施例中，油在添加至細胞培養基中之前部分或完全水解以有助於供宿主細胞使用該油。

於細胞(例如細菌)中工業化製造小分子(諸如異戊二烯)之主要障礙之一為使分子製造與細胞生長相分離。在工業上可行地製造異戊二烯之一些實施例中，大量來自原料之碳轉化成異戊二烯，而非用於細胞之生長及維持(「碳效率」)。在多個實施例中，細胞使細胞培養基中大於或約0.0015、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.12、0.14、0.16、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0或8.0%之碳轉化成異戊二烯。在特定實施例中，轉化成下游產物的大部分來自原料之碳轉化成異戊二烯。如實例11中進一步描述，表現MVA途徑及野葛異戊二

烯合成酶核酸之大腸桿菌細胞展現異戊二烯或中間物甲羥戊酸之製造與生長相分離，從而使得碳效率較高。詳言之，由表現來自糞腸球菌之上游MVA途徑之細胞形成甲羥戊酸。由表現來自糞腸球菌之上游MVA途徑、來自釀酒酵母之下游MVA途徑及來自山葛(野葛)之異戊二烯合成酶的細胞形成異戊二烯。此異戊二烯或甲羥戊酸製造與生長相分離在以下四種不同的大腸桿菌菌株中得到證實：BL21(LDE3)、BL21(LDE3) Tuner、FM5及MG1655。前兩種大腸桿菌菌株為B菌株，且後兩者為K12菌株。製造與生長相分離亦在*ack*及*pta*基因缺失之MG1655變異體中得到證實。此變異體亦證實製造較少乙酸鹽。

例示性多肽與核酸

多種異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽與核酸可用於本文所述之組合物及方法中。

在一些實施例中，融合多肽包括第一多肽(例如異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽，或其催化活性片段)之一部分或全部，且可視情況包括第二多肽(例如有助於純化或偵測融合多肽之肽，諸如His標籤)之一部分或全部。在一些實施例中，融合多肽具有兩種或兩種以上MVA途徑多肽(諸如AA-CoA硫解酶及HMG-CoA還原酶多肽)之活性。在一些實施例中，多肽為天然存在之多肽(諸如由糞腸球菌*mvaE*核酸編碼之多肽)，其具有兩種或兩種以上MVA途徑多肽之活

性。

在多個實施例中，多肽具有至少或約50、100、150、175、200、250、300、350、400個或400個以上胺基酸。在一些實施例中，多肽片段含有至少或約25、50、75、100、150、200、300個或300個以上來自全長多肽之相鄰胺基酸，且具有相應全長多肽之至少或約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的活性。在特定實施例中，多肽包括任何天然存在之異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽之區段或整個胺基酸序列。在一些實施例中，多肽與野生型異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽之序列(亦即，天然存在之序列)相比，具有一或多個突變。

在一些實施例中，多肽為分離之多肽。在一些實施例中，多肽為異源多肽。

在一些實施例中，核酸為重組核酸。在一些實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸可操作地連接於編碼另一多肽之全部或一部分的另一核酸，使得重組核酸編碼包括異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽、及另一多肽(例如有助於純化或偵測融合多肽之肽，諸如His標籤)之全部或一部分的融合多肽。在一些實施例中，重組核酸之一部分或全部係以化學方式合成的。應瞭解，包括單一核苷酸突變之突變可在本文所定

義之核酸內發生。

在一些實施例中，核酸為異源核酸。在特定實施例中，核酸包括任何天然存在之異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸之區段或整個核酸序列。在一些實施例中，核酸包括至少或約50、100、150、200、300、400、500、600、700、800個或800個以上來自天然存在之異戊二烯合成酶核酸、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸之相鄰核苷酸。在一些實施例中，核酸與野生型異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸之序列(亦即，天然存在之序列)相比，具有一或多個突變。在一些實施例中，核酸具有一或多個增加異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶或轉錄因子核酸之轉錄或轉譯的突變(例如沉默突變)。在一些實施例中，核酸為編碼異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽之任何核酸的簡併變異體。

例示性異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑多肽與核酸之寄存編號列於附錄1中(附錄1及其相應序列之寄存編號以全文引用的方式併入本文中，尤其關於異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑多肽與核酸之胺基酸及核酸序列)。Kegg資料庫亦含有眾多例示性異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑多肽與核酸之胺基酸及核酸序列(參見，例如全球資訊網「genome.jp/kegg/pathway/

map/map00100.html」及其中之序列，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑多肽與核酸之胺基酸及核酸序列)。在一些實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑多肽及/或核酸中之一或多者的序列與2007年12月12日或2008年9月14日公開可用之序列，諸如對應於附錄1中之任何寄存編號的任何序列或Kegg資料庫中存在之任何序列一致。其他例示性異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑多肽與核酸進一步描述於下文中。

例示性異戊二烯合成酶多肽與核酸

如上所述，異戊二烯合成酶多肽使二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)轉化成異戊二烯。例示性異戊二烯合成酶多肽包括具有異戊二烯合成酶多肽之至少一種活性的多肽、多肽片段、肽及融合多肽。可使用標準方法，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使DMAPP轉化成異戊二烯之能力來判定該多肽是否具有異戊二烯合成酶多肽活性。在例示性檢驗中，如實例1所述，藉由採用震盪燒瓶方法使菌株(例如本文所述之大腸桿菌/pTrcKudzu菌株)生長來製備細胞提取物。誘導完成後，藉由以7000×g離心10分鐘使約10 mL細胞集結成粒，且再懸浮於5 ml不含甘油之PEB中。採用標準程序，使用弗氏細胞壓碎器(French Pressure cell)使細胞溶解。或者，在-80℃下冷凍/解凍後，用溶菌酶(Ready-Lyse溶菌酶溶液；EpiCentre)處理細胞。

細胞提取物中異戊二烯合成酶多肽之活性可例如如Silver等人，*J. Biol. Chem.* 270:13010-13016, 1995及其中之參考文獻所述來量測，各文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯合成酶多肽活性之檢驗。將DMAPP(Sigma)在氮氣流下蒸發至乾燥且於100 mM磷酸鉀緩衝液(pH 8.2)中再水合至100 mM濃度，並儲存於-20℃下。為進行檢驗，將5 μL 1 M $MgCl_2$、1 mM(250 μg/ml) DMAPP、65 μL植物提取緩衝液(PEB)(50 mM Tris-HCl(pH 8.0)、20 mM $MgCl_2$、5%甘油及2 mM DTT)之溶液添加至具有金屬螺旋蓋及經鐵氟龍(teflon)塗覆之矽隔板的20 ml頂部空間小瓶(Agilent Technologies)中之25 μL細胞提取物中，且在37℃、於震盪下培養15分鐘。藉由添加200 μL 250 mM EDTA中止反應，且如實例1部分II所述藉由GC/MS定量。

例示性異戊二烯合成酶核酸包括編碼具有異戊二烯合成酶多肽之至少一種活性之多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。例示性異戊二烯合成酶多肽與核酸包括來自本文所述之任何源生物體的天然存在之多肽與核酸，以及源自本文所述之任何源生物體的突變型多肽與核酸。

在一些實施例中，異戊二烯合成酶多肽或核酸係來自豆科，諸如豆科植物亞科。在一些實施例中，異戊二烯合成酶多肽或核酸為來自山葛(野葛)(Sharkey等人，Plant Physiology 137: 700-712, 2005)、大葛藤(*Pueraria lobata*)、楊屬(諸如銀白楊(*Populus alba*)、黑楊(*Populus nigra*)、毛

果楊(*Populus trichocarpa*)或銀白楊與歐洲山楊雜交種(*Populus alba x tremula*)(CAC35696)，Miller等人，Planta 213: 483-487, 2001)、山楊屬(諸如美洲山楊(*Populus tremuloides*)，Silver等人，JBC 270(22): 13010-1316, 1995)或英國櫟(English Oak/*Quercus robur*)(Zimmer等人，WO 98/02550)之多肽或核酸，各文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯合成酶核酸、及異戊二烯合成酶多肽之表現。適合之異戊二烯合成酶包括(但不限於)根據Genbank寄存編號AY341431、AY316691、AY279379、AJ457070及AY182241所鑑別者，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯合成酶核酸與多肽之序列。在一些實施例中，異戊二烯合成酶多肽或核酸並非來自英國櫟之天然存在之多肽或核酸(亦即，異戊二烯合成酶多肽或核酸為除了來自英國櫟之天然存在之多肽或核酸以外的異戊二烯合成酶多肽或核酸)。在一些實施例中，異戊二烯合成酶核酸或多肽為來自楊屬之天然存在之多肽或核酸。在一些實施例中，異戊二烯合成酶核酸或多肽並非來自楊屬之天然存在之多肽或核酸。

例示性DXS多肽與核酸

如上所述，1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)多肽使丙酮酸及D-甘油醛-3-磷酸轉化成1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸。例示性DXS多肽包括具有DXS多肽之至少一種活性的多肽、多肽片段、肽及融合多肽。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提

取物中或活體內使丙酮酸及D-甘油醛-3-磷酸轉化成1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸之能力來判定該多肽是否具有DXS多肽活性。例示性DXS核酸包括編碼具有DXS多肽之至少一種活性之多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。例示性DXS多肽與核酸包括來自本文所述之任何源生物體的天然存在之多肽與核酸，以及源自本文所述之任何源生物體的突變型多肽與核酸。

例示性IDI多肽與核酸

異戊烯基二磷酸異構酶多肽(異戊烯基-二磷酸δ-異構酶或IDI)催化異戊烯基二磷酸(IPP)與二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)相互轉化(例如IPP轉化成DMAPP及/或DMAPP轉化成IPP)。例示性IDI多肽包括具有IDI多肽之至少一種活性的多肽、多肽片段、肽及融合多肽。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使IPP與DMAPP相互轉化之能力來判定該多肽是否具有IDI多肽活性。例示性IDI核酸包括編碼具有IDI多肽之至少一種活性之多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。例示性IDI多肽與核酸包括來自本文所述之任何源生物體的天然存在之多肽與核酸，以及源自本文所述之任何源生物體的突變型多肽與核酸。

例示性MVA途徑多肽與核酸

例示性MVA途徑多肽包括乙醯基-CoA乙醯轉移酶(AA-CoA硫解酶)多肽、3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA合成酶(HMG-CoA合成酶)多肽、3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA還

原酶(HMG-CoA還原酶)多肽、甲羥戊酸激酶(MVK)多肽、磷酸甲羥戊酸激酶(PMK)多肽、二磷酸甲羥戊酸去羧酶(MVD)多肽、磷酸甲羥戊酸去羧酶(PMDC)多肽、異戊烯基磷酸激酶(IPK)多肽、IDI多肽，及具有兩種或兩種以上MVA途徑多肽之活性的多肽(例如融合多肽)。詳言之，MVA途徑多肽包括具有MVA途徑多肽之至少一種活性的多肽、多肽片段、肽及融合多肽。例示性MVA途徑核酸包括編碼具有MVA途徑多肽之至少一種活性之多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。例示性MVA途徑多肽與核酸包括來自本文所述之任何源生物體的天然存在之多肽與核酸，以及源自本文所述之任何源生物體的突變型多肽與核酸。

詳言之，乙醯基-CoA乙醯轉移酶多肽(AA-CoA硫解酶或AACT)使兩個乙醯基-CoA分子轉化成乙醯乙醯基-CoA。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使兩個乙醯基-CoA分子轉化成乙醯乙醯基-CoA之能力來判定該多肽是否具有AA-CoA硫解酶多肽活性。

3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA合成酶(HMG-CoA合成酶或HMGS)多肽使乙醯乙醯基-CoA轉化成3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使乙醯乙醯基-CoA轉化成3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA之能力來判定該多肽是否具有HMG-CoA合成酶多肽活性。

3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA還原酶(HMG-CoA還原酶或HMGR)多肽使3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA轉化成甲羥戊酸。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA轉化成甲羥戊酸之能力來判定該多肽是否具有HMG-CoA還原酶多肽活性。

甲羥戊酸激酶(MVK)多肽使甲羥戊酸磷酸化，形成甲羥戊酸-5-磷酸。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使甲羥戊酸轉化成甲羥戊酸-5-磷酸之能力來判定該多肽是否具有MVK多肽活性。

磷酸甲羥戊酸激酶(PMK)多肽使甲羥戊酸-5-磷酸磷酸化，形成甲羥戊酸-5-二磷酸。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使甲羥戊酸-5-磷酸轉化成甲羥戊酸-5-二磷酸之能力來判定該多肽是否具有PMK多肽活性。

二磷酸甲羥戊酸去羧酶(MVD或DPMDC)多肽使甲羥戊酸-5-二磷酸轉化成異戊烯基二磷酸(IPP)。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使甲羥戊酸-5-二磷酸轉化成IPP之能力來判定該多肽是否具有MVD多肽活性。

磷酸甲羥戊酸去羧酶(PMDC)多肽使甲羥戊酸-5-磷酸轉化成異戊烯基磷酸(IP)。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活

體內使甲羥戊酸-5-磷酸轉化成IP之能力來判定該多肽是否具有PMDC多肽活性。

異戊烯基磷酸激酶(IPK)多肽使異戊基磷酸(IP)磷酸化，形成異戊烯基二磷酸(IPP)。可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內使IP轉化成IPP之能力來判定該多肽是否具有IPK多肽活性。

例示性IDI多肽與核酸描述於上文。

例示性氫化酶多肽與核酸

氫化酶多肽催化以下反應：$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$。彼反應在活體外可逆，但某些氫化酶在活體內僅可單向起作用，即氧化H_2或還原H^+。氫化酶多肽可為氧敏感性的，含有錯合金屬輔因子作為其催化中心之一部分，且有時由多個次單位組成，其中氫化酶基因表現有時涉及其他附屬多肽，諸如『成熟』因子或轉錄調控因子(亦即，活化子或抑制子)。氫化酶基於其催化中心中金屬輔因子之類型而分類為至少三大族群：(i)鎳-鐵(「NiFe」)氫化酶具有鎳/鐵輔因子；(2)鐵-鐵氫化酶(「FeFe」)具有鐵/鐵輔因子；及(3)缺乏族群(1)及(2)中所見之4Fe4S簇的鐵/無硫(「Fe」)氫化酶具有鐵輔因子及甲醯基-四氫甲烷蝶呤(methenyl-tetrahydromethanopterin)電子載體。參見，例如Chung-Jung Chou等人，「Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: implications for biofuels」，*Metabol. Eng.* 10:394-404 (2008)，及Gönül Vardar-Schara等人，

「Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation」，*Microbial Biotechnol.* 1(2): 107-125 (2008)，兩者均以全文引用的方式併入本文中，尤其關於各種類型及類別之氫化酶。儘管許多生物體含有多種氫化酶，但極少生物體含有NiFe與FeFe氫化酶兩者之基因。

NiFe氫化酶之催化中心由鎳原子及鐵原子組成，各原子皆具有兩個一氧化碳(CO)及兩個氰離子(CN^-)配位體。NiFe氫化酶皆至少包含第二次單位，該次單位含有多個鐵-硫(Fe-S)中心以將電子轉移至催化中心或自催化中心轉移電子。NiFe氫化酶可細分為四個主要類別：(1)呼吸酶，其為將H_2氧化在厭氧條件下與最終電子受體(諸如SO_4^{2-}或NO_3^-)還原相聯繫或在好氧微生物中與O_2相聯繫之多酶系統之一部分；(2)H_2感測器，其活化具代謝活性之NiFe氫化酶之表現；(3)含有多個能夠利用$NADP^+$之次單位的細胞質氫化酶，其在活體外容易可逆，但在活體內僅可氧化H_2；及(4)膜結合儲能多酶複合物，其亦見於細菌及古生菌中。Chung-Jung Chou等人，「Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: implications for biofuels」，*Metabol. Eng.* 10:394-404 (2008)。

FeFe氫化酶之催化中心含有催化性「H簇」，該「H簇」經由單一蛋白質(半胱胺酸)配位體與橋接於[4Fe-4S]中心之雙核(FeFe)位點配位。雙核中心之兩個鐵原子各具有兩個一氧化碳(CO)及兩個氰離子(CN^-)配位體，且亦由兩個

作為小有機分子之一部分的硫原子橋接。大多數FeFe氫化酶為約50千道爾頓(kilodalton，kDa)之單體酶，且似乎活體內功能主要為處置質子還原成氫氣所產生之過量還原當量。Chung-Jung Chou等人，「Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: implications for biofuels」，*Metabol. Eng.* 10:394-404 (2008)。

最初認為Fe氫化酶之催化中心具有基於不涉及金屬之有機輔因子的活性位點，但稍後顯示含有單核Fe原子。儘管在三種類型之氫化酶之間存在系統發生差異，但除至少一個鐵原子以外，全部三個族群之氫化酶均在其活性位點中亦含有鐵原子之至少一個一氧化碳(CO)配位體，該配位體有助於H_2催化氧化及質子還原。Chung-Jung Chou等人，「Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: implications for biofuels」，*Metabol. Eng.* 10:394-404 (2008)。

例示性氫化酶多肽包括(但不限於)大腸桿菌氫化酶-1(Hyd-1)多肽、大腸桿菌氫化酶-2(Hyd-2)多肽、大腸桿菌氫化酶-3(Hyd-3)多肽、大腸桿菌氫化酶-4(Hyd-4)多肽；大腸桿菌甲酸氫解酶(FHL)複合物，其在厭氧條件下、於酸性pH值下自甲酸及CO_2製造氫氣(參見，例如Akihito Yoshida等人，「Efficient induction of formate hydrogen lyase of aerobically grown *Escherichia coli* in a three-step biohydrogen production process」，*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:754-760 (2007)，其以全文引用的方式併入

本文中，尤其關於在大腸桿菌中誘導甲酸氫解酶表現)；真氧產鹼桿菌(*Ralstonia eutropha*，*R. eutropha*)H16氫化酶(真氧產鹼桿菌HoxH)、混濁紅球菌(*Rhodococcus opacus*，*R. opacus*)*MR11*氫化酶(混濁紅球菌HoxH)多肽、藍藻屬(*Synechosystis* sp.，*Syn.*)PCC 6803氫化酶(藍藻PCC 6803 HoxH)多肽、巨大脫硫弧菌(*Desulfovibrio gigas*，*D. gigas*)氫化酶多肽及脫硫脫硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*，*D. desulfuricans*)ATCC 7757氫化酶多肽(參見，例如Gönül Vardar-Schara等人，「Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation」，*Microbial Biotechnol.* 1(2):107-125 (2008)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於各種類型及類別之氫化酶)；及具有兩種或兩種以上氫化酶多肽之活性的多肽(例如融合多肽)。詳言之，氫化酶多肽包括具有氫化酶多肽之至少一種活性的多肽、多肽片段、肽及融合多肽。例示性氫化酶核酸包括編碼具有氫化酶多肽之至少一種活性，或氫化酶多肽表現、加工或成熟所必需之至少一種活性之多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。例示性氫化酶多肽與核酸包括來自本文所述之任何源生物體的天然存在之多肽與核酸，以及源自本文所述之任何源生物體的突變型多肽與核酸。

作為厭氧甲酸氫解酶(FHL)複合物之一部分的大腸桿菌Hyd-3係由*hyc*操縱子(包含*hycA*、*hycB*、*hycC*、*hycD*、*hycE*、*hycF*、*hycG*、*hycH*及*hycI*基因)編碼。大腸桿菌

Hyd-4係由*hyf*操縱子(包含*hyfA*、*hyfB*、*hyfC*、*hyfD*、*hyfE*、*hyfF*、*hyfG*、*hyfH*、*hyfI*、*hyfJ*及*hyfR*基因)編碼。大腸桿菌FHL係由來自*hyc*操縱子之六個基因(*hycB*、*hycC*、*hycD*、*hycE*、*hycF*及*hycG*)及*fdhF*基因(編碼甲酸去氫酶H(Fdh-H))編碼。FHL複合物之表現可進一步涉及丙酮酸甲酸裂解酶(*pfl*)FhlA(一種活化*fdhF*及*hyc*操縱子的轉錄之轉錄因子)的表現，或HycA(一種由負性調控FHL轉錄之*hycA*基因編碼之轉錄因子)的缺失/失活。可藉由與氫化酶及其他酶之基因表現的調控有關之其他蛋白質(例如鐵-硫複合轉錄調控子(*iscR*))的表現或失活/缺失來改良異戊二烯與氫氣之共同製造(Kalim-Akhtar等人，「Deletion of iscR stimulates recombinant Clostridial Fe/Fe hydrogenase activity and H_2-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3)」，*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:853-862 (2008)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於在大腸桿菌中藉由使*iscR*基因缺失而刺激梭菌Fe/Fe氫化酶活性及氫氣積累)。

例示性鐵氧化還原蛋白依賴性氫化酶多肽包括(但不限於)乙醯肉毒梭菌(*Clostridium acetobutulicum*)氫化酶A(HydA)(參見，例如P.W. King等人，「Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system」，*J. Bacteriol.* 188(6):163-172 (2006)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於由HydA及三種HydA相關成熟酶(HydE、HydG及HydF)製造

氫氣)，該乙醯肉毒梭菌氫化酶A可單獨表現或與以下一或多者聯合表現：(1)枯草桿菌NADPH鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(NFOR)(參見，例如Viet等人，(2008)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於由NFOR製造氫氣；亦參見PCT公開案第WO/2007/089901號，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於針對氫氣製造使大腸桿菌菌株最佳化)、克魯氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)NADH鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(RnfCDGEAB)(Henning Seedorf等人，「The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features」，*Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 105(6):2128-2133 (2008)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於NADH鐵氧化還原蛋白氧化還原酶，且關於厭氧乙醇-乙酸鹽醱酵途徑之組分)，或巴斯德梭菌(*Clostridium pasteuranium*)鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(Fdx)；(2)甘油醛-6-磷酸鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(「GAPOR」)；或(3)丙酮酸鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(「POR」)，及具有兩種或兩種以上氫化酶多肽或一或多種氫化酶多肽之活性及一或多種鐵氧化還原蛋白依賴性氧化還原酶之活性的多肽(例如融合多肽)。詳言之，鐵氧化還原蛋白依賴性氫化酶多肽包括具有鐵氧化還原蛋白依賴性氫化酶多肽之至少一種活性的多肽、多肽片段、肽及融合多肽。

例示性NADPH依賴性氫化酶多肽包括(但不限於)嗜熱氫化酶多肽，諸如激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)氫化酶

(參見，例如J. Woodward等人，「Enzymatic production of biohydrogen」，*Nature* 405(6790):1014-1015 (2000))，及具有兩種或兩種以上NADPH依賴性氫化酶多肽之活性的多肽(例如融合多肽)。詳言之，NADPH依賴性氫化酶多肽包括具有NADPH依賴性氫化酶多肽之至少一種活性的多肽、多肽片段、肽及融合多肽。

例示性耐氧性或氧不敏感性氫化酶包括(但不限於)膠狀紅長命菌(*Rubrivivax gelatinosus*)氫化酶(參見，例如P.C. Maness等人，「Characterization of the oxygen tolerance of a hydrogenase linked to a carbon monoxide oxidation pathway in *Rubrivivax gelatinosus* 」，*Appl. Environ. Microbiol.* 68(6):2633-2636 (2002)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於膠狀紅長命菌(*R. gelatinosus*)氫化酶)，及真氧產鹼桿菌氫化酶多肽(參見，例如T. Burgdorf等人，「[NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation」，*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10(2-4):181-196 (2005)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於真氧產鹼桿菌氫化酶多肽)。或者，可使用標準方法及檢驗對編碼氫化酶多肽之異源核酸進行突變誘發且針對O_2耐受性或O_2不敏感性進行篩選(參見，例如L.E. Nagy等人，「Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel [FeFe]-hydrogenase libraries」，*Biotechnol. Letts.* 29(3)421-430 (2007)，其以引用的方式併入本文中，尤其

關於耐氧性氫化酶多肽之突變誘發與篩選)。

可使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)，藉由量測多肽於活體外、細胞提取物中或活體內製造氫氣之能力來判定該多肽是否具有氫化酶活性。

與發酵副產物製造相關之基因的例示性多肽與核酸

除表現或過度表現大腸桿菌中之異源或天然氫化酶以外，亦可藉由使厭氧生物合成途徑失活，進而阻斷通向限氧或厭氧條件下製造之多種代謝物(亦即發酵副產物)的碳流量來改良異戊二烯與氫氣之共同製造，該等代謝物包括(但不限於)乳酸鹽、乙酸鹽、丙酮酸鹽、乙醇、丁二酸鹽及甘油。與發酵副產物製造有關之例示性多肽包括甲酸去氫酶N、α次單位(*fdnG*)、甲酸去氫酶O、大型次單位(*fdoG*)、硝酸還原酶(*narG*)、甲酸轉運體A(*focA*)、甲酸轉運體B(*focB*)、丙酮酸氧化酶(*poxB*)、丙酮酸去氫酶E1組分ackA/pta(*aceE*)、醇去氫酶(*adhE*)、反丁烯二酸還原酶膜蛋白(*frdC*)及乳酸去氫酶(*ldh*A)。參見，例如Toshinori Maeda等人，「Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli* 」，*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(4):879-890 (2007)，其以全文引用的方式併入，尤其關於葡萄糖代謝經修飾之大腸桿菌菌株的製造。與發酵副產物製造所涉及之基因的調控或表現有關且亦可失活以改良異戊二烯與氫氣之共同製造的例示性多肽包括(但不限於)：甲酸氫解酶之抑制子(*hycA*)；反丁烯二酸還原酶調控子(*fnr*)；乙醯基-輔酶A合成酶(*acs*)；

及甲酸去氫酶調控蛋白(*hycA*)，其調控轉錄調控子fhlA(甲酸氫解酶轉錄活化子)之表現。

與氫氣再吸收相關之基因的例示性多肽與核酸

與氫氣再吸收有關且亦可失活以改良異戊二烯與氫氣之共同製造的例示性多肽包括(但不限於)大腸桿菌氫化酶-1(Hyd-1)(*hya*操縱子)及大腸桿菌氫化酶-2(Hyd-2)(*hyb*操縱子)。大腸桿菌Hyd-1係由*hya*操縱子(包含*hyaA*、*hyaB*、*hyaC*、*hyaD*、*hyaE*及*hyaF*基因)編碼。大腸桿菌Hyd-2係由*hyb*操縱子(包含*hybA*、*hybB*、*hybC*、*hybD*、*hybE*、*hybF*、*hybG*及*hybO*基因)編碼。

分離核酸之例示性方法

異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸可使用標準方法加以分離。自相關源生物體(諸如細菌基因組)獲得所要核酸之方法為常見的且在分子生物學領域中為熟知的(參見，例如WO 2004/033646及其中所引用之參考文獻，各文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於相關核酸之分離)。舉例而言，若核酸序列為已知的(諸如本文所述之任何已知核酸)，則可藉由限制性核酸內切酶分解而生成適合之基因組文庫且可使用與所要核酸序列互補之探針進行篩選。一旦分離出序列，即可使用標準引子引導之擴增方法，諸如聚合酶鏈反應(PCR)(美國專利第4,683,202號，其以全文引用的方式併入，尤其關於PCR方法)來擴增DNA，以獲得適於使用適當載體進行轉型之DNA的量。

或者，可使用標準方法以化學方式合成異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸(諸如核酸序列已知之任何異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸)。

可使用標準方法鑑別可適用於本文所述之組合物及方法的其他異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽與核酸。舉例而言，可在諸如大腸桿菌之生物體中構築已知天然地製造異戊二烯之生物體之染色體DNA的黏質體文庫，接著針對異戊二烯產量進行篩選。詳言之，可生成基因組DNA之大區段(35-45 kb)封裝於載體中且用於轉型適當宿主之黏質體文庫。黏質體載體在能夠容納大量DNA方面獨一無二。一般而言，黏質體載體具有封裝異源DNA、隨後使異源DNA成環所需之cos DNA序列的至少一個複本。除cos序列以外，此等載體亦含有複製起點，諸如ColEI；及抗藥性標記物，諸如對胺苄青黴素或新黴素具抗性之核酸。使用黏質體載體轉型適合之細菌宿主之方法充分描述於Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989中，該文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於轉型方法。

通常，為選殖黏質體，使用適當限制性核酸內切酶分離異源DNA且使用適當接合酶接合於鄰近黏質體載體之cos區之處。接著使含有線性化異源DNA之黏質體載體與DNA

封裝運載體(諸如噬菌體)反應。在封裝過程中，cos位點裂解且異源DNA封裝於細菌病毒粒子之頭部。此等粒子接著用於轉染適合之宿主細胞，諸如大腸桿菌。一旦注射至細胞中，異源DNA即在cos黏性末端影響下成環。以此方式，可將異源DNA之大區段引入宿主細胞中且於其中表現。

獲得異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸之其他方法包括藉由檢驗(諸如本文所述之頂部空間檢驗)或藉由使用針對編碼一定長度之保守胺基酸(例如至少3個保守胺基酸)之核苷酸的引子進行PCR來篩選多源基因組文庫(metagenomic library)。保守胺基酸可藉由比對已知異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽之胺基酸序列來鑑別。異戊二烯合成酶多肽之保守胺基酸可基於已知異戊二烯合成酶多肽之經比對序列來鑑別。可對據發現天然地製造異戊二烯之生物體進行標準蛋白質純化方法(在此項技術中為熟知的)且可使用標準方法對所得經純化多肽進行定序。其他方法見於文獻中(參見，例如Julsing等人，*Applied. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1377-84, 2007；Withers等人，*Appl Environ Microbiol.* 73(19): 6277-83, 2007，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於與異戊二烯合成有關之核酸的鑑別)。

另外，可使用標準序列比對及/或結構預測程式，基於其他DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉

錄因子多肽與核酸之一級結構及/或預測多肽二級結構與已知DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽與核酸的相似性來鑑別其他DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽與核酸。亦可使用標準資料庫，諸如swissprot-trembl資料庫(全球資訊網「expasy.org」，Swiss Institute of Bioinformatics Swiss-Prot group CMU-1 rue Michel Servet CH-1211 Geneva 4, Switzerland)來鑑別異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄調控多肽與核酸。可使用標準結構預測程式，諸如PredictProtein (630 West, 168 Street, BB217, New York, N.Y. 10032, USA)之預設定值來預測異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽之二級及/或三級結構。或者，可使用標準方法確定異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽之實際二級及/或三級結構。亦可藉由與自己知異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸產生之探針雜交來鑑別其他異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸。

例示性啟動子與載體

本文所述之任何異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸均可包括於一或多種載體中。因此，本文中亦描述具有一或多種編碼

本文所述之任何異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽之核酸的載體。在一些實施例中，載體所含之核酸處於表現控制序列之控制下。

在一些實施例中，載體含有選擇性標記物或可選擇標記物。適用於供木黴屬(*Trichoderma*)轉型用之載體系統中之標記物在此項技術中為已知的(參見，例如Finkelstein，第6章，Biotechnology of Filamentous Fungi, Finkelstein等人編，Butterworth-Heinemann, Boston, MA，第6章，1992；及Kinghorn等人，Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London, 1992，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於選擇性標記物)。在一些實施例中，選擇性標記物為*amdS*核酸，其編碼乙醯胺酶，使得經轉型之細胞於乙醯胺氮源上生長。使用小巢狀麴菌(*A. nidulans*)*amdS*核酸作為選擇性標記物描述於Kelley等人，*EMBO J.* 4:475-479, 1985及Penttila等人，*Gene* 61:155-164, 1987中(各文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於選擇性標記物)。在一些實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄調控核酸整合至不含選擇性標記物之細胞的染色體中。

適合之載體為與所採用之宿主細胞相容之載體。適合之載體可源自例如細菌、病毒(諸如噬菌體T7或源自M-13之噬菌體)、黏質體、酵母或植物。獲得及使用該等載體之

方案在此項技術中為已知的(參見，例如Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於載體之使用)。

啟動子在此項技術中為熟知的。在宿主細胞中發揮功能之任何啟動子皆可用於異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸於宿主細胞中之表現。適用於驅動異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸於各種宿主細胞中表現之起始控制區或啟動子為數眾多且為熟習此項技術者所熟知(參見，例如WO 2004/033646及其中所引用之參考文獻，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於供表現相關核酸用之載體)。實際上，可使用能夠驅動此等核酸之任何啟動子，包括(但不限於)CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADCI、TRP1、URA3、LEU2、ENO及TPI(適用於酵母(*Saccharomyces*)中之表現)；AOX1(適用於畢赤酵母(*Pichia*)中之表現)；及lac、trp、λP_L、λP_R、T7、tac及trc(適用於大腸桿菌中之表現)。

在一些實施例中，使用葡萄糖異構酶啟動子(參見，例如美國專利第7,132,527號及其中所引用之參考文獻，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於供表現相關多肽用之啟動子及質體系統)。所報導之葡萄糖異構酶啟動子突變體可用於改變可操作地連接於該葡萄糖異構酶啟動子之核

酸所編碼之多肽的表現量(美國專利第7,132,527號)。在多個實施例中，葡萄糖異構酶啟動子含於低複本質體、中等複本質體或高複本質體中(美國專利第7,132,527號)。

在多個實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸含於低複本質體(例如維持約1至約4個複本/細胞之質體)、中等複本質體(例如維持約10至約15個複本/細胞之質體)或高複本質體(例如維持約50個或50個以上複本/細胞之質體)中。在一些實施例中，異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸可操作地連接於T7啟動子。在一些實施例中，可操作地連接於T7啟動子之異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸含於中等複本質體或高複本質體中。在一些實施例中，異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸可操作地連接於Trc啟動子。在一些實施例中，可操作地連接於Trc啟動子之異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸含於中等複本質體或高複本質體中。在一些實施例中，異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸可操作地連接於Lac啟動子。在一些實施例中，可操作地連接於Lac啟動子之異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化

酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸含於低複本質體中。在一些實施例中，異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸可操作地連接於內源啟動子，諸如內源大腸桿菌屬(*Escherichia*)、泛菌屬(*Panteoa*)、桿菌屬、耶氏酵母屬(*Yarrowia*)、鏈黴菌屬(*Streptomyces*)或木黴屬啟動子，或內源鹼性絲胺酸蛋白酶、異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子啟動子。在一些實施例中，可操作地連接於內源啟動子之異源或額外內源異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸含於高複本質體中。在一些實施例中，載體為不整合至細胞中之染色體中的複製質體。在一些實施例中，載體之一部分或全部整合至細胞中之染色體中。

在一些實施例中，載體為當引入真菌宿主細胞中時整合至宿主細胞基因組中且進行複製之任何載體。關於載體之清單，參考Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains(FGSC，全球資訊網「fgsc.net」及其中所引用之參考文獻，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於載體)。適合之表現及/或整合載體之其他實例提供於Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989, Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel等人(編)1987，增刊30，章節7.7.18)；van den Hondel等人，

Bennett及Lasure(編)More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press，第396-428頁，1991；及美國專利第5,874,276號中，各文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於載體。尤其適用之載體包括pFB6、pBR322、PUC18、pUC100及pENTR/D。

在一些實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸可操作地連接於在真菌宿主細胞中顯示轉錄活性之適合啟動子。該啟動子可源自一或多種編碼宿主細胞之內源或異源多肽的核酸。在一些實施例中，啟動子適用於木黴屬宿主。適合啟動子之非限制性實例包括*cbh*1、*cbh*2、*egl*1、*egl*2、*pepA*、*hfb*1、*hfb*2、*xyn*1及*amy*。在一些實施例中，啟動子為宿主細胞之天然啟動子。舉例而言，在一些實施例中，當里氏木黴(*T. reesei*)為宿主時，啟動子為天然里氏木黴啟動子。在一些實施例中，啟動子為里氏木黴*cbh1*，該啟動子為誘導性啟動子且以寄存編號D86235寄存於GenBank(以全文引用的方式併入，尤其關於啟動子)。在一些實施例中，啟動子為真菌宿主細胞之異源啟動子。適用啟動子之其他實例包括來自泡盛麴菌(*A. awamori*)及黑麴菌(*A. niger*)葡糖澱粉酶之基因(glaA)的啟動子(Nunberg等人，*Mol. Cell Biol.* 4:2306-2315, 1984及Boel等人，*EMBO J.* 3:1581-1585, 1984，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於啟動子)；來自黑麴菌(*Aspergillus niger*)α澱粉酶、米麴菌(*Aspergillus oryzae*)TAKA澱粉酶、里氏木黴

*xln*1及里氏木黴纖維二糖水解酶1之基因的啟動子(EP 137280，其以全文引用的方式併入，尤其關於啟動子)。

在一些實施例中，表現載體亦包括終止序列。終止控制區亦可源自宿主細胞之各種天然基因。在一些實施例中，終止序列及啟動子序列源自相同來源。在另一實施例中，終止序列對宿主細胞而言為內源的。尤其適合之終止子序列為源自木黴屬菌株(諸如里氏木黴)之*cbh*1。其他適用之真菌終止子包括來自黑麴菌或泡盛麴菌葡糖澱粉酶核酸之終止子(Nunberg等人，*Mol. Cell Biol.* 4:2306-2315, 1984及Boel等人，*EMBO J.* 3:1581-1585, 1984，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於真菌終止子)。視情況，可包括終止位點。為有效表現多肽，編碼多肽之DNA經由起始密碼子可操作地連接於所選表現控制區，使得表現會形成適當信使RNA。

在一些實施例中，啟動子、編碼區及終止子皆源於待表現之異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸。在一些實施例中，將異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸之編碼區插入通用表現載體中，使得該編碼區處於表現構築體啟動子及終止子序列之轉錄控制下。在一些實施例中，於強*cbh*1啟動子之下游插入基因或其一部分。

可使用標準技術將異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸併入載體

(諸如表現載體)中(Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於適當DNA序列之篩選、及載體之構築)。用於接合包含相關核酸(諸如異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸)、啟動子、終止子及其他序列之DNA構築體且將其插入適合載體中之方法在此項技術中為熟知的。舉例而言，可使用限制性酶使異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸及載體裂解。接著，可接合裂解之異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸及裂解之載體的相容末端。一般藉由在適宜限制性位點處接合而實現連接。若該等位點不存在，則根據習知規範使用合成寡核苷酸連接子(參見Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989，及Bennett與Lasure, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, San Diego，第70-76頁，1991，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於寡核苷酸連接子)。另外，可使用已知重組技術(例如Invitrogen Life Technologies, Gateway Technology)構築載體。

在一些實施例中，可能需要以遠遠高於天然存在之細胞中當前所見之量，過度表現異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核

酸。可藉由將編碼彼等多肽之核酸選擇性選殖至多複本質體中或將彼等核酸置於強誘導性或組成性啟動子之控制下來達成此結果。過度表現所要多肽之方法為常見的且在分子生物學領域中為熟知的，且實例可見於Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989中，該文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於選殖技術。

在一些實施例中，可能需要以遠遠低於天然存在之細胞中當前所見之量，過低表現編碼異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽之核酸(例如使之突變、失活或缺失)。此結果可如下實現：使異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸表現所需之轉錄調控蛋白突變或失活，使異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸缺失，或將彼等核酸置於強抑制性啟動子之控制下。使所要多肽突變、失活或缺失之方法為常見的且在分子生物學領域中為熟知的，且實例可見於Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989中，該文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於選殖與突變誘發技術。

以下資源包括根據本文所述之組合物及方法適用之其他一般方法之描述：Kreigler, Gene Transfer and Expression; A Laboratory Manual, 1990及Ausubel等人編，Current

Protocols in Molecular Biology, 1994，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於分子生物學及選殖技術。

例示性源生物體

異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸(及其所編碼之多肽)可獲自天然含有異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸之任何生物體。如上所述，異戊二烯天然地由多種生物體，諸如細菌、酵母、植物及動物形成。生物體含有用於製造異戊二烯之MVA途徑、DXP途徑、或MVA途徑與DXP途徑(圖19A及圖19B)。因此，DXS核酸可獲自例如含有DXP途徑或含有MVA途徑與DXP途徑之任何生物體。IDI核酸及異戊二烯合成酶核酸可獲自例如含有MVA途徑、DXP途徑、或MVA途徑與DXP途徑之任何生物體。MVA途徑核酸可獲自例如含有MVA途徑或含有MVA途徑與DXP途徑之任何生物體。氫化酶核酸可獲自例如氧化氫氣或還原氫離子之任何生物體。醱酵副產物基因可例如自進行限氧或厭氧呼吸(諸如糖酵解)之任何生物體獲得或鑑別。

在一些實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸之核酸序列與由以下任何生物體天然地製造之核酸的序列一致。在一些實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽之胺基酸序列與由以下任何生物體天然地製造之多肽的序列一致。在

一些實施例中，異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸或多肽為源自本文所述之任何生物體之突變型核酸或多肽。本文中所用之「源自」係指引入有一或多個突變之核酸或多肽的來源。舉例而言，「源自植物多肽」之多肽係指藉由將一或多個突變引入野生型植物多肽之序列(亦即，天然存在之序列)中而產生之相關多肽。

在一些實施例中，源生物體為真菌，其實例為麴菌屬(*Aspergillus*)，諸如米麴菌及黑麴菌；酵母屬，諸如釀酒酵母(*S. cerevisiae*)；裂殖酵母屬(*Schizosaccharomyces*)，諸如粟酒裂殖酵母(*S.* pombe)；及木黴屬，諸如里氏木黴。在一些實施例中，源生物體為絲狀真菌細胞。術語「絲狀真菌」係指真菌亞門(subdivision Eumycotina)之所有絲狀形式(參見Alexopoulos, C. J. (1962), Introductory Mycology, Wiley, New York)。此等真菌之特徵在於具有由甲殼素、纖維素及其他複雜多醣構成之細胞壁的營養菌絲體。絲狀真菌在形態上、生理學上及遺傳學上不同於酵母。絲狀真菌藉由菌絲伸長實現營養生長，且碳分解代謝為專性好氧的。絲狀真菌母細胞可為以下(但不限於以下)屬之細胞：木黴屬(例如里氏木黴，紅褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)之無性變種，先前分類為長梗木黴(*T. longibrachiatum*)、綠色木黴(*Trichoderma viride*)、康寧木黴(*Trichoderma koningii*)、哈茨木黴(*Trichoderma harzianum*))(Sheir-Neirs等人，Appl. Microbiol. Biotechnol

20: 46-53, 1984；ATCC第56765號及ATCC第26921號)；青黴菌屬(*Penicillium sp.*)；腐質黴屬(*Humicola sp.*)(例如特異腐質黴(*H. insolens*)、綿毛狀腐質黴(*H. lanuginose*)或灰色腐質黴(*H. grisea*))；金孢子菌屬(*Chrysosporium sp.*)(例如洛克維金孢子菌(*C. lucknowense*))；黏帚黴屬(*Gliocladium sp.*)；麴菌屬(例如米麴菌、黑麴菌、醬油麴菌(*A. sojae*)、日本麴菌(*A. japonicus*)、小巢狀麴菌或泡盛麴菌)(Ward等人，Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 7380743, 1993及Goedegebuur等人，Genet 41: 89-98, 2002)；鐮刀菌屬(*Fusarium sp.*)(例如粉紅鐮刀菌(*F. roseum*)、禾赤鐮刀菌(*F. graminum*)、禾穀鐮刀菌(*F. cerealis*)、尖孢鐮刀菌(*F. oxysporuim*)或棉狀嗜熱鐮刀菌(*F. venenatum*))；鏈孢黴屬(*Neurospora sp.*)(例如粗糙鏈孢黴(*N. crassa*))；肉座菌屬(*Hypocrea sp.*)；毛黴屬(*Mucor sp.*)(例如米黑毛黴(*M. miehei*))；根黴屬(*Rhizopus sp.*)；及裸胞殼屬(*Emericella sp.*)(亦參見Innis等人，*Sci.* 228: 21-26, 1985)。術語「木黴屬(*Trichoderma/Trichoderma sp./Trichoderma spp.*)」係指先前或當前歸類為木黴之任何真菌屬。

在一些實施例中，真菌為小巢狀麴菌、泡盛麴菌、米麴菌、棘孢麴菌(*A. aculeatus*)、黑麴菌、日本麴菌、里氏木黴、綠色木黴(*T. viride*)、尖孢鐮刀菌(*F. oxysporum*)或茄腐鐮刀菌(*F. solani*)。麴菌屬菌株揭示於Ward等人，Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:738-743, 1993及Goedegebuur等

人，Curr Gene 41:89-98, 2002中，各文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於真菌。在特定實施例中，真菌為木黴屬菌株，諸如里氏木黴菌株。里氏木黴菌株為已知的，且非限制性實例包括ATCC第13631號、ATCC第26921號、ATCC第56764號、ATCC第56765號、ATCC第56767號及NRRL 15709，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於里氏木黴菌株。在一些實施例中，宿主菌株為RL-P37之衍生物。RL-P37揭示於Sheir-Neiss等人，Appl. Microbiol. Biotechnology 20:46-53, 1984中，該文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於里氏木黴菌株。

在一些實施例中，源生物體為酵母，諸如酵母屬、裂殖酵母屬、畢赤酵母屬或假絲酵母屬(*Candida sp.*)。在一些實施例中，酵母屬為釀酒酵母。

在一些實施例中，源生物體為細菌，諸如桿菌屬菌株，諸如地衣桿菌(*B. lichenformis*)或枯草桿菌；泛菌屬菌株，諸如檸檬泛菌(*P. citrea*)；假單胞菌屬(*Pseudomonas*)菌株，諸如產鹼假單胞菌(*P. alcaligenes*)、惡臭假單胞菌(*P. putida*)或螢光假單胞菌(*P. fluorescens*)；鏈黴菌屬菌株，諸如青紫鏈黴菌(*S. lividans*)或鏽赤黴鏈黴菌(*S. rubiginosus*)；棒狀桿菌屬(*Corynebacterium* sp.)菌株，諸如麩胺酸棒狀桿菌(*Corynebacterium glutamicum*)；紅假單胞菌屬(*Rhodopseudomonas sp.*)菌株，諸如沼澤紅假單胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)；或大腸桿菌屬菌株，諸如大腸桿菌。

本文中所用之「桿菌屬」包括如熟習此項技術者已知，屬於「桿菌」屬之所有種類，包括(但不限於)枯草桿菌、地衣桿菌、緩慢桿菌(*B. lentus*)、短桿菌(*B. brevis*)、嗜熱脂肪桿菌(*B. stearothermophilus*)、嗜鹼桿菌(*B. alkalophilus*)、解澱粉桿菌(*B. amyloliquefaciens*)、克勞氏桿菌(*B. clausii*)、耐鹽桿菌(*B. halodurans*)、巨大桿菌(*B. megaterium*)、凝結桿菌(*B. coagulans*)、環狀桿菌(*B. circulans*)、燦爛桿菌(*B. lautus*)及蘇雲金桿菌(*B. thuringiensis*)。應瞭解，桿菌屬繼續經歷分類改組。因此，該屬意欲包括已重新分類之種類，包括(但不限於)諸如嗜熱脂肪桿菌之生物體，現稱為「嗜熱脂肪土桿菌(*Geobacillus stearothermophilus*)」。在氧氣存在下產生抗性內生孢子被視為桿菌屬之特定特徵，不過此特徵亦適用於最新命名之脂環桿菌屬(*Alicyclobacillus*)、兩性桿菌屬(*Amphibacillus*)、嗜熱桿菌屬(*Aneurinibacillus*)、厭氧桿菌屬(*Anoxybacillus*)、短桿菌屬(*Brevibacillus*)、菲洛桿菌屬(*Filobacillus*)、薄壁桿菌屬(*Gracilibacillus*)、鹵桿菌屬(*Halobacillus*)、類桿菌屬(*Paenibacillus*)、柳桿菌屬(*Salibacillus*)、熱桿菌屬(*Thermobacillus*)、脲桿菌屬(*Ureibacillus*)及維京桿菌屬(*Virgibacillus*)。

在一些實施例中，源生物體為革蘭氏陽性細菌。非限制性實例包括鏈黴菌屬菌株(例如青紫鏈黴菌、天藍色鏈黴菌(*S. coelicolor*)或灰色鏈黴菌(*S. griseus*))及桿菌屬菌株。在一些實施例中，源生物體為革蘭氏陰性細菌，諸如

大腸桿菌；紅假單胞菌屬，諸如沼澤紅假單胞菌；或假單胞菌屬，諸如產鹼假單胞菌、惡臭假單胞菌或螢光假單胞菌。

在一些實施例中，源生物體為植物，諸如豆科(諸如豆科植物亞科)之植物。在一些實施例中，源生物體為野葛、楊屬(諸如銀白楊與歐洲山楊雜交種CAC35696)、山楊屬(諸如美洲山楊)或英國櫟。

在一些實施例中，源生物體為藻類，諸如綠藻、紅藻、灰綠藻(glaucophytes)、阿米巴狀藻(chlorarachniophytes)、類眼蟲鞭毛藻(euglenids)、原藻(chromista)或渦鞭毛藻(dinoflagellates)。

在一些實施例中，源生物體為藍細菌，諸如基於形態歸類為以下任一組之藍細菌：色球藻目(*Chroococcales*)、寬球藻目(*Pleurocapsales*)、顫藻目(*Oscillatoriales*)、念珠藻目(*Nostocales*)或真枝藻目(*Stigonematales*)。

在一些實施例中，源生物體為厭氧生物體。厭氧生物體可包括(但不限於)專性厭氧菌、兼性厭氧菌及耐氧厭氧菌。該等生物體可為上文所列之任何生物體、細菌、酵母等。在一實施例中，專性厭氧菌可為選自由以下組成之群之任一者或組合：揚氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)、產乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)、黏液真桿菌(*Eurobacterium limosum*)、食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxydivorans*)、產生分解鏈球菌(*Peptostreptococcus productus*)及食甲基丁酸桿菌(*Butyribacterium methylotrophicum*)。

應瞭解，本文所述之任何源生物體之任何組合皆可用於本發明之其他實施例。

例示性宿主細胞

多種宿主細胞可用於表現異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽且用於利用本文所述之方法共同製造異戊二烯與氫氣。例示性宿主細胞包括來自標題為「*例示性源生物體*」之先前章節中所列之任何生物體的細胞。宿主細胞可為天然地製造異戊二烯之細胞或不會天然地製造異戊二烯之細胞。在一些實施例中，宿主細胞使用DXP途徑天然地製造異戊二烯，且添加異戊二烯合成酶、DXS及/或IDI核酸以增強使用此途徑製造異戊二烯。在一些實施例中，宿主細胞使用MVA途徑天然地製造異戊二烯，且添加異戊二烯合成酶及/或一或多種MVA途徑核酸以增強使用此途徑製造異戊二烯。在一些實施例中，宿主細胞使用DXP途徑天然地製造異戊二烯，且添加一或多種MVA途徑核酸以使用MVA途徑以及DXP途徑之一部分或全部來製造異戊二烯。在一些實施例中，宿主細胞使用DXP途徑與MVA途徑天然地製造異戊二烯，且添加一或多種異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑核酸以增強經由此等途徑中之一或兩者製造異戊二烯。

在一些實施例中，宿主細胞使用DXP途徑與MVA途徑天然地製造異戊二烯，且添加一或多種異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑核酸以增強經由此等途徑中之一或

兩者製造異戊二烯，添加一或多種氫化酶核酸以增強氫氣製造，且使一或多種製造醱酵副產物之基因失活或缺失以限制醱酵副產物製造。在一些實施例中，宿主細胞使用DXP途徑與MVA途徑天然地共同製造異戊二烯與氫氣，且添加一或多種異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑核酸以增強經由此等途徑中之一或兩者製造異戊二烯，添加一或多種氫化酶核酸以增強氫氣製造，使一或多種製造醱酵副產物之基因失活或缺失以限制醱酵副產物製造，且使一或多種氫氣再吸收基因失活或缺失以增加氫氣製造。在一些實施例中，宿主細胞使用DXP途徑與MVA途徑及氫化酶天然地共同製造異戊二烯與氫氣，且添加一或多種異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑核酸以增強經由此等途徑中之一或兩者製造異戊二烯，添加一或多種氫化酶核酸以增強氫氣製造，添加一或多種氫化酶成熟核酸以增強氫氣製造，使一或多種製造醱酵副產物之基因失活或缺失以限制醱酵副產物製造，且使一或多種氫氣再吸收基因失活或缺失以增加氫氣製造。在一些實施例中，宿主細胞使用DXP途徑與MVA途徑天然地共同製造異戊二烯與氫氣，且添加一或多種異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑核酸以增強經由此等途徑中之一或兩者製造異戊二烯，添加一或多種氫化酶核酸以增強氫氣製造，添加一或多種氫化酶成熟核酸以增強氫氣製造，添加一或多種轉錄因子核酸或使之失活或缺失以增強氫化酶製造，使一或多種製造醱酵副產物之基因失活或缺失以限制醱酵副產物製造，且

使一或多種氫氣再吸收基因失活或缺失以增加氫氣製造。

例示性轉型方法

可使用標準技術將異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子核酸或含其之載體插入宿主細胞(例如本文所述之植物細胞、真菌細胞、酵母細胞或細菌細胞)中以供表現所編碼之異戊二烯合成酶、DXS、IDI、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟及/或轉錄因子多肽。可使用以下技術將DNA構築體或載體引入宿主細胞中：諸如轉型、電穿孔、細胞核顯微注射、轉導、轉染(例如脂質體轉染介導或DEAE-糊精介導之轉染，或使用重組噬菌體病毒進行轉染)、與磷酸鈣DNA沈澱物一起培育、用經DNA塗覆之微彈進行高速轟擊，及原生質體融合。一般轉型技術在此項技術中為已知的(參見，例如Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel等人(編)，第9章，1987)；Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989；及Campbell等人，*Curr. Genet.* 16:53-56, 1989，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於轉型方法)。異源多肽於木黴中之表現描述於以下文獻中：美國專利第6,022,725號；美國專利第6,268,328號；美國專利第7,262,041號；WO 2005/001036；Harkki等人，*Enzyme Microb. Technol.* 13:227-233, 1991；Harkki等人，*Bio Technol.* 7:596-603, 1989；EP 244,234；EP 215,594；及Nevalainen等人，「*The Molecular Biology of*

Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes」，Molecular Industrial Mycology, Leong及Berka編，Marcel Dekker Inc., NY，第129-148頁，1992，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於轉型及表現方法。關於麴菌屬菌株之轉型，亦參考Cao等人，*Sci.* 9:991-1001, 2000；EP 238023；及Yelton等人，*Proceedings. Natl. Acad. Sci.* USA 81:1470-1474, 1984(各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於轉型方法)。所引入之核酸可整合至染色體DNA中或維持染色體外複製序列之形式。

此項技術中已知之任何方法皆可用於選擇轉型體。在一非限制性實例中，包括*amdS*標記物之穩定轉型體與不穩定轉型體之區別在於其生長速率較快且在含有乙醯胺之固體培養基上形成輪廓平滑而非粗糙之環形群落。另外，在一些狀況下，由以下步驟對穩定性進行進一步測試：使轉型體於固體非選擇性培養基(例如缺乏乙醯胺之培養基)上生長，自此培養基收集孢子，且測定隨後在含有乙醯胺之選擇性培養基上發芽並生長之此等孢子的百分比。

在一些實施例中，藉由包含原生質體形成及原生質體轉型、接著以已知方式再生細胞壁之過程來轉型真菌細胞。在一特定實施例中，供轉型用之木黴屬之製備包含自真菌菌絲體製備原生質體(參見Campbell等人，*Curr. Genet.* 16:53-56, 1989，其以全文引用的方式併入，尤其關於轉型方法)。在一些實施例中，自發芽之營養孢子獲得菌絲

體。用分解細胞壁之酶處理菌絲體，從而得到原生質體。接著在滲透壓穩定劑存在下於懸浮培養基中保護原生質體。此等穩定劑包括山梨糖醇、甘露糖醇、氯化鉀、硫酸鎂及其類似物。通常，此等穩定劑之濃度在0.8 M與1.2 M之間變化。需要在懸浮培養基中使用約1.2 M山梨糖醇溶液。

DNA吸收至宿主木黴屬菌株中取決於鈣離子濃度。一般而言，吸收溶液中使用約10 mM $CaCl_2$至50 mM $CaCl_2$。吸收溶液中除鈣離子以外，一般包括之其他化合物為緩衝系統，諸如TE緩衝液(10 Mm Tris, pH 7.4；1 mM EDTA)或10 mM MOPS(嗎啉丙烷磺酸)緩衝液(pH 6.0)，及聚乙二醇(PEG)。在不欲受任何特定理論約束下，咸信聚乙二醇起作用而與細胞膜融合，由此使得培養基之內含物傳遞至木黴屬菌株之細胞質中且質體DNA轉移至細胞核。此融合常常留下質體DNA之多個複本整合至宿主染色體中。

通常，使用含有已經歷滲透處理且密度為10^5至10^7/mL(諸如2×10^6/mL)之木黴屬原生質體或細胞的懸浮液進行轉型。將100 μL體積之含有此等原生質體或細胞之適當溶液(例如1.2 M山梨糖醇及50 mM $CaCl_2$)與所要DNA混合。一般，將高濃度之PEG添加至吸收溶液中。可將0.1至1體積之25% PEG 4000添加至原生質體懸浮液中。在一些實施例中，將約0.25體積添加至原生質體懸浮液中。亦可將諸如二甲亞碸、肝素、亞精胺(spermidine)、氯化鉀及其類似物之添加劑添加至吸收溶液中且幫助轉型。類似程

序可用於其他真菌宿主細胞(參見，例如美國專利第6,022,725號及第6,268,328號，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於轉型方法)。

一般而言，接著在約0℃下培養混合物10至30分鐘。接著再將PEG添加至混合物中以進一步增強所要核酸序列之吸收。一般添加體積為轉型混合物體積之5至15倍的25% PEG 4000；然而，可能需要較大及較小體積。25% PEG 4000理想地為轉型混合物體積之約10倍。添加PEG後，接著在室溫下或於冰上培養轉型混合物，隨後添加山梨糖醇及$CaCl_2$溶液。接著再將原生質體懸浮液添加至生長培養基之熔融等分試樣中。當生長培養基包括生長選擇劑(例如乙醯胺或抗生素)時，其僅允許轉型體生長。

可根據習知方法進行細菌細胞之轉型，例如，如Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982中所述，該文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於轉型方法。

例示性細胞培養基

本文中亦描述一種共同製造異戊二烯與氫氣之培養中細胞或細胞群體。「培養中細胞」意謂於允許細胞經歷一或多次細胞分裂之溶液(例如細胞生長培養基)中之兩個或兩個以上細胞。「培養中細胞」不包括如下植物細胞：其為含有已分化成植物組織之細胞之活的多細胞植物之一部分。在多個實施例中，細胞培養物包括至少或約10、20、50、100、200、500、1,000、5,000、10,000個或10,000個

以上細胞。

「限氧培養物中之細胞」意謂於允許細胞經歷一或多次細胞分裂之溶液(例如細胞生長培養基)中之兩個或兩個以上細胞，其中該溶液含有有限量之氧氣。術語「限氧培養物」意謂該培養物缺氧或所含氧氣量低於支持經由還原當量生物轉移至氧氣而呼吸所需之氧氣量，且亦涵蓋厭氧培養物。在限氧培養條件下，一些源自碳代謝之電子因氧氣濃度過低而不能被接收，此時若細胞包含用於氫氣製造之適當代謝途徑，則使得細胞轉變成製造氫氣。當如培養基中溶解氧濃度接近零所指示，氧轉移速率(「OTR」)低於氧吸收速率(「OUR」)時，產生限氧培養條件。

任何碳源皆可用於培養宿主細胞。術語「碳源」係指一或多種能夠由宿主細胞或生物體代謝之含碳化合物。舉例而言，用於培養宿主細胞之細胞培養基可包括適於維持生存力或使宿主細胞生長之任何碳源。

在一些實施例中，碳源為碳水化合物(諸如單醣、雙醣、寡醣或多醣)、轉化糖(例如酶促處理之蔗糖糖漿)、甘油、丙三醇(例如生物柴油或製皂製程之丙三醇副產物)、二羥基丙酮、單碳源、油(例如植物油，諸如玉米油、棕櫚油或大豆油)、動物脂肪、動物油、脂肪酸(例如飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸或多元不飽和脂肪酸)、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、可再生碳源(例如生質碳源，諸如水解之生質碳源)、酵母提取物、來自酵母提

取物之組分、聚合物、酸、醇、醛、酮、胺基酸、丁二酸鹽、乳酸鹽、乙酸鹽、乙醇，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，碳源為光合作用之產物，包括(但不限於)葡萄糖。

例示性單醣包括葡萄糖及果糖；例示性寡醣包括乳糖及蔗糖；且例示性多醣包括澱粉及纖維素。例示性碳水化合物包括C6糖(例如果糖、甘露糖、半乳糖或葡萄糖)及C5糖(例如木糖或阿拉伯糖)。在一些實施例中，細胞培養基包括碳水化合物、以及非碳水化合物之碳源(例如甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源，或來自酵母提取物之組分)。在一些實施例中，細胞培養基包括碳水化合物以及多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)。在一些實施例中，微生物多肽為來自酵母或細菌之多肽。在一些實施例中，植物多肽為來自大豆、玉米、芥花(canola)、麻風樹、棕櫚、花生、向日葵、椰子、芥子、油菜籽、棉籽、棕櫚仁、橄欖、紅花、芝麻或亞麻子之多肽。

在一些實施例中，碳水化合物之濃度為至少或約5公克/公升培養液(g/L，其中培養液體積包括細胞培養基體積與細胞體積)，諸如至少或約10、15、20、30、40、50、60、80、100、150、200、300、400 g/L或400 g/L以上。在一些實施例中，碳水化合物之濃度介於約50 g/L與約400 g/L之間，諸如約100 g/L與約360 g/L之間，約120 g/L與約

360 g/L之間，或約200 g/L與約300 g/L之間。在一些實施例中，此碳水化合物濃度包括在培養宿主細胞之前及/或期間所添加之碳水化合物的總量。

在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。「限制性葡萄糖條件」意謂所添加之葡萄糖的量小於或約為細胞所消耗之葡萄糖之量的105%(諸如約100%)。在特定實施例中，添加至培養基中之葡萄糖的量與在特定時段期間細胞所消耗之葡萄糖之量大致相同。在一些實施例中，藉由限制所添加之葡萄糖的量來控制細胞生長速率，使得細胞以細胞培養基中葡萄糖之量可支持之速率生長。在一些實施例中，葡萄糖在細胞培養期間不會積累。在多個實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞，超過或約為1、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60或70小時。在多個實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞，超過或約為細胞培養總持續時間之5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、95或100%。在不欲受任何特定理論約束下，咸信限制性葡萄糖條件可更有利於調控細胞。

在一些實施例中，於過量葡萄糖存在下培養細胞。在特定實施例中，所添加之葡萄糖的量大於在特定時段期間細胞所消耗之葡萄糖之量的約105%或105%以上(諸如約為或大於110、120、150、175、200、250、300、400或500%)。在一些實施例中，葡萄糖在細胞培養期間積累。

例示性脂質為任何含有一或多種飽和、不飽和或分支脂

肪酸之物質，該一或多種脂肪酸為C4及C4以上脂肪酸。

例示性油為在室溫下呈液體之脂質。在一些實施例中，脂質含有一或多種C4或C4以上脂肪酸(例如含有一或多種具4個或4個以上碳之飽和、不飽和或分支脂肪酸)。在一些實施例中，油獲自大豆、玉米、芥花、麻風樹、棕櫚、花生、向日葵、椰子、芥子、油菜籽、棉籽、棕櫚仁、橄欖、紅花、芝麻、亞麻子、油質微生物細胞、烏桕，或前述兩者或兩者以上之任何組合。

例示性脂肪酸包括式RCOOH之化合物，其中「R」為烴。例示性不飽和脂肪酸包括如下化合物：其中「R」包括至少一個碳碳雙鍵。例示性不飽和脂肪酸包括(但不限於)油酸、十八碳烯酸、亞麻油酸、棕櫚烯酸及花生四烯酸。例示性多元不飽和脂肪酸包括如下化合物：其中「R」包括複數個碳碳雙鍵。例示性飽和脂肪酸包括如下化合物：其中「R」為飽和脂族基團。在一些實施例中，碳源包括一或多種C_{12}-C_{22}脂肪酸，諸如C_{12}飽和脂肪酸、C_{14}飽和脂肪酸、C_{16}飽和脂肪酸、C_{18}飽和脂肪酸、C_{20}飽和脂肪酸或C_{22}飽和脂肪酸。在一例示性實施例中，脂肪酸為棕櫚酸。在一些實施例中，碳源為脂肪酸(例如不飽和脂肪酸)之鹽、脂肪酸(例如不飽和脂肪酸)之衍生物，或脂肪酸(例如不飽和脂肪酸)之衍生物之鹽。適合之鹽包括(但不限於)鋰鹽、鉀鹽、鈉鹽及其類似鹽。二酸甘油酯及三酸甘油酯為甘油之脂肪酸酯。

在一些實施例中，脂質、油、脂肪、脂肪酸、單酸甘油

酯、二酸甘油酯或三酸甘油酯之濃度為至少或約1公克/公升培養液(g/L，其中培養液體積包括細胞培養基體積與細胞體積)，諸如至少或約5、10、15、20、30、40、50、60、80、100、150、200、300、400 g/L或400 g/L以上。在一些實施例中，脂質、油、脂肪、脂肪酸、單酸甘油酯、二酸甘油酯或三酸甘油酯之濃度介於約10 g/L與約400 g/L之間，諸如約25 g/L與約300 g/L之間，約60 g/L與約180 g/L之間，或約75 g/L與約150 g/L之間。在一些實施例中，該濃度包括在培養宿主細胞之前及/或期間所添加之脂質、油、脂肪、脂肪酸、單酸甘油酯、二酸甘油酯或三酸甘油酯的總量。在一些實施例中，碳源包括以下兩者：(i)脂質、油、脂肪、脂肪酸、單酸甘油酯、二酸甘油酯或三酸甘油酯；及(ii)碳水化合物，諸如葡萄糖。在一些實施例中，脂質、油、脂肪、脂肪酸、單酸甘油酯、二酸甘油酯或三酸甘油酯與碳水化合物之比率以碳計為約1:1(亦即，碳水化合物中之每個碳對應於脂質、油、脂肪、脂肪酸、單酸甘油酯、二酸甘油酯或三酸甘油酯中之一個碳)。在特定實施例中，脂質、油、脂肪、脂肪酸、單酸甘油酯、二酸甘油酯或三酸甘油酯之量介於約60 g/L與180 g/L之間，且碳水化合物之量介於約120 g/L與360 g/L之間。

例示性微生物多肽碳源包括一或多種來自酵母或細菌之多肽。例示性植物多肽碳源包括一或多種來自大豆、玉米、芥花、麻風樹、棕櫚、花生、向日葵、椰子、芥子、

油菜籽、棉籽、棕櫚仁、橄欖、紅花、芝麻或亞麻子之多肽。

例示性可再生碳源包括乾酪乳清滲透液、玉米漿、甜菜糖蜜、大麥芽，及來自前述任一者之組分。例示性可再生碳源亦包括諸如玉米、柳枝稷、甘蔗之生質中存在的葡萄糖、己醣、戊醣及木糖，醱酵過程之細胞廢物，及研磨大豆、玉米或小麥所產生之蛋白質副產物。在一些實施例中，生質碳源為木質纖維素、半纖維素或纖維素材料，諸如(但不限於)草、小麥、小麥稈、甜菜渣、甘蔗渣、軟木漿、玉米、玉米穗軸或玉米殼、玉米粒、玉米粒纖維、玉米乾草、柳枝稷、稻殼產品，或濕式或乾式研磨穀物(例如玉米、高粱、黑麥、黑小麥、大麥、小麥及/或酒糟穀物(distillers grains))所產生之副產物。例示性纖維素材料包括木材、紙張及製漿廢液、草本植物，及果漿。在一些實施例中，碳源包括任何植物部分，諸如莖幹、穀粒、根或塊莖。在一些實施例中，使用以下任何植物之整體或一部分作為碳源：玉米、小麥、黑麥、高粱、黑小麥、稻、粟、大麥、木薯、豆類(諸如蠶豆及豌豆)、馬鈴薯、甘薯、香蕉、甘蔗及/或樹薯。在一些實施例中，碳源為生質水解產物，諸如包括木糖與葡萄糖或包括蔗糖與葡萄糖之生質水解產物。

在一些實施例中，在將可再生碳源(諸如生質)添加至細胞培養基中之前，對該可再生碳源進行預處理。在一些實施例中，預處理包括酶促預處理、化學預處理、或酶促預

處理與化學預處理之組合(參見，例如Farzaneh等人，*Bioresource Technology* 96 (18): 2014-2018, 2005；美國專利第6,176,176號；美國專利第6,106,888號；各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於可再生碳源之預處理)。在一些實施例中，在將可再生碳源添加至細胞培養基中之前，使該可再生碳源部分或完全水解。

在一些實施例中，在將可再生碳源(諸如玉米乾草)添加至細胞培養基中之前，對該可再生碳源進行氨纖維膨脹(ammonia fiber expansion，AFEX)預處理(參見，例如Farzaneh等人，*Bioresource Technology* 96 (18): 2014-2018, 2005)。在AFEX預處理期間，在中等溫度(諸如約60℃至約100℃)及高壓(諸如約250 psi至約300 psi)下，用無水液態氨處理可再生碳源約5分鐘。接著，快速釋放壓力。在此過程中，木質素溶解、半纖維素水解、纖維素解晶及表面積增加之化學作用與物理作用之組合能夠使纖維素及半纖維素接近完全地酶促轉化成可醱酵糖。AFEX預處理之優勢在於接近全部之氨可回收及再使用，而其餘氨充當下游過程中微生物之氮源。又，AFEX預處理不需要洗滌流。因此，AFEX處理後之乾物回收率基本上為100%。AFEX本質上為乾式-乾式過程。經處理之可再生碳源長時間穩定，且可以極高固體負載饋入酶促水解或醱酵過程中。纖維素及半纖維素在AFEX過程中保存完好，幾乎不降解。在已經歷AFEX預處理之可再生碳源酶促水解之前，不需要進行中和。經AFEX處理之碳源的酶促水解產生潔淨糖

流供後續醱酵使用。

在一些實施例中，碳源(例如可再生碳源)之濃度等效於至少或約0.1、0.5、1、1.5、2、3、4、5、10、15、20、30、40或50%葡萄糖(w/v)。可使用標準HPLC方法，以葡萄糖作為參考來量測碳源所產生之葡萄糖的量，藉此確定葡萄糖當量數。在一些實施例中，碳源(例如可再生碳源)之濃度等效於約0.1%至約20%葡萄糖，諸如約0.1%至約10%葡萄糖、約0.5%至約10%葡萄糖、約1%至約10%葡萄糖、約1%至約5%葡萄糖，或約1%至約2%葡萄糖。

在一些實施例中，碳源包括酵母提取物、或酵母提取物之一或多種組分。在一些實施例中，酵母提取物之濃度為至少1公克酵母提取物/公升培養液(g/L，其中培養液體積包括細胞培養基體積與細胞體積)，諸如至少或約5、10、15、20、30、40、50、60、80、100、150、200、300 g/L或300 g/L以上。在一些實施例中，酵母提取物之濃度介於約1 g/L與約300 g/L之間，諸如約1 g/L與約200 g/L之間，約5 g/L與約200 g/L之間，約5 g/L與約100 g/L之間，或約5 g/L與約60 g/L之間。在一些實施例中，該濃度包括在培養宿主細胞之前及/或期間所添加之酵母提取物的總量。在一些實施例中，碳源包括酵母提取物(或其一或多種組分)與另一碳源(諸如葡萄糖)。在一些實施例中，酵母提取物與另一碳源之比率為約1:5、約1:10或約1:20(w/w)。

另外，碳源亦可為單碳受質，諸如二氧化碳或甲醇。關於自單一碳源(例如甲醇、甲醛或甲酸酯)製造甘油，已報

導甲基營養型酵母中之情形(Yamada等人，*Agric. Biol. Chem.*, 53(2) 541-543, 1989，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於碳源)，及細菌中之情形(Hunter等人，*Biochemistry*, 24, 4148-4155, 1985，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於碳源)。此等生物體可同化呈氧化態介於甲烷至甲酸酯之範圍內的單碳化合物，且製造甘油。碳同化途徑可經由單磷酸核酮糖、經由絲胺酸或經由單磷酸木酮糖達成(Gottschalk, Bacterial Metabolism，第2版，Springer-Verlag: New York, 1986，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於碳源)。單磷酸核酮糖途徑包含使甲酸酯與核酮糖-5-磷酸縮合形成六碳糖，其變成果糖且最終變成三碳產物甘油醛-3-磷酸。同樣，絲胺酸途徑經由亞甲基四氫葉酸將單碳化合物同化至醣解途徑中。

除一種及兩種碳受質以外，亦已知甲基營養型生物體利用許多其他含碳化合物，諸如甲胺、葡糖胺及多種胺基酸來達成代謝活性。舉例而言，已知甲基營養型酵母利用甲胺之碳形成海藻糖或甘油(Bellion等人，*Microb. Growth Cl Compd.*, [Int. Symp.]，第7版，415-32。編輯：Murrell等人，出版者：Intercept, Andover, UK, 1993，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於碳源)。類似地，各種假絲酵母屬使丙胺酸或油酸發生代謝(Sulter等人，*Arch. Microbiol.* 153(5), 485-9, 1990，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於碳源)。

在一些實施例中，於含有生理鹽及營養素之標準培養基

中培養細胞(參見，例如Pourquie, J.等人，Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, Aubert等人編，Academic Press，第71-86頁，1988及Ilmen等人，*Appl. Environ. Microbiol.* 63:1298-1306, 1997，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於細胞培養基)。例示性生長培養基為常見之商業製備之培養基，諸如魯利亞-貝爾塔尼(Luria Bertani，LB)培養液、薩蒲洛氏右旋糖(Sabouraud Dextrose，SD)培養液或酵母培養基(YM)培養液。亦可使用其他限定或合成生長培養基，且供特定宿主細胞生長用之適當培養基為熟習微生物學或醱酵科學技術者所知。

除適當碳源以外，細胞培養基理想地含有適合之礦物、鹽、輔因子、緩衝液，及熟習此項技術者已知適於培養物生長或適於增強異戊二烯製造之其他組分(參見，例如WO 2004/033646與其中所引用之參考文獻、及WO 96/35796與其中所引用之參考文獻，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於細胞培養基及細胞培養條件)。在一些實施例中，若異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑核酸處於誘導性啟動子之控制下，則需要以有效誘導異戊二烯合成酶、DXS、IDI及/或MVA途徑多肽表現之濃度將誘導劑(例如糖、金屬鹽或抗微生物劑)添加至培養基中。在一些實施例中，細胞培養基具有對應於具有一或多種DXS、IDI或MVA途徑核酸之載體上之抗生素抗性核酸(諸如康黴素抗性核酸)的抗生素(諸如康黴素)。

例示性細胞培養條件

適用於細菌培養物之維持與生長之材料及方法在此項技術中為熟知的。例示性技術可見於*Manual of Methods for General Bacteriology*, Gerhardt等人編，American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994)或Brock, Biotechnology: *A Textbook of Industrial Microbiology*，第2版(1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA中，各文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於細胞培養技術。在一些實施例中，在允許由插入宿主細胞中之核酸編碼之一或多種異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑多肽表現之條件下，於培養基中培養細胞。

可使用標準細胞培養條件培養細胞(參見，例如WO 2004/033646及其中所引用之參考文獻，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於細胞培養與醱酵條件)。使細胞生長並維持於適當溫度、氣相混合物及pH值(諸如約20℃至約37℃、約6%至約84% CO_2及約5至約9之pH值)下。在一些實施例中，使細胞在35℃下於適當細胞培養基中生長。在一些實施例中，舉例而言，在約28℃下於震盪培養器或醱酵槽中之適當培養基中培養培養物，直至達成共同製造所要量之異戊二烯與氫氣為止。在一些實施例中，醱酵之pH值範圍為約pH 5.0至約pH 9.0(諸如約pH 6.0至約pH 8.0，或約6.5至約7.0)。可基於宿主細胞之需求，在好氧、缺氧或厭氧條件下進行反應。在一些實施例中，於限氧條件下培養細胞。在一些實施例中，在氧氣存在下，於每莫耳所製造之異戊二烯吸收0.5莫耳氧氣之條件下培養

細胞。在一些實施例中，於厭氧條件下培養細胞。既定絲狀真菌之例示性培養條件在此項技術中為已知的，且可見於科學文獻及/或來自真菌來源，諸如美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)及真菌遺傳保存中心(Fungal Genetics Stock Center)。

在多個實施例中，使用任何已知之醱酵模式，諸如分批、批式補料(fed-batch)或連續製程使細胞生長。在一些實施例中，使用分批醱酵方法。經典分批醱酵為封閉系統，其中培養基之組成在醱酵開始時進行設定且在醱酵期間不會作出人工變更。因此，在醱酵開始時，用所要宿主細胞接種細胞培養基且在未向系統中添加任何物質下進行醱酵。然而，「分批」醱酵就添加碳源而言通常為分批的，且常常試圖控制諸如pH值及氧濃度之因素。在分批系統中，系統之代謝物及生質組成恆定地發生變化直至停止醱酵為止。在分批培養中，細胞平緩經過靜態遲滯期(static lag phase)至高度生長對數期，且最終到達生長速率減緩或停止之停滯期。在一些實施例中，對數期之細胞負責製造大部分異戊二烯。在一些實施例中，停滯期之細胞製造異戊二烯。

在一些實施例中，使用基於標準分批系統之變更，諸如批式補料系統。批式補料醱酵過程包含典型分批系統，但隨著醱酵之進行，遞增式添加碳源。當分解代謝物抑制作用傾向於抑制細胞代謝時且當細胞培養基中需要具有有限量之碳源時，批式補料系統為適用的。可以有限量或過量

之碳源(例如葡萄糖)進行批式補料醱酵。量測批式補料系統中碳源之實際濃度較為困難，且因此基於諸如pH值、溶解氧、及廢氣(諸如CO_2)分壓之可量測因素的變化來估算該實際濃度。分批及批式補料醱酵為常見的且在此項技術中為熟知的，且實例可見於Brock, Biotechnology: *A Textbook of Industrial Microbiology*，第2版(1989) Sinauer Associates, Inc.，該文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於細胞培養與醱酵條件。

在一些實施例中，使用連續醱酵方法。連續醱酵為開放系統，其中將限定醱酵培養基連續添加至生物反應器中，且同時移除等量條件培養基以供處理。連續醱酵一般將培養物維持在恆定的高密度下，其中細胞主要處於生長對數期。

連續醱酵允許調節影響細胞生長或異戊二烯製造之一個因素或多個因素。舉例而言，一種方法將諸如碳源或氮含量之限制性營養素維持於固定速率下且允許減緩所有其他參數。在其他系統中，可連續改變多個影響生長之因素，同時使細胞濃度(例如由培養基濁度量度之濃度)保持恆定。連續系統力求維持穩態生長條件。因此，因抽出培養基所致之細胞損失針對醱酵中之細胞生長速率達成平衡。調節連續醱酵過程之營養素及生長因素之方法以及使產物形成速率最大化之技術在工業微生物學技術中為熟知的，且多種方法係由Brock, Biotechnology: *A Textbook of Industrial Microbiology*，第2版(1989) Sinauer Associates,

Inc.詳述，該文獻藉此以全文引用的方式併入，尤其關於細胞培養與醱酵條件。

在一些實施例中，細胞固定於作為全細胞催化劑之受質上且經受醱酵條件以供製造異戊二烯。

在一些實施例中，將液體培養瓶置於震盪器中以將氧氣引入液體中且維持培養物之均勻性。在一些實施例中，使用培育箱控制培養物生長之溫度、濕度、震盪速度及/或其他條件。最簡單之培育箱為具有可調式加熱器(通常至多升至約65℃)之保溫箱。更精緻之培育箱亦可具有降低溫度(經由致冷)之能力或控制濕度或CO_2含量之能力。最精密之培育箱包括計時器；一些亦可經程式設計以循環通過不同溫度、濕度水準等。培育箱之台面至單元之尺寸、小室之尺寸可改變。

必要時，可更換細胞培養基之一部分或全部以補充營養素及/或避免潛在有害之代謝副產物及死細胞積累。在懸浮液培養之狀況下，可藉由離心或過濾懸浮液培養物且接著將細胞再懸浮於新鮮培養基中而自培養基分離細胞。在貼壁培養之狀況下，可藉由抽吸直接移除培養基且加以替換。在一些實施例中，細胞培養基允許至少一部分細胞於連續培養物(諸如未經稀釋之連續培養物)中分裂，達至少或約5、10、20、40、50、60、65次或65次以上之細胞分裂。

在一些實施例中，使用組成性啟動子或滲漏啟動子(leaky promoter)(諸如Trc啟動子)，且不添加用以誘導可操

作地連接於該啟動子之異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑核酸表現之化合物(諸如IPTG)。在一些實施例中，添加用以誘導可操作地連接於啟動子之異戊二烯合成酶、DXS、IDI或MVA途徑核酸表現之化合物(諸如IPTG)。

使異戊二烯製造與細胞生長相分離之例示性方法

理想的是，原料中之碳轉化成異戊二烯，而非用於細胞之生長及維持。在一些實施例中，使細胞生長至低OD_{600}至中等OD_{600}，接著開始或增強異戊二烯製造。此策略使得大部分碳轉化成異戊二烯。

在一些實施例中，細胞達到使之不再分裂或分裂極其緩慢之光學密度，但繼續製造異戊二烯，持續數小時(諸如約2、4、6、8、10、15、20、25、30小時或30小時以上)。舉例而言，圖60A-67C說明在細胞達到使之不再分裂或分裂極其緩慢之光學密度之後，細胞可繼續製造大量甲羥戊酸或異戊二烯。在一些狀況下，550 nm下之光學密度隨時間降低(諸如在細胞因細胞溶解而不再處於指數生長期之後，光學密度降低)，且細胞繼續製造大量甲羥戊酸或異戊二烯。在一些實施例中，550 nm下細胞之光學密度經某一時段(諸如超過或約5、10、15、20、25、30、40、50或60小時)增加小於或約50%(諸如小於或約40、30、20、10、5或0%)，且在此時段期間細胞製造大於或約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、

2,000、2,500、3,000、4,000、5,000奈莫耳異戊二烯/公克細胞(細胞濕重)/小時(nmol/g_{wcm}/h)或5,000 nmol/g_{wcm}/h以上之異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯之量為約2至約5,000 nmol/g_{wcm}/h，諸如約2至約100 nmol/g_{wcm}/h、約100至約500 nmol/g_{wcm}/h、約150至約500 nmol/g_{wcm}/h、約500至約1,000 nmol/g_{wcm}/h、約1,000至約2,000 nmol/g_{wcm}/h、或約2,000至約5,000 nmol/g_{wcm}/h。在一些實施例中，異戊二烯之量為約20至約5,000 nmol/g_{wcm}/h、約100至約5,000 nmol/g_{wcm}/h、約200至約2,000 nmol/g_{wcm}/h、約200至約1,000 nmol/g_{wcm}/h、約300至約1,000 nmol/g_{wcm}/h、或約400至約1,000 nmol/g_{wcm}/h。

在一些實施例中，550 nm下細胞之光學密度經某一時段(諸如超過或約5、10、15、20、25、30、40、50或60小時)增加小於或約50%(諸如小於或約40、30、20、10、5或0%)，且在此時段期間細胞製造累積力價(總量)大於或約為1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000毫克異戊二烯/公升培養液(mg/$L_{培養液}$，其中培養液體積包括細胞及細胞培養基之體積)或100,000 mg/$L_{培養液}$以上之異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯之量為約2至約5,000 mg/$L_{培養液}$，諸如約2至約100 mg/$L_{培養液}$、約100至約500 mg/$L_{培養液}$、約500至約1,000 mg/$L_{培養液}$、約1,000至約2,000 mg/$L_{培養液}$、或約2,000至約5,000 mg/$L_{培養液}$。

在一些實施例中，異戊二烯之量為約20至約5,000 mg/L培養液、約100至約5,000 mg/L培養液、約200至約2,000 mg/L培養液、約200至約1,000 mg/L培養液、約300至約1,000 mg/L培養液、或約400至約1,000 mg/L培養液。

在一些實施例中，550 nm下細胞之光學密度經某一時段(諸如超過或約5、10、15、20、25、30、40、50或60小時)增加小於或約50%(諸如小於或約40、30、20、10、5或0%)，且在此時段期間細胞使細胞培養基中大於或約0.0015、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.12、0.14、0.16、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0或8.0%之碳轉化成異戊二烯。在一些實施例中，碳轉化成異戊二烯之轉化百分率為諸如約0.002%至約4.0%、約0.002%至約3.0%、約0.002%至約2.0%、約0.002%至約1.6%、約0.002%至約0.005%、約0.005%至約0.01%、約0.01%至約0.05%、約0.05%至約0.15%、0.15%至約0.2%、約0.2%至約0.3%、約0.3%至約0.5%、約0.5%至約0.8%、約0.8%至約1.0%、或約1.0%至約1.6%。在一些實施例中，碳轉化成異戊二烯之轉化百分率為約0.002%至約0.4%、0.002%至約0.16%、0.04%至約0.16%、約0.005%至約0.3%、約0.01%至約0.3%、或約0.05%至約0.3%。

在一些實施例中，僅在停滯期製造異戊二烯。在一些實施例中，在生長期與停滯期皆製造異戊二烯。在多個實施

例中，在停滯期期間所製造之異戊二烯之量(諸如所製造之異戊二烯的總量，或1 OD_{600}每小時每公升培養液所製造之異戊二烯之量)大於或約為在生長期期間歷經相同持續時間所製造之異戊二烯之量的2、3、4、5、10、20、30、40、50倍或50倍以上。在多個實施例中，當細胞處於停滯期時，製造大於或約為所製造總量(諸如在醱酵期間歷經某一時間段(諸如20小時)製造之異戊二烯)之5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、99%或99%以上之異戊二烯。在多個實施例中，當細胞緩慢分裂或不分裂，使得550 nm下細胞之光學密度增加小於或約50%(諸如小於或約40、30、20、10、5或0%)時，製造大於或約為所製造總量(諸如在醱酵期間歷經某一時間段(諸如20小時)製造之異戊二烯)之5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、99%或99%以上之異戊二烯。在一些實施例中，僅在生長期製造異戊二烯。

在一些實施例中，一或多種MVA途徑、IDI、DXP或異戊二烯合成酶核酸置於在停滯期比在生長期更具活性之啟動子或因子的控制下。舉例而言，一或多種MVA途徑、IDI、DXP或異戊二烯合成酶核酸可置於停滯期σ因子(諸如RpoS)之控制下。在一些實施例中，一或多種MVA途徑、IDI、DXP或異戊二烯合成酶核酸置於在停滯期可誘導之啟動子，諸如在停滯期可由反應調控子誘導呈活性之啟動子的控制下。

在安全操作範圍內製造異戊二烯

根據異戊二烯之可燃性特徵在安全操作水準下製造異戊二烯簡化了工業化設施之設計與構建，大大改良安全操作之能力，且限制起火之可能性。詳言之，異戊二烯製造之最佳範圍處於安全區域內，亦即，異戊二烯濃度之非可燃範圍內。在一此類態樣中，本文中描述一種在異戊二烯濃度之非可燃範圍內(異戊二烯之可燃包絡範圍(flammability envelope)外)製造異戊二烯之方法。

因此，使用電腦模型化及實驗測試來測定異戊二烯(諸如在O_2、N_2、CO_2或兩種或兩種以上前述氣體之任何組合存在下的異戊二烯)之可燃限度以確保製程安全性。可燃包絡範圍之特徵在於可燃下限(LFL)、可燃上限(UFL)、極限氧濃度(LOC)及極限溫度。若系統欲可燃，則須在最少量之氧化劑(通常為氧氣)存在下含有最少量之燃料(諸如異戊二烯)。LFL為維持燃燒須存在之異戊二烯的最小量，而UFL為可存在之異戊二烯的最大量。高於此限度時，混合物富含燃料且氧氣分數過低而使混合物不可燃。LOC表示亦須存在以使混合物可燃之氧氣的最小分數。極限溫度係基於異戊二烯之閃點且為異戊二烯燃燒可傳播之最低溫度。此等限度具體到異戊二烯濃度、氧化劑類型及濃度、系統中存在之惰性物質、系統溫度及壓力。處於可燃包絡範圍之限度內的組合物傳播燃燒且在製程設備之設計與操作方面需要其他安全防範。

使用電腦模擬與數學分析以及實驗測試來測試以下條件。必要時，可使用本文所述之方法來測試其他條件(諸

如其他溫度、壓力及永久氣體組成)以測定LFL、UFL及LOC濃度。

(1)電腦模擬與數學分析

測試套件1：

異戊二烯：0重量%-14重量%

O_2：6重量%-21重量%

N_2：79重量%-94重量%

測試套件2：

異戊二烯：0重量%-14重量%

O_2：6重量%-21重量%

N_2：79重量%-94重量%

以H_2O達到飽和

測試套件3：

異戊二烯：0重量%-14重量%

O_2：6重量%-21重量%

N_2：79重量%-94重量%

CO_2：5重量%-30重量%

(2)最終測定可燃限度之實驗測試

測試套件1：

異戊二烯：0重量%-14重量%

O_2：6重量%-21重量%

N_2：79重量%-94重量%

測試套件2：

異戊二烯：0重量%-14重量%

O_2：6重量%-21重量%

N_2：79重量%-94重量%

以H_2O達到飽和

使用模擬軟體得到若干不同測試條件下系統之可燃特徵的估算值。CO_2顯示對系統之可燃限度無顯著影響。藉由實驗測試確認測試套件1及2。模型化結果與實驗測試結果相一致。在添加水之情況下發現僅稍有變化。

40℃及1個大氣壓下，異戊二烯、O_2、N_2及CO_2混合物之LOC據測定為9.5體積%。添加至多30% CO_2不會顯著影響異戊二烯、O_2及N_2混合物之可燃特徵。在無水與以水達到飽和之異戊二烯、O_2及N_2系統之間顯示可燃特徵僅稍有變化。極限溫度為約-54℃。低於約-54℃之溫度因過低而不能傳播異戊二烯燃燒。

在一些實施例中，視系統中氧氣之量而定，異戊二烯之LFL在約1.5體積%至約2.0體積%之範圍內，且異戊二烯之UFL在約2.0體積%至約12.0體積%之範圍內。在一些實施例中，LOC為約9.5體積%之氧氣。在一些實施例中，當溫度為約25℃至約55℃(諸如約40℃)且壓力為約1個大氣壓至3個大氣壓時，異戊二烯之LFL為約1.5體積%至約2.0體積%，異戊二烯之UFL為約2.0體積%至約12.0體積%，且LOC為約9.5體積%之氧氣。

在一些實施例中，在小於約9.5體積%(亦即，低於異戊二烯混合物可燃所需之LOC)之氧氣存在下製造異戊二烯。在大於或約9.5體積%之氧氣存在下製造異戊二烯之一

些實施例中，異戊二烯濃度低於LFL(諸如低於約1.5體積%)。舉例而言，可藉由用惰性氣體稀釋異戊二烯組合物(例如，藉由連續或週期性地添加諸如氮氣之惰性氣體以保持異戊二烯組合物低於LFL)來保持異戊二烯之量低於LFL。在大於或約9.5體積%之氧氣存在下製造異戊二烯之一些實施例中，異戊二烯濃度高於UFL(諸如高於約12體積%)。舉例而言，可使用製造濃度高於UFL之異戊二烯的系統(諸如本文所述之任何細胞培養系統)來保持異戊二烯之量高於UFL。必要時，可使用相對較低含量之氧氣以使得UFL亦相對較低。在此狀況下，需要較低異戊二烯濃度以保持高於UFL。

在大於或約9.5體積%之氧氣存在下製造異戊二烯之一些實施例中，異戊二烯濃度在可燃包絡範圍內(諸如介於LFL與UFL之間)。在一些實施例中，當異戊二烯濃度可能處於可燃包絡範圍內時，進行一或多個步驟以降低起火或爆炸之可能性。舉例而言，可避開一或多個燃燒源(諸如可能產生火花之任何材料)。在一些實施例中，進行一或多個步驟以縮短異戊二烯濃度保持在可燃包絡範圍內之時間段。在一些實施例中，使用感測器偵測異戊二烯濃度何時接近或處於可燃包絡範圍內。必要時，可在細胞培養期間於一或多個時間點量測異戊二烯濃度，且若異戊二烯濃度接近或處於可燃包絡範圍內，則可使用標準方法調整細胞培養條件及/或惰性氣體量。在特定實施例中，調整細胞培養條件(諸如醱酵條件)以使異戊二烯濃度降至LFL以下

或使異戊二烯濃度增至UFL以上。在一些實施例中，藉由用惰性氣體稀釋異戊二烯組合物(諸如藉由連續或週期性地添加惰性氣體以保持異戊二烯組合物低於LFL)來保持異戊二烯之量低於LFL。

在一些實施例中，除異戊二烯以外之可燃性揮發物(諸如一或多種糖)之量比所製造的異戊二烯之量至少約低2、5、10、50、75或100倍。在一些實施例中，除異戊二烯氣體以外之氣相部分包含約0%至約100%(體積)之氧氣，諸如約0%至約10%、約10%至約20%、約20%至約30%、約30%至約40%、約40%至約50%、約50%至約60%、約60%至約70%、約70%至約80%、約80%至約90%、或約90%至約100%(體積)之氧氣。在一些實施例中，除異戊二烯氣體以外之氣相部分包含約0%至約99%(體積)之氮氣，諸如約0%至約10%、約10%至約20%、約20%至約30%、約30%至約40%、約40%至約50%、約50%至約60%、約60%至約70%、約70%至約80%、約80%至約90%、或約90%至約99%(體積)之氮氣。

在一些實施例中，除異戊二烯氣體以外之氣相部分包含約1%至約50%(體積)之CO_2，諸如約1%至約10%、約10%至約20%、約20%至約30%、約30%至約40%、或約40%至約50%(體積)之CO_2。

在一些實施例中，異戊二烯組合物亦含有乙醇。舉例而言，可使用乙醇對異戊二烯進行萃取蒸餾，從而得到包括乙醇及異戊二烯之組合物(諸如中間產物流)。理想地，乙

醇之量處於乙醇之可燃包絡範圍外。在標準條件，諸如約1個大氣壓及約60°F下，乙醇之LOC為約8.7體積%，且乙醇之LFL為約3.3體積%(NFPA 69 Standard on Explosion Prevention Systems, 2008版，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於LOC、LFL及UFL值)。在一些實施例中，在低於乙醇混合物可燃所需之LOC(諸如小於約8.7體積%)下製造包括異戊二烯及乙醇之組合物。在高於或約為乙醇混合物可燃所需之LOC下製造包括異戊二烯及乙醇之組合物的一些實施例中，乙醇濃度低於LFL(諸如小於約3.3體積%)。

在多個實施例中，氧化劑(諸如氧氣)之量低於系統中任何燃料(諸如異戊二烯或乙醇)之LOC。在多個實施例中，氧化劑(諸如氧氣)之量比異戊二烯或乙醇之LOC約低60、40、30、20、10或5%。在多個實施例中，氧化劑(諸如氧氣)之量比異戊二烯或乙醇之LOC至少低2、4、5或5個以上絕對百分點(體積%)。在特定實施例中，氧氣之量比異戊二烯或乙醇之LOC至少低2個絕對百分點(體積%)(諸如當異戊二烯之LOC為9.5體積%時，氧氣濃度小於7.5體積%)。在多個實施例中，燃料(諸如異戊二烯或乙醇)之量小於或約為彼燃料之LFL的25、20、15、10或5%。

以高效率製造並回收由醱酵而得之異戊二烯，一種揮發性烴

本文中提供製造異戊二烯之方法，其包含a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及(b)製造異戊二烯，其中異

戊二烯之液相濃度小於約200 mg/L。在一些實施例中，培養物中異戊二烯之液相濃度小於約以下任一值：175 mg/L、150 mg/L、125 mg/L、100 mg/L、75 mg/L、50 mg/L、25 mg/L、20 mg/L、15 mg/L、10 mg/L、5 mg/L或2.5 mg/L。在一些實施例中，培養物中異戊二烯之液相濃度為約以下任一範圍：0.1 mg/L至200 mg/L、1 mg/L至200 mg/L、1 mg/L至150 mg/L、1 mg/L至100 mg/L、1 mg/L至50 mg/L、1 mg/L至25 mg/L、1 mg/L至20 mg/L、或10 mg/L至20 mg/L。在一些實施例中，所製造之異戊二烯為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，液相濃度低於異戊二烯之溶解限度。

在方法之一些實施例中，細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一範圍：400 nmol/g_{wcm}/h至1 mol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至1 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至40 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至4 mmol/g_{wcm}/h、1 mmol/g_{wcm}/h至1.5 mmol/g_{wcm}/h、1.5 mmol/g_{wcm}/h至3 mmol/g_{wcm}/h、3 mmol/g_{wcm}/h至5 mmol/g_{wcm}/h、5 mmol/g_{wcm}/h至25 mmol/g_{wcm}/h、25 mmol/g_{wcm}/h至100 mmol/g_{wcm}/h、100 mmol/g_{wcm}/h至500 mmol/g_{wcm}/h、或500 mmol/g_{wcm}/h至1000 mmol/g_{wcm}/h。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一值：1 mmol/g_{wcm}/h、1.5 mmol/g_{wcm}/h、2 mmol/g_{wcm}/h、3 mmol/g_{wcm}/h、4

mmol/g_{wcm}/h或5 mmol/g_{wcm}/h。

亨利係數(Henry's coefficient)(以$M \cdot atm^{-1}$為單位)之低值意謂可藉由以低釋氣速率(例如0.01 vvm至2 vvm)進行氣提而自醱酵培養液中回收異戊二烯。在一些實施例中，釋氣速率為約以下任一範圍：0.1 vvm至1 vvm、0.01 vvm至0.5 vvm、0.2 vvm至1 vvm、或0.5 vvm至1 vvm。在一些實施例中，釋氣速率為約以下任一值：0.1 vvm、0.25 vvm、0.5 vvm、0.75 vvm、1 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm、1.75 vvm或2 vvm。在一些實施例中，在生長期期間或在停滯期期間，在整個醱酵操作過程中維持低釋氣速率。在一些實施例中，維持低釋氣速率達約以下任一時段：1小時至5小時、5小時至10小時、10小時至20小時、20小時至30小時、30小時至40小時、40小時至50小時、或50小時至60小時。理想釋氣下限定義為水相以異戊二烯變得飽和且有機液相形成之點。此僅可在低於異戊二烯沸點(1 atm下34.1℃)下發生，高於該沸點將決不會形成異戊二烯液相。在低於異戊二烯沸點之溫度下，由異戊二烯之水溶度確定液相形成，該水溶度在25℃下為約650 mg/L。儘管非常需要避免異戊二烯液相形成，但倘若細胞可耐受無毒性作用之液體異戊二烯的存在，則並不絕對需要避免其形成。

在一些實施例中，氧氣、CO_2及異戊二烯為題為「在安全操作範圍內製造異戊二烯」之章節中所論述之任何量或濃度。在一些實施例中，細胞在維持完全需氧代謝時消耗所有氧氣。在一些實施例中，使用過量氧氣滿足細胞之需

氧量。釋出氣體中氧氣之理想範圍為小於20%、或小於15%、或小於10%(v/v)。低於異戊二烯燃燒所需之極限氧濃度(1 atm下9.5% v/v)的氧含量為尤其理想的。在一些實施例中，為使氣體吹掃速率最小，同時滿足細胞需氧量，利用富氧空氣。在一些實施例中，氣體吹掃之氣相部分包含約0.1%至約10%、約10%至約20%、或約20%至約30%(體積)之氧氣。在一些實施例中，在高壓下進行異戊二烯醱酵以使維持液相中所需溶解氧含量所需要的過量氧之量降至最低。

在一些實施例中，通過醱酵槽之氣體吹掃速率降低對於整合異戊二烯製造過程之有利之處在於，該等條件使得釋出氣體中之異戊二烯含量富集高達約30,000 μg/L(約1% v/v)，而不會不利地影響細胞之生理機能。

在一些實施例中，較低釋氣速率不會顯著不利地影響細胞之生理機能。在一些實施例中，釋氣速率較低之培養物中細胞之二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一值：50 mmol/L/h、100 mmol/L/h、150 mmol/L/h、200 mmol/L/h、250 mmol/L/h、300 mmol/L/h、350 mmol/L/h、400 mmol/L/h、450 mmol/L/h或500 mmol/L/h。在一些實施例中，釋氣速率較低之細胞的生存

力降低程度小於約以下任一值：1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍、0.75倍、0.5倍或0.25倍。在一些實施例中，釋氣速率較低之細胞的生存力降低至約1/2。在一些實施例中，將釋氣速率較低之表現MVA途徑及/或DXP途徑RNA及/或來自異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之複本中之一或多者之蛋白質的細胞之細胞生存力與釋氣速率較低之缺乏異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之複本中之一或多者的對照細胞相比較。在一些實施例中，將釋氣速率較低之在誘導性啟動子(其中該啟動子經誘導)控制下表現MVA途徑及/或DXP途徑RNA及/或來自異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之複本中之一或多者之蛋白質的細胞之細胞生存力與釋氣速率較低之在誘導性啟動子(其中該啟動子未加以誘導(未經誘導))控制下含有異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之複本中之一或多者的對照細胞相比較。在一些實施例中，誘導性啟動子為β-半乳糖苷酶啟動子。

在一些實施例中，經遺傳修飾之宿主生物體之醱酵使生物體所消耗之總碳的至少5%轉化成揮發性不飽和烴。在一些實施例中，不飽和烴之製造速率使得醱酵釋出氣體中存在之不飽和烴的含量為至少約100 μg/L、500 μg/L、1000 μg/L、2,500 μg/L、5,000 μg/L、7,500 μg/L或10,000 μg/L中之任一值。

在一些實施例中，以適於高製造速率之方式自釋出氣流中回收不飽和烴，該等速率對應於釋出氣體中至少約100 μg/L、500 μg/L、1000 μg/L、2,500 μg/L、5,000 μg/L、7,500 μg/L或10,000 μg/L中之任一值的濃度。在一些實施例中，尤其以低氣體吹掃速率自醱酵釋出氣體中連續萃取並回收不飽和烴，使得所得釋出氣體中富集相關揮發性組分。在一些實施例中，由依賴於較高揮發物濃度之方法回收揮發性烴。舉例而言，經由使用壓縮/冷凝或萃取蒸餾技術有效捕集醱酵釋出氣體中之異戊二烯。亦涵蓋使用活性碳濾筒以及矽膠吸附劑，使異戊二烯自碳濾筒脫附並濃縮，及/或構築可使約5%或5%以上之葡萄糖受質轉化成異戊二烯且使得釋出氣體中異戊二烯之濃度大於約15,000 μg/L之宿主生物體，諸如大腸桿菌菌株，並使該等生物體醱酵。回收方法包括本文所述之任何方法。

本文中亦提供製造化合物之方法，其中該化合物具有一或多種選自由以下組成之群的特徵：(a)亨利定律係數小於約250 M/atm，及(b)水中溶解度小於約100 g/L。在一些實施例中，該方法包含：a)在適於製造化合物之條件下培養細胞，其中以約0.01 vvm至約2 vvm之釋氣速率添加氣體(諸如添加氣體至系統中，諸如醱酵系統中)；及b)製造化合物。

在一些實施例中，分配至細胞塊中之化合物的量不包括於液相溶解度值中。在一些實施例中，液相濃度低於化合物之溶解限度。

在一些實施例中，可藉由以中等釋氣速率至低釋氣速率進行氣提而自醱酵培養液中連續回收化合物，尤其亨利定律係數為約小於250 M/atm、200 M/atm、150 M/atm、100 M/atm、75 M/atm、50 M/atm、25 M/atm、10 M/atm、5 M/atm或1 M/atm中之任一值的彼等化合物。實例包括醛，諸如乙醛(15 M/atm)；酮，諸如丙酮(30 M/atm)或2-丁酮(20 M/atm)；或醇，包括甲醇(220 M/atm)、乙醇(200 M/atm)、1-丁醇(120 M/atm)，或C5醇，包括3-甲基-3-丁烯-1-醇及3-甲基-2-丁烯-1-醇(50-100 M/atm)。醇酯之亨利常數一般低於各別醇，例如乙酸乙酯(6-9 M/atm)或C5醇之乙醯酯(<5 M/atm)。亨利定律係數小於1 M/atm之化合物為尤其理想的。實例包括半萜、單萜或倍半萜，以及其他烴，諸如C1至C5烴(例如甲烷、乙烷、乙烯或丙烯)。在一些實施例中，諸如C1至C5烴之烴為飽和、不飽和或分支的。

一般而言，亨利定律係數與水溶度之間的關聯在於具有極低係數之化合物難溶於水(實質上不溶於水)。儘管可藉由氣提移除水中溶解度無限大之揮發物(例如丙酮或乙醇)，但理想溶解限度為小於約100 g/L、75 g/L、50 g/L、25 g/L、10 g/L、5 g/L或1 g/L中之任一值。

在製造上述任何化合物之任何方法的一些實施例中，釋氣速率為約以下任一範圍：0.1 vvm至1 vvm、0.2 vvm至1 vvm、或0.5 vvm至1 vvm。在一些實施例中，釋氣速率為約以下任一值：0.1 vvm、0.25 vvm、0.5 vvm、0.75

vvm、1 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm、1.75 vvm或2 vvm。在一些實施例中，在生長期期間或在停滯期期間，在整個醱酵操作過程中維持低釋氣速率。在一些實施例中，維持低釋氣速率達約以下任一時段：1小時至5小時、5小時至10小時、10小時至20小時、20小時至30小時、30小時至40小時、40小時至50小時、或50小時至60小時。

本文所述之任何系統皆可用於製造上述化合物之方法中。標準方法將用於純化，諸如題為「例示性純化方法」之章節中所述之彼等方法。可在回收後進行分離，例如藉由蒸餾或選擇性吸附技術進行分離。

例示性製造生物異戊二烯

在一些實施例中，在允許細胞製造異戊二烯之條件下於培養基中培養細胞。

「峰值絕對生產力」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間釋出氣體中異戊二烯之最大絕對量。「峰值絕對生產力時間點」意謂在醱酵操作期間，在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間釋出氣體中異戊二烯之絕對量處於最大值時的時間點。在一些實施例中，於峰值絕對生產力時間點量測異戊二烯之量。在一些實施例中，細胞之峰值絕對生產力約為本文中所揭示之任何異戊二烯的量。

「峰值比生產力」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間每個細胞所製造之異戊二烯的最大量。「峰值比生產力時間點」意謂在歷經特

定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間，每個細胞所製造之異戊二烯之量處於最大值時的時間點。如600 nm下之光學密度(OD_{600})所測定，藉由用總生產力除以細胞量來測定峰值比生產力。在一些實施例中，於峰值比生產力時間點量測異戊二烯之量。在一些實施例中，細胞之峰值比生產力約為本文中所揭示之任何異戊二烯的量/細胞。

「峰值體積生產力」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間每體積培養液(包括細胞及細胞培養基之體積)所製造之異戊二烯的最大量。「峰值比體積生產力時間點」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間，每體積培養液所製造之異戊二烯之量處於最大值時的時間點。藉由用總生產力除以培養液體積及時間量來測定峰值比體積生產力。在一些實施例中，於峰值比體積生產力時間點量測異戊二烯之量。在一些實施例中，細胞之峰值比體積生產力約為本文中所揭示之每段時間每體積之任何異戊二烯的量。

「峰值濃度」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間所製造之異戊二烯的最大量。「峰值濃度時間點」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間，每個細胞所製造之異戊二烯之量處於最大值時的時間點。在一些實施例中，於峰值濃度時間點量測異戊二烯之量。在一些實施例

中，細胞之峰值濃度約為本文中所揭示之任何異戊二烯的量。

「平均體積生產力」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間每體積培養液(包括細胞及細胞培養基之體積)所製造之異戊二烯的平均量。藉由用總生產力除以培養液體積及時間量來測定平均體積生產力。在一些實施例中，細胞之平均比體積生產力約為本文中所揭示之每段時間每體積之任何異戊二烯的量。

「累積總生產力」意謂在歷經特定時段培養細胞(例如在特定醱酵操作期間培養細胞)期間所製造之異戊二烯的累積總量。在一些實施例中，量測異戊二烯之累積總量。在一些實施例中，細胞之累積總生產力約為本文中所揭示之任何異戊二烯的量。

本文中所用之「相對偵測器回應值」係指一種化合物(諸如異戊二烯)之偵測器回應值(諸如GC/MS面積)與一或多種化合物(諸如所有C5烴)之偵測器回應值(諸如GC/MS面積)之比率。可如本文所述量測偵測器回應值，諸如用配備有Agilent HP-5MS GC/MS管柱(30 m×250 μm；0.25 μm膜厚度)之Agilent 6890 GC/MS系統進行GC/MS分析。必要時，可使用各化合物之回應因子將相對偵測器回應值轉換成重量百分比。此回應因子為針對既定量之特定化合物所產生之信號強弱(亦即，偵測器對特定化合物之敏感程度)的量度。當偵測器對相比較之化合物具有不同敏感度時，此回應因子可用作將相對偵測器回應值轉換成重量百分比

之修正因子。或者，可藉由假定相比較之化合物的回應因子相同來近似估計重量百分比。因此，可假定重量百分比與相對偵測器回應值近似相同。

在一些實施例中，培養中細胞製造大於或約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、12,500、20,000、30,000、40,000、50,000、75,000、100,000、125,000、150,000、188,000奈莫耳異戊二烯/公克細胞(細胞濕重)/小時(nmol/g_{wcm}/h)或188,000 nmol/g_{wcm}/h以上之異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯之量為約2至約200,000 nmol/g_{wcm}/h，諸如約2至約100 nmol/g_{wcm}/h、約100至約500 nmol/g_{wcm}/h、約150至約500 nmol/g_{wcm}/h、約500至約1,000 nmol/g_{wcm}/h、約1,000至約2,000 nmol/g_{wcm}/h、或約2,000至約5,000 nmol/g_{wcm}/h、約5,000至約10,000 nmol/g_{wcm}/h、約10,000至約50,000 nmol/g_{wcm}/h、約50,000至約100,000 nmol/g_{wcm}/h、約100,000至約150,000 nmol/g_{wcm}/h、或約150,000至約200,000 nmol/g_{wcm}/h。在一些實施例中，異戊二烯之量為約20至約5,000 nmol/g_{wcm}/h、約100至約5,000 nmol/g_{wcm}/h、約200至約2,000 nmol/g_{wcm}/h、約200至約1,000 nmol/g_{wcm}/h、約300至約1,000 nmol/g_{wcm}/h、或約400至約1,000 nmol/g_{wcm}/h、約1,000至約5,000 nmol/g_{wcm}/h、約2,000至約20,000 nmol/g_{wcm}/h、約5,000至約50,000 nmol/g_{wcm}/h、約10,000至

約100,000 nmol/g_{wcm}/h、約20,000至約150,000 nmol/g_{wcm}/h、或約20,000至約200,000 nmol/g_{wcm}/h。

以nmol/g_{wcm}/h為單位之異戊二烯之量可如美國專利第5,849,970號中所揭示來量測，該專利藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯產量之量測。舉例而言，使用標準氣相層析系統，諸如採用正辛烷/多孔矽膠珠C(porasil C)管柱(Alltech Associates, Inc., Deerfield, Ill.)以等溫方式(85℃)操作且耦接至RGD2氧化汞還原氣體偵測器(Trace Analytical, Menlo Park, CA)之系統，分析2 mL頂部空間氣體(headspace)(例如培養物之頂部空間氣體，諸如在密封小瓶中於32℃、以200 rpm震盪下培養約3小時之2 mL培養物之頂部空間氣體)中的異戊二烯(參見，例如Greenberg等人，*Atmos. Environ.* 27A: 2689-2692, 1993；Silver等人，*Plant Physiol.* 97:1588-1591, 1991，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯產量之量測)。經由標準異戊二烯濃度校準曲線將氣相層析面積單位轉換成異戊二烯奈莫耳數。在一些實施例中，藉由獲得細胞培養物樣品之A_{600}值，接著基於具有已知A_{600}值之細胞培養物的濕重之校準曲線將該A_{600}值轉換成細胞公克數來計算細胞公克數之值(細胞濕重)。在一些實施例中，藉由假定A_{600}值為1之1公升培養液(包括細胞培養基及細胞)的細胞濕重為1公克來估算細胞公克數。亦用該值除以培育培養物已歷經之小時數，諸如3小時。

在一些實施例中，培養中細胞製造大於或約1、10、

25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、100,000奈克異戊二烯/公克細胞(細胞濕重)/小時(ng/g_{wcm}/h)或100,000 ng/g_{wcm}/h以上之異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯之量為約2至約5,000 ng/g_{wcm}/h，諸如約2至約100 ng/g_{wcm}/h、約100至約500 ng/g_{wcm}/h、約500至約1,000 ng/g_{wcm}/h、約1,000至約2,000 ng/g_{wcm}/h、或約2,000至約5,000 ng/g_{wcm}/h。在一些實施例中，異戊二烯之量為約20至約5,000 ng/g_{wcm}/h、約100至約5,000 ng/g_{wcm}/h、約200至約2,000 ng/g_{wcm}/h、約200至約1,000 ng/g_{wcm}/h、約300至約1,000 ng/g_{wcm}/h、或約400至約1,000 ng/g_{wcm}/h。以ng/g_{wcm}/h為單位之異戊二烯的量可藉由用上文所論述之單位為nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯產量值乘以68.1(如以下等式5所述)來計算。

在一些實施例中，培養中細胞製造累積力價(總量)大於或約為1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000毫克異戊二烯/公升培養液(mg/$L_{培養液}$，其中培養液體積包括細胞及細胞培養基之體積)或100,000 mg/$L_{培養液}$以上之異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯之量為約2至約5,000 mg/$L_{培養液}$，諸如約2至約100 mg/$L_{培養液}$、約100至約500 mg/$L_{培養液}$、約500至約1,000 mg/$L_{培養液}$、約

1,000至約2,000 mg/L培養液、或約2,000至約5,000 mg/L培養液。在一些實施例中，異戊二烯之量為約20至約5,000 mg/L培養液、約100至約5,000 mg/L培養液、約200至約2,000 mg/L培養液、約200至約1,000 mg/L培養液、約300至約1,000 mg/L培養液、或約400至約1,000 mg/L培養液。

來自震盪燒瓶或類似培養器之異戊二烯之比生產力(毫克異戊二烯/公升頂部空間氣體)可藉由自OD_{600}值為約1.0之細胞培養物獲取1 ml樣品，將其置於20 mL小瓶中，培育30分鐘，接著量測頂部空間氣體中異戊二烯之量來量測(如例如實例1部分II所述)。若OD_{600}值不為1.0，則可藉由用量測值除以OD_{600}值來針對1.0之OD_{600}值進行校正。可藉由用毫克異戊二烯/公升頂部空間氣體之值乘以38將其轉換成mg/L培養液/h/培養液之OD_{600}。可將以mg/L培養液/h/OD_{600}為單位之值乘以小時數及OD_{600}值來獲得以毫克異戊二烯/公升培養液為單位之累積力價。

在一些實施例中，培養中細胞中異戊二烯之平均體積生產力大於或約為0.1、1.0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500毫克異戊二烯/公升培養液/小時(mg/L培養液/h，其中培養液體積包括細胞及細胞培養基之體積)或3,500 mg/L培養液/h以上。在一些實施例中，異戊二

烯之平均體積生產力為約0.1至約3,500 mg/L培養液/h，諸如約0.1至約100 mg/L培養液/h、約100至約500 mg/L培養液/h、約500至約1,000 mg/L培養液/h、約1,000至約1,500 mg/L培養液/h、約1,500至約2,000 mg/L培養液/h、約2,000至約2,500 mg/L培養液/h、約2,500至約3,000 mg/L培養液/h、或約3,000至約3,500 mg/L培養液/h。在一些實施例中，異戊二烯之平均體積生產力為約10至約3,500 mg/L培養液/h、約100至約3,500 mg/L培養液/h、約200至約1,000 mg/L培養液/h、約200至約1,500 mg/L培養液/h、約1,000至約3,000 mg/L培養液/h、或約1,500至約3,000 mg/L培養液/h。

在一些實施例中，培養中細胞中異戊二烯之峰值體積生產力大於或約為0.5、1.0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500、3,750、4,000、4,250、4,500、4,750、5,000、5,250、5,500、5,750、6,000、6,250、6,500、6,750、7,000、7,250、7,500、7,750、8,000、8,250、8,500、8,750、9,000、9,250、9,500、9,750、10,000、12,500、15,000毫克異戊二烯/公升培養液/小時(mg/L培養液/h，其中培養液體積包括細胞及細胞培養基之體積)或15,000 mg/L培養液/h以上。在一些實施例中，異戊二烯之峰值體積生產力為約0.5至約15,000 mg/L培養液/h，諸如約0.5至約10 mg/L培養液/h、約1.0至約100 mg/L培養液/h、約

100至約500 mg/L培養液/h、約500至約1,000 mg/L培養液/h、約1,000至約1,500 mg/L培養液/h、約1,500至約2,000 mg/L培養液/h、約2,000至約2,500 mg/L培養液/h、約2,500至約3,000 mg/L培養液/h、約3,000至約3,500 mg/L培養液/h、約3,500至約5,000 mg/L培養液/h、約5,000至約7,500 mg/L培養液/h、約7,500至約10,000 mg/L培養液/h、約10,000至約12,500 mg/L培養液/h、或約12,500至約15,000 mg/L培養液/h。在一些實施例中，異戊二烯之峰值體積生產力為約10至約15,000 mg/L培養液/h、約100至約2,500 mg/L培養液/h、約1,000至約5,000 mg/L培養液/h、約2,500至約7,500 mg/L培養液/h、約5,000至約10,000 mg/L培養液/h、約7,500至約12,500 mg/L培養液/h、或約10,000至約15,000 mg/L培養液/h。

發酵槽中以mg/L培養液/h為單位之瞬時異戊二烯製造速率可藉由獲取發酵槽釋出氣體之樣品，如例如實例1部分II所述分析樣品中異戊二烯之量(以諸如毫克異戊二烯/公升氣體為單位)，且將此值乘以釋出氣體通過每公升培養液之速率(例如1 vvm(空氣體積/培養液體積/分鐘)，其為60公升氣體/小時)來量測。因此，1 mg/L氣體之釋出氣體量對應於在1 vvm之空氣流速下60 mg/L培養液/h之瞬時製造速率。必要時，可將以mg/L培養液/h為單位之值除以OD_{600}值來獲得以mg/L培養液/h/OD為單位之比速率。毫克異戊二烯/公升氣體之平均值可如下轉換成總產物生產力(公克異戊二烯/公升發酵培養液，mg/L培養液)：將此平均釋出氣體異戊二烯濃度乘以在發酵期間每公升發酵培養液釋出之釋出氣體的總量。因此，在1 vvm下經10小時0.5 mg/L培養液/h之平均釋

出氣體異戊二烯濃度對應於300 mg異戊二烯/L培養液之總產物濃度。

在一些實施例中，培養中細胞使細胞培養基中大於或約0.0015、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.12、0.14、0.16、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0、15.0、16.0、17.0、18.0、19.0、20.0、21.0、22.0、23.0、23.2、23.4、23.6、23.8、24.0、25.0、30.0、31.0、32.0、33.0、35.0、37.5、40.0、45.0、47.5、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0或90.0莫耳%之碳轉化成異戊二烯。在一些實施例中，碳轉化成異戊二烯之轉化百分率為約0.002至約90.0莫耳%，諸如約0.002至約0.005%、約0.005至約0.01%、約0.01至約0.05%、約0.05至約0.15%、0.15至約0.2%、約0.2至約0.3%、約0.3至約0.5%、約0.5至約0.8%、約0.8至約1.0%、約1.0至約1.6%、約1.6至約3.0%、約3.0至約5.0%、約5.0至約8.0%、約8.0至約10.0%、約10.0至約15.0%、約15.0至約20.0%、約20.0至約25.0%、約25.0%至30.0%、約30.0%至35.0%、約35.0%至40.0%、約45.0%至50.0%、約50.0%至55.0%、約55.0%至60.0%、約60.0%至65.0%、約65.0%至70.0%、約75.0%至80.0%、約80.0%至85.0%、或約85.0%至90.0%。在一些實施例中，碳轉化成異戊二烯之轉化百分率為約0.002至約0.4莫耳%、0.002至約0.16莫耳%、0.04至約0.16

莫耳%、約0.005至約0.3莫耳%、約0.01至約0.3莫耳%、約0.05至約0.3莫耳%、約0.1至0.3莫耳%、約0.3至約1.0莫耳%、約1.0至約5.0莫耳%、約2至約5.0莫耳%、約5.0至約10.0莫耳%、約7至約10.0莫耳%、約10.0至約20.0莫耳%、約12至約20.0莫耳%、約16至約20.0莫耳%、約18至約20.0莫耳%、約18至23.2莫耳%、約18至23.6莫耳%、約18至約23.8莫耳%、約18至約24.0莫耳%、約18至約25.0莫耳%、約20至約30.0莫耳%、約30至約40.0莫耳%、約30至約50.0莫耳%、約30至約60.0莫耳%、約30至約70.0莫耳%、約30至約80.0莫耳%、或約30至約90.0莫耳%。

碳轉化成異戊二烯之轉化百分率(亦稱作碳產率%)可藉由用所製造之異戊二烯中之碳莫耳數除以碳源中之碳莫耳數(諸如批料及補料葡萄糖及酵母提取物中之碳莫耳數)來量測。將此數值乘以100%以得到百分比值(如等式1所指示)。

等式1

碳產率%=(所製造之異戊二烯中之碳莫耳數)/(碳源中之碳莫耳數)×100

關於此計算，可假定酵母提取物含有50% w/w碳。舉例而言，對於實例7部分VIII所述之500公升，可如等式2所示計算碳轉化成異戊二烯之轉化百分率。

等式2

碳產率%=(39.1 g異戊二烯×1/68.1 mol/g×5 C/mol)/[(181221 g葡萄糖×1/180 mol/g×6 C/mol) + (17780 g酵母提取物×0.5×1/12 mol/g)]×100=0.042%

對於本文中(實例7部分VII及VIII)所述之兩個500公升醱酵，碳轉化成異戊二烯之轉化百分率為0.04-0.06%。已使用如本文所述之14公升系統達成0.11-0.16%之碳產率。實例11部分V描述使用本文所述之方法使得碳轉化成異戊二烯之轉化率為1.53%。

熟習此項技術者可易於將異戊二烯製造速率或所製造之異戊二烯的量轉換成任何其他單位。用於單位之間相互轉換之例示性等式如下文所列。

異戊二烯製造速率(總速率及比速率)之單位

等式3

1 g異戊二烯/$L_{培養液}$/h=14.7 mmol異戊二烯/$L_{培養液}$/h(總體積速率)

等式4

1 nmol異戊二烯/g_{wcm}/h=1 nmol異戊二烯/$L_{培養液}$/h/OD_{600}(此轉換假定OD_{600}值為1之1公升培養液的細胞濕重為1公克。)

等式5

1 nmol異戊二烯/g_{wcm}/h=68.1 ng異戊二烯/g_{wcm}/h(給出異戊二烯之分子量)

等式6

1 nmol異戊二烯/$L_{氣體}$ O_2/h=90 nmol異戊二烯/$L_{培養液}$/h(對於每公升培養液，O_2流動速率為90 L/h)

等式7

1 μg異戊二烯/$L_{氣體}$釋出氣體中之異戊二烯=60 μg異戊二烯/

$L_{培養液}$/h(流動速率為60 $L_{氣體}$/$L_{培養液}$(1 vvm))

力價(總力價及比力價)之單位

等式8

1 nmol異戊二烯/mg細胞蛋白質=150 nmol異戊二烯/$L_{培養液}$/OD_{600}(此轉換假定OD_{600}值為1之1公升培養液的總細胞蛋白質為約150 mg)(比生產力)

等式9

1 g異戊二烯/$L_{培養液}$=14.7 mmol異戊二烯/$L_{培養液}$(總力價)

必要時，可使用等式10將包括細胞濕重之任何單位轉換成包括細胞乾重之相應單位。

等式10

細胞乾重=(細胞濕重)/3.3

必要時，可使用等式11在單位ppm與μg/L之間進行轉換。詳言之，「ppm」意謂依μg/g(w/w)定義之百萬分率。氣體濃度亦可以體積計使用依μL/L(體積/體積)定義之「ppmv」(體積百萬分率)來表示。可藉由測定每公升釋出氣體之質量(亦即，氣體密度)將μg/L轉換成ppm(例如微克分析物/公克氣體)。舉例而言，在標準溫度及壓力(STP；101.3 kPa(1巴)及273.15K)下，1公升空氣之密度為約1.29 g/L。因此，在STP下，1 ppm(μg/g)之濃度等於1.29 μg/L(等式11)。ppm(μg/g)至μg/L之轉換為壓力、溫度與釋出氣體之總體組成的函數。

等式11

在標準溫度及壓力(STP；101.3 kPa(1巴)及273.15K)下，1

ppm(μg/g)等於1.29 μg/L。

可使用通用氣體定律(Universal Gas Law)(等式12)將μg/L轉換成ppmv(例如微升分析物/公升氣體)。舉例而言，1000 μg/$L_{氣體}$之釋出氣體濃度對應於14.7 μmol/$L_{氣體}$。通用氣體常數為0.082057 L.atm $K^{-1}mol^{-1}$，故使用等式12，在STP下14.7 μmol HG所佔據之體積等於0.329 mL。因此，在STP下，1000 μg/L HG之濃度等於329 ppmv或0.0329%(v/v)。

等式12

PV=nRT，其中「P」為壓力，「V」為體積，「n」為氣體莫耳數，「R」為通用氣體常數，且「T」為克耳文(Kelvin)溫度。

異戊二烯組合物中雜質之量在本文中通常以重量/體積(w/v)計，以諸如μg/L之單位加以量測。必要時，可使用等式13將以μg/L為單位之量測值轉換成單位mg/m^3。

等式13

1 μg/L=1 mg/m^3

在本文所述之一些實施例中，包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸的細胞所製造之異戊二烯之量至少或約為在基本上相同條件下生長、但不含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸的相應細胞所製造之異戊二烯之量的2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、400倍或400倍以上。

在本文所述之一些實施例中，包含編碼異戊二烯合成酶

多肽之異源核酸及一或多種編碼DXS、IDI及/或MVA途徑多肽之異源核酸的細胞所製造之異戊二烯之量至少或約為在基本上相同條件下生長、但不含異源核酸的相應細胞所製造之異戊二烯之量的2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、400倍或400倍以上。

在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，異戊二烯組合物包含大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之偵測器回應值計，組合物中異戊二烯之相對偵測器回應值大於或約為99.90、99.91、99.92、99.93、99.94、99.95、99.96、99.97、99.98、99.99或100%。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，異戊二烯組合物包含約99.90至約99.92重量%、約99.92至約99.94重量%、約99.94至約99.96重量%、約99.96至約99.98重量%、約99.98至100重量%之異戊二烯。

在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，異戊二烯組合物包含小於或約0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之偵測器回應值計，組合物中非異戊二烯之C5烴的相對偵測器回應值小於或約為

0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001%。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之偵測器回應值計，組合物中1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔之相對偵測器回應值小於或約為0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001%。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，異戊二烯組合物包含約0.02至約0.04重量%、約0.04至約0.06重量%、約0.06至0.08重量%、約0.08至0.10重量%或約0.10至約0.12重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。

在一些實施例中，異戊二烯組合物包含小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含約0.005至約50 μg/L，諸如約0.01至約10、約0.01至約5、約0.01至約1、約0.01至約0.5或約0.01至約0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含

小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L之非異戊二烯之烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含約0.005至約50 μg/L，諸如約0.01至約10、約0.01至約5、約0.01至約1、約0.01至約0.5或約0.01至約0.005 μg/L之非異戊二烯之烴。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L之蛋白質或脂肪酸(諸如與天然橡膠天然相關之蛋白質或脂肪酸)。

在一些實施例中，異戊二烯組合物包含小於或約10、5、1、0.8、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之α-炔烴、間戊二烯、乙腈或1,3-環戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含小於或約5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之硫或丙二烯。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含小於或約30、20、15、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之所有炔烴(諸如1-戊炔、2-戊炔、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔及順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含小於或約2000、1000、500、200、100、50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 ppm之異戊二烯二聚體，諸如環狀異戊二烯二聚體(例如源自兩個異戊二烯單元的二聚化之環狀C10化合物)。

在一些實施例中，異戊二烯組合物包括乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在特定實施例中，異戊二烯組合物包含大於或約0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、60、80、100或120 μg/L之乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在一些實施例中，異戊二烯組合物包含約0.005至約120 μg/L，諸如約0.01至約80、約0.01至約60、約0.01至約40、約0.01至約30、約0.01至約20、約0.01至約10、約0.1至約80、約0.1至約60、約0.1至約40、約5至約80、約5至約60或約5至約40 μg/L之乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇，或前述任意兩者或兩者以上。

在一些實施例中，異戊二烯組合物包括以下一或多種組分：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、2,3-環庚

烯醇吡啶或線性異戊二烯聚合物(諸如源自多個異戊二烯單元的聚合之線性異戊二烯二聚體或線性異戊二烯三聚體)。在多個實施例中，以重量百分比為單位，此等組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為大於或約0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%(w/w)。在一些實施例中，以異戊二烯之偵測器回應值計，第二化合物之相對偵測器回應值大於或約為0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%。在多個實施例中，以重量百分比為單位，此等組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為約0.01至約105%(w/w)，諸如約0.01至約90、約0.01至約80、約0.01至約50、約0.01至約20、約0.01至約10、約0.02至約50、約0.05至約50、約0.1至約50或0.1至約20%(w/w)。

在一些實施例中，異戊二烯組合物包括以下一或多者：醇、醛或酮(諸如本文所述之任何醇、醛或酮)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包括(i)醇及醛，(ii)醇及酮，(iii)醛及酮，或(iv)醇、醛及酮。

在一些實施例中，異戊二烯組合物含有以下一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。在一些實施例中，異戊二烯組合物含有1 ppm或1 ppm以上之下列一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙

醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。在一些實施例中，異戊二烯組合物(諸如純化前之釋出氣體)中以下一或多者之濃度為約1至約10,000 ppm：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。在一些實施例中，異戊二烯組合物(諸如已經歷一或多個純化步驟之後的釋出氣體)包括以下一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚，其濃度為約1至約100 ppm，諸如約1至約10 ppm、約10至約20 ppm、約20至約30 ppm、約30至約40 ppm、約40至約50 ppm、約50至約60 ppm、約60至約70 ppm、約70至約80 ppm、約80至約90 ppm、或約90至約100 ppm。可使用標準方法，諸如本文所述之彼等方法或其他標準方法(諸如質子轉移反應-質譜法)分析來自細胞培養物之揮發性有機化合物(諸如細胞培養物之頂部空間氣體中之揮發性有機化合物)(參見，例如Bunge等人，*Applied and Environmental Microbiology*, 74(7):2179-2186, 2008，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於揮發性有機化合物之分析)。

在一些實施例中，組合物包含大於約2 mg之異戊二烯，諸如大於或約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000 mg之異戊二烯。在一些實施例中，組合物包含大於或約2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100

g之異戊二烯。在一些實施例中，組合物中異戊二烯之量為約2至約5,000 mg，諸如約2至約100 mg、約100至約500 mg、約500至約1,000 mg、約1,000至約2,000 mg、或約2,000至約5,000 mg。在一些實施例中，組合物中異戊二烯之量為約20至約5,000 mg、約100至約5,000 mg、約200至約2,000 mg、約200至約1,000 mg、約300至約1,000 mg、或約400至約1,000 mg。在一些實施例中，異戊二烯超過或約為組合物之揮發性有機部分的20、25、30、40、50、60、70、80、90或95重量%。

在一些實施例中，組合物包括乙醇。在一些實施例中，組合物包括約75至約90重量%之乙醇，諸如約75至約80重量%、約80至約85重量%或約85至約90重量%之乙醇。在組合物包括乙醇之一些實施例中，組合物亦包括約4至約15重量%之異戊二烯，諸如約4至約8重量%、約8至約12重量%或約12至約15重量%之異戊二烯。

在本文所述之一些實施例中，包含一或多種編碼異戊二烯合成酶多肽、DXS多肽、IDI多肽及/或MVA途徑多肽之異源核酸的細胞所製造之類異戊二烯化合物(諸如由一或多個IPP分子與一或多個DMAPP分子反應所形成之具有10個或10個以上碳原子之化合物)的量大於或約為在基本上相同條件下生長、但不含一或多種異源核酸之相應細胞所製造之類異戊二烯化合物之量的2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、400倍或400倍以上。在本文所述之一些實施例中，包含一或多種編碼異戊

二烯合成酶多肽、DXS多肽、IDI多肽及/或MVA途徑多肽之異源核酸的細胞所製造之C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)的量大於或約為在基本上相同條件下生長、但不含一或多種異源核酸之相應細胞所製造之C5異戊二烯醇之量的2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、400倍或400倍以上。

例示性共同製造生物異戊二烯與氫氣

在一些實施例中，本文所述之任何包含一或多種編碼異戊二烯合成酶多肽、DXS多肽、IDI多肽及/或MVA途徑多肽且可操作地連接於啟動子之異源核酸的製造異戊二烯之細胞均進一步包含亦可操作地連接於啟動子且編碼一或多種氫化酶多肽或一或多種與氫化酶多肽之調控或表現有關之多肽(例如氫化酶成熟蛋白或轉錄因子)的異源核酸。在一些實施例中，本文所述之任何包含一或多種編碼異戊二烯合成酶多肽、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑多肽、一或多種氫化酶多肽或一或多種與氫化酶多肽之調控或表現有關之多肽且可操作地連接於啟動子之異源核酸的製造異戊二烯之細胞均進一步包含使一或多種與醱酵副產物製造有關之多肽、一或多種與製造醱酵副產物之基因的調控或表現有關之多肽、或一或多種與氫氣再吸收有關之多肽失活的突變或缺失。該等細胞可共同製造異戊二烯與氫氣。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞為細菌細胞，諸如革蘭氏陽性細菌細胞(例如桿菌屬細胞，諸如枯草桿菌細胞；或鏈黴菌屬細胞，諸如青紫鏈黴菌

(*Streptomyces lividans*)、天藍色鏈黴菌(*Streptomyces coelicolor*)或灰色鏈黴菌(*Streptomyces griseus*)細胞)。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞為革蘭氏陰性細菌細胞(例如大腸桿菌屬細胞，諸如大腸桿菌細胞；紅假單胞菌屬，諸如沼澤紅假單胞菌細胞；假單胞菌屬，諸如螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)細胞或惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)細胞；或泛菌屬細胞，諸如檸檬泛菌細胞)。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞為真菌細胞，諸如絲狀真菌細胞(例如木黴屬細胞，諸如里氏木黴細胞；或麴菌屬細胞，諸如米麴菌及黑麴菌)；或酵母細胞(例如耶氏酵母屬細胞，諸如解脂耶氏酵母細胞；或酵母屬細胞，諸如釀酒酵母)。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異戊二烯合成酶多肽為來自以下植物之多肽：諸如葛屬(例如山葛或大葛藤)或楊屬(*Populus*)(例如美洲山楊、銀白楊、黑楊、毛果楊、或銀白楊與歐洲山楊雜交種)。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼IDI多肽之異源核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼IDI多肽之內源核酸之複本插入物。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼DXS多肽之異源核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼DXS多肽之內源核酸之複本插入物。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含一或多種編碼IDI多肽及DXS多

肽之核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，一種核酸編碼異戊二烯合成酶多肽、IDI多肽及DXS多肽。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，一種載體編碼異戊二烯合成酶多肽、IDI多肽及DXS多肽。在一些實施例中，載體包含選擇性標記物或可選擇標記物，諸如抗生素抗性核酸。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼MVA途徑多肽(諸如來自釀酒酵母或糞腸球菌之MVA途徑多肽)之異源核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼MVA途徑多肽(諸如來自釀酒酵母或糞腸球菌之MVA途徑多肽)之內源核酸之複本插入物。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞包含異戊二烯合成酶、DXS及MVA途徑核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞包含異戊二烯合成酶核酸、DXS核酸、IDI核酸及MVA途徑核酸。

在一些實施例中，本文所述之製造異戊二烯之細胞進一步包含編碼氫化酶多肽且可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，氫化酶多肽包含大腸桿菌氫化酶-1(Hyd-1)；大腸桿菌氫化酶-2(Hyd-2)；大腸桿菌氫化酶-3(Hyd-3)；大腸桿菌氫化酶-4(Hyd-4)；大腸桿菌甲酸氫解酶(FHL)複合物，其在厭氧條件下、於酸性pH值下自甲酸及CO_2製造氫氣；混濁紅球菌*MR11*氫化酶(混濁紅球菌HoxH)；藍藻屬PCC 6803氫化酶(藍藻PCC 6803 HoxH)；巨大脫硫弧菌氫化酶；及脫硫脫硫弧菌*ATCC 7757*氫化

酶。在一些實施例中，進一步包含編碼氫化酶多肽且可操作地連接於啟動子之異源核酸的製造異戊二烯之細胞進一步包含大腸桿菌氫化酶-3(Hyd-3)、大腸桿菌丙酮酸甲酸裂解酶(*pfl*)及大腸桿菌甲酸氫解酶(FHL)複合物。

在一些實施例中，氫化酶多肽編碼鐵氧化還原蛋白依賴性氫化酶多肽。在一些實施例中，鐵氧化還原蛋白依賴性氫化酶多肽包含乙醯肉毒梭菌氫化酶A(HydA)，其可與以下一或多者聯合表現：(1)枯草桿菌NADPH鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(NFOR)，或克魯氏梭菌NADH鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(RnfCDGEAB)、巴斯德梭菌鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(Fdx)；(2)甘油醛-6-磷酸鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(「GAPOR」)；或(3)丙酮酸鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(「POR」)。在一些實施例中，鐵氧化還原蛋白依賴性氫化酶多肽乙醯肉毒梭菌氫化酶A(HydA)與三種HydA相關成熟酶(HydE、HydG及HydF)一起表現，且另外與以下一或多者聯合表現：(1)枯草桿菌NADPH鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(NFOR)，或克魯氏梭菌NADH鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(RnfCDGEAB)、巴斯德梭菌鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(Fdx)；(2)甘油醛-6-磷酸鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(「GAPOR」)；或(3)丙酮酸鐵氧化還原蛋白氧化還原酶(「POR」)。

在一些實施例中，氫化酶多肽編碼NADPH依賴性氫化酶多肽。在一些實施例中，NADPH依賴性氫化酶多肽包含激烈火球菌氫化酶。在一些實施例中，氫化酶多肽編碼

耐氧性氫化酶。在一些實施例中，耐氧性氫化酶包含膠狀紅長命菌氫化酶及真氧產鹼桿菌氫化酶。

在一些實施例中，本文所述之製造異戊二烯之細胞進一步包含使與氫化酶活性調控有關之基因(鐵-硫複合轉錄調控子(*iscR*))失活之突變或缺失(Kalim-Akhtar等人，「Deletion of iscR stimulates recombinant Clostridial Fe/Fe hydrogenase activity and H_2-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3)」，*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:853-862 (2008)，其以全文引用的方式併入本文中，尤其關於在大腸桿菌中藉由使*iscR*基因缺失而刺激梭菌Fe/Fe氫化酶活性及氫氣積累)。

在一些實施例中，本文所述之製造異戊二烯之細胞進一步包含使編碼一或多種與醱酵副產物製造有關之細胞多肽之基因失活的突變或缺失，該等醱酵副產物為諸如乳酸鹽、乙酸鹽、丙酮酸鹽、乙醇、丁二酸鹽及甘油。在一些實施例中，失活的與醱酵副產物製造有關之多肽包含一或多種編碼以下之多肽：甲酸去氫酶N、α次單位(*fdnG*)、甲酸去氫酶O、大型次單位(*fdoG*)、硝酸還原酶(*narG*)、甲酸轉運體A(*focA*)、甲酸轉運體B(*focB*)、丙酮酸氧化酶(*poxB*)、丙酮酸去氫酶E1組分ackA/pta(*aceE*)、醇去氫酶(*adhE*)、反丁烯二酸還原酶膜蛋白(*frdC*)或乳酸去氫酶(*ldh*A)。

在一些實施例中，本文所述之製造異戊二烯之細胞進一步包含使編碼一或多種與醱酵副產物製造中所涉及之基因

的調控或表現有關之細胞多肽之基因失活的突變或缺失。在一些實施例中，失活的與醱酵副產物製造中所涉及之基因的調控或表現有關之多肽包含甲酸氫解酶之抑制子(*hycA*)、反丁烯二酸還原酶調控子(*fnr*)、乙醯基-輔酶A合成酶(*acs*)及甲酸去氫酶調控蛋白(*hycA*)。

在一些實施例中，本文所述之製造異戊二烯之細胞進一步包含使編碼一或多種與氫氣再吸收有關之細胞多肽之基因失活的突變或缺失。在一些實施例中，失活的與氫氣再吸收有關之多肽包含大腸桿菌氫化酶-1(Hyd-1)(*hya*操縱子)及大腸桿菌氫化酶-2(Hyd-2)(*hyb*操縱子)。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子多肽或核酸可操作地連接於T7啟動子，諸如中等複本質體或高複本質體中所含之T7啟動子。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸可操作地連接於Trc啟動子，諸如中等複本質體或高複本質體中所含之Trc啟動子。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸可操作地連接於Lac啟動子，諸如低複本質體中所含之Lac啟動子。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸可操作地連接於

內源啟動子，諸如內源鹼性絲胺酸蛋白酶啟動子。在一些實施例中，異源異戊二烯合成酶、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸整合至不含選擇性標記物或不含可選擇標記物之細胞的染色體中。

在一些實施例中，一或多種MVA途徑、IDI、DXS、異戊二烯合成酶、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸置於在停滯期比在生長期更具活性之啟動子或因子的控制下。舉例而言，一或多種MVA途徑、IDI、DXS、異戊二烯合成酶、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸可置於停滯期σ因子(諸如RpoS)之控制下。在一些實施例中，一或多種MVA途徑、IDI、DXS、異戊二烯合成酶、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸置於在停滯期可誘導之啟動子，諸如在停滯期可由反應調控子誘導呈活性之啟動子的控制下。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，至少一部分細胞於連續培養物(諸如未經稀釋之連續培養物)中歷經至少或約5、10、20、40、50、60、65次或65次以上之細胞分裂，維持異源異戊二烯合成酶、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，包含異戊二烯合成酶、DXS多肽、IDI多肽、MVA途徑、氫化酶、氫化酶成熟或轉錄因子核酸之核酸亦包含選擇性標記物或可選擇標記物，諸如抗生素抗性核酸。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，在有助於細胞

共同製造異戊二烯與氫氣之限氧條件下，於本文所述之任何培養基中培養共同製造異戊二烯與氫氣之細胞。在一些實施例中，使細胞於限氧培養物中生長。在一些實施例中，在每莫耳異戊二烯0.5莫耳氧氣存在下使細胞生長。在一些實施例中，在不存在氧氣下使細胞以厭氧方式生長。

在一些實施例中，本文所述之任何細胞均於限氧培養物中生長且共同製造異戊二烯與氫氣。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞以大於約400 $nmol/g_{wcm}/h$之速率製造異戊二烯，且以大於約125 $nmol/g_{wcm}/h$之速率製造氫氣。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞以約400 $nmol/g_{wcm}/h$至約2.0×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之速率製造異戊二烯，且以約125 $nmol/g_{wcm}/h$至約1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$之速率製造氫氣。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞以約400 $nmol/g_{wcm}/h$與約2.0×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間、約500 $nmol/g_{wcm}/h$與約1.5×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間、約750 $nmol/g_{wcm}/h$與約1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間、約1000 $nmol/g_{wcm}/h$與約1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間、約2500 $nmol/g_{wcm}/h$與約1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間、約5000 $nmol/g_{wcm}/h$與約1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間、約7500 $nmol/g_{wcm}/h$與約1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間、及約1×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$與約1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$之間的速率製造異戊二烯。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞製造大於約400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、

3,000、4,000、5,000 nmol/g_{wcm}/h或5,000 nmol/g_{wcm}/h以上之異戊二烯。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞以約125 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約250 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約500 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約750 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約1000 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約1250 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約2500 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約5000 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約7500 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、及約1.00×10^4 nmol/g_{wcm}/h至約1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h之速率製造氫氣。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞製造大於約125、250、500、750、1000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500、10,000 nmol/g_{wcm}/h或10,000 nmol/g_{wcm}/h以上之氫氣。

在一些實施例中，本文所述之任何細胞均於限氧培養物中生長且共同製造異戊二烯與氫氣。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞的異戊二烯平均體積生產力大於約0.1 mg/$L_{培養液}$/h，且氫氣平均體積生產力大於約0.005 mg/$L_{培養液}$/h。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞的異戊二烯峰值體積生產力大於約1000 mg/$L_{培養液}$/h，且氫氣峰值體積生產力大於約5 mg/$L_{培養液}$/h。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞的異戊二烯峰值體積生產力大於約3000 mg/$L_{培養液}$/h，

且氫氣峰值體積生產力大於約5 mg/L培養液/h。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞的異戊二烯峰值體積生產力大於約5000 mg/L培養液/h，且氫氣峰值體積生產力大於約5 mg/L培養液/h。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞的異戊二烯平均體積生產力在約0.1 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間，且氫氣平均體積生產力在約0.005 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞的異戊二烯平均體積生產力在約1 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約5 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約10 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約25 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約50 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約100 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約250 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約500 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、約1000 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間、及約2500 mg/L培養液/h與約5000 mg/L培養液/h之間，且氫氣平均體積生產力在約0.01 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間、約0.025 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間、約0.05 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間、約0.1 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間、約0.25 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間、約0.5 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間、約1 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間、及約2.5 mg/L培養液/h與約5 mg/L培養液/h之間。

在一些實施例中，本文所述之任何細胞均於限氧培養物中生長且共同製造異戊二烯與氫氣。在一些實施例中，限

氧培養物中之細胞使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過約0.002莫耳%轉化成異戊二烯，且製造之氫氣等效於超過細胞自細胞培養基中消耗之碳的約0.024莫耳%。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過約0.002莫耳%轉化成異戊二烯，且製造之氫氣等效於超過細胞自細胞培養基中消耗之碳的約400莫耳%。

在一些實施例中，本文所述之共同製造異戊二烯與氫氣之任何細胞均於限氧培養物中生長。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞共同製造異戊二烯與氫氣，其比率範圍為每3莫耳%之氫氣至少1莫耳%之異戊二烯至每4莫耳%之氫氣至少1莫耳%之異戊二烯。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞製造含有1至11莫耳%之異戊二烯及3至33莫耳%之氫氣的釋出氣體。在一些實施例中，細胞製造1至11莫耳%之異戊二烯及4至44莫耳%之氫氣。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞亦製造含有氧氣、二氧化碳或氮氣之釋出氣體。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞製造含有0至21莫耳%之氧氣、18至44莫耳%之二氧化碳及0至78莫耳%之氮氣的釋出氣體。

在另一態樣中，本文中提供於限氧培養物中共同製造異戊二烯與氫氣之細胞，其包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸，其中該等細胞：(i)以大於約400 $nmol/g_{wcm}/h$之速率製造異戊二烯且以大於約125 $nmol/g_{wcm}/h$之速率製造氫氣；(ii)異戊二烯平均體積生產力大於約0.1 $mg/L_{培養液}/h$

且氫氣平均體積生產力大於約0.005 mg/L培養液/h；或(iii)使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過約0.002莫耳%轉化成異戊二烯，且製造之氫氣等效於超過細胞自細胞培養基中消耗之碳的約0.024莫耳%。

在一些實施例中，限氧培養物中之細胞包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸，其中該異源核酸可操作地連接於啟動子，且其中該等細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯及大於約125 nmol/g_{wcm}/h之氫氣。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸，其中該異源核酸可操作地連接於啟動子，且其中該等細胞之異戊二烯平均體積生產力大於約0.1 mg/L培養液/h且氫氣平均體積生產力大於約0.005 mg/L培養液/h。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸，其中該異源核酸可操作地連接於啟動子，且其中該等細胞使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過約0.002莫耳%轉化成異戊二烯，且使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過約0.024莫耳%轉化成氫氣。在一些實施例中，異戊二烯合成酶多肽為植物異戊二烯合成酶多肽。

在一些實施例中，限氧培養物中之包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸的細胞以約400 nmol/g_{wcm}/h與約2.0×10^5 nmol/g_{wcm}/h之間、約500 nmol/g_{wcm}/h與約1.5×10^5 nmol/g_{wcm}/h之間、約750 nmol/g_{wcm}/h與約1×10^5 nmol/g_{wcm}/h之間、約1000 nmol/g_{wcm}/h與約1×10^5 nmol/g_{wcm}/h之間、約2500 nmol/g_{wcm}/h與約1×10^5

nmol/g_{wcm}/h 之間、約 5000 nmol/g_{wcm}/h 與約 1×10^5 nmol/g_{wcm}/h 之間、約 7500 nmol/g_{wcm}/h 與約 1×10^5 nmol/g_{wcm}/h 之間、及約 1×10^4 nmol/g_{wcm}/h 與約 1×10^5 nmol/g_{wcm}/h 之間的速率製造異戊二烯，且以約 125 nmol/g_{wcm}/h至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 250 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 500 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 750 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 1000 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 1250 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 2500 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 5000 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、約 7500 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h、及約 1.00×10^4 nmol/g_{wcm}/h 至約 1.25×10^4 nmol/g_{wcm}/h之速率製造氫氣。

在一些實施例中，本文中提供共同製造異戊二烯與氫氣之方法，該等方法包含：(a)在適於共同製造異戊二烯與氫氣之條件下培養細胞；及(b)共同製造異戊二烯與氫氣，其中該等細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，且其中該等細胞製造大於約125 nmol/g_{wcm}/h之氫氣。

在一些實施例中，限氧培養物中之包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸的細胞以約400 nmol/g_{wcm}/h與約 2.0×10^5 nmol/g_{wcm}/h之間、約500 nmol/g_{wcm}/h與約 1.5×10^5 nmol/g_{wcm}/h 之間、約 750 nmol/g_{wcm}/h 與約 1×10^5 nmol/g_{wcm}/h 之間、約 1000 nmol/g_{wcm}/h 與約 1×10^5

$nmol/g_{wcm}/h$ 之間、約 2500 $nmol/g_{wcm}/h$ 與約 1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$ 之間、約 5000 $nmol/g_{wcm}/h$ 與約 1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$ 之間、約 7500 $nmol/g_{wcm}/h$ 與約 1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$ 之間、及約 1×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$ 與約 1×10^5 $nmol/g_{wcm}/h$ 之間的速率製造異戊二烯，且以約 125 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 250 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 500 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 750 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 1000 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 1250 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 2500 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 5000 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、約 7500 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$、及約 1.00×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$ 至約 1.25×10^4 $nmol/g_{wcm}/h$之速率製造氫氣。

在一些實施例中，本文中提供共同製造異戊二烯與氫氣之方法，該等方法包含：(a)在適於共同製造異戊二烯與氫氣之條件下培養細胞；及(b)共同製造異戊二烯與氫氣，其中該等細胞之異戊二烯平均體積生產力大於約0.1 $mg/L_{培養液}/h$，且氫氣平均體積生產力大於約0.005 $mg/L_{培養液}/h$。

在一些實施例中，本文中提供共同製造異戊二烯與氫氣之方法，該等方法包含：(a)在適於共同製造異戊二烯與氫氣之條件下培養細胞；及(b)共同製造異戊二烯與氫氣，其中該等細胞使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過約

0.002莫耳%轉化成異戊二烯，且製造之氫氣等效於超過細胞自細胞培養基中消耗之碳的約0.024莫耳%。

在一些實施例中，本文中提供包含以下之組合物：異戊二烯及氫氣，其比率範圍為每3莫耳%之氫氣至少1莫耳%之異戊二烯至每4莫耳%之氫氣至少1莫耳%之異戊二烯；及0.1莫耳%或0.1莫耳%以下之揮發性雜質。在一些實施例中，組合物進一步包含1至11莫耳%之異戊二烯及4至44莫耳%之氫氣。在一些實施例中，組合物進一步包含氧氣、二氧化碳或氮氣。在一些實施例中，組合物進一步包含0至21莫耳%之氧氣、18至44莫耳%之二氧化碳及0至78莫耳%之氮氣。在一些實施例中，組合物進一步包含1.0×10^{-4}莫耳%或1.0×10^{-4}莫耳%以下之非甲烷揮發性雜質。在一些實施例中，非甲烷揮發性雜質包含以下一或多者：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、2,3-環庚烯醇吡啶或線性異戊二烯聚合物(諸如源自多個異戊二烯單元的聚合之線性

異戊二烯二聚體或線性異戊二烯三聚體)。在一些實施例中，非甲烷揮發性雜質包含以下一或多者：異戊二烯組合物包括以下一或多者：醇、醛或酮(諸如本文所述之任何醇、醛或酮)。在一些實施例中，異戊二烯組合物包括(i)醇及醛，(ii)醇及酮，(iii)醛及酮，或(iv)醇、醛及酮。在一些實施例中，非甲烷揮發性雜質包含以下一或多者：甲醇、乙醛、乙醇、甲硫醇、1-丁醇、3-甲基-1-丙醇、丙酮、乙酸、2-丁酮、2-甲基-1-丁醇或吲哚。

本文中亦提供共同製造異戊二烯與氫氣之方法，該等方法包含：a)在適於共同製造異戊二烯與氫氣之條件下培養細胞；及b)共同製造異戊二烯與氫氣，其中由限氧培養物中之細胞製造之異戊二烯的峰值濃度大於約10 ng/$L_{培養液}$，且細胞之氫氣析出速率大於約0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h。在此等方法中之任一者之一些實施例中，氫氣析出速率為約以下任一範圍：0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h至約10 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h至約5 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h至約2.5 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h至約1 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h至約0.5 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h至約0.25 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.0025 mmol/$L_{培養液}$/h至約0.025 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.025 mmol/$L_{培養液}$/h至約0.5 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.025 mmol/$L_{培養液}$/h至約1 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.025 mmol/$L_{培養液}$/h至約2.5 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.025 mmol/$L_{培養液}$/h至約5 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.025 mmol/$L_{培養液}$/h至約10 mmol/$L_{培養液}$/h、約0.25

mmol/L培養液/h至1 mmol/L培養液/h、約0.25 mmol/L培養液/h至2.5 mmol/L培養液/h、約0.25 mmol/L培養液/h至2.5 mmol/L培養液/h、及約0.25 mmol/L培養液/h至10 mmol/L培養液/h。

本文中亦提供共同製造異戊二烯與氫氣之方法，其包含a)在適於共同製造異戊二烯與氫氣之條件下培養細胞；及b)共同製造異戊二烯與氫氣，其中異戊二烯之液相濃度小於約200 mg/L，該等細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，且該等細胞之氫氣析出速率大於約0.0025 mmol/L/h。在一些實施例中，培養物中異戊二烯之液相濃度小於約以下任一值：175 mg/L、150 mg/L、125 mg/L、100 mg/L、75 mg/L、50 mg/L、25 mg/L、20 mg/L、15 mg/L、10 mg/L、5 mg/L或2.5 mg/L。在一些實施例中，培養物中異戊二烯之液相濃度為約以下任一範圍：0.1 mg/L至200 mg/L、1 mg/L至200 mg/L、1 mg/L至150 mg/L、1 mg/L至100 mg/L、1 mg/L至50 mg/L、1 mg/L至25 mg/L、1 mg/L至20 mg/L或10 mg/L至20 mg/L。在此等方法中之任一者之一些實施例中，氫氣析出速率為約以下任一範圍：0.0025 mmol/L培養液/h至約10 mmol/L培養液/h、約0.0025 mmol/L培養液/h至約5 mmol/L培養液/h、約0.0025 mmol/L培養液/h至約2.5 mmol/L培養液/h、約0.0025 mmol/L培養液/h至約1 mmol/L培養液/h、約0.0025 mmol/L培養液/h至約0.5 mmol/L培養液/h、約0.0025 mmol/L培養液/h至約0.25 mmol/L培養液/h、約0.0025 mmol/L培養液/h至約0.025 mmol/L培養液/h、約0.025 mmol/L培養液/h至約0.5 mmol/L培養液/h、約0.025 mmol/L培養液/h至約1

mmol/L培養液/h、約0.025 mmol/L培養液/h至約2.5 mmol/L培養液/h、約0.025 mmol/L培養液/h至約5 mmol/L培養液/h、約0.025 mmol/L培養液/h至約10 mmol/L培養液/h、約0.25 mmol/L培養液/h至1 mmol/L培養液/h、約0.25 mmol/L培養液/h至2.5 mmol/L培養液/h、約0.25 mmol/L培養液/h至2.5 mmol/L培養液/h、及約0.25 mmol/L培養液/h至10 mmol/L培養液/h。

在一態樣中，本文中提供於限氧培養物中共同製造異戊二烯與氫氣之細胞。在一些實施例中，限氧培養物為厭氧的。在一些實施例中，限氧培養物中之細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯及大於約125 nmol/g_{wcm}/h之氫氣。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。

在一些實施例中，本文中提供之於限氧培養物中之細胞使細胞培養基中超過約0.002%之碳轉化成異戊二烯且製造的氫氣等效於細胞培養基中超過約0.024莫耳%之碳。在一些實施例中，限氧培養物為厭氧的。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於

啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。

在一些實施例中，本文中提供於限氧培養物中之包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸的細胞。在一些實施例中，限氧培養物為厭氧的。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。

在一態樣中，本文中提供共同製造異戊二烯與另一化合物之方法，諸如使用本文所述之任何細胞共同製造異戊二烯與氫氣之方法。在一些實施例中，該方法包含在足以製造大於約400 $nmol/g_{wcm}/h$之異戊二烯及大於約125

nmol/g_{wcm}/h之氫氣的限氧條件下培養細胞。在一些實施例中，限氧培養物為厭氧的。在一些實施例中，該方法亦包括回收細胞所製造之異戊二烯及氫氣。在一些實施例中，該方法進一步包括純化細胞所製造之異戊二烯及氫氣。在一些實施例中，該方法包括使異戊二烯聚合。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。在多個實施例中，在停滯期期間所製造之異戊二烯之量(諸如所製造之異戊二烯的總量，或1 OD_{600}每小時每公升培養液所製造之異戊二烯之量)大於或約為在生長期期間歷經相同持續時間所製造之異戊二烯之量的兩倍或兩倍以上。

在一些實施例中，該方法包括在足以使細胞培養基中超過約0.002%之碳(mol/mol)轉化成異戊二烯且製造的氫氣等效於細胞培養基中超過約0.024莫耳%之碳之限氧條件下培養細胞。在一些實施例中，限氧培養物為厭氧的。在一些實施例中，該方法亦包括回收細胞所製造之異戊二烯及氫氣。在一些實施例中，該方法進一步包括純化細胞所製造

之異戊二烯及氫氣。在一些實施例中，該方法包括使異戊二烯聚合。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，微生物多肽碳源包括一或多種來自酵母或細菌之多肽。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，植物多肽碳源包括一或多種來自大豆、玉米、芥花、麻風樹、棕櫚、花生、向日葵、椰子、芥子、油菜籽、棉籽、棕櫚仁、橄欖、紅花、芝麻或亞麻子之多肽。

在一些實施例中，僅在停滯期共同製造異戊二烯與氫氣。在一些實施例中，在生長期與停滯期皆共同製造異戊二烯與氫氣。在多個實施例中，在停滯期期間所製造之異戊二烯之量(諸如所製造之異戊二烯的總量，或1 OD_{600}每小時每公升培養液所製造之異戊二烯之量)大於或約為在生長期期間歷經相同持續時間所製造之異戊二烯之量的2、3、4、5、10、20、30、40、50倍或50倍以上。在多個實施例中，在停滯期期間所製造之氫氣之量(諸如所製造

之氫氣的總量，或1 OD_{600}每小時每公升培養液所製造之氫氣之量)大於或約為在生長期期間歷經相同持續時間所製造之氫氣之量的2、3、4、5、10、20、30、40、50倍或50倍以上。

在一些實施例中，本文所提供之組合物包含氫氣，及以組合物中所有C5烴之總重量計大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，組合物包含小於或約0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，組合物具有小於或約0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔。在特定實施例中，組合物具有大於約2 mg之異戊二烯，且以組合物中所有C5烴之總重量計，具有大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，組合物具有小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、

0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在特定實施例中，組合物亦包含大於約2 mg之異戊二烯及大於約0.48 mg之氫氣。

在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分具有小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(氣相之揮發性有機部分中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在特定實施例中，氣相之揮發性有機部分亦具有大於約2 mg之異戊二烯及大於約0.48 mg之氫氣。

在一些實施例中，系統包括本文所述之任何細胞及/或組合物。在一些實施例中，系統包括反應器，其腔室包含於限氧培養物中製造大於約400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000 nmol/g_{wcm}/h或5,000 nmol/g_{wcm}/h以上之異戊二烯及大於約125、250、500、750、1000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500、10,000 nmol/g_{wcm}/h或10,000 nmol/g_{wcm}/h以上之氫氣的細胞。在一些實施例中，系統並非封閉系統。在一些實施例中，自系統中移出至少一部分異戊二烯。在一些實施例中，系統包括包含異戊二烯及氫氣之氣相。在多個實施例中，氣相包含本文所述之任何組合物。

在一態樣中，本文中提供一種由本文所述之任何組合物或方法製造之產品。

在高異戊二烯力價下之細胞生存力

異戊二烯為許多植物、動物及微生物所分泌之疏水性分子。細菌(諸如桿菌屬)製造含量相當低的異戊二烯。儘管某種跡象表明植物分泌異戊二烯以幫助進行熱保護，但已假定異戊二烯可對藍細菌或真菌起拮抗作用，或充當抗微生物劑。參見，例如Ladygina等人，*Process Biochemistry* 41:1001-1014 (2006)，其以全文引用的方式併入，尤其關於起拮抗作用之異戊二烯。由於自然界中產生之極低產量水準足以抗微生物，故極大關注於異戊二烯工業化所必需之異戊二烯力價及生產力水準將殺死宿主微生物。

吾人已發現產生供異戊二烯工業化用之異戊二烯力價及生產力水準，同時維持如二氧化碳析出速率或總二氧化碳析出速率所指示之細胞生存力及/或代謝活性的方法。

本文中提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。在一些實施例中，所製造之異戊二烯為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一範圍：400 nmol/g_{wcm}/h至1 mol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至1 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至40 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至4 mmol/g_{wcm}/h、1 mmol/g_{wcm}/h至1.5 mmol/g_{wcm}/h、1.5 mmol/g_{wcm}/h至3 mmol/g_{wcm}/h、3 mmol/g_{wcm}/h至5

mmol/g_{wcm}/h、5 mmol/g_{wcm}/h至25 mmol/g_{wcm}/h、25 mmol/g_{wcm}/h至100 mmol/g_{wcm}/h、100 mmol/g_{wcm}/h至500 mmol/g_{wcm}/h、或500 mmol/g_{wcm}/h至1000 mmol/g_{wcm}/h。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一值：1 mmol/g_{wcm}/h、1.5 mmol/g_{wcm}/h、2 mmol/g_{wcm}/h、3 mmol/g_{wcm}/h、4 mmol/g_{wcm}/h或5 mmol/g_{wcm}/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一值：50 mmol/L/h、100 mmol/L/h、150 mmol/L/h、200 mmol/L/h、250 mmol/L/h、300 mmol/L/h、350 mmol/L/h、400 mmol/L/h、450 mmol/L/h或500 mmol/L/h。

本文中亦提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，且細胞生存力降低程度小於約2倍。在一些實施例中，所製造之異戊二烯為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一範圍：400 nmol/g_{wcm}/h至1 mol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至1 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至40 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至4 mmol/g_{wcm}/h、1

$mmol/g_{wcm}/h$ 至 1.5 $mmol/g_{wcm}/h$、1.5 $mmol/g_{wcm}/h$ 至 3 $mmol/g_{wcm}/h$、3 $mmol/g_{wcm}/h$ 至 5 $mmol/g_{wcm}/h$、5 $mmol/g_{wcm}/h$ 至 25 $mmol/g_{wcm}/h$、25 $mmol/g_{wcm}/h$ 至 100 $mmol/g_{wcm}/h$、100 $mmol/g_{wcm}/h$ 至 500 $mmol/g_{wcm}/h$、或 500 $mmol/g_{wcm}/h$ 至 1000 $mmol/g_{wcm}/h$。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一值：1 $mmol/g_{wcm}/h$、1.5 $mmol/g_{wcm}/h$、2 $mmol/g_{wcm}/h$、3 $mmol/g_{wcm}/h$、4 $mmol/g_{wcm}/h$ 或 5 $mmol/g_{wcm}/h$。在一些實施例中，細胞生存力降低程度小於約以下任一值：1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍、0.75倍、0.5倍或0.25倍。在一些實施例中，細胞生存力降低至約1/2。

本文中另外提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中培養中細胞所製造之異戊二烯之累積總生產力大於約 0.2 $mg/L_{培養液}/h$，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約 1×10^{-18} mmol/L/h。在一些實施例中，異戊二烯之累積總生產力為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之累積總生產力為約以下任一範圍：0.2 $mg/L_{培養液}/h$ 至 5 $g/L_{培養液}/h$、0.2 $mg/L_{培養液}/h$ 至 1 $g/L_{培養液}/h$、1 $g/L_{培養液}/h$ 至 2.5 $g/L_{培養液}/h$、2.5 $g/L_{培養液}/h$ 至 5 $g/L_{培養液}/h$。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h 至約 1 mol/L/h、1 mmol/L/h 至 1 mol/L/h、25 mmol/L/h 至 750 mmol/L/h、25 mmol/L/h 至 75 mmol/L/h、250 mmol/L/h 至

750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一值：50 mmol/L/h、100 mmol/L/h、150 mmol/L/h、200 mmol/L/h、250 mmol/L/h、300 mmol/L/h、350 mmol/L/h、400 mmol/L/h、450 mmol/L/h或500 mmol/L/h。

本文中提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中培養中細胞所製造之異戊二烯之累積總生產力大於約0.2 mg/L$_{培養液}$/h，且細胞生存力降低程度小於約2倍。在一些實施例中，異戊二烯之累積總生產力為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之累積總生產力為約以下任一範圍：0.2 mg/L$_{培養液}$/h至5 g/L$_{培養液}$/h、0.2 mg/L$_{培養液}$/h至1 g/L$_{培養液}$/h、1 g/L$_{培養液}$/h至2.5 g/L$_{培養液}$/h、2.5 g/L$_{培養液}$/h至5 g/L$_{培養液}$/h。在一些實施例中，細胞生存力降低程度小於約以下任一值：1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍、0.75倍、0.5倍或0.25倍。

本文中亦提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中培養中細胞所製造之異戊二烯之峰值濃度大於約10 ng/L$_{培養液}$，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。在一些實施例中，異戊二烯之峰值濃度為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之峰值濃度為約以下任一

範圍：10 ng/L培養液至500 ng/L培養液、500 ng/L培養液至1 μg/L培養液、1 μg/L培養液至5 μg/L培養液、5 μg/L培養液至50 μg/L培養液、5 μg/L培養液至100 μg/L培養液、5 μg/L培養液至250 μg/L培養液、250 μg/L培養液至500 μg/L培養液、500 μg/L培養液至1 mg/L培養液、1 mg/L培養液至50 mg/L培養液、1 mg/L培養液至100 mg/L培養液、1 mg/L培養液至200 mg/L培養液、10 ng/L培養液至200 mg/L培養液、5 μg/L培養液至100 mg/L培養液、或5 μg/L培養液至200 mg/L培養液。在一些實施例中，峰值濃度為約以下任一值：10 ng/L培養液、100 ng/L培養液、1 μg/L培養液、5 μg/L培養液、1 mg/L培養液、30 mg/L培養液、100 mg/L培養液或200 mg/L培養液。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一值：50 mmol/L/h、100 mmol/L/h、150 mmol/L/h、200 mmol/L/h、250 mmol/L/h、300 mmol/L/h、350 mmol/L/h、400 mmol/L/h、450 mmol/L/h或500 mmol/L/h。

另外，本文中亦提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中培養中細胞所製造之異戊二烯之峰值濃度大於約10 ng/L培養液，且細胞生存力降低程度小於約2倍。在一些實施例中，異戊二烯之峰值濃度為題為「例示性製造異戊

二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之峰值濃度為約以下任一範圍：10 ng/$L_{培養液}$至500 ng/$L_{培養液}$、500 ng/$L_{培養液}$至1 μg/$L_{培養液}$、1 μg/$L_{培養液}$至5 μg/$L_{培養液}$、5 μg/$L_{培養液}$至50 μg/$L_{培養液}$、5 μg/$L_{培養液}$至100 μg/$L_{培養液}$、5 μg/$L_{培養液}$至250 μg/$L_{培養液}$、250 μg/$L_{培養液}$至500 μg/$L_{培養液}$、500 μg/$L_{培養液}$至1 mg/$L_{培養液}$、1 mg/$L_{培養液}$至50 mg/$L_{培養液}$、1 mg/$L_{培養液}$至100 mg/$L_{培養液}$、1 mg/$L_{培養液}$至200 mg/$L_{培養液}$、10 ng/$L_{培養液}$至200 mg/$L_{培養液}$、5 μg/$L_{培養液}$至100 mg/$L_{培養液}$、或5 μg/$L_{培養液}$至200 mg/$L_{培養液}$。在一些實施例中，峰值濃度為約以下任一值：10 ng/$L_{培養液}$、100 ng/$L_{培養液}$、1 μg/$L_{培養液}$、5 μg/$L_{培養液}$、1 mg/$L_{培養液}$、30 mg/$L_{培養液}$、100 mg/$L_{培養液}$或200 mg/$L_{培養液}$。在一些實施例中，細胞生存力降低程度小於約以下任一值：1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍、0.75倍、0.5倍或0.25倍。在一些實施例中，細胞生存力降低至約1/2。

本文中亦提供包含編碼異戊二烯合成酶多肽之核酸的培養中細胞，其中該等細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。在一些實施例中，所製造之異戊二烯為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一範圍：400 nmol/g_{wcm}/h至1 mol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至1 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至40 mmol/g_{wcm}/h、400 nmol/g_{wcm}/h至4 mmol/g_{wcm}/h、1 mmol/g_{wcm}/h至1.5

$mmol/g_{wcm}/h$、1.5 $mmol/g_{wcm}/h$至3 $mmol/g_{wcm}/h$、3 $mmol/g_{wcm}/h$至5 $mmol/g_{wcm}/h$、5 $mmol/g_{wcm}/h$至25 $mmol/g_{wcm}/h$、25 $mmol/g_{wcm}/h$至100 $mmol/g_{wcm}/h$、100 $mmol/g_{wcm}/h$至500 $mmol/g_{wcm}/h$、或500 $mmol/g_{wcm}/h$至1000 $mmol/g_{wcm}/h$。在一些實施例中，異戊二烯之量為約以下任一值：1 $mmol/g_{wcm}/h$、1.5 $mmol/g_{wcm}/h$、2 $mmol/g_{wcm}/h$、3 $mmol/g_{wcm}/h$、4 $mmol/g_{wcm}/h$或5 $mmol/g_{wcm}/h$。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一值：50 mmol/L/h、100 mmol/L/h、150 mmol/L/h、200 mmol/L/h、250 mmol/L/h、300 mmol/L/h、350 mmol/L/h、400 mmol/L/h、450 mmol/L/h或500 mmol/L/h。

本文中亦提供包含編碼異戊二烯合成酶多肽之核酸的培養中細胞，其中該等培養中細胞所製造之異戊二烯之累積總生產力大於約0.2 $mg/L_{培養液}/h$，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。在一些實施例中，異戊二烯之累積總生產力為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之累積總生產力為約以下任一範圍：0.2 $mg/L_{培養液}/h$至5 $g/L_{培養液}/h$、0.2 $mg/L_{培養液}/h$至1 $g/L_{培養液}/h$、1 $g/L_{培養液}/h$至

2.5 g/L培養液/h、2.5 g/L培養液/h至5 g/L培養液/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一值：50 mmol/L/h、100 mmol/L/h、150 mmol/L/h、200 mmol/L/h、250 mmol/L/h、300 mmol/L/h、350 mmol/L/h、400 mmol/L/h、450 mmol/L/h或500 mmol/L/h。

另外，本文中提供包含編碼異戊二烯合成酶多肽之核酸的培養中細胞，其中該等培養中細胞所製造之異戊二烯之峰值濃度大於約10 ng/L培養液，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。在一些實施例中，異戊二烯之峰值濃度為題為「例示性製造異戊二烯」之章節中所揭示之任何濃度或量。在一些實施例中，異戊二烯之峰值濃度為約以下任一範圍：10 ng/L培養液至500 ng/L培養液、500 ng/L培養液至1 μg/L培養液、1 μg/L培養液至5 μg/L培養液、5 μg/L培養液至50 μg/L培養液、5 μg/L培養液至100 μg/L培養液、5 μg/L培養液至250 μg/L培養液、250 μg/L培養液至500 μg/L培養液、500 μg/L培養液至1 mg/L培養液、1 mg/L培養液至50 mg/L培養液、1 mg/L培養液至100 mg/L培養液、1 mg/L培養液至200 mg/L培養液、10 ng/L培養液至200 mg/L培養液、5 μg/L培養液至100 mg/L培養液、或5 μg/L培養液至200 mg/L培養液。在一些實施例中，峰值濃度為約以下任

一值：10 ng/L培養液、100 ng/L培養液、1 μg/L培養液、5 μg/L培養液、1 mg/L培養液、30 mg/L培養液、100 mg/L培養液或200 mg/L培養液。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一值：50 mmol/L/h、100 mmol/L/h、150 mmol/L/h、200 mmol/L/h、250 mmol/L/h、300 mmol/L/h、350 mmol/L/h、400 mmol/L/h、450 mmol/L/h或500 mmol/L/h。

在本文所述之任何方法及細胞之一些實施例中，將表現MVA途徑及/或DXP途徑RNA及/或來自異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之複本中之一或多者的蛋白質之細胞的二氧化碳析出速率及/或細胞生存力與缺乏異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之複本中之一或多者的對照細胞相比較。在一些實施例中，將在誘導性啟動子(其中該啟動子經誘導)控制下表現MVA途徑及/或DXP途徑RNA及/或來自異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之複本中之一或多者的蛋白質之細胞的二氧化碳析出速率及/或細胞生存力與在誘導性啟動子(其中該啟動子未加以誘導(未經誘導))控制下含有異源MVA途徑及/或DXP途徑核酸及/或MVA途徑及/或DXP途徑核酸之

複本中之一或多者的對照細胞相比較。在一些實施例中，誘導性啟動子為β-半乳糖苷酶啟動子。

在一些實施例中，製造異戊二烯之方法包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。本文中另外提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中培養中細胞所製造之異戊二烯之累積總生產力大於約0.2 mg/$L_{培養液}$/h，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。本文中亦提供製造異戊二烯之方法，其包含：a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及b)製造異戊二烯，其中培養中細胞所製造之異戊二烯之峰值濃度大於約10 ng/$L_{培養液}$，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。在此等方法中之任一者之一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約50 mmol/L/h或約500 mmol/L/h。

本文中另外提供包含編碼異戊二烯合成酶多肽之核酸的培養中細胞，其中該等細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18}

mmol/L/h。本文中亦提供包含編碼異戊二烯合成酶多肽之核酸的培養中細胞，其中該等培養中細胞所製造之異戊二烯之累積總生產力大於約0.2 mg/$L_{培養液}$/h，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。另外，本文中提供包含編碼異戊二烯合成酶多肽之核酸的培養中細胞，其中該等培養中細胞所製造之異戊二烯之峰值濃度大於約10 ng/$L_{培養液}$，且該等細胞之二氧化碳析出速率大於約1×10^{-18} mmol/L/h。在此等培養中細胞中之任一者之一些實施例中，二氧化碳析出速率為約以下任一範圍：1×10^{-18} mmol/L/h至約1 mol/L/h、1 mmol/L/h至1 mol/L/h、25 mmol/L/h至750 mmol/L/h、25 mmol/L/h至75 mmol/L/h、250 mmol/L/h至750 mmol/L/h、或450 mmol/L/h至550 mmol/L/h。在一些實施例中，二氧化碳析出速率為約50 mmol/L/h或約500 mmol/L/h。

本文中亦提供製造異戊二烯之方法，其包含a)在適於製造異戊二烯之條件下培養細胞；及(b)製造異戊二烯，其中異戊二烯之液相濃度小於約200 mg/L，且該等細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯。在一些實施例中，培養物中異戊二烯之液相濃度小於約以下任一值：175 mg/L、150 mg/L、125 mg/L、100 mg/L、75 mg/L、50 mg/L、25 mg/L、20 mg/L、15 mg/L、10 mg/L、5 mg/L或2.5 mg/L。在一些實施例中，培養物中異戊二烯之液相濃度為約以下任一範圍：0.1 mg/L至200 mg/L、1 mg/L至200 mg/L、1 mg/L至150 mg/L、1 mg/L至100 mg/L、1 mg/L至50

mg/L、1 mg/L至25 mg/L、1 mg/L至20 mg/L、或10 mg/L至20 mg/L。

本文中亦提供製造化合物之方法，其中該化合物具有一或多種選自由以下組成之群的特徵：(a)亨利定律係數小於約250 M/atm，及(b)水中溶解度小於約100 g/L。在一些實施例中，該方法包含：a)在適於製造化合物之條件下培養細胞，其中以約0.01 vvm至約2 vvm之釋氣速率添加氣體(諸如添加氣體至系統中，諸如醱酵系統中)；及b)製造化合物。在一些實施例中，化合物之亨利定律係數小於約以下任一值：200 M/atm、150 M/atm、100 M/atm、75 M/atm、50 M/atm、25 M/atm、10 M/atm、5 M/atm或1 M/atm。在一些實施例中，化合物之水中溶解度小於約以下任一值：75 g/L、50 g/L、25 g/L、10 g/L、5 g/L或1 g/L。在一些實施例中，化合物係選自由以下組成之群：異戊二烯、醛(例如乙醛)、酮(例如丙酮或2-丁酮)、醇(例如甲醇、乙醇、1-丁醇，或C5醇，諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)、醇酯(例如乙酸乙酯或C5醇之乙醯酯)、半萜、單萜、倍半萜，及C1至C5烴(例如甲烷、乙烷、乙烯或丙烯)。在一些實施例中，C1至C5烴為飽和、不飽和或分支的。在特定實施例中，化合物為異戊二烯。在製造上述任何化合物之方法的一些實施例中，釋氣速率為約以下任一範圍：0.1 vvm至1 vvm、0.2 vvm至1 vvm、或0.5 vvm至1 vvm。

在一態樣中，使用培養中細胞製造異戊二烯。在一些實

施例中，培養中細胞製造大於約400奈莫耳異戊二烯/公克細胞(細胞濕重)/小時(nmol/g_{wcm}/h)之異戊二烯。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。

在一些實施例中，培養中細胞使細胞培養基中超過約0.002%之碳轉化成異戊二烯。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。

在一些實施例中，培養中細胞包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊

二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。

在一態樣中，本文中描述製造異戊二烯之方法，諸如使用本文所述之任何細胞製造異戊二烯之方法。在一些實施例中，該方法包含在足以製造大於約400 $nmol/g_{wcm}/h$之異戊二烯之條件下培養細胞。在一些實施例中，該方法亦包括回收細胞所製造之異戊二烯。在一些實施例中，該方法包括純化細胞所製造之異戊二烯。在一些實施例中，該方法包括使異戊二烯聚合。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡

葡萄糖條件下培養細胞。在多個實施例中，在停滯期期間所製造之異戊二烯之量(諸如所製造之異戊二烯的總量，或1 OD_{600}每小時每公升培養液所製造之異戊二烯之量)大於或約為在生長期期間歷經相同持續時間所製造之異戊二烯之量的兩倍或兩倍以上。在一些實施例中，氣相包含大於或約9.5%(體積)之氧氣，且氣相中異戊二烯之濃度低於可燃下限或高於可燃上限。在特定實施例中，(i)氣相中異戊二烯之濃度低於可燃下限或高於可燃上限，及(ii)細胞製造大於約400 $nmol/g_{wcm}/h$之異戊二烯。

在一些實施例中，該方法包括在足以使細胞培養基中超過約0.002%(mol/mol)之碳轉化成異戊二烯的條件下培養細胞。在一些實施例中，該方法亦包括回收細胞所製造之異戊二烯。在一些實施例中，該方法包括純化細胞所製造之異戊二烯。在一些實施例中，該方法包括使異戊二烯聚合。在一些實施例中，細胞具有(i)編碼異戊二烯合成酶多肽及(ii)可操作地連接於啟動子之異源核酸。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。

在一些實施例中，僅在停滯期製造異戊二烯。在一些實

施例中，在生長期與停滯期皆製造異戊二烯。在多個實施例中，在停滯期期間所製造之異戊二烯之量(諸如所製造之異戊二烯的總量，或1 OD_{600}每小時每公升培養液所製造之異戊二烯之量)大於或約為在生長期期間歷經相同持續時間所製造之異戊二烯之量的2、3、4、5、10、20、30、40、50倍或50倍以上。

在一態樣中，本文中描述包含異戊二烯之組合物及系統。在一些實施例中，組合物包含大於或約2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000 mg之異戊二烯。在一些實施例中，組合物包含大於或約2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 g之異戊二烯(w/w)，該組合物之揮發性有機部分為異戊二烯。

在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，組合物包含大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，組合物包含小於或約0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，組合物具有小於或約0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、

0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔。在特定實施例中，組合物具有大於約2 mg之異戊二烯，且以組合物中所有C5烴之總重量計，具有大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。

在一些實施例中，組合物具有小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在特定實施例中，組合物亦具有大於約2 mg之異戊二烯。

在一些實施例中，組合物具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。在一些實施例中，組合物具有大於或約0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、60、80、100或120 μg/L之乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在特定實施例中，組合物具有大於約2 mg之異戊二烯，且具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。

在一些實施例中，組合物包括異戊二烯及一或多種選自

由以下組成之群的第二化合物：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。在多個實施例中，以重量百分比為單位，此等第二組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為大於或約0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%(w/w)。

在一些實施例中，組合物包含(i)包含異戊二烯之氣相，及(ii)製造大於約400 $nmol/g_{wcm}/h$之異戊二烯之培養中細胞。在一些實施例中，組合物包含封閉系統，且當針對1 mL、1 OD_{600}、培養1小時進行校正時，氣相包含大於或約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μg/L之異戊二烯。在一些實施例中，組合物包含開放系統，且當以1 vvm之速率釋氣時，氣相包含大於或約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μg/L之異戊二烯。在一些實施例中，以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量

計，氣相之揮發性有機部分包含大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量計，氣相之揮發性有機部分包含小於或約0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量計，氣相之揮發性有機部分具有小於或約0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔。在特定實施例中，氣相之揮發性有機部分具有大於約2 mg之異戊二烯，且以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量計，具有大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。

在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分具有小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(氣相之揮發性有機部分中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在特定實施例

中，氣相之揮發性有機部分亦具有大於約2 mg之異戊二烯。

在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分具有大於或約0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、60、80、100或120 μg/L之乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在特定實施例中，氣相之揮發性有機部分具有大於約2 mg之異戊二烯，且具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。

在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分包括異戊二烯及一或多種選自由以下組成之群的第二化合物：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、

(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。在多個實施例中，在氣相之揮發性有機部分中，以重量百分比為單位，此等第二組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為大於或約0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%(w/w)。

在本文所述之任何組合物之一些實施例中，至少一部分異戊二烯處於氣相中。在一些實施例中，至少一部分異戊二烯處於液相(諸如冷凝物)中。在一些實施例中，至少一部分異戊二烯處於固相中。在一些實施例中，至少一部分異戊二烯吸附於固體支撐物，諸如包括二氧化矽及/或活性碳之支撐物。在一些實施例中，組合物包括乙醇。在一些實施例中，組合物包括約75至約90重量%之乙醇，諸如約75至約80重量%、約80至約85重量%或約85至約90重量%之乙醇。在一些實施例中，組合物包括約4至約15重量%之異戊二烯，諸如約4至約8重量%、約8至約12重量%或約12至約15重量%之異戊二烯。

在一些實施例中，系統包括本文所述之任何細胞及/或組合物。在一些實施例中，系統包括反應器，其腔室包含製造大於約400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000 nmol/g_{wcm}/h或5,000 nmol/g_{wcm}/h以上之異戊二烯之培養中細胞。在一些實施例中，系統並非封閉系統。在一些實施例中，自系統中移出至少一部分異戊二烯。在一些實

施例中，系統包括包含異戊二烯之氣相。在多個實施例中，氣相包含本文所述之任何組合物。

在本文所述之任何組合物、系統及方法之一些實施例中，於氣相中製造非可燃濃度之異戊二烯。在一些實施例中，氣相包含小於約9.5%(體積)之氧氣。在一些實施例中，氣相包含大於或約9.5%(體積)之氧氣，且氣相中異戊二烯之濃度低於可燃下限或高於可燃上限。在一些實施例中，氣相中非異戊二烯之部分包含約0%至約100%(體積)之氧氣，諸如約10%至約100%(體積)之氧氣。在一些實施例中，氣相中非異戊二烯之部分包含約0%至約99%(體積)之氮氣。在一些實施例中，氣相中非異戊二烯之部分包含約1%至約50%(體積)之CO_2。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，培養中細胞製造大於或約400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000 nmol/g_{wcm}/h或5,000 nmol/g_{wcm}/h以上之異戊二烯。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，培養中細胞使細胞培養基中大於或約0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.12、0.14、0.16、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6%或1.6%以上之碳轉化成異戊二烯。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，培養中細胞製造大於或約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、

5,000、10,000、100,000奈克異戊二烯/公克細胞(細胞濕重)/小時(ng/g_{wcm}/h)或100,000 ng/g_{wcm}/h以上之異戊二烯。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，培養中細胞製造累積力價(總量)大於或約為1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000毫克異戊二烯/公升培養液(mg/$L_{培養液}$，其中培養液體積包括細胞及細胞培養基之體積)或100,000 mg/$L_{培養液}$以上之異戊二烯。異戊二烯製造之其他例示性速率及異戊二烯製造之總量揭示於本文中。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼IDI多肽之異源核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼IDI多肽之內源核酸之複本插入物。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼DXS多肽之異源核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼DXS多肽之內源核酸之複本插入物。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含一或多種編碼IDI多肽及DXS多肽之核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，一種核酸編碼異戊二烯合成酶多肽、IDI多肽及DXS多肽。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，一種載體編碼異戊二烯合成酶多肽、IDI多肽及DXS多肽。在一些實施例中，載體包含選擇性標記物，諸如抗生素抗性核酸。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶核酸可操作地連接於T7啟動子，諸如中等複本質體或高複本質體中所含之T7啟動子。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶核酸可操作地連接於Trc啟動子，諸如中等複本質體或高複本質體中所含之Trc啟動子。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶核酸可操作地連接於Lac啟動子，諸如低複本質體中所含之Lac啟動子。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異源異戊二烯合成酶核酸可操作地連接於內源啟動子，諸如內源鹼性絲胺酸蛋白酶啟動子。在一些實施例中，異源異戊二烯合成酶核酸整合至不含選擇性標記物之細胞的染色體中。

在一些實施例中，一或多種MVA途徑、IDI、DXP或異戊二烯合成酶核酸置於在停滯期比在生長期更具活性之啟動子或因子的控制下。舉例而言，一或多種MVA途徑、IDI、DXP或異戊二烯合成酶核酸可置於停滯期σ因子(諸如RpoS)之控制下。在一些實施例中，一或多種MVA途徑、IDI、DXP或異戊二烯合成酶核酸置於在停滯期可誘導之啟動子，諸如在停滯期可由反應調控子誘導呈活性之啟動子的控制下。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，至少一部分細胞於連續培養物(諸如未經稀釋之連續培養物)中歷經至少或約5、10、20、40、50、60、65次或65次以上之細胞分裂，維持異源異戊二烯合成酶核酸。在本文所述之任何態

樣之一些實施例中，包含異戊二烯合成酶、IDI或DXS核酸之核酸亦包含選擇性標記物，諸如抗生素抗性核酸。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼MVA途徑多肽(諸如來自釀酒酵母或糞腸球菌之MVA途徑多肽)之異源核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞進一步包含編碼MVA途徑多肽(諸如來自釀酒酵母或糞腸球菌之MVA途徑多肽)之內源核酸之複本插入物。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞包含異戊二烯合成酶、DXS及MVA途徑核酸。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞包含異戊二烯合成酶核酸、DXS核酸、IDI核酸、及MVA途徑核酸(以及IDI核酸)。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，異戊二烯合成酶多肽為來自以下植物之多肽：諸如葛屬(例如山葛或大葛藤)或楊屬(例如美洲山楊、銀白楊、黑楊、毛果楊、或銀白楊與歐洲山楊雜交種)。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞為細菌細胞，諸如革蘭氏陽性細菌細胞(例如桿菌屬細胞，諸如枯草桿菌細胞；或鏈黴菌屬細胞，諸如青紫鏈黴菌、天藍色鏈黴菌或灰色鏈黴菌細胞)。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞為革蘭氏陰性細菌細胞(例如大腸桿菌屬細胞，諸如大腸桿菌細胞；紅假單胞菌屬，諸如沼澤紅假單胞菌細胞；假單胞菌屬，諸如螢光假單胞菌細胞或惡臭假單胞菌細胞；或泛菌屬細胞，諸如檸檬泛菌細胞)。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，細胞為真菌細胞，諸如絲狀真菌細胞(例如木黴屬細胞，諸如里氏木黴細胞；或麴菌屬細胞，諸如米麴菌及黑麴菌)；或酵母細胞(例如耶氏酵母屬細胞，諸如解脂耶氏酵母細胞；或酵母屬細胞，諸如釀酒酵母)。

在本文所述之任何態樣之一些實施例中，微生物多肽碳源包括一或多種來自酵母或細菌之多肽。在本文所述之任何態樣之一些實施例中，植物多肽碳源包括一或多種來自大豆、玉米、芥花、麻風樹、棕櫚、花生、向日葵、椰子、芥子、油菜籽、棉籽、棕櫚仁、橄欖、紅花、芝麻或亞麻子之多肽。

在厭氧微生物中使用合成氣作為能源製造異戊二烯

在一些實施例中，在厭氧微生物中使用合成氣作為能源製造生物異戊二烯組合物，如2009年12月22日申請之美國臨時專利申請案第61/289,347號及第61/289,355號中所述，該等申請案之揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

由厭氧生物體自合成氣製造異戊二烯可提供許多優於由好氧生物體自糖製造異戊二烯之優勢。首先，異戊二烯之最大理論質量產率可大於好氧生物體，如下文進一步論述。其次，厭氧生物體不具有呈NAD(P)H形式之過量還原力，而NAD(P)H須經由細胞生長、形成副產物(諸如甘油、乳酸或乙醇)或使用分子氧進行氧化而得以轉換。在無需此NAD(P)H轉換之情況下，厭氧生物體之能產率較高、需氧量較低、醱酵熱較低及操作該過程之效用成本較

低。第三，由於系統中缺乏氧氣，故厭氧生物體之釋出氣體中異戊二烯濃度較高、產生可燃性異戊二烯-氧氣混合物之可能性較低、回收較容易及異戊二烯品質較高。第四，藉由使用現有基礎結構，諸如經設計用於製造生物乙醇之現有植物，可更容易使厭氧生物體生長。

適用於製造異戊二烯之厭氧生物體可包括專性厭氧菌、兼性厭氧菌及耐氧厭氧菌。專性厭氧菌可為選自由以下組成之群之任一者或組合：揚氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)、產乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)、黏液真桿菌(*Eurobacterium limosum*)、食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxydivorans*)、產生分解鏈球菌(*Peptostreptococcus productus*)及食甲基丁酸桿菌(*Butyribacterium methylotrophicum*)。適用作製造異戊二烯之能源的合成氣可經由多種過程自原料得到，該等過程包括甲烷重整、煤液化、共燃、醱酵反應、酶促反應及生質氣化。

例示性純化方法

在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包括回收共同製造之化合物。在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包括回收異戊二烯。在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包括由低溫膜、基於吸附基質之分離方法回收氫氣。

使用本文所述之組合物及方法製造之異戊二烯及氫氣可使用標準技術加以回收，諸如氣提、膜增強型分離、分

餾、吸附/脫附、滲透蒸發(pervaporation)、使異戊二烯自固相熱脫附或真空脫附，或用溶劑萃取固定或吸附於固相之異戊二烯(參見，例如美國專利第4,703,007號、第4,570,029號及第4,740,222號(「Recovery and Purification of Hydrogen from Refinery and Petrochemical Off-gas Streams」)，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯回收與純化方法('007及'029專利)且關於氫氣回收與純化方法('222專利))。在特定實施例中，用醇(諸如乙醇、甲醇、丙醇或其組合)進行萃取蒸餾來回收異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯回收包含以液體形式分離異戊二烯(諸如異戊二烯之純溶液或異戊二烯於溶劑中之溶液)。氣提包含以連續方式自醱酵釋出氣流中移出異戊二烯蒸氣。該移出可以若干不同方式達成，包括(但不限於)吸附於固相、分配至液相中、或直接冷凝(諸如因與冷凝線圈接觸而冷凝或因壓力增加而冷凝)。在一些實施例中，在稀異戊二烯蒸氣流之露點之上對該蒸氣進行膜富集，從而冷凝得到液體異戊二烯。在一些實施例中，對異戊二烯進行壓縮及冷凝。

異戊二烯回收可包含一個步驟或多個步驟。在一些實施例中，自醱酵釋出氣體中移出異戊二烯蒸氣及使異戊二烯轉化成液相係同時進行。舉例而言，可使異戊二烯自釋出氣流中直接冷凝而形成液體。在一些實施例中，自醱酵釋出氣體中移出異戊二烯蒸氣及使異戊二烯轉化成液相係依序進行。舉例而言，可使異戊二烯吸附於固相，接著用溶

劑自固相萃取。

氫氣回收可包含一個步驟或多個步驟。在一些實施例中，自醱酵釋出氣體中移出氫氣及使氫氣轉化成液相係同時進行。在一些實施例中，自醱酵釋出氣體中移出氫氣及使氫氣轉化成液相係依序進行。舉例而言，可使氫氣吸附於固相，接著經由壓力擺動(pressure swing)自固相脫附。在一些實施例中，濃縮並壓縮所回收之氫氣。

在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包括純化異戊二烯。舉例而言，使用本文所述之組合物及方法所製造之異戊二烯可使用標準技術加以純化。純化係指使異戊二烯與一或多種在製造異戊二烯時所存在之組分分離的過程。在一些實施例中，以實質上純液體之形式獲得異戊二烯。純化方法之實例包括(i)用液體萃取劑自溶液蒸餾，及(ii)層析。本文中所用之「經純化異戊二烯」意謂已與一或多種在製造異戊二烯時所存在之組分分離的異戊二烯。在一些實施例中，至少約20重量%的異戊二烯與在製造異戊二烯時所存在之其他組分分離。在多個實施例中，異戊二烯之純度至少或約為25重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、75重量%、80重量%、90重量%、95重量%或99重量%。可藉由任何適當方法，例如藉由管柱層析、HPLC分析或GC-MS分析來檢驗純度。

在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包括純化氫氣。舉例而言，使用本文所述之組合物及方法所製造

之氫氣可使用標準技術加以純化。純化係指使氫氣與一或多種在製造氫氣時所存在之組分分離的過程。在一些實施例中，以實質上純氣體之形式獲得氫氣。在一些實施例中，以實質上純液體之形式獲得氫氣。純化方法之實例包括(i)低溫冷凝及(ii)固體基質吸附。本文中所用之「經純化氫氣」意謂已與一或多種在製造氫氣時所存在之組分分離的氫氣。在一些實施例中，至少約20重量%的氫氣與在製造氫氣時所存在之其他組分分離。在多個實施例中，氫氣之純度至少或約為25重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、75重量%、80重量%、90重量%、95重量%或99重量%。可藉由任何適當方法，例如藉由管柱層析或GC-MS分析來檢驗純度。

在一些實施例中，藉由將一或多個移出異戊二烯之回收步驟之後殘留之至少一部分氣相引入用於製造異戊二烯之細胞培養系統(諸如醱酵槽)中使該氣相再循環。

自醱酵槽釋出氣體純化生物異戊二烯組合物之方法及裝置描述於2009年12月18日申請之美國臨時專利申請案第61/88,142號中，該文獻以全文引用的方式併入本文中。

來自醱酵槽釋出氣體之生物異戊二烯組合物可含有生物異戊二烯，以及揮發性雜質及生物副產物雜質。在一些實施例中，使用一種方法自醱酵槽釋出氣體純化生物異戊二烯組合物，該方法包含：(a)在第一管柱中使醱酵槽釋出氣體與溶劑接觸以形成：包含溶劑、大部分異戊二烯及大部分生物副產物雜質之富異戊二烯溶液，及包含大部分揮發

性雜質之蒸氣；(b)將富異戊二烯溶液自第一管柱轉移至第二管柱；及(c)在第二管柱中自富異戊二烯溶液氣提異戊二烯以形成：包含大部分生物副產物雜質之貧異戊二烯溶液，及經純化之異戊二烯組合物。

圖169說明一種純化異戊二烯之例示性方法、及一種例示性裝置。可由此項技術中之任何方法，例如美國臨時專利申請案第61/187,944號中所述，自可再生資源(例如碳源)產生包含異戊二烯之醱酵槽釋出氣體，該申請案之內容藉此以引用的方式併入，尤其關於產生包含異戊二烯之醱酵槽釋出氣體之方法。可將自一或多個個別醱酵槽12(例如串聯及/或並聯連接之1、2、3、4、5、6、7、8個或8個以上醱酵槽)產生之醱酵槽釋出氣體引導至第一管柱14。如下文所述，可將醱酵槽釋出氣體引導穿過分離單元16及/或由壓縮構件(諸如壓縮系統18)壓縮。另外，在與溶劑接觸之前可在任何點處視情況降低醱酵槽釋出氣體之溫度，例如以形成冷凝物或部分冷凝物(此可有助於一或多種釋出氣體組分(諸如異戊二烯)溶解)。在管柱14中可使醱酵槽釋出氣體與溶劑(例如本文所述之任何溶劑，諸如非極性高沸點溶劑)接觸(例如吸收於其中)。自剩餘溶劑/醱酵槽釋出氣體混合物中分離吸收於溶劑(尤其非極性高沸點溶劑)中之傾向較小的揮發性雜質，得到包含大部分揮發性雜質之蒸氣(例如在開口20處退出)，及具有大部分異戊二烯及大部分生物副產物雜質之富異戊二烯溶液(例如在開口22處)。在與醱酵槽釋出氣體接觸之前、同時及/或

之後可視情況由任何適合方式(例如由蒸汽)加熱溶劑，此可有助於自剩餘溶液中分離揮發性雜質。可將蒸汽引導穿過管柱(在任何適合位置處，諸如釋出氣體之入口附近及/或揮發性雜質出口之相對端，如圖169中所示)以提供可有助於移除揮發性雜質之吹掃蒸氣相。

可將具有大部分異戊二烯及大部分生物副產物雜質之富異戊二烯溶液(例如在開口22處)引導至第二管柱24。第二管柱可與第一管柱14分離(如圖169中所示)或可為包含第一管柱與第二管柱之單一管柱的一部分(例如串聯式管柱，其中溶劑在一端或一端附近進入第一管柱，且在相對端或相對端附近退出第二管柱)。可在第二管柱中自富異戊二烯溶液氣提異戊二烯以產生經純化之異戊二烯組合物(例如在開口26處)及包含大部分生物副產物雜質之貧異戊二烯溶液(例如在開口28處)。可由任何適合方式(例如由蒸汽)加熱富異戊二烯溶液，此可有助於自剩餘溶液汽提異戊二烯。可將蒸汽引導穿過管柱(在任何適合位置處，諸如富異戊二烯溶液入口點之相對端及/或貧異戊二烯溶液出口端附近，如圖169中所示)。

如本文所述，管柱可為習知管柱且具有任何適合尺寸。例示性管柱類型可自包括Koch Modular Process Systems(Paramus, NJ)、Fluor Corporation(Irving, TX)、Kuhni USA(Mount Holly, NC)在內之製造商購得。一般而言，管柱經設計以使蒸氣/液體接觸最大化，從而達成所要效率。此係藉由用裝填材料或沿管柱以規則間隔隔開之

塔盤填充管柱來達成。適合之裝填材料包括基於金屬、玻璃、聚合物及陶瓷材料之無規類型與結構化類型。例示性無規填料類型包括拉西環(Raschig ring)、巴耳環(Pall ring)、A-PAK環、矩鞍環(Saddle ring)、Pro-Pak、Heli-Pak、陶瓷矩鞍(Ceramic saddle)及FLEXIRINGS®。結構化填料包括絲網及多孔金屬板型材料。專供管柱填料之製造商包括ACS Separations & Mass-Transfer Products(Houston, TX)、Johnson Bros. Metal Forming Co.(Berkeley, IL)及Koch Glitsch, Inc. Knight Div.(East Canton, OH)。氣提管柱之效率係以管柱中之理論板高度及總板數表示。一般而言，存在之理論板數愈多，管柱效率愈高。實驗室規模之管柱可購自Ace Glass(Vineland, NJ)、Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)及Chemglass(Vineland, NJ)。適合之玻璃管柱類型包括韋氏(Vigreux)、史耐德(Snyder)、漢培爾(Hemple)及多孔板型管柱。管柱可包括裝填材料，或含有經設計以使蒸氣/液體接觸最大化之特徵。實驗室規模之氣體洗滌器單元(部件號CG-1830-10)可購自Chemglass，且由填料玻璃管柱、溶劑儲集器及溶劑再循環泵組成。

可由任何適合方式(例如使用回流冷凝器34及/或吸附系統36，諸如二氧化矽吸附系統)進一步純化來自第二管柱24之經純化異戊二烯組合物(例如在開口26處退出)。回流減少異戊二烯產物中之溶劑組成。可使貧異戊二烯溶液再循環回第一管柱以供再使用(例如，如圖169中所示在開口30處)。在再循環至第一管柱14之前可由任何適合方式(例

如由液液萃取及/或吸附系統32，諸如二氧化矽吸附系統)純化貧異戊二烯溶液以減少生物副產物之量。另外，在再循環至第一管柱14之前(例如，在視情況純化異戊二烯溶液之前、同時及/或之後)可由任何適合方式降低貧異戊二烯溶液之溫度。圖169展示在純化貧異戊二烯溶液之前在開口40處降低貧異戊二烯溶液之溫度的實例(在此狀況下，使用冷卻劑來降低溫度)。

包含大部分揮發性雜質之蒸氣(例如在圖169中開口20處退出之蒸氣)可包含小部分異戊二烯(例如未保留於富異戊二烯溶液中之殘餘異戊二烯)。可由任何適合方式(例如吸附系統38，諸如活性碳吸附系統)自包含大部分揮發性雜質之蒸氣中再收集殘餘異戊二烯以供使用，且在一些狀況下，如圖169中所示，可將殘餘異戊二烯與經純化異戊二烯組合物合併(例如在額外純化(諸如類似於系統36之吸附系統)之前、期間或之後)。圖169亦展示視情況選用之捕集器件42(例如熱氧化器及/或CO_2捕集系統)，該捕集器件能夠減少自蒸氣釋放至大氣中之不合需要之組分(CO_2)的量。

例示性異戊二烯化學轉化

儘管異戊二烯之當前工業用途主要在於製造合成橡膠，但異戊二烯為反應性共軛二烯且經歷多種化學轉化以形成氧化物及較高分子量的烴。舉例而言，鈀(0)錯合物($Pd(acac)_2$-Ph_3P及$Pd(OAc)_2$-Ph_3P)催化異戊二烯於醇溶劑中二聚及調聚以得到線性異戊二烯二聚體(例如2,7-二甲

基-1,3,7-辛三烯)及甲氧基二甲基辛二烯(Zakharkin, L. I.及Babich, S. A. *Russ. Chem. Bull.* (**1976**)，第1967-1968頁)。Adams, J. M.及Clapp, T. V.(*Clay and Clay Minerals* (**1986**), 34(3), 287-294)報導異戊二烯於二價及三價過渡金屬交換之蒙脫石(例如Cr^{3+}蒙脫石)上反應得到異戊二烯二聚體及與甲醇之加成物。由Ni(0)胺基亞膦酸酯系統催化異戊二烯線性二聚得到區位選擇性尾-尾線性二聚體，伴隨競爭性環二聚化反應(Denis, Philippe; Croizy, Jean Francois; Mortreux, Andre; Petit, Francis, *Journal of Molecular Catalysis* (**1991**), 68(2), 159-75；Denis, Philippe; Jean, Andre; Croizy, Jean Francois; Mortreux, Andre; Petit, Francis, *Journal of the American Chemical Society* (**1990**), 112(3), 1292-4)。研究發現新型對掌性胺基亞膦酸酯配位體(例如(+)-$MeCH_2CHMeCH(NH_2)CH_2OPPh_2$)為異戊二烯線性二聚中之均相催化劑，使得轉化率高於50%(Masotti, Henriette; Peiffer, Gilbert; Siv, Chhan; Courbis, Pierre; Sergent, Michelle; Phan Tan Luu, Roger, *Bulletin des Societes Chimiques Belges* (**1991**), 100(1), 63-77)。

在二硝基甲酚作為聚合抑制劑存在下於110-250℃下使異戊二烯熱二聚，得到高產率之二聚體及極少聚合物(美國專利第4,973,787號)。Ni催化之異戊二烯二聚得到由80% 1,5-二甲基-1,5-環辛二烯及20% 1,6-二甲基-1,5-環辛二烯組成之二甲基-1,5-環辛二烯混合物(Doppelt, Pascal; Baum, Thomas H.; Ricard, Louis, *Inorganic Chemistry* (**1996**),

35(5), 1286-91)。用催化量之Cp*Ru(η4-異戊二烯)Cl及AgOTf使異戊二烯轉化成二甲基環辛二烯(Itoh, Kenji; Masuda, Katsuyuki; Fukahori, Takahiko; Nakano, Katsumasa; Aoki, Katsuyuki; Nagashima, Hideo, *Organometallics* (**1994**), 13(3), 1020-9)。JP59065026A (1984)報導藉由在包含羧酸鐵或β-二酮化合物、有機鋁或有機鎂化合物及具有推電子基團之2,2'-聯吡啶衍生物之催化劑存在下使異戊二烯環二聚化來製備1,6-二甲基-1,5-環辛二烯。藉由使異戊二烯於含有羧酸鎳或β-酮、有機鋁或有機鎂化合物及經取代之亞磷酸三苯酯之三組分催化劑上環二聚化來製備二甲基環辛二烯(JP58055434A, 1983)。藉由在100-300℃下，於惰性有機溶劑中，在含有Fe(3)鹽、有機鋁化合物及活化劑之均相催化劑存在下(SU615056A1, 1978)，在含有乙醯基丙酮酸鎳、亞磷酸三芳基酯及全氫鋁酚烯(perhydroalumophenolene)之均相催化劑存在下(SU493455A1, 1975)，在含有羧酸鎳或羧酸鹽或鎳與1-羥基-3-羰基化合物之螯合化合物、三烷基鋁、二烷基鎂或獲自共軛二烯與鎂之活性有機鎂化合物、亞磷酸三芳基酯及三級胺之混合物的催化劑存在下(JP48064049A, 1973)，或在由環烷酸鎳、Et_3Al及磷酸三鄰甲苯酯構成之催化劑存在下(Suga, K.; Watanabe, S.; Fujita, T.; Shimada, T., *Israel Journal of Chemistry* (**1972**), 10(1), 15-18)，使異戊二烯環二聚化來製備1,5-二甲基-1,5-環辛二烯。美國專利第3,954,665號揭示在$[(\eta3\text{-}C_6H_5)NiBr]_2$或$[M(NO)_2X]_2$(M=Fe、

Co；X=Cl、I、Br)與羰基鐵、羰基鈷或羰基鎳之反應產物存在下使異戊二烯二聚。歐洲專利第2411號(1981)揭示在-5℃至+20℃下使異戊二烯於$Fe(NO)_2Cl$-雙(1,5-環辛二烯)鎳催化劑上環二聚化，得到1-甲基-4-異丙烯基-1-環己烯與2-甲基-4-異丙烯基-1-環己烯及1,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯與2,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯。美國專利第4,189,403號揭示藉由使異戊二烯與亞磷酸參(經取代烴基)酯、亞砷酸參(經取代烴基)酯或亞銻酸參(經取代烴基)酯及VIII族金屬(0)化合物(例如乙醯基丙酮酸鎳)之混合型催化劑接觸來製備1,5-二甲基-1,5-環辛二烯及1,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯。Jackstell, R.; Grotevendt, A.; Michalik, D.; El Firdoussi, L.; Beller, M. *J. Organometallic Chem.* (**2007**) 692(21), 4737-4744提及使用鈀/碳烯催化劑使異戊二烯二聚。Bowen, L.; Charernsuk, M.; Wass, D.F. *Chem. Commun.* (**2007**) 2835-2837描述使用*N,N*-雙(二芳基膦基)胺鉻催化劑製造線性及環狀異戊二烯三聚體。

據報導，異戊二烯在Ni催化劑存在下二聚得到順-2-異丙烯基-1-甲基乙烯基環丁烷(Billups, W. E.; Cross, J. H.; Smith, C. V., *Journal of the American Chemical Society* (**1973**), 95(10), 3438-9)。在多種亞磷酸酯作為電子供體存在下由環烷酸鎳及異戊二烯鎂催化異戊二烯[78-79-5]寡聚，得到含有二甲基環辛二烯[39881-79-3]之環狀二聚體；尤其在1,1,1-參(羥甲基)丙烷亞磷酸酯[39865-19-5]存在下選擇性地得到三甲基環十二烷三烯[39881-80-6](Suga,

Kyoichi; Watanabe, Shoji; Fujita, Tsutomu; Shimada, Takashi, *Journal of Applied Chemistry & Biotechnology* (**1973**), 23(2), 131-8)。WO2006/051011揭示藉由在包含Ni及/或Ti、一或多種有機金屬化合物及VA族化合物之催化劑系統存在下使異戊二烯三聚來製備適用於香水及芳香劑之三甲基環十二烷三烯，且該反應係於含羥基溶劑中進行。Ligabue, R. A.; Dupont, J.; de Souza, R. F., Alegre, R.S. *J. Mol. Cat. A: Chem.* (**2001**), 169(1-2), 11-17描述在離子液體中使用亞硝醯基鐵催化劑使異戊二烯選擇性二聚成六員二聚體。Huchette, D.; Nicole, J.; Petit, F., Tetrahedron Letters (**1979**), (12), 1035-8描述以電化學方式產生亞硝醯基鐵催化劑，隨後用於使異戊二烯二聚成環己烯二聚體。Zakharkin, L. I.; Zhigareva, G. G.; Pryanishnikov, A. P. *Zhurnal Obshchei Khimii* (**1987**), 57(11), 2551-6描述異戊二烯於錯合鎳及鐵催化劑上環化寡聚。

使用所引用之參考文獻中揭示之各催化劑系統及反應條件使本文所述之高純度異戊二烯起始組合物發生化學轉化。熟習此項技術者可使此項技術中已知之其他催化劑及反應條件，諸如應用於1,3-丁二烯化學轉化之催化劑及反應條件適於異戊二烯起始組合物。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質經歷催化化學轉化，得到二聚體及三聚體。使用此項技術中已知之方法鑑別催化劑系統。較佳催化劑包括已知以高效率使異戊二烯轉化成二聚體及三聚體之催化劑。實

例包括基於鈀、鎳、鈷、鐵及鉻之催化劑。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質進行熱二聚或催化二聚。藉由在壓力下加熱異戊二烯起始組合物而使該起始組合物轉化成包括不飽和6員及8員環之二聚體混合物。在一些實施例中，在壓力下將起始異戊二烯組合物加熱至高於或約100、125、150、175、200、225或250℃。在一些實施例中，在抗氧化劑(例如2,6-二-第三丁基-4-甲基苯酚)存在下加熱起始異戊二烯組合物以防止自由基介導之聚合。在一些實施例中，由一或多種選自此項技術中已知用於催化異戊二烯環二聚化之催化劑的催化劑加速反應，例如美國專利4,144,278、4,181,707、5,545,789及歐洲專利EP0397266A2中所述之亞硝醯基鹵化鐵催化劑。Ligabue等人(2001) *J. Mol. Catalysis A: Chemical*, 169 (2), 11-17描述於離子液體中使用亞硝醯基鐵催化劑。催化劑之實例包括(但不限於)$Fe(NO)_2Cl_2$及Cr^{3+}蒙脫石。在另一實例中，使用釕催化劑使異戊二烯起始組合物轉化成C10環狀二聚體(例如二甲基-環辛二烯之混合物)(Itoh, Kenji; Masuda, Katsuyuki; Fukahori, Takahiko; Nakano, Katsumasa; Aoki, Katsuyuki; Nagashima, Hideo, *Organometallics* (**1994**), 13(3), 1020-9)。

在一特定實施例中，在壓力下及在抗氧化劑存在下將呈液態之異戊二烯起始組合物加熱至高於100℃以製造包括以下6員及8員環之二聚體混合物：例如檸檬烯(1-甲基-4-

(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯)、1-甲基-5-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、2,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、1,5-二甲基環辛-1,5-二烯、1,6-二甲基環辛-1,5-二烯、2,6-二甲基-1,3-環辛二烯、2,6-二甲基-1,4-環辛二烯、3,7-二甲基-1,5-環辛二烯、3,7-二甲基-1,3-環辛二烯、3,6-二甲基-1,3-環辛二烯，及如*Organometallics* (**1994**), 13(3), 1020-9中所述之其他8員環異戊二烯二聚體。涵蓋此等化合物之所有立體異構體。最佳在不存在氧氣下使異戊二烯轉化成二聚體以避免製造不合需要之反應產物。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質進行光二聚，得到4員環二聚體。藉由光照射使異戊二烯起始組合物轉化成包含以下一或多者之混合物：1,2-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-3-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-2-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二甲基-1,3-二乙烯基環丁烷、1,2-二甲基-1,2-二乙烯基環丁烷及其立體異構體。在一些實施例中，在催化劑(例如鎳催化劑)或光敏劑(例如苯甲酮)存在下使高純度異戊二烯起始物質二聚，得到4員環二聚體，例如順-2-異丙烯基-1-甲基乙烯基環丁烷，以及6員及8員環[參見：Hammond, J.S.; Turro, N.J.; Liu, R.S.H. (**1963**)「Mechanisms of Photochemical Reactions in Solution」。XVI. Photosensitized Dimerization of Conjugated Dienes. *J. Org. Chem.*, 28, 3297-3303]。

在一些實施例中，在催化劑系統存在下使工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質轉化成環狀三聚體。在一些實施例中，環狀三聚體為三甲基環十二烷三烯。在一些實施例中，催化劑系統包含鎳催化劑。在一些實施例中，催化劑系統包含鈦化合物。在一些實施例中，催化劑系統包含鎳催化劑及鈦化合物。在一些實施例中，催化劑系統包含一或多種有機金屬化合物、及VA族化合物。在一些實施例中，於含羥基溶劑中進行催化轉化。在一特定實施例中，在包含Ni及/或Ti、一或多種有機金屬化合物、及VA族化合物之催化劑系統存在下使起始異戊二烯組合物轉化成三甲基環十二烷三烯，且該反應係於含羥基溶劑中進行。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質藉由用C2至C5不飽和烴處理而熱轉化或催化轉化成C7至C14範圍內之烴。C2至C5烴可為烯烴、二烯或炔烴。舉例而言，在一些實施例中，使異戊二烯與乙烯及適當催化劑接觸以製造C7化合物。在另一實施例中，使異戊二烯與1,3-丁二烯接觸以形成環狀C9烴。氫化此等C7至C14烴會得到適合用作噴射機燃料及其他航空燃料之組合物。在另一實施例中，源自異戊二烯及一或多種不飽和烴之不飽和C7至C14烴經歷脫氫以形成適合用作噴射機燃料及其他航空燃料或用作該等燃料之摻合原料的芳族衍生物。

在一些實施例中，於醇溶劑中使用催化劑系統使工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質轉化成線性二聚體及三

聚體之混合物。此反應當在甲醇或乙醇中進行時亦製造烷氧基衍生物。在一些實施例中，催化劑系統為鈀基催化劑系統，例如乙醯基丙酮酸鈀-三苯基膦系統或乙酸鈀-三苯基膦系統。在一些實施例中，醇溶劑為甲醇、乙醇或異丙醇。產物性質視所用催化劑及溶劑而定。舉例而言，當在異丙醇溶劑中使用鈀基催化劑系統(例如$Pd(acac)_2$-Ph_3P或$Pd(OAc)_2$-Ph_3P)時，形成線性異戊二烯二聚體，例如2,7-二甲基-1,3,7-辛三烯及2,7-二甲基-2,4,6-辛三烯。當在甲醇中進行此反應時，除線性異戊二烯二聚體(諸如二甲基辛三烯)以外，亦形成甲氧基二甲基辛二烯(例如1-甲氧基-2,7-二甲基-2,7-辛二烯及3-甲氧基-2,7-二甲基-1,7-辛二烯)。一些反應製造線性異戊二烯三聚體，諸如α-法呢烯(α-farnesene，3,7,11-三甲基-1,3,6,10-十二烷四烯)、β-法呢烯(7,11-二甲基-3-亞甲基-1,6,10-十二烷三烯)及其他位置異構體(例如，來自異戊二烯單元之尾-尾及頭-頭加成)。在另一實例中，使用*N,N*-雙(二芳基膦基)胺鉻催化劑使異戊二烯轉化成線性及環狀C15三聚體(Bowen, L.; Charernsuk, M.; Wass, D.F. *Chem. Commun.* (**2007**) 2835-2837)。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質藉由在酸催化劑存在下與乙醇及其他醇反應而轉化成燃料氧化物。在一實施例中，酸催化劑為硫酸。在另一實施例中，酸催化劑為固相硫酸(例如Dowex Marathon®)。其他催化劑包括液相與固相氟磺酸，例如三氟甲烷磺酸及

Nafion-H(DuPont)。在類似於Hensel等人[Hensen, K.; Mahaim, C.; Holderich, W.F., *Applied Catalysis A: General* **(1997)** 140(2), 311-329]所述之條件下，亦可使用沸石催化劑(例如β-沸石)進行檸檬烯及相關單萜之甲氧基化。在一些實施例中，由羥基化/酯化過程或此項技術中之其他已知烯烴反應使高純度異戊二烯起始物質轉化成醇及酯，例如用諸如過乙酸及3-氯過苯甲酸之過酸進行過氧化以得到環氧化物；及用i)水與酸催化劑及ii)硼氫化方法進行水合以得到醇及二醇。該等反應描述於例如Michael B. Smith及Jerry March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*，第6版，John Wiley & Sons, 2007中。圖3及圖4展示可自起始異戊二烯組合物製造之醇及氧化物之實例。

在一些實施例中，使工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質部分地氫化成單烯烴(例如2-甲基丁-1-烯、3-甲基-丁-1-烯及2-甲基丁-2-烯)。在一些實施例中，使用傳統烴陽離子催化(諸如用於使異丁烯轉化成異辛烷)使單烯烴進行二聚或與其他烯烴反應。參見，例如H.M. Lybarger. Isoprene in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*，第4版，Wiley, New York (1995), *14*, 934-952。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯起始物質為生物異戊二烯組合物。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質進行部分氫化以形成單烯烴(例如2-甲基丁-1-烯、3-

甲基-丁-1-烯及2-甲基丁-2-烯)。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯起始物質為生物異戊二烯組合物。在一些實施例中，異戊二烯起始物質之部分氫化製造高產率之單烯烴，而極少轉化成異戊烷且殘餘異戊二烯含量較低。在一些實施例中，製造單烯烴與異戊烷之混合物，其中殘餘異戊二烯含量較低。在一些實施例中，部分氫化為選擇性氫化，其中優先製造特定單烯烴，諸如2-甲基丁-2-烯、2-甲基丁-1-烯或3-甲基丁-1-烯。較佳氫化催化劑提供高催化活性，隨著時間推移維持催化活性，且對異戊二烯轉化成單烯烴具有高選擇性。

適用於異戊二烯起始組合物之部分氫化之催化劑可含有鉑族金屬，諸如鉑、鈀、銠或釕；或過渡金屬，諸如鎳、鈷、銅、鐵、鉬；或貴金屬，諸如銀或金，呈單質形式、或與有機及無機配位體形成之鹽或錯合物形式。在一些情況下，亦可使用此等金屬之合金。此等金屬及其衍生物可為純的或與其他活性及惰性物質混合。可使催化劑吸附於支撐材料(諸如活性碳、氧化鋁或二氧化矽)以使有效表面積最大化。已知氫化催化劑之實體形態對其效能具有顯著影響。較佳氫化催化劑包括異相鈀催化劑，諸如鈀/碳(Pd/C)、鈀/氧化鋁(Pd/Al_2O_3)或鈀/二氧化矽(Pd/SiO_2)，相對於支撐材料之等級範圍為0.1% Pd至20% Pd(w/w)。適合之選擇性氫化催化劑之一實例為LD 2773，一種耐硫、促進型鈀/氧化鋁(Axens, Rueil-Malmaison Cedex, France)。允許異戊二烯轉化成異戊烯，而極少轉化成異戊烷之部分

氫化催化劑包括林德拉催化劑(Lindlar catalyst)(經喹啉處理之$Pd/BaSO_4$)、經第15族元素(N、P、As)之三苯基衍生物處理之Pd/C、經含硫化合物處理之Pd/C、硫化鉬、及Pd/Fe合金。一種較佳催化劑包含鈀吸附於蛋殼型氧化鋁(δ-Al_2O_3)。在精煉工業中用於自熱解汽油中移除二烯烴及炔烴之催化劑為尤其較佳的，例如基於Ni/Al_2O_3及Pd/Al_2O_3之催化劑。用於異戊二烯轉化成異戊烯之另一適合類別之催化劑為工業中用於氫化處理熱解汽油之催化劑。參見，例如美國專利第7,014,750號及第6,9949,686號及其中所引用之參考文獻。一般而言，用於熱解氣體氫化處理之催化劑允許炔烴及二烯烴(例如異戊二烯及間戊二稀)選擇性轉化成單烯烴。

氫源可為氫氣，或包括(但不限於)氫氣(H_2)、甲酸、肼或異丙醇之氫源。氫源可以化學或生物方式得到。在一些實施例中，用於氫化之氫氣係在醱酵期間與異戊二烯共同製造。氫化可在0.5 atm至200 atm之範圍內或200 atm以上之氫壓下進行。溫度可在0℃至200℃之範圍內。

預期來自生物異戊二烯組合物的部分氫化之產物含有最初存在於起始異戊二烯組合物中之某些雜質及/或該等雜質之氫化衍生物，諸如丙酮、乙醇、戊醇、乙酸乙酯、乙酸異戊酯、甲基乙基酮及其他飽和極性雜質。

在一些實施例中，異戊二烯起始組合物在鈀催化劑存在下進行部分氫化或選擇性氫化。舉例而言，諸如$Pd/CaCO_3$、$Pd/BaSO_4$、Pd/C、鈀黑、Pd/SiO_3、Pd/Al_2O_3或

Pd/SiO_2之鈀催化劑顯示使異戊二烯以相比完全還原之C5烷烴高於95%之選擇性轉化成單烯烴。使用此等鈀催化劑得到單烯烴產物之混合物，其中5% $Pd/CaCO_3$對3-甲基丁-1-烯具有最高選擇性且5% Pd/SiO_2對2-甲基丁-2-烯具有最高選擇性(參見G.C. Bond及A.F. Rawle. *J. Mol. Catalysis A: Chemical* 109 (1996) 261-271)。Bond及Rawle亦已顯示鈀-金及鈀-銀催化劑(例如$Pd-Au/SiO_2$及$Pd-Ag/SiO_2$)對異戊二烯還原成單烯烴相比完全還原之C5烷烴具有高選擇性。在一些實施例中，已使用二氧化矽支撐型聚醯胺基胺(PAMAM)樹枝狀聚合物-鈀錯合物選擇性催化環狀及非環狀二烯還原成單烯烴異構體之混合物。對各種單烯烴異構體之選擇性視催化劑中所用之確切PAMAM配位體而定(參見P.P. Zweni及H. Alper. *Adv. Synth. Catal.* 348 (2006) 725-731)。在一些實施例中，可使用無機支撐物(例如金屬沸石)上之VIB族金屬作為催化劑使異戊二烯還原成單烯烴。舉例而言，使用Mo/Al_2O_3催化劑使1,3-丁二烯選擇性還原成各別單烯烴(參見US 6,235,954 B1)。在某一實施例中，可使用由IB、VIB、VIIB族金屬或鋅促進之VIII族金屬催化劑使異戊二烯還原成單烯烴以減少催化劑中毒(參見US 6,949,686 B2)。在一些實施例中，可使用可呈蜂巢組態之整體式催化劑床使異戊二烯還原成單烯烴。整體式催化劑床之催化劑支撐材料可包括金屬，諸如鎳、鉑、鈀、銠、釕、銀、鐵、銅、鈷、鉻、銥、錫，及其合金或混合物(參見US 7,014,750 B2)。在一些實施例中，可使用蛋殼型

Pd/δ-Al_2O_3催化劑使異戊二烯還原成單烯烴，尤其在反應不含水之情況下。蛋殼型Pd/δ-Al_2O_3催化劑對單烯烴相比完全還原之烷烴具選擇性，且2-甲基丁-2-烯為熱力學上有利之異構體(參見J.-R. Chang及C.-H. Cheng. *Ind. Eng. Chem. Res.* 36 (1997) 4094-4099)。

可容易地使用酸催化劑使輕質烯烴(C3-C6)二聚，得到高碳烯烴(C6-C12，亦稱為二聚烯)。舉例而言，此項技術中充分描述使用多種酸催化劑使異丁烯(2-甲基丙烯)轉化成異辛烯，該等酸催化劑包括硫酸、磷酸及其他無機酸、磺酸、氟磺酸、沸石及酸性黏土。

在一些實施例中，異戊二烯起始組合物進行部分氫化或選擇性氫化以形成單烯烴，且單烯烴使用傳統烴陽離子催化(諸如用於使異丁烯轉化成異辛烷)，例如硫酸、磷酸及其他無機酸、磺酸、氟磺酸、沸石及酸性黏土進行二聚或與其他烯烴反應。參見，例如H.M. Lybarger. Isoprene in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*，第4版，Wiley, New York (1995), *14*, 934-952。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯起始物質為生物異戊二烯組合物。可使用呈液體與固體形式之酸催化劑。酸樹脂為較佳的且包括Amberlyst 15、Amberlyst 35、Amberlyst XE586、Amberlyst XN1010(Rohm and Haas)及類似酸性離子交換樹脂。酸性分子篩亦為較佳催化劑，包括中孔酸分子篩，諸如ZSM-5、鎂鹼沸石(ferrierite)、ZSM-22及ZSM-23。

在一些實施例中，異戊二烯起始組合物進行部分氫化或選擇性氫化以形成異戊烯。在一些實施例中，使異戊烯二聚化以得到C10二聚烯，諸如異癸烯。在一些實施例中，使異戊烯與諸如丙烯、丁烷或異丁烯之烯烴二聚化以得到C8-C10二聚烯。在一些實施例中，使用樹脂催化劑(例如Amberlyst、Amberlyst 35、Amberlyst 15、Amberlyst XN1010、Amberlyst XE586)使單烯烴進行二聚化以製造二異戊烯。已顯示使用該等樹脂催化劑使裂化及其他寡聚反應減至最少，且在最佳條件下，樹脂催化劑對二聚體之選擇性高於92%，而對形成三聚體之選擇性低於8%。參見，例如M. Marchionna等人*Catalysis Today* 65 (2001) 397-403。在一些實施例中，使用含有酸性中孔分子篩，諸如嵌入沸石結構ZSM-5、鎂鹼沸石、ZSM-22或ZSM-23中之中孔篩之催化物質使單烯烴進行二聚。在一特定實施例中，催化物質在高溫(例如至少900℃)下熱穩定。在另一特定實施例中，單烯烴實質上不含多元不飽和烴，諸如異戊二烯。使用含有酸性中孔分子篩之催化物質進行二聚可使得對二聚體之選擇性超過80%。參見，例如US 2007/0191662 A1。在一些實施例中，使用固體酸性催化劑(例如固體磷酸催化劑、酸性離子交換樹脂)使單烯烴進行二聚。使用固體磷酸催化劑時對二聚體之選擇性可為至少75%、至少85%或至少90%。參見，例如US 2009/0099400 A1及US 6,660,898 B1。

有效二聚有時可需要在原料流中存在極性組分，諸如水

及氧化化合物。實例包括醇，諸如甲醇、乙醇及第三丁醇；醚，諸如甲基第三丁基醚(MTBE)及甲基第三戊基醚(TAME)；或酯，諸如C1至C5乙酸酯。在一些實施例中，可藉由在酸催化劑存在下用醇處理而使異戊烯轉化成醚，諸如TAME。

在一些實施例中，可使本文所述之任何方法所製造之單烯烴的C10二聚體還原成完全飽和之C10烷基化物(例如藉由氫化)。在一特定實施例中，可使用催化劑使異戊二烯或單烯烴還原成烷基化物，該催化劑含有以下兩者之混合物：酸組分，諸如硫酸、氟磺酸、全鹵烷基磺酸、離子液體，或布朗斯特酸(Bronsted acid)與路易斯酸(Lewis acid)之混合物；聚合物組分，諸如聚丙烯酸酯(參見US 2010/0094072 A1)。

在一些實施例中，工業上有益量之高純度異戊二烯起始物質在酸催化劑存在下進行寡聚以製造二聚體、三聚體、高碳寡聚物、芳族產物及/或聚合產物。反應之動態控制可有利於某些產物，例如低碳寡聚物，但結膠及焦化為已知導致催化劑失活之問題。

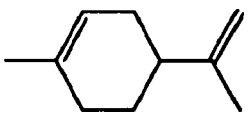
例示性不飽和異戊二烯衍生物

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之組合物及系統進一步包含用於異戊二烯起始組合物化學轉化成燃料成分之不飽和烴或氧化物中間物。在某一實施例中，不飽和烴中間物包含一或多種選自由以下組成之群的不飽和異戊二烯二聚體：1,2-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二(丙-1-

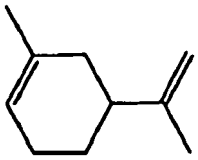
烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-3-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-2-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二甲基-1,3-二乙烯基環丁烷、1,2-二甲基-1,2-二乙烯基環丁烷、1-甲基-4-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1-甲基-5-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、2,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、1,5-二甲基環辛-1,5-二烯、1,6-二甲基環辛-1,5-二烯、1,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯、2,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯、2,7-二甲基-1,3,7-辛三烯、2,7-二甲基-2,4,6-辛三烯、2,6-二甲基-1,3-環辛二烯、2,6-二甲基-1,4-環辛二烯、3,7-二甲基-1,5-環辛二烯、3,7-二甲基-1,3-環辛二烯及3,6-二甲基-1,3-環辛二烯。在一些實施例中，不飽和烴中間物包含一或多種不飽和三聚體，諸如α-法呢烯、β-法呢烯、三甲基環十二烷三烯(例如1,5,9-三甲基-(1*E*,5*E*,9*E*)-環十二烷三烯及其位置異構體及幾何異構體)及三甲基十二烷四烯及其類似物。在一些實施例中，不飽和氧化物中間物包含一或多種不飽和甲基醚，諸如1-甲氧基-2,7-二甲基-2,7-辛二烯及3-甲氧基-2,7-二甲基-1,7-辛二烯及其類似物。在一些實施例中，不飽和氧化物中間物包含一或多種不飽和乙基醚，諸如乙基3-甲基-3-丁烯基醚、乙基1,1-二甲基-2-丙烯基醚、乙基1,2-二甲基-2-丙烯基醚、乙基2-甲基-3-丁烯基醚及其類似物。在一些實施例中，不飽和氧化物中間物包含一或多種不飽和醇，諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇、2-甲基-3-丁烯-2-醇、3-甲基-3-丁烯-2-醇、2-甲基-3-丁烯-1-醇及其類似物。在一些

實施例中，不飽和氧化物中間物包含一或多種不飽和酯，諸如乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸2-甲基-3-丁烯-2-基酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-2-基酯、乙酸2-甲基-3-丁烯-1-基酯及其他C_3-C_{18}脂族羧酸酯。在某一實施例中，不飽和烴中間物包含一或多種異戊烯，例如2-甲基丁-1-烯、3-甲基-丁-1-烯及2-甲基丁-2-烯。在一些實施例中，不飽和烴中間物包含一或多種源自異戊烯的二聚化之二異戊烯。

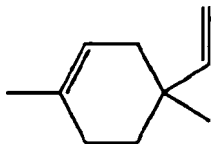
流程I.例示性不飽和6員及8員環中間物



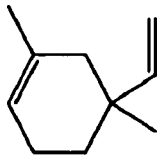
1-甲基-4-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯



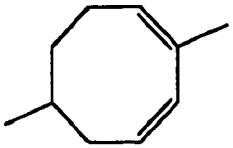
1-甲基-5-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯



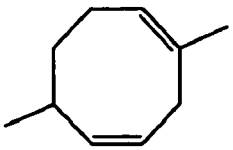
1,4-二甲基-4-乙烯基環己烯



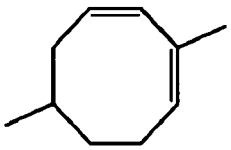
2,4-二甲基-4-乙烯基環己烯



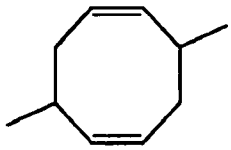
2,6-二甲基-1,3-環辛二烯



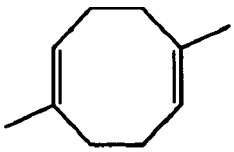
2,6-二甲基-1,4-環辛二烯



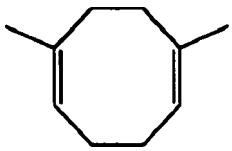
3,7-二甲基-1,3-環辛二烯



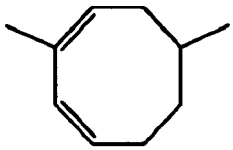
3,7-二甲基-1,5-環辛二烯



1,5-二甲基環辛-1,5-二烯

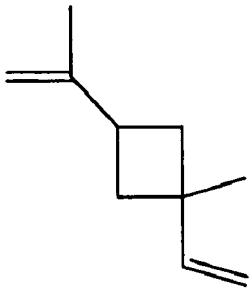


1,6-二甲基環辛-1,5-二烯

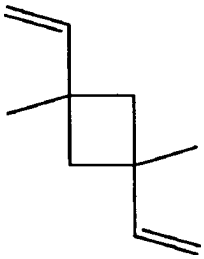


3,6-二甲基-1,3-環辛二烯

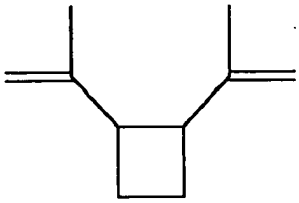
流程II.例示性不飽和4員環中間物



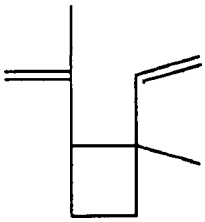
1-甲基-3-(丙-1-烯-2-基)-1-乙烯基環丁烷



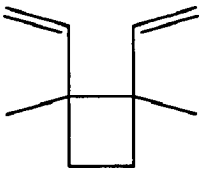
1,3-二甲基-1,3-二乙烯基環丁烷



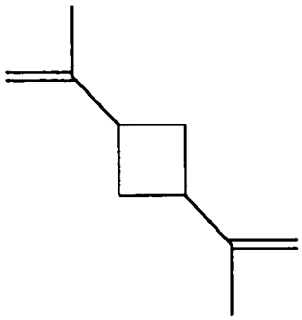
1,2-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷



1-甲基-2-(丙-1-烯-2-基)-1-乙烯基環丁烷

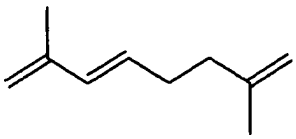


1,2-二甲基-1,2-二乙烯基環丁烷

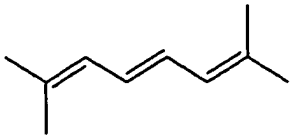


1,3-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷

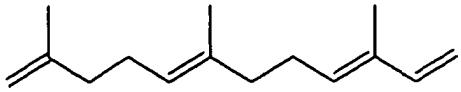
流程III.例示性不飽和異戊二烯調聚物及氧化物中間物



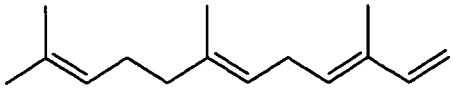
2,7-二甲基辛-1,3,7-三烯



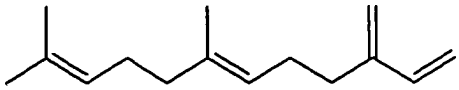
2,7-二甲基辛-2,4,6-三烯



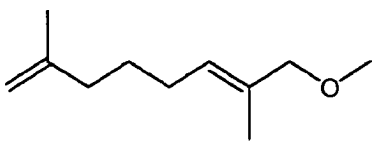
3,7,11-三甲基十二烷-1,3,7,11-四烯



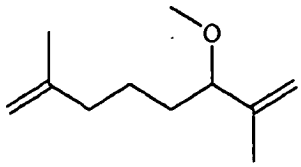
3,7,11-三甲基十二烷-1,3,6,10-四烯



7,11-二甲基-3-亞甲基十二烷-1,6,10-三烯

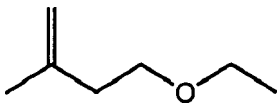


8-甲氧基-2,7-二甲基辛-1,6-二烯

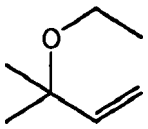


3-甲氧基-2,7-二甲基辛-1,7-二烯

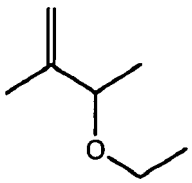
流程IV.例示性不飽和乙基醚中間物



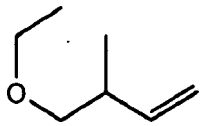
乙基3-甲基-3-丁烯基醚



乙基1,1-二甲基-2-丙烯基醚

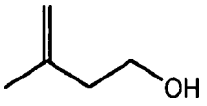


乙基1,2-二甲基-2-丙烯基醚

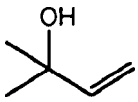


乙基2-甲基-3-丁烯基醚

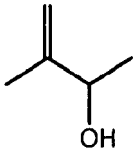
流程V.例示性不飽和醇中間物



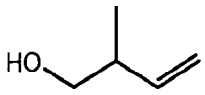
3-甲基-3-丁烯-1-醇



2-甲基-3-丁烯-2-醇

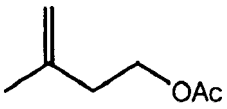


3-甲基-3-丁烯-2-醇

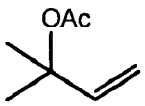


2-甲基-3-丁烯-1-醇

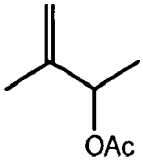
流程VI.例示性不飽和酯中間物



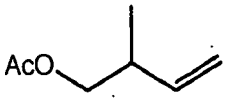
乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯



乙酸2-甲基-3-丁烯-2-基酯



乙酸3-甲基-3-丁烯-2-基酯



乙酸2-甲基-3-丁烯-1-基酯

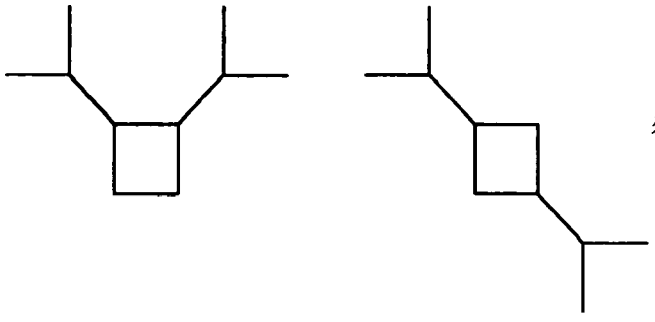
例示性氫化不飽和中間物

在氫化催化劑存在下對不飽和異戊二烯衍生物進行氫化以製造飽和化合物。對飽和化合物進行表徵且評估其作為

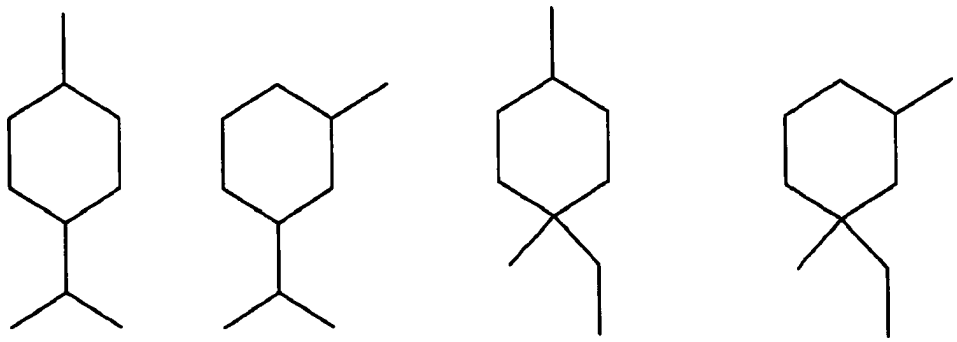
燃料之價值。在一些實施例中，供氫化用之氫源為氫氣。在一些實施例中，氫氣係與生物異戊二烯共同製造，如2008年12月30日申請之美國臨時專利申請案第61/141,652號、及US 2009/0203102 A1中所述。在一些實施例中，氫化催化劑為鈀基催化劑，諸如Pd/C(例如5%(重量)Pd/C)。在一些實施例中，氫化催化劑為阮尼鎳(Raney Nickel)催化劑。在一些實施例中，氫化催化劑為均相催化劑，諸如釕基或銠基均相氫化催化劑。在一些實施例中，氫化不飽和異戊二烯二聚體及三聚體以製造適用於製造燃料之飽和C10及C15烴。在一些實施例中，氫化不飽和環狀二聚體以製造飽和環狀C10烴，諸如1,2-雙(異丙基)環丁烷、1,2-雙(異丙基)環丁烷、1-甲基-4-異丙基環己烷、1-甲基-3-異丙基環己烷、1-乙基-1,4-二甲基環己烷、1-乙基-1,3-二甲基環己烷、1,5-二甲基環辛烷及1,4-二甲基環辛烷。在一些實施例中，氫化不飽和環狀三聚體以製造飽和環狀C15烴，諸如1,5,9-三甲基環十二烷及1,5,10-三甲基環十二烷(參見流程VII)。在一些實施例中，氫化不飽和線性二聚體以製造飽和脂族C10烴，諸如2,6-二甲基辛烷、2,7-二甲基辛烷及3,6-二甲基辛烷。在一些實施例中，氫化不飽和線性三聚體以製造飽和脂族C15烴，諸如2,6,10-三甲基十二烷、2,7,10-三甲基十二烷及3,7,10-三甲基十二烷(參見流程VIII)。在一些實施例中，使異戊烯之二聚產物(癸烯或C10二聚烯)完全氫化成異烷烴(例如2,3,4,4-四甲基己烷、2,2,3,4-四甲基己烷、2,3,3,4-四甲基己烷及3,3,5-三甲基庚

烷)(參見流程VIIIa)。在一些實施例中，氫化工業上有益量之高純度異戊二烯起始組合物以製造包含2-甲基丁烷之產物。在一些實施例中，氫化不飽和異戊二烯羥基化物以製造飽和羥基化物，諸如C5醇及二醇(例如3-甲基-丁-1-醇、2-甲基-丁-1-醇及2-甲基-丁-2-醇、3-甲基-丁-1,3-二醇及2-甲基-丁-2,3-二醇)、C-10醇及二醇(例如3,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-2-醇及2,7-二甲基辛-2,7-二醇)及環狀C-10醇(例如2-(4-甲基環己基)丙-2-醇、2-(4-甲基環己基)丙-1-醇、2-(1,4-二甲基環己基)乙醇及4-乙基-1,4-二甲基環己醇)(參見流程IX)。在一些實施例中，氫化不飽和異戊二烯氧化物以製造飽和醚，諸如1,3-二乙氧基-3-甲基丁烷、1-乙氧基-3-甲基丁烷、1-甲氧基-2,7-二甲基辛烷及3-甲氧基-2,7-二甲基辛烷(參見流程X)。應瞭解，當氫化烯烴部分時，製造一或多種立體異構體。立體異構體之間的相對比率視所用反應條件及催化劑而定。適用時，各個及每一立體異構體均欲為本文所述之飽和烴及氧化物。

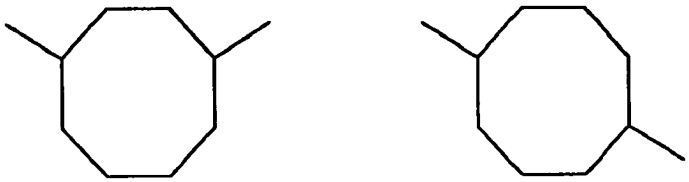
流程VII.源自異戊二烯之環烴之實例



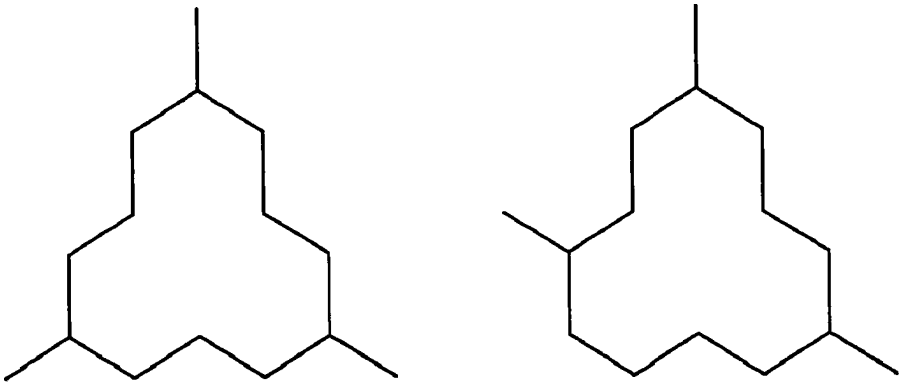
來自2+2光二聚之雙(異丙基)環丁烷



來自熱環化二聚或催化環化二聚之環己烷

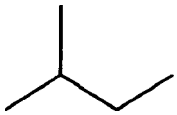


來自熱環化二聚或催化環化二聚之1,5-二甲基環辛烷及1,6-二甲基環辛烷

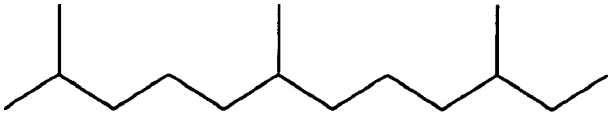


來自異戊二烯環化三聚之1,5,9-三甲基環十二烷及1,5,10-三甲基環十二烷

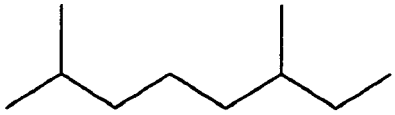
流程VIII.源自異戊二烯之脂族烴之實例



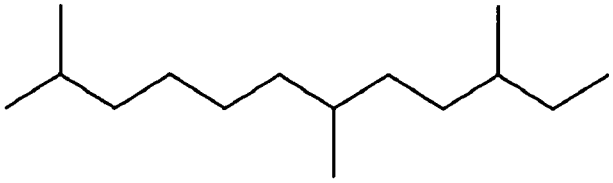
2-甲基丁烷



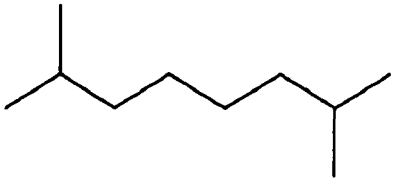
2,6,10-三甲基十二烷（法呢烷）



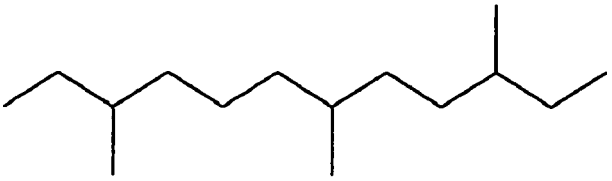
2,6-二甲基辛烷



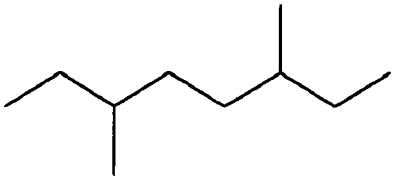
2,7,10-三甲基十二烷



2,7-二甲基辛烷

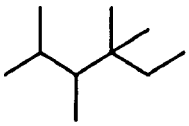


3,7,10-三甲基十二烷

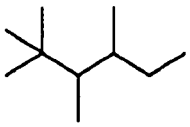


3,6-二甲基辛烷

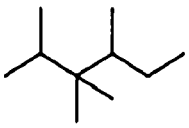
流程VIIIa.源自異戊烯之異癸烷之實例



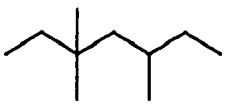
2,3,4,4-四甲基己烷



2,2,3,4-四甲基己烷

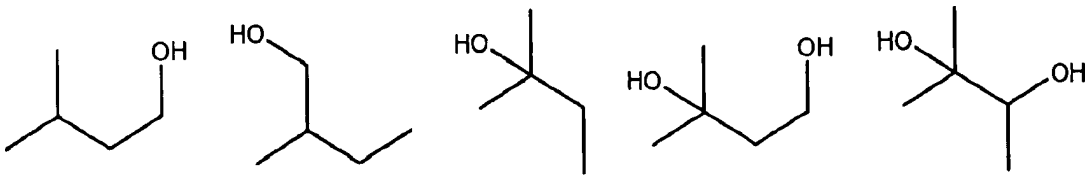


2,3,3,4-四甲基己烷

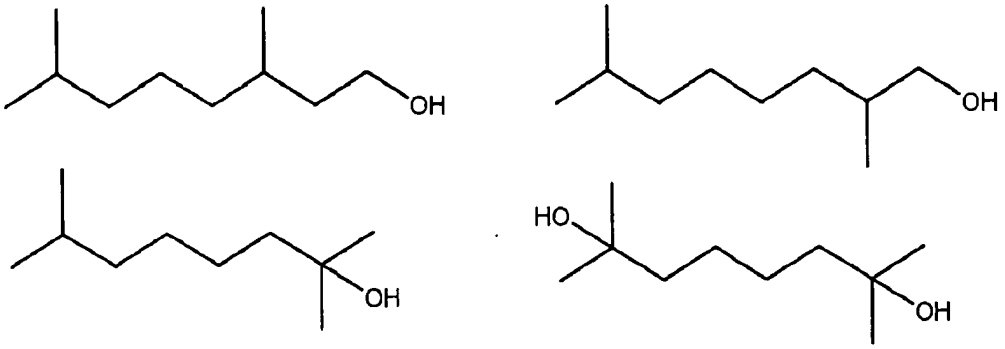


3,3,5-三甲基庚烷

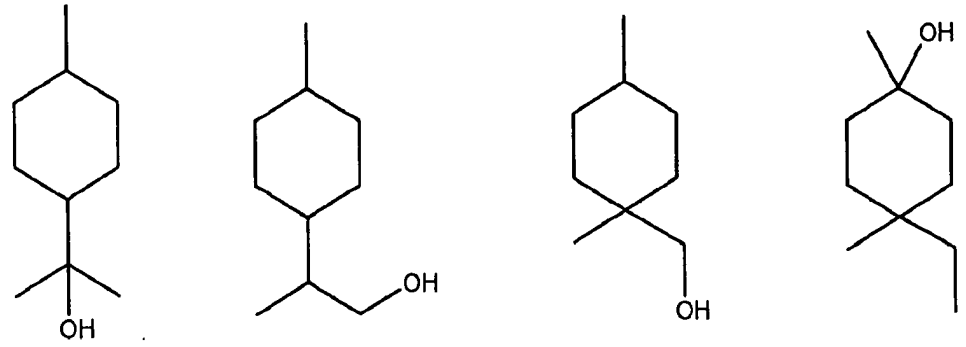
流程IX.源自異戊二烯之IsoFuel™醇之實例



C5醇及二醇

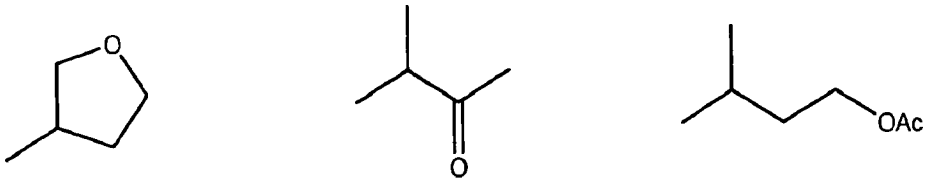


C10醇及二醇

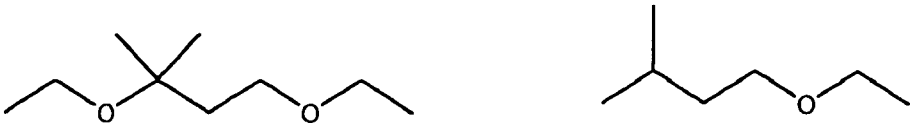


環狀C10醇

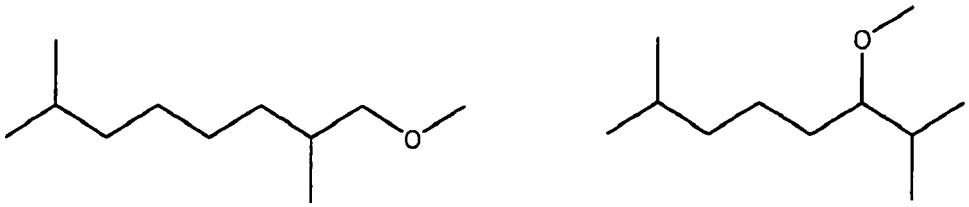
流程X.源自異戊二烯之IsoFuel™氧化物之實例



3-甲基四氫呋喃　　3-甲基-2-丁酮　　乙酸異戊酯



異戊二烯與乙醇之反應產物（參見S. Reyer之附加陳述）



甲醇溶劑中Pd催化之異戊二烯調聚所製造之烷氧基衍生物
（參見Zakharkin (1976)）

在某一實施例中，藉由使工業上有益量之高純度異戊二烯起始組合物發生化學轉化而製造之燃料成分包含飽和異戊二烯衍生物。在一些實施例中，燃料成分包含源自異戊二烯之飽和C10及C15烴。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的飽和環狀C10烴：1,2-雙(異丙基)環丁烷、1,2-雙(異丙基)環丁烷、1-甲基-4-異丙基環己烷、1-甲基-3-異丙基環己烷、1-乙基-1,4-二甲基環己烷、1-乙基-1,3-二甲基環己烷、1,5-二甲基環辛烷及1,4-二甲基環辛烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的飽和環狀C15烴：1,5,9-三甲基環十二烷及1,5,10-三甲基環十二烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的飽和脂族C10烴：2,6-二甲基辛烷、2,7-二甲基辛烷及3,6-二甲基辛烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的飽和脂族C15烴：2,6,10-三甲基十二烷、2,7,10-三甲基

十二烷及3,7,10-三甲基十二烷。在一些實施例中，燃料成分包含2-甲基丁烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的異烷烴：2,3,4,4-四甲基己烷、2,2,3,4-四甲基己烷、2,3,3,4-四甲基己烷及3,3,5-三甲基庚烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的飽和羥基化物：3-甲基-丁-1-醇、2-甲基-丁-1-醇及2-甲基-丁-2-醇、3-甲基-丁-1,3-二醇、2-甲基-丁-2,3-二醇、3,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-2-醇、2,7-二甲基辛-2,7-二醇、2-(4-甲基環己基)丙-2-醇、2-(4-甲基環己基)丙-1-醇、2-(1,4-二甲基環己基)乙醇及4-乙基-1,4-二甲基環己醇。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的飽和醚：1,3-二乙氧基-3-甲基丁烷、1-乙氧基-3-甲基丁烷、1-甲氧基-2,7-二甲基辛烷及3-甲氧基-2,7-二甲基辛烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的異戊二烯氧化物：3-甲基四氫呋喃、3-甲基-2-丁酮及乙酸異戊酯。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之組合物及系統進一步包含催化異戊二烯起始組合物化學轉化成燃料成分或用於製造燃料成分之中間物的催化劑。在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之組合物及系統進一步包含催化不飽和中間物氫化以製造飽和燃料成分之催化劑。在一些實施例中，催化劑為所述之任何催化劑，或本文所述之一或多種催化劑之組合。

製造燃料之方法及/或製程

本發明提供自異戊二烯製造燃料成分之方法及/或製程，其包含：(a)獲得工業上有益量之高純度異戊二烯；及(b)使該工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分。在一實施例中，在連續化學過程中使高純度異戊二烯組合物轉化成燃料組分。在另一實施例中，在化學轉化成燃料組合物之前進一步純化高純度異戊二烯。在另一實施例中，使高純度異戊二烯化學轉化成中間組合物；該中間組合物經歷進一步化學轉化以製造燃料或燃料組分。在另一實施例中，將所製造之燃料組分與石油餾出物及其他視情況選用之添加劑混合以製成燃料。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯為生物異戊二烯組合物。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含獲得工業上有益量之高純度異戊二烯組合物。在一些實施例中，適用於本發明之高純度異戊二烯組合物包含大於或約2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000 mg之異戊二烯。在一些實施例中，高純度異戊二烯組合物包含大於或約2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 g之異戊二烯。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物包含大於或約0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000 kg之異戊二烯。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含

獲得工業上有益量之高純度異戊二烯組合物。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，高純度異戊二烯起始組合物包含大於或約98.0、98.5、99.0、99.5或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，適用於本發明之高純度異戊二烯組合物包含大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，高純度異戊二烯組合物包含小於或約2.0、1.5、1.0、0.5、0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，以組合物中所有C5烴之總重量計，高純度異戊二烯組合物具有小於或約2.0、1.5、1.0、0.5、0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔。在特定實施例中，高純度異戊二烯組合物具有大於約2 mg之異戊二烯，且以組合物中所有C5烴之總重量計，具有大於或約98.0、98.5、99.0、99.5、99.90、99.92、99.94、99.96、

99.98或100重量%之異戊二烯。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含獲得工業上有益量之高純度異戊二烯組合物。在一些實施例中，適用於本發明之高純度異戊二烯組合物具有小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(組合物中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在特定實施例中，組合物亦具有大於約2 mg之異戊二烯。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含獲得工業上有益量之高純度異戊二烯組合物。在一些實施例中，適用於本發明之高純度異戊二烯組合物具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。在一些實施例中，高純度異戊二烯組合物具有大於或約0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、60、80、100或120 μg/L之乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在特定實施例中，高純度異戊二烯組合物具有大於約2 mg之異戊二烯，且具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含獲得工業上有益量之高純度異戊二烯組合物。在一些實施例中，適用於本發明之高純度異戊二烯組合物包括異戊二

烯及一或多種選自由以下組成之群的第二化合物：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。在多個實施例中，以重量百分比為單位，此等第二組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為大於或約0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%(w/w)。在一些實施例中，以重量百分比為單位，甲硫醇之量相對於異戊二烯之量為小於0.01%(w/w)。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含獲得工業上有益量之高純度異戊二烯組合物。在一些實施例中，該方法包含自生物過程獲得工業上有益量之高純度異戊二烯組合物，該生物過程包含：(a)在適於製造異戊二烯之培養條件下培養包含編碼異戊二烯合成酶多肽之異源核酸的細胞，其中該等細胞(i)製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯，(ii)使細胞自細胞培養基中消耗之碳有超過

約0.002莫耳%轉化成異戊二烯，或(iii)使異戊二烯之平均體積生產力大於約0.1 mg異戊二烯/$L_{培養液}$/h；及(b)製造異戊二烯。在一些實施例中，細胞具有如下異源核酸：(i)編碼異戊二烯合成酶多肽，例如來自諸如葛屬之植物的天然存在之多肽；及(ii)可操作地連接於啟動子，例如T7啟動子。在一些實施例中，在包括碳源之培養基中培養細胞，該碳源為諸如(但不限於)碳水化合物、甘油、丙三醇、二羥基丙酮、單碳源、油、動物脂肪、動物油、脂肪酸、脂質、磷脂、甘油脂、單酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、可再生碳源、多肽(例如微生物或植物蛋白質或肽)、酵母提取物、來自酵母提取物之組分，或前述兩者或兩者以上之任何組合。在一些實施例中，於限制性葡萄糖條件下培養細胞。在某一實施例中，細胞進一步包含編碼IDI多肽之異源核酸。在一些實施例中，細胞進一步包含編碼MDV途徑多肽之異源核酸。在某一實施例中，該方法包含使用以下文獻中所述之方法製造異戊二烯：2008年7月2日申請之美國臨時專利申請案第61/134,094號，WO 2010/003007，及2008年12月15日申請之美國專利申請案第12/335,071號(US 2009/0203102 A1)，其以全文引用的方式併入。

在某一實施例中，該方法包含獲得由製造異戊二烯之培養中細胞產生之氣相(釋出氣體)。在一些實施例中，培養中細胞製造大於約400 nmol/g_{wcm}/h之異戊二烯。在一些實施例中，當以1 vvm之速率釋氣時，氣相包含大於或約5、

10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μg/L之異戊二烯。在一些實施例中，以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量計，氣相之揮發性有機部分包含大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。在一些實施例中，以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量計，氣相之揮發性有機部分包含小於或約2.0、1.5、1.0、0.5、0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量計，氣相之揮發性有機部分具有小於或約2.0、1.5、1.0、0.5、0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔。在特定實施例中，氣相之揮發性有機部分具有大於約2 mg之異戊二烯，且以揮發性有機部分中所有C5烴之總重量計，具有大於或約99.90、99.92、99.94、99.96、99.98或100重量%之異戊二烯。

在某一實施例中，該方法包含獲得由製造異戊二烯之培

養中細胞產生之氣相(釋出氣體)。在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分具有小於或約50、40、30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01或0.005 μg/L抑制異戊二烯聚合之化合物(氣相之揮發性有機部分中抑制異戊二烯聚合之任何化合物)。在特定實施例中，氣相之揮發性有機部分亦具有大於約2 mg之異戊二烯。在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分具有大於或約0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、60、80、100或120 μg/L之乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)，或前述任意兩者或兩者以上。在特定實施例中，氣相之揮發性有機部分具有大於約2 mg之異戊二烯，且具有一或多種選自由乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物組成之群的化合物。在一些實施例中，氣相之揮發性有機部分包括異戊二烯及一或多種選自由以下組成之群的第二化合物：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸

3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。在多個實施例中，在氣相之揮發性有機部分中，以重量百分比為單位，此等第二組分之一之量相對於異戊二烯之量(亦即，組分重量除以異戊二烯重量×100)為大於或約0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110%(w/w)。在一些實施例中，該方法進一步包括自氣相回收異戊二烯。舉例而言，包含異戊二烯之氣相中之異戊二烯可使用標準技術加以回收，諸如氣提、膜增強型分離、分餾、吸附/脫附、滲透蒸發、使異戊二烯自固相熱脫附或真空脫附，或用溶劑萃取固定或吸附於固相之異戊二烯(參見，例如美國專利第4,703,007號及第4,570,029號，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於異戊二烯回收與純化方法)。在一些特定實施例中，用醇(諸如乙醇、甲醇、丙醇或其組合)進行萃取蒸餾來回收異戊二烯。在一些實施例中，異戊二烯回收包含以液體形式分離異戊二烯(諸如異戊二烯之純溶液或異戊二烯於溶劑中之溶液)。氣提包含以連續方式自醱酵釋出氣流中移出異戊二烯蒸氣。該移出可以若干不同方式達成，包括(但不限於)吸附於固相、分配至液相中、或直接冷凝(諸如因與冷凝線圈接觸而冷凝或因壓力增加而冷凝)。在一些實施例中，在稀異戊二烯蒸氣流之露點之上

對該蒸氣進行膜富集，從而冷凝得到液體異戊二烯。在一些實施例中，對所回收之異戊二烯進行壓縮及冷凝。

異戊二烯回收可包含一個步驟或多個步驟。在一些實施例中，自醱酵釋出氣體中移出異戊二烯蒸氣及使異戊二烯轉化成液相係同時進行。舉例而言，可使異戊二烯自釋出氣流中直接冷凝而形成液體。在一些實施例中，自醱酵釋出氣體中移出異戊二烯蒸氣及使異戊二烯轉化成液相係依序進行。舉例而言，可使異戊二烯吸附於固相，接著用溶劑自固相萃取。

在一些實施例中，提供一種製造環狀異戊二烯二聚體之方法，其包含加熱純生物異戊二烯。所製造之環狀異戊二烯二聚體可為6員環二聚體(例如[2+4]電環化產物，諸如檸檬烯)或8員環二聚體或其混合物。6員環二聚體之實例包括(但不限於)1-甲基-4-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1-甲基-5-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、2,4-二甲基-4-乙烯基環己烯及其類似物。8員環二聚體之實例包括(但不限於)1,5-二甲基環辛-1,5-二烯、1,6-二甲基環辛-1,5-二烯及其類似物。在一實施例中，藉由將以生物方法製造之純異戊二烯加熱至約100℃至約300℃、較佳約150℃至約250℃之溫度而使之二聚。維持壓力為約2至3 atm。在另一實施例中，可使用適於催化共軛二烯二聚化之催化劑。可由催化劑及其他反應條件控制產物混合物中各種二聚體之比例。舉例而言，鎳催化劑可促進8員環二聚體形成。

在一些實施例中，提供一種製造環狀異戊二烯二聚體之方法，其包含使生物異戊二烯進行光二聚。所製造之環狀異戊二烯二聚體可為一或多種4員環二聚體或其混合物。4員環二聚體之實例包括(但不限於)1,2-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-3-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-2-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二甲基-1,3-二乙烯基環丁烷、1,2-二甲基-1,2-二乙烯基環丁烷及其類似物。在一實施例中，藉由較佳在諸如苯甲酮之光敏劑存在下用UV光照射以生物方法製造之純異戊二烯而使之二聚。

可氫化異戊二烯二聚體以形成可充當燃料或摻合至燃料中之飽和C_{10}烴。在一實施例中，對不飽和異戊二烯二聚體進行催化氫化以製造部分氫化及/或完全氫化之產物。完全氫化之產物的實例包括(但不限於)1-甲基-4-異丙基環己烷及1-甲基-5-異丙基環己烷、1,4-二甲基-4-乙基環己烷、2,4-二甲基-4-乙基環己烷、1,2-二異丙基環丁烷及1,3-二異丙基環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-3-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙基-2-(丙-2-基)環丁烷、1,3-二甲基-1,3-乙基環丁烷、1,2-二甲基-1,2-二乙基環丁烷、1,5-二甲基環辛烷、1,6-二甲基環辛烷及其類似物。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使高純度異戊二烯起始組合物之至少一部分化學轉化成燃料成分，其包含：(i)在壓力下將高純度

異戊二烯組合物加熱至高於或約100℃，(ii)使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和環狀異戊二烯二聚體，及(iii)氫化不飽和環狀異戊二烯二聚體以製造飽和環狀異戊二烯二聚體。在一些實施例中，在壓力下將起始異戊二烯組合物加熱至高於或約100、125、150、175、200、225或250℃。在一些實施例中，在抗氧化劑(例如2,6-二-第三丁基-4-甲基苯酚)存在下加熱起始異戊二烯組合物以防止自由基介導之聚合。在一實施例中，在二硝基甲酚作為聚合抑制劑存在下進行異戊二烯之熱二聚。適合之抗氧化劑可用作聚合抑制劑。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成包括以下6員及8員環之不飽和二聚體混合物：例如檸檬烯(1-甲基-4-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯)、1-甲基-5-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、2,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、1,5-二甲基環辛-1,5-二烯、1,6-二甲基環辛-1,5-二烯、2,6-二甲基-1,3-環辛二烯、2,6-二甲基-1,4-環辛二烯、3,7-二甲基-1,5-環辛二烯、3,7-二甲基-1,3-環辛二烯及3,6-二甲基-1,3-環辛二烯。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物中大於或約20、30、40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、99或100%之異戊二烯轉化成不飽和環狀異戊二烯二聚體。在一些實施例中，由諸如鈀基催化劑(例如Pd/C，例如5%(重量)Pd/C)之氫化催化劑催化不飽和環狀異戊二烯二聚體之氫化。在一些實施例中，飽和環狀異戊二烯二聚體包含一或多種選自由以下組成之群的C10烴：

1-甲基-4-異丙基環己烷、1-甲基-3-異丙基環己烷、1,5-二甲基環辛烷及1,4-二甲基環辛烷。在一些較佳實施例中，起始異戊二烯組合物為生物異戊二烯組合物。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使高純度異戊二烯起始組合物之至少一部分化學轉化成燃料成分，其包含：(i)使高純度異戊二烯組合物與催化劑系統接觸，(ii)使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和異戊二烯二聚體及/或三聚體，及(iii)氫化不飽和二聚體及/或三聚體以製造飽和C10及/或C15烴。在一些實施例中，起始異戊二烯組合物中大於或約20、30、40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、99或100%之異戊二烯轉化成不飽和異戊二烯二聚體及/或三聚體。在一些實施例中，使起始異戊二烯組合物與此項技術中已知之適當催化劑系統接觸以得到一或多種選自由以下組成之群的不飽和環狀異戊二烯二聚體：1,2-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-3-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1-甲基-1-乙烯基-2-(丙-1-烯-2-基)環丁烷、1,3-二甲基-1,3-二乙烯基環丁烷、1,2-二甲基-1,2-二乙烯基環丁烷、1-甲基-4-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1-甲基-5-(丙-1-烯-2-基)環己-1-烯、1,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、2,4-二甲基-4-乙烯基環己烯、1,5-二甲基環辛-1,5-二烯、1,6-二甲基環辛-1,5-二烯、1,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯、2,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯、

2,7-二甲基-1,3,7-辛三烯、2,7-二甲基-2,4,6-辛三烯、2,6-二甲基-1,3-環辛二烯、2,6-二甲基-1,4-環辛二烯、3,7-二甲基-1,5-環辛二烯、3,7-二甲基-1,3-環辛二烯及3,6-二甲基-1,3-環辛二烯。在一些實施例中，使起始異戊二烯組合物與此項技術中已知之適當催化劑系統接觸以得到一或多種不飽和環狀異戊二烯三聚體，諸如三甲基環十二烷三烯及三甲基十二烷四烯及其類似物。在一些實施例中，使起始異戊二烯組合物與此項技術中已知之適當催化劑系統接觸以得到一或多種不飽和線性異戊二烯二聚體及/或三聚體，諸如二甲基辛三烯(例如2,7-二甲基-1,3,7-辛三烯及2,7-二甲基-2,4,6-辛三烯)及三甲基十二烷四烯(例如2,6,10-三甲基-1,5,9,11-十二烷四烯、α-法呢烯及β-法呢烯)及其類似物。在一些較佳實施例中，起始異戊二烯組合物為生物異戊二烯組合物。

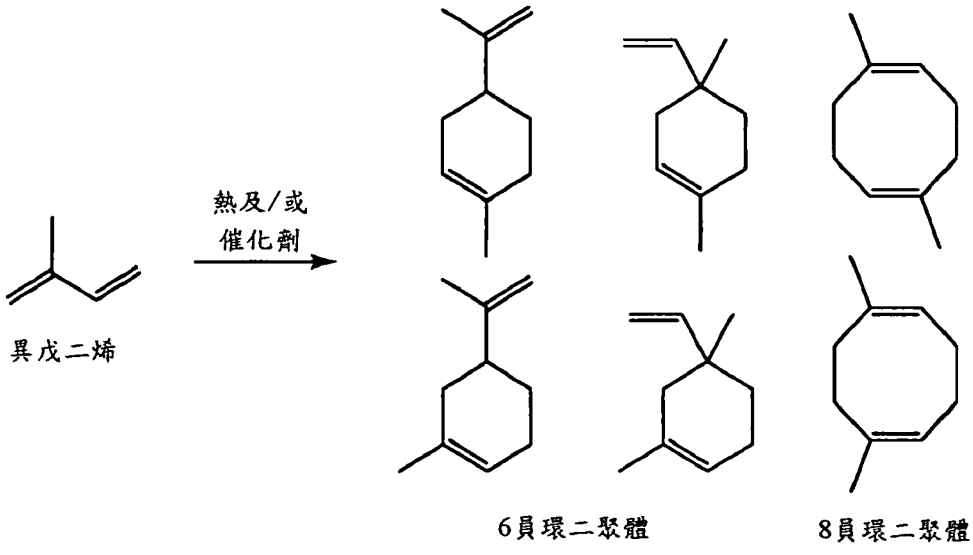
在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含使高純度異戊二烯組合物與催化劑系統接觸以使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和異戊二烯二聚體及/或三聚體。在一些實施例中，催化劑系統包含Ni、Fe或Co催化劑，且起始組合物中之異戊二烯轉化成8員環異戊二烯二聚體，包含二甲基環辛二烯，諸如1,5-二甲基環辛-1,5-二烯及1,6-二甲基環辛-1,5-二烯。在一些實施例中，催化劑系統包含鎳化合物。Ni催化之異戊二烯二聚得到由1,5-二甲基-1,5-環辛二烯與1,6-二甲基-1,5-環辛二烯以約90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、

20:80及10:90比率組成之二甲基-1,5-環辛二烯混合物。在一實施例中，催化劑系統包含三組分催化劑，其含有羧酸鎳或β-酮、有機鋁或有機鎂化合物及經取代之亞磷酸三苯酯。舉例而言，在氮氣氛圍下將高純度異戊二烯起始組合物於無水甲苯中之脫氣溶液與$Ni(acac)_2$、Et_3Al及亞磷酸參(3,4-雙(二甲基胺基)苯基)酯混合，且在95℃下加熱該混合物以得到二甲基環辛二烯。在另一實施例中，催化劑系統包含羧酸鐵或β-二酮化合物、有機鋁或有機鎂化合物及具有推電子基團之2,2'-聯吡啶衍生物。舉例而言，將起始異戊二烯組合物與乙烯基丙酮酸鐵、4,4'-二甲基-2,2'-聯吡啶及Et_3Al於甲苯中之混合物一起加熱以得到優良產率之1,6-二甲基-1,5-環辛二烯。在一些較佳實施例中，起始異戊二烯組合物為生物異戊二烯組合物。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含使高純度異戊二烯組合物與催化劑系統接觸以使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和異戊二烯二聚體及/或三聚體。在一些實施例中，催化劑系統包含Ru、Fe、Ni或Pd催化劑或其組合，且起始組合物中之異戊二烯轉化成包含6員環異戊二烯二聚體之混合物。在一實施例中，催化劑系統為$Fe(NO)_2Cl$-雙(1,5-環辛二烯)鎳催化劑系統，且起始組合物中之異戊二烯在低溫(例如-5℃至+20℃)下環二聚化，得到1-甲基-4-異丙烯基-1-環己烯與2-甲基-4-異丙烯基-1-環己烯及1,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯與2,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯。在另一實施例中，與亞磷酸參(經

取代烴基)酯、亞砷酸參(經取代烴基)酯或亞銻酸參(經取代烴基)酯及VIII族金屬(0)化合物(例如乙醯基丙酮酸鎳)之混合型催化劑接觸使起始組合物中之異戊二烯轉化成1,4-二甲基-4-乙烯基-1-環己烯及1,5-二甲基-1,5-環辛二烯。在另一實施例中，異戊二烯起始組合物與釩催化劑(參見，例如Itoh, Kenji; Masuda, Katsuyuki; Fukahori, Takahiko; Nakano, Katsumasa; Aoki, Katsuyuki; Nagashima, Hideo, *Organometallics* (**1994**), 13(3), 1020-9)接觸使異戊二烯轉化成C10環狀二聚體(例如二甲基-環辛二烯之混合物)。釩催化劑可以兩個步驟自$RuCl_3$及五甲基環戊二烯(C_5Me_5H)合成。該製程可以分批模式進行且回收催化劑並使之再循環。在一些較佳實施例中，起始異戊二烯組合物為生物異戊二烯組合物。該方法之一實施例於流程XI中說明。

流程XI



。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含使高純度異戊二烯組合物與催化劑系統接觸以使起始異戊

二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和異戊二烯二聚體及/或三聚體。在一些實施例中，催化劑系統包含Ni、Ti、Al或Mg催化劑或其混合物，且起始組合物中之異戊二烯轉化成包含環狀異戊二烯三聚體(諸如三甲基環十二烷三烯)之混合物。在一實施例中，用於異戊二烯三聚之催化劑系統包含Ni及/或Ti、一或多種有機金屬化合物、及VA族化合物。反應可於含羥基溶劑中進行。在另一實施例中，在多種亞磷酸酯作為電子供體存在下由環烷酸鎳及異戊二烯鎂催化異戊二烯寡聚，得到含有二甲基環辛二烯之環狀二聚體；尤其在1,1,1-參(羥甲基)丙烷亞磷酸酯存在下選擇性地得到三甲基環十二烷三烯。

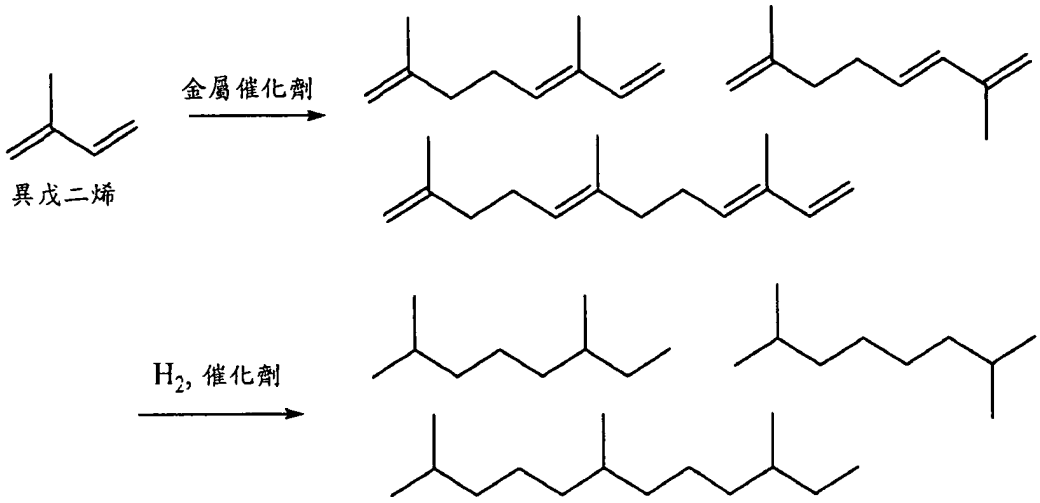
在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含使高純度異戊二烯組合物與催化劑系統接觸以使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和異戊二烯二聚體及/或三聚體。在一些實施例中，催化劑系統包含Ni、Pd或Cr催化劑或其混合物，且起始組合物中之異戊二烯轉化成調聚物或線性二聚體及/或三聚體。在一實施例中，包含Pd(0)錯合物(例如$Pd(acac)_2$-Ph_3P及$Pd(OAc)_2$-Ph_3P)之催化劑系統催化異戊二烯二聚及調聚以得到線性異戊二烯二聚體(例如2,7-二甲基-1,3,7-辛三烯)。在一種變化形式中，於甲醇溶劑中進行反應，且製造甲基醚，諸如甲氧基二甲基辛二烯(例如1-甲氧基-2,7-二甲基-2,7-辛二烯及3-甲氧基-2,7-二甲基-1,7-辛二烯)。在另一實施例中，催化劑系統包含二價及三價過渡金屬交換之蒙脫石(例如Cr^{3+}蒙脫

石)。在另一實施例中，催化劑系統包含Ni(0)胺基亞膦酸酯催化劑，且起始組合物中之異戊二烯轉化成區位選擇性尾-尾線性二聚體。在一些變化形式中，由競爭性環二聚化反應形成線性二聚體。在另一實施例中，催化劑系統包含*N,N*-雙(二芳基膦基)胺鉻催化劑(參見，例如Bowen, L.; Charernsuk, M.; Wass, D.F. *Chem. Commun.* (**2007**) 2835-2837)，且異戊二烯轉化成線性及環狀C15三聚體。在一種變化形式中，鉻催化劑係自$CrCl_3(THF)_3$及PNP膦配位體就地製成。

在一些實施例中，自生物異戊二烯組合物製造燃料成分之方法包含如下使生物異戊二烯組合物中之大部分異戊二烯發生化學轉化：(i)使生物異戊二烯組合物與催化異戊二烯三聚之催化劑接觸以製造不飽和異戊二烯三聚體，及(ii)氫化異戊二烯三聚體以製造燃料成分。在一些實施例中，在化學轉化期間生物異戊二烯組合物中至少約95%之異戊二烯轉化成非異戊二烯化合物。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成不飽和異戊二烯衍生物；及(c)氫化不飽和異戊二烯衍生物以製造飽和化合物。在一些實施例中，以分批模式使不飽和異戊二烯衍生物氫化成飽和化合物。在一些實施例中，以連續模式使不飽和異戊二烯衍生物氫化成飽和化合物。該方法之一實施例於流程XII中說明。

流程 XII



。

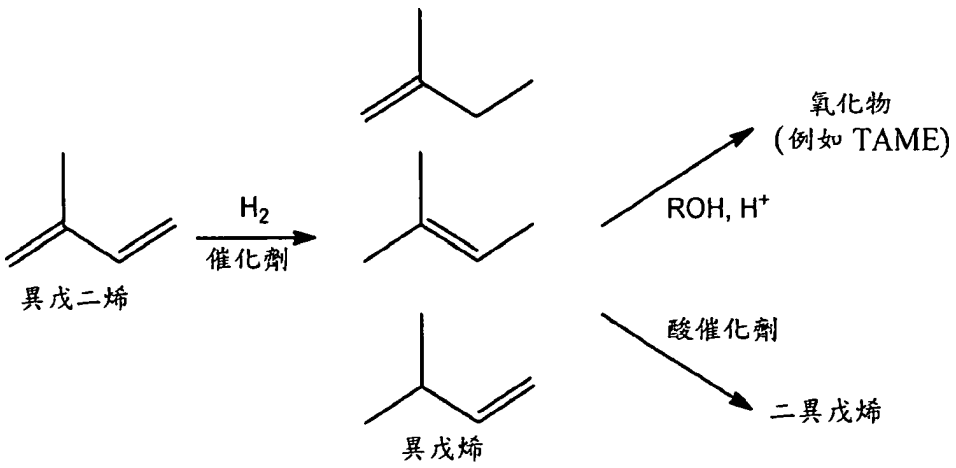
在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使起始異戊二烯組合物之至少一部分轉化成氧化異戊二烯衍生物；及視情況，(c)氫化任何不飽和氧化異戊二烯衍生物以製造飽和氧化物。在一些實施例中，在醇(例如甲醇或乙醇或其混合物)存在下使異戊二烯起始組合物與催化劑接觸以形成包含一或多種不飽和或飽和醚(例如甲基醚或乙基醚或其混合物)之氧化異戊二烯衍生物。在一些實施例中，催化劑為酸催化劑，諸如硫酸、固相硫酸(例如Dowex Marathon®)、液相及固相氟磺酸(例如三氟甲烷磺酸及Nafion-H(DuPont))。在類似於Hensel等人 [Hensen, K.; Mahaim, C.; Holderich, W.F., *Applied Catalysis A: General* (**1997**) 140(2), 311-329]所述之條件下，亦可使用沸石催化劑(例如β-沸石)進行檸檬烯及相關單萜之甲氧基化。在一些實施例中，異戊二烯起始組合物或不飽和異戊二烯二聚體或三聚體進行氧化/氫化以形成

包含一或多種醇(諸如C5、C10及C15醇及二醇)之羥基化異戊二烯衍生物。在一些實施例中，異戊二烯起始組合物進行羥基化/酯化以形成醇及酯。舉例而言，用諸如過乙酸及3-氯過苯甲酸之過酸對生物異戊二烯或不飽和中間物進行過氧化以得到環氧化物；且用i)水與酸催化劑及ii)硼氫化方法進行水合以得到醇及二醇。該等反應描述於例如Michael B. Smith及Jerry March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*，第6版，John Wiley & Sons, 2007中。在一些較佳實施例中，起始異戊二烯組合物為生物異戊二烯組合物。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使起始異戊二烯組合物部分地氫化成單烯烴(例如2-甲基丁-1-烯、3-甲基-丁-1-烯及2-甲基丁-2-烯)；及(c)自單烯烴製造燃料成分。在一實施例中，單烯烴進行二聚。在另一實施例中，使用傳統烴陽離子催化(諸如用於使異丁烯轉化成異辛烷)使單烯烴與其他烯烴反應。二聚或與其他烯烴反應之產物接著進行氫化以得到飽和燃料成分。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯為生物異戊二烯組合物。在某一實施例中，使用鈀催化劑部分地氫化起始異戊二烯組合物，該鈀催化劑為諸如$Pd/CaCO_3$、$Pd/BaSO_4$、Pd/C、鈀黑、Pd/SiO_3、Pd/Al_2O_3或Pd/SiO_2。在某一實施例中，使用二氧化矽支撐型聚醯胺基胺(PAMAM)樹枝狀聚合物-鈀錯合物部分地氫化起始異

戊二烯組合物。在某一實施例中，使用鈀-金及鈀-銀催化劑(例如Pd-Au/SiO_2及Pd-Ag/SiO_2)部分地氫化起始異戊二烯組合物對異戊二烯還原成單烯烴相比完全還原之C5烷烴具有高選擇性。在某一實施例中，使用無機支撐物(例如金屬沸石)上之VIB族金屬作為催化劑(例如Mo/Al_2O_3催化劑)部分地氫化起始異戊二烯組合物。在某一實施例中，使用可呈蜂巢組態之整體式催化劑床部分地氫化起始異戊二烯組合物。整體式催化劑床之催化劑支撐材料可包括金屬，諸如鎳、鉑、鈀、銠、釕、銀、鐵、銅、鈷、鉻、鉿、錫，及其合金或混合物。在某一實施例中，使用蛋殼型Pd/δ-Al_2O_3催化劑部分地氫化起始異戊二烯組合物，尤其在反應不含水之情況下。在某一實施例中，使用由IB、VIB、VIIB族金屬或鋅促進之VIII族金屬催化劑部分地氫化起始異戊二烯組合物以減少催化劑中毒。使異戊二烯轉化成異戊烯(單烯烴)之方法可以連續模式或分批模式使用均相或異相催化劑進行。該方法之一實施例於流程XIII中說明。

流程XIII



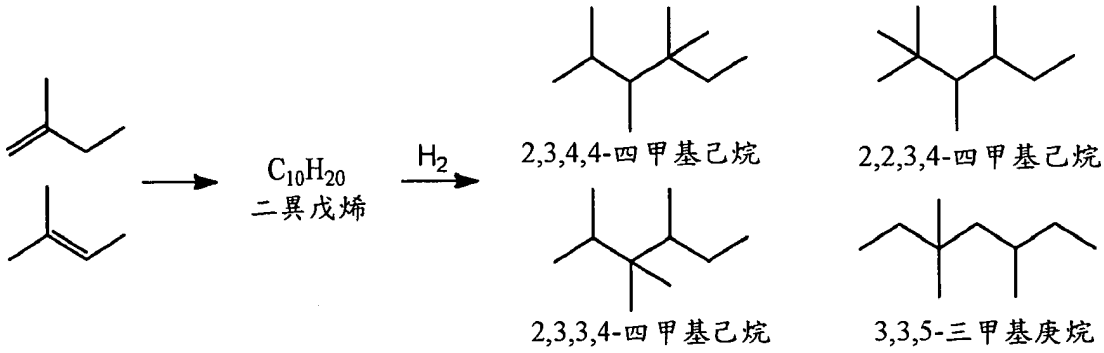
。

在一些實施例中，異戊二烯的部分氫化所製造之異戊烯在液相中於離子交換樹脂及沸石上進行三聚。參見GranGranollers, Ind. Eng. Chem. Res., 49 (8)，第3561-3570頁(2001)。

在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使起始異戊二烯組合物部分地氫化成單烯烴(例如2-甲基丁-1-烯、3-甲基-丁-1-烯及2-甲基丁-2-烯)；(c)使單烯烴與用於單烯烴二聚化之催化劑接觸以與另一單烯烴形成二聚烯；及(d)氫化二聚產物(二聚烯)以製造飽和烴燃料成分。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯為生物異戊二烯組合物。在一些實施例中，另一單烯烴為源自高純度異戊二烯起始組合物之異戊烯。在一些實施例中，另一單烯烴為來自另一來源之烯烴，諸如丙烯、丁烷或異丁烯。在一些實施例中，供二聚用之催化劑為樹脂催化劑(例如Amberlyst、Amberlyst 35、Amberlyst 15、Amberlyst XN1010、Amberlyst XE586)。在一些實施例中，供二聚用之催化劑為含有酸性中孔分子篩，諸如嵌入沸石結構ZSM-5、鎂鹼沸石、ZSM-22或ZSM-23中之中孔篩的催化物質。在一些實施例中，供二聚用之催化劑為在高溫(例如至少900℃)下熱穩定之催化物質。在一些實施例中，供二聚用之催化劑為含有酸性中孔分子篩之催化物質。在一些實施例中，供二聚用之催化劑為固體酸性催化劑(例如固體磷酸催化劑、酸性離子交換樹脂)。該方法之

一實施例於流程XIV中說明。

流程XIV



在一些實施例中，自異戊二烯製造燃料成分之方法包含：(a)獲得工業上有益量之本文所述之任何高純度異戊二烯起始組合物；(b)使起始異戊二烯組合物部分地氫化成異戊烯(例如2-甲基丁-1-烯、3-甲基-丁-1-烯及2-甲基丁-2-烯)；(c)使異戊烯與醇及催化劑接觸以形成氧化物；及(c)自異戊烯氧化物製造燃料成分。在一些較佳實施例中，高純度異戊二烯為生物異戊二烯組合物。在一些實施例中，異戊烯與乙醇接觸且所形成之燃料氧化物為醚，諸如TAME。

在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包括在化學轉化之前純化起始異戊二烯組合物。舉例而言，使用本發明之組合物及方法所製造之異戊二烯可使用標準技術加以純化。純化係指使異戊二烯與一或多種在製造異戊二烯時所存在之組分分離的過程。在一些實施例中，以實質上純液體之形式獲得異戊二烯。純化方法之實例包括(i)用液體萃取劑自溶液蒸餾，及(ii)層析。本文中所用之「經

純化異戊二烯」意謂已與一或多種在製造異戊二烯時所存在之組分分離的異戊二烯。在一些實施例中，至少約20重量%的異戊二烯與在製造異戊二烯時所存在之其他組分分離。在多個實施例中，異戊二烯之純度至少或約為25重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、75重量%、80重量%、90重量%、95重量%或99重量%。可藉由任何適當方法，例如藉由管柱層析、HPLC分析或GC-MS分析來檢驗純度。在一些實施例中，藉由初始吸附於活性碳、接著脫附並濃縮而自醱酵釋出氣體中回收生物異戊二烯以得到用於化學轉化成燃料成分之液體異戊二烯組合物。

製造燃料之連續製程

本發明亦提供一種自異戊二烯製造燃料成分之連續製程，其包含：(a)連續製造工業上有益量之高純度異戊二烯；及(b)連續使該工業上有益量之高純度異戊二烯之至少一部分化學轉化成燃料成分。在本發明之一連續製程中，由例如生物過程(例如培養製造異戊二烯之細胞)連續製造高純度異戊二烯流，且將其通至用於化學轉化之反應器中。在一些實施例中，於連續純化單元中使用萃取蒸餾、冷凝、吸附或膜將來自醱酵釋出氣體之異戊二烯與水及其他永久氣體(例如O_2、N_2及CO_2)分離，該連續純化單元中氧氣含量降至ppm範圍且其他問題雜質得以移除；使用異相催化劑使異戊二烯蒸氣催化轉化成二聚體(C10)及三聚體(C15)；分離所要產物且使未反應之異戊二烯返回至反

應器以供進一步轉化。在一些實施例中，藉由量測氣相中所需C10烴之含量來監測催化二聚。

在一些實施例中，使以生物方法製造之異戊二烯流通過維持在約100℃至約300℃之溫度下的化學反應器(例如反應管)，該化學反應器中以生物方法製造之異戊二烯進行二聚反應。在一種變化形式中，使異戊二烯二聚體與產物流分離且使至少一部分未反應之異戊二烯再循環回化學反應器中。在一實施例中，於第二化學反應器中使所製造之不飽和異戊二烯二聚體與氫化催化劑及氫源接觸，從而製造部分氫化及/或完全氫化之產物。該製程可進一步包含自製造異戊二烯之生物反應器之釋出氣體中回收異戊二烯的步驟。

在一些實施例中，首先將含有共同製造之氫氣的生物異戊二烯流與氫氣分離，使生物異戊二烯流通過維持在約100℃至約300℃之溫度下的化學反應器(例如反應管)，該化學反應器中以生物方法製造之異戊二烯進行二聚反應。在一種變化形式中，使異戊二烯二聚體與產物流分離且使至少一部分未反應之異戊二烯再循環回化學反應器中。在一實施例中，於第二化學反應器中使所製造之不飽和異戊二烯二聚體與氫化催化劑及氫源接觸，從而製造部分氫化及/或完全氫化之產物。在一種變化形式中，自共同製造之異戊二烯-氫氣中分離之氫氣流用於氫化步驟。該製程可進一步包含自製造異戊二烯之生物反應器之釋出氣體中回收異戊二烯的步驟。該製程可進一步包含以下步驟：使

用此項技術中已知之純化方法(諸如低溫冷凝及固體基質吸附)純化自共同製造之異戊二烯-氫氣中分離之氫氣流。

自燃料產物移除二烯及聚合物

燃料組合物常常含有可隨著時間推移形成膠、樹脂、聚合物及其他不合需要之副產物的不飽和化合物(烯烴、二烯烴及聚烯烴)(參見，例如Pereira及Pasa (2006) *Fuel*, **85**, 1860-1865及其中之參考文獻)。一般而言，隨著既定化合物之不飽和度增加，彼化合物形成該等副產物之可能性愈大。異戊二烯為當存在於燃料組合物中時易於形成不合需要之聚合副產物的1,3-二烯。儘管存在可降低副產物形成程度之燃料添加劑(抗氧化劑、自由基抑止劑等)，但該等副產物仍可隨著時間推移而形成。烯烴因自燃料中蒸發或因含烯烴燃料不完全燃燒而釋放至大氣中時，亦可有助於形成地面臭氧。

因此，完全或部分源自異戊二烯之燃料組合物應含有極少乃至不含異戊二烯。一系列方法可用於自燃料組合物移除異戊二烯，諸如藉由蒸餾而純化，與醇反應以形成醚，或氫化以使異戊二烯轉化成飽和衍生物。或者，可用親二烯物(諸如蘋果酸酐)處理異戊二烯，從而製造不會有助於形成不合需要之副產物的惰性加成物。

提供包含異戊二烯衍生物且實質上不含異戊二烯之燃料組合物。在一些實施例中，燃料組合物含有小於0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%或15%之異戊二烯。亦提供使生物異戊二烯組合物化學轉化成包含異戊二烯衍

生物且實質上不含異戊二烯之燃料組合物的方法。在一些實施例中，使來自生物異戊二烯組合物之大部分異戊二烯轉化成燃料成分。在一些實施例中，使來自生物異戊二烯組合物之大部分異戊二烯轉化成可進一步轉化以製造燃料成分之中間物。在一些實施例中，使來自生物異戊二烯組合物之大部分異戊二烯轉化成非異戊二烯之化合物。「大部分」為99.99%、99.9%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%。

在一些情況下，異戊二烯與其他共軛二烯可形成具有膠狀稠度之聚合產物，其可降低所要產物之產率及/或使催化劑失活(參見，例如R.C.C. Pereira及V.M.D. Pasa. *Fuel* 85 (2006) 1860-1865)。在一些實施例中，提供測定產物混合物中存在之共軛二烯之量的方法。D.F. Andrade等人描述測定所存在之共軛二烯之量的多種方法(*Fuel* (2010), doi:10.106/j.fuel/2010.01.003)，包括以下：1) UOP-326方法(順丁烯二酸酐方法)，量測經由與二烯進行狄爾斯-阿爾德反應所消耗之順丁烯二酸酐之量的半定量方法；2)極譜法；3)氣相層析法，其中二烯可與衍生化試劑，諸如4-甲基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(MTAD)或4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮(PTAD)反應；4) HPLC；5)超臨界流體層析法；6) NMR；7) UV及近IR光譜法；及8)其他光譜方法，其可包括首先用氟硼酸對硝基苯重氮鹽對二烯進行衍生處理。

本文中提供使結膠減至最少及/或減少已產生之膠之量的方法。在一些實施例中，使用抗氧化劑使結膠減至最

少。在其他實施例中，使聚合副產物再循環回製程物流。在一些實施例中，經由烯烴複分解使聚合副產物解聚。烯烴複分解可使用鉬或鎢催化劑進行，諸如2,6-二異丙基苯基醯亞胺基新值二烯雙己基(neophylidene)鉬雙(2-第三丁基苯氧化物)(參見US 5,446,102)。

在一些實施例中，本文所述之任何方法均進一步包括對此等反應之產物進行表徵且評估潛在燃料價值。舉例而言，由此項技術中已知之標準方法對產物進行表徵，例如GC/MS、NMR、UV-Vis及IR光譜法、沸點溫度、密度及其他物理特性。可由雙重碳-同位素指紋分析對產物進行進一步表徵(參見美國專利第7,169,588號)。由量測燃料特性之參數來評估產物之潛在燃料價值，該等特性為諸如能量密度、熱值、水溶度、辛烷/十六烷值、密度、黏度、表面張力、汽化焓、蒸氣擴散度、閃點、自燃點、可燃限度、濁點及化學穩定性。

如同商業石油燃料一般，可測試BioIsoFuel™產品之酸度、密度、痕量礦物含量、苯、總芳族物含量、水含量及腐蝕度。為確保BioIsoFuel™產品中之微量雜質不會不利地影響其材料特性，亦可藉由標準ASTM測試(諸如用水及銅條針對腐蝕度進行卡爾費希爾測試(Karl Fischer))測試樣品之腐蝕度及與燃料系統之相容性。

燃料組合物

本發明提供一種包含由本文所述之任何方法及製程製造之燃料成分的燃料組合物。在一些實施例中，燃料成分包

含一或多種選自由以下組成之群的烴：源自異戊二烯之飽和C10及C15烴，及異戊二烯之氧化衍生物。預期BioIsoFuel™烴產品與石油、汽油及柴油完全相容。預期BioIsoFuel™與商業石油燃料之摻合物具有較理想之特性，因為其不含酸、硫、芳族物或其他不合需要之雜質。

在一些較佳實施例中，燃料成分包含生物異戊二烯之衍生物。預期對源自由非基於石化之可再生資源製成之生物異戊二烯的燃料將存在顯著需求。咸信工業用戶及消費者相較以源自石化製程之異戊二烯製成之燃料組分將偏向於購買源自該等環保型來源之燃料組分。進一步咸信，用戶將願意為該等以可再生資源製成之環保型產品支付額外費用。本文所述之源自生物異戊二烯組合物之燃料組分提供可驗證為源自非基於石化之資源的益處。

在一些實施例中，燃料成分包含一或多種飽和環狀C10烴，諸如1,2-雙(異丙基)環丁烷、1,2-雙(異丙基)環丁烷、1-甲基-4-異丙基環己烷、1-甲基-3-異丙基環己烷、1-乙基-1,4-二甲基環己烷、1-乙基-1,3-二甲基環己烷、1,5-二甲基環辛烷及1,4-二甲基環辛烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種飽和環狀C15烴，諸如1,5,9-三甲基環十二烷及1,5,10-三甲基環十二烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種飽和脂族C10烴，諸如2,6-二甲基辛烷、2,7-二甲基辛烷及3,6-二甲基辛烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種飽和脂族C15烴，諸如2,6,10-三甲基十二烷、2,7,10-三甲基十二烷及3,7,10-三甲基十二烷。在

一些實施例中，燃料成分包含2-甲基丁烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的烴：1,2-雙(異丙基)環丁烷、1,2-雙(異丙基)環丁烷、1-甲基-4-異丙基環己烷、1-甲基-3-異丙基環己烷、1-乙基-1,4-二甲基環己烷、1-乙基-1,3-二甲基環己烷、1,5-二甲基環辛烷、1,4-二甲基環辛烷、1,5,9-三甲基環十二烷、1,5,10-三甲基環十二烷、2,6-二甲基辛烷、2,7-二甲基辛烷、3,6-二甲基辛烷、2,6,10-三甲基十二烷、2,7,10-三甲基十二烷、3,7,10-三甲基十二烷及2-甲基丁烷。

在一些實施例中，燃料成分包含一或多種飽和羥基化物，諸如C5醇及二醇(例如3-甲基-丁-1-醇、2-甲基-丁-1-醇及2-甲基-丁-2-醇、3-甲基-丁-1,3-二醇及2-甲基-丁-2,3-二醇)、C-10醇及二醇(例如3,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-2-醇及2,7-二甲基辛-2,7-二醇)及環狀C-10醇(例如2-(4-甲基環己基)丙-2-醇、2-(4-甲基環己基)丙-1-醇、2-(1,4-二甲基環己基)乙醇及4-乙基-1,4-二甲基環己醇)。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種飽和醚，諸如1,3-二乙氧基-3-甲基丁烷、1-乙氧基-3-甲基丁烷、1-甲氧基-2,7-二甲基辛烷及3-甲氧基-2,7-二甲基辛烷。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的異戊二烯衍生氧化物：3-甲基-丁-1-醇、2-甲基-丁-1-醇、2-甲基-丁-2-醇、3-甲基-丁-1,3-二醇、2-甲基-丁-2,3-二醇、3,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-1-醇、2,7-二甲基辛-2-醇、2,7-二甲基辛-2,7-二醇、2-(4-甲基環

己基)丙-2-醇、2-(4-甲基環己基)丙-1-醇、2-(1,4-二甲基環己基)乙醇、4-乙基-1,4-二甲基環己醇、1,3-二乙氧基-3-甲基丁烷、1-乙氧基-3-甲基丁烷、1-甲氧基-2,7-二甲基辛烷及3-甲氧基-2,7-二甲基辛烷。

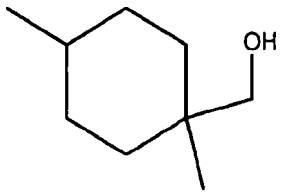
在一些實施例中，在經歷根據本文所述之任何方法及製程之步驟之後，燃料成分包含小於或約0.5 μg/L之來自非異戊二烯之C5烴的產物。在一實施例中，在經歷根據本文所述之任何方法及製程之步驟之後，燃料成分實質上不含來自非異戊二烯之C5烴的產物。在一些實施例中，以起始組合物中所有C5烴之總重量計，燃料成分包含小於或約0.2、0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001重量%之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、順-1,3-戊二烯、反-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。在一些實施例中，燃料成分包含濃度小於100、10、1、0.1或0.01 ppm之非異戊二烯之C5烴(諸如1,3-環戊二烯、反-1,3-戊二烯、順-1,3-戊二烯、1,4-戊二烯、1-戊炔、2-戊炔、1-戊烯、2-甲基-1-丁烯、3-甲基-1-丁炔、戊-4-烯-1-炔、反-戊-3-烯-1-炔或順-戊-3-烯-1-炔)。

應瞭解，在經歷本文所述之各種製程之後，本文所述之生物異戊二烯組合物中非異戊二烯之組分將轉化成不同產物。方法/製程中所用之金屬基催化劑對非異戊二烯之組

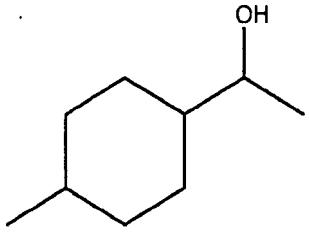
分的敏感度視此等組分之性質及含量而不同。對於熱二聚製程，將耐受較多化合物。在一些狀況下，非異戊二烯之組分將與異戊二烯反應以製造加成物，例如甲基丙烯醛及甲基乙烯基酮與異戊二烯進行狄爾斯-阿爾德反應以得到6員產物。不飽和加成物可進一步氫化成於燃料成分及組合物中存在之飽和衍生物，例如1,4-二甲基-1-(羥甲基)環己烷及1-(1-羥乙基)-4-甲基環己烷(參見流程XV)。

流程XV.源自Bioisoprene™之痕量雜質之實例

i) 經氫化之狄爾斯-阿爾德加成物

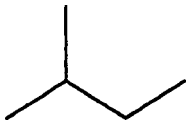


1,4-二甲基-1-(羥甲基)環己烷

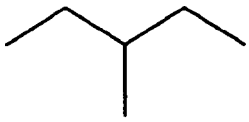


1-(1-羥乙基)-4-甲基環己烷

ii) 烷烴

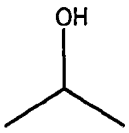


2-甲基丁烷

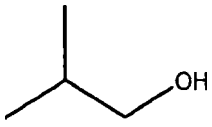


3-甲基戊烷

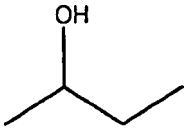
iii) 醇



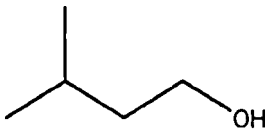
2-丙醇



2-甲基-1-丙醇

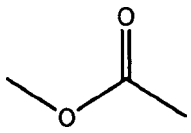


2-丁醇

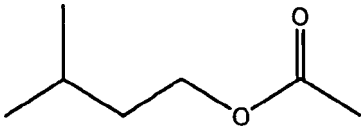


3-甲基-1-丁醇

iv) 酯



乙酸乙酯



乙酸3-甲基-1-丁酯

在一些實施例中，在經歷根據本文所述之任何方法及製程之步驟之後，燃料成分包含來自選自由以下組成之群之化合物的產物：乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物。在一些實施例中，在經歷根據本文所述之任何方法及製程之步驟之後，燃料成分包含一或多種來自一或多種選自由以下組成之群之化合物的產物：乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二烯、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)、2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的化合物：1,4-二甲基-1-(羥甲基)環己烷、1-(1-羥乙基)-4-甲基環己烷、2-甲基丁烷、3-甲基戊烷、2-丙醇、2-甲基-1-丙醇、2-丁醇、3-甲基-1-丁醇、乙酸乙酯及乙酸3-甲基-1-丁酯。

在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的化合物：1,4-二甲基-1-(羥甲基)環己烷、1-(1-羥乙基)-4-甲基環己烷、2-甲基丁烷、3-甲基戊烷、2-丙醇、2-甲基-1-丙醇、2-丁醇、3-甲基-1-丁醇、乙酸乙酯及乙酸3-甲基-1-丁酯，其含量大於或約為10 ppm、1 ppm、100 ppb、10 ppb或1 ppb。

在一些實施例中，燃料成分包含一或多種選自由以下組成之群的化合物：乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-3-甲基-1,3-戊二烯及反-3-甲基-1,3-戊二烯、C5異戊二烯醇(諸如3-甲基-3-丁烯-1-醇或3-甲基-2-丁烯-1-醇)、2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯、香葉醇(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶，其含量大於或約為10 ppm、1 ppm、100 ppb、10 ppb或1 ppb。

碳指紋分析

可基於雙重碳-同位素指紋分析將源自生物異戊二烯之

BioIsoFuel與源自石化碳之燃料相區分。另外，可藉由雙重碳-同位素指紋分析確定生物來源之碳(例如葡萄糖與甘油)的特定來源(參見美國專利第7,169,588號，其以引用的方式併入本文中)。

此方法適用於區分化學上相同之物質，且由生物圈(植物)組分生長之來源(且可能為年份)來分配產物中之碳。同位素^{14}C及^{13}C帶來關於此問題之補充資訊。核半衰期為5730年之放射性碳定年同位素(^{14}C)無疑允許在化石(「死」)原料與生物圈(「活」)原料之間分配標本碳[Currie, L. A. 「Source Apportionment of Atmospheric Particles」, Characterization of Environmental Particles, J. Buffle及H. P. van Leeuwen編，the IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series之第I卷第1部分 (Lewis Publishers, Inc) (1992) 3 74]。放射性碳定年之基本假設為大氣中^{14}C濃度恆定使得活生物體中^{14}C恆定。當處理分離之樣品時，可由以下關係近似推斷出樣品年齡：$t=(-5730/0.693)\ln(A/A_O)$(等式14)，其中t=年齡，5730年為放射性碳之半衰期，且A及A_O分別為樣品及現代標準之^{14}C放射性比度[Hsieh, Y., Soil Sci. Soc. Am J., 56, 460, (1992)]。然而，由於自1950年起已進行大氣核測試且自1850年起已燃燒化石燃料，^{14}C已獲得第二地球化學時間特徵。20世紀60年代中期，在核測試頂峰期^{14}C於大氣CO_2中且因此於活生物圈中之濃度近似翻倍。此後，濃度已逐漸返回至約1.2×10^{-12}之穩態宇宙(大氣)基線同位素比率($^{14}C/^{12}C$)，近

似鬆弛「半衰期」為7-10年。(此後一半衰期不得照字面意義理解；實際上，自核時代開始起，吾人必須使用詳細的大氣核輸入/衰變函數來追蹤大氣及生物圈^{14}C之變化。)此後一生物圈^{14}C時間特徵提出每年對最新生物圈碳進行定年之承諾。可由加速器質譜法(AMS)量測^{14}C，結果以單位「現代碳分數」(f_M)給出。f_M係由國家標準與技術研究院(National Institute of Standards and Technology，NIST)標準參考物質(Standard Reference Materials，SRM)4990B及4990C定義，分別稱為草酸標準HOxI及HOxII。基本定義涉及HOxI之$^{14}C/^{12}C$同位素比率之0.95倍(參考AD 1950)。此約等效於經衰變修正之工業革命前木材。對於當前活生物圈(植物物質)，f_M約為1.1。

穩定的碳同位素比率($^{13}C/^{12}C$)提供來源判別及分配之補充路徑。既定生物來源之物質中$^{13}C/^{12}C$之比率為在將二氧化碳固定時大氣二氧化碳中$^{13}C/^{12}C$之比率的結果，且亦反映確切代謝途徑。區域性變化亦存在。石油、C_3植物(闊葉樹)、C_4植物(草)及海相碳酸鹽在$^{13}C/^{12}C$及相應$\delta^{13}C$值方面皆顯示顯著差異。此外，分析發現C_3及C_4植物之脂質物質與源自相同植物之碳水化合物組分之物質因代謝途徑而不同。在量測精度內，^{13}C因同位素分餾效應而顯示較大變化，對本發明而言最顯著之處為光合機制。植物中碳同位素比率之差異的主要原因與植物中光合碳代謝途徑(尤其在初級羧化(亦即，初始固定大氣CO_2)期間發生之反應)之差異密切相關。兩大類植物為併有「C_3」(或Calvin-

Benson)光合循環之植物及併有「C_4」(或Hatch-Slack)光合循環之植物。諸如硬木及針葉樹之C_3植物在溫帶氣候帶占主導。在C_3植物中，初級CO_2固定或羧化反應涉及核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶，且第一穩定產物為三碳化合物。另一方面，C_4植物包括諸如熱帶草、玉米及甘蔗之植物。在C_4植物中，涉及另一種酶(磷酸烯醇-丙酮酸羧化酶)之另一羧化反應為初級羧化反應。第一穩定碳化合物為實質上脫除羧基之四碳酸。由此釋放之CO_2係由C_3循環再固定。

C_4與C_3植物均展現一定範圍之$^{13}C/^{12}C$同位素比率，但典型值為約-10至-14‰(per mil)(C_4)及-21至-26‰(C_3)[Weber等人，J. Agric. Food Chem., 45, 2942 (1997)]。煤及石油一般處於此後一範圍內。^{13}C量測標度最初由皮狄組擬箭石(pee dee belemnite，PDB)石灰石設定為零來定義，其中各值係以自此物質之千分率偏差給出。「$\delta^{13}C$」值為千分率，縮寫成‰，且計算如下(等式15)：

$$(\delta^{13}C \equiv \frac{\left(^{13}C/^{12}C\right)_{樣品} - \left(^{13}C/^{12}C\right)_{標準}}{\left(^{13}C/^{12}C\right)_{標準}} \times 100\% \text{ 等式15})$$

由於PDB參考物質(RM)已耗竭，故已與IAEA、USGS、NIST及其他所選國際同位素實驗室協同開發一系列替代性RM。自PDB之‰偏差的記號為$\delta^{13}C$。藉由高精度穩定比率質譜法(IRMS)對分子離子質量為44、45及46之CO_2進行量測。

對於源自石油精煉廠之C_5流之萃取蒸餾的異戊二烯，

$\delta^{13}C$為約-22‰至約-24‰。此範圍為源自石油之輕質不飽和烴之典型範圍，且源自基於石油之異戊二烯之產物通常含有$\delta^{13}C$相同之異戊二烯單元。由源於玉米之葡萄糖($\delta^{13}C$為-10.73‰)與最少量之其他含碳營養素(例如酵母提取物)醱酵製造之生物異戊二烯可製得異戊二烯，其可聚合成$\delta^{13}C$為-14.66‰至-14.85‰之聚異戊二烯。自該生物異戊二烯製造之產物所預期之$\delta^{13}C$值應比源自基於石油之異戊二烯之產物具有較小負值。對於源自異丁烯與甲醛的反應之異戊二烯，$\delta^{13}C$值可為約-34.4‰，此係因為甲醛常常源自具有負值大得多之$\delta^{13}C$值的原料。

用來自利用生物可再生碳源之細胞培養物的異戊二烯製成之本發明燃料及燃料成分可根據其$\delta^{13}C$值及其他燃料特徵如此加以鑑別。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的$\delta^{13}C$值大於(負值小於)-22‰。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的$\delta^{13}C$值大於-20、-18、-16、-14、-12或-10‰。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的$\delta^{13}C$值在-22至-10‰、-21至-12‰或-20至-14‰之範圍內。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的$\delta^{13}C$值在-34至-24‰、-34至-25‰、-33至-25‰、-32至-24‰、-32至-25‰、-31至-25‰、-30至-29‰、-30.0至-29.5‰、-29.5至-28.5‰或-29.0至-28.5‰之範圍內。

在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分包含放射性碳-14。在一些實施例中，$^{14}C/^{12}C$比率大於或約為

1.0×10^{-12}、1.05×10^{-12}、1.1×10^{-12}、1.15×10^{-12}或1.2×10^{-12}。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的f_M值大於或約為0.9、0.95、1.0、1.05或1.1。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的f_M值大於或約為0.9、0.95、1.0、1.05或1.1，且$\delta^{13}C$值大於(負值小於)-22‰。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的f_M值大於或約為0.9、0.95、1.0、1.05或1.1，且$\delta^{13}C$值在-22至-10‰、-21至-12‰或-20至-14‰之範圍內。在一些實施例中，源自生物異戊二烯之燃料成分的f_M值大於或約為0.9、0.95、1.0、1.05或1.1，且$\delta^{13}C$值在-34至-24‰、-34至-25‰、-33至-25‰、-32至-24‰、-32至-25‰、-31至-25‰、-30至-29‰、-30.0至-29.5‰、-29.5至-28.5‰或-29.0至-28.5‰之範圍內。

生物異戊二烯衍生物及相關BioIsoFuel、中間物及混合物可基於$^{14}C(f_M)$及雙重碳-同位素指紋分析而與其石化來源性對應物完全區分，指示新型目標組合物。

在一些實施例中，本發明之燃料成分的能量密度高於乙醇。在一些實施例中，燃料成分增進燃料(例如基於石油之燃料)之十六烷值。在一些實施例中，燃料成分減少基於石油之燃料之排放。在一些實施例中，燃料組合物之辛烷值在約80至約120之範圍內。在一些實施例中，燃料組合物之十六烷值在約30至約130之範圍內。

在一些實施例中，本發明之燃料組合物包含一或多種二甲基環辛烷化合物。在一些實施例中，本發明之燃料組合

物包含一或多種C10烴，諸如經取代之環己烷。在一些實施例中，本發明之燃料組合物包含一或多種本文所述之異戊二烯衍生氧化物。在一些實施例中，本文所述之任何燃料組合物均進一步包含基於石油之燃料，以總燃料組合物之總重量或總體積計，該基於石油之燃料之量為約1%至約95%(以重量計或體積計)。

本發明另外提供製造燃料組合物之方法，其包含獲得石油餾出物及添加本發明之燃料成分。

本發明可藉由參考以下實例而進一步加以理解，該等實例係作為說明而提供，且不欲作為限制。

實例

實例1：在表現重組野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌中製造異戊二烯

I. 構築用於在大腸桿菌中表現野葛異戊二烯合成酶之載體

野葛(山葛)異戊二烯合成酶基因(IspS)之蛋白質序列獲自GenBank(AAQ84170)。針對大腸桿菌密碼子使用最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因購自DNA2.0(SEQ ID NO:1)。藉由用*Bsp*LU11I/*Pst*I進行限制性核酸內切酶分解而自供應之質體中移出異戊二烯合成酶基因，經凝膠純化，且接合至已用*Nco*I/*Pst*I分解之pTrcHis2B(Invitrogen)中。設計構築體，使得異戊二烯合成酶基因5'之終止密碼子在*Pst*I位點之前。因此，當構築體表現時，His標籤不連接於異戊二烯合成酶蛋白。藉由定序來驗證所得質體pTrcKudzu(圖

2及圖3；SEQ ID NO:2)。

亦將異戊二烯合成酶基因選殖至pET16b(Novagen)中。在此狀況下，將異戊二烯合成酶基因插入pET16b中，使得重組異戊二烯合成酶蛋白含有N端His標籤。藉由使用引子組pET-His-Kudzu-2F：5'-CGTGAGATCATATGTGTGCGACCTCTTCTCAATTTAC(SEQ ID NO:49)及pET-His-Kudzu-R：5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG(SEQ ID NO:50)進行PCR而自pTrcKudzu擴增異戊二烯合成酶基因。分別在基因之5'末端之*Nde*I位點處及3'末端之*Bam*H1位點處添加此等引子。使用上述質體pTrcKudzu作為模板DNA，根據製造商之說明書使用Herculase聚合酶(Stratagene)，且以10 pMol之濃度添加引子。以25 μl之總體積進行PCR。用*Nde*I/*Bam*H1分解PCR產物且將其選殖至經相同酶分解之pET16b中。將接合混合物轉型至大腸桿菌Top10(Invitrogen)中且藉由定序選擇正確純系。所得質體命名為pETNHisKudzu(圖4及圖5；SEQ ID NO:51)，其中野葛異戊二烯合成酶基因自T7啟動子開始表現。

亦將野葛異戊二烯合成酶基因選殖至低複本數質體pCL1920中。使用引子自上述pTrcKudzu擴增野葛異戊二烯合成酶基因。前置引子將*Hin*dIII位點及大腸桿菌共同RBS添加至5'末端。*Pst*I選殖位點已存在於pTrcKudzu中緊鄰終止密碼子之3'處，由此構築反置引子以使得最終PCR產物包括*Pst*I位點。引子序列為：HindIII-rbs-Kudzu F：5'-CATATGAAAGCTTGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAAC

C(SEQ ID NO:51)及BamH1-Kudzu R：

5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGC TG(SEQ ID NO:50)。使用Herculase聚合酶，以濃度為10 pmol之引子及1 ng模板DNA(pTrcKudzu)擴增PCR產物。擴增方案包括30次循環(95℃下持續1分鐘，60℃下持續1分鐘，72℃下持續2分鐘)。用*Hin*dIII及*Pst*I分解產物且將其接合至亦已用*Hin*dIII及*Pst*I分解之pCL1920中。將接合混合物轉型至大腸桿菌Top10中。藉由定序檢查若干轉型體。所得質體命名為pCL-lac-Kudzu(圖6及圖7；SEQ ID NO:4)。

II. 測定異戊二烯產量

對於震盪燒瓶培養，將1 ml培養物自震盪燒瓶轉移至20 ml CTC頂部空間小瓶(Agilent小瓶目錄號5188 2753；瓶蓋目錄號5188 2759)中。將瓶蓋旋緊，且在等效溫度、以250 rpm震盪下培育小瓶。30分鐘後，自培育箱移出小瓶且如下所述進行分析(關於此檢驗之一些實驗值，參見表1)。

在測定醱酵槽中異戊二烯產量之狀況下，自醱酵槽之釋出氣體獲取樣品且如下所述直接進行分析(關於此檢驗之一些實驗值，參見表2)。

使用與CTC Analytics(Switzerland)CombiPAL自動取樣器相接且以頂部空間模式操作之Agilent 6890 GC/MS系統進行分析。使用Agilent HP-5MS GC/MS管柱(30 m×0.25 mm；0.25 μm膜厚度)分離分析物。設置取樣器以注射500 μL頂部空間氣體。GC/MS方法利用氦作為載氣，流速為1

ml/min。保持注射口在250℃下，分流比為50:1。歷經2分鐘之分析持續時間，保持烘箱溫度為37℃。以m/z為67之單離子監測(SIM)模式操作Agilent 5793N質量選擇偵測器。自1.4分鐘至1.7分鐘切斷偵測器以允許永久氣體溶離。在此等條件下，觀測到異戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)在1.78分鐘時溶離。使用校準表來定量異戊二烯之絕對量，且發現自1 μg/L至70,000 μg/L呈線性。使用此方法估算偵測限度為50至100 ng/L。

III. 在含有表現重組異戊二烯合成酶之大腸桿菌細胞之震盪燒瓶中製造異戊二烯

將上述載體引入大腸桿菌菌株BL21(Novagen)中以製造菌株BL21/ptrcKudzu、BL21/pCL-lac-Kudzu及BL21/pETHisKudzu。塗佈菌株使其分離於LA(魯利亞瓊脂(Luria agar))+羧苄青黴素(50 μg/ml)上，且在37℃下培育隔夜。將單一群落接種至含有20 ml魯利亞-貝爾塔尼培養液(LB)及羧苄青黴素(100 μg/ml)之250 ml擋板式震盪燒瓶中。在20℃、以200 rpm震盪下使培養物生長隔夜。量測隔夜培養物之OD_{600}，且將培養物稀釋至含有30 ml MagicMedia(Invitrogen)+羧苄青黴素(100 μg/ml)之250 ml擋板式震盪燒瓶中直至OD_{600}達到約0.05。在30℃、以200 rpm震盪下培育培養物。當OD_{600}為約0.5-0.8時，添加400 μM IPTG，且在30℃、以200 rpm震盪下再培育細胞6小時。在用IPTG誘導後0、2、4及6小時，收集培養物之1 ml等分試樣，測定OD_{600}，且如上所述量測所製造之異戊二烯之量。結果展示於圖8

中。

IV. 以14公升醱酵自BL21/ptrcKudzu製造異戊二烯

自批式補料培養物測定含有重組野葛異戊二烯合成酶基因之大腸桿菌大規模製造之異戊二烯。關於醱酵培養基(TM2)，每公升醱酵培養基的配方如下：K_2HPO_4 13.6 g、KH_2PO_4 13.6 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、$(NH_4)_2SO_4$ 3.2 g、酵母提取物5 g、1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水(diH_2O)中。用氫氧化鉀(KOH)將pH值調整至6.8且補足體積。用0.22 μ過濾器(僅採用過濾器，而非高壓滅菌器)對最終產物進行過濾滅菌。1000×改質痕量金屬溶液之配方如下：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg、$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22 μ過濾器進行過濾滅菌。

在14 L生物反應器中進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 6.7及溫度34℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。在大豆腺(soytone)-酵母提取物-葡萄糖培養基中製備自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株BL21/ptrcKudzu之接種體。在接種體生長至OD_{550}=0.6之後，對兩個600 ml燒瓶進行離心，且使內含物再懸浮於70 ml上清液中以將細胞顆粒(70 ml物質，OD 3.1)轉移至生物反應器中。在接種後之多個時間，移

出樣品且如上所述測定所製造之異戊二烯之量。結果展示於圖9中。

實例2：在表現重組楊屬異戊二烯合成酶之大腸桿菌中製造異戊二烯

楊屬(銀白楊與歐洲山楊雜交種)異戊二烯合成酶之蛋白質序列(Schnitzler, J-P等人，(2005) *Planta* 222:777-786)獲自GenBank(CAC35696)。針對大腸桿菌進行密碼子最佳化之基因購自DNA2.0(p9796-poplar，圖30及圖31；SEQ ID NO:14)。藉由用*Bsp*LU11I/*Pst*I進行限制性核酸內切酶分解而自供應之質體中移出異戊二烯合成酶基因，經凝膠純化，且接合至已用*Nco*I/*Pst*I分解之pTrcHis2B中。選殖構築體，使得插入物中之終止密碼子在*Pst*I位點之前，從而得到His標籤不連接於異戊二烯合成酶蛋白之構築體。藉由定序來驗證所得質體pTrcPoplar(圖32及圖33；SEQ ID NO:15)。

實例2B：證實來自若干楊屬異戊二烯合成酶之異戊二烯合成酶活性

檢查以下異戊二烯合成酶：銀白楊(寄存編號BAD98243；圖137A及B；SEQ ID NO:30)、黑楊(寄存編號CAL69918；圖137C及D；SEQ ID NO:31)、美洲山楊(寄存編號AAQ16588；圖137E、F及G；SEQ ID NO:32-33)、毛果楊(寄存編號ACD70404；圖137H及I；SEQ ID NO:34)、銀白楊與歐洲山楊雜交種(寄存編號CAJ29303；圖137J及K；SEQ ID NO:35)及MCM112-Kudzu。

pET24Kudzu(亦稱作MCM112)如下構築：將野葛異戊二烯合成酶基因自pCR2.1載體(Invitrogen)次選殖至pET24d載體(Novagen)中。使用引子MCM50 5'-GATCATGCATTCG CCCTTAGGAGGTAAAAAAACATGTGTGCGACCTCTTCTC AATTTACT(SEQ ID NO:52)及MCM53 5'-CGGTCGACGG ATCCCTGCAG TTAGACATAC ATCAGCTG(SEQ ID NO:50)自pTrcKudzu模板DNA擴增野葛IspS基因。使用Taq DNA聚合酶(Invitrogen)進行PCR反應，將所得PCR產物選殖至pCR2.1-TOPO TA選殖載體(Invitrogen)中，且轉型至大腸桿菌Top10化學性勝任細胞(Invitrogen)中。將轉型體塗於含有羧苄青黴素(50 μg/ml)之L瓊脂上，且在37℃下培育隔夜。用單一轉型體接種含有50 μg/ml羧苄青黴素之5 ml魯利亞培養液培養物，且在37℃下生長隔夜。藉由對自1 ml液體培養物(魯利亞培養液)分離之質體DNA進行定序而針對正確插入物篩選五個群落，且使用QIAprep Spin Miniprep套組(Qiagen)進行純化。命名為MCM93之所得質體於pCR2.1骨架中含有野葛IspS編碼序列(圖137L)。MCM93之序列(SEQ ID NO:36)展示於圖137M及N中。

藉由用*Pci*I及*Bam*H1(Roche)進行限制性核酸內切酶分解來移出野葛編碼序列，且使用QIAquick凝膠萃取套組(Qiagen)進行凝膠純化。用*Nco*I及*Bam*HI(Roche)分解pET24d載體DNA，用蝦鹼性磷酸酶(Roche)處理，且使用QIAprep Spin Miniprep套組(Qiagen)進行純化。使用快速DNA接合套組(Roche)將野葛IspS片段接合於經

*Nco*I/*Bam*H1分解之pET24d，片段與載體之比率為5:1，總體積為20 μl。將一部分接合混合物(5 μl)轉型至大腸桿菌Top 10化學性勝任細胞中，且塗於含有康黴素(50 μg/ml)之L瓊脂上。藉由定序確認正確轉型體，且將其轉型至化學性勝任BL21(λDE3)pLysS細胞(Novagen)中。在37℃下生長隔夜後，於含有康黴素(50 μg/ml)之L瓊脂上選擇單一群落。命名為pET24D-Kudzu之所得質體之圖譜展示於圖137O中。pET24D-Kudzu之序列(SEQ ID NO:37)展示於圖137P及Q中。

對於美洲山楊、銀白楊、黑楊及毛果楊，選殖至pET24a表現載體(Novagen)中之針對大腸桿菌最佳化之異戊二烯合成酶基因係購自DNA2.0(Menlo Park, CA)。合成葉綠體轉運肽序列經移除之基因，從而表現成熟蛋白。

野葛異戊二烯合成酶之構築體在此實例中用作對照。將質體轉型至大腸桿菌表現宿主BL21(DE3)plysS中，且使轉型體於0.6 ml TM3培養基中生長。TM3培養基之配方如下：K_2HPO_4(13.6 g/l)、KH_2PO_4(13.6 g/l)、$MgSO_4*7H_2O$(2 g/L)、單水合檸檬酸(2 g/L)、檸檬酸鐵銨(0.3 g/L)、$(NH_4)_2SO_4$(3.2 g/L)、酵母提取物(0.2 g/L)、1 ml 1000×痕量元素溶液，用氫氧化銨將pH值調整至6.8，用無菌去離子水補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。1000×痕量元素溶液之配方如下：單水合檸檬酸(40 g/L)、$MnSO_4*H_2O$(30 g/L)、NaCl(10 g/L)、$FeSO_4*7H_2O$(1 g/L)、$CoCl_2*\cdot 6H_2O$(1 g/L)、$ZnSO_4*7H_2O$(1 g/L)、$CuSO_4*5H_2O$(100

mg/L)、H_3BO_3(100 mg/L)、$NaMoO_4*2H_2O$(100 mg/L)。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

用400 μM IPTG誘導培養物，且繼續生長至OD_{600}為約5。將培養物之等分試樣轉移至深孔玻璃板中，且用鋁板密封件將孔密封。在25℃、以450 rpm震盪下培育該板30分鐘。藉由將溫度升至70℃，持續5分鐘而使反應熱滅活。藉由如實例1部分II中所述之GCMS方法量測全細胞頂部空間氣體。

自以類似方式生長之培養物獲得K_m值，但收集細胞且由冷凍/解凍溶菌酶方案溶解。將體積為400 μL之培養物轉移至新的96孔板(Perkin Elmer，目錄號6008290)中，且藉由於Beckman Coulter Allegra 6R離心機中以2500×g離心來收集細胞。將顆粒再懸浮於200 mL低滲緩衝液(5 mM $MgCl_2$，5 mM Tris HCl，5 mM DTT，pH 8.0)中，且在-80℃下將該板冷凍最少60分鐘時間。藉由解凍該板且添加32 mL異戊二烯合成酶DMAPP檢驗緩衝液(57 mM Tris HCl、19 mM $MgCl_2$、74 mg/mL DNase I(Sigma，目錄號DN-25)、2.63×10^5 U/mL ReadyLyse溶菌酶溶液(Epicentre，目錄號R1802M)及5 mg/mL分子生物級BSA)來製備細胞溶菌液。在25℃、震盪下將板培育30分鐘，接著置於冰上。將DMAPP及溶菌液以所要濃度添加至密封深孔玻璃磚中以進行上文所述之全細胞頂部空間氣體檢驗。使反應進行1小時，接著由上文所述之加熱步驟而終止，

且亦如所述量測頂部空間氣體活性。

在一替代方法中，自以25 mL體積培養且如上所述以類似方式誘導之細胞量測酶活性。藉由離心收集細胞，且藉由在由50%甘油以1:1與20 mM Tris/HCl(pH 7.4)、20 mM $MgCl_2$、200 mM KCl、1 mM DTT混合而組成之緩衝液中進行弗氏壓碎(French press)來溶解顆粒。在含有75 μL檢驗緩衝液(66.6 mM Tris/HCl(pH 8)、6.66 mM DMAPP、43 mM $MgCl_2$)之2 mL螺旋蓋小瓶中檢驗體積為25 μL之溶菌液的異戊二烯合成酶活性。在30℃下培育反應物15分鐘，且藉由經小瓶隔板添加100 μL 250 mM EDTA而淬滅。藉由如實例1部分II中所述之GC/MS來量測異戊二烯。

所有測定活性之方法均顯示源自純種楊之楊屬酶比楊屬[銀白楊與歐洲山楊雜交種]高數倍。圖138及圖139分別展示全細胞頂部空間氣體檢驗及DMAPP檢驗之此等結果，且令人驚訝地指示來自黑楊(*P. nigra*)、美洲山楊(*P. tremuloides*)、毛果楊(*P. trichocarpa*)及銀白楊(*P. alba*)之酶的活性皆顯著高於雜交體[銀白楊與歐洲山楊雜交種]。

DMAPP檢驗如下進行：將體積為400 μL之培養物轉移至新的96孔板(Perkin Elmer，目錄號6008290)中，且藉由於Beckman Coulter Allegra 6R離心機中以2500×g離心來收集細胞。將顆粒再懸浮於200 mL低滲緩衝液(5 mM $MgCl_2$，5 mM Tris HCl，5 mM DTT，pH 8.0)中，且在-80℃下將該板冷凍最少60分鐘時間。藉由解凍該板且添加32 mL異戊二烯合成酶DMAPP檢驗緩衝液(57 mM Tris HCl、19 mM

$MgCl_2$、74 mg/mL DNase I(Sigma，目錄號DN-25)、2.63×10^5 U/mL ReadyLyse溶菌酶溶液(Epicentre，目錄號R1802M)及5 mg/mL分子生物級BSA)來製備細胞溶菌液。在25℃、震盪下將板培育30分鐘，接著置於冰上。為製造異戊二烯，將80 mL溶菌液等分試樣轉移至96孔深孔玻璃板(Zinsser，目錄號3600600)中，且添加10 mM DMAPP於100 mM $KHPO_4$(pH 8.2)(Cayman Chemical，目錄號63180)中之20 mL溶液。用鋁板密封件(Beckman Coultor，目錄號538619)密封該板，且在30℃、震盪下培育60分鐘。藉由加熱玻璃磚(70℃下持續5分鐘)來終止酶促反應。如實例1部分II中所述定量分析各孔之細胞頂部空間氣體。

銀白楊、美洲山楊、毛果楊之異戊二烯合成酶活性顯著高於野葛。在所有測試酶中，來自銀白楊之酶以最高活性表現。與全細胞頂部空間氣體檢驗相比，以細胞溶菌液所觀測到之較高活性可能歸因於DMAPP方面的限制，DMAPP為此等酶之受質，由細胞之內源去氧木酮糖5-磷酸(DXP)途徑傳遞。

K_m動力學參數對於測定該值之所有酶而言經量測為約2至3 mM。

實例3：在表現重組野葛異戊二烯合成酶之檸檬泛菌中製造異戊二烯

將實例1所述之pTrcKudzu及pCL-lac Kudzu質體電穿孔至檸檬泛菌中(美國專利第7,241,587號)。分別在含有羧苄青黴素(200 μg/ml)或壯觀黴素(spectinomycin)(50 μg/ml)之

LA上選擇轉型體。如實例1中針對表現重組野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌菌株所述，自震盪燒瓶製造異戊二烯且測定所製造之異戊二烯之量。結果展示於圖10中。

實例4：在表現重組野葛異戊二烯合成酶之枯草桿菌中製造異戊二烯

I. 構築供野葛異戊二烯合成酶表現用之枯草桿菌複製質體

在*aprE*啟動子控制下，使用複製質體(具有氯黴素抗性卡匣之pBS19)於枯草桿菌*aprEnprE Pxyl-comK*菌株(BG3594comK)中表現野葛異戊二烯合成酶基因。使用PCR獨立地擴增異戊二烯合成酶基因、*aprE*啟動子及轉錄終止子，且將其融合。接著將構築體選殖至pBS19中且轉型至枯草桿菌中。

a) 擴增*aprE*啟動子

使用以下引子自枯草桿菌之染色體DNA擴增*aprE*啟動子：

*aprE*啟動子MfeI之CF 797 (+)起始端

5'- GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC (SEQ ID NO:53)

CF 07-43 (-)融合*aprE*啟動子與野葛ispS

5'- ATTGAGAAGAGGTCGCACACACTCTTTACCCTCTCCTTTTA (SEQ ID NO:54)

b) 擴增異戊二烯合成酶基因

自質體pTrcKudzu(SEQ ID NO:2)擴增野葛異戊二烯合成酶基因。該基因已針對大腸桿菌進行密碼子最佳化且由DNA 2.0合成。使用以下引子：

CF 07-42 (+)融合aprE啟動子與野葛異戊二烯合成酶基因(GTG起始密碼子)

5'- TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCAAT (SEQ ID NO:55)

CF 07-45 (-)融合野葛異戊二烯合成酶基因之3'末端與終止子

5'- CCAAGGCCGGTTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID NO:56)

c) 擴增轉錄終止子

使用以下引子，自先前定序之質體pJHPms382擴增解澱粉桿菌(*Bacillus amyliquefaciens*)的鹼性絲胺酸蛋白酶之終止子。

CF 07-44 (+)融合野葛異戊二烯合成酶之3'末端與終止子

5'- GATTAACCAGCTGATGTATGTCTAAAAAAAACCGGCCTTGG (SEQ ID NO:57)

解澱粉桿菌終止子(BamHI)之CF 07-46 (-)末端

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:58)

使用PCR，用以下引子將野葛片段與終止子片段融合：

CF 07-42 (+)融合*aprE*啟動子與野葛異戊二烯合成酶基因(GTG起始密碼子)

5'- TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCAAT (SEQ ID NO:55)

解澱粉桿菌終止子(BamHI)之CF 07-46 (-)末端

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:58)

使用PCR，用以下引子將野葛終止子片段與啟動子片段融合：

*aprE*啟動子MfeI之CF 797 (+)起始端

5'- GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC (SEQ ID NO:53)

解澱粉桿菌終止子(BamHI)之CF 07-46 (-)末端

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:58)

使用Qiagen套組純化融合PCR片段，且用限制性酶*Mfe*I及*Bam*HI分解。使用Qiagen套組對此經分解之DNA片段進行凝膠純化，且接合至已用*Eco*RI及*Bam*HI分解且經凝膠純化之載體(稱為pBS19)。

將接合混合物轉型至大腸桿菌Top 10細胞中，且在LA+50羧苄青黴素板上選擇群落。選擇總共六個群落，且在LB+50羧苄青黴素中生長隔夜，接著使用Qiagen套組分離質體。用*Eco*RI及*Bam*HI分解該等質體以檢查插入物，且遞呈三個正確質體以供以下引子定序：

*aprE*啟動子之CF 149 (+) EcoRI起始端

5'- GACATGAATTCCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:59)

pXX 049中之CF 847 (+)序列(*aprE*啟動子之末端)

5'- AGGAGAGGGTAAAGAGTGAG (SEQ ID NO:60)

CF 07-45 (-)融合野葛異戊二烯合成酶之3'末端與終止子

5'- CCAAGGCCGGTTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID NO:56)

野葛異戊二烯合成酶之CF 07-48 (+)定序引子

5'- CTTTTCCATCACCCACCTGAAG (SEQ ID NO:61)

野葛異戊二烯合成酶中之CF 07-49 (+)定序引子

5'- GGCGAAATGGTCCAACAACAAAATTATC (SEQ ID NO:62)

藉由定序判定命名為pBS Kudzu #2之質體(圖52及圖12；SEQ ID NO:5)為正確的，且將其轉型至BG 3594 comK(一種枯草桿菌宿主菌株)中。在LA+5氯黴素板上進行選擇。轉型體在LA+5氯黴素上選擇且導向單一群落，

接著於LB+5氯黴素中生長直至其OD_{600}達到1.5為止。在-80℃下，於甘油存在下，將其冷凍儲存於小瓶中。所得菌株命名為CF 443。

II. 在含有表現重組異戊二烯合成酶之枯草桿菌細胞之震盪燒瓶中製造異戊二烯

用來自LA+氯黴素(Cm，25 μg/ml)之CF 443之單一群落接種隔夜培養物。在37℃、以200 rpm震盪下，使培養物於LB+Cm中生長。使用此等隔夜培養物(1 ml)接種含有25 ml Grants II培養基及氯黴素之250 ml擋板式震盪燒瓶，最終濃度為25 μg/ml。Grants II培養基配方為10 g大豆腖、3 ml 1 M K_2HPO_4、75 g葡萄糖、3.6 g尿素、100 ml 10×MOPS，用H_2O補足至1 L，pH 7.2；10×MOPS配方為83.72 g MOPS、7.17 g三(羥甲基)甲基甘胺酸(tricine)、12 g KOH顆粒、10 ml 0.276 M K_2SO_4溶液、10 ml 0.528 M $MgCl_2$溶液、29.22 g NaCl、100 ml 100×微量營養素，用H_2O補足至1 L；且100×微量營養素配方為1.47 g $CaCl_2*2H_2O$、0.4 g $FeSO_4*7H_2O$、0.1 g $MnSO_4*H_2O$、0.1 g $ZnSO_4*H_2O$、0.05 g $CuCl_2*2H_2O$、0.1 g $CoCl_2*6H_2O$、0.1 g $Na_2MoO_4*2H_2O$，用H_2O補足至1 L。在37℃下培育震盪燒瓶，且在18、24及44小時獲取樣品。在18小時，對CF443及對照菌株之頂部空間氣體進行取樣。此表示異戊二烯之18小時積累情況。如實例1所述，藉由氣相層析測定異戊二烯之量。異戊二烯產量藉由表現重組異戊二烯合成酶而顯著提高(圖11)。

III. 以14 L醱酵由CF443製造異戊二烯

自批式補料培養物測定於複製質體上含有重組野葛異戊二烯合成酶基因之枯草桿菌大規模製造之異戊二烯。藉由在含有大豆粉(Cargill)、磷酸鈉及磷酸鉀、硫酸鎂、及檸檬酸、氯化鐵及氯化錳之溶液的營養素培養基中進行習知批式補料醱酵來培養表現野葛異戊二烯合成酶基因之桿菌菌株CF 443或不表現野葛異戊二烯合成酶基因之對照菌株。在醱酵之前，使用包括纖維素酶、半纖維素酶及果膠酶之酶混合物浸漬培養基90分鐘(參見WO 95/04134)。用60% wt/wt葡萄糖(Cargill DE99右旋糖、ADM Versadex greens或Danisco轉化糖)及99% wt/wt油(Western Family大豆油，其中99% wt/wt為添加至細胞培養基中之前油的濃度)對14 L分批醱酵進行補料。當批料中之葡萄糖不可偵測時，開始補料。補料速率經數小時均勻變化，且加以調整以在等碳基礎上添加油。使用28% w/v氫氧化銨將pH值控制在6.8-7.4。在起泡之狀況下，將消泡劑添加至培養基中。將醱酵溫度控制在37℃且以750 rpm攪動醱酵培養物。在整個過程中監測多個其他參數，諸如pH值、DO%、氣流及壓力。維持DO%高於20。經36小時時程獲取樣品且分析細胞生長(OD_{550})及異戊二烯產量。此等實驗之結果呈現於圖53A及圖53B中。

IV. 將野葛異戊二烯合成酶(ispS)整合於枯草桿菌中

在*aprE*啟動子控制下，將野葛異戊二烯合成酶基因選殖於整合質體(pJH101-cmpR)中。在測試條件下，未偵測到

異戊二烯。

實例5：在木黴屬中製造異戊二烯

I. 構築用於在里氏木黴中表現野葛異戊二烯合成酶之載體

由DNA 2.0合成針對解脂耶氏酵母進行密碼子最佳化之野葛IS基因(SEQ ID NO:6)(圖13)。此質體充當以下PCR擴增反應之模板：1 μl質體模板(20 ng/μl)、1 μl引子EL-945(10 μM)5'-GCTTATGGATCCTCTAGACTATTACACGTACATCAATTGG(SEQ ID NO:63)、1 μl引子EL-965(10 μM)5'-CACCATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTTAC(SEQ ID NO:64)、1 μl dNTP(10 mM)、5 μl 10×PfuUltra II融合HS DNA聚合酶緩衝液、1 μl PfuUltra II融合HS DNA聚合酶、40 μl水，總反應體積為50 μl。前置引子之5'末端含有其他4個核苷酸，其不對應於針對解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*)進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因，但為選殖至pENTR/D-TOPO載體中所必需。反置引子之5'末端含有其他21個核苷酸，其不對應於針對解脂耶氏酵母進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因，但經插入以供選殖至其他載體骨架中。使用MJ Research PTC-200溫度循環器，如下進行PCR反應：95℃下持續2分鐘(僅第一次循環)、95℃下持續30秒、55℃下持續30秒、72℃下持續30秒(重複27次循環)、最後一次循環後於72℃下持續1分鐘。在1.2% E-gel上分析PCR產物以確認針對解脂耶氏酵母進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因成功擴增。

接著遵循製造商之方案，使用以下TOPO pENTR/D-TOPO選殖套組選殖PCR產物：1 μl PCR反應物、1 μl鹽溶液、1 μl TOPO pENTR/D-TOPO載體及3 μl水，總反應體積為6 μl。在室溫下培育反應物5分鐘。將1微升TOPO反應物轉型至TOP10化學性勝任大腸桿菌細胞中。在LA+50 μg/ml康黴素板上選擇轉型體。揀選數個群落，且將各群落接種至含有LB+50 μg/ml康黴素之5 ml管中，且在37℃、以200 rpm震盪下使培養物生長隔夜。遵循製造商之方案，使用QIAprep Spin Miniprep套組自隔夜培養管中分離質體。對數個質體進行定序以驗證DNA序列為正確的。

編碼針對解脂耶氏酵母進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因之單一pENTR/D-TOPO質體用於Gateway選殖至定製pTrex3g載體中。pTrex3g之構築描述於WO 2005/001036 A2中。遵循製造商關於Gateway LR Clonase II酶混合套組(Invitrogen)之方案進行反應：1 μl針對解脂耶氏酵母進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因pENTR/D-TOPO供體載體、1 μl pTrex3g 目的載體、6 μl TE緩衝液，pH 8.0，總反應體積為8 μl。在室溫下培育反應物1小時，接著添加1 μl蛋白酶K溶液，且在37℃下繼續培育10分鐘。接著將1 μl反應物轉型至TOP10化學性勝任大腸桿菌細胞中。在LA+50 μg/ml羧苄青黴素板上選擇轉型體。揀選數個群落，且將各群落接種至含有LB+50 μg/ml羧苄青黴素之5 ml管中，且在37℃、以200 rpm震盪下使培養物生長隔夜。遵循製造商之方案，使用QIAprep

Spin Miniprep套組(Qiagen, Inc.)自隔夜培養管中分離質體。對數個質體進行定序以驗證DNA序列為正確的。

使用基因槍PDS-1000/HE粒子傳遞系統將針對解脂耶氏酵母進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶pTrex3g質體(圖14)以基因槍技術轉型至四重缺失之里氏木黴菌株中(參見WO 2005/001036 A2)。使用專利公開案WO 2005/001036 A2之實例11中所列之方案來分離穩定轉型體及評估震盪燒瓶。

II. 在重組里氏木黴菌株中製造異戊二烯

將上述異戊二烯合成酶轉型體之1 ml老培養物(15小時及36小時)轉移至頂部空間小瓶中。密封小瓶且在30℃下培育5小時。量測頂部空間氣體且由實例1所述之方法鑑別異戊二烯。兩個轉型體顯示痕量異戊二烯。可藉由培育14小時來增加異戊二烯之量。兩個陽性樣品顯示歷經14小時培育，異戊二烯之含量為約0.5 μg/L。未轉型之對照顯示異戊二烯之含量不可偵測。此實驗顯示當向里氏木黴供給外源異戊二烯合成酶時，其能夠自內源前驅物製造異戊二烯。

實例6：在耶氏酵母屬中製造異戊二烯

I. 構築用於在解脂耶氏酵母中表現野葛異戊二烯合成酶之載體

構築用於在解脂耶氏酵母中表現野葛異戊二烯合成酶基因之載體的起點為載體pSPZ1(MAP29Spb)。此載體之完整序列(SEQ ID NO:7)展示於圖15中。

藉由使用解脂耶氏酵母菌株GICC 120285之染色體DNA作為模板進行PCR來擴增以下片段：無啟動子形式之URA3基因、18S核糖體RNA基因之片段、解脂耶氏酵母XPR2基因之轉錄終止子，及兩個含有XPR2及ICL1基因之啟動子的DNA片段。使用以下PCR引子：

ICL1 3

5'- GGTGAATTCAGTCTACTGGGGATTCCCAAATCTATATATACTGCAGGTGAC (SEQ ID NO:65)

ICL1 5

5'- GCAGGTGGGAAACTATGCACTCC (SEQ ID NO:66)

XPR 3

5'- CCTGAATTCTGTTGGATTGGAGGATTGGATAGTGGG (SEQ ID NO:67)

XPR 5

5'- GGTGTCGACGTACGGTCGAGCTTATTGACC (SEQ ID NO:68)

XPRT3

5'- GGTGGGCCCGCATTTTGCCACCTACAAGCCAG (SEQ ID NO:69)

XPRT 5

5'- GGTGAATTCTAGAGGATCCCAACGCTGTTGCCTACAACGG (SEQ ID NO:70)

Y18S3

5'- GGTGCGGCCGCTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCCG (SEQ ID NO:71)

Y18S 5

5'- GGTGGGCCCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAG (SEQ ID NO:72)

YURA3

5'- GGTGACCAGCAAGTCCATGGGTGGTTTGATCATGG (SEQ ID NO:73)

YURA 50

5'- GGTGCGGCCGCCTTTGGAGTACGACTCCAACTATG (SEQ ID NO:74)

YURA 51

5'- GCGGCCGCAGACTAAATTTATTTCAGTCTCC (SEQ ID NO:75)

對於PCR擴增，按照製造商之說明書使用PfuUltraII聚合酶(Stratagene)、供應商提供之緩衝液及dNTP、2.5 μM引子及指定模板DNA。使用以下循環進行擴增：95℃下持續1分鐘；34次(95℃下持續30秒；55℃下持續30秒；72℃下持續3分鐘)；及72℃下持續10分鐘，接著在4℃下培育。

由DNA 2.0獲得編碼針對耶氏酵母中之表現進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因的合成DNA分子(圖16；SEQ ID NO:8)。在XPR2及ICL1啟動子控制下載運合成野葛異戊二烯合成酶基因之質體pYLA(KZ1)及pYLI(KZ1)之構築流程的全部細節分別呈現於圖18中。亦構築對照質體，其中插入交配因子基因(MAP29)來替代異戊二烯合成酶基因(圖18E及圖18F)。

可使用類似選殖程序表現楊屬(銀白楊與歐洲山楊雜交種)異戊二烯合成酶基因。楊屬異戊二烯之序列描述於Miller B.等人(2001) *Planta* 213, 483-487中，且展示於圖17中(SEQ ID NO:9)。產生在XPR2及ICL1啟動子控制下載運合成楊屬異戊二烯合成酶基因之質體pYLA(POP1)及pYLI(POP1)的構築流程分別呈現於圖18A及圖18B中。

II. 由重組解脂耶氏酵母菌株製造異戊二烯

用*Sac*II分解載體pYLA(KZ1)、pYLI(KZ1)、pYLA(MAP29)及pYLI(MAP29)，且使用該等載體藉由標準乙酸

鋰/聚乙二醇程序將解脂耶氏酵母菌株CLIB 122轉型成尿苷原養型(uridine prototrophy)。簡言之，藉由離心(4000 rpm，10分鐘)收集於YEPD(1%酵母提取物、2%蛋白腖、2%葡萄糖)中生長隔夜之酵母細胞，用無菌水洗滌一次，且懸浮於0.1 M乙酸鋰(pH 6.0)中。將細胞懸浮液之200 μl等分試樣與線性化質體DNA溶液(10-20 μg)混合，在室溫下培育10分鐘，且於相同緩衝液中與1 ml 50% PEG 4000混合。在室溫下再培育懸浮液1小時，接著在42℃下熱休克2分鐘。接著將細胞塗於SC his leu板(0.67%酵母氮源、2%葡萄糖、各100 mg/L之白胺酸及組胺酸)上。在30℃下培育3-4天後，出現轉型體。

在30℃、震盪下，使三個來自pYLA(KZ1)轉型之分離物、三個來自pYLI(KZ1)轉型之分離物、兩個來自pYLA(MAP29)轉型之分離物及兩個來自pYLI(MAP29)轉型之分離物於YEP7培養基(1%酵母提取物、2%蛋白腖，pH 7.0)中生長24小時。藉由離心自10 ml培養物中收集細胞，再懸浮於3 ml新鮮YEP7中，且置於15 ml螺旋蓋小瓶中。在室溫、平緩(60 rpm)震盪下，培育小瓶隔夜。如實例1所述，藉由氣相層析，使用質譜偵測器來分析此等小瓶之頂部空間氣體中之異戊二烯含量。以pYLA(KZ1)及pYLI(KZ1)獲得之所有轉型體皆製造可易於偵測之量的異戊二烯(0.5 μg/L至1 μg/L，圖20)。在載運植酸酶基因而非異戊二烯合成酶基因之對照菌株的頂部空間氣體中未偵測到異戊二烯。

實例7：在表現野葛異戊二烯合成酶及*idi*、或*dxs*、或*idi*與*dxs*之大腸桿菌中製造異戊二烯

I. 構築編碼野葛異戊二烯合成酶及*idi*、或*dxs*、或*idi*與*dxs*之載體以供在大腸桿菌中製造異戊二烯

i)構築pTrcKudzuKan

用賦予康黴素抗性之基因置換pTrcKudzu(實例1所述)之*bla*基因。為移除*bla*基因，用*Bsp*HI分解pTrcKudzu，用蝦鹼性磷酸酶(SAP)處理，在65℃下熱滅活，接著用Klenow片段及dNTP填補末端。由瓊脂糖凝膠純化5 kbp大片段，且使用引子MCM22 5'-GATCAAGCTTAACCGGAATTGCCAGCTG(SEQ ID NO:76)及MCM23 5'-GATCCGATCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC(SEQ ID NO:77)將該片段接合於已自pCR-Blunt-II-TOPO進行PCR擴增之kan^{r}基因，用*Hin*dIII及*Pvu*I分解，且填補末端。在含有50 μg/ml康黴素之LA上選擇載運賦予康黴素抗性之質體(pTrcKudzuKan)的轉型體。

ii)構築pTrcKudzu yIDI Kan

用*Pst*I分解pTrcKudzuKan，用SAP處理，進行熱滅活及凝膠純化。用合成RBS將其接合於編碼來自釀酒酵母之*idi*的PCR產物。PCR之引子為NsiI-YIDI 1 F 5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAAAATGAC(SEQ ID NO:78)及PstI-YIDI 1 R 5'-CCTTCTGCAGGACGCGTTGTTATAGC(SEQ ID NO:79)；且模板為釀酒酵母基因組DNA。PCR產物在接合之前用*Nsi*I及*Pst*I分解且經凝膠純化。將接合混

合物轉型至化學性勝任TOP10細胞中，且在含有50 μg/ml康黴素之LA上進行選擇。分離數個轉型體且定序，所得質體稱為pTrcKudzu-yIDI(kan)(圖34及圖35；SEQ ID NO:16)。

iii)構築pTrcKudzu DXS Kan

用*Pst*I分解質體pTrcKudzuKan，用SAP處理，進行熱滅活及凝膠純化。用合成RBS將其接合於編碼來自大腸桿菌之*dxs*的PCR產物。PCR之引子為MCM13 5'-GATCATGCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAACATGAGTTTTGATATTGCCAAATACCCG(SEQ ID NO:80)及MCM14 5'-CATGCTGCAGTTATGCCAGCCAGGCCTTGAT(SEQ ID NO:81)；且模板為大腸桿菌基因組DNA。PCR產物在接合之前用*Nsi*I及*Pst*I分解且經凝膠純化。將所得轉型反應物轉型至TOP10細胞中，且在含有50 μg/ml康黴素之LA上進行選擇。分離數個轉型體且定序，所得質體稱為pTrcKudzu-DXS(kan)(圖36及圖37；SEQ ID NO:17)。

iv)構築pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan)

用*Pst*I分解pTrcKudzu-yIDI(kan)，用SAP處理，進行熱滅活及凝膠純化。用合成RBS將其接合於編碼大腸桿菌*dxs*之PCR產物(引子MCM13 5'-GATCATGCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAACATGAGTTTTGATATTGCCAAATACCCG(SEQ ID NO:80)及MCM14 5'-CATGCTGCAGTTATGCCAGCCAGGCCTTGAT(SEQ ID NO:81)；模板TOP10細胞)，該PCR產物已用*Nsi*I及*Pst*I分解且經凝膠純化。最終質體稱

為 pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan)(圖 21 及圖 22；SEQ ID NO:10)。

v)構築 pCL PtrcKudzu

使用 *Ssp*I 自 pTrcKudzu 分解來自上述實例 1 之含有啟動子、結構基因及終止子之 DNA 片段，且進行凝膠純化。將其接合於已用 *Pvu*II 分解、用 SAP 處理且經熱滅活之 pCL1920。將所得接合混合物轉型至 TOP10 細胞中，且在含有 50 μg/ml 壯觀黴素之 LA 中進行選擇。分離數個純系且定序，且選擇其中兩者。pCL PtrcKudzu 及 pCL PtrcKudzu (A3)具有相反定向之插入物(圖 38-41；SEQ ID NO:18-19)。

vi)構築 pCL PtrcKudzu yIDI

將上述(ii)之經 *Nsi*I-*Pst*I 分解、經凝膠純化之 IDI PCR 擴增子接合至已用 *Pst*I 分解、用 SAP 處理且經熱滅活之 pCL PtrcKudzu 中。將接合混合物轉型至 TOP10 細胞中，且在含有 50 μg/ml 壯觀黴素之 LA 中進行選擇。分離數個純系且定序，所得質體稱為 pCL PtrcKudzu yIDI(圖 42 及圖 43；SEQ ID NO:20)。

vii)構築 pCL PtrcKudzu DXS

將上述(iii)之經 *Nsi*I-*Pst*I 分解、經凝膠純化之 DXS PCR 擴增子接合至已用 *Pst*I 分解、用 SAP 處理且經熱滅活之 pCL PtrcKudzu (A3)中。將接合混合物轉型至 TOP10 細胞中，且在含有 50 μg/ml 壯觀黴素之 LA 中進行選擇。分離數個純系且定序，所得質體稱為 pCL PtrcKudzu DXS(圖 44 及圖

45；SEQ ID NO:21)。

II. 量測在不同複本數下表現野葛異戊二烯合成酶、*idi*及/或*dxs*之培養物的頂部空間氣體中之異戊二烯

使先前經質體pTrcKudzu(kan)(A)、pTrcKudzu-yIDI kan(B)、pTrcKudzu-DXS kan(C)、pTrcKudzu-yIDI-DXS kan(D)轉型之大腸桿菌BL21(λDE3)之培養物於LB+50 μg/ml康黴素中生長。使pCL PtrcKudzu(E)、pCL PtrcKudzu、pCL PtrcKudzu-yIDI(F)及pCL PtrcKudzu-DXS(G)之培養物於LB及50 μg/ml壯觀黴素中生長。在0時(OD_{600}為約0.5)用400 μM IPTG誘導培養物，且獲取樣品以供量測頂部空間氣體中之異戊二烯(參見實例1)。結果展示於圖23A-23G中。

藉由轉型將質體pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan)引入大腸桿菌菌株BL21中。在20℃下使所得菌株BL21/pTrc Kudzu IDI DXS於含有康黴素(50 μg/ml)之LB中生長隔夜，且用於接種含有1%葡萄糖之TM3(13.6 g K_2PO_4、13.6 g KH_2PO_4、2.0 g $MgSO_4*7H_2O$、2.0 g單水合檸檬酸、0.3 g檸檬酸鐵銨、3.2 g $(NH_4)_2SO_4$、0.2 g酵母提取物、1.0 ml 1000×改質痕量金屬溶液，調整至pH 6.8且用H_2O補足，且經過濾滅菌)之震盪燒瓶。在30℃下培育該等燒瓶直至OD_{600}達到0.8為止，接著用400 μM IPTG進行誘導。在誘導後之多個時間獲取樣品，且如實例1所述量測頂部空間氣體中異戊二烯之量。結果展示於圖23H中。

III. 在大腸桿菌/pTrcKudzu yIDI DXS中自生質製造異戊

二烯

測試菌株BL21 pTrcKudzuIDIDXS自三種類型之生質(甜菜渣、玉米乾草及軟木漿)產生異戊二烯之能力，使用葡萄糖作為對照。藉由酶促水解製備生質之水解產物(Brown, L及Torget, R., 1996, NREL standard assay method Lap-009「Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass」)，且在基於葡萄糖當量稀釋下使用。在此實例中，葡萄糖當量等於1%葡萄糖。使用來自BL21 (DE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan)之板新鮮轉型細胞之單一群落接種5 ml LB+康黴素(50 μg/ml)。在25℃、震盪下培育培養物隔夜。次日，於25 ml TM3+0.2% YE+1%原料中將隔夜培養物稀釋至OD_{600}為0.05。原料為玉米乾草、甜菜渣或軟木漿。使用葡萄糖作為陽性對照，且不使用葡萄糖作為陰性對照。在30℃、以180 rpm震盪下培育培養物。監測培養物之OD_{600}，且當其OD_{600}達到約0.8時，在1小時及3小時如實例1所述分析培養物之異戊二烯產量。培養物未經誘導。含有所添加之原料的所有培養物所製造之異戊二烯均等同於葡萄糖陽性對照之情況。實驗一式兩份進行且展示於圖46中。

IV. 在大腸桿菌/pTrcKudzuIDIDXS中自轉化糖製造異戊二烯

使用來自BL21 (λDE3)/pTrcKudzu yIDI DXS (kan)之板新鮮轉型細胞之單一群落接種5 ml LB+康黴素(50 μg/ml)。在25℃、震盪下培育培養物隔夜。次日，於25 ml

TM3+0.2% YE+1%原料中將隔夜培養物稀釋至OD_{600}為0.05。原料為葡萄糖、轉化葡萄糖或玉米乾草。藉由酶促處理蔗糖糖漿製備轉化糖原料(Danisco轉化糖)。如下文(部分V)所述來製備AFEX玉米乾草。使細胞於30℃下生長，且當培養物之OD_{600}達到約0.8-1.0時(0小時)，量測第一樣品。在0小時、1小時及3小時，分析培養物之生長(如由OD_{600}量測)及異戊二烯產量(如實例1)。結果展示於圖47中。

V. 自經AFEX預處理之玉米乾草製備水解產物

經AFEX預處理之玉米乾草獲自密西根生物技術研究所(Michigan Biotechnology Institute)。預處理條件為60%濕度，1:1氨負載，及於90℃下持續30分鐘，接著空氣乾燥。經AFEX預處理之玉米乾草中之水分含量為21.27%。經AFEX預處理之玉米乾草中葡聚糖及木聚糖之含量分別為31.7%及19.1%(乾基)。糖化過程如下：將20 g經AFEX預處理之玉米乾草添加至具有5 ml 1 M檸檬酸鈉緩衝液(pH 4.8)、2.25 ml乙醇纖維素酶1000(Accellerase 1000)、0.1 ml格林酶H121(Grindamyl H121)(來自麵包製造工業用之黑麴菌的Danisco木聚糖酶產品)及72.65 ml去離子水之500 ml燒瓶中。將該燒瓶置於迴轉式震盪器中且在50℃下培育96小時。自震盪器中獲取一個樣品且使用HPLC進行分析。水解產物含有38.5 g/l葡萄糖、21.8 g/l木糖，及10.3 g/l之葡萄糖及/或木糖寡聚物。

VI. 酵母提取物對生長於批式補料培養物中之大腸桿菌之

異戊二烯產量的影響

如先前關於含有上述pTrcKudzu yIDI DXS質體之大腸桿菌細胞所述，以14 L規模進行醱酵。以指數速率補給酵母提取物(Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada)。在40小時醱酵期間，傳遞至醱酵槽中之酵母提取物之總量在70-830 g之間變化。在550 nm波長下量測醱酵培養液之光學密度。醱酵槽內之最終光學密度與所添加之酵母提取物之量成比例(圖48A)。如先前所述測定醱酵槽之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加(圖48B)。所製造之異戊二烯之量與所補給之酵母提取物之量成線性比例關係(圖48C)。

VII. 以pTrcKudzu DXS yIDI之500 L醱酵製造異戊二烯

使用具有野葛異戊二烯合成酶、釀酒酵母IDI及大腸桿菌DXS核酸(大腸桿菌BL21 (λDE3) pTrc Kudzu dxs yidi)之大腸桿菌細胞之500公升醱酵來製造異戊二烯。異戊二烯含量經15小時時期自50 μg/L變為300 μg/L。基於平均異戊二烯濃度、通過器件之平均流量及異戊二烯析出(breakthrough)程度，計算出所收集之異戊二烯之量為約17 g。

VIII. 以生長於批式補料培養物中之大腸桿菌之500 L醱酵製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g、1000×改質痕量金屬溶

液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氨氣(NH_3)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg、$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在500-L生物反應器中用含有pTrcKudzu yIDI DXS質體之大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖及酵母提取物形成異戊二烯之情況。在大豆腖-酵母提取物-葡萄糖培養基中製備自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體。接種體生長至OD 0.15(在550 nm下所量測)之後，使用20 ml接種體接種含有2.5-L大豆腖-酵母提取物-葡萄糖培養基之生物反應器。使2.5-L生物反應器物質在30℃下生長至OD為1.0，且將2.0-L物質轉移至500 L生物反應器中。

以指數速率補給酵母提取物(Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada)及葡萄糖。在50小時醱酵期間，傳遞至生物反應器中之葡萄糖及酵母提取物之總量分別為181.2 kg及17.6 kg。生物反應器內隨時間而變之光學密度展示於圖

49A中。如先前所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加(圖49B)。在50小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為55.1 g，且製造時程展示於圖49C中。

實例8：在表現野葛異戊二烯合成酶及重組甲羥戊酸途徑基因之大腸桿菌中製造異戊二烯

I. 選殖下游MVA途徑

選殖下游甲羥戊酸途徑之策略如下。藉由PCR自釀酒酵母染色體DNA擴增甲羥戊酸生物合成途徑之四種基因：甲羥戊酸激酶(MVK)基因、磷酸甲羥戊酸激酶(PMK)基因、二磷酸甲羥戊酸去羧酶(MVD)基因及異戊烯基二磷酸異構酶基因，且將其個別地選殖至pCR BluntII TOPO質體(Invitrogen)中。在一些狀況下，自大腸桿菌染色體DNA擴增*idi*基因。設計引子，使得在5'末端，起始密碼子上游8 bp處插入大腸桿菌共同RBS(AGGAGGT(SEQ ID NO:82)或AAGGAGG(SEQ ID NO:83))，且在3'末端添加*Pst*I位點。接著將該等基因依次選殖至pTrcHis2B載體中，直至整個途徑得到組裝為止。

來自釀酒酵母S288C之染色體DNA獲自ATCC(ATCC 204508D)。按照製造商之說明書，使用引子MVKF(5'-AGGAGGTAAAAAAACATGTCATTACCGTTCTTAACTTCTGC，SEQ ID NO:84)及MVK-Pst1-R(5'-ATGGCTGCAGGCCTATCGCAAATTAGCTTATGAAGTCCATGGTAAATTCGTG，SEQ ID NO:85)且使用PfuTurbo，自釀酒酵母之染色體

擴增MVK基因。藉由經1.2% E-gel(Invitrogen)進行電泳來鑑別尺寸正確之PCR產物(1370 bp)，且將其選殖至pZeroBLUNT TOPO中。所得質體命名為pMVK1。用*Sac*I及*Taq*1限制性核酸內切酶分解質體pMVK1，用凝膠純化片段且將其接合至經*Sac*I及*Bst*BI分解之pTrcHis2B中。所得質體稱為pTrcMVK1。

藉由使用以下引子進行PCR來擴增甲羥戊酸生物合成途徑中之第二個基因PMK：PstI-PMK1 R(5'-GAATTCGCCCTTCTGCAGCTACC，SEQ ID NO:86)及BsiHKA I-PMK1 F(5'-CGACTGGTGCACCCTTAAGGAGGAAAAAAAACATGTCAG，SEQ ID NO:87)。按照製造商之說明書，使用Pfu Turbo聚合酶(Stratagene)進行PCR反應。用*Pst*I及*Bsi*HKI分解尺寸正確之產物(1387 bp)，且將其接合至經*Pst*I分解之pTrcMVK1中。所得質體稱為pTrcKK。以相同方式選殖MVD及*idi*基因。使用引子對PstI-MVD 1 R(5'-GTGCTGGAATTCGCCCTTCTGCAGC，SEQ ID NO:88)及NsiI-MVD 1 F(5'-GTAGATGCATGCAGAATTCGCCCTTAAGGAGG，SEQ ID NO:89)進行PCR以擴增MVD基因，且使用引子對PstI-YIDI 1 R(5'-CCTTCTGCAGGACGCGTTGTTATAGC，SEQ ID NO:79)及NsiI-YIDI 1 F(5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAAAATGAC，SEQ ID NO:78)進行PCR以擴增yIDI基因。在一些狀況下，使用來自大腸桿菌之IPP異構酶基因*idi*。為擴增來自大腸桿菌染色體DNA之*idi*，使用以下引子組：PstI-CIDI 1 R(5'-GTGTG

ATGGATATCTGCAGAATTCG，SEQ ID NO:90)及NsiI-CIDI 1 F(5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAACATG，SEQ ID NO:91)。模板DNA為由標準方法自大腸桿菌FM5中分離之染色體DNA(WO 96/35796及WO 2004/033646，各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於核酸分離)。最終質體對於編碼酵母*idi*基因之構築體稱為pKKDIy，或對於編碼大腸桿菌*idi*基因之構築體稱為pKKDIc。將質體轉型至大腸桿菌宿主BL21中以供後續分析。在一些狀況下，將野葛異戊二烯合成酶選殖至pKKDIy中，得到質體pKKDIyIS。

亦將下游MVA途徑選殖至含有康黴素抗生素抗性標記物之pTrc中。用限制性核酸內切酶*Apa*I及*Pst*I分解質體pTrcKKDIy，在1.2%瓊脂糖E-gel上分離5930 bp片段，且根據製造商之說明書使用Qiagen凝膠純化套組進行純化。用限制性核酸內切酶*Apa*I及*Pst*I分解實例7中所述之質體pTrcKudzuKan，且使用Qiagen凝膠純化套組經1.2% E-gel純化含有載體之3338 bp片段。使用Roche快速接合套組接合3338 bp載體片段及5930 bp下游MVA途徑片段。將接合混合物轉型至大腸桿菌TOP10細胞中，且在37℃下使轉型體生長隔夜，同時在含有康黴素(50 μg/ml)之LA上進行選擇。藉由限制性酶分解來驗證轉型體，且冷凍一個轉型體作為儲備物。質體命名為pTrcKanKKDIy。

II. 將野葛異戊二烯合成酶基因選殖至pTrcKanKKDIy中

藉由使用引子MCM50 5'-GATCATGCATTCGCCCTTAG

GAGGTAAAAAAACATGTGTGCGACCTCTTCTCAATTTAC T(SEQ ID NO:52)及MCM53 5'-CGGTCGACGGATCCC TGCAGTTAGACATACATCAGCTG(SEQ ID NO:50)進行PCR，自實例1中所述之pTrcKudzu擴增野葛異戊二烯合成酶基因。將所得PCR片段選殖至pCR2.1中，且轉型至大腸桿菌TOP10中。此片段含有野葛異戊二烯合成酶之編碼序列、及含有大腸桿菌RBS之上游區域。在37℃下培育轉型體隔夜，同時在含有羧苄青黴素(50 μg/ml)之LA上進行選擇。藉由定序驗證片段正確插入，且此菌株命名為MCM93。

用限制性核酸內切酶*Nsi*I及*Pst*I分解來自菌株MCM93之質體以釋放含有RBS及野葛異戊二烯合成酶之1724 bp插入物。在1.2%瓊脂糖E-gel上分離1724 bp片段，且根據製造商之說明書使用Qiagen凝膠純化套組進行純化。用限制性核酸內切酶*Pst*I分解質體pTrcKanKKDIy，在37℃下用SAP處理30分鐘，且使用Qiagen PCR淨化套組進行純化。使用Roche快速接合套組接合該質體及編碼野葛異戊二烯合成酶之DNA片段。將接合混合物轉型至大腸桿菌TOP10細胞中，且在37℃下使轉型體生長隔夜，同時在含有50 μg/ml康黴素之LA上進行選擇。藉由限制酶分解驗證正確轉型體，且質體命名為pTrcKKDyIkISKan(圖24及圖25；SEQ ID NO:11)。將此質體轉型至BL21(λDE3)細胞(Invitrogen)中。

III. 自表現重組下游甲羥戊酸途徑及野葛異戊二烯合成酶

之大腸桿菌中之甲羥戊酸製造異戊二烯

在調整至pH 7.1且補充有0.5%葡萄糖及0.5%甲羥戊酸之MOPS培養基(Neidhardt等人，(1974) *J. Bacteriology* 119: 736-747)中培養菌株BL21/pTrcKKDyIkISKan。亦使用相同條件，但在不添加0.5%甲羥戊酸之情況下設置對照培養物。自具有1%接種體之隔夜接種培養物開始培養，且當培養物之OD_{600}已達到0.3至0.5時，用500 μM IPTG進行誘導。在30℃、以250 rpm震盪下使培養物生長。誘導後3小時，使用實例1中所述之頂部空間檢驗來分析異戊二烯產量。最大異戊二烯產量為6.67×10^{-4} $mol/L_{培養液}/OD_{600}/h$，其中$L_{培養液}$為培養液體積且包括細胞培養基體積與細胞體積。未補充甲羥戊酸之對照培養物不製造可量測之異戊二烯。

IV. 選殖上游MVA途徑

自糞腸球菌選殖包含編碼三種酶促活性之兩種基因的上游甲羥戊酸生物合成途徑。*mvaE*基因編碼具有乙醯基-CoA乙醯轉移酶與3-羥基-3-甲基戊二醯基-CoA(HMG-CoA)還原酶(該途徑中之第一個蛋白質與第三個蛋白質)之酶促活性的蛋白質，且*mvaS*基因編碼該途徑中之第二個酶HMG-CoA還原酶。使用以下引子，自前部具有大腸桿菌核糖體結合位點及間隔子之糞腸球菌(*E. faecalis*)基因組DNA(ATCC 700802D-5)擴增*mvaE*基因：

mvaE w/ RBS+ATG起始密碼子*Sac*I之CF 07-60 (+)起始端
5' - GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAAACATGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:93)

CF 07-62 (-)融合之間具有RBS之*mvaE*與*mvaS*

5' - TTTATCAATCCCAATTGTCATGTTTTTTTACCTCCTTTATTGTTTTCTTAAATC (SEQ ID NO:94)

使用以下引子，自前部具有大腸桿菌RBS及間隔子之糞腸球菌基因組DNA(ATCC 700802D-5)擴增*mvaS*基因：

CF 07-61 (+)融合之間具有RBS之*mvaE*與*mvaS*

5' - GATTTAAGAAAACAATAAAGGAGGTAAAAAAACATGACAATTGGGATTGATAAA (SEQ ID NO:95)

*mvaS*基因*Bgl*II之CF 07-102 (-)末端

5' -GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:96)

藉由使用以下引子進行PCR將PCR片段融合在一起：

mvaE w/ RBS+ATG起始密碼子*Sac*I之CF 07-60 (+)起始端

5' -GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAAACATGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:93)

*mvaS*基因*Bgl*II之CF 07-102 (-)末端

5'-GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:96)

使用Qiagen套組純化融合PCR片段，且用限制性酶*Sac*I及*Bgl*II分解。使用Qiagen套組對此經分解之DNA片段進行凝膠純化，且將其接合至已用*Sac*I及*Bgl*II分解且經凝膠純化之市售載體pTrcHis2A中。

將接合混合物轉型至大腸桿菌Top 10細胞中，且在LA+50 μg/ml羧苄青黴素板上選擇群落。選擇總共六個群落，且在LB+50 μg/ml羧苄青黴素中生長隔夜，且使用Qiagen套組分離質體。用*Sac*I及*Bgl*II分解質體以檢查插入物，且用以下引子對一個正確質體進行定序：

*mvaE*基因之CF 07-58 (+)起始端

5' – ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID NO:97)

*mvaE*基因之CF 07-59 (-)末端

5' – ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAAATAGC (SEQ ID NO:98)

*mvaS*基因之CF 07-82 (+)起始端

5' – ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID NO:99)

*mvaS*基因之CF 07-83 (-)末端

5' – TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:100)

*mvaE*中之CF 07-86 (+)序列

5' – GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID NO:101)

*mvaE*中之CF 07-87 (+)序列

5' – TTGCCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID NO:102)

*mvaE*中之CF 07-88 (+)序列

5' – GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID NO:103)

*mvaS*中之CF 07-89 (+)序列

5' – GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID NO:104)

藉由定序判定稱為pTrcHis2AUpperPathway#1之質體為正確的，且將其轉型至市售大腸桿菌菌株BL21中。在LA+50 μg/ml羧苄青黴素上進行選擇。選擇兩個轉型體，且於LB+50 μg/ml羧苄青黴素上生長直至其OD_{600}達到1.5為止。在-80℃下，於甘油存在下，將兩個菌株冷凍於小瓶中。菌株對於BL21分離株#1中之pTrcHis2AUpperPathway#1命名為CF 449，且對於BL21分離株#2中之pTrcHis2AUpperPathway#1命名為CF 450。分析發現，兩個純系之表現相同。

V. 將上游MVA途徑選殖至pCL1920中

用限制性核酸內切酶*Ssp*I分解質體pTrcHis2AUpperPathway以釋放含有pTrc-*mvaE*-*mvaS*-(His標籤)-終止子之片段。在此片段中，his標籤未轉譯。使用Qiagen凝膠純化套組，經1.2% E-gel純化此具有鈍末端之4.5 kbp片段。藉由用限制性核酸內切酶*Pvu*II分解載體，用SAP處理且使用Qiagen凝膠純化套組經1.2% E-gel進行凝膠純化來製備來自pCL1920之已脫除磷酸且具有鈍末端的4.2 kbp片段。使用Roche快速接合套組接合該兩個片段，且將其轉型至TOP10化學性勝任細胞中。在含有壯觀黴素(50 μg/ml)之LA上選擇轉型體。藉由以PCR針對插入物之存在進行篩選來鑑別正確群落。質體命名為pCL PtrcUpperPathway(圖26及圖27A-27D；SEQ ID NO:12)。

VI. 表現組合之上游與下游甲羥戊酸途徑之菌株

為獲得具有完整甲羥戊酸途徑與野葛異戊二烯合成酶之菌株，將質體pTrcKKDyIkISkan與pCLpTrcUpperPathway均轉型至BL21(λDE3)勝任細胞(Invitrogen)中，且在含有康黴素(50 μg/ml)及壯觀黴素(50 μg/ml)之LA上選擇轉型體。由質體製劑檢查轉型體以確保兩個質體均保留於宿主中。菌株命名為MCM127。

VII. 自大腸桿菌/pUpperpathway中之葡萄糖製造甲羥戊酸

將 BL21/pTrcHis2A-*mvaE*/*mvaS* 或 FM5/p pTrcHis2A-*mvaE*/*mvaS*之單一群落接種至LB+羧苄青黴素(100 μg/ml)中，且在37℃、以200 rpm震盪下生長隔夜。將此等培養物稀釋至250 ml擋板式燒瓶中之50 ml培養基中，以使

OD_{600}達到0.1。培養基為TM3+1%或2%葡萄糖+羧苄青黴素(100 μg/ml)，或TM3+1%葡萄糖+水解大豆油+羧苄青黴素(100 μg/ml)，或TM3+生質(製備之甜菜渣、玉米乾草或柳枝稷)。在30℃、以200 rpm震盪下使培養物生長約2-3小時，直至OD_{600}達到0.4為止。此時，藉由添加IPTG(400 μM)誘導*mvaE mvaS*構築體中之表現。誘導後再培育培養物20或40小時，以2小時至6小時時間間隔、接著必要時在24、36及48小時獲取樣品。如下完成取樣：移出1 ml培養物，量測OD_{600}，使細胞於微量離心機(microfuge)中集結成粒，移出上清液且分析其中之甲羥戊酸。

使用TM3培養基及2%葡萄糖作為細胞培養基，具有編碼糞腸球菌AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合成酶及HMG-CoA還原酶多肽之核酸的大腸桿菌細胞之14公升醱酵製造22公克甲羥戊酸。使用LB培養基及1%葡萄糖作為細胞培養基，此等細胞之震盪燒瓶中每公升製造2-4公克甲羥戊酸。在此等菌株中製造甲羥戊酸指示，MVA途徑在大腸桿菌中發揮功能。

VIII. 自含有上游及下游MVA途徑與野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌BL21製造異戊二烯

藉由在如上所述含有上游及下游MVA途徑與野葛異戊二烯合成酶基因之質體與實例7中所述含有idi、dxs及dxr與異戊二烯合成酶基因之質體的多種組合中進行轉型來產生以下菌株。所用宿主細胞為化學性勝任BL21(λDE3)，且由標準方法進行轉型。在含有康黴素(50 μg/ml)、或康黴素

與壯觀黴素(濃度均為50 μg/ml)之L瓊脂上選擇轉型體。在37℃下使板生長。所得菌株指定如下：

在康黴素與壯觀黴素(各50 μg/ml)上生長

MCM127-於BL21(λDE3)中之pCL上游MVA+pTrcKKDyIkIS (kan)

MCM131-於BL21(λDE3)中之pCL1920+pTrcKKDyIkIS (kan)

MCM125-於BL21(λDE3)中之pCL上游MVA+pTrcHis2B (kan)

在康黴素(50 μg/ml)上生長

MCM64-於BL21(λDE3)中之pTrcKudzu yIDI DXS (kan)

MCM50-於BL21(λDE3)中之pTrcKudzu (kan)

MCM123-於BL21(λDE3)中之pTrcKudzu yIDI DXS DXR (kan)

將來自冷凍器儲備物之上述菌株於LA+適當抗生素上劃線培養(streak)，且在37℃下生長隔夜。使用來自各板之單一群落接種震盪燒瓶(25 ml LB+適當抗生素)。在22℃、以200 rpm震盪下培育該等燒瓶隔夜。次日早晨，將該等燒瓶轉移至37℃培育箱中，且在以200 rpm震盪下再生長4.5小時。對25 ml培養物進行離心以使細胞集結成粒，且將細胞再懸浮於5 ml LB+適當抗生素中。接著將培養物稀釋至25 ml LB+1%葡萄糖+適當抗生素中，以使OD_{600}達到0.1。對各菌株設置兩個燒瓶，一組經IPTG(800 μM)誘導且第二組未經誘導。在37℃、以250 rpm震盪下培育培養物。1.50小時後(緊接取樣時間點1之後)誘導一組培養物。在各取樣時間點，量測OD_{600}且如實例1中所述測定異戊二烯之量。結果呈現於表3中。所製造之異戊二烯之量以特定菌株之峰值產量處之量表示。

表3.大腸桿菌菌株中異戊二烯之產量

菌株	異戊二烯(μg/L/OD/h)
MCM50	23.8
MCM64	289
MCM125	ND
MCM131	痕量
MCM127	874

ND：未偵測到

痕量：峰存在，但不可積分。

IX. 分析甲羥戊酸

由Sigma-Aldrich(WI, USA)供應甲羥戊酸內酯(1.0 g，7.7 mmol)(CAS編號503-48-0)溶解於水(7.7 mL)中之漿液，且用氫氧化鉀(7.7 mmol)處理以產生甲羥戊酸之鉀鹽。藉由^{1}H NMR分析確認轉化成甲羥戊酸。藉由以14,000 rpm離心5分鐘移除細胞，接著將上清液之300 μl等分試樣添加至900 μl H_2O中，藉此製備供HPLC分析用之樣品。隨後添加過氯酸(36 μl之70%溶液)，接著混合且於冰上冷卻5分鐘。接著再次對樣品進行離心(14,000 rpm，持續5分鐘)，且將上清液轉移至HPLC。以相同方式製備甲羥戊酸標準物(20、10、5、1及0.5 g/L)。藉由使用以5 mM硫酸以0.6 mL/min溶離且具有折射率(RI)偵測之BioRad Aminex 87-H+管柱(300 mm×7.0 mm)進行HPLC來分析甲羥戊酸(20 μL注射體積)。在此等條件下，甲羥戊酸在18.5分鐘時以內酯形式溶離。

X. 自含有上游MVA途徑與野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌BL21製造異戊二烯

使用表現甲羥戊酸途徑多肽及野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌的15-L規模醱酵，自批式補料培養物中之細胞製造異戊二烯。此實驗證實，在葡萄糖限制性條件下生長之細胞製造2.2 g/L之異戊二烯。

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

使用以下組分產生1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有pCL PtrcUpperPathway(圖26)及pTrcKKDyIkIS質體之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃

下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至大豆胰-酵母提取物-葡萄糖培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種5-L生物反應器。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在54小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為3.7 kg。藉由添加異丙基-β-D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為10時，使IPTG濃度達到25 μM。當OD_{550}達到190時，IPTG濃度升至50 μM。在醱酵38小時之時，IPTG濃度升至100 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖54中。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到2.2 g/L(圖55)。在54小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為15.9 g，且製造時程展示於圖56中。

XI. 在15-L規模下自表現甲羥戊酸途徑基因且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌醱酵而製造異戊二烯

使用表現甲羥戊酸途徑多肽及野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌的15-L規模醱酵，自批式補料培養物中之細胞製造異戊二烯。此實驗證實，在葡萄糖限制性條件下生長之細胞製造3.0 g/L之異戊二烯。

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

使用以下組分產生1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種5-L生物反應器。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此

後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在59小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為2.2 kg。藉由添加IPTG達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為10時，使IPTG濃度達到25 μM。當OD_{550}達到190時，IPTG濃度升至50 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖93中。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到3.0 g/L(圖94)。在59小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為22.8 g，且製造時程展示於圖95中。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為2.2%。自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為1.0%。

XII. 在15-L規模下自表現甲羥戊酸途徑基因且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌醱酵而製造異戊二烯

使用表現甲羥戊酸途徑多肽、大葛藤異戊二烯合成酶及野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌的15-L規模醱酵，自批式補料培養物中之細胞製造異戊二烯。此實驗證實，在葡萄糖限制性條件下生長之細胞製造3.3 g/L之異戊二烯。

i)構築pCLPtrcUpperPathwayHGS2

使用引子NsiI-RBS-HGS F(CTTGATGCATCCTGCATTCGCCCTTAGGAGG，SEQ ID NO:105)及pTrcR(CCAGGCAAATTCTGTTTTATCAG，SEQ ID NO:106)且使用pTrcKKDyIkIS作為模板，對編碼大葛藤異戊二烯合成酶之基因進行PCR擴增。用*Nsi*I及*Pst*I對由此獲得之PCR產物進行限制酶分解，且經凝膠純化。根據製造商之說明書，用*Pst*I對質體

pCL PtrcUpperPathway進行限制酶分解，且使用rAPid鹼性磷酸酶(Roche)脫除磷酸。

將此等DNA片段接合在一起，且將接合反應物轉型至大腸桿菌Top10化學性勝任細胞(Invitrogen)中，塗於含有壯觀黴素(50 μg/ml)之L瓊脂上，且在37℃下培育隔夜。使用Qiaquick Spin Mini-prep套組自6個純系製備質體DNA。用限制性酶*Eco*RV及*Mlu*I分解質體DNA，以鑑別插入物具有正確定向(亦即，基因之取向與pTrc啟動子相同)之純系。

所得正確質體命名為pCLPtrcUpperPathwayHGS2。使用本文所述之頂部空間檢驗對此質體進行檢驗且發現在大腸桿菌Top10中製造異戊二烯，由此驗證基因之功能性。將質體轉型至含有pTrcKKDyIkIS之BL21(LDE3)中以得到菌株BL21/pCLPtrcUpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS。此菌株與BL21/pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS菌株(實例8部分XI)相比，具有異戊二烯合成酶之額外複本。此菌株與實例8部分XI中所用之BL21/pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS菌株相比，HMGS之表現及活性亦增加。

ii)在15-L規模下，由表現pCLPtrcUpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌醱酵製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。

所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

使用以下組分產生1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15 L生物反應器中，用含有pCLPtrcUpperPathwayHGS2及pTrc KKDyIkIS質體之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種5-L生物反應器。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在58小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為2.1 kg。藉由添加IPTG達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為9時，使IPTG濃度達到25 μM。當OD_{550}達到170時，IPTG濃度升

至50 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖104中。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到3.3 g/L(圖105)。在58小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為24.5 g，且製造時程展示於圖106中。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為2.5%。自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為1.2%。分析顯示，與表現CL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之BL21相比，異戊二烯合成酶之活性增強約3-4倍(數據未圖示)。

XIII. 將下游甲羥戊酸途徑整合於大腸桿菌之染色體中

將含有甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之合成操縱子整合至大腸桿菌之染色體中。必要時，可藉由在操縱子之5'處整合不同啟動子來改變表現。

表4列出此實驗所用之引子。

表4.引子

MCM78	整合構築體之attTn7向上反置引子	gcatgctcgagcggccgcTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTC(SEQ ID NO:107)
MCM79	整合構築體之attTn7向下反置引子	gatcgaagggcgatcgTGTCACAGTCTGGCGAAACCG (SEQ ID NO:108)
MCM88	整合構築體之attTn7向上前置引子	ctgaattctgcagatatcTGTTTTTCCACTCTTCGTTCACTTT(SEQ ID NO:109)
MCM89	整合構築體之attTn7向下前置引子	tctagagggcccAAGAAAAATGCCCCGCTTACG(SEQ ID NO:110)
MCM104	GI1.2啟動子-MVK	Gatcgcggccgcgcccttgacgatgccacatcctgagcaaataattcaaccactaattgtgagcggataacacaaggaggaaacagctatgtcattaccgttcttaactc(SEQ ID NO:111)

MCM105	aspA終止子-yIDI	Gatcgggccccaagaaaaaaggcacgtcatctgacgtgccttttttatttgtagacgcgttgttatagcattcta(SEQ ID NO:112)
MCM120	attTn7前置引子：attTn7同源，GB標記物同源	aaagtagccgaagatgacggtttgtcacatggagttggcaggatgtttgattaaaagcAATTAACCCTCACTAAAGGGCGG(SEQ ID NO:113)
MCM127	1.2 GI互補反置引子：GB標記物同源(超長)，啟動子，RBS，ATG	AGAGTGTTCACCAAAAATAATAACCTTTCCCGGTGCAgaagttaagaacggtaatgacatagctgtttcctccttgtgttatccgctcacaattagtggttgaattatttgctcaggatgtggcatcgtcaagggcTAATACGACTCACTATAGGGCTCG(SEQ ID NO:114)

i)構築標靶載體

選擇attTn7位點以供整合。藉由PCR，自MG1655細胞擴增上游(attTn7向上)(引子MCM78及MCM79)及下游(attTn7向下)(引子MCM88及MCM89)同源之區域。在94℃下使具有1 μL 10 μM引子、3 μL再蒸餾水、45 μL Invitrogen Platinum高保真PCR超混試劑(PCR Supermix High Fidelity)及刮下之MG1655群落的50 μL反應物變性2分鐘，循環25次(94℃下2分鐘，50℃下30秒，及68℃下1分鐘)，在72℃下延長7分鐘，且冷卻至4℃。根據製造商之說明書，將此所得DNA選殖至pCR2.1(Invitrogen)中，得到質體MCM278(attTn7向上)及MCM252(attTn7向下)。將來自MCM252之經分解且經凝膠純化之832 bp *Apa*I-*Pvu*I片段選殖至經*Apa*I-*Pvu*I分解且經凝膠純化之質體pR6K中，產生質體MCM276。將來自MCM278之經分解且經凝膠純化之825 bp *Pst*I-*Not*I片段選殖至經*Pst*I-*Not*I分解且經凝膠純化之MCM276中，產生質體MCM281。

ii)選殖下游途徑及啟動子

根據製造商之說明書，使用Roche Expand Long PCR系

統，用引子MCM104及MCM105自pTrcKKDyIkIS擴增MVK-PMK-MVD-IDI基因。用*Not*I及*Apa*I分解此產物，且將其選殖至已用*Not*I及*Apa*I分解且經凝膠純化之MCM281中。使用Stratagene Pfu Ultra II，用引子MCM120及MCM127自GeneBridges FRT-gb2-Cm-FRT模板DNA擴增CMR卡匣。使用四份含有1 μL之約10 ng/μL模板、各1 μL之引子、1.25 μL 10 mM dNTP、5 μL 10×緩衝液、1 μL酶及39.75 μL再蒸餾水之50 μL PCR反應物進行PCR變性程式：95℃下4分鐘，5次循環(95℃下20秒，55℃下20秒，72℃下2分鐘)，25次循環(95℃下20秒，58℃下20秒，72℃下2分鐘，72℃下10分鐘)；接著冷卻至4℃。彙集反應物，在Qiagen PCR淨化管柱上純化，且用於電穿孔含有質體MCM296之經水洗Pir1細胞。在2 mM電擊管(cuvette)中，以2.5 V及200歐姆(ohm)進行電穿孔。在30℃下於LB中回收電穿孔反應物3小時。在具有CMP5、Kan50之LA上選擇轉型體MCM330(圖107及圖108A-108C；SEQ ID NO:25)。

iii)整合至大腸桿菌染色體中

用*Sna*BI分解來自MCM330之經小規模純化DNA(Qiaquick Spin套組)，且將其用於電穿孔含有GeneBridges質體pRedET Carb之BL21(DE3)(Novagen)或MG1655。在30℃下使細胞生長至OD約為1，接著在37℃下用0.4% L-阿拉伯糖誘導1.5小時。在4℃再蒸餾水中洗滌此等細胞三次，隨後與2 μL DNA一起進行電穿孔。在含有氯黴素(5 μg/ml)之L瓊脂上選擇整合體，隨後確認在L瓊脂+康黴素

(50 μg/ml)上不會生長。冷凍BL21整合體MCM331及MG1655整合體MCM333。

iv)構築編碼野葛異戊二烯合成酶之pET24D-Kudzu

將野葛異戊二烯合成酶基因自pCR2.1載體(Invitrogen)次選殖至pET24d載體(Novagen)中。詳言之，使用引子MCM50 5'-GATCATGCAT TCGCCCTTAG GAGGTAAAAA AACATGTGTG CGACCTCTTC TCAATTTACT(SEQ ID NO:52)及MCM53 5'-CGGTCGACGG ATCCCTGCAG TTAGACATAC ATCAGCTG(SEQ ID NO:50)自pTrcKudzu模板DNA擴增野葛異戊二烯合成酶基因。使用Taq DNA聚合酶(Invitrogen)進行PCR反應，且將所得PCR產物選殖至pCR2.1-TOPO TA選殖載體(Invitrogen)中，且轉型至大腸桿菌Top10化學性勝任細胞(Invitrogen)中。將轉型體塗於含有羧苄青黴素(50 μg/ml)之L瓊脂上，且在37℃下培育隔夜。用單一轉型體接種含有50 μg/ml羧苄青黴素之5 ml魯利亞培養液培養物，且在37℃下生長隔夜。藉由對自1 ml液體培養物(魯利亞培養液)分離之質體DNA進行定序來針對正確插入物篩選五個群落，且使用QIAprep Spin Miniprep套組(Qiagen)進行純化。命名為MCM93之所得質體於pCR2.1骨架中含有野葛異戊二烯合成酶編碼序列。

藉由用*Pci*I及*Bam*H1(Roche)進行限制性核酸內切酶分解來移出野葛編碼序列，且使用QIAquick凝膠萃取套組(Qiagen)進行凝膠純化。用*Nco*I及*Bam*HI(Roche)分解pET24d載體DNA，用蝦鹼性磷酸酶(Roche)處理，且使用

QIAprep Spin Miniprep套組(Qiagen)進行純化。使用快速DNA接合套組(Roche)將野葛異戊二烯合成酶片段接合於經*Nco*I/*Bam*H1分解之pET24d，片段與載體之比率為5:1，總體積為20 μl。將一部分接合混合物(5 μl)轉型至大腸桿菌Top 10化學性勝任細胞中，且塗於含有康黴素(50 μg/ml)之L瓊脂上。藉由定序確認正確轉型體，且將其轉型至化學性勝任BL21(λDE3)pLysS細胞(Novagen)中。在37℃下生長隔夜後，於含有康黴素(50 μg/ml)之L瓊脂上選擇單一群落。命名為pET24D-Kudzu之所得質體之圖譜展示於圖109中。pET24D-Kudzu之序列(SEQ ID NO:26)展示於圖110A及圖110B中。使用頂部空間檢驗確認異戊二烯合成酶活性。

v)製造菌株

用質體pCLPtrcupperpathway與pTrcKudzu或pETKudzu共同轉型菌株MCM331及MCM333，得到表5中所示之菌株。

表5.製造菌株

背景	整合下游	上游MVA質體	異戊二烯合成酶質體	製造菌株
BL21(DE3)	MCM331	pCLPtrcUpper Pathway	pTrcKudzu	MCM343
BL21(DE3)	MCM331	pCLPtrcUpper Pathway	pET24D-Kudzu	MCM335
MG1655	MCM333	pCLPtrcUpper Pathway	pTrcKudzu	MCM345

vi)在15-L規模下自表現甲羥戊酸途徑基因且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌醱酵而製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

使用以下組分產生1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有上述gi1.2整合下游MVA途徑以及pCL PtrcUpperMVA及pTrcKudzu質體之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種5-L生物反應器。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在57小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為3.9 kg。藉由添加IPTG達成誘導。當二氧化碳析出速率達到100 mmol/L/h時，使IPTG濃度達到100 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖111A中。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到1.6 g/L(圖111B)。醱酵過程中異戊二烯之比生產力展示於圖111C中，且峰值為1.2 mg/OD/h。在57小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為16.2 g。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為0.9%。自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為0.4%。

XIV. 使用甘油作為碳源，自含有野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌BL21製造異戊二烯

使用表現野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌的15-L規模醱酵，自批式補料培養物中補給甘油之細胞製造異戊二烯。此實驗證實，在甘油存在下(不存在葡萄糖)生長之細胞製造2.2 mg/L之異戊二烯。

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之

後，添加5.1 g甘油、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有pTrcKudzu質體之BL21(DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度35℃下自甘油形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LA培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至大豆腖-酵母提取物-葡萄糖培養基中且在35℃下生長。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用600 mL接種體接種7.5-L生物反應器。

以指數速率補給甘油，直至550 nm下細胞之光學密度(OD_{550})達到153為止。在36小時醱酵期間傳遞至生物反應器之甘油的總量為1.7 kg。除接種體中之葡萄糖以外，未添加葡萄糖至生物反應器中。藉由添加IPTG達成誘導。當OD_{550}達到值為50時，使IPTG濃度達到20 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖57中。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到2.2 mg/L(圖58)。

在54小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為20.9 mg，且製造時程展示於圖59中。

XV. 使用轉化糖作為碳源，在15-L規模下自表現甲羥戊酸途徑基因且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌醱酵而製造異戊二烯

使用表現甲羥戊酸途徑多肽及野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌的15-L規模醱酵，自批式補料培養物中補給轉化糖之細胞製造異戊二烯。此實驗證實，在轉化糖存在下生長之細胞製造2.4 g/L之異戊二烯。

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g轉化糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

使用以下組分產生1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自轉化糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種5-L生物反應器。

以指數速率補給轉化糖直至細胞到達停滯期為止。此後，轉化糖補料減至滿足代謝需求。在44小時醱酵期間傳遞至生物反應器之轉化糖的總量為2.4 kg。藉由添加IPTG達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為9時，使IPTG濃度達到25 μM。當OD_{550}達到200時，IPTG濃度升至50 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖96中。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到2.4 g/L(圖97)。在44小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為18.4 g，且製造時程展示於圖98中。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為1.7%。自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為0.8%。

實例9.構築上游及下游MVA途徑以供整合至枯草桿菌中

I. 在枯草桿菌中構築上游MVA途徑

在*aprE*啟動子控制下，將來自糞腸球菌之上游途徑整合至枯草桿菌中。該上游途徑由兩個基因組成：編碼AACT

及HMGR之*mvaE*，及編碼HMGS之*mvaS*。該兩個基因融合在一起，其間具有終止密碼子，在*mvaS*之前具有RBS位點，且該兩個基因處於*aprE*啟動子控制下。終止子位於*mvaE*基因之後。在*mvaE*基因之後選殖氯黴素抗性標記物，且藉由使用側接同源區進行雙雜交(double cross)而在*aprE*基因座處整合構築體。

藉由PCR擴增四個DNA片段，使之含有允許其經由PCR反應融合在一起之懸垂物(overhang)。根據製造商之說明書，使用Herculase聚合酶進行PCR擴增。

1. PaprE

*aprE*啟動子PstI之CF 07-134 (+)起始端

5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:115)

CF 07-94 (-)融合PaprE與*mvaE*

5'- CAATAATAACTACTGTTTTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAA (SEQ ID NO:116)

模板：枯草桿菌染色體DNA

2. *mvaE*

CF 07-93 (+)融合*mvaE*與*aprE*啟動子(GTG起始密碼子)

5'- TTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:117)

CF 07-62 (-)融合之間具有RBS之*mvaE*與*mvaS*

5'- TTTATCAATCCCAATTGTCATGTTTTTTTACCTCCTTTATTGTTTTCTTAAATC (SEQ ID NO:94)

模板：糞腸球菌染色體DNA(來自ATCC)

3. *mvaS*

CF 07-61 (+)融合之間具有RBS之*mvaE*與*mvaS*

5'-
GATTTAAGAAAACAATAAAGGAGGTAAAAAAACATGACAATTGGGATTGATAAA
(SEQ ID NO:95)

CF 07-124 (-)融合*mvaS*末端與終止子
5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:118)

模板：糞腸球菌染色體DNA

4.解澱粉桿菌鹼性絲胺酸蛋白酶終止子

CF 07-123 (+)融合mvaS末端與終止子
5'- ACCGTTCGTTCTTATCGAAACTAAAAAAAACCGGCCTTGGCCCCG (SEQ ID NO:119)

解澱粉桿菌終止子BamHI之CF 07-46 (-)末端

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:58)

模板：解澱粉桿菌染色體DNA

PCR融合反應

5.融合*mvaE*與*mvaS*

CF 07-93 (+)融合*mvaE*與*aprE*啟動子(GTG起始密碼子)

5'- TTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:117)

CF 07-124 (-)融合*mvaS*末端與終止子
5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:118)

模板：上述#2及#3

6.融合*mvaE-mvaS*與*aprE*啟動子

*aprE*啟動子PstI之CF 07-134 (+)起始端

5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:115)

CF 07-124 (-)融合*mvaS*末端與終止子
5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:118)

模板：上述#1及#4

7.融合PaprE-*mvaE*-*mvaS*與終止子

*aprE*啟動子PstI之CF 07-134 (+)起始端

5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:115)

解澱粉桿菌終止子BamHI之CF 07-46 (-)末端

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:58)

模板：#4與#6

用限制性核酸內切酶*Pst*I/*Bam*HI分解產物，且將其接合於經*Pst*I/*Bam*HI分解之pJM102(Perego, M. 1993. Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*，第615-624頁。A. L. Sonenshein, J. A. Hoch及R. Losick (編), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.)。將接合物轉型至大腸桿菌TOP 10化學性勝任細胞中，且在含有羧苄青黴素(50 μg/ml)之LA上選擇轉型體。藉由定序鑑別正確質體且命名為pJMUpperpathway2(圖50及圖51)。將經純化之質體DNA轉型至枯草桿菌*aprEnprE* Pxyl-*comK*中，且在含有氯黴素(5 μg/ml)之L瓊脂上選擇轉型體。選擇正確群落，且依序塗於含有10、15及25 μg/ml氯黴素之L瓊脂上以擴增含有上游途徑之卡匣的複本數。

藉由使所得菌株於含有1%葡萄糖及1%之LB中生長來測試該菌株之甲羥戊酸產量。藉由GC分析培養物之甲羥戊酸產量。

隨後使用此菌株作為整合下游甲羥戊酸途徑之宿主。

使用以下引子對上述各種構築體進行定序。

定序引子：

*aprE*啟動子PstI之CF 07-134 (+)起始端

5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:115)

*mvaE*基因之CF 07-58 (+)起始端

5'- ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID NO:97)

*mvaE*基因之CF 07-59 (-)末端

5'- ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAAATAGC (SEQ ID NO:98)

*mvaS*基因之CF 07-82 (+)起始端

5'- ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID NO:99)

*mvaS*基因之CF 07-83 (-)末端

5'- TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:100)

*mvaE*中之CF 07-86 (+)序列

5'- GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID NO:101)

*mvaE*中之CF 07-87 (+)序列

5'- TTGCCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID NO:102)

*mvaE*中之CF 07-88 (+)序列

5'- GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID NO:103)

*mvaS*中之CF 07-89 (+)序列

5'- GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID NO:104)

在含有濃度為5 μg/ml之氯黴素之LA上選擇轉型體。藉由定序確認一個群落正確整合，且將其塗於含有經數天濃度漸增(最終含量達到25 μg/ml)之氯黴素之LA上。此使得

含有相關基因之卡匣擴增。所得菌株命名為CF 455：pJMupperpathway#1 X枯草桿菌*aprEnprE* Pxyl *comK*(經擴增以於含有25 μg/ml氯黴素之LA上生長)。

II. 在枯草桿菌中構築下游MVA途徑

將由基因mvk1、pmk、mpd及idi組成之下游MVA途徑組合於由來自枯草桿菌染色體之nprE區域(整合位點)之側接DNA區域、*aprE*啟動子及壯觀黴素抗性標記物組成之卡匣中(見圖28及圖29；SEQ ID NO:13)。由DNA2.0合成此卡匣，且將其整合至含有整合於aprE基因座處之上游MVA途徑的枯草桿菌染色體中。自實例4中所述之複製質體表現野葛異戊二烯合成酶基因，且將其轉型至整合有上游與下游途徑之菌株中。

實例10：例示性異戊二烯組合物及其製造方法

I. 含有異戊二烯之醱酵釋出氣體之組成分析

用含有兩種編碼類異戊二烯前驅物生物合成之完整甲羥戊酸途徑、酵母異戊二烯基焦磷酸異構酶及野葛異戊二烯合成酶之質體(pCL upperMev；pTrcKKDyIkIS)的重組大腸桿菌BL21 (DE3)菌株進行14 L規模醱酵。在峰值異戊二烯生產力時間(27.9小時已醱酵時間，「EFT」)左右，將14 L槽之醱酵釋出氣體收集至20 mL頂部空間小瓶中，且藉由頂部空間GC/MS分析揮發性組分。

用配備有Agilent HP-5MS GC/MS管柱(30 m×250 μm；0.25 μm膜厚度)之Agilent 6890 GC/MS系統進行頂部空間分析。使用combiPAL自動注射器自20 mL頂部空間小瓶中

取出500 μL等分試樣。GC/MS方法利用氦作為載氣，流速為1 mL/min。保持注射口在250℃下，分流比為50:1。使烘箱溫度在37℃下初始保持2分鐘，接著以25℃/min之速率增至237℃，總方法時間為10分鐘。Agilent 5793N質量選擇偵測器在m/z 29至m/z 300之間掃描。此系統之偵測限度為約0.1 μg/L氣體或約0.1 ppm。必要時，可使用具有較低偵測限度之更敏感設備。

釋出氣體由以下組成：99.925%(v/v)永久氣體(N_2、CO_2及O_2)、約0.075%異戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)(約750 ppmv，2100 μg/L)，及微量(<50 ppmv)乙醇、丙酮及兩種C5異戊二烯醇。未測定水蒸氣之量，但據估算其等於0℃下之平衡蒸氣壓。藉由對GC/MS層析圖(圖86A及圖86B)中峰下方之面積進行積分來確定揮發性有機部分之組成，且列於表6中。乙醇及丙酮標準物之校準曲線使得能夠使用標準方法將GC面積轉換成以μg/L為單位之氣相濃度。

表6.醱酵釋出氣體中揮發性有機組分之組成。在使用表現異源甲羥戊酸途徑、酵母異戊二烯基焦磷酸異構酶及野葛異戊二烯合成酶的大腸桿菌BL21 (DE3)菌株醱酵之27.9小時時間點分析釋出氣體。

化合物	RT(min)	GC面積	面積%	濃度(μg/L)
乙醇	1.669	239005	0.84	62+/- 6
丙酮	1.703	288352	1.02	42+/- 4
異戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)	1.829	27764544	97.81	2000+/- 200
3-甲基-3-丁烯-1-醇	3.493	35060	0.12	<10
3-甲基-2-丁烯-1-醇	4.116	58153	0.20	<10

II. 量測在重組大腸桿菌菌株醱酵期間與異戊二烯共同製造之痕量揮發性有機化合物(VOC)

用含有兩種編碼類異戊二烯前驅物生物合成之完整甲羥戊酸途徑、酵母異戊二烯基焦磷酸異構酶及野葛異戊二烯合成酶之質體(pCL upperMev；pTrcKKDyIkIS)的重組大腸桿菌BL21 (DE3)菌株進行14 L規模醱酵。

使醱酵釋出氣體通過冷卻之頂部空間小瓶以濃縮並鑑別痕量揮發性有機組分。對此醱酵之釋出氣體進行取樣，且使其以1 L/min之速率通過裝填有石英棉(2 g)並以乾冰冷卻至-78℃之20 mL頂部空間小瓶，持續10分鐘。用新瓶蓋將小瓶重新封蓋，且藉由頂部空間GC/MS，使用實例10部分I中所述之條件分析所捕獲之VOC。在圖87A-87D中觀測到之化合物比率為醱酵釋出氣體中之總含量、-78℃下之相對蒸氣壓及質譜儀之偵測器回應值的組合。舉例而言，異戊二烯相對於氧化揮發物(例如丙酮及乙醇)之低含量與此物質之高揮發性相關，使得其在-78℃下不會積累於頂部空間小瓶中。

許多此等化合物之存在為源自生物來源之異戊二烯組合物所特有。結果描繪於圖87A-87D中且概述於表7A及表7B中。

表7A：在-78℃下低溫捕獲(cryo-trapping)之後由大腸桿菌BL21 (DE3)(pCL upperMev；pTrcKKDyIkIS)製造之釋出氣體中存在之痕量揮發物

化合物	RT(min)	GC面積[1]	面積%[2]	比率%[3]
乙醛	1.542	4019861	4.841	40.14
乙醇	1.634	10553620	12.708	105.39
丙酮	1.727	7236323	8.714	72.26
2-甲基-1,3-丁二烯	1.777	10013714	12.058	100.00
1-丙醇	1.987	163574	0.197	1.63
雙乙醯	2.156	221078	0.266	2.21
2-甲基-3-丁烯-2-醇	2.316	902735	1.087	9.01
2-甲基-1-丙醇	2.451	446387	0.538	4.46
3-甲基-1-丁醛	2.7	165162	0.199	1.65
1-丁醇	2.791	231738	0.279	2.31
3-甲基-3-丁烯-1-醇	3.514	14851860	17.884	148.32
3-甲基-1-丁醇	3.557	8458483	10.185	84.47
3-甲基-2-丁烯-1-醇	4.042	18201341	21.917	181.76
3-甲基-2-丁烯醛	4.153	1837273	2.212	18.35
乙酸3-甲基丁酯	5.197	196136	0.236	1.96
乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯	5.284	652132	0.785	6.51
2-庚酮	5.348	67224	0.081	0.67
2,5-二甲基吡嗪	5.591	58029	0.070	0.58
乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯	5.676	1686507	2.031	16.84
6-甲基-5-庚烯-2-酮	6.307	101797	0.123	1.02
2,4,5-三甲基吡啶	6.39	68477	0.082	0.68
2,3,5-三甲基吡嗪	6.485	30420	0.037	0.30
(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯	6.766	848928	1.022	8.48
(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯	6.864	448810	0.540	4.48
丁酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯	7.294	105356	0.127	1.05
香茅醛	7.756	208092	0.251	2.08
2,3-環庚烯醇吡啶	8.98	1119947	1.349	11.18

1 GC面積為對應於所列化合物之峰下方的未修正面積。

2面積%為峰面積相對於所有化合物之總峰面積，以%表示。

3比率%為峰面積相對於2-甲基-1,3-丁二烯之峰面積，以%表示。

表 7B. 在 -196℃ 下低溫捕獲之後由大腸桿菌 BL21 (DE3)(pCL upperMev；pTrcKKDyIkIS)製造之釋出氣體中存在之痕量揮發物

化合物	RT(min)	GC面積[1]	面積%[2]	比率%[3]
乙醛	1.54	1655710	0.276	0.33
甲硫醇	1.584	173620	0.029	0.03
乙醇	1.631	10259680	1.707	2.03
丙酮	1.722	73089100	12.164	14.43
2-甲基-1,3-丁二烯	1.771	506349429	84.269	100.00
乙酸甲酯	1.852	320112	0.053	0.06
1-丙醇	1.983	156752	0.026	0.03
雙乙醯	2.148	67635	0.011	0.01
2-丁酮	2.216	254364	0.042	0.05
2-甲基-3-丁烯-2-醇	2.312	684708	0.114	0.14
乙酸乙酯	2.345	2226391	0.371	0.44
2-甲基-1-丙醇	2.451	187719	0.031	0.04
3-甲基-1-丁醛	2.696	115723	0.019	0.02
3-甲基-2-丁酮	2.751	116861	0.019	0.02
1-丁醇	2.792	54555	0.009	0.01
2-戊酮	3.034	66520	0.011	0.01
3-甲基-3-丁烯-1-醇	3.516	1123520	0.187	0.22
3-甲基-1-丁醇	3.561	572836	0.095	0.11
異丁酸乙酯	3.861	142056	0.024	0.03
3-甲基-2-丁烯-1-醇	4.048	302558	0.050	0.06
3-甲基-2-丁烯醛	4.152	585690	0.097	0.12
乙酸丁酯	4.502	29665	0.005	0.01
乙酸3-甲基丁酯	5.194	271797	0.045	0.05
乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯	5.281	705366	0.117	0.14
乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯	5.675	815186	0.136	0.16
(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯	6.766	207061	0.034	0.04
(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯	6.863	94294	0.016	0.02
2,3-環庚烯醇吡啶	8.983	135104	0.022	0.03

1 GC面積為對應於所列化合物之峰下方的未修正面積。

2 面積%為峰面積相對於所有化合物之總峰面積，以%表示。

3 比率%為峰面積相對於2-甲基-1,3-丁二烯之峰面積，以%表示。

III. 源自醱酵之異戊二烯中不存在C5烴異構體

使用於液氮中冷卻之2 mL頂部空間小瓶進行醱酵釋出氣體中存在之異戊二烯的低溫捕獲。首先使釋出氣體(1 L/min)通過含有氫氧化鈉顆粒之20 mL小瓶以使2 mL小瓶(-196℃)中冰及固體CO_2之積累最少。使約10 L釋出氣體通過小瓶，此後在通氣下將其溫至-78℃，接著用新瓶蓋重新密封且藉由GC/MS進行分析。

以使用100 μL氣密性注射器之Agilent 6890 GC/MS系統，以頂部空間模式進行GC/MS頂部空間分析。使用Zebron ZB-624 GC/MS管柱(30 m×250 μm；1.40 μm膜厚度)分離分析物。GC自動注射器配備有氣密性100 μL注射器，且調整針高度以允許注射來自2 mL GC小瓶之50 μL頂部空間樣品。GC/MS方法利用氦作為載氣，流速為1 mL/min。保持注射口在200℃下，分流比為20:1。歷經5分鐘之分析持續時間，保持烘箱溫度為37℃。以m/z為55、66、67及70之單離子監測(SIM)模式操作Agilent 5793N質量選擇偵測器。在此等條件下，觀測到異戊二烯在2.966分鐘時溶離(圖88B)。亦使用此方法分析石油來源性異戊二烯(Sigma-Aldrich)之標準物，且發現其含有其他C5烴異構體，該等異構體在主峰之前或之後不久溶離且基於經修正之GC面積來定量(圖88A)。

表8A：石油來源性異戊二烯之GC/MS分析

化合物	RT(min)	GC面積	全部C5烴之面積%
2-甲基-1-丁烯	2.689	18.2×10^3	0.017%
(Z)-2-戊烯	2.835	10.6×10^4	0.101%
異戊二烯	2.966	10.4×10^7	99.869%
1,3-環戊二烯(CPD)	3.297	12.8×10^3	0.012%

表8B：醱酵來源性異戊二烯之GC/MS分析(全部C5烴%)

化合物	RT(min)	經修正之GC面積	全部C5烴%
異戊二烯	2.966	8.1×10^7	100%

在獨立實驗中，分析C5烴之標準混合物以判定各化合物之偵測器回應值是否相同。該等化合物為2-甲基-1-丁烯、2-甲基-1,3-丁二烯、(E)-2-戊烯、(Z)-2-戊烯及(E)-1,3-戊二烯。在此狀況下，在Agilent DB-Petro管柱(100 m×0.25 mm，0.50 μm膜厚度)上於50℃下保持15分鐘來進行分析。GC/MS方法利用氦作為載氣，流速為1 mL/min。保持注射口在200℃下，分流比為50:1。以m/z 19至m/z 250之全掃描模式操作Agilent 5793N質量選擇偵測器。在此等條件下，濃度為100 μg/L之各標準物在實驗誤差內產生相同偵測器回應值。

IV. 使包含異戊二烯之組合物吸附於固相

使以生物方法製造之異戊二烯吸附於活性碳，使得固相含有50%至99.9%碳、0.1%至50%異戊二烯、0.01%至5%水及微量(<0.1%)其他揮發性有機組分。

使醱酵釋出氣體穿過保持於0℃下之銅冷凝線圈，接著

穿過顆粒狀二氧化矽乾燥劑過濾器以移除水蒸氣。接著使已除濕之釋出氣體穿過含碳過濾器(Koby Jr, Koby Filters, MA)，達到藉由GC/MS在過濾器排氣中偵測到異戊二烯析出之程度。可藉由計算釋出氣體中之濃度、總流動速率及在收集期之析出百分比間接地確定吸附於濾筒之異戊二烯的量。或者，可藉由熱、真空或溶劑介導之脫附自過濾器回收所吸附之異戊二烯。

V. 收集並分析經冷凝之異戊二烯

對醱酵釋出氣體除濕，且藉由經適合吸附劑(例如鹼石棉)過濾來移除CO_2。接著使所得釋出氣流穿過經液氮冷卻之冷凝器以冷凝氣流中之VOC。收集容器含有第三丁基兒茶酚以抑制所得異戊二烯冷凝物。藉由GC/MS及NMR分析冷凝物以使用標準方法(諸如本文所述之彼等方法)測定純度。

VI. 藉由醱酵製造異戊二烯醇

對表現野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌BL21 (DE3)菌株之釋出氣體進行的分析揭示，存在異戊二烯與3-甲基-3-丁烯-1-醇(異戊二烯醇)。整個醱酵過程之醱酵釋出氣體中該兩種化合物之含量展示於圖89中，如由頂部空間GC/MS所測定。在此實驗中，所獲得之異戊二烯醇(3-甲基-3-丁烯-1-醇，3-MBA)之含量接近10 $\mu g/L_{釋出氣體}$。其他實驗得到在醱酵釋出氣體中含量為約20 $\mu g/L_{釋出氣體}$。

實例11：在表現甲羥戊酸途徑基因且於批式補料培養物中醱酵之大腸桿菌中使生長與異戊二烯製造相分離

實例11說明使細胞生長與甲羥戊酸及異戊二烯製造相分離。

I. 醱酵條件

培養基配方(每公升醱酵培養基):

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基):K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後,添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液:

使用以下組分產生1000×改質痕量金屬溶液:單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中,用HCl/NaOH將pH值調整至3.0,接著補足體積,且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

用含有pTrcHis2AUpperPathway(亦稱為pTrcUpperMVA,圖91及圖92A-92C;SEQ ID NO:23)(50 μg/ml羧苄青黴素)或pCL PtrcUpperMVA(亦稱為pCL PtrcUpperPathway(圖26))(50 μg/ml壯觀黴素)質體之大腸桿菌細胞進行醱酵。對於製造異戊二烯之實驗,大腸桿菌細胞亦含有pTrc KKDyIkIS(50 μg/ml康黴素)質體。進行此等實驗以監測在

醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成甲羥戊酸或異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LA培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至在550 nm下所量測之光學密度為1.0之後，將其用於接種生物反應器。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。藉由添加IPTG達成誘導。藉由將經過氯酸(Sigma-Aldrich 244252號)處理之樣品(0.3 M，在4℃下培育5分鐘)施加於有機酸HPLC管柱(BioRad 125-0140號)來測定醱酵培養液中甲羥戊酸之濃度。藉由將培養液甲羥戊酸峰尺寸與藉由用過氯酸處理甲羥戊酸內酯(Sigma-Aldrich M4667號)形成D,L-甲羥戊酸而產生之校準曲線相比較來測定濃度。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為異戊二烯力價。

II. 在150-L規模下自表現pTrcUpperMVA質體之大腸桿菌BL21 (DE3)細胞製造甲羥戊酸

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之BL21 (DE3)細胞接種至含有45 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、以170 rpm震盪下培育5小時。將此溶液轉移至胰蛋白腖-酵母提取物培養基之5-L生物反應器中，且在30℃及27.5 rpm下使細胞生長至培養物之OD_{550}達到1.0。將5 L接種體接種至含有45-kg培養基之150 L生物

反應器中。當OD_{550}達到值為10時，使IPTG濃度達到1.1 mM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖60A中。甲羥戊酸力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到61.3 g/L(圖60B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖60C中，且與圖60A之比較說明生長與甲羥戊酸製造相分離。在52.5小時醱酵期間自14.1 kg所利用之葡萄糖製造之甲羥戊酸的總量為4.0 kg。在醱酵期間所利用之參與製造甲羥戊酸之碳的莫耳產率為34.2%。

III. 在15-L規模下自表現pTrcUpperMVA質體之大腸桿菌BL21 (DE3)細胞製造甲羥戊酸

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之BL21 (DE3)細胞接種至含有500 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、160 rpm下生長至OD_{550}為1.0。將此物質接種至含有4.5 kg培養基之15-L生物反應器中。當OD_{550}達到值為10時，使IPTG濃度達到1.0 mM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖61A中。甲羥戊酸力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到53.9 g/L(圖61B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖61C中，且與圖61A之比較說明生長與甲羥戊酸製造相分離。在46.6小時醱酵期間自2.1 kg所利用之葡萄糖製造之甲羥戊酸的總量為491 g。在醱酵期間所利用之參與製造甲羥戊酸之碳的莫耳產率為28.8%。

IV. 在15-L規模下自表現pTrcUpperMVA質體之大腸桿菌FM5細胞製造甲羥戊酸

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之FM5細胞接種至含有500 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、160 rpm下生長至OD_{550}為1.0。將此物質接種至含有4.5-kg培養基之15-L生物反應器中。當OD_{550}達到值為30時，使IPTG濃度達到1.0 mM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖62A中。甲羥戊酸力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到23.7 g/L(圖62B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖62C中，且與圖62A之比較說明生長與甲羥戊酸製造相分離。在51.2小時醱酵期間自1.1 kg所利用之葡萄糖製造之甲羥戊酸的總量為140 g。在醱酵期間所利用之參與製造甲羥戊酸之碳的莫耳產率為15.2%。

V. 在15-L規模下自表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之大腸桿菌BL21 (DE3)細胞製造異戊二烯

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之BL21 (DE3)細胞接種至含有500 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、160 rpm下生長至OD_{550}為1.0。將此物質接種至含有4.5-kg培養基之15-L生物反應器中。當OD_{550}達到值為10時，使IPTG濃度達到25 μM。當OD_{550}達到190時，IPTG濃度升至50 μM。在醱酵38小時之時，IPTG濃度升至100 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖63A中。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到2.2公克/公升培養液(圖63B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖63C中，且與圖63A之比較說明生長與異戊二烯製

造相分離。在54.4小時醱酵期間自2.3 kg所利用之葡萄糖製造之異戊二烯的總量為15.9 g。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為1.53%。

VI. 在15-L規模下自表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之大腸桿菌BL21 (DE3) tuner細胞製造異戊二烯

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之BL21 (DE3) tuner細胞接種至含有500 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、160 rpm下生長至OD_{550}為1.0。將此物質接種至含有4.5-kg培養基之15-L生物反應器中。當OD_{550}達到值為10時，使IPTG濃度達到26 μM。當OD_{550}達到175時，IPTG濃度升至50 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖64A中。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到1.3公克/公升培養液(圖64B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖64C中，且與圖64A之比較說明生長與異戊二烯製造相分離。在48.6小時醱酵期間自1.6 kg所利用之葡萄糖製造之異戊二烯的總量為9.9 g。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為1.34%。

VII. 在15-L規模下自表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之大腸桿菌MG1655細胞製造異戊二烯

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之MG1655細胞接種至

含有500 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、160 rpm下生長至OD_{550}為1.0。將此物質接種至含有4.5-kg培養基之15-L生物反應器中。當OD_{550}達到值為45時，使IPTG濃度達到24 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖65A中。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到393毫克/公升培養液(圖65B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖65C中，且與圖65A之比較說明生長與異戊二烯製造相分離。在67.4小時醱酵期間自520 g所利用之葡萄糖製造之異戊二烯的總量為2.2 g。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為0.92%。

VIII. 在15-L規模下自表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之大腸桿菌MG1655ack-pta細胞製造異戊二烯

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之MG1655ack-pta細胞接種至含有500 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、160 rpm下生長至OD_{550}為1.0。將此物質接種至含有4.5-kg培養基之15-L生物反應器中。當OD_{550}達到值為10時，使IPTG濃度達到30 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖66A中。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到368毫克/公升培養液(圖66B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖66C中，且與圖66A之比較說明生長與異戊二烯製造相分離。在56.7小時醱酵期

間自531 g所利用之葡萄糖製造之異戊二烯的總量為1.8 g。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為0.73%。

IX. 在15-L規模下自表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之大腸桿菌FM5細胞製造異戊二烯

將如上文實例11部分I中所說明於板上生長之表現pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之FM5細胞接種至含有500 mL胰蛋白腖-酵母提取物培養基之燒瓶中，且在30℃、160 rpm下生長至OD_{550}為1.0。將此物質接種至含有4.5-kg培養基之15-L生物反應器中。當OD_{550}達到值為15時，使IPTG濃度達到27 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖67A中。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到235毫克/公升培養液(圖67B)。整個醱酵中之比生產力概況展示於圖67C中，且與圖67A之比較說明生長與異戊二烯製造相分離。在52.3小時醱酵期間自948 g所利用之葡萄糖製造之異戊二烯的總量為1.4 g。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為0.32%。

實例12：在表現甲羥戊酸途徑基因且於批式補料培養物中醱酵之大腸桿菌之指數生長期期間製造異戊二烯

實例12說明在細胞之指數生長期期間製造異戊二烯。

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

使用以下組分產生培養基(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨

0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

使用以下組分產生1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有pCL PtrcUpperMVA及pTrc KKDyIkIS質體之ATCC11303大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種5-L生物反應器。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在50小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為2.0 kg。藉由添加IPTG達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為10時，

使IPTG濃度達到25 μM。當OD_{550}達到190時，IPTG濃度升至50 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖99中。如本文所述測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到1.4 g/L(圖100)。在50小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為10.0 g。生物反應器內隨時間而變之異戊二烯比生產力概況展示於圖101中。在醱酵期間所利用之促成製造異戊二烯之碳的莫耳產率為1.1%。自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為0.5%。

實例13：異戊二烯之可燃性模型化與測試

I. 異戊二烯之可燃性模型化與測試之概述

對多種烴/氧氣/氮氣/水/二氧化碳混合物進行可燃性模型化與實驗。此模型化與測試實驗旨在界定在固定壓力及溫度下於指定蒸汽及一氧化碳濃度下異戊二烯及氧氣/氮氣之可燃性曲線。一批模型條件展示於表9中，且所進行之一批實驗展示於表5中。

表9.模型化異戊二烯可燃性之概述

系列	溫度 (℃)	壓力 (psig)	蒸汽濃度 (重量%)	二氧化碳濃度 (重量%)	異戊二烯濃度 (體積%)	氧氣濃度 (體積%)
A	40	0	0	0	變化	變化
B	40	0	4	0	變化	變化
C	40	0	0	5	變化	變化
D	40	0	0	10	變化	變化
E	40	0	0	15	變化	變化
F	40	0	0	20	變化	變化
G	40	0	0	30	變化	變化

表10.異戊二烯可燃性測試之概述

系列號	溫度 (℃)	壓力 (psig)	蒸汽 濃度 (體積%)	異戊二烯 濃度 (體積%)	氧氣 濃度 (體積%)
1	40	0	0	變化	變化
2	40	0	4	變化	變化

II. 計算絕熱火焰溫度(CAFT)模型之描述

使用燃燒傳播之計算絕熱火焰溫度(CAFT)以及所選極限火焰溫度來確定異戊二烯之可燃包絡範圍。此研究中用於計算火焰溫度之電腦程式為NASA Glenn Research Center CEA(化學平衡與應用(Chemical Equilibrium with Applications))軟體。

使用均勻燃燒機制(其中燃料與氧化劑均呈氣態)之絕熱火焰溫度模型確定可燃包絡範圍涉及五個步驟：選擇所要反應物，選擇測試條件，選擇極限火焰溫度，改變反應物，及自計算結果構建可燃包絡範圍。

在此選擇所要反應物之第一步驟中，必須決定將存在於系統中之反應物質及各者之量。在許多狀況下，用於計算之電腦程式具有反應物及產物物質之清單。若程式中未發現有待研究之物質的任何資料，則可自其他來源(諸如JANAF表)或自網際網路獲得資料。在此當前模型中，水、氮氣、氧氣及二氧化碳之資料存在於程式資料庫中。程式資料庫並不含異戊二烯物質；因此，手動併入熱力學特性。

下一步驟為決定發生燃燒過程之初始壓力及溫度條件。

在此模型中，壓力為1個大氣壓(絕對壓力)，且溫度為40℃(異戊二烯之沸點)。

燃燒之極限火焰溫度可基於理論原理進行選擇或以實驗方式測定。各方法具有其自身之限制。

基於先前研究，烴之極限火焰溫度處於1000 K至1500 K之範圍內。對於此模型，選擇之值為1500 K。此為一氧化碳至二氧化碳之反應(高度放熱反應，且形成大比例之火焰能)可自我維持之溫度。

一旦已決定極限火焰溫度，即對既定反應物混合物(物質濃度)進行模型計算且確定絕熱火焰溫度。僅在溫度高於極限火焰溫度時，視為已發生火焰傳播。接著改變反應物混合物組成以生成傳播及非傳播混合物之資料集。

此類型之模型顯示與以實驗方式確定之可燃限度良好吻合。所導出之包絡範圍以外之區域不可燃，且包絡範圍以內之區域可燃。包絡範圍形成鼻狀。包絡範圍之鼻端與氣態燃料之極限氧濃度(LOC)相關。

III. 計算絕熱火焰溫度(CAFT)模型之結果

系列A至G之CAFT模型結果分別繪製於圖68至圖74中。該等圖繪製對於若干氧氣/氮氣比率(以重量計)，隨燃料濃度(以重量計)而變之計算絕熱火焰溫度(使用NASA CEA程式)。高於1500 K(所選極限火焰溫度)之曲線部分含有足以供火焰傳播之燃料含量。以圖68至圖74中所呈現之形式可能難以解釋結果。另外，當前形式並不利於與一般依體積百分比呈現之實驗數據進行比較。

使用系列A作為實例，以傳統可燃包絡範圍之形式繪製圖68中之數據。使用圖68及橫越縱座標上1500 K溫度線之讀數，吾人可藉由使切線落至與該切線相交之各曲線(氧氣與氮氣之比率)的橫座標而確定此極限火焰溫度之燃料濃度。接著可以針對既定重量百分比的氧化劑之燃料重量百分比形式將此等值製成表格(圖75A)。接著在瞭解燃料組成(100重量%異戊二烯)及氧化劑組成(水、氧氣及氮氣之相對含量)之情況下，可確定莫耳量。

自此等莫耳量可計算體積百分比濃度。接著可繪製體積百分比濃度以產生可燃包絡範圍(圖75B)。包絡範圍所包括之區域為可爆炸範圍，且不包括之區域為非爆炸範圍。包絡範圍之「鼻端」為極限氧濃度。圖76A及圖76B含有自圖69中所呈現之數據產生之系列B之可燃包絡範圍的計算體積濃度。可對圖70-74中所呈現之數據使用類似方法。

IV. 可燃性測試實驗設備與程序

在4公升高壓容器中進行可燃性測試。該容器之形狀為圓筒形，其內部直徑為6"且內部高度為8.625"。使用由PID控制器控制之外部加熱器維持容器(及內部氣體)之溫度。為防止熱損失，在壓力容器周圍纏繞陶瓷棉及反射絕熱體。使用K型熱電偶量測氣體空間之溫度以及容器自身之溫度。圖77說明測試容器。

在進行測試之前，抽空容器且用氮氣吹掃以確保移除先前測試之任何氣體。接著將容器抽成真空。此舉完成後，

壓力通常為約0.06巴。歸因於氮氣吹掃，設想造成此初始壓力之氣體為氮氣。使用分壓，接著添加適量水、異戊二烯、氮氣及氧氣以達成所述測試條件。容器內磁性驅動之混合風扇確保氣態內含物混合。使氣體混合約2分鐘，在點火之前約1分鐘關閉風扇。

點火器在計時器電路上包含1.5歐姆鎳鉻線圈及AC電壓源。使用示波器，確定34.4 VAC歷經3.2秒傳遞至點火器。3.8安培之最大電流約一半進入點火週期中。因此，最大功率為131 W，且在點火週期中所提供之總能量為約210 J。

使用連接至數據擷取系統之可變磁阻Validyne DP215壓力轉導器擷取爆燃數據。若壓力升高大於或等於5%，則將氣體混合物視為已爆燃。

V. 可燃性測試之結果

在40℃及0 psig下，在無蒸汽下進行第一實驗系列(系列1)。在濃度變化之異戊二烯及氧氣下進行測試，產生圖78A中所示之可燃性曲線。此曲線中所示之數據點僅為毗鄰曲線之數據點。此系列所獲得之所有數據點之詳細清單展示於圖80A及圖80B中。

圖78B概述圖78A中所示之可爆炸數據點。圖78C為實驗數據與CAFT模型預測之可燃包絡範圍的比較。模型與實驗數據極好吻合。差異可歸因於測試腔室之非絕熱性質及模型之限制。模型著眼於氧化反應之無限時間範圍，且未將任何反應動力學限制考慮在內。

另外，模型受其資料庫中平衡化學物質之數目限制，且由此可能不會適當預測熱解物質。又，模型所開發之可燃包絡範圍使用極限火焰溫度之一個值(1500K)。視反應化學物質而定，極限火焰溫度之值可在1,000K至1,500K之範圍內。在高於化學計量之燃料/氧化劑含量的燃料濃度下所形成之熱解化學物質之複雜性質為模型可能不會準確預測此系統之可燃上限的一個原因。

在40℃及0 psig下，於4%之固定蒸汽濃度下進行第二實驗系列(系列2)。在濃度變化之異戊二烯及氧氣下進行測試，產生圖79A中所示之可燃性曲線。此曲線中所示之數據點僅為毗鄰曲線之數據點。此系列所獲得之所有數據點之詳細清單展示於圖81中。歸因於系列1中數據之間的相似性，僅測試可燃下限、極限氧濃度及可燃上限之關鍵點。添加4%蒸汽至測試混合物中並未顯著改變可燃包絡範圍之關鍵界限。應注意，較高濃度之蒸汽/水及/或其他惰性物可能影響可燃包絡範圍。

圖79B概述圖79A中所示之可爆炸數據點。圖79C為實驗數據與CAFT模型預測之可燃包絡範圍的比較。模型與實驗數據極好吻合。差異可歸因於系列1中所述之相同因素。

VI. 計算3個大氣壓之壓力下空氣中異戊二烯之可燃限度

實例13部分I至IV中所述之方法亦用於計算在3個大氣壓之系統絕對壓力及40℃下異戊二烯之可燃限度。將此等結果與實例13部分I至IV中在1個大氣壓之系統絕對壓力及

40℃下獲得之結果相比較。由於可燃包絡範圍因系統初始壓力增加而擴展或變大，故測試此較高壓力。可燃上限最受影響，其次為極限氧組成。可燃下限受影響最小(參見，例如「Bulletin 627-Flammability Characteristics of Combustible Gases and Vapors」由Michael G. Zabetakis撰寫且由先前美國礦務局(US Bureau of Mines)公開(1965)，其藉此以全文引用的方式併入，尤其關於可燃限度之計算)。

在圖82中，繪製隨異戊二烯(燃料)濃度(以總燃料/氮氣/氧氣之重量百分比表示)而變之計算絕熱火焰溫度，其中系統壓力最初為3個大氣壓。計算火焰溫度與最初在1個大氣壓之系統中所確定之計算火焰溫度極為類似(圖83)。因此，當使用計算絕熱可燃數據產生可燃包絡範圍時，曲線極為類似(見圖84及圖85)。因此，基於此等理論計算結果，系統壓力自1個大氣壓增至3個大氣壓不會導致可燃包絡範圍顯著增加/變寬。必要時，可使用實驗測試(諸如本文所述在1個大氣壓之壓力下的實驗測試)驗證此等模型結果。

VII. 可燃性研究之概述

針對40℃及0 psig下異戊二烯/氧氣/氮氣/水/二氧化碳系統之可燃包絡範圍開發計算絕熱溫度模型。所開發之CAFT模型與在此項工作中進行之測試所產生之實驗數據良好吻合。系列1及2之實驗結果驗證系列A及B之模型結果。

實例14：表現構築體與菌株

I. 構築編碼甲羥戊酸激酶之質體

合成編碼馬氏甲烷球菌(*Methanosarcina mazei*)下游MVA途徑之構築體(寄存編號NC_003901.1、NC_003901.1、NC_003901.1及NC_003901.1，各藉此以全文引用的方式併入)，同時針對大腸桿菌中之表現進行密碼子最佳化。此構築體稱為馬氏甲烷球菌(*M. mazei*)古生下游途徑操縱子(圖112A-112C；SEQ ID NO:27)且編碼馬氏甲烷球菌MVK(一種推定的去羧酶)、IPK及IDI酶。根據製造商之方案，使用黏接溫度為55℃且延長時間為60秒之30次循環，使用Strategene Herculase II Fusion套組，利用引子MCM165及MCM177(表11)對編碼MVK之基因(寄存編號NC_003901.1)進行PCR擴增。使用Qiagen PCR管柱純化此擴增子，接著在37℃下於10 μL含PmeI之反應物中(在NEB緩衝液4及BSA存在下)分解。1小時後，添加NsiI及Roche緩衝液H，在37℃下再持續1小時。在Qiagen PCR管柱上純化經分解之DNA，且將其接合於11 μL反應物、5 μL Roche快速接合酶緩衝液1、1 μL緩衝液2、1 μL質體、3 μL擴增子及1 μL接合酶中以類似方式分解並純化之質體MCM29(MCM29為經編碼野葛異戊二烯合成酶之pTrcKudzu轉型之大腸桿菌TOP10(Invitrogen))(在室溫下1小時)。MCM 29為pTrcKudzuKan。將接合反應物引入Invitrogen TOP10細胞中，且在LA/kan50板上、於37℃下培育隔夜，藉此選擇轉型體。對所得質體MCM382中之

MVK插入物進行定序(圖113A-113C；SEQ ID NO:28)。

表11.寡核苷酸

MCM161	馬氏甲烷球菌 MVK for	CACCATGGTATCCTGTTCTGCG(SEQ ID NO:120)
MCM162	馬氏甲烷球菌 MVK rev	TTAATCTACTTTCAGACCTTGC(SEQ ID NO:121)
MCM165	馬氏甲烷球菌 MVK for w/ RBS	gcgaacgATGCATaaaggaggtaaaaaaacATGGTATCCTGTTCTG CGCCGGGTAAGATTTACCTG(SEQ ID NO:122)
MCM177	馬氏甲烷球菌 MVK rev Pst	gggcccgtttaaactttaactagactTTAATCTACTTTCAGACCTTGC (SEQ ID NO:123)

II. 產生過度表現甲羥戊酸激酶及異戊二烯合成酶之菌株

將質體MCM382轉型至已於LB培養基中生長至對數中期且在冰冷無菌水中洗滌三次之MCM331細胞(其含有編碼釀酒酵母甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之染色體構築體gi1.2KKDyI)中。將1 μL DNA添加至50 μL細胞懸浮液中，且在2 mm電擊管中以2.5伏特(volt)、25 μFd對此混合物進行電穿孔，隨即在37℃下於500 μL LB培養基中回收1小時。轉型體在LA/kan50上選擇且稱為MCM391。由相同電穿孔方案將質體MCM82引入此菌株中，接著在LA/kan50/spec50上進行選擇。所得菌株MCM401含有cmp標記之染色體構築體gi1.2KKDyI、kan標記之質體MCM382，及spec標記之質體MCM82(其為編碼糞腸球菌mvaE及mvaS之pCL PtrcUpperPathway)。參見表12。

表12.過度表現甲羥戊酸激酶及異戊二烯合成酶之菌株

MCM382	大腸桿菌BL21 (λDE3) pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌)GI1.2KKDyI
MCM391	MCM331 pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌)
MCM401	MCM331pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌)pCLPtrcUpperpathway
MCM396	MCM333pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌)
MCM406	MCM333pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌)pCLPtrcUpperpathway

III. 構築質體MCM376-來自pET200D中馬氏甲烷球菌古生下游途徑之MVK

使用Invitrogen Platinum HiFi PCR混合物，使用引子MCM161及MCM162(表11)對來自馬氏甲烷球菌古生下游途徑操縱子(圖112A-112C；SEQ ID NO:27)之MVK ORF進行PCR擴增。將45 μL PCR混合物與1 μL模板、各1 μL之引子(10 μM)及2 μL水組合。反應如下循環：94℃下持續2分鐘；94℃下持續30秒、55℃下持續30秒及68℃下持續1分15秒，循環30次；接著72℃下持續7分鐘；及4℃下直至冷卻。根據製造商之方案，將3 μL此PCR反應物接合於Invitrogen pET200D質體。將3 μL此接合物引入Invitrogen TOP10細胞中，且在LA/kan50上選擇轉型體。自轉型體分離質體且對插入物進行定序，得到MCM376(圖114A-114C；SEQ ID NO:29)。

IV. 產生表現菌株MCM378

根據製造商之方案，將質體MCM376轉型至Invitrogen BL21(DE3) pLysS細胞中。在LA/kan50上選擇轉型體MCM378。

實例15：在20 mL分批規模下由表現上游甲羥戊酸(MVA)途徑、整合下游MVA途徑(gi1.2KKDyI)、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶及野葛異戊二烯合成酶且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

每公升醱酵培養基含有K_2HPO_4 13.6 g、KH_2PO_4 13.6 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、$(NH_4)_2SO_4$ 3.2 g、酵母提取物1 g及1000×痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至6.8且補足體積。用0.22微米過濾器對培養基進行過濾滅菌。滅菌及調整pH值之後，添加葡萄糖(2.5 g)及抗生素。

1000×痕量金屬溶液：

1000×痕量金屬溶液含有單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

菌株：

MCM343細胞為含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(pCL上游)、整合下游MVA途徑(gi1.2KKDyI)及野葛異戊二烯合成酶(pTrcKudzu)之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞。

MCM401細胞為含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(pCL

PtrcUpperPathway)、整合下游MVA途徑(gi1.2KKDyI)及高表現量之馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶與野葛異戊二烯合成酶(pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌))之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞。

藉由在30℃之溫度下使菌株以20 mL工作體積於100 mL生物反應器中生長來分析異戊二烯產量。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在30℃下培育。將單一群落接種至培養基中且生長隔夜。將細菌稀釋至20 mL培養基中直至550 nm下所量測之光學密度達到0.05。密封100 mL生物反應器，且以8 mL/min之速率泵出空氣。藉由使用磁性攪拌棒以600 rpm攪拌而對培養基進行充分攪動。使用線上Hiden HPR-20質譜儀分析生物反應器之釋出氣體。監測對應於異戊二烯、CO_2及空氣中天然存在之其他氣體的質量。藉由合計隨時間而變之各別氣體濃度(%)來計算積累之異戊二烯及CO_2產量。自總和扣除大氣CO_2以估算因代謝活性而釋放之CO_2。

將表現完整甲羥戊酸途徑及野葛異戊二烯合成酶之菌株(MCM343)的異戊二烯產量與在100 mL生物反應器中另外亦過度表現馬氏甲烷球菌MVK及野葛異戊二烯合成酶之菌株(MCM401)相比較。在相同條件下使細菌於葡萄糖作為碳源之合成培養基(defined media)中生長。藉由添加異丙基-β-D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)誘導製造異戊二烯，最終濃度為100 μM或200 μM。釋出氣體量測結果揭示，過

度表現MVK與異戊二烯合成酶之菌株(MCM401)相比僅表現甲羥戊酸途徑及野葛異戊二烯合成酶之菌株(MCM343)製造顯著更多異戊二烯，如圖115A-115D中所示。在100 μM誘導下，MCM401菌株所製造之異戊二烯為MCM343菌株的2倍。在200 μM IPTG誘導下，MCM401菌株所製造之異戊二烯為MCM343菌株的3.4倍。對生物反應器之釋出氣體中之CO_2(其為代謝活性之量度)的分析指示，代謝活性與IPTG誘導及異戊二烯製造無關。

實例16：在15-L規模下由表現上游甲羥戊酸(MVA)途徑、整合下游MVA途徑(gi1.2KKDyI)、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶及野葛異戊二烯合成酶且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

每公升醱酵培養基含有K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

1000×改質痕量金屬溶液含有單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐

一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(編碼糞腸球菌mvaE及mvaS之pCL PtrcUpperPathway)、整合下游MVA途徑(編碼釀酒酵母甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之gi1.2KKDyI)及高表現量之馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶與野葛異戊二烯合成酶(pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌))之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白胨-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種15-L生物反應器中之5-L培養基。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在68小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為3.8 kg。藉由添加異丙基-β-D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為9時，使IPTG濃度達到51 μM。當OD_{550}達到149時，IPTG濃度升至88 μM。當OD_{550}=195時，再添加IPTG使濃度升至119 μM；且當OD_{550}=210時，再添加IPTG使濃度升至152 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖116中。使用Hiden

質譜儀測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到23.8 g/L(圖117)。在68小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為227.2 g，且製造時程展示於圖118中。如由TCER量測之代謝活性概況展示於圖119中。在醱酵10小時與39小時之間，總活菌數(總群落形成單位)降低兩個數量級(圖120)。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為13.0%。自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為6.3%。

實例17：在15-L規模(2×100 μM IPTG誘導)下由表現上游甲羥戊酸(MVA)途徑、整合下游MVA途徑(gi1.2KKDyI)、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶及野葛異戊二烯合成酶且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

每公升醱酵培養基含有K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

1000×改質痕量金屬溶液含有單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100

mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15 L生物反應器中，用含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(編碼糞腸球菌mvaE及mvaS之pCL PtrcUpperPathway)、整合下游MVA途徑(編碼釀酒酵母甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之gi1.2KKDyI)及高表現量之馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶與野葛異戊二烯合成酶(pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌))之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種15-L生物反應器中之5-L培養基。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在55小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為1.9 kg。藉由添加異丙基-β-D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為9時，使IPTG濃度達到111 μM。當OD_{550}達到155時，IPTG濃度升至193 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖121中。使用Hiden質譜儀測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含

量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到19.5 g/L(圖122)。在55小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為133.8 g，且製造時程展示於圖123中。瞬時體積生產力水準達到高達1.5公克異戊二烯/公升培養液/小時之值(圖124)。瞬時產率水準達到高達17.7% w/w(圖125)。如由TCER量測之代謝活性概況展示於圖126中。在醱酵8小時與36小時之間，總活菌數(總群落形成單位)降低兩個數量級(圖127)。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為15.8%。在整個醱酵中自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為7.4%。

另外，作為對照，在15-L生物反應器中，用含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(編碼糞腸球菌mvaE及mvaS之pCL PtrcUpperPathway)、整合下游MVA途徑(編碼釀酒酵母甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之gi1.2KKDyI)及高表現量之馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶與野葛異戊二烯合成酶(pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌))之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖起，如由CER量測之未經誘導細胞代謝活性。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株(上述MCM401)之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種15-L生物反應器中之5-L培養基。以指數速率補給

葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。

圖148比較上述未經誘導細胞與實例16及17中藉由添加異丙基-β-D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)而誘導之細胞的CER概況。

實例18：在15-L規模(補給1×50 μM IPTG+150 μM IPTG進行誘導)下由表現上游甲羥戊酸(MVA)途徑、整合下游MVA途徑(gi1.2KKDyI)、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶及野葛異戊二烯合成酶且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

每公升醱酵培養基含有K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

1000×改質痕量金屬溶液含有單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(編碼糞腸球菌mvaE及mvaS之pCL PtrcUpperPathway)、整合下游MVA途徑(編碼釀酒酵母甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之gi1.2KKDyI)及高表現量之馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶與野葛異戊二烯合成酶(pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌))之BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在37℃下培育。將單一群落接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種15-L生物反應器中之5-L培養基。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在55小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為2.2 kg。藉由添加異丙基-β-D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為10時，使IPTG濃度達到51 μM。除外加(spike)IPTG以外，當OD_{550}=10時，亦開始恆定補料且經18小時傳遞164 mg IPTG。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖128中。使用Hiden質譜儀測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，最終值達到22.0 g/L(圖129)。在55小時醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為170.5 g，且製

造時程展示於圖130中。如由TCER量測之代謝活性概況展示於圖131中。當歷經約1.7小時進入生物反應器之氣流自8 slpm降至4 slpm時，釋出氣體中異戊二烯之濃度自0.51%增至0.92%(w/w)(圖132)。如由總二氧化碳析出速率(TCER)量測，此等異戊二烯含量升高似乎不會對細胞代謝活性造成任何負面影響，因為在37.2小時與39.3小時之間TCER僅下降7%(圖132)。在醱酵7小時與36小時之間，總活菌數(總群落形成單位)降低兩個數量級(圖133)。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率為16.6%。在整個醱酵中自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率為7.7%。

實例19：外部施加之異戊二烯對1 L規模下於批式補料培養物中生長之野生型大腸桿菌的影響

培養基配方(每公升醱酵培養基)：

每公升醱酵培養基含有K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g及1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：

1000×改質痕量金屬溶液含有單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100

mg、H_3BO_3 100 mg及$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在1-L生物反應器中，用BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度30℃下於葡萄糖批式補料生物反應器中異戊二烯對細胞生存力及代謝活性的影響。將來自冷凍小瓶之大腸桿菌菌株之接種體接種至胰蛋白腖-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用50 mL接種體接種1-L生物反應器中之0.5-L培養基。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，補給葡萄糖補料以滿足代謝需求。使用氮氣作為載體向生物反應器中補給異戊二烯。在生長中期(OD_{550}=31-44)，異戊二烯補給速率為1 g/L/h，且持續總共75分鐘(13.2小時至14.4小時)。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖134中。如由TCER量測之代謝活性概況展示於圖135中。在將異戊二烯引入生物反應器中之時段期間，總活菌數(總群落形成單位)增加14倍(圖136)。

實例20：由釀酒酵母製造異戊二烯及表現異戊二烯合成酶

根據雜交釀酒酵母/甲醇酵母(*Pichia pastoris*)密碼子使用表針對表現對野葛異戊二烯合成酶進行最佳化，合成該酶，且將其選殖至pDONR221:19430中(藉由DNA 2.0，圖140展示圖譜且圖141展示序列(SEQ ID NO:38))。根據製造商之方案進行Gateway®選殖(Invitrogen)反應：由於

pDONR221:19430為「入口」載體，故使用LR Clonase II酶(LR反應物)將經密碼子最佳化之異戊二烯合成酶引入「目的」載體pYES-DEST52(Invitrogen)中。

接著，根據製造商之方案將LR反應物轉型至Top10化學性勝任細胞(Invitrogen)中，且在含有50 μg/ml羧苄青黴素之LA板上選擇具有含異戊二烯合成酶ORF之pYES-DEST52質體的細菌。藉由使用illustra PuReTaq Ready-To-Go™ PCR珠粒(GE Healthcare)，以T7前置引子及酵母異戊二烯合成酶-Rev2引子(參見表13)進行群落PCR(關於引子濃度及熱循環參數，見下文)來測試個別陽性轉型體。

表13.擴增異戊二烯合成酶之引子序列

引子名稱	序列(5'至3')	用途
酵母HGS-For2	CACCAAAGACTTCATAGACT (SEQ ID NO:124)	供最佳化之酵母異戊二烯合成酶用之前置引子
酵母HGS-Rev2	AGAGATATCTTCCTGCTGCT (SEQ ID NO:125)	供最佳化之酵母異戊二烯合成酶用之反置引子
T7前置引子	TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO:126)	PCR及定序引子

由miniprep(Qiagen)純化得到正確尺寸(1354 bp)之PCR片段的質體，且發送以供使用T7前置引子及酵母異戊二烯合成酶-For2引子(參見表13)進行定序(Quintara Biosciences, Berkeley, CA)。將定序操作之結果與pDONR221:19430之已知序列相比較(使用Vector NTI軟體，Invitrogen)，且選擇單一質體pDW14以供進一步研究(圖142A展示圖譜，且圖142B及C展示完整序列(SEQ ID NO:39))。pDW14序列與pDONR221:19430序列之差異在於單一核苷酸(在圖142B中

以粗體標記)。單一核苷酸變化(G變為A)不會導致ORF發生變化，因為其處於離胺酸編碼密碼子之第三位置處。

使用釀酒酵母EasyComp轉型套組(Invitrogen)中所述之方案，將經純化之pDW14轉型至釀酒酵母菌株INVSc-1中。如pYES-DEST52 Gateway Vector手冊(Invitrogen)中所述，在含2%葡萄糖、不含尿嘧啶之SC基本培養基上選擇並維持具有pDW14或pYES-DEST52(其含有完整URA3基因)之INVSc-1菌株。選擇含有pDW14之INVSc-1及具有pYES-DEST52之單一對照菌株的兩個獨立分離株以供進一步分析。

為誘導異戊二烯合成酶表現，使培養物於液體SC基本培養基中生長隔夜。接著將培養物稀釋至OD_{600}為約0.2且生長2-3小時。使培養物旋轉離心，洗滌一次，再懸浮於等體積(10 ml)之含1%棉子糖、2%半乳糖、不含尿嘧啶的SC基本培養基中，且生長隔夜以誘導異戊二烯合成酶表現。測定菌株之OD_{600}(圖144A)，藉由離心收集菌株並使其再懸浮於2 ml溶解緩衝液(50%甘油與PEB(pH 7.4，Tris鹼2.423 g/L、$MgCl_2$(無水)1.904 g/L、KCl 14.910 g/L、DTT 0.154 g/L、甘油50 mL/L)之1:1混合物)中。

使溶解混合物通過弗氏壓碎器三次，且由SDS-PAGE分析溶菌液。為進行庫馬斯凝膠分析(Coomassie gel analysis)(圖143A)，根據製造商之方案(Invitrogen Novex系統)，用含還原劑之2×SDS負載緩衝液以1:1稀釋樣品，將其(總體積20 μl)負載至4-12% bis-tris凝膠上，在MES緩

衝液中進行電泳，且使用SimplyBlue SafeStain染色。

使用WesternBreeze套組(Invitrogen)轉移異戊二烯合成酶且在硝化纖維素膜上進行呈色偵測。一次抗體為以1:1000稀釋於Invitrogen抗體稀釋劑中之10週1799A。進行一次抗體結合，接著用標記有Alexa Fluor 488之二次抗體(Invitrogen，目錄號A-11008)顯色以允許定量測定信號。如Invitrogen所述進行西方墨點程序。以使用藍色濾光片設置之Molecular Dynamics Storm儀器記錄螢光信號，且以Molecular Dynamics ImageQuant影像分析套裝軟體進行定量分析。自所製造之異戊二烯之量除以誘導培養物之A_{600}或由西方墨點法測定之異戊二烯合成酶蛋白濃度的比率來計算文庫成員之比活性。圖143B展示與具有pYES-DEST52之對照(泳道1)相比，異戊二烯合成酶存在於具有pDW14之經誘導INVSc-1菌株(泳道2及3)中。

對來自各菌株之25 μL溶菌液進行異戊二烯合成酶頂部空間DMAPP檢驗，該溶菌液中添加有5 μL 1 M $MgCl_2$、5 μL 100 mM DMAPP及65 μL 50 mM Tris(pH 8)。在30℃下於1.8 mL氣密性GC管中進行反應，持續15分鐘。藉由添加100 μL 250 mM EDTA(pH 8)終止反應。圖144B展示與對照相比，具有pDW14之經誘導菌株的比活性值(μg HG/L/OD)。具有pDW14之經誘導菌株所展示之活性為缺乏異戊二烯合成酶之對照的約20倍。

PCR循環參數

Illustra PuReTaq Ready-To-Go™ PCR珠粒(GE

Healthcare)與濃度各為0.4 μM之寡核苷酸引子對一起使用，總體積/反應為25 μl。為分析由LR Clonase反應(Invitrogen)所得之質體，將來自選擇性板上之個別群落的少量細菌添加至含有上述PCR混合物之各管中。反應循環如下：1)95℃下持續4分鐘；2)95℃下持續20秒；3)52℃下持續20秒；4)72℃下持續30秒；步驟2至4循環5次；5)95℃下持續20秒；6)55℃下持續20秒；7)72℃下持續30秒；步驟5至7循環25次，72℃下持續10分鐘，及4℃下直至冷卻。

實例21：在假單胞菌中製造異戊二烯，及結合假單胞菌構築pBBR5HGSOpt2_2之其他革蘭氏陰性細菌，及量測異戊二烯合成酶活性

針對不同的相關微生物物種對編碼大葛藤(野葛植物)異戊二烯合成酶之基因進行密碼子最佳化(表14；fluo-opt2v2為所選序列)，且藉由DNA2.0(Menlo Park, CA)合成該基因。fluo-opt2v2之圖譜及序列可見於圖145A及圖145B中(SEQ ID NO:40)。將HindIII及BamHI限制性位點添加至合成之序列中以更易於選殖，且在ATG之前添加RBS以增強轉錄。

在不同型式之經密碼子最佳化之大葛藤異戊二烯合成酶中，稀有密碼子之數目隨微生物物種而變。數輪最佳化使得所有相關物種中之基因均不含稀有密碼子。

表14.稀有密碼子之數目

生物體	fluo-opt1(引用)	fluo-opt2	fluo-opt3	大腸桿菌opt	fluo-opt2v2
螢光假單胞菌Pf-5	19	X	X	57	0
沼澤紅假單胞菌CGA009	37	13	3	74	0
惡臭假單胞菌F1	0	0	0	29	0
麩胺酸棒狀桿菌(ATCC)	4(Ser)	0	0	0	0
螢光假單胞菌PfO-1	1(Val)	0	0	57	0

基因係由DNA2.0提供於選殖載體中。用HindIII/BamHI分解載體，對對應於相關插入物之色帶進行凝膠純化，且與經HindIII/BamHI分解之pBBR1MCS5(Kovach等人，*Gene* 166:175-176, 1995，其以全文引用的方式併入，尤其關於pBBR1MCS5)(圖146A展示圖譜且圖146B及C展示序列(SEQ ID NO:41))一起移交。此得到質體pBBR5HGSOpt2_2(圖147A展示圖譜且圖147B及C展示序列(SEQ ID NO:42))，其中異戊二烯合成酶係自pBBR1MCS5中呈現之lac啟動子表現。

將載體轉型於大腸桿菌S17-1中且與惡臭假單胞菌F1 ATCC700007及螢光假單胞菌ATCC 13525一起交配。在LB上結合之後，於M9+16 mM檸檬酸鈉+50 μg/ml慶大黴素上選擇具有質體之假單胞菌屬菌株。使用Qiagen套組(Valencia, CA)，由質體製劑檢查由此產生之菌株中質體的存在。

藉由使菌株於TM3培養基(如實例1部分II中所述)+10 g/L葡萄糖中生長，收集對數中期之生質，由弗氏壓碎器打碎細胞且進行DMAPP檢驗來檢驗重組菌株惡臭假單胞菌、

pBBR5HGSOpt2_2及螢光假單胞菌之異戊二烯合成酶活性。檢驗結果呈現於表15中。由DMAPP檢驗量測到活性存在，確認異戊二烯合成酶於假單胞菌中表現。

在使用質體pBBR5HGSOpt2_2自lac啟動子表現異戊二烯合成酶之惡臭假單胞菌及螢光假單胞菌中檢查異戊二烯合成酶活性。

表15.惡臭假單胞菌及螢光假單胞菌中之異戊二烯合成酶活性

菌株	OD	異戊二烯合成酶活性 mg異戊二烯/(L·h·OD)
螢光假單胞菌，pBBR5HGSOpt2_2	1.46	0.96
惡臭假單胞菌，pBBR5HGSOpt2_2	3.44	0.65
對照(惡臭假單胞菌，無質體)	8.32	待測定

實例22：大腸桿菌及假單胞菌屬菌株於蔗糖上相比於葡萄糖上之生長，及使用兩種受質表現異戊二烯合成酶

I. 製備液體蔗糖

按以下方式將結晶原料蔗糖溶解於水中：向250 g糖中添加750 g H_2O。攪拌溶液且溫和加熱直至溶解。某種物質不可溶。溶解後將溶液重量調整至1 kg以補充蒸發之水。量測溶液體積為940 mL。因此，溶液濃度為265 g/L。產品標籤標明15 g原料蔗糖中有14 g碳水化合物。因此，溶液之碳水化合物濃度為248 g/L。量測乾固體為24.03%，充分接近預期的250 g/kg。溶液之pH值為5.49。使用酶促/光譜檢驗，以葡萄糖氧化酶量測葡萄糖濃度。葡萄糖濃度為17.4 g/L。

由於大多數微生物不使用蔗糖，但可使用葡萄糖及果糖，故將溶液一分為二。一半進行一次高壓滅菌，持續30分鐘(原樣蔗糖)。發生某種轉化，因為葡萄糖含量增至29.75 g/L(參見圖149)。使用磷酸將另一半溶液調整至pH 4.0，接著藉由高壓滅菌使溶液轉化(轉化蔗糖)。三次30分鐘循環足以獲得完全轉化，如圖149中所示。將兩種溶液用於下文所述之生長曲線。

II. 不同大腸桿菌及假單胞菌屬菌株於蔗糖上相比於葡萄糖上之生長曲線

在25 ml TM3+10 g/L葡萄糖中接種表16中呈現之各菌株之一個群落，且在30℃及200 rpm下生長隔夜。TM3描述於實例7章節II中。次日早晨，使用各1 ml之培養物接種含有25 mL TM3及10 g/L葡萄糖、10 g/L原樣蔗糖或10 g/L轉化蔗糖(上述蔗糖溶液)之燒瓶。在30℃及200 rpm下培育該等燒瓶，且有規律地獲取樣品以量測OD_{600}。圖150及圖151展示對於葡萄糖及轉化蔗糖，假單胞菌屬菌株與大腸桿菌菌株之生長速率及生質產率相當。螢光假單胞菌顯示一些亦能夠使用未轉化之蔗糖的跡象。

表16.此研究中所用之菌株

	菌株
大腸桿菌	BL21
	MG1655
	ATCC11303
	B REL 606
假單胞菌屬	惡臭假單胞菌F1(ATCC700007)
	螢光假單胞菌(ATCC13525)

III. 比較表現異戊二烯合成酶之大腸桿菌於葡萄糖或蔗糖上生長時的異戊二烯產量

使如實例14章節II中所述含有完整MVA途徑、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶及大葛藤異戊二烯合成酶之大腸桿菌MCM401(BL21(DE3))於TM3+10 g/L葡萄糖或10 g/L轉化蔗糖(基於糖漿之碳水化合物濃度)中生長。用在TM3+10 g/L葡萄糖上達到OD_{600}=0.2之隔夜培養物接種燒瓶。必要時添加抗生素。兩小時後，用400 μM IPTG誘導大腸桿菌培養物。生長6小時後，使用如實例2B中所述之DMAPP檢驗來量測異戊二烯產量及異戊二烯合成酶活性。結果呈現於表17中且明確說明以每個細胞計在異戊二烯及異戊二烯合成酶產量方面轉化蔗糖與葡萄糖等效。

表17.

菌株	碳源	OD	異戊二烯合成酶活性 mg異戊二烯/(L·h·OD)	異戊二烯產量 mg異戊二烯/(L·h·OD)
MCM401	葡萄糖	2.20	21.06	8.98
MCM401	轉化蔗糖	2.32	20.20	9.23

實例23：構築表現釀酒酵母gi1.2KKDyI操縱子、銀白楊異戊二烯合成酶、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶、pCL上游MVA(糞腸球菌mvaE及mvaS)及ybhE (pgl)之大腸桿菌菌株

(i)構築菌株EWL201(BL21, Cm-GI1.2-KKDyI)

大腸桿菌BL21(Novagen商標，EMD Biosciences, Inc.)為經MCM331 P1溶菌液(根據Ausubel等人，*Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.中所述之方法製備的溶菌液)轉導之接受菌株。MCM331細

胞含有編碼釀酒酵母甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之染色體構築體gi1.2KKDyI(亦即，來自釀酒酵母之gi1.2-KKDyI操縱子)。藉由將細胞塗佈於L瓊脂及20 μg/μl氯黴素上來選擇轉導體。在30℃下培育板隔夜。轉導體之分析顯示，對照板(針對逆轉之水+細胞對照板，及針對溶菌液污染之水與P1溶菌液對照板)上無群落。

揀選四個轉導體且用於接種5 mL L培養液及20 μg/μl氯黴素。在30℃、以200 rpm震盪下使培養物生長隔夜。為製造各轉導體之基因組DNA製劑以供PCR分析，對1.5 mL隔夜細胞培養物進行離心。用400 μl再懸浮緩衝液(20 mM Tris、1 mM EDTA、50 mM NaCl，pH 7.5)使細胞顆粒再懸浮，且添加4 μl不含DNase之RNase(Roche)。在37℃下將管培育30分鐘，接著添加4 μl 10% SDS及4 μl 10 mg/ml蛋白酶K儲備溶液(Sigma-Aldrich)。在37℃下將管培育1小時。將細胞溶菌液轉移至2 ml Phase Lock Light Gel管(Eppendorf)中，且添加各200 μl之飽和苯酚(pH 7.9)(Ambion Inc.)及氯仿。將管充分混合，且微量離心5分鐘。用400 μl氯仿進行第二次萃取，且將水層轉移至新的eppendorf管中。藉由添加1 ml 100%乙醇且離心5分鐘而使基因組DNA沈澱。用1 ml 70%乙醇洗滌基因組DNA顆粒。移除乙醇且對基因組DNA顆粒進行簡單空氣乾燥。用200 μl TE使基因組DNA顆粒再懸浮。

使用Pfu Ultra II DNA聚合酶(Stratagene)及200 ng/μl基

因組DNA作為模板，根據製造商之方案製備兩組不同的PCR反應管。對於第1組，使用引子MCM130及GB Cm-Rev(表18)確保轉導體成功整合至attTn7基因座中。第1組之PCR參數為95℃下持續2分鐘(僅第一次循環)，95℃下持續25秒，55℃下持續25秒，72℃下持續25秒(重複步驟2-4，循環28次)，72℃下持續1分鐘。對於第2組，使用引子MVD For及MVD Rev(表18)確保適當整合gi1.2-KKDyI操縱子。第2組之PCR參數為95℃下持續2分鐘(僅第一次循環)，95℃下持續25秒，55℃下持續25秒，72℃下持續10秒(重複步驟2-4，循環28次)，72℃下持續1分鐘。在1.2% E-gel(Invitrogen Corp.)上分析PCR擴增子，顯示全部4個轉導體純系皆正確。揀選一者且命名為菌株EWL201。

(ii)構築菌株EWL204(BL21, 環出-GI1.2-KKDyI)

如Datsenko及Wanner (2000)(Datsenko等人，*Proc Natl. Acad. Sci* USA 97:6640-6645, 2000)所述，使用質體pCP20使菌株EWL201之氯黴素標記物環出。使用PCR產物使大腸桿菌K-12中之染色體基因於單一步驟中失活(Datsenko等人，*PNAS*, 97: 6640-6645, 2000)。使EWL201細胞於L培養液中生長至對數中期，接著在冰冷無菌水中洗滌3次。取50 μl細胞懸浮液之等分試樣與1 μl pCP20混合，且使用Gene Pulser電穿孔儀(Bio-Rad Inc.)在2 mm電擊管(Invitrogen Corp.)中以2.5伏特及25 μFd對細胞懸浮液混合物進行電穿孔。即刻將1 ml LB添加至細胞中，接著轉移至具有金屬蓋之14 ml聚丙烯管(Sarstedt)中。藉由使細胞

在30℃下生長1小時來回收細胞。在L瓊脂及20 μg/μl氯黴素及50 μg/μl羧苄青黴素上選擇轉型體，且在30℃下培育隔夜。次日，在30℃下使單一純系於10 ml L培養液及50 μg/μl羧苄青黴素上生長至對數早期。接著使生長培養物之溫度轉換至42℃，持續2小時。進行連續稀釋，接著將細胞塗佈於LA板(無抗生素選擇)上，且在30℃下培育隔夜。次日，揀選20個群落，且貼於L瓊脂(無抗生素)及LA及20 μg/μl氯黴素板上。接著在30℃下培育分析板隔夜。能夠在LA板上生長，但不能在LA及20 μg/μl氯黴素板上生長之細胞被視為氯黴素標記物環出(揀選一株且命名為菌株EWL204)。

(iii)構築質體pEWL230(pTrc P. alba)

基於針對大腸桿菌表現之密碼子最佳化方法，將編碼銀白楊異戊二烯合成酶(P. alba HGS)之合成基因的製造外包給DNA2.0 Inc.(Menlo Park, CA)。將合成基因按定製選殖至質體pET24a(Novagen商標，EMD Biosciences, Inc.)中，且凍乾交付(圖152、圖153A-B；SEQ ID NO:43)。

根據製造商之方案，使用pET24 P. alba HGS(作為模板)、引子MCM182及MCM192、及Herculase II Fusion DNA聚合酶(Stratagene)進行PCR反應，以擴增銀白楊異戊二烯合成酶(*P. alba* HGS)。PCR條件如下：95℃下持續2分鐘(僅第一次循環)；95℃下持續25秒，55℃下持續20秒，72℃下持續1分鐘，重複25次循環；最終在72℃下延長3分鐘。使用QIAquick PCR純化套組(Qiagen Inc.)純化銀白楊

異戊二烯合成酶PCR產物。

接著在含有1 μl *Bsp*HI核酸內切酶(New England Biolabs)與2 μl 10×NEB緩衝液4之20 μl反應物中分解銀白楊異戊二烯合成酶PCR產物。在37℃下培育反應物2小時。接著使用QIAquick PCR純化套組純化經分解之PCR片段。在含有1 μl *Pst*I核酸內切酶(Roche)與2 μl 10×緩衝液H之20 μl反應物中進行二次限制酶分解。在37℃下培育反應物2小時。接著使用QIAquick PCR純化套組純化經分解之PCR片段。在含有1 μl *Nco*I核酸內切酶(Roche)、1 μl *Pst*I核酸內切酶及2 μl 10×緩衝液H之20 μl反應物中分解質體pTrcHis2B(Invitrogen Corp.)。在37℃下培育反應物2小時。使用1.2% E-gel(Invitrogen Corp.)對經分解之pTrcHis2B載體進行凝膠純化，且使用QIAquick凝膠萃取套組(Qiagen)進行萃取(圖154)。使用*Bsp*HI及*Nco*I位點之相容黏性末端，製備含有5 μl銀白楊異戊二烯合成酶插入物、2 μl pTrc載體、1 μl T4 DNA接合酶(New England Biolabs)、2 μl 10×接合酶緩衝液及10 μl再蒸餾水之20 μl接合反應物。在室溫下培育接合混合物40分鐘。藉由使0.025 μm硝化纖維素膜濾器(Millipore)漂浮於皮氏培養皿(petri dish)中之再蒸餾水中且在室溫下將接合混合物平緩施加於硝化纖維素膜濾器之上並保持30分鐘，使接合混合物脫鹽。使MCM446細胞(參見章節II)於LB中生長至對數中期，接著在冰冷無菌水中洗滌3次。將50 μl細胞懸浮液之等分試樣與5 μl脫鹽之pTrc P.alba HGS接合混合物混

合。使用Gene Pulser電穿孔儀，在2 mm電擊管中以2.5伏特及25 μFd對細胞懸浮液混合物進行電穿孔。即刻將1 ml LB添加至細胞中，接著轉移至具有金屬蓋之14 ml聚丙烯管(Sarstedt)中。藉由使細胞在30℃下生長2小時來回收細胞。在L瓊脂及50 μg/μl羧苄青黴素及10 mM甲羥戊酸上選擇轉型體，且在30℃下培育。次日，揀選6個轉型體，且在30℃下於5 ml L培養液及50 μg/μl羧苄青黴素管中生長隔夜。使用QIAquick Spin Miniprep套組(Qiagen)對隔夜培養物進行質體製備。歸因於使用供繁殖質體之BL21細胞，將用PB緩衝液(5×)及PE緩衝液(3×)洗滌Spin管柱之修改併入製造商之標準方案中以獲得高品質質體DNA。用20 μl反應物中之*Pst*I分解質體以確保尺寸正確之線性片段。全部6個質體皆具有正確尺寸，且運送至Quintara Biosciences (Berkeley, CA)以用引子MCM65、MCM66、EL1000(表18)進行定序。DNA定序結果顯示全部6個質體皆正確。揀選一個質體，命名為質體EWL230(圖155、圖156A-B；SEQ ID NO:44)。

iv)構築質體pEWL244(pTrc P. alba-mMVK)

根據製造商之方案，使用MCM376(作為模板)(參見以下章節(v))、引子MCM165及MCM177(參見表18)及Pfu Ultra II Fusion DNA聚合酶(Stratagene)進行PCR反應以擴增馬氏甲烷球菌MVK基因。PCR條件如下：95℃下持續2分鐘(僅第一次循環)；95℃下持續25秒，55℃下持續25秒，72℃下持續18秒，重複28次循環；72℃下最終延長1分鐘。使用

QIAquick PCR純化套組(Qiagen Inc.)純化馬氏甲烷球菌MVK PCR產物。

接著在含有8 μl PCR產物、2 μl *Pme*I核酸內切酶(New England Biolabs)、4 μl 10×NEB緩衝液4、4 μl 10×NEB BSA及22 μl再蒸餾水之40 μl反應物中分解馬氏甲烷球菌MVK PCR產物。在37℃下培育反應物3小時。接著使用QIAquick PCR純化套組純化經分解之PCR片段。在含有2 μl *Nsi*I核酸內切酶(Roche)、4.7 μl 10×緩衝液H及40 μl經PmeI分解之馬氏甲烷球菌MVK片段之47 μl反應物中進行二次限制酶分解。在37℃下培育反應物3小時。接著使用1.2% E-gel對經分解之PCR片段進行凝膠純化，且使用QIAquick凝膠萃取套組進行萃取。在含有10 μl質體、2 μl PmeI核酸內切酶、4 μl 10×NEB緩衝液4、4 μl 10×NEB BSA及20 μl再蒸餾水之40 μl反應物中分解質體EWL230。在37℃下培育反應物3小時。接著使用QIAquick PCR純化套組純化經分解之PCR片段。在含有2 μl *Pst*I核酸內切酶、4.7 μl 10×緩衝液H及40 μl經*Pme*I分解之EWL230線性片段之47 μl反應物中進行二次限制酶分解。在37℃下培育反應物3小時。接著使用1.2% E-gel對經分解之PCR片段進行凝膠純化，且使用QIAquick凝膠萃取套組進行萃取(圖157)。使用*Nsi*I及*Pst*I位點之相容黏性末端，製備含有8 μl馬氏甲烷球菌MVK插入物、3 μl EWL230質體、1 μl T4 DNA接合酶、2 μl 10×接合酶緩衝液及6 μl再蒸餾水之20 μl接合反應物。在16℃下培育接合混合物隔夜。次日，藉

由使0.025 μm硝化纖維素膜濾器漂浮於皮氏培養皿中之再蒸餾水中且在室溫下將接合混合物平緩施加於硝化纖維素膜濾器之上並保持30分鐘，使接合混合物脫鹽。使MCM446細胞於LB中生長至對數中期，接著在冰冷無菌水中洗滌3次。將50 μl細胞懸浮液之等分試樣與5 μl脫鹽之pTrc P.alba-mMVK接合混合物混合。使用Gene Pulser電穿孔儀，在2 mm電擊管中以2.5伏特及25 μFd對細胞懸浮液混合物進行電穿孔。即刻將1 ml LB添加至細胞中，接著將細胞轉移至具有金屬蓋之14 ml聚丙烯管中。藉由使細胞在30℃下生長2小時來回收細胞。在LA及50 μg/μl羧苄青黴素及5 mM甲羥戊酸板上選擇轉型體，且在30℃下培育。次日，揀選6個轉型體，且在30℃下於5 ml LB及50 μg/μl羧苄青黴素管中生長隔夜。使用QIAquick Spin Miniprep套組對隔夜培養物進行質體製備。歸因於使用供繁殖質體之BL21細胞，將用PB緩衝液(5×)及PE緩衝液(3×)洗滌Spin管柱之修改併入製造商之標準方案中以獲得高品質質體DNA。用20 μl反應物中之PstI分解質體以確保尺寸正確之線性片段。6個質體中之三者具有正確尺寸，且運送至Quintara Biosciences以用引子MCM65、MCM66、EL1000、EL1003及EL1006(表18)進行定序。DNA定序結果顯示全部3個質體皆正確。揀選一者且命名為質體EWL244(圖158及圖159A-B；SEQ ID NO:45)。

v)構築質體MCM376-來自pET200D中馬氏甲烷球菌古生下游途徑之MVK

使用Invitrogen Platinum HiFi PCR混合物，使用引子MCM161及MCM162(表18)對來自馬氏甲烷球菌古生下游途徑操縱子(圖160A-C；SEQ ID NO:46)之MVK ORF進行PCR擴增。將45 μL PCR混合物與1 μL模板、各1 μL之引子(10 μM)及2 μL水組合。反應如下循環：94℃下持續2分鐘；94℃下持續30秒、55℃下持續30秒及68℃下持續1分15秒，循環30次；接著72℃下持續7分鐘；及4℃下直至冷卻。根據製造商之方案，將3 μL此PCR反應物接合於Invitrogen pET200D質體。將3 μL此接合物引入Invitrogen TOP10細胞中，且在LA/kan50上選擇轉型體。自轉型體分離質體且對插入物進行定序，得到MCM376(圖161A-C)。

vi)構築菌株EWL251(BL21(DE3), Cm-GI1.2-KKDyI, pTrc P.alba-mMVK)

使MCM331細胞(其含有編碼釀酒酵母甲羥戊酸激酶、甲羥戊酸磷酸激酶、甲羥戊酸焦磷酸去羧酶及IPP異構酶之染色體構築體gi1.2KKDyI)於LB中生長至對數中期，接著在冰冷無菌水中洗滌3次。將50 μl細胞懸浮液與1 μl質體EWL244混合。使用Gene Pulser電穿孔儀，在2 mm電擊管中以2.5伏特及25 μFd對細胞懸浮液混合物進行電穿孔。即刻將1 ml LB添加至細胞中，接著將細胞轉移至具有金屬蓋之14 ml聚丙烯管中。藉由使細胞在30℃下生長2小時來回收細胞。在LA及50 μg/μl羧苄青黴素及5 mM甲羥戊酸板上選擇轉型體，且在37℃下培育。選擇一個群落且命名為菌株EWL251。

vii)構築菌株EWL256(BL21(DE3), Cm-GI1.2-KKDyI, pTrc P.alba-mMVK, pCL上游MVA)

使EWL251細胞於LB中生長至對數中期，接著在冰冷無菌水中洗滌3次。將50 μl細胞懸浮液與1 μl質體MCM82(包含編碼糞腸球菌mvaE及mvaS之pCL PtrcUpperPathway(亦稱為「pCL上游MVA」))混合。如上文實例8所述構築質體pCL Ptrc Upper Pathway。使用Gene Pulser電穿孔儀，在2 mm電擊管中以2.5伏特及25 μFd對細胞懸浮液混合物進行電穿孔。即刻將1 ml LB添加至細胞中。接著將細胞轉移至具有金屬蓋之14 ml聚丙烯管中。藉由使細胞在30℃下生長2小時來回收細胞。在LA及50 μg/μl羧苄青黴素及50 μg/μl壯觀黴素板上選擇轉型體，且在37℃下培育。揀選一個群落且命名為菌株EWL256。

表18：引子序列

引子名稱	引子序列
MCM130	ACCAATTGCACCCGGCAGA(SEQ ID NO:127)
GB Cm Rev	GCTAAAGCGCATGCTCCAGAC(SEQ ID NO:128)
MVD For	GACTGGCCTCAGATGAAAGC(SEQ ID NO:129)
MVD Rev	CAAACATGTGGCATGGAAAG(SEQ ID NO:130)
MCM182	GGGCCCGTTTAAACTTTAACTAGACTCTGCAGTTAGCGTTCAAACGGCAGAA (SEQ ID NO:131)
MCM192	CGCATGCATGTCATGAGATGTAGCGTGTCCACCGAAAA(SEQ ID NO:132)
MCM65	ACAATTTCACACAGGAAACAGC(SEQ ID NO:133)
MCM66	CCAGGCAAATTCTGTTTTATCAG(SEQ ID NO:106)
EL1000	GCACTGTCTTTCCGTCTGCTGC(SEQ ID NO:134)
MCM165	GCGAACGATGCATAAAGGAGGTAAAAAAACATGGTATCCTGTTCTGCGCCGGG TAAGATTTACCTG(SEQ ID NO:122)

MCM177	GGGCCCGTTTAAACTTTAACTAGACTTTAATCTACTTTCAGACCTTGC(SEQ ID NO:123)
EL1003	GATAGTAACGGCTGCGCTGCTACC(SEQ ID NO:137)
EL1006	GACAGCTTATCATCGACTGCACG(SEQ ID NO:138)
MCM161	CACCATGGTATCCTGTTCTGCG(SEQ ID NO:120)
MCM162	TTAATCTACTTTCAGACCTTGC(SEQ ID NO:121)

viii)構築菌株RM111608-2(Cm-GI1.2-KKDyI, pTrc P.alba-mMVK, pCL上游MVA, pBBRCMPGI1.5-pgl)

藉由在複製質體pBBR1MCS5(慶大黴素)(獲自Dr. K. Peterson, Louisiana State University)上組成性表現*ybhE*基因(編碼大腸桿菌6-磷酸葡糖酸內酯酶)來構築製造異戊二烯之大腸桿菌BL21菌株(EWL256)。

用於Red/ET介導之整合及抗生素標記物環出的基於FRT之重組卡匣、及質體係獲自Gene Bridges GmbH (Germany)。根據Gene Bridges之方案進行使用此等材料之程序。使用引子Pgl-F(SEQ ID NO:139)及PglGI1.5-R(SEQ ID NO:140)，根據製造商之方案使用Stratagene Herculase II Fusion套組自FRT-gb2-Cm-FRT模板擴增抗性卡匣。PCR反應物(最終體積50 μL)含有：5 μL緩衝液、1 μL模板DNA(FRT-gb2-Cm-F，來自Gene Bridges)、10 pmol各引子、及1.5 μL 25 mM dNTP混合物，用蒸餾水(dH_2O)製成50 μL。反應如下循環：1×95℃ 2分鐘；接著，(95℃ 30秒，63℃ 30秒，72℃ 3分鐘)循環30次。

使用QiaQick PCR純化套組(Qiagen)純化所得PCR產物，且如下電穿孔至具有含pRed-ET重組酶之質體的電穿孔勝任MG1655細胞中。藉由在30℃下於5 mL L培養液中生長

至OD_{600}為約0.6來製備細胞。藉由添加4%阿拉伯糖來誘導細胞表現重組酶，且在30℃下使細胞生長30分鐘，接著在37℃下生長30分鐘。在冰冷蒸餾水中將1.5 mL細胞等分試樣洗滌3-4次。使最終細胞顆粒再懸浮於40 μL冰冷蒸餾水中，且添加2-5 μL PCR產物。在Gene Pulser電穿孔儀(Bio-Rad Inc.)中，於1 mm間隙之電擊管中以1.3 kV進行電穿孔。在30℃下回收細胞1-2小時，且塗於含有氯黴素(5 μg/mL)之L瓊脂上。藉由PCR及使用側接整合位點之引子(2個引子組：pgl及49 rev及3' EcoRV-pglstop；底部Pgb2及頂部GB's CMP (946))定序來分析五個轉型體。選擇正確轉型體，且此菌株命名為MG1655 GI1.5-pgl::CMP。

使用MG1655 GI1.5-pgl::CMP之染色體DNA作為模板以產生含有FRT-CMP-FRT-GI1.5-ybhE構築體之PCR片段。將此構築體如下選殖至pBBR1MCS5(慶大黴素)中。使用5'引子 Pglconfirm-F(SEQ ID NO:141) 及 3' 引子 3' EcoRV-pglstop(SEQ ID NO:142)擴增此處稱作CMP-GI1.5-pgl之片段。如製造商所建議，使用Invitrogen TOPO-Blunt選殖套組將所得片段選殖至質體載體pCR-Blunt II-TOPO中。將具有CMP-GI1.5-pgl片段之*Nsi*I片段選殖至pBBR1MCS5(慶大黴素)之*Pst*I位點中。製備含有5 μl CMP-GI1.5-pgl插入物、2 μl pBBR1MCS5(慶大黴素)載體、1 μl T4 DNA接合酶(New England Biolabs)、2 μl 10×接合酶緩衝液及10 μl再蒸餾水之20 μl接合反應物。在室溫下培育接合混合物40分鐘，接著使用上文所揭示之參數將2-4 μL接合混合物電

穿孔至電穿孔勝任Top10細胞(Invitrogen)中。在含有10 μg/ml氯黴素及5 μg/ml慶大黴素之L瓊脂上選擇轉型體。使用上文所述之許多引子以及Sequetech, CA所提供之自身T3及反置引子來確定所選純系之序列。此質體命名為pBBRCMPGI1.5-pgl(圖162、圖163A-B及SEQ ID NO:48)。

如本文所述將質體pBBRCMPGI1.5-pgl電穿孔至EWL256中，且將轉型體塗於含有氯黴素(10 μg/mL)、慶大黴素(5 μg/mL)、壯觀黴素(50 μg/mL)及羧苄青黴素(50 μg/mL)之L瓊脂上。選擇一個轉型體且命名為菌株RM111608-2。

引子：

Pgl-F
5'-
ACCGCCAAAAGCGACTAATTTTAGCTGTTACAGTCAGTTGAATTAACCCTCACTAAA
GGGCGGCCGC-3' (SEQ ID NO:139)

PglGI1.5-R
5'-
GCTGGCGATATAAACTGTTTGCTTCATGAATGCTCCTTTGGGTTACCTCCGGGAAAC
GCGGTTGATTTGTTTAGTGGTTGAATTATTTGCTCAGGATGTGGCATAGTCAAGGGC
GTGACGGCTCGCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAG-3' (SEQ ID NO:140)

3' EcoRV-pglstop：

5'-CTT GAT ATC TTA GTG TGC GTT AAC CAC CAC (SEQ ID NO:142)

pgl+49 rev：CGTGAATTTGCTGGCTCTCAG(SEQ ID NO: 136)

底部Pgb2：GGTTTAGTTCCTCACCTTGTC(SEQ ID NO: 135)

頂部GB's CMP (946)：ACTGAAACGTTTTCATCGCTC(SEQ ID NO:92)

Pglconfirm-F

5'-ACCGCCAAAAGCGACTAATTTTAGCT-3' (SEQ ID NO:141)

實例24：藉由在大腸桿菌中組成性表現*ybhE* (pgl)改良異戊二烯產量

此實例展示與在野生型層面上表現*ybhE*之對照菌株(亦即EWL256)相比，在組成性表現大腸桿菌*ybhE* (pgl)之菌株中之異戊二烯產量。基因*ybhE* (pgl)編碼抑制異源表現之蛋白質的轉譯後葡糖基化且改良產物溶解度及產率，同時亦改良生質產率及通過戊糖磷酸途徑之通量的大腸桿菌6-磷酸葡糖酸內酯酶(Aon等人，*Applied and Environmental Microbiology*, 74(4): 950-958, 2008)。

i)小規模分析

培養基配方(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 13.6 g、KH_2PO_4 13.6 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、$(NH_4)_2SO_4$ 3.2 g、酵母提取物1 g、1000×痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至6.8且補足體積。用0.22微米過濾器對培養基進行過濾滅菌。滅菌及調整pH值之後，添加5.0 g葡萄糖、及抗生素。

1000×痕量金屬溶液(每公升醱酵培養基)：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg、$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中。用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足溶液體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

(a)實驗程序

藉由使菌株於來自MicroReactor Technologies, Inc之Cellerator™中生長來分析異戊二烯產量。24個孔中每一者之工作體積均為4.5 mL。溫度維持在30℃下，pH值設定點為7.0，氧氣流量設定點為20 sccm，且攪動速率為800 rpm。將自冷凍小瓶中獲取之大腸桿菌菌株之接種體於LB培養液瓊脂板(含抗生素)上劃線培養，且在30℃下培育。將單一群落接種至含抗生素之培養基中且生長隔夜。將細菌稀釋至4.5 mL含抗生素之培養基中以使550 nm下所量測之光學密度達到0.05。

使用氣相層析-質譜儀(GC-MS)(Agilent)頂部空間檢驗來分析釋出氣體中之異戊二烯。如下製備樣品：將100 μL完整培養液置於密封GC小瓶中，且在30℃下培育30分鐘之固定時間。在由70℃下培育5分鐘組成之熱滅活步驟之後，將樣品負載於GC上。

在操作過程中，使用微定量板式讀取器(Spectramax)獲得波長550 nm下之光學密度(OD)。藉由用異戊二烯濃度(μg/L)除以OD讀數及時間(小時)來獲得比生產力。

在200及400 μM IPTG誘導水準下評估兩種菌株EWL256及RM11608-2。在誘導後1、2.5、4.75及8小時分析樣品之異戊二烯產量及細胞生長(OD_{550})。一式兩份操作樣品。

(b)結果

實驗證實，在2種不同之IPTG濃度下，表現*ybhE* (pgl)之菌株的異戊二烯比生產力相比對照菌株顯著增加2-3倍。

ii)在15-L規模下自表現Cm-GI1.2-KKDyI、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶、銀白楊異戊二烯合成酶及*ybhE*(pgl)(RM111608-2)且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌醱酵而製造異戊二烯

培養基配方(每公升醱酵培養基)：K_2HPO_4 7.5 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、酵母提取物0.5 g、1000×改質痕量金屬溶液1 ml。所有組分一起添加且溶解於去離子水中。對此溶液進行高壓滅菌。用氫氧化銨(30%)將pH值調整至7.0且補足體積。滅菌及調整pH值之後，添加10 g葡萄糖、0.1 g鹽酸硫胺素、及抗生素。

1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg、$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整至3.0，接著補足體積，且用0.22微米過濾器進行過濾滅菌。

在15-L生物反應器中，用含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(pCL上游)、整合下游MVA途徑(gi1.2KKDyI)、高表現量之馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶與銀白楊異戊二烯合成酶(pTrcAlba-mMVK)及高表現量之大腸桿菌*pgl*(pBBR-pgl)的BL21 (DE3)大腸桿菌細胞進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要之pH 7.0及溫度34℃下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。解凍冷凍小瓶中之大腸桿菌菌株，且接種至胰蛋白

腺-酵母提取物培養基中。接種體生長至OD 1.0(在550 nm下所量測)之後，使用500 mL接種體接種15-L生物反應器，使得初始體積達到5-L。

以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在40小時(59小時)醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為3.1 kg(59小時之時為4.2 kg)。藉由添加IPTG達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為4時，使IPTG濃度達到110 μM。當OD_{550}達到150時，IPTG濃度升至192 μM。生物反應器內隨時間而變之OD_{550}概況展示於圖164A中。使用Hiden質譜儀測定生物反應器之釋出氣體中之異戊二烯含量。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，在40小時之時達到33.2 g/L之最大值(59小時之時達到48.6 g/L)(圖164B)。異戊二烯力價隨著醱酵過程而增加，在40小時之時達到40.0 g/L之最大值(59小時之時達到60.5 g/L)(圖164C)。在40小時(59小時)醱酵期間所製造之異戊二烯之總量為281.3 g(59小時之時為451.0 g)，且製造時程展示於圖164D中。體積生產力之時程展示於圖164E中，且顯示在0小時與40小時之間維持1.0 g/L/h之平均速率(在19小時與59小時之間維持1.4 g/L/h)。如由CER量測之代謝活性概況展示於圖164F中。在醱酵期間所利用之參與製造異戊二烯之碳的莫耳產率在40小時之時為19.6%(在59小時之時為23.6%)。自葡萄糖製得之異戊二烯之重量百分比產率在40小時之時為8.9%(在59小時之時為10.7%)。

實例25：在表現馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶、銀白楊異戊二烯合成酶、pCL上游MVA(糞腸球菌mvaE及mvaS)及*ybhE* (pgl)之大腸桿菌菌株中共同製造異戊二烯與氫氣收集醱酵釋出氣體並分析其中之氫氣及異戊二烯含量

使用菌株RM111608-2(大腸桿菌BL21 (DE3), pCL上游MVA, cmR-gi1.2-yKKDyI, pTrcAlba-mMVK, pBBR cmR-gi1.5-pgl)及EWL 256(大腸桿菌BL21 (DE3), pCL上游MVA, cmR-gi1.2-yKKDyI, pTrcAlba-mMVK)進行醱酵。細菌菌株之構築描述於上文實例23中。

自表現馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶、銀白楊異戊二烯合成酶、pCL上游MVA(糞腸球菌*mvaE*及*mvaS*)且組成性表現*ybhE* (pgl)(RM111608-2)或正常表現*ybhE* (pgl)(EWL256)之大腸桿菌菌株EWL256及RM111608-2的批式補料培養物測定自大腸桿菌大規模製造之異戊二烯。此實驗證實在葡萄糖存在下生長之細胞會共同製造異戊二烯與氫氣。

關於醱酵培養基(TM2)，每公升TM2醱酵培養基的配方如下：K_2HPO_4 13.6 g、KH_2PO_4 13.6 g、$MgSO_4*7H_2O$ 2 g、單水合檸檬酸2 g、檸檬酸鐵銨0.3 g、$(NH_4)_2SO_4$ 3.2 g、酵母提取物5 g、1000×改質痕量金屬溶液1 ml。1000×改質痕量金屬溶液：單水合檸檬酸40 g、$MnSO_4*H_2O$ 30 g、NaCl 10 g、$FeSO_4*7H_2O$ 1 g、$CoCl_2*6H_2O$ 1 g、$ZnSO_4*7H_2O$ 1 g、$CuSO_4*5H_2O$ 100 mg、H_3BO_3 100 mg、$NaMoO_4*2H_2O$ 100 mg。對於1000×改質痕量金屬溶液，將各組分逐一溶解於去離子水中，用HCl/NaOH將pH值調整

至3.0，接著於蒸餾水中補足至最終體積，且用0.22微米(μm)過濾器進行過濾滅菌(此溶液未經高壓滅菌)。對於TM2醱酵培養基，所有組分一起添加，溶解於去離子水中，用氫氧化鉀(KOH)將pH值調整至6.8，補足體積，且用0.22微米(μm)過濾器對培養基進行過濾滅菌。葡萄糖以99DE(右旋糖當量)、71% DS(乾固體)之糖漿形式源自於Cargill。

在15 L生物反應器中，用含有上游甲羥戊酸(MVA)途徑(pCL上游MVA)、整合下游MVA途徑(cmR-gi1.2-yKKDyI)、馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶及銀白楊異戊二烯合成酶(pTrcAlba-mMVK)且組成性表現*ybhE* (pgl)(RM111608-2)或正常表現*ybhE* (pgl)(EWL256)之大腸桿菌菌株EWL256或RM111608-2進行醱酵。進行此實驗以監測在醱酵所要條件(pH 7.0及溫度34℃)下自葡萄糖形成異戊二烯之情況。

在蛋白腖-酵母提取物培養基中製備自冷凍小瓶中獲取之適當大腸桿菌菌株之接種體。接種體生長至OD_{550}=0.6之後，使用600 mL接種體接種含有TM2培養基之15-L生物反應器。以指數速率補給葡萄糖直至細胞到達停滯期為止。此後，葡萄糖補料減至滿足代謝需求。在67小時醱酵期間傳遞至生物反應器之葡萄糖的總量為3.9 kg。藉由添加異丙基-β-D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)達成誘導。當550 nm下之光學密度(OD_{550})達到值為9時，使IPTG濃度達到102 μM。當OD_{550}達到140時，IPTG濃度升至192 μM。

在接種後之多個時間，移出樣品且如下文所述測定所製造之異戊二烯之量。如下文所論述，使用Hiden HPR-20質譜儀測定生物反應器之釋出氣體中氫氣、氮氣、氧氣、二氧化碳及異戊二烯之含量。

藉由以1 $L_{釋出氣體}$/min向20 mL玻璃頂部空間小瓶釋氣10秒將15-L生物反應器之醱酵釋出氣體之樣品收集於小瓶中，且用配備有經鐵氟龍塗覆之隔板(Agilent, CA)的金屬螺旋蓋密封。在收集30分鐘內分析小瓶。

藉由將Hiden HPR-20質譜儀(Hiden Analytics, U.K.)之入口管置於未封蓋頂部空間小瓶中1-2分鐘，以4 scc/min(4 mL/min)之速率將兩種樣品輸注至該質譜儀中，來分析該兩種樣品。HPR-20儀器經組態以掃描對應於氫氣(*m/z* 2)、氮氣(*m/z* 28)、氧氣(*m/z* 32)、二氧化碳(*m/z* 44)及異戊二烯(*m/z* 67)之質量。法拉第偵測器(Faraday detector)用於質量28、32、44及67。SEM偵測器用於氫氣(*m/z* 2)。以壓力之任意單位(托(Torr))量度偵測器回應值。藉由與可靠氫氣標準相比較來估算絕對氫氣含量。使用MASsoft V 6.21.0.51軟體(Hiden Analytics, United Kingdom)記錄結果。

結果

自兩個醱酵操作獲取釋出氣體樣品，且如上所述進行分析：

A)菌株RM111608-2(大腸桿菌BL21 (DE3), pCL上游，cmR-gi1.2-yKKDyI, pTrcAlba-mMVK, pBBR cmR-gi1.5-

pgl)。在64.8小時獲取操作中之樣品，在此期間醱酵以厭氧方式操作，氮氣以1 vvm進行釋氣。

B)菌株EWL256(大腸桿菌BL21 (DE3), pCL上游，cmR-gi1.2-yKKDyI, pTrcAlba-mMVK)。在34.5小時獲取操作中之樣品，在此期間醱酵以好氧方式操作，空氣以1 vvm進行釋氣。

結果描繪於圖165A-B中。在兩種狀況下，除異戊二烯、氧氣及二氧化碳以外，亦偵測到低含量之氫氣。氫氣之基線讀數為0.95×10^{-8}托。樣品A與B均得到約1.3×10^{-8}托之讀數。基於與氫氣標準之比較，樣品A及B之釋出氣體中存在之氫氣的量據估算小於10 ppmv(體積百萬分率)，但高於基線。如圖165A-B中所示，樣品A與B均亦含有大量異戊二烯及二氧化碳。

實例26：在表現馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶、銀白楊異戊二烯合成酶、pCL上游MVA(糞腸球菌mvaE及mvaS)及*ybhE* (pgl)之大腸桿菌菌株中共同製造異戊二烯與氫氣

收集醱酵釋出氣體並分析其中之氫氣及異戊二烯含量

此實驗之目的在於在經工程改造之大腸桿菌菌株中共同製造氫氣與異戊二烯。為達成此目的，將在如本文所述而製備之菌株EWL256 [BL21 (DE3), pCL上游，cmR-gi1.2-yKKDyI, pTrcAlba-mMVK]中表現一部分編碼大腸桿菌氫化酶-3之*hyc*操縱子，不過本文所述之任何細菌菌株均可以類似方式修飾，諸如RM111608-2。藉由此項技術中已知之標準選殖方法，基於公開可用之基因序列來製備包含

*hyc*操縱子基因*hycB*(gi|16130631)、*hycC*(gi|16130630)、*hycD*(gi|16130629)、*hycE*(gi|16130628)、*hycF*(gi|16130627)及*hycG*(gi|16130626)之表現構築體，且將其引入菌株EWL256中以製造新型菌株EWL256+Hyd-3。

單獨或與EWL256+Hyd-3組合來評估其他突變對共同製造氫氣與異戊二烯之影響，如下：引入與氫化酶-3成熟或調控有關之基因(例如hycH(gi|16130625)及hycI(gi|16130624))；使以下失活或缺失：與氫氣吸收或轉運有關之基因(例如大腸桿菌氫化酶-1(*hya*操縱子)及氫化酶-2(*hyb*操縱子))或相關蛋白質(例如甲酸去氫酶(*fdhF*(gi|16130624))、甲酸裂解酶抑制子(*hycA*(gi|16130632))、甲酸去氫酶N、α次單位(*fdnG*(gi|16129433))、甲酸去氫酶O、大型次單位(*fdoG*(gi|16131734))、硝酸還原酶(*narG*(gi|16129187))、反丁烯二酸還原酶調控子(*fnr*(gi|16129295))及乙醯基-輔酶A合成酶(*acs*(gi|16131895)))；使與氫化酶上調有關之基因(例如甲酸氫解酶活化子(*fhlA*(gi|16130638))失活；使以下失活或缺失：與醱酵副產物製造有關之基因(例如乳酸去氫酶(*ldhA*(gi|16129341))、反丁烯二酸還原酶膜蛋白(*frdC*(gi|16131977))、醇去氫酶(*adhE*(gi|16129202))、丙酮酸氧化酶(*poxB*(gi|16128839))、丙酮酸去氫酶E1組分*ackA/pta*(*aceE*(gi|16128107))、甲酸去氫酶調控蛋白(*hycA*(gi|16130632))及甲酸轉運體A與B(*FocA*(gi|16128871)與*FocB*(gi|16130417))；或表現與氫氣代謝有關之異源基

因(例如來自丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)之甘油醛-3-磷酸去氫酶(*gapC*(gi|15893997))。

基本上如上文實例25中所述，單獨或以組合形式使用經修飾以包含一或多種如本文所述之其他突變的經工程改造之菌株EWL 256+Hyd-3變異體(BL21 (DE3), pCL上游，cmR-gi1.2-yKKDyI, pTrcAlba-mMVK及*hycB-F*)進行醱酵。藉由基本上如上文所述分析釋出氣體樣品來評估氫氣與異戊二烯之共同製造。基於異戊二烯與氫氣共同製造之速率來選擇菌株以供進一步分析。

除非另有規定，否則本文中所用之所有技術及科學術語之含義皆為熟習本發明所屬領域之技術者通常所理解之含義。Singleton等人，Dictionary of Microbiology and Molecular Biology，第2版，John Wiley and Sons, New York (1994)，及Hale與Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, N.Y. (1991)向熟習此項技術者提供本發明中所用之許多術語的通用辭典。應瞭解，本發明並不限於所描述之特定方法、方案及試劑，因為其可變化。熟習此項技術者亦應瞭解，類似或等效於本文所述之任何方法及材料亦可用於實施或測試本發明。

實例27：在含有上游甲羥戊酸途徑、或上游與下游甲羥戊酸途徑及野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌*fadR atoC* LS5218中自脂肪酸或棕櫚油製造異戊二烯或甲羥戊酸

大腸桿菌*fadR atoC*菌株LS5218(6966號)獲自大腸桿菌保藏中心(Coli Genetic Stock Center)。FadR編碼負性調控編

碼脂肪酸降解酶之表現的轉錄抑制子(Campbell等人，*J. Bacteriol.* 183: 5982-5990, 2001)。AtoC為兩組分調控系統中之回應調控子，在該系統中AtoS調控乙醯乳酸代謝。fadR atoC菌株允許脂肪酸降解基因組成性表現，且將長鏈脂肪酸併入長鏈長度的聚羥基烷酸酯中。當棕櫚油用作甲羥戊酸或異戊二烯製造之碳源時，棕櫚油轉化成甘油與脂肪酸。關於此之方法在此項技術中為熟知的，且藉由與脂肪酶(例如豬胰脂肪酶、皺褶假絲酵母(*Candida rugosa*)脂肪酶或其他類似脂肪酶)一起培育而以酶促方式進行或藉由用諸如氫氧化鈉之鹼皂化而以化學方式進行。

i)表現上游甲羥戊酸途徑之大腸桿菌*fadR atoC*菌株

藉由使用標準方法將pCLPtrcUpperPathway電穿孔至LS5218中來產生菌株WW4(Sambrooke等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor, 1989)。當在補充有C12脂肪酸(FA)或棕櫚油作為碳源之TM3培養基中培養細胞時，藉由製造甲羥戊酸(MVA)來證實質體併入。為證實由WW4自脂肪酸製造MVA，將來自隔夜培養物之細胞以1:100稀釋至補充有0.25% C12 FA(Sigma，目錄號L9755)之5 mL經改質TM3培養基(不含酵母提取物之TM3)中。在30℃下培育經IPTG誘導之培養物隔夜之後，MVA產量之第一標誌(24 mg/L)顯而易見。產量經三天漸增，所製造之MVA之最終含量為194 mg/L。為證實由WW4自油製造MVA，將來自隔夜培養物之細胞以1:100稀釋至每5 mL TM3培養基補充有200 mg經

分解棕櫚油之經改質TM3培養基中。在30℃下培育經IPTG誘導之培養物隔夜之後，MVA產量之第一標誌(50 mg/L)顯而易見。產量經三天漸增，所製造之MVA之最終含量為500 mg/L。

ii)表現上游與下游MVA途徑及野葛異戊二烯合成酶之大腸桿菌*fadR atoC*菌株

用pMCM118 [pTrcKKDyIkIS]轉型大腸桿菌菌株WW4 (LS5218 fadR atoC pCLPtrcUpperPathway)，得到WW10。當在TM3及葡萄糖中培養菌株且用IPTG(100、300或900 μM)誘導時，由製造異戊二烯之跡象來證實質體併入。菌株對IPTG相對敏感，且甚至在100 μM IPTG下仍顯示顯著生長缺陷。此等結果展示於圖70A中。

為測試自十二烷酸製造異戊二烯，在37℃、以200 rpm震盪下於含有壯觀黴素(50 μg/ml)及康黴素(50 μg/ml)之L培養液中培養WW10隔夜。如下用經改質TM3培養基洗滌細胞：進行離心且以其原始培養體積再懸浮於此培養基中。將來自此起子培養物(starter culture)之經洗滌且再懸浮之細胞以1:100及1:10稀釋至含有0.125% C12脂肪酸(Sigma，目錄號L9755)之5 mL經改質TM3培養基中。

為證實自棕櫚油製造甲羥戊酸，在37℃及250 rpm下用脂肪酶預分解該油數天以釋放脂肪酸(由震盪管時所形成之泡沫判斷水解跡象)。

另外，藉由將經洗滌之細胞以1:10稀釋至具棕櫚油之試管中所含之經改質TM3培養基中來設置培養物。藉由將

0.125% C12FA添加至其餘(2.5 mL)未經進一步稀釋(生物轉化)之經洗滌細胞中來設置另一管。在30℃、以250 rpm震盪下生長3.75小時後，藉由添加50 μM IPTG誘導所有培養物。繼續培育4小時，此後用經修改之頂部空間檢驗來檢驗各200 μL之培養物的異戊二烯積累(在30℃、以500 rpm震盪下1小時之積累)。在GCMS分析之前，藉由在檢驗玻璃磚上培育12小時來進行另一異戊二烯檢驗。繼續培育經誘導之培養物隔夜，且次日早晨再次檢驗200 μL等分試樣之異戊二烯產量(1小時、30℃、500 rpm Shel-Lab震盪器)。此等培養物之分析顯示製造大量異戊二烯。在自已培育並誘導隔夜之後的隔夜起子培養物以1/10稀釋下接種之培養物中觀測到最高含量之異戊二烯。此結果表明此培養物繼續生長且其細胞密度增加。此等結果展示於圖70B中。由於脂肪酸懸浮液之外觀混濁，故不可直接量測細胞密度。因此，藉由將培養物之等分試樣塗板來測定此培養物之細胞密度，且顯示有8×10^7個群落形成單位。此大致對應於0.1之OD_{600}。儘管如此，此培養物提供顯著異戊二烯產量；在不含此實例中所述之途徑的類似菌株中未觀測到異戊二烯。

實例28：表現來自鏈黴菌屬植物之異戊二烯合成酶

野葛異戊二烯合成酶之基因獲自質體pJ201:19813。質體pJ201:19813編碼來自大葛藤(野葛植物)之異戊二烯合成酶，且針對螢光假單胞菌、惡臭假單胞菌、沼澤紅假單胞菌及棒狀桿菌進行密碼子最佳化(圖79A-79C(SEQ ID

NO:123))。用限制性酶NdeI及BamHI分解質體pJ201:19813會釋放基因iso19813，將該基因接合至鏈黴菌-大腸桿菌穿梭載體pUWL201PW(Doumith等人，*Mol. Gen. Genet.* 264: 477-485, 2000；圖71)中以產生pUWL201_iso。藉由pUWL201_iso之限制性分析驗證成功選殖。在允許於鏈黴菌屬中組成性表現，而不允許在大腸桿菌中表現之*erm*啟動子控制下表現異戊二烯合成酶iso19813。

如Hopwood等人，*The John innes foundation, Norwich*, 1985所述，藉由原生質體轉型將PUWL201PW(無插入物)及pUWL201_iso引入白色鏈黴菌(*Streptomyces albus*)J1074(Sanchez等人，*Chem. Biol.* 9:519-531, 2002)中。

用1.9 μg pUWL201PW或2.9 μg pUWL201_iso轉型原生質體懸浮液之200 μl等分試樣。在28℃下於非選擇性R5-瓊脂板上培育隔夜之後，藉由在含有硫鏈絲菌素(thiostrepton)(250 μg/ml)之R3-疊層瓊脂中再培育4天來選擇陽性轉型體。使用質體微型套組(Plasmid Mini Kit，Qiagen)，由質體製劑檢查硫鏈絲菌素抗性轉型體中pUWL質體的存在。將所製備之質體DNA再引入大腸桿菌DH5α中以產生足量質體DNA留待藉由限制性分析加以分析。在含胺苄青黴素之L瓊脂板上選擇陽性轉型體，且藉由用*Nde*I及*Bam*HI核酸內切酶分解質體DNA來進行插入物分析。在陽性pUWL201 iso純系中鑑別出呈1.7 kb片段形式之異戊二烯合成酶，而在對照菌株(pUWL201PW)中未觀

測到該片段。

分析含有對照質體pUWL201PW或編碼異戊二烯合成酶之pUWL201_iso的白色鏈黴菌(*S. albus*)之野生型菌株及轉型體之異戊二烯形成。在存在或不存在硫鏈絲菌素(200 μg/ml)之情況下於固體培養基(胰蛋白酶大豆培養液瓊脂，TSB；2.5 ml)上一式兩份培養菌株，且在28℃下於密封頂部空間小瓶(總體積20 ml)中培育4天。藉由GC-MS以SIM模式分析500 μl頂部空間樣品(終點量測)，且根據參考滯留時間及分子質量(67 m/z)來鑑別異戊二烯。由先前產生之校準曲線來定量頂部空間樣品中存在之異戊二烯。儘管野生型白色鏈黴菌及具有pUWL201PW之對照菌株所製造之異戊二烯的濃度略微高於偵測限度(0.04-0.07 ppm)，但具有pUWL201_iso之白色鏈黴菌所製造之異戊二烯與對照相比至少過量10倍(0.75 ppm；圖72)。結果證實在放線菌(*Actinomycetes*)族群之原核生物體中成功表現植物來源性異戊二烯合成酶。

實例29：回收Bioisoprene™

自一組四個14-L規模醱酵中以兩步操作回收Bioisoprene™，該兩步操作包含藉由使異戊二烯吸附於活性碳而自醱酵釋出氣體氣提異戊二烯，接著進行離線蒸汽脫附並冷凝以得到液體Bioisoprene™(圖166A及圖166B)。四個醱酵槽所製造之Bioisoprene™之總量為1150 g(16.9 mol)，其中953 g(14 mol，83%)由碳濾器吸附。蒸氣脫附/冷凝步驟之後，所回收之液體Bioisoprene™之量為810 g，

對應於總回收產率70%。分析所回收之Bioisoprene™中雜質的存在。

Bioisoprene™液體之分析與雜質概況

藉由GC/MS及氣相層析/火焰離子化偵測(GC/FID)來分析所回收之Bioisoprene™液體以確定雜質之性質及含量。測得產物之純度>99.5%，且含有若干主要雜質以及許多微量組分。GC/FID層析圖描繪於圖167中，且雜質之典型含量展示於表19中。雜質概況類似於在此規模上製造之其他Bioisoprene™批次。

表19.數批Bioisoprene™中所見之雜質之性質及含量概述

化合物	滯留時間(min)		濃度範圍
	GC/MS	GC/FID	
乙醇	1.59	11.89	<50 ppm
丙酮	1.624	12.673	<100 ppm
甲基丙烯醛	1.851	15.369	<200 ppm
甲基乙烯基酮	1.923	16.333	<20 ppm
乙酸乙酯	2.037	17.145	100至800 ppm
3-甲基-1,3-戊二烯	2.27	18.875	50至500 ppm
甲基乙烯基環氧乙烷	2.548	19.931	<100 ppm
異戊二烯醇	2.962	21.583	<500 ppm
3-甲基-1-丁醇	2.99	21.783	<50 ppm
3-己烯-1-醇	4.019	24.819	<100 ppm
乙酸異戊烯酯	4.466	25.733	200至1000 ppm
乙酸3-己烯-1-基酯	5.339	27.223	<400 ppm
檸檬烯	5.715	27.971	<500 ppm
其他環狀物	5.50-6.50	27.5-28.0	<200 ppm

藉由用吸附劑處理而純化Bioisoprene™

吸附劑在工業中廣泛用於自烴原料中移除痕量雜質。適合之吸附劑包括基於沸石、氧化鋁及二氧化矽之物質。Bioisoprene™可藉由通過矽膠，且在較小程度上利用氧化鋁而實質上得到純化。圖168展示在處理之前(A)及用氧化鋁處理之後(B)或二氧化矽處理之後(C)Bioisoprene™樣品之GC/FID層析圖。來自BASF之Selexsorb™吸附劑產品為選擇用於自Bioisoprene™中移除極性雜質之吸附劑之一。特定言之，Selexsorb CD及CDX產品由於經證實在自異戊二烯及丁二烯原料中移除極性雜質方面具效用而為較佳的。

實例30：化學轉化Bioisoprene™

化學品及溶劑按自Sigma Aldrich Corp(WI, USA)接收時之原樣使用。BioIsoprene™係藉由使表現異戊二烯合成酶及異源甲羥戊酸(MVA)異戊二烯前驅物生物合成途徑之大腸桿菌BL21菌株醱酵而製造。藉由使生物異戊二烯吸附於活性碳、接著進行蒸汽脫附並冷凝以獲得粗液體生物異戊二烯，而自醱酵釋出氣體中回收生物異戊二烯。藉由在臨用前進行分餾而純化生物異戊二烯。

^1H NMR分析

在Varian VNMRS 500 MHz NMR系統上記錄質子(^1H)核磁共振(NMR)光譜。除非另有規定，否則所有NMR光譜皆以四甲基矽烷(TMS，0 ppm)或氯仿($CHCl_3$，7.26 ppm)作參考，且峰頻率以ppm形式加以記錄。在氘化氯仿($CDCl_3$)或甲醇(CD_3OD)中操作樣品。

GC/MS分析

使用與CTC Analytics(Switzerland)CombiPAL自動取樣器相接且以頂部空間模式操作之Agilent 6890 GC/MS系統進行分析。使用Agilent HP-5MS GC/MS管柱(30 m×0.25 mm；0.25 μm膜厚度)分離分析物。設置自動取樣器以自10 μL液體注射器注射1 μL液體樣品。GC/MS方法利用氦作為載氣，流速為1 mL/min。保持注射口在250℃下，分流比為100:1。烘箱程式始於50℃，持續2分鐘；以25℃/min之速率增至225℃；接著保持1分鐘，總操作時間為10分鐘。以m/z 29至m/z 500之掃描模式操作Agilent 5793N質量選擇偵測器。採用1.5分鐘之溶劑延遲。在此等條件下，觀測到異戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)在0.675分鐘時溶離。

GC/FID分析

使用與CTC Analytics(Switzerland)CombiPAL自動取樣器相接且以液體模式操作之Agilent 6890 GC/FID系統進行分析。使用Agilent DB-Petro GC管柱(100 m×0.25 mm；0.50 μm膜厚度)分離分析物。設置自動取樣器以自10 μL液體注射器注射1 μL液體樣品。GC/FID方法利用氦作為載氣，流速為1 mL/min。保持注射口在200℃下，分流比為50:1。烘箱程式始於50℃，持續15分鐘；以25℃/min之速率增至250℃；接著保持10分鐘，總操作時間為33分鐘。以恒定組成模式保持FID偵測器在280℃下，氫氣流速為35 mL/min且空氣流速為250 mL/min。在此等條件下，觀測到異戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)在13.54分鐘時溶離。

I. 經由狄爾斯-阿爾德熱環化加成製備環狀異戊二烯二聚體

在2,6-二-第三丁基-4-甲基苯酚(0.165 g，0.05 mol)充當熱聚合抑制劑存在下，於150℃下加熱異戊二烯(1.02 g，0.015 mol)並持續24小時。在密封厚壁玻璃反應容器中進行反應，反應之前該反應容器已於真空烘箱中乾燥24小時。用磁性攪拌器攪拌反應混合物。藉由氣相層析與質譜儀偵測器(GC-MS)監測反應進程。反應完成後，以己烷作為溶離劑，使用矽膠層析純化所得異構體混合物。在旋轉式真空蒸發器上濃縮後，藉由GC-MS及^{1}H-NMR對產物進行表徵。GC/MS：產物A: 5.17, 5.19 min；產物B: 5.72, 5.74 min；產物C: 6.11 min。^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.8 (m); 5.4 (m); 4.95 (m); 2.4-1.2 (m)。

II. 經由Pd催化之寡聚製備異戊二烯寡聚物

在密封厚壁玻璃反應容器中混合異戊二烯(2.03 g，0.03 mol)與異丙醇(1.79 g，0.03 mol)。反應之前，玻璃腔室於真空烘箱中乾燥24小時。在惰性氮氣氛圍下完成所有試劑的轉移。將乙醯基丙酮酸鈀(0.55 mg，0.06 mmol)及三苯基膦(1.49 mg，0.19 mmol)添加至反應混合物中。接著在經由磁性攪拌器促成混合下，將反應腔室加熱至100℃，持續24小時。藉由GC-MS分析反應過程。一旦反應完成，即藉由使用己烷作為溶離劑進行矽膠管柱層析來分離產物。藉由GC-MS及^{1}H-NMR光譜法對最終產物進行表徵。GC/MS：產物A: 5.54 min；產物B: 6.6 min；產物C: 6.85

min。

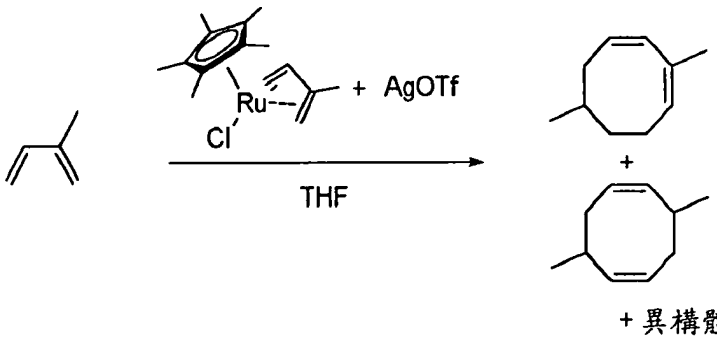
III. 氫化不飽和化合物

將實例2中所獲得之異構體混合物(1.36 g，0.01 mol)置於配備有磁性攪拌器且含有氫化催化劑(Pd/C，5重量%)(0.21 g，0.1 mmol)之玻璃腔室中。在進行實驗之前真空乾燥所有玻璃器皿。將氫氣引入系統中且保持壓力為3 atm。數小時後，自反應混合物過濾反應混合物中之Pd/C，且使用矽膠層析法分離產物。使用GC-MS及NMR完成最終分析。

IV. 製備乙氧基化異戊二烯衍生物

在配備有磁性攪拌器之厚壁玻璃腔室中混合異戊二烯(0.982 g，0.014 mol)與絕對乙醇(0.665 g，0.014 mol)。將催化量之濃硫酸添加至反應混合物中，接著在85℃下攪拌隔夜。藉由GC-MS監測反應進程。加熱16小時後，GC-MS痕量分析揭示存在具有以下滯留時間之異構體的混合物：產物A: 2.66 min m/z^+=99；產物B: 3.88 m/z^+=99, 114；產物C: 5.41 min, m/z^+=87, 99, 114。

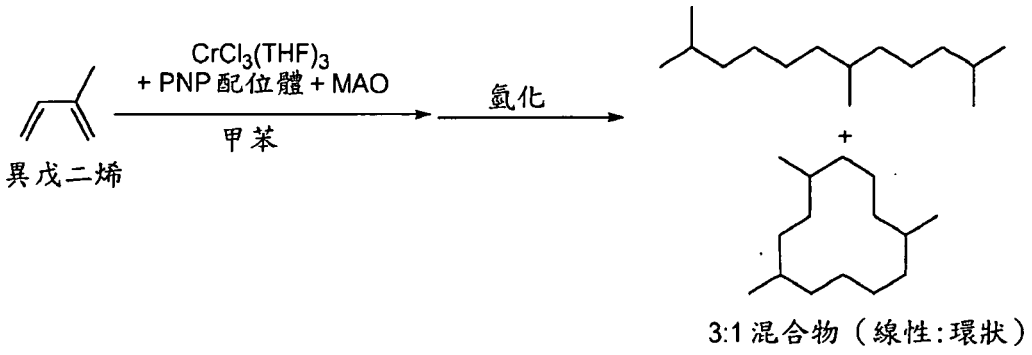
V. 使用釕催化劑使異戊二烯轉化成C10環狀二聚體



已使用釕催化劑以極佳產率使異戊二烯轉化成C10環狀

二聚體，即轉化成二甲基-環辛二烯之混合物(Itoh, Kenji; Masuda, Katsuyuki; Fukahori, Takahiko; Nakano, Katsumasa; Aoki, Katsuyuki; Nagashima, Hideo, *Organometallics* (**1994**), 13(3), 1020-9)。據報導，在中等溫度(低至60℃)下轉化率高於95%。可使用氯化釕($RuCl_3$)及五甲基環戊二烯(C_5Me_5H)作為起始物質，以兩個簡易步驟製備催化劑，基於五甲基環戊二烯基之釕有機金屬化合物。對於二聚反應，用三氟甲磺酸銀(AgOTf)活化催化劑以製造活性物質，但亦可使用其他活化劑。

VI. 使用鉻催化劑使異戊二烯轉化成C15三聚體



3:1混合物（線性:環狀）

可使用鉻催化劑與P-N-P配位體*N,N*-雙(二芳基膦基)胺使異戊二烯轉化成C15三聚體。就地製備催化劑且使用MAO將其活化，如Bowen, L.; Charernsuk, M.; Wass, D.F. *Chem. Commun.* (**2007**) 2835-2837中所述。在中等溫度(70℃)下，所報導之異戊二烯轉化成由線性產物與環狀產物之混合物(3:1)組成之C15三聚體的轉化率高達95%。在每種狀況下均鑑別出四聚體為另一主要產物。

VII. 氫化異戊二烯

使用H-cube氫化儀器(ThalesNano, Princeton, NJ, U.S.A.)以連續方式將異戊二烯(10 mL於絕對乙醇中之10%溶液(v/v))氫化成2-甲基丁烷(異戊烷)。將異戊二烯溶液以0.5 mL/min泵送穿過保持於70℃下之10% Pd/C催化劑筒。在1 atm壓力下使用「全模式」引入氫氣。收集產物且藉由^{1}H NMR及GC/FID進行分析，確認異戊二烯以超過90%之產率轉化成2-甲基丁烷，加之微量部分氫化之單烯烴。^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.8 (m, 9H, CH_3); 1.12 (m, 2H, CH_2); 1.37 (m, 1H, CH)。GC/FID：2-甲基丁烷；滯留時間=12.69分鐘。

VIII. 部分氫化異戊二烯

混合BioIsoprene™產品(50 mL，0.5 mol)與甲苯(200 mL)，且在40℃及5巴氫氣壓力下、於Midi-Cube氫化儀器(ThalesNano, Budapest, Hungary)上、在5% Pd/C催化劑上使其部分地氫化。基質流動速率為10 mL/min，且以125 mL/min(5 mmol/min)傳遞氫氣。使產物流再循環穿過儀器，持續2小時，此後藉由GC/MS及GC/FID分析產物之等分試樣，顯示大部分起始物質已轉化成異戊烯(2-甲基-1-丁烯、2-甲基-2-丁烯及3-甲基-1-丁烯)之混合物，加之異戊烷及某些未反應之異戊二烯(圖170)。

IX. 選擇性氫化BioIsoprene™產品

在上述實例中所列舉之條件下，使用蛋殼型Pd/δ-Al_2O_3催化劑選擇性氫化BioIsoprene™產品，得到異戊烯之混合物，其中2-甲基-2-丁烯為主要產物，佔總異戊烯之超過

50%，且3-甲基-1-丁烯為次要產物，佔總異戊烯產物之不足25%，如GC/MS分析所測定。異戊烷及殘餘異戊二烯之量佔總產物流之不足10%。當使用硫化鈀/碳催化劑進行反應時，獲得類似結果。

X. 在氣相中部分氫化BioIsoprene™產品

將含有BioIsoprene™產品之乾燥氣流與略微過量之氫氣(mol/mol)混合，且使氣態混合物通過異相氫化催化劑，諸如美國專利申請案20090203520中所述之具有高孔隙體積之IB族促進之鈀催化劑，以製造異戊烯與一或多種雜質之混合物，該一或多種雜質係源自最初產生BioIsoprene™產品之醱酵過程。在0.5巴至200巴之範圍內之壓力及0℃至200℃之溫度下進行轉化。

XI. 用固體酸催化劑使異戊烯二聚

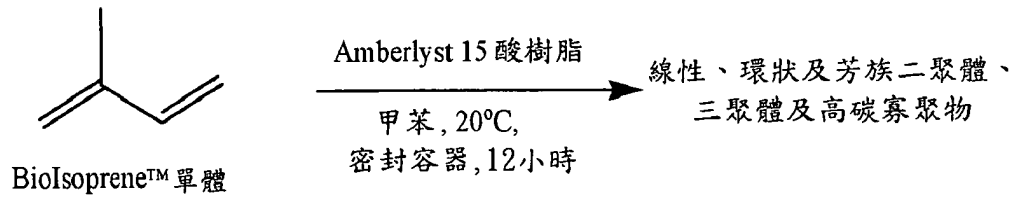
在室溫下將2-甲基-2-丁烯(1.5 mL)及甲苯(4 mL)與Amberlyst 15酸樹脂(186 mg)一起攪拌12小時。自反應混合物中移出等分試樣(500 μL)且將其轉移至GC小瓶中。藉由GC/MS分析該混合物(圖171)，且揭示部分轉化成適合用作BioIsofuel™組分之C10二聚體(二異戊烯)。

視情況在實例30部分VII中所述之條件下，或經由此項技術中已知用於使烯烴氫化成異烷烴之條件[參見，例如Marichonna (2001)]，完全氫化二聚反應之產物(二異戊烯，C10二聚烯)。

XII. 用固體酸催化劑使BioIsoprene™產品寡聚

在室溫下將BioIsoprene™單體、2-甲基-2-丁烯(1.5 mL)

及甲苯(4 mL)之混合物與Amberlyst 15酸樹脂(186 mg)一起攪拌12小時。自反應混合物中移出等分試樣(500 μL)且將其轉移至GC小瓶中。藉由GC/MS分析混合物(圖172)，且揭示由異戊二烯、線性、環狀及芳族C10、C15及高碳寡聚物組成之複雜產物混合物。



XIII. 用固體酸催化劑使BioIsoprene™產品連續寡聚

在含有Amberlyst 15離子交換樹脂或等效催化劑之二聚反應器中，使BioIsoprene™單體連續轉化成C10二聚體及C15三聚體。BioIsoprene™原料流包含BioIsoprene™單體且視情況包含BioIsoprene™之C5衍生物及共溶劑。在20℃至200℃之範圍內之溫度及0.5巴至200巴之壓力下進行該過程。在第一分餾管柱中分餾二聚步驟之產物以自高碳(>C5)寡聚物分離未反應之異戊二烯。使C5餾份返回至二聚反應器，且將>C5重餾份引入第二分餾管柱中，在該管柱中自頂部氣流收集所要C10/C15餾份。將由>C15寡聚物組成之底部餾份饋入含有諸如Grubbs第2代催化劑之複分解催化劑的重質再循環反應器中。複分解催化劑使一部分高碳寡聚物餾份經由烯烴交叉複分解反應轉化成較輕組分，隨後將其饋入如圖173中所描繪之1號分餾管柱中。

總體上，該過程使得生物異戊二烯單體轉化成

BioIsofuel™前驅物C10二聚體及C15三聚體，接著在實例30章節VII中所述之條件下對其進行部分或完全氫化。所得部分或完全飽和之化合物適合用作BioIsofuel™組合物及BioIsofuel™摻合原料。

實例31. $^{13}C/^{12}C$同位素分析

可如下進行^{13}C分析：將0.5至1.0 mg樣品負載至錫杯中以使用Costech ECS4010元素分析儀作為ThermoFinnigan Delta Plus XP同位素比率質譜儀之入口來進行碳同位素分析。將樣品滴入1020℃下之氧化亞鈷/氧化鈷燃燒反應器中，使燃燒氣體於氦流中以85 mL/min通過銅反應器(650℃)以使NO_x轉化成N_2。使用3 m 5Å分子篩管柱分離CO_2與N_2。接著，使用兩種實驗室標準(乙醯苯胺B，-29.52±0.02‰m；及玉米澱粉A，-11.01±0.02‰)針對VPDB量表校準$^{13}C/^{12}C$比率，該兩種實驗室標準已藉由使用T. B. Coplen等人，New Guidelines for $\delta^{13}C$ Measurements, Anal. Chem., 78, 2439-2441 (2006)之雙標準方法進行離線燃燒與雙重入口分析而針對VPDB量表經仔細校準。Coplen之教示內容以引用的方式併入本文中以達成教示測定$\delta^{13}C$值之技術的目的。

2008年6月30日申請之美國臨時專利申請案第61/133,521號、及WO 2010/05525 A1列出原料及源自各種來源之異戊二烯之聚合物的$\delta^{13}C$值，包括表20中所列者。

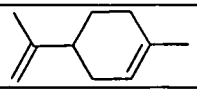
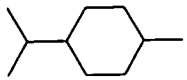
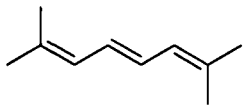
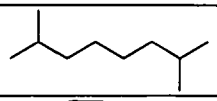
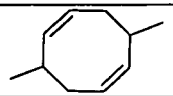
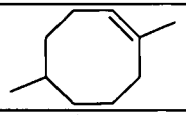
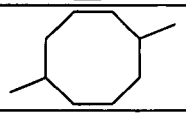
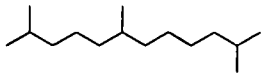
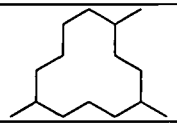
表 20

樣品	$\delta^{13}C$
棕櫚油	-30.00
酵母提取物	-25.70
來自萃取蒸餾之商用聚異戊二烯	-23.83
來自軟木漿之糖	-23.00
來自異戊二烯樣品B(乳液聚合)之聚異戊二烯	-19.67
轉化糖	-15.37
來自異戊二烯樣品A(釹催化劑)之聚異戊二烯	-14.85
來自甜菜渣之葡萄糖	-13.00
來自玉米乾草之葡萄糖	-11.20
玉米澱粉	-11.10
葡萄糖	-10.73

實例32-例示性燃料特性

表21列出可使用本文所述之方法自異戊二烯製造之某些化合物的燃料特性。

表 21

	式		MW (g/mol)	沸點 (℃)	密度 (g/cm^3)	蒸氣壓 (托，25℃)*	ΔHc (kcal/mol)	低熱值 (kBtu/gal)	高熱值 (kBtu/gal)	辛烷 (十六烷)
α-檸檬烯	$C_{10}H_{16}$		136.23	177	0.8477	1.54	1474	130.6	137.9	88
1-甲基-4-異丙基環己烷	$C_{10}H_{20}$		140.27	170.2	0.8060	2.16	1561	126.5	134.9	75
2,7-二甲基,-(4E)-2,4,6- 辛三烯	$C_{10}H_{16}$		136.23	186.4*	0.782	0.915	1481	121.1	127.8	110
2,7-二甲基-辛烷	$C_{10}H_{22}$		142.28	160	0.728	3.35	1620	116.5	124.7	97
3,7-二甲基-1,5-環辛二烯	$C_{10}H_{16}$		136.23	182.7*	0.860	1.09	1490	134.0	141.4	95
1,5-二甲基環辛烯(BIF-10)	$C_{10}H_{18}$		138.25	178.5*	0.830	1.33	1545	131.6	139.4	90
1,5-二甲基環辛烷	$C_{10}H_{20}$		140.27	158.5	0.800	1.39	1560	125.4	133.8	85
2,6,11-三甲基十二烷	$C_{15}H_{32}$		212.41	247.8*	0.766	0.0396	2400	121.7	130.1	(65)
1,4,8-三甲基環十二烷	$C_{15}H_{30}$		210.40	278.0*	0.850	7.38E-3	2380	135.7	144.6	(40)
BIF-15	$C_{15}H_{31.5}$	線性C15與環狀C15之3:1混合物	211.9	255.4	0.787	0.0315	2395	125.2	133.7	(58.8)

本文中所提供之標題並不限制本發明之各個態樣或實施例，該等態樣或實施例總體上可參考說明書而獲得。

本說明書中所引用之所有公開案、專利申請案及專利皆以引用的方式併入本文中，如同各個別公開案、專利申請案或專利特定及個別地以引用的方式併入一般。詳言之，本文中所引用之所有公開案均係出於描述及論述可能與本發明結合使用之組合物及方法的目的而以引用的方式明確併入本文中。儘管已出於清楚理解之目的而經由說明及實例略為詳細地描述前述發明內容，但一般技術者鑒於本發明之教示將顯而易知，可在不脫離隨附申請專利範圍之精神或範疇下對其作出某些變化及修改。

附錄 1

例示性 1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶核酸與多肽

ATH: AT3G21500(DXPS1)
AT4G15560(CLA1)
AT5G11380(DXPS3)
OSA: 4338768 4340090 4342614
CME: CMF089C
PFA: MAL13P1.186
TAN: TA20470
TPV: TP01_0516
ECO: b0420(dxs)
ECJ: JW0410(dxs)
ECE: Z0523(dxs)
ECS: ECs0474
ECC: c0531(dxs)
ECI: UTI89_C0443(dxs)
ECP: ECP_0479
ECV: APECO1_1590(dxs)
ECW: EcE24377A_0451(dxs)
ECX: EcHS_A0491
STY: STY0461(dxs)
STT: t2441(dxs)
SPT: SPA2301(dxs)
SEC: SC0463(dxs)
STM: STM0422(dxs)
YPE: YPO3177(dxs)
YPK: y1008(dxs)
YPM: YP_0754(dxs)
YPA: YPA_2671
YPN: YPN_0911
YPP: YPDSF_2812
YPS: YPTB0939(dxs)
YPI: YpsIP31758_3112(dxs)
SFL: SF0357(dxs)
SFX: S0365(dxs)
SFV: SFV_0385(dxs)
SSN: SSON_0397(dxs)
SBO: SBO_0314(dxs)
SDY: SDY_0310(dxs)
ECA: ECA1131(dxs)
PLU: plu3887(dxs)
BUC: BU464(dxs)
BAS: BUsg448(dxs)
WBR: WGLp144(dxs)
SGL: SG0656
KPN: KPN_00372(dxs)
BFL: Bfl238(dxs)
BPN: BPEN_244(dxs)
HIN: HI1439(dxs)
HIT: NTHI1691(dxs)
HIP: CGSHiEE_04795
HIQ: CGSHiGG_01080
HDU: HD0441(dxs)
HSO: HS_0905(dxs)
PMU: PM0532(dxs)
MSU: MS1059(dxs)
APL: APL_0207(dxs)
XFA: XF2249
XFT: PD1293(dxs)
XCC: XCC2434(dxs)
XCB: XC_1678
XCV: XCV2764(dxs)
XAC: XAC2565(dxs)
XOO: XOO2017(dxs)
XOM: XOO_1900(XOO1900)
VCH: VC0889
VVU: VV1_0315
VVY: VV0868
VPA: VP0686
VFI: VF0711
PPR: PBPRA0805
PAE: PA4044(dxs)
PAU: PA14_11550(dxs)
PAP: PSPA7_1057(dxs)
PPU: PP_0527(dxs)
PST: PSPTO_0698(dxs)
PSB: Psyr_0604
PSP: PSPPH_0599(dxs)
PFL: PFL_5510(dxs)
PFO: Pfl_5007
PEN: PSEEN0600(dxs)
PMY: Pmen_3844
PAR: Psyc_0221(dxs)
PCR: Pcryo_0245
ACI: ACIAD3247(dxs)
SON: SO_1525(dxs)
SDN: Sden_2571
SFR: Sfri_2790
SAZ: Sama_2436
SBL: Sbal_1357
SLO: Shew_2771
SHE: Shewmr4_2731
SHM: Shewmr7_2804
SHN: Shewana3_2901

SHW: Sputw3181_2831
ILO: IL2138(dxs)
CPS: CPS_1088(dxs)
PHA: PSHAa2366(dxs)
PAT: Patl_1319
SDE: Sde_3381
PIN: Ping_2240
MAQ: Maqu_2438
MCA: MCA0817(dxs)
FTU: FTT1018c(dxs)
FTF: FTF1018c(dxs)
FTW: FTW_0925(dxs)
FTL: FTL_1072
FTH: FTH_1047(dxs)
FTA: FTA_1131(dxs)
FTN: FTN_0896(dxs)
NOC: Noc_1743
AEH: Mlg_1381
HCH: HCH_05866(dxs)
CSA: Csal_0099
ABO: ABO_2166(dxs)
AHA: AHA_3321(dxs)
BCI: BCI_0275(dxs)
RMA: Rmag_0386
VOK: COSY_0360(dxs)
NME: NMB1867
NMA: NMA0589(dxs)
NMC: NMC0352(dxs)
NGO: NGO0036
CVI: CV_2692(dxs)
RSO: RSc2221(dxs)
REU: Reut_A0882
REH: H16_A2732(dxs)
RME: Rmet_2615
BMA: BMAA0330(dxs)
BMV: BMASAVP1_1512(dxs)
BML: BMA10299_1706(dxs)
BMN: BMA10247_A0364(dxs)
BXE: Bxe_B2827
BUR: Bcep18194_B2211
BCN: Bcen_4486
BCH: Bcen2424_3879
BAM: Bamb_3250
BPS: BPSS1762(dxs)
BPM: BURPS1710b_A0842(dxs)
BPL: BURPS1106A_A2392(dxs)
BPD: BURPS668_A2534(dxs)
BTE: BTH_II0614(dxs)
BPE: BP2798(dxs)
BPA: BPP2464(dxs)
BBR: BB1912(dxs)

RFR: Rfer_2875
POL: Bpro_1747
PNA: Pnap_1501
AJS: Ajs_1038
MPT: Mpe_A2631
HAR: HEAR0279(dxs)
MMS: mma_0331
NEU: NE1161(dxs)
NET: Neut_1501
NMU: Nmul_A0236
EBA: ebA4439(dxs)
AZO: azo1198(dxs)
DAR: Daro_3061
TBD: Tbd_0879
MFA: Mfla_2133
HPY: HP0354(dxs)
HPJ: jhp0328(dxs)
HPA: HPAG1_0349
HHE: HH0608(dxs)
HAC: Hac_0968(dxs)
WSU: WS1996
TDN: Tmden_0475
CJE: Cj0321(dxs)
CJR: CJE0366(dxs)
CJJ: CJJ81176_0343(dxs)
CJU: C8J_0298(dxs)
CJD: JJD26997_1642(dxs)
CFF: CFF8240_0264(dxs)
CCV: CCV52592_1671(dxs)
CCV52592_1722
CHA: CHAB381_1297(dxs)
CCO: CCC13826_1594(dxs)
ABU: Abu_2139(dxs)
NIS: NIS_0391(dxs)
SUN: SUN_2055(dxs)
GSU: GSU0686(dxs-1) GSU1764(dxs-2)
GME: Gmet_1934 Gmet_2822
PCA: Pcar_1667
PPD: Ppro_1191 Ppro_2403
DVU: DVU1350(dxs)
DVL: Dvul_1718
DDE: Dde_2200
LIP: LI0408(dsx)
DPS: DP2700
ADE: Adeh_1097
MXA: MXAN_4643(dxs)
SAT: SYN_02456
SFU: Sfum_1418
PUB: SAR11_0611(dxs)
MLO: mlr7474
MES: Meso_0735

SME: SMc00972(dxs)
ATU: Atu0745(dxs)
ATC: AGR_C_1351
RET: RHE_CH00913(dxs)
RLE: RL0973(dxs)
BME: BMEI1498
BMF: BAB1_0462(dxs)
BMS: BR0436(dxs)
BMB: BruAb1_0458(dxs)
BOV: BOV_0443(dxs)
BJA: bll2651(dxs)
BRA: BRADO2161(dxs)
BBT: BBta_2479(dxs)
RPA: RPA0952(dxs)
RPB: RPB_4460
RPC: RPC_1149
RPD: RPD_4305
RPE: RPE_1067
NWI: Nwi_0633
NHA: Nham_0778
BHE: BH04350(dxs)
BQU: BQ03540(dxs)
BBK: BARBAKC583_0400(dxs)
CCR: CC_2068
SIL: SPO0247(dxs)
SIT: TM1040_2920
RSP: RSP_0254(dxsA) RSP_1134(dxs)
JAN: Jann_0088 Jann_0170
RDE: RD1_0101(dxs) RD1_0548(dxs)
MMR: Mmar10_0849
HNE: HNE_1838(dxs)
ZMO: ZMO1234(dxs) ZMO1598(dxs)
NAR: Saro_0161
SAL: Sala_2354
ELI: ELI_12520
GOX: GOX0252
GBE: GbCGDNIH1_0221
GbCGDNIH1_2404
RRU: Rru_A0054 Rru_A2619
MAG: amb2904
MGM: Mmc1_1048
SUS: Acid_1783
BSU: BG11715(dxs)
BHA: BH2779
BAN: BA4400(dxs)
BAR: GBAA4400(dxs)
BAA: BA_4853
BAT: BAS4081
BCE: BC4176(dxs)
BCA: BCE_4249(dxs)
BCZ: BCZK3930(dxs)
BTK: BT9727_3919(dxs)
BTL: BALH_3785(dxs)
BLI: BL01523(dxs)
BLD: BLi02598(dxs)
BCL: ABC2462(dxs)
BAY: RBAM_022600
BPU: BPUM_2159
GKA: GK2392
GTN: GTNG_2322
LMO: lmo1365(tktB)
LMF: LMOf2365_1382(dxs)
LIN: lin1402(tktB)
LWE: lwe1380(tktB)
LLA: L108911(dxsA) L123365(dxsB)
LLC: LACR_1572 LACR_1843
LLM: llmg_0749(dxsB)
SAK: SAK_0263
LPL: lp_2610(dxs)
LJO: LJ0406
LAC: LBA0356
LSL: LSL_0209(dxs)
LGA: LGAS_0350
STH: STH1842
CAC: CAC2077 CA_P0106(dxs)
CPE: CPE1819
CPF: CPF_2073(dxs)
CPR: CPR_1787(dxs)
CTC: CTC01575
CNO: NT01CX_1983
CTH: Cthe_0828
CDF: CD1207(dxs)
CBO: CBO1881(dxs)
CBA: CLB_1818(dxs)
CBH: CLC_1825(dxs)
CBF: CLI_1945(dxs)
CKL: CKL_1231(dxs)
CHY: CHY_1985(dxs)
DSY: DSY2348
DRM: Dred_1078
PTH: PTH_1196(dxs)
SWO: Swol_0582
CSC: Csac_1853
TTE: TTE1298(dxs)
MTA: Moth_1511
MPE: MYPE730
MGA: MGA_1268(dxs)
MTU: Rv2682c(dxs1) Rv3379c(dxs2)
MTC: MT2756(dxs)
MBO: Mb2701c(dxs1) Mb3413c(dxs2)
MLE: ML1038(dxs)
MPA: MAP2803c(dxs)

MAV: MAV_3577(dxs)
MSM: MSMEG_2776(dxs)
MMC: Mmcs_2208
CGL: NCgl1827(cgl1902)
CGB: cg2083(dxs)
CEF: CE1796
CDI: DIP1397(dxs)
CJK: jk1078(dxs)
NFA: nfa37410(dxs)
RHA: RHA1_ro06843
SCO: SCO6013(SC1C3.01)
SCO6768(SC6A5.17)
SMA: SAV1646(dxs1) SAV2244(dxs2)
TWH: TWT484
TWS: TW280(Dxs)
LXX: Lxx10450(dxs)
CMI: CMM_1660(dxsA)
AAU: AAur_1790(dxs)
PAC: PPA1062
TFU: Tfu_1917
FRA: Francci3_1326
FAL: FRAAL2088(dxs)
ACE: Acel_1393
SEN: SACE_1815(dxs) SACE_4351
BLO: BL1132(dxs)
BAD: BAD_0513(dxs)
FNU: FN1208 FN1464
RBA: RB2143(dxs)
CTR: CT331(dxs)
CTA: CTA_0359(dxs)
CMU: TC0608
CPN: CPn1060(tktB_2)
CPA: CP0790
CPJ: CPj1060(tktB_2)
CPT: CpB1102
CCA: CCA00304(dxs)
CAB: CAB301(dxs)
CFE: CF0699(dxs)
PCU: pc0619(dxs)
TPA: TP0824
TDE: TDE1910(dxs)
LIL: LA3285(dxs)
LIC: LIC10863(dxs)
LBJ: LBJ_0917(dxs)
LBL: LBL_0932(dxs)
SYN: sll1945(dxs)
SYW: SYNW1292(Dxs)
SYC: syc1087_c(dxs)
SYF: Synpcc7942_0430
SYD: Syncc9605_1430
SYE: Syncc9902_1069
SYG: sync_1410(dxs)
SYR: SynRCC307_1390(dxs)
SYX: SynWH7803_1223(dxs)
CYA: CYA_1701(dxs)
CYB: CYB_1983(dxs)
TEL: tll0623
GVI: gll0194
ANA: alr0599
AVA: Ava_4532
PMA: Pro0928(dxs)
PMM: PMM0907(Dxs)
PMT: PMT0685(dxs)
PMN: PMN2A_0300
PMI: PMT9312_0893
PMB: A9601_09541(dxs)
PMC: P9515_09901(dxs)
PMF: P9303_15371(dxs)
PMG: P9301_09521(dxs)
PMH: P9215_09851
PMJ: P9211_08521
PME: NATL1_09721(dxs)
TER: Tery_3042
BTH: BT_1403 BT_4099
BFR: BF0873 BF4306
BFS: BF0796(dxs) BF4114
PGI: PG2217(dxs)
CHU: CHU_3643(dxs)
GFO: GFO_3470(dxs)
FPS: FP0279(dxs)
CTE: CT0337(dxs)
CPH: Cpha266_0671
PVI: Cvib_0498
PLT: Plut_0450
DET: DET0745(dxs)
DEH: cbdb_A720(dxs)
DRA: DR_1475
DGE: Dgeo_0994
TTH: TTC1614
TTJ: TTHA0006
AAE: aq_881
TMA: TM1770
PMO: Pmob_1001

例示性乙醯基-CoA-乙醯轉移酶核酸與多肽

HSA: 38(ACAT1) 39(ACAT2)
PTR: 451528(ACAT1)
MCC: 707653(ACAT1) 708750(ACAT2)
MMU: 110446(Acat1) 110460(Acat2)
RNO: 25014(Acat1)
CFA: 484063(ACAT2) 489421(ACAT1)
GGA: 418968(ACAT1)
421587(RCJMB04_34i5)
XLA: 379569(MGC69098)
414622(MGC81403) 414639(MGC81256)
444457(MGC83664)
XTR: 394562(acat2)
DRE: 30643(acat2)
SPU: 759502(LOC759502)
DME: Dmel_CG10932 Dmel_CG9149
CEL: T02G5.4 T02G5.7 T02G5.8(kat-1)
ATH: AT5G48230(ACAT2/EMB1276)
OSA: 4326136 4346520
CME: CMA042C CME087C
SCE: YPL028W(ERG10)
AGO: AGOS_ADR165C
PIC: PICST_31707(ERG10)
CAL: CaO19.1591(erg10)
CGR: CAGL0L12364g
SPO: SPBC215.09c
MGR: MGG_01755 MGG_13499
ANI: AN1409.2
AFM: AFUA_6G14200 AFUA_8G04000
AOR: AO090103000012 AO090103000406
CNE: CNC05280
UMA: UM03571.1
DDI: DDB_0231621
PFA: PF14_0484
TET: TTHERM_00091590
TTHERM_00277470 TTHERM_00926980
TCR: 511003.60
ECO: b2224(atoB)
ECJ: JW2218(atoB) JW5453(yqeF)
ECE: Z4164(yqeF)
ECS: ECs3701
ECC: c2767(atoB) c3441(yqeF)
ECI: UTI89_C2506(atoB)
UTI89_C3247(yqeF)
ECP: ECP_2268 ECP_2857
ECV: APECO1_3662(yqeF)
APECO1_4335(atoB)
APECO1_43352(atoB)
ECX: EcHS_A2365
STY: STY3164(yqeF)
STT: t2929(yqeF)
SPT: SPA2886(yqeF)
SEC: SC2958(yqeF)
STM: STM3019(yqeF)
SFL: SF2854(yqeF)
SFX: S3052(yqeF)
SFV: SFV_2922(yqeF)
SSN: SSON_2283(atoB) SSON_3004(yqeF)
SBO: SBO_2736(yqeF)
ECA: ECA1282(atoB)
ENT: Ent638_3299
SPE: Spro_0592
HIT: NTHI0932(atoB)
XCC: XCC1297(atoB)
XCB: XC_2943
XCV: XCV1401(thlA)
XAC: XAC1348(atoB)
XOO: XOO1881(atoB)
XOM: XOO_1778(XOO1778)
VCH: VCA0690
VCO: VC0395_0630
VVU: VV2_0494 VV2_0741
VVY: VVA1043 VVA1210
VPA: VPA0620 VPA1123 VPA1204
PPR: PBPRB1112 PBPRB1840
PAE: PA2001(atoB) PA2553 PA3454
PA3589 PA3925
PAU: PA14_38630(atoB)
PPU: PP_2051(atoB) PP_2215(fadAx)
PP_3754 PP_4636
PPF: Pput_2009 Pput_2403 Pput_3523
Pput_4498
PST: PSPTO_0957(phbA-1)
PSPTO_3164(phbA-2)
PSB: Psyr_0824 Psyr_3031
PSP: PSPPH_0850(phbA1)
PSPPH_2209(phbA2)

PFL: PFL_1478(atoB-2) PFL_2321 PFL_3066 PFL_4330(atoB-2) PFL_5283
PFO: Pfl_1269 Pfl_1739 Pfl_2074 Pfl_2868
PEN: PSEEN3197 PSEEN3547(fadAx) PSEEN4635(phbA)
PMY: Pmen_1138 Pmen_2036 Pmen_3597 Pmen_3662 Pmen_3820
PAR: Psyc_0252 Psyc_1169
PCR: Pcryo_0278 Pcryo_1236 Pcryo_1260
PRW: PsycPRwf_2011
ACI: ACIAD0694 ACIAD1612 ACIAD2516(atoB)
SON: SO_1677(atoB)
SDN: Sden_1943
SFR: Sfri_1338 Sfri_2063
SAZ: Sama_1375
SBL: Sbal_1495
SBM: Shew185_1489
SBN: Sbal195_1525
SLO: Shew_1667 Shew_2858
SPC: Sputcn32_1397
SSE: Ssed_1473 Ssed_3533
SPL: Spea_2783
SHE: Shewmr4_2597
SHM: Shewmr7_2664
SHN: Shewana3_2771
SHW: Sputw3181_2704
ILO: IL0872
CPS: CPS_1605 CPS_2626
PHA: PSHAa0908 PSHAa1454(atoB) PSHAa1586(atoB)
PAT: Patl_2923
SDE: Sde_3149
PIN: Ping_0659 Ping_2401
MAQ: Maqu_2117 Maqu_2489 Maqu_2696 Maqu_3162
CBU: CBU_0974
LPN: lpg1825(atoB)
LPF: lpl1789
LPP: lpp1788
NOC: Noc_1891
AEH: Mlg_0688 Mlg_2706
HHA: Hhal_1685
HCH: HCH_05299
CSA: Csal_0301 Csal_3068
ABO: ABO_0648(fadAx)
MMW: Mmwyl1_0073 Mmwyl1_3021 Mmwyl1_3053 Mmwyl1_3097 Mmwyl1_4182
AHA: AHA_2143(atoB)
CVI: CV_2088(atoB) CV_2790(phaA)
RSO: RSc0276(atoB) RSc1632(phbA) RSc1637(bktB) RSc1761(RS02948)
REU: Reut_A0138 Reut_A1348 Reut_A1353 Reut_B4561 Reut_B4738 Reut_B5587 Reut_C5943 Reut_C6062
REH: H16_A0170 H16_A0867 H16_A0868 H16_A0872 H16_A1297 H16_A1438(phaA) H16_A1445(bktB) H16_A1528 H16_A1713 H16_A1720 H16_A1887 H16_A2148 H16_B0380 H16_B0381 H16_B0406 H16_B0662 H16_B0668 H16_B0759 H16_B1369 H16_B1771
RME: Rmet_0106 Rmet_1357 Rmet_1362 Rmet_5156
BMA: BMA1316 BMA1321(phbA) BMA1436
BMV: BMASAVP1_A1805(bktB) BMASAVP1_A1810(phbA)
BML: BMA10299_A0086(phbA) BMA10299_A0091
BMN: BMA10247_1076(bktB) BMA10247_1081(phbA)
BXE: Bxe_A2273 Bxe_A2335 Bxe_A2342 Bxe_A4255 Bxe_B0377 Bxe_B0739 Bxe_C0332 Bxe_C0574 Bxe_C0915
BVI: Bcep1808_0519 Bcep1808_1717 Bcep1808_2877 Bcep1808_3594 Bcep1808_4015 Bcep1808_5507 Bcep1808_5644
BUR: Bcep18194_A3629 Bcep18194_A5080 Bcep18194_A5091 Bcep18194_A6102 Bcep18194_B0263 Bcep18194_B1439 Bcep18194_C6652 Bcep18194_C6802 Bcep18194_C6874 Bcep18194_C7118 Bcep18194_C7151 Bcep18194_C7332
BCN: Bcen_1553 Bcen_1599 Bcen_2158 Bcen_2563 Bcen_2998 Bcen_6289
BCH: Bcen2424_0542 Bcen2424_1790 Bcen2424_2772 Bcen2424_5368 Bcen2424_6232 Bcen2424_6276

BAM: Bamb_0447 Bamb_1728 Bamb_2824 Bamb_4717 Bamb_5771 Bamb_5969
BPS: BPSL1426 BPSL1535(phbA) BPSL1540
BPM: BURPS1710b_2325(bktB) BURPS1710b_2330(phbA) BURPS1710b_2453(atoB-2)
BPL: BURPS1106A_2197(bktB) BURPS1106A_2202(phbA)
BPD: BURPS668_2160(bktB) BURPS668_2165(phbA)
BTE: BTH_I2144 BTH_I2256 BTH_I2261
PNU: Pnuc_0927
BPE: BP0447 BP0668 BP2059
BPA: BPP0608 BPP1744 BPP3805 BPP4216 BPP4361
BBR: BB0614 BB3364 BB4250 BB4804 BB4947
RFR: Rfer_0272 Rfer_1000 Rfer_1871 Rfer_2273 Rfer_2561 Rfer_2594 Rfer_3839
POL: Bpro_1577 Bpro_2140 Bpro_3113 Bpro_4187
PNA: Pnap_0060 Pnap_0458 Pnap_0867 Pnap_1159 Pnap_2136 Pnap_2804
AAV: Aave_0031 Aave_2478 Aave_3944 Aave_4368
AJS: Ajs_0014 Ajs_0124 Ajs_1931 Ajs_2073 Ajs_2317 Ajs_3548 Ajs_3738 Ajs_3776
VEI: Veis_1331 Veis_3818 Veis_4193
DAC: Daci_0025 Daci_0192 Daci_3601 Daci_5988
MPT: Mpe_A1536 Mpe_A1776 Mpe_A1869 Mpe_A3367
HAR: HEAR0577(phbA)
MMS: mma_0555
NEU: NE2262(bktB)
NET: Neut_0610
EBA: ebA5202 p2A409(tioL)
AZO: azo0464(fadA1) azo0469(fadA2) azo2172(thlA)
DAR: Daro_0098 Daro_3022
HPA: HPAG1_0675
HAC: Hac_0958(atoB)
GME: Gmet_1719 Gmet_2074 Gmet_2213 Gmet_2268 Gmet_3302
GUR: Gura_3043
BBA: Bd0404(atoB) Bd2095
DOL: Dole_0671 Dole_1778 Dole_2160 Dole_2187
ADE: Adeh_0062 Adeh_2365
AFW: Anae109_0064 Anae109_1504
MXA: MXAN_3791
SAT: SYN_02642
SFU: Sfum_2280 Sfum_3582
RPR: RP737
RCO: RC1134 RC1135
RFE: RF_0163(paaJ)
RBE: RBE_0139(paaJ)
RAK: A1C_05820
RBO: A1I_07215
RCM: A1E_04760
PUB: SAR11_0428(thlA)
MLO: mlr3847
MES: Meso_3374
PLA: Plav_1573 Plav_2783
SME: SMa1450 SMc03879(phbA)
SMD: Smed_0499 Smed_3117 Smed_5094 Smed_5096
ATU: Atu2769(atoB) Atu3475
ATC: AGR_C_5022(phbA) AGR_L_2713
RET: RHE_CH04018(phbAch) RHE_PC00068(ypc00040) RHE_PF00014(phbAf)
RLE: RL4621(phaA) pRL100301 pRL120369
BME: BMEI0274 BMEII0817
BMF: BAB1_1783(phbA-1) BAB2_0790(phbA-2)
BMS: BR1772(phbA-1) BRA0448(phbA-2)
BMB: BruAb1_1756(phbA-1) BruAb2_0774(phbA-2)
BOV: BOV_1707(phbA-1)
OAN: Oant_1130 Oant_3107 Oant_3718 Oant_4020
BJA: bll0226(atoB) bll3949 bll7400 bll7819 blr3724(phbA)
BRA: BRADO0562(phbA) BRADO0983(pimB) BRADO3110 BRADO3134(atoB)
BBT: BBta_3558 BBta_3575(atoB) BBta_5147(pimB) BBta_7072(pimB) BBta_7614(phbA)

RPA: RPA0513(pcaF) RPA0531 RPA3715(pimB)
RPB: RPB_0509 RPB_0525 RPB_1748
RPC: RPC_0504 RPC_0636 RPC_0641 RPC_0832 RPC_1050 RPC_2005 RPC_2194 RPC_2228
RPD: RPD_0306 RPD_0320 RPD_3105 RPD_3306
RPE: RPE_0168 RPE_0248 RPE_3827
NWI: Nwi_3060
XAU: Xaut_3108 Xaut_4665
CCR: CC_0510 CC_0894 CC_3462
SIL: SPO0142(bktB) SPO0326(phbA) SPO0773 SPO3408
SIT: TM1040_0067 TM1040_2790 TM1040_3026 TM1040_3735
RSP: RSP_0745 RSP_1354 RSP_3184
RSH: Rsph17029_0022 Rsph17029_2401 Rsph17029_3179 Rsph17029_3921
RSQ: Rsph17025_0012 Rsph17025_2466 Rsph17025_2833
JAN: Jann_0262 Jann_0493 Jann_4050
RDE: RD1_0025 RD1_0201(bktB) RD1_3394(phbA)
PDE: Pden_2026 Pden_2663 Pden_2870 Pden_2907 Pden_4811 Pden_5022
DSH: Dshi_0074 Dshi_3066 Dshi_3331
MMR: Mmar10_0697
HNE: HNE_2706 HNE_3065 HNE_3133
NAR: Saro_0809 Saro_1069 Saro_1222 Saro_2306 Saro_2349
SAL: Sala_0781 Sala_1244 Sala_2896 Sala_3158
SWI: Swit_0632 Swit_0752 Swit_2893 Swit_3602 Swit_4887 Swit_5019 Swit_5309
ELI: ELI_01475 ELI_06705 ELI_12035
GBE: GbCGDNIH1_0447
ACR: Acry_1847 Acry_2256
RRU: Rru_A0274 Rru_A1380 Rru_A1469 Rru_A1946 Rru_A3387
MAG: amb0842
MGM: Mmc1_1165
ABA: Acid345_3239
BSU: BG11319(mmgA) BG13063(yhfS)
BHA: BH1997 BH2029 BH3801(mmgA)
BAN: BA3687 BA4240 BA5589
BAR: GBAA3687 GBAA4240 GBAA5589
BAA: BA_0445 BA_4172 BA_4700
BAT: BAS3418 BAS3932 BAS5193
BCE: BC3627 BC4023 BC5344
BCA: BCE_3646 BCE_4076 BCE_5475
BCZ: BCZK3329(mmgA) BCZK3780(thl) BCZK5044(atoB)
BCY: Bcer98_2722 Bcer98_3865
BTK: BT9727_3379(mmgA) BT9727_3765(thl) BT9727_5028(atoB)
BTL: BALH_3262(mmgA) BALH_3642(fadA) BALH_4843(atoB)
BLI: BL03925(mmgA)
BLD: BLi03968(mmgA)
BCL: ABC0345 ABC2989 ABC3617 ABC3891(mmgA)
BAY: RBAM_022450
BPU: BPUM_2374(yhfS) BPUM_2941 BPUM_3373
OIH: OB0676 OB0689 OB2632 OB3013
GKA: GK1658 GK3397
SAU: SA0342 SA0534(vraB)
SAV: SAV0354 SAV0576(vraB)
SAM: MW0330 MW0531(vraB)
SAR: SAR0351(thl) SAR0581
SAS: SAS0330 SAS0534
SAC: SACOL0426 SACOL0622(atoB)
SAB: SAB0304(thl) SAB0526
SAA: SAUSA300_0355 SAUSA300_0560(vraB)
SAO: SAOUHSC_00336 SAOUHSC_00558
SAJ: SaurJH9_0402
SAH: SaurJH1_0412
SEP: SE0346 SE2384
SER: SERP0032 SERP0220
SHA: SH0510(mvaC) SH2417
SSP: SSP0325 SSP2145
LMO: lmo1414
LMF: LMOf2365_1433
LIN: lin1453
LWE: lwe1431
LLA: L11745(thiL) L25946(fadA)
LLC: LACR_1665 LACR_1956
LLM: llmg_0930(thiL)
SPY: SPy_0140 SPy_1637(atoB)

SPZ: M5005_Spy_0119 M5005_Spy_0432 M5005_Spy_1344(atoB)
SPM: spyM18_0136 spyM18_1645(atoB)
SPG: SpyM3_0108 SpyM3_1378(atoB)
SPS: SPs0110 SPs0484
SPH: MGAS10270_Spy0121 MGAS10270_Spy0433 MGAS10270_Spy1461(atoB)
SPI: MGAS10750_Spy0124 MGAS10750_Spy0452 MGAS10750_Spy1453(atoB)
SPJ: MGAS2096_Spy0123 MGAS2096_Spy0451 MGAS2096_Spy1365(atoB)
SPK: MGAS9429_Spy0121 MGAS9429_Spy0431 MGAS9429_Spy1339(atoB)
SPF: SpyM50447(atoB2)
SPA: M6_Spy0166 M6_Spy0466 M6_Spy1390
SPB: M28_Spy0117 M28_Spy0420 M28_Spy1385(atoB)
SAK: SAK_0568
LJO: LJ1609
LAC: LBA0626(thiL)
LSA: LSA1486
LDB: Ldb0879
LBU: LBUL_0804
LBR: LVIS_2218
LCA: LSEI_1787
LGA: LGAS_1374
LRE: Lreu_0052
EFA: EF1364
OOE: OEOE_0529
STH: STH2913 STH725 STH804
CAC: CAC2873 CA_P0078(thiL)
CPE: CPE2195(atoB)
CPF: CPF_2460
CPR: CPR_2170
CTC: CTC00312
CNO: NT01CX_0538 NT01CX_0603
CDF: CD1059(thlA1) CD2676(thlA2)
CBO: CBO3200(thl)
CBE: Cbei_0411 Cbei_3630
CKL: CKL_3696(thlA1) CKL_3697(thlA2) CKL_3698(thlA3)
AMT: Amet_4630
AOE: Clos_0084 Clos_0258
CHY: CHY_1288 CHY_1355(atoB) CHY_1604 CHY_1738
DSY: DSY0632 DSY0639 DSY1567 DSY1710 DSY2402 DSY3302
DRM: Dred_0400 Dred_1491 Dred_1784 Dred_1892
SWO: Swol_0308 Swol_0675 Swol_0789 Swol_1486 Swol_1934 Swol_2051
TTE: TTE0549(paaJ)
MTA: Moth_1260
MTU: Rv1135A Rv1323(fadA4) Rv3546(fadA5)
MTC: MT1365(phbA)
MBO: Mb1167 Mb1358(fadA4) Mb3576(fadA5) Mb3586c(fadA6)
MBB: BCG_1197 BCG_1385(fadA4) BCG_3610(fadA5) BCG_3620c(fadA6)
MLE: ML1158(fadA4)
MPA: MAP2407c(fadA3) MAP2436c(fadA4)
MAV: MAV_1544 MAV_1573 MAV_1863 MAV_5081
MSM: MSMEG_2224 MSMEG_4920
MUL: MUL_0357
MVA: Mvan_1976 Mvan_1988 Mvan_4305 Mvan_4677 Mvan_4891
MGI: Mflv_1347 Mflv_1484 Mflv_2040 Mflv_2340 Mflv_4356 Mflv_4368
MMC: Mmcs_1758 Mmcs_1769 Mmcs_3796 Mmcs_3864
MKM: Mkms_0251 Mkms_1540 Mkms_1805 Mkms_1816 Mkms_2836 Mkms_3159
Mkms_3286 Mkms_3869 Mkms_3938 Mkms_4227 Mkms_4411 Mkms_4580
Mkms_4724 Mkms_4764 Mkms_4776
MJL: Mjls_0231 Mjls_1739 Mjls_1750 Mjls_2819 Mjls_3119 Mjls_3235
Mjls_3800 Mjls_3850 Mjls_4110 Mjls_4383 Mjls_4705 Mjls_4876
Mjls_5018 Mjls_5063 Mjls_5075
CGL: NCgl2309(cgl2392)
CGB: cg2625(pcaF)
CEF: CE0731 CE2295
CJK: jk1543(fadA3)
NFA: nfa10750(fadA4)

RHA: RHA1_ro01455 RHA1_ro01623 RHA1_ro01876 RHA1_ro02517(catF)

RHA1_ro03022 RHA1_ro03024 RHA1_ro03391 RHA1_ro03892

RHA1_ro04599 RHA1_ro05257 RHA1_ro08871

SCO: SCO5399(SC8F4.03)

SMA: SAV1384(fadA5) SAV2856(fadA1)

ART: Arth_1160 Arth_2986 Arth_3268 Arth_4073

NCA: Noca_1371 Noca_1797 Noca_1828 Noca_2764 Noca_4142

TFU: Tfu_1520 Tfu_2394

FRA: Francci3_3687

FRE: Franean1_1044 Franean1_2711 Franean1_2726 Franean1_3929

Franean1_4037 Franean1_4577

FAL: FRAAL2514 FRAAL2618 FRAAL5910(atoB)

ACE: Acel_0626 Acel_0672

SEN: SACE_1192(mmgA) SACE_2736(fadA6) SACE_4011(catF)

SACE_6236(fadA4)

STP: Strop_3610

SAQ: Sare_1316 Sare_3991

RXY: Rxyl_1582 Rxyl_1842 Rxyl_2389 Rxyl_2530

FNU: FN0495

BGA: BG0110(fadA)

BAF: BAPKO_0110(fadA)

LIL: LA0457(thiL1) LA0828(thiL2) LA4139(fadA)

LIC: LIC10396(phbA)

LBJ: LBJ_2862(paaJ-4)

LBL: LBL_0209(paaJ-4)

SYN: slr1993(phaA)

SRU: SRU_1211(atoB) SRU_1547

CHU: CHU_1910(atoB)

GFO: GFO_1507(atoB)

FJO: Fjoh_4612

FPS: FP0770 FP1586 FP1725

RRS: RoseRS_3911 RoseRS_4348

RCA: Rcas_0702 Rcas_3206

HAU: Haur_0522

DRA: DR_1072 DR_1428 DR_1960 DR_2480 DR_A0053

DGE: Dgeo_0755 Dgeo_1305 Dgeo_1441 Dgeo_1883

TTH: TTC0191 TTC0330

TTJ: TTHA0559

TME: Tmel_1134

FNO: Fnod_0314

PMO: Pmob_0515

HMA: rrnAC0896(acaB3) rrnAC2815(aca2) rrnAC3497(yqeF)

rrnB0240(aca1) rrnB0242(acaB2) rrnB0309(acaB1)

TAC: Ta0582

TVO: TVN0649

PTO: PTO1505

APE: APE_2108

SSO: SSO2377(acaB-4)

STO: ST0514

SAI: Saci_0963 Saci_1361(acaB1)

MSE: Msed_0656

PAI: PAE1220

PIS: Pisl_0029 Pisl_1301

PCL: Pcal_0781

PAS: Pars_0309 Pars_1071

CMA: Cmaq_1941

例示性HMG-CoA合成酶核酸與多肽

HSA: 3157(HMGCS1) 3158(HMGCS2)
PTR: 457169(HMGCS2)
461892(HMGCS1)
MCC: 702553(HMGCS1)
713541(HMGCS2)
MMU: 15360(Hmgcs2) 208715(Hmgcs1)
RNO: 24450(Hmgcs2) 29637(Hmgcs1)
CFA: 479344(HMGCS1)
607923(HMGCS2)
BTA: 407767(HMGCS1)
SSC: 397673(CH242-38B5.1)
GGA: 396379(HMGCS1)
XLA: 380091(hmgcs1)
447204(MGC80816)
DRE: 394060(hmgcs1)
SPU: 578259(LOC578259)
DME: Dmel_CG4311(Hmgs)
CEL: F25B4.6
ATH: AT4G11820(BAP1)
OSA: 4331418 4347614
CME: CMM189C
SCE: YML126C(ERG13)
AGO: AGOS_ADL356C
PIC: PICST_83020
CAL: CaO19_7312(CaO19.7312)
CGR: CAGL0H04081g
SPO: SPAC4F8.14c(hcs)
MGR: MGG_01026
ANI: AN4923.2
AFM: AFUA_3G10660 AFUA_8G07210
AOR: AO090003000611 AO090010000487
CNE: CNC05080 CNG02670
UMA: UM05362.1
ECU: ECU10_0510
DDI: DDBDRAFT_0217522
DDB_0219924(hgsA)
TET: TTHERM_00691190
TBR: Tb927.8.6110
YPE: YPO1457
YPK: y2712(pksG)
YPM: YP_1349(pksG)
YPA: YPA_0750
YPN: YPN_2521
YPP: YPDSF_1517
YPS: YPTB1475
CBD: COXBU7E912_1931
TCX: Tcr_1719
DNO: DNO_0799
BMA: BMAA1212
BPS: BPSS1002
BPM: BURPS1710b_A2613
BPL: BURPS1106A_A1384
BPD: BURPS668_A1470
BTE: BTH_II1670
MXA: MXAN_3948(tac)
MXAN_4267(mvaS)
BSU: BG10926(pksG)
OIH: OB2248
SAU: SA2334(mvaS)
SAV: SAV2546(mvaS)
SAM: MW2467(mvaS)
SAR: SAR2626(mvaS)
SAS: SAS2432
SAC: SACOL2561
SAB: SAB2420(mvaS)
SAA: SAUSA300_2484
SAO: SAOUHSC_02860
SAJ: SaurJH9_2569
SAH: SaurJH1_2622
SEP: SE2110
SER: SERP2122
SHA: SH0508(mvaS)
SSP: SSP0324
LMO: lmo1415
LMF: LMOf2365_1434(mvaS)
LIN: lin1454
LWE: lwe1432(mvaS)
LLA: L13187(hmcM)
LLC: LACR_1666
LLM: llmg_0929(hmcM)
SPY: SPy_0881(mvaS.2)
SPZ: M5005_Spy_0687(mvaS.1)
SPM: spyM18_0942(mvaS2)
SPG: SpyM3_0600(mvaS.2)
SPS: SPs1253
SPH: MGAS10270_Spy0745(mvaS1)
SPI: MGAS10750_Spy0779(mvaS1)
SPJ: MGAS2096_Spy0759(mvaS1)
SPK: MGAS9429_Spy0743(mvaS1)
SPF: SpyM51121(mvaS)
SPA: M6_Spy0704
SPB: M28_Spy0667(mvaS.1)
SPN: SP_1727
SPR: spr1571(mvaS)
SPD: SPD_1537(mvaS)
SAG: SAG1316
SAN: gbs1386
SAK: SAK_1347

SMU: SMU.943c
STC: str0577(mvaS)
STL: stu0577(mvaS)
STE: STER_0621
SSA: SSA_0338(mvaS)
SSU: SSU05_1641
SSV: SSU98_1652
SGO: SGO_0244
LPL: lp_2067(mvaS)
LJO: LJ1607
LAC: LBA0628(hmcS)
LSA: LSA1484(mvaS)
LSL: LSL_0526
LDB: Ldb0881(mvaS)
LBU: LBUL_0806
LBR: LVIS_1363
LCA: LSEI_1785
LGA: LGAS_1372
LRE: Lreu_0676
PPE: PEPE_0868
EFA: EF1363
OOE: OEOE_0968
LME: LEUM_1184
NFA: nfa22120
SEN: SACE_4570(pksG)
BBU: BB0683
BGA: BG0706
BAF: BAPKO_0727
FJO: Fjoh_0678
HAL: VNG1615G(mvaB)
HMA: rrnAC1740(mvaS)
HWA: HQ2868A(mvaB)
NPH: NP2608A(mvaB_1)
NP4836A(mvaB_2)

例示性羥甲基戊二醯基-CoA還原酶核酸與多肽

HSA: 3156(HMGCR)
PTR: 471516(HMGCR)
MCC: 705479(HMGCR)
MMU: 15357(Hmgcr)
RNO: 25675(Hmgcr)
CFA: 479182(HMGCR)
BTA: 407159(HMGCR)
GGA: 395145(RCJMB04_14m24)
SPU: 373355(LOC373355)
DME: Dmel_CG10367(Hmgcr)
CEL: F08F8.2
OSA: 4347443
SCE: YLR450W(HMG2)
YML075C(HMG1)
AGO: AGOS_AER152W
CGR: CAGL0L11506g
SPO: SPCC162.09c(hmg1)
ANI: AN3817.2
AFM: AFUA_1G11230 AFUA_2G03700
AOR: AO090103000311 AO090120000217
CNE: CNF04830
UMA: UM03014.1
ECU: ECU10_1720
DDI: DDB_0191125(hmgA)
DDB_0215357(hmgB)
TBR: Tb927.6.4540
TCR: 506831.40 509167.20
LMA: LmjF30.3190
VCH: VCA0723
VCO: VC0395_0662
VVU: VV2_0117
VVY: VVA0625
VPA: VPA0968
VFI: VFA0841
PAT: Patl_0427
CBU: CBU_0030 CBU_0610
CBD: COXBU7E912_0151
COXBU7E912_0622(hmgA)
TCX: Tcr_1717
DNO: DNO_0797
CVI: CV_1806
SUS: Acid_5728 Acid_6132
SAU: SA2333(mvaA)
SAV: SAV2545(mvaA)
SAM: MW2466(mvaA)
SAB: SAB2419c(mvaA)
SEP: SE2109
LWE: lwe0819(mvaA)
LLA: L10433(mvaA)
LLC: LACR_1664
LLM: llmg_0931(mvaA)
SPY: SPy_0880(mvaS.1)
SPM: spyM18_0941(mvaS1)
SPG: SpyM3_0599(mvaS.1)
SPS: SPs1254
SPH: MGAS10270_Spy0744
SPI: MGAS10750_Spy0778
SPJ: MGAS2096_Spy0758
SPK: MGAS9429_Spy0742
SPA: M6_Spy0703

SPN: SP_1726
SAG: SAG1317
SAN: gbs1387
STC: str0576(mvaA)
STL: stu0576(mvaA)
STE: STER_0620
SSA: SSA_0337(mvaA)
LPL: lp_0447(mvaA)
LJO: LJ1608
LSL: LSL_0224
LBR: LVIS_0450
LGA: LGAS_1373
EFA: EF1364
NFA: nfa22110
BGA: BG0708(mvaA)
SRU: SRU_2422
FPS: FP2341
MMP: MMP0087(hmgA)
MMQ: MmarC5_1589
MAC: MA3073(hmgA)
MBA: Mbar_A1972
MMA: MM_0335
MBU: Mbur_1098
MHU: Mhun_3004
MEM: Memar_2365
MBN: Mboo_0137
MTH: MTH562

MST: Msp_0584(hmgA)
MSI: Msm_0227
MKA: MK0355(HMG1)
AFU: AF1736(mvaA)
HAL: VNG1875G(mvaA)
HMA: rrnAC3412(mvaA)
HWA: HQ3215A(hmgR)
NPH: NP0368A(mvaA_2)
NP2422A(mvaA_1)
TAC: Ta0406m
TVO: TVN1168
PTO: PTO1143
PAB: PAB2106(mvaA)
PFU: PF1848
TKO: TK0914
RCI: RCIX1027(hmgA) RCIX376(hmgA)
APE: APE_1869
IHO: Igni_0476
HBU: Hbut_1531
SSO: SSO0531
STO: ST1352
SAI: Saci_1359
PAI: PAE2182
PIS: Pisl_0814
PCL: Pcal_1085
PAS: Pars_0796

例示性甲羥戊酸激酶核酸與多肽

HSA: 4598(MVK)
MCC: 707645(MVK)
MMU: 17855(Mvk)
RNO: 81727(Mvk)
CFA: 486309(MVK)
BTA: 505792(MVK)
GGA: 768555(MVK)
DRE: 492477(zgc:103473)
SPU: 585785(LOC585785)
DME: Dmel_CG33671
OSA: 4348331
SCE: YMR208W(ERG12)
AGO: AGOS_AER335W
PIC: PICST_40742(ERG12)
CGR: CAGL0F03861g
SPO: SPAC13G6.11c
MGR: MGG_06946
ANI: AN3869.2
AFM: AFUA_4G07780

AOR: AO090023000793
CNE: CNK01740
ECU: ECU09_1780
DDI: DDBDRAFT_0168621
TET: TTHERM_00637680
TBR: Tb927.4.4070
TCR: 436521.9 509237.10
LMA: LmjF31.0560
CBU: CBU_0608 CBU_0609
CBD: COXBU7E912_0620(mvk)
LPN: lpg2039
LPF: lpl2017
LPP: lpp2022
BBA: Bd1027(lmbP) Bd1630(mvk)
MXA: MXAN_5019(mvk)
OIH: OB0225
SAU: SA0547(mvaK1)
SAV: SAV0590(mvaK1)
SAM: MW0545(mvaK1)

SAR: SAR0596(mvaK1)
SAS: SAS0549
SAC: SACOL0636(mvk)
SAB: SAB0540(mvaK1)
SAA: SAUSA300_0572(mvk)
SAO: SAOUHSC_00577
SEP: SE0361
SER: SERP0238(mvk)
SHA: SH2402(mvaK1)
SSP: SSP2122
LMO: lmo0010
LMF: LMOf2365_0011
LIN: lin0010
LWE: lwe0011(mvk)
LLA: L7866(yeaG)
LLC: LACR_0454
LLM: llmg_0425(mvk)
SPY: SPy_0876(mvaK1)
SPZ: M5005_Spy_0682(mvaK1)
SPM: spyM18_0937(mvaK1)
SPG: SpyM3_0595(mvaK1)
SPS: SPs1258
SPH: MGAS10270_Spy0740(mvaK1)
SPI: MGAS10750_Spy0774(mvaK1)
SPJ: MGAS2096_Spy0753(mvaK1)
SPK: MGAS9429_Spy0737(mvaK1)
SPF: SpyM51126(mvaK1)
SPA: M6_Spy0699
SPB: M28_Spy0662(mvaK1)
SPN: SP_0381
SPR: spr0338(mvk)
SPD: SPD_0346(mvk)
SAG: SAG1326
SAN: gbs1396
SAK: SAK_1357(mvk)
SMU: SMU.181
STC: str0559(mvaK1)
STL: stu0559(mvaK1)
STE: STER_0598
SSA: SSA_0333(mvaK1)
SSU: SSU05_0289
SSV: SSU98_0285
SGO: SGO_0239(mvk)
LPL: lp_1735(mvaK1)
LJO: LJ1205
LAC: LBA1167(mvaK)
LSA: LSA0908(mvaK1)
LSL: LSL_0685(eRG)
LDB: Ldb0999(mvk)
LBU: LBUL_0906
LBR: LVIS_0858
LCA: LSEI_1491
LGA: LGAS_1033
LRE: Lreu_0915
PPE: PEPE_0927
EFA: EF0904(mvk)
OOE: OEOE_1100
LME: LEUM_1385
NFA: nfa22070
BGA: BG0711
BAF: BAPKO_0732
FPS: FP0313
MMP: MMP1335
MAE: Maeo_0775
MAC: MA0602(mvk)
MBA: Mbar_A1421
MMA: MM_1762
MBU: Mbur_2395
MHU: Mhun_2890
MEM: Memar_1812
MBN: Mboo_2213
MST: Msp_0858(mvk)
MSI: Msm_1439
MKA: MK0993(ERG12)
HAL: VNG1145G(mvk)
HMA: rrnAC0077(mvk)
HWA: HQ2925A(mvk)
NPH: NP2850A(mvk)
PTO: PTO1352
PHO: PH1625
PAB: PAB0372(mvk)
PFU: PF1637(mvk)
TKO: TK1474
RCI: LRC399(mvk)
APE: APE_2439
HBU: Hbut_0877
SSO: SSO0383
STO: ST2185
SAI: Saci_2365(mvk)
MSE: Msed_1602
PAI: PAE3108
PIS: Pisl_0467
PCL: Pcal_1835

例示性磷酸甲羥戊酸激酶核酸與多肽

HSA: 10654(PMVK)
PTR: 457350(PMVK)
MCC: 717014(PMVK)
MMU: 68603(Pmvk)
CFA: 612251(PMVK)
BTA: 513533(PMVK)
DME: Dmel_CG10268
ATH: AT1G31910
OSA: 4332275
SCE: YMR220W(ERG8)
AGO: AGOS_AER354W
PIC: PICST_52257(ERG8)
CGR: CAGL0F03993g
SPO: SPAC343.01c
MGR: MGG_05812
ANI: AN2311.2
AFM: AFUA_5G10680
AOR: AO090010000471
CNE: CNM00100
UMA: UM00760.1
DDI: DDBDRAFT_0184512
TBR: Tb09.160.3690
TCR: 507913.20 508277.140
LMA: LmjF15.1460
MXA: MXAN_5017
OIH: OB0227
SAU: SA0549(mvaK2)
SAV: SAV0592(mvaK2)
SAM: MW0547(mvaK2)
SAR: SAR0598(mvaK2)
SAS: SAS0551
SAC: SACOL0638
SAB: SAB0542(mvaK2)
SAA: SAUSA300_0574
SAO: SAOUHSC_00579
SAJ: SaurJH9_0615
SEP: SE0363
SER: SERP0240
SHA: SH2400(mvaK2)
SSP: SSP2120
LMO: lmo0012
LMF: LMOf2365_0013
LIN: lin0012
LWE: lwe0013
LLA: L10014(yebA)
LLC: LACR_0456
LLM: llmg_0427
SPY: SPy_0878(mvaK2)
SPZ: M5005_Spy_0684(mvaK2)
SPM: spyM18_0939
SPG: SpyM3_0597(mvaK2)
SPS: SPs1256
SPH: MGAS10270_Spy0742(mvaK2)
SPI: MGAS10750_Spy0776(mvaK2)
SPJ: MGAS2096_Spy0755(mvaK2)
SPK: MGAS9429_Spy0739(mvaK2)
SPF: SpyM51124(mvaK2)
SPA: M6_Spy0701
SPB: M28_Spy0664(mvaK2)
SPN: SP_0383
SPR: spr0340(mvaK2)
SPD: SPD_0348(mvaK2)
SAG: SAG1324
SAN: gbs1394
SAK: SAK_1355
SMU: SMU.938
STC: str0561(mvaK2)
STL: stu0561(mvaK2)
STE: STER_0600
SSA: SSA_0335(mvaK2)
SSU: SSU05_0291
SSV: SSU98_0287
SGO: SGO_0241
LPL: lp_1733(mvaK2)
LJO: LJ1207
LAC: LBA1169
LSA: LSA0906(mvaK2)
LSL: LSL_0683
LDB: Ldb0997(mvaK)
LBU: LBUL_0904
LBR: LVIS_0860
LCA: LSEI_1092
LGA: LGAS_1035
LRE: Lreu_0913
PPE: PEPE_0925
EFA: EF0902
NFA: nfa22090
BGA: BG0710
BAF: BAPKO_0731
NPH: NP2852A
SSO: SSO2988
STO: ST0978
SAI: Saci_1244

例示性二磷酸甲羥戊酸去羧酶核酸與多肽

HSA: 4597(MVD)
PTR: 468069(MVD)
MCC: 696865(MVD)
MMU: 192156(Mvd)
RNO: 81726(Mvd)
CFA: 489663(MVD)
GGA: 425359(MVD)
DME: Dmel_CG8239
SCE: YNR043W(MVD1)
AGO: AGOS_AGL232C
PIC: PICST_90752
CGR: CAGL0C03630g
SPO: SPAC24C9.03
MGR: MGG_09750
ANI: AN4414.2
AFM: AFUA_4G07130
AOR: AO090023000862
CNE: CNL04950
UMA: UM05179.1
DDI: DDBDRAFT_0218058
TET: TTHERM_00849200
TBR: Tb10.05.0010 Tb10.61.2745
TCR: 507993.330 511281.40
LMA: LmjF18.0020
CBU: CBU_0607(mvaD)
CBD: COXBU7E912_0619(mvaD)
LPN: lpg2040
LPF: lpl2018
LPP: lpp2023
TCX: Tcr_1734
DNO: DNO_0504(mvaD)
BBA: Bd1629
MXA: MXAN_5018(mvaD)
OIH: OB0226
SAU: SA0548(mvaD)
SAV: SAV0591(mvaD)
SAM: MW0546(mvaD)
SAR: SAR0597(mvaD)
SAS: SAS0550
SAC: SACOL0637(mvaD)
SAB: SAB0541(mvaD)
SAA: SAUSA300_0573(mvaD)
SAO: SAOUHSC_00578
SAJ: SaurJH9_0614
SAH: SaurJH1_0629
SEP: SE0362
SER: SERP0239(mvaD)
SHA: SH2401(mvaD)
SSP: SSP2121
LMO: lmo0011
LMF: LMOf2365_0012(mvaD)
LIN: lin0011
LWE: lwe0012(mvaD)
LLA: L9089(yeaH)
LLC: LACR_0455
LLM: llmg_0426(mvaD)
SPY: SPy_0877(mvaD)
SPZ: M5005_Spy_0683(mvaD)
SPM: spyM18_0938(mvd)
SPG: SpyM3_0596(mvaD)
SPS: SPs1257
SPH: MGAS10270_Spy0741(mvaD)
SPI: MGAS10750_Spy0775(mvaD)
SPJ: MGAS2096_Spy0754(mvaD)
SPK: MGAS9429_Spy0738(mvaD)
SPF: SpyM51125(mvaD)
SPA: M6_Spy0700
SPB: M28_Spy0663(mvaD)
SPN: SP_0382
SPR: spr0339(mvd1)
SPD: SPD_0347(mvaD)
SAG: SAG1325(mvaD)
SAN: gbs1395
SAK: SAK_1356(mvaD)
SMU: SMU.937
STC: str0560(mvaD)
STL: stu0560(mvaD)
STE: STER_0599
SSA: SSA_0334(mvaD)
SSU: SSU05_0290
SSV: SSU98_0286
SGO: SGO_0240(mvaD)
LPL: lp_1734(mvaD)
LJO: LJ1206
LAC: LBA1168(mvaD)
LSA: LSA0907(mvaD)
LSL: LSL_0684
LDB: Ldb0998(mvaD)
LBU: LBUL_0905
LBR: LVIS_0859
LCA: LSEI_1492
LGA: LGAS_1034
LRE: Lreu_0914
PPE: PEPE_0926
EFA: EF0903(mvaD)
LME: LEUM_1386

NFA: nfa22080
BBU: BB0686
BGA: BG0709
BAF: BAPKO_0730
GFO: GFO_3632
FPS: FP0310(mvaD)
HAU: Haur_1612
HAL: VNG0593G(dmd)
HMA: rrnAC1489(dmd)
HWA: HQ1525A(mvaD)
NPH: NP1580A(mvaD)
PTO: PTO0478 PTO1356
SSO: SSO2989
STO: ST0977
SAI: Saci_1245(mvd)
MSE: Msed_1576

例示性異戊烯基磷酸激酶(IPK)核酸與多肽

Methanobacterium thermoautotrophicum gi|2621082
Methanococcus jannaschii DSM 2661 gi|1590842 ;
Methanocaldococcus jannaschii gi|1590842
Methanothermobacter thermautotrophicus gi|2621082
Picrophilus torridus DSM9790 (IG-57) gi|48477569
Pyrococcus abyssi gi|14520758
Pyrococcus horikoshii OT3 gi|3258052
Archaeoglobus fulgidus DSM4304 gi|2648231

例示性異戊烯基-二磷酸δ-異構酶(IDI)核酸與多肽

HSA: 3422(IDI1) 91734(IDI2)
PTR: 450262(IDI2) 450263(IDI1)
MCC: 710052(LOC710052)
721730(LOC721730)
MMU: 319554(Idi1)
RNO: 89784(Idi1)
GGA: 420459(IDI1)
XLA: 494671(LOC494671)
XTR: 496783(idi2)
SPU: 586184(LOC586184)
CEL: K06H7.9(idi-1)
ATH: AT3G02780(IPP2)
OSA: 4338791 4343523
CME: CMB062C
SCE: YPL117C(IDI1)
AGO: AGOS_ADL268C
PIC: PICST_68990(IDI1)
CGR: CAGL0J06952g
SPO: SPBC106.15(idi1)
ANI: AN0579.2
AFM: AFUA_6G11160
AOR: AO090023000500
CNE: CNA02550
UMA: UM04838.1
ECU: ECU02_0230
DDI: DDB_0191342(ipi)
TET: TTHERM_00237280
TTHERM_00438860
TBR: Tb09.211.0700
TCR: 408799.19 510431.10
LMA: LmjF35.5330
EHI: 46.t00025
ECO: b2889(idi)
ECJ: JW2857(idi)
ECE: Z4227
ECS: ECs3761
ECC: c3467
ECI: UTI89_C3274
ECP: ECP_2882
ECV: APECO1_3638
ECW: EcE24377A_3215(idi)
ECX: EcHS_A3048
STY: STY3195
STT: t2957
SPT: SPA2907(idi)
SEC: SC2979(idi)

STM: STM3039(idi)
SFL: SF2875(idi)
SFX: S3074
SFV: SFV_2937
SSN: SSON_3042 SSON_3489(yhfK)
SBO: SBO_3103
SDY: SDY_3193
ECA: ECA2789
PLU: plu3987
ENT: Ent638_3307
SPE: Spro_2201
VPA: VPA0278
VFI: VF0403
PPR: PBPRA0469(mvaD)
PEN: PSEEN4850
CBU: CBU_0607(mvaD)
CBD: COXBU7E912_0619(mvaD)
LPN: lpg2051
LPF: lpl2029
LPP: lpp2034
TCX: Tcr_1718
HHA: Hhal_1623
DNO: DNO_0798
EBA: ebA5678 p2A143
DVU: DVU1679(idi)
DDE: Dde_1991
LIP: LI1134
BBA: Bd1626
AFW: Anae109_4082
MXA: MXAN_5021(fni)
RPR: RP452
RTY: RT0439(idi)
RCO: RC0744
RFE: RF_0785(fni)
RBE: RBE_0731(fni)
RAK: A1C_04190
RBO: A1I_04755
RCM: A1E_02555
RRI: A1G_04195
MLO: mlr6371
RET: RHE_PD00245(ypd00046)
XAU: Xaut_4134
SIL: SPO0131
SIT: TM1040_3442
RSP: RSP_0276
RSH: Rsph17029_1919
RSQ: Rsph17025_1019
JAN: Jann_0168
RDE: RD1_0147(idi)
DSH: Dshi_3527
BSU: BG11440(ypgA)
BAN: BA1520
BAR: GBAA1520
BAA: BA_2041
BAT: BAS1409
BCE: BC1499
BCA: BCE_1626
BCZ: BCZK1380(fni)
BCY: Bcer98_1222
BTK: BT9727_1381(fni)
BTL: BALH_1354
BLI: BL02217(fni)
BLD: BLi02426
BAY: RBAM_021020(fni)
BPU: BPUM_2020(fni)
OIH: OB0537
SAU: SA2136(fni)
SAV: SAV2346(fni)
SAM: MW2267(fni)
SAR: SAR2431(fni)
SAS: SAS2237
SAC: SACOL2341(fni)
SAB: SAB2225c(fni)
SAA: SAUSA300_2292(fni)
SAO: SAOUHSC_02623
SEP: SE1925
SER: SERP1937(fni-2)
SHA: SH0712(fni)
SSP: SSP0556
LMO: lmo1383
LMF: LMOf2365_1402(fni)
LIN: lin1420
LWE: lwe1399(fni)
LLA: L11083(yebB)
LLC: LACR_0457
LLM: llmg_0428(fni)
SPY: SPy_0879
SPZ: M5005_Spy_0685
SPM: spyM18_0940
SPG: SpyM3_0598
SPS: SPs1255
SPH: MGAS10270_Spy0743
SPI: MGAS10750_Spy0777
SPJ: MGAS2096_Spy0756
SPK: MGAS9429_Spy0740
SPF: SpyM51123(fni)
SPA: M6_Spy0702
SPB: M28_Spy0665
SPN: SP_0384
SPR: spr0341(fni)
SPD: SPD_0349(fni)
SAG: SAG1323

SAN: gbs1393
SAK: SAK_1354(fni)
SMU: SMU.939
STC: str0562(idi)
STL: stu0562(idi)
STE: STER_0601
SSA: SSA_0336
SGO: SGO_0242
LPL: lp_1732(idi1)
LJO: LJ1208
LAC: LBA1171
LSA: LSA0905(idi)
LSL: LSL_0682
LDB: Ldb0996(fni)
LBU: LBUL_0903
LBR: LVIS_0861
LCA: LSEI_1493
LGA: LGAS_1036
LRE: Lreu_0912
EFA: EF0901
OOE: OEOE_1103
STH: STH1674
CBE: Cbei_3081
DRM: Dred_0474
SWO: Swol_1341
MTA: Moth_1328
MTU: Rv1745c(idi)
MTC: MT1787(idi)
MBO: Mb1774c(idi)
MBB: BCG_1784c(idi)
MPA: MAP3079c
MAV: MAV_3894(fni)
MSM: MSMEG_1057(fni)
MSMEG_2337(fni)
MUL: MUL_0380(idi2)
MVA: Mvan_1582 Mvan_2176
MGI: Mflv_1842 Mflv_4187
MMC: Mmcs_1954
MKM: Mkms_2000
MJL: Mjls_1934
CGL: NCgl2223(cgl2305)
CGB: cg2531(idi)
CEF: CE2207
CDI: DIP1730(idi)
NFA: nfa19790 nfa22100
RHA: RHA1_ro00239
SCO: SCO6750(SC5F2A.33c)
SMA: SAV1663(idi)
LXX: Lxx23810(idi)
CMI: CMM_2889(idiA)
AAU: AAur_0321(idi)
PAC: PPA2115
FRA: Francci3_4188
FRE: Franean1_5570
FAL: FRAAL6504(idi)
KRA: Krad_3991
SEN: SACE_2627(idiB_2) SACE_5210(idi)
STP: Strop_4438
SAQ: Sare_4564 Sare_4928
RXY: Rxyl_0400
BBU: BB0684
BGA: BG0707
SYN: sll1556
SYC: syc2161_c
SYF: Synpcc7942_1933
CYA: CYA_2395(fni)
CYB: CYB_2691(fni)
TEL: tll1403
ANA: all4591
AVA: Ava_2461 Ava_B0346
TER: Tery_1589
SRU: SRU_1900(idi)
CHU: CHU_0674(idi)
GFO: GFO_2363(idi)
FJO: Fjoh_0269
FPS: FP1792(idi)
CTE: CT0257
CCH: Cag_1445
CPH: Cpha266_0385
PVI: Cvib_1545
PLT: Plut_1764
RRS: RoseRS_2437
RCA: Rcas_2215
HAU: Haur_4687
DRA: DR_1087
DGE: Dgeo_1381
TTH: TT_P0067
TTJ: TTHB110
MJA: MJ0862
MMP: MMP0043
MMQ: MmarC5_1637
MMX: MmarC6_0906
MMZ: MmarC7_1040
MAE: Maeo_1184
MVN: Mevan_1058
MAC: MA0604(idi)
MBA: Mbar_A1419
MMA: MM_1764
MBU: Mbur_2397
MTP: Mthe_0474
MHU: Mhun_2888
MLA: Mlab_1665

MEM: Memar_1814
MBN: Mboo_2211
MTH: MTH48
MST: Msp_0856(fni)
MSI: Msm_1441
MKA: MK0776(lldD)
AFU: AF2287
HAL: VNG1818G(idi) VNG6081G(crt_1) VNG6445G(crt_2) VNG7060 VNG7149
HMA: rrnAC3484(idi)
HWA: HQ2772A(idiA) HQ2847A(idiB)
NPH: NP0360A(idiB_1) NP4826A(idiA) NP5124A(idiB_2)
TAC: Ta0102
TVO: TVN0179
PTO: PTO0496
PHO: PH1202
PAB: PAB1662
PFU: PF0856
TKO: TK1470
RCI: LRC397(fni)
APE: APE_1765.1
SMR: Smar_0822
IHO: Igni_0804
HBU: Hbut_0539
SSO: SSO0063
STO: ST2059
SAI: Saci_0091
MSE: Msed_2136
PAI: PAE0801
PIS: Pisl_1093
PCL: Pcal_0017
PAS: Pars_0051
TPE: Tpen_0272

例示性異戊二烯合成酶核酸與多肽

Genbank寄存編號
AY341431
AY316691
AY279379
AJ457070
AY182241

【圖式簡單說明】

圖1為針對大腸桿菌中之表現進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。atg起始密碼子為斜體，終止密碼子為粗體，且添加之*Pst*I位點加下劃線。

圖2為pTrcKudzu之圖譜。

圖3A-C為pTrcKudzu之核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。RBS加下劃線，野葛異戊二烯合成酶起始密碼子為粗體大寫字母，且終止密碼子為粗體大寫字母。載體骨架為pTrcHis2B。

圖4為pETNHisKudzu之圖譜。

圖5A-C為pETNHisKudzu之核苷酸序列(SEQ ID NO:3)。

圖6為pCL-lac-Kudzu之圖譜。

圖7A-C為pCL-lac-Kudzu之核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。

圖8A為展示不含載體之大腸桿菌BL21細胞中異戊二烯產量之圖。

圖8B為展示含有pCL-lac-Kudzu之大腸桿菌BL21細胞中異戊二烯產量之圖。

圖8C為展示含有pTrcKudzu之大腸桿菌BL21細胞中異戊二烯產量之圖。

圖8D為展示含有pETN-HisKudzu之大腸桿菌BL21細胞中異戊二烯產量之圖。

圖9A為展示在14公升批式補料醱酵中大腸桿菌BL21/pTrcKudzu之OD隨醱酵時間而變之圖。

圖9B為展示在14公升批式補料醱酵中大腸桿菌BL21/pTrcKudzu之異戊二烯產量隨醱酵時間而變之圖。

圖10A為展示檸檬泛菌中之異戊二烯產量之圖。不含重組野葛異戊二烯合成酶之對照細胞。灰色菱形表示異戊二烯合成，黑色正方形表示OD_{600}。

圖10B為展示表現pCL-lac Kudzu之檸檬泛菌中之異戊二烯產量之圖。灰色菱形表示異戊二烯合成，黑色正方形表示OD_{600}。

圖10C為展示表現pTrcKudzu之檸檬泛菌中之異戊二烯產量之圖。灰色菱形表示異戊二烯合成，黑色正方形表示OD_{600}。

圖11為展示表現重組異戊二烯合成酶之枯草桿菌中之異戊二烯產量之圖。BG3594comK為不含質體之枯草桿菌菌株(天然異戊二烯製造)。CF443為含有pBSKudzu之枯草桿菌菌株BG3594comK(重組異戊二烯製造)。y軸上之IS表示異戊二烯。

圖12A-C為pBS Kudzu #2之核苷酸序列(SEQ ID NO:5)。

圖13為針對耶氏酵母屬中之表現進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶的核苷酸序列(SEQ ID NO:6)。

圖14為包含針對耶氏酵母屬中之表現進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶基因之pTrex3g的圖譜。

圖15A-C為載體pSPZ1(MAP29Spb)之核苷酸序列(SEQ ID NO:7)。

圖16為針對耶氏酵母屬中之表現進行密碼子最佳化之合

成野葛(山葛)異戊二烯基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:8)。

圖17為合成雜交楊屬(銀白楊與歐洲山楊雜交種)異戊二烯合成酶基因之核苷酸序列(SEQ ID NO:9)。ATG起始密碼子為粗體，且終止密碼子加下劃線。

圖18A(圖18A1及圖18A2)展示概述載體pYLA 1、pYL1及pYL2(SEQ ID NO:75、73、72、71、70、69)之構造的示意圖。

圖18B展示概述載體pYLA(POP1)(SEQ ID NO:68、69)之構造的示意圖。

圖18C展示概述載體pYLA(KZ1)之構造的示意圖。

圖18D展示概述載體pYLI(KZ1)(SEQ ID NO:66、67)之構造的示意圖。

圖18E展示概述載體pYLI(MAP29)之構造的示意圖。

圖18F展示概述載體pYLA(MAP29)之構造的示意圖。

圖19A展示異戊二烯之MVA及DXP代謝途徑(基於F. Bouvier等人，Progress in Lipid Res. 44: 357-429, 2005)。以下描述包括途徑中各多肽之替代性名稱及揭示用於量測指定多肽之活性之檢驗的參考文獻(此等參考文獻中之每一者各藉此以全文引用的方式併入，尤其關於針對MVA及DXP途徑中之多肽的多肽活性之檢驗)。**甲羥戊酸途徑：AACT**；乙醯基-CoA乙醯轉移酶，MvaE，EC 2.3.1.9。檢驗：J. Bacteriol., 184: 2116-2122, 2002；**HMGS**；羥甲基戊二醯基-CoA合成酶，MvaS，EC 2.3.3.10。檢驗：J. Bacteriol., 184: 4065-4070, 2002；**HMGR**；3-羥基-3-甲基

戊二醯基-CoA還原酶，MvaE，EC 1.1.1.34。檢驗：J. Bacteriol., 184: 2116-2122, 2002；**MVK**；甲羥戊酸激酶，ERG12，EC 2.7.1.36。檢驗：Curr Genet 19: 9-14, 1991。**PMK**；磷酸甲羥戊酸激酶，ERG8，EC 2.7.4.2。檢驗：Mol Cell Biol., 11: 620-631, 1991；**DPMDC**；二磷酸甲羥戊酸去羧酶，MVD1，EC 4.1.1.33。檢驗：Biochemistry, 33: 13355-13362, 1994；**IDI**；異戊烯基-二磷酸δ-異構酶，IDI1，EC 5.3.3.2。檢驗：J. Biol. Chem. 264: 19169-19175, 1989。**DXP途徑：DXS**；1-去氧木酮糖-5-磷酸合成酶，dxs，EC 2.2.1.7。檢驗：PNAS, 94: 12857-62, 1997；**DXR**；1-去氧-D-木酮糖5-磷酸還原異構酶，dxr，EC 2.2.1.7。檢驗：Eur. J. Biochem. 269: 4446-4457, 2002；**MCT**；4-二磷酸胞苷-2C-甲基-D-赤藻糖醇合成酶，IspD，EC 2.7.7.60。檢驗：PNAS, 97: 6451-6456, 2000；**CMK**；4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藻糖醇激酶，IspE，EC 2.7.1.148。檢驗：PNAS, 97: 1062-1067, 2000；**MCS**；2C-甲基-D-赤藻糖醇2,4-環二磷酸合成酶，IspF，EC 4.6.1.12。檢驗：PNAS, 96: 11758-11763, 1999；**HDS**；1-羥基-2-甲基-2-(E)-丁烯基4-二磷酸合成酶，ispG，EC 1.17.4.3。檢驗：J. Org. Chem., 70: 9168-9174, 2005；**HDR**；1-羥基-2-甲基-2-(E)-丁烯基4-二磷酸還原酶，IspH，EC 1.17.1.2。檢驗：JACS, 126:12847-12855, 2004。

圖19B說明經典MVA途徑及經修改之MVA途徑。1，乙醯

基-CoA乙醯轉移酶(**AACT**)；2，HMG-CoA合成酶(**HMGS**)；3，HMG-CoA還原酶(**HMGR**)；4，甲羥戊酸激酶(**MVK**)；5，磷酸甲羥戊酸激酶(**PMK**)；6，二磷酸甲羥戊酸去羧酶(**MVD**或**DPMDC**)；7，異戊烯基二磷酸異構酶(**IDI**)；8，磷酸甲羥戊酸去羧酶(**PMDC**)；9，異戊烯基磷酸激酶(**IPK**)。經典MVA途徑自反應1經由反應5及6行進至反應7，而經修改之MVA途徑行進至反應8及9。結構式中之P及PP分別為磷酸及焦磷酸。此圖獲自Koga及Morii, *Microbiology and Mol. Biology Reviews*, 71:97-120, 2007，其以全文引用的方式併入，尤其關於經修改之MVA途徑之核酸與多肽。經修改之MVA途徑存在於例如一些古生生物體，諸如馬氏甲烷球菌中。

圖20(圖20A及圖20B)展示描繪不含(左圖)或含有(右圖)野葛異戊二烯合成酶基因之重組解脂耶氏酵母菌株之異戊二烯產量之GC-MS分析結果的圖。箭頭表示可靠異戊二烯標準物之溶離時間。

圖21為pTrcKudzu yIDI DXS Kan之圖譜。

圖22A-D為pTrcKudzu yIDI DXS Kan之核苷酸序列(SEQ ID NO:10)。

圖23A為展示在BL21/pTrcKudzukan中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。0時為用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。菱形表示OD_{600}，圓圈表示異戊二烯總生產力(μg/L)，且正方

形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖23B為展示在BL21/pTrcKudzu yIDI kan中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。0時為用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。菱形表示OD_{600}，圓圈表示異戊二烯總生產力(μg/L)，且正方形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖23C為展示在BL21/pTrcKudzu DXS kan中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。0時為用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。菱形表示OD_{600}，圓圈表示異戊二烯總生產力(μg/L)，且正方形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖23D為展示在BL21/pTrcKudzu yIDI DXS kan中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。0時為用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。菱形表示OD_{600}，圓圈表示異戊二烯總生產力(μg/L)，且正方形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖23E為展示在BL21/pCL PtrcKudzu中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。0時為用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。菱形表示OD_{600}，圓圈表示異戊二烯總生產力

(μg/L)，且正方形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖23F為展示在BL21/pCL PtrcKudzu yIDI中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。0時為用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。菱形表示OD_{600}，圓圈表示異戊二烯總生產力(μg/L)，且正方形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖23G為展示在BL21/pCL PtrcKudzu DXS中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。0時為用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。菱形表示OD_{600}，圓圈表示異戊二烯總生產力(μg/L)，且正方形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖23H為展示在BL21/pTrcKudzuIDIDXSkan中自葡萄糖製造異戊二烯之情況之圖。箭頭表示用IPTG(400 μmol)誘導之時間。x軸為誘導後時間；y軸為OD_{600}，且y2軸為異戊二烯總生產力(μg/L頂部空間氣體)或比生產力(μg/L頂部空間氣體/OD)。黑色菱形表示OD_{600}，黑色三角形表示異戊二烯生產力(μg/L)，且白色正方形表示異戊二烯比生產力(μg/L/OD)。

圖24為pTrcKKDyIkIS kan之圖譜。

圖25A-D為pTrcKKDyIkIS kan之核苷酸序列(SEQ ID NO:11)。

圖26為pCL PtrcUpperPathway之圖譜。

圖27A-27D為pCL PtrcUpperPathway之核苷酸序列(SEQ ID NO:12)。

圖28展示含有下游MVA途徑及酵母idi以供整合至枯草桿菌染色體中nprE基因座處之卡匣的圖譜。nprE上游/下游表示距nprE基因座各1 kb之序列以供整合。aprE啟動子(鹼性絲胺酸蛋白酶啟動子)表示*aprE*基因之啟動子(-35、-10、+1轉錄起始位點，RBS)。MVK1表示酵母甲羥戊酸激酶基因。RBS-PMK表示起始位點上游具有桿菌屬RBS之酵母磷酸甲羥戊酸激酶基因。RBS-MPD表示起始位點上游具有桿菌屬RBS之酵母二磷酸甲羥戊酸去羧酶基因。RBS-IDI表示起始位點上游具有桿菌屬RBS之酵母idi基因。終止子表示來自解澱粉桿菌之鹼性絲胺酸蛋白酶轉錄終止子。SpecR表示壯觀黴素抗性標記物。「供擴增用之nprE上游重複序列」表示用於擴增之上游區域之正向重複序列。

圖29A-D為含有下游MVA途徑及酵母idi以供整合至枯草桿菌染色體中*nprE*基因座處之卡匣的核苷酸序列(SEQ ID NO:13)。

圖30為p9796-poplar之圖譜。

圖31A-B為p9796-poplar之核苷酸序列(SEQ ID NO:14)。

圖32為pTrcPoplar之圖譜。

圖33A-C為pTrcPoplar之核苷酸序列(SEQ ID NO:15)。

圖34為pTrcKudzu yIDI Kan之圖譜。

圖35A-C為pTrcKudzu yIDI Kan之核苷酸序列(SEQ ID NO:16)。

圖36為pTrcKudzuDXS Kan之圖譜。

圖37A-C為pTrcKudzuDXS Kan之核苷酸序列(SEQ ID NO:17)。

圖38為pCL PtrcKudzu之圖譜。

圖39A-C為pCL PtrcKudzu之核苷酸序列(SEQ ID NO:18)。

圖40為pCL PtrcKudzu A3之圖譜。

圖41A-C為pCL PtrcKudzu A3之核苷酸序列(SEQ ID NO:19)。

圖42為pCL PtrcKudzu yIDI之圖譜。

圖43A-C為pCL PtrcKudzu yIDI之核苷酸序列(SEQ ID NO:20)。

圖44為pCL PtrcKudzu DXS之圖譜。

圖45A-D為pCL PtrcKudzu DXS之核苷酸序列(SEQ ID NO:21)。

圖46A-E展示描繪自生質原料而得之異戊二烯產量之圖。A圖展示自玉米乾草而得之異戊二烯產量，B圖展示自甜菜渣而得之異戊二烯產量，C圖展示自軟木漿而得之異戊二烯產量，D圖展示自葡萄糖而得之異戊二烯產量，且E圖展示自不含其他原料之細胞而得之異戊二烯產量。灰色正方形表示在接種後指定時間培養物之OD_{600}量測值，且黑色三角形表示在接種後指定時間之異戊二烯產量。

圖47A展示描繪在未添加葡萄糖之培養物中由BL21

(λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan)而得之異戊二烯產量之圖。正方形表示OD_{600}，且三角形表示所製造之異戊二烯(μg/ml)。

圖47B展示描繪由BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan)自1%葡萄糖原料轉化糖而得之異戊二烯產量之圖。正方形表示OD_{600}，且三角形表示所製造之異戊二烯(μg/ml)。

圖47C展示描繪由BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan)自1%轉化糖原料而得之異戊二烯產量之圖。正方形表示OD_{600}，且三角形表示所製造之異戊二烯(μg/ml)。

圖47D展示描繪由BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan)自1% AFEX玉米乾草原料而得之異戊二烯產量之圖。正方形表示OD_{600}，且三角形表示所製造之異戊二烯(μg/ml)。

圖48A-C展示顯示酵母提取物對異戊二烯產量之影響的圖。A圖展示在以不同量之酵母提取物進行補料之醱酵槽內光學密度之時程。B圖展示在以不同量之酵母提取物進行補料之醱酵槽內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。C圖展示酵母提取物對生長於批式補料培養物中之大腸桿菌之異戊二烯產量的影響。

圖49A-C展示顯示在500 L生物反應器中含有pTrcKudzu+yIDI+DXS質體之大腸桿菌細胞之異戊二烯產量之圖。A圖展示在以葡萄糖及酵母提取物進行補料之

500-L生物反應器內光學密度之時程。B圖展示在以葡萄糖及酵母提取物進行補料之500-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。C圖展示以葡萄糖及酵母提取物進行補料之500-L生物反應器中所製造之總異戊二烯之時程。

圖50為pJMupperpathway2之圖譜。

圖51A-C為pJMupperpathway2之核苷酸序列(SEQ ID NO:22)。

圖52為pBS Kudzu #2之圖譜。

圖53A為展示在14公升批式補料醱酵中表現重組野葛異戊二烯合成酶之桿菌屬在醱酵時間期間之生長的圖。黑色菱形表示不含重組異戊二烯合成酶之對照菌株(BG3594comK)(天然異戊二烯製造)，且灰色三角形表示CF443，含有pBSKudzu之桿菌屬菌株BG3594comK(重組異戊二烯製造)。

圖53B為展示在14公升批式補料醱酵中表現重組野葛異戊二烯合成酶之桿菌屬在醱酵時間期間之異戊二烯產量的圖。黑色菱形表示不含重組異戊二烯合成酶之對照菌株(BG3594comK)(天然異戊二烯製造)，且灰色三角形表示CF443，含有pBSKudzu之桿菌屬菌株BG3594comK(重組異戊二烯製造)。

圖54為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖55為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯

力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖56為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖57為以甘油進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖58為以甘油進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖59為以甘油進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖60A-60C為以葡萄糖進行補料之150-L生物反應器內光學密度、甲羥戊酸力價及比生產力之時程。

圖61A-61C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度、甲羥戊酸力價及比生產力之時程。

圖62A-62C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度、甲羥戊酸力價及比生產力之時程。

圖63A-63C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度、異戊二烯力價及比生產力之時程。

圖64A-64C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度、異戊二烯力價及比生產力之時程。

圖65A-65C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度、異戊二烯力價及比生產力之時程。

圖66A-66C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光

學密度、異戊二烯力價及比生產力之時程。

圖67A-67C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度、異戊二烯力價及比生產力之時程。

圖68為系列A之計算絕熱火焰溫度隨多種氧含量之燃料濃度而變之圖。圖例以圖中曲線出現之次序列出該等曲線。舉例而言，圖例中之第一條目(40℃下於空氣中之異戊二烯)對應於圖中最高曲線。

圖69為系列B之計算絕熱火焰溫度隨多種氧含量與4%水之燃料濃度而變之圖。圖例以圖中曲線出現之次序列出該等曲線。

圖70為系列C之計算絕熱火焰溫度隨多種氧含量與5% CO_2之燃料濃度而變之圖。圖例以圖中曲線出現之次序列出該等曲線。

圖71為系列D之計算絕熱火焰溫度隨多種氧含量與10% CO_2之燃料濃度而變之圖。圖例以圖中曲線出現之次序列出該等曲線。

圖72為系列E之計算絕熱火焰溫度隨多種氧含量與15% CO_2之燃料濃度而變之圖。圖例以圖中曲線出現之次序列出該等曲線。

圖73為系列F之計算絕熱火焰溫度隨多種氧含量與20% CO_2之燃料濃度而變之圖。圖例以圖中曲線出現之次序列出該等曲線。

圖74為系列G之計算絕熱火焰溫度隨多種氧含量與30% CO_2之燃料濃度而變之圖。圖例以圖中曲線出現之次序列

出該等曲線。

圖75A為系列A之重量百分比至體積百分比之CAFT模型結果轉換之表格。

圖75B為以體積百分比繪製的圖68中系列A之CAFT模型之可燃性結果之圖。

圖76A為系列B之重量百分比至體積百分比之CAFT模型結果轉換之表格。

圖76B為以體積百分比繪製的圖69中系列B之CAFT模型之可燃性結果之圖。

圖77為描繪可燃性測試容器之圖。

圖78A為測試系列1(0%蒸汽、0 psig及40℃)之可燃性曲線之圖。

圖78B為概述測試系列1之爆炸及非爆炸數據點之表格。

圖78C為測試系列1與CAFT模型相比較之可燃性曲線之圖。

圖79A為測試系列2(4%蒸汽、0 psig及40℃)之可燃性曲線之圖。

圖79B為概述測試系列2之爆炸及非爆炸數據點之表格。

圖79C為測試系列2與CAFT模型相比較之可燃性曲線之圖。

圖80A-B為測試系列1之詳細實驗條件及結果之表格。

圖81為測試系列2之詳細實驗條件及結果之表格。

圖82為所繪製之在3個大氣壓之壓力下計算絕熱火焰溫度隨多種氮氣/氧氣比率之燃料濃度而變之圖。

圖83為所繪製之在1個大氣壓之壓力下計算絕熱火焰溫度隨多種氮氣/氧氣比率之燃料濃度而變之圖。

圖84為使用來自圖82之數據且遵循實例13中所述之方法構建之可燃包絡範圍之圖。實驗數據點(圓圈)係來自本文所述在1個大氣壓之初始系統壓力下進行之測試。

圖85為使用來自圖83之數據且遵循實例13中所述之方法構建之可燃包絡範圍之圖。實驗數據點(圓圈)係來自本文所述在1個大氣壓之初始系統壓力下進行之測試。

圖86A為醱酵釋出氣體之GC/MS層析圖。

圖86B為圖86A之放大圖，其展示醱酵釋出氣體中存在之微量揮發物。

圖87A為在-78℃下低溫捕獲之後釋出氣體中存在之痕量揮發物之GC/MS層析圖。

圖87B為在-196℃下低溫捕獲之後釋出氣體中存在之痕量揮發物之GC/MS層析圖。

圖87C為圖87B之放大圖。

圖87D為圖87C之放大圖。

圖88A-B為比較來自石油來源性異戊二烯(圖88A)與來自以生物方法製造之異戊二烯(圖88B)之C5烴的GC/MS層析圖。標準物含有三種在異戊二烯主峰附近溶離之C5烴雜質(圖88A)。相比之下，以生物方法製造之異戊二烯含有一定量之乙醇及丙酮(過柱時間為3.41分鐘)(圖88A)。

圖89為分析表現野葛異戊二烯合成酶且補給葡萄糖與3 g/L酵母提取物之大腸桿菌BL21 (DE3) pTrcIS菌株之醱酵

釋出氣體之圖。

圖90展示結構上類似於異戊二烯且亦可能充當聚合催化劑毒物之若干雜質之結構。

圖91為pTrcHis2AUpperPathway(亦稱為pTrcUpperMVA)之圖譜。

圖92A-92C為pTrcHis2AUpperPathway(亦稱為pTrcUpperMVA)之核苷酸序列(SEQ ID NO:23)。

圖93為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖94為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖95為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖96為以轉化糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖97為以轉化糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖98為以轉化糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖99為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖100為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二

烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖101為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯比活性之時程。

圖102為pCLPtrcUpperPathwayHGS2之圖譜。

圖103A-103C為pCLPtrcUpperPathwayHGS2之核苷酸序列(SEQ ID NO:24)。

圖104為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖105為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖106為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖107為質體MCM330(attTn7處之FRT-cm-FRT-gi1.2-KKDy)之圖譜。

圖108A-108C為質體MCM330之核苷酸序列(SEQ ID NO:25)。

圖109為pET24D-Kudzu之圖譜。

圖110A-B為pET24D-Kudzu之核苷酸序列(SEQ ID NO:26)。

圖111A為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖111B為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二

烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖111C為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器中異戊二烯比生產力之時程。

圖112A為馬氏甲烷球菌古生下游途徑操縱子之圖譜。

圖112B-C為馬氏甲烷球菌古生下游途徑操縱子之核苷酸序列(SEQ ID NO:27)。

圖113A為MCM382-pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌)之圖譜。

圖113B-C為MCM382-pTrcKudzuMVK(馬氏甲烷球菌)之核苷酸序列(SEQ ID NO:28)。

圖114A為MCM376-來自pET200D中馬氏甲烷球菌古生下游途徑之MVK之圖譜。

圖114B-C為MCM376-來自pET200D中馬氏甲烷球菌古生下游途徑之MVK之核苷酸序列(SEQ ID NO:29)。

圖115A-115D展示過度表現MVK及異戊二烯合成酶會增加異戊二烯產量。在100 mL生物反應器中、以100及200 μM IPTG誘導製造異戊二烯下、於葡萄糖上生長期間，在22小時時程中量測自MCM401及MCM343積累之異戊二烯及CO_2。圖115A為自MCM343積累之異戊二烯(%)之圖。圖115B為自MCM401積累之異戊二烯(%)之圖。圖115C為自MCM343積累之CO_2(%)之圖。圖115D為自MCM401積累之CO_2(%)之圖。

圖116為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密

度之時程。

圖117為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖118為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖119為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內總二氧化碳析出速率(TCER)或代謝活性概況之圖。

圖120為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內在異戊二烯製造期間細胞生存力之圖。TVC/OD為1 mL培養液中、1個光學密度單位(OD_{550})下的總活菌數(群落形成單位)。

圖121為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖122為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖123為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖124為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內體積生產力之時程。每小時每公升培養液所製造之異戊二烯之量即定為體積生產力。

圖125為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內瞬時產率之時程。在數據點之間的時間間隔期間向生物反應器補

給之每單位量的葡萄糖(公克)所製造之異戊二烯之量(公克)(w/w)即定為瞬時產率。

圖126為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內總二氧化碳析出速率(TCER)或代謝活性概況之圖。

圖127為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內在異戊二烯製造期間的細胞生存力。TVC/OD為1 mL培養液中、1個光學密度單位(OD_{550})下的總活菌數(群落形成單位)。

圖128為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。

圖129為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。

圖130為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。

圖131為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內總二氧化碳析出速率(TCER)或代謝活性概況之圖。

圖132為展示以下情況之圖：進入生物反應器之氣流瞬間減少使得釋出氣體中異戊二烯之濃度突增，此不會導致代謝活性(TCER)顯著下降。TCER或代謝活性為總二氧化碳析出速率。

圖133為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內在異戊二烯製造期間細胞生存力之圖。TVC/OD為1 mL培養液中、1個光學密度單位(OD_{550})下的總活菌數(群落形成單位)。

圖134為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內光學密度之時程。垂直點線表示將異戊二烯以1 g/L/h之速率引入生物反應器中之時間間隔。

圖135為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內之總二氧化碳析出速率(TCER)或代謝活性概況。垂直點線表示將異戊二烯以1 g/L/h之速率引入生物反應器中之時間間隔。

圖136為以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內在異戊二烯製造期間的細胞生存力。TVC/OD為1 mL培養液中、1個光學密度單位(OD_{550})下的總活菌數(群落形成單位)。垂直點線表示將異戊二烯以1 g/L/h之速率引入生物反應器中之時間間隔。

圖137A-B為銀白楊pET24a之序列：異戊二烯合成酶基因以粗體字母突出顯示(SEQ ID NO:30)。

圖137C-D為黑楊pET24a之序列：異戊二烯合成酶基因以粗體字母突出顯示(SEQ ID NO:31)。

圖137E-F為美洲山楊pET24a之序列(SEQ ID NO:32)。

圖137G為美洲山楊異戊二烯合成酶基因之胺基酸序列(SEQ ID NO:33)。

圖137H-I為毛果楊pET24a之序列：異戊二烯合成酶基因以粗體字母突出顯示(SEQ ID NO:34)。

圖137J-K為歐洲山楊與銀白楊雜交種pET24a之序列：異戊二烯合成酶基因以粗體字母突出顯示(SEQ ID NO:35)。

圖137L為在pCR2.1骨架中含有野葛IspS編碼序列之MCM93的圖譜。

圖137M-N為MCM93之序列(SEQ ID NO:36)。

圖137O為pET24D-Kudzu之圖譜。

圖137P-Q為pET24D-Kudzu之序列(SEQ ID NO:37)。

圖138為如全細胞頂部空間檢驗中所量測之多個楊屬物種之異戊二烯合成酶表現數據。Y軸為以IPTG誘導之0.2 mL培養物所製造之異戊二烯，μg/L/OD。

圖139為如DMAPP檢驗所量測之楊屬異戊二烯合成酶之相對活性。楊屬酶之活性顯著高於野葛異戊二烯合成酶。楊屬[銀白楊與歐洲山楊雜交種]僅具有痕量(<1%)活性且未展示於圖中。

圖140為pDONR221:19430-hybrid_HGS之圖譜。

圖141為pDONR221:19430-hybrid_HGS之核苷酸序列，針對酵母進行密碼子最佳化之野葛異戊二烯合成酶之序列(SEQ ID NO:38)。

圖142A為pDW14之圖譜。

圖142B-C為pDW14之完整核苷酸序列(SEQ ID NO:39)。

圖143展示具有pDW14或pYES-DEST52之經誘導INVSc-1菌株。圖143A：以半乳糖誘導且以SimplyBlue SafeStain (Invitrogen)染色之INVSc-1菌株所產生之溶菌液的4-12% bis tris凝膠(Novex, Invitrogen)。圖143B：使用WesternBreeze套組(Invitrogen)對上述菌株進行之西方墨點分析。泳道如下：1，INVSc-1+pYES-DEST52；2，INVSc-1+pDW14(分離株1)；3，INVSc-1+pDW14(分離株2)。指示MW(kDa)(使用SeeBlue Plus2分子量標準)。

圖 144(圖 144A 及圖 144B)展示具有 pDW14 或 pYES-DEST52之經誘導INVSc-1菌株。圖144A：在溶解之前半乳糖誘導之菌株的OD_{600}。y軸為OD_{600}。圖144B：在對照菌株及具有異戊二烯合成酶之菌株中異戊二烯合成酶頂部空間DMAPP檢驗。以μg HG/L/OD計算比活性。樣品如下：對照，INVSc-1+pYES-DEST52；HGS-1，INVSc-1+pDW14(分離株1)；HGS-2，INVSc-1+pDW14(分離株2)。

圖145A為經密碼子最佳化之異戊二烯合成酶fluo-opt2v2之圖譜。

圖145B為經密碼子最佳化之異戊二烯合成酶fluo-opt2v2之核苷酸序列(SEQ ID NO:40)。

圖146A為pBBR1MCS5之圖譜。

圖 146B-C 為 pBBR1MCS5 之核苷酸序列(SEQ ID NO:41)。

圖147A為pBBR5HGSOpt2_2之圖譜。

圖 147B-C 為 pBBR5HGSOpt2_2 之核苷酸序列(SEQ ID NO:42)。

圖148為未經誘導、經IPTG(4×50 μmol)誘導或經IPTG(2×100 μmol)誘導之菌株MCM401的CER相對於醱酵時間之圖。

圖149展示在pH值經調整或未經調整之蔗糖溶液中，隨高壓滅菌循環(一次循環=30 min)次數而變之葡萄糖濃度。

圖150展示惡臭假單胞菌F1及螢光假單胞菌ATCC13525於葡萄糖、蔗糖及轉化蔗糖上之生長曲線(隨時間而變之

OD_{600})。

圖151展示大腸桿菌BL21(DE3)、MG1655、ATCC11303及B REL 606於葡萄糖、蔗糖及轉化蔗糖上之生長曲線(隨時間而變之OD_{600})。

圖152為質體pET24 P. alba HGS之圖譜。

圖153A-B為質體pET24 P. alba HGS之核苷酸序列(SEQ ID NO:43)。

圖154為展示用於核酸內切酶分解以構築質體EWL230之限制性位點、及BspHI與NcoI位點之間的相容黏性末端之示意圖。

圖155為質體EWL230之圖譜。

圖156A-B為質體EWL230之核苷酸序列(SEQ ID NO:44)。

圖157為展示用於核酸內切酶分解以構築質體EWL244之限制性位點、及NsiI與PstI位點之間的相容黏性末端之示意圖。

圖158為質體EWL244之圖譜。

圖159A-B為質體EWL244之核苷酸序列(SEQ ID NO:45)。

圖160A為馬氏甲烷球菌古生下游途徑操縱子之圖譜。

圖160B-C為馬氏甲烷球菌古生下游途徑操縱子之核苷酸序列(SEQ ID NO:46)。

圖161A為MCM376-來自pET200D中馬氏甲烷球菌古生下游途徑之MVK之圖譜。

圖161B-C為MCM376-來自pET200D中馬氏甲烷球菌古生下游途徑之MVK之核苷酸序列(SEQ ID NO:47)。

圖162為質體pBBRCMPGI1.5-pgl之圖譜。

圖163A-B為質體pBBRCMPGI1.5-pgl之核苷酸序列(SEQ ID NO:48)。

圖164A-F為在15-L規模下由表現馬氏甲烷球菌甲羥戊酸激酶、銀白楊異戊二烯合成酶及*pgl*(RHM111608-2)且於批式補料培養物中生長之大腸桿菌菌株製造異戊二烯之圖。圖164A展示以葡萄糖進行補料之15 L生物反應器內光學密度之時程。圖164B展示以葡萄糖進行補料之15 L生物反應器內異戊二烯力價之時程。每公升醱酵培養液所製造之異戊二烯之量即定為力價。計算異戊二烯之方法：59小時內所製造之累積異戊二烯(g)/59小時之時醱酵槽體積(L)[=]公克/公升培養液。圖164C亦展示以葡萄糖進行補料之15 L生物反應器內異戊二烯力價之時程。計算異戊二烯之方法：∫(瞬時異戊二烯製造速率，g/L/h)dt(t=0-59小時)[=]公克/公升培養液。圖164D展示以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內所製造之總異戊二烯之時程。圖164E展示以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內的體積生產力。圖164F展示以葡萄糖進行補料之15-L生物反應器內的二氧化碳析出速率(CER)或代謝活性概況。

圖165A-B為展示在15-L生物反應器中醱酵所產生之釋出氣體之分析情況的圖。樣品A為在64.8小時取樣之菌株RM111608-2。樣品B為在34.5小時取樣之菌株EWL256(大

腸桿菌BL21 (DE3), pCL上游，cmR-gi1.2-yKKDyI, pTrcAlba-mMVK)。對於兩種樣品，均偵測到氫氣高於基線(0.95×10^{-8}托)。

圖166A展示例示性Bioisoprene™回收單元。

圖166B展示例示性Bioisoprene™脫附/冷凝配置。

圖167展示Bioisoprene™產品之GC/FID層析圖。該物質經測定為99.7%純。

圖168A-C展示在處理之前(A)及用氧化鋁處理之後(B)或二氧化矽處理之後(C)Bioisoprene™樣品之GC/FID層析圖。此等層析圖中未展示異戊二烯峰。

圖169展示自醱酵釋出氣體純化異戊二烯之製程及相關裝置之圖。

圖170展示部分氫化之BioIsoprene™單體之GC/FID層析圖。化合物1(RT=12.30 min)=3-甲基-1-丁烯，化合物2(RT=12.70 min)=2-甲基丁烷，化合物3(RT=13.23 min)=2-甲基-1-丁烯，化合物4(RT=13.53 min)=異戊二烯，化合物5(RT=14.01 min)=2-甲基-2-丁烯。

圖171展示源自Amberlyst-15酸樹脂催化之2-甲基-2-丁烯二聚化之產物的GC/MS總離子層析圖。

圖172展示源自Amberlyst 15酸樹脂催化之BioIsoprene™單體寡聚之產物的GC/MS總離子層析圖。

圖173展示使用二聚反應器將C5流轉化成C10/C15產物流之製程流程圖。C5流包含BioIsoprene™單體及/或BioIsoprene™單體之C5衍生物。

【主要元件符號說明】

12	醱酵槽
14	第一管柱/管柱
16	分離單元
18	壓縮系統
20	開口
22	開口
24	第二管柱
26	開口
28	開口
30	開口
32	吸附系統
34	回流冷凝器
36	吸附系統/系統
38	吸附系統
40	開口
42	捕集器件

序列表

<110> 美商戴尼斯科美國公司

<120> 包含異戊二烯衍生物之燃料組合物

<140> TW 099119620
<141> 2010-06-15

<150> US 61/187,959
<151> 2009-06-17

<160> 142

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 1701
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 1
atgtgtgcga cctcttctca atttactcag attaccgagc ataattcccg tcgttccgca 60
aactatcagc caaacctgtg gaatttcgaa ttcctgcaat ccctggagaa cgacctgaaa 120
gtggaaaagc tggaggagaa agcgaccaaa ctggaggaag aagttcgctg catgatcaac 180
cgtgtagaca cccagccgct gtccctgctg gagctgatcg acgatgtgca gcgcctgggt 240
ctgacctaca aatttgaaaa agacatcatt aaagccctgg aaaacatcgt actgctggac 300
gaaaacaaaa agaacaaatc tgacctgcac gcaaccgctc tgtctttccg tctgctgcgt 360
cagcacggtt tcgaggtttc tcaggatgtt tttgagcgtt tcaaggataa agaaggtggt 420
ttcagcggtg aactgaaagg tgacgtccaa ggcctgctga gcctgtatga agcgtcttac 480
ctgggtttcg agggtgagaa cctgctggag gaggcgcgta cctttttcat cacccacctg 540
aagaacaacc tgaaagaagg cattaatacc aaggttgcag aacaagtgag ccacgccctg 600
gaactgccat atcaccagcg tctgcaccgt ctggaggcac gttggttcct ggataaatac 660
gaaccgaaag aaccgcatca ccagctgctg ctggagctgg cgaagctgga ttttaacatg 720
gtacagaccc tgcaccagaa agagctgcaa gatctgtccc gctggtggac cgagatgggc 780
ctggctagca aactggattt tgtacgcgac cgcctgatgg aagtttattt ctgggcactg 840
ggtatggcgc cagacccgca gtttggtgaa tgtcgcaaag ctgttactaa aatgtttggt 900
ctggtgacga tcatcgatga cgtgtatgac gtttatggca ctctggacga actgcaactg 960
ttcaccgatg ctgtagagcg ctgggacgtt aacgctatta acaccctgcc ggactatatg 1020
aaactgtgtt tcctggcact gtacaacacc gttaacgaca cgtcctattc tatttctgaaa 1080
gagaaaggtc ataacaacct gtcctatctg acgaaaagct ggcgtgaact gtgcaaagcc 1140
tttctgcaag aggcgaaatg gtccaacaac aaaattatcc cggctttctc caagtacctg 1200
gaaaacgcca gcgtttcctc ctccggtgta gcgctgctgg cgccgtctta cttttccgta 1260
tgccagcagc aggaagacat ctccgaccac gcgctgcgtt ccctgaccga cttccatggt 1320
ctggtgcgtt ctagctgcgt tatcttccgc ctgtgcaacg atctggccac ctctgcggcg 1380
gagctggaac gtggcgagac taccaattct atcattagct acatgcacga aaacgatggt 1440
accagcgagg aacaggcccg cgaagaactg cgtaaactga tcgacgccga atggaaaaag 1500
atgaatcgtg aacgcgttag cgactccacc ctgctgccta aagcgttcat ggaaatcgca 1560
gttaacatgg cacgtgtttc ccactgcacc taccagtatg gcgatggtct gggtcgccca 1620
gactacgcga ctgaaaaccg catcaaactg ctgctgattg acccttttcc gattaaccag 1680
ctgatgtatg tctaactgca g 1701

<210> 2
<211> 6080
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 2
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatgtgtgc 420
gacctcttct caatttactc agattaccga gcataattcc cgtcgttccg caaactatca 480

gccaaacctg tggaatttcg aattcctgca atccctggag aacgacctga aagtggaaaa 540
gctggaggag aaagcgacca aactggagga agaagttcgc tgcatgatca accgtgtaga 600
cacccagccg ctgtccctgc tggagctgat cgacgatgtg cagcgcctgg gtctgaccta 660
caaatttgaa aaagacatca ttaaagccct ggaaaacatc gtactgctgg acgaaaacaa 720
aaagaacaaa tctgacctgc acgcaaccgc tctgtctttc cgtctgctgc gtcagcacgg 780
tttcgaggtt tctcaggatg tttttgagcg tttcaaggat aaagaaggtg gtttcagcgg 840
tgaactgaaa ggtgacgtcc aaggcctgct gagcctgtat gaagcgtctt acctgggttt 900
cgagggtgag aacctgctgg aggaggcgcg taccttttcc atcacccacc tgaagaacaa 960
cctgaaagaa ggcattaata ccaaggttgc agaacaagtg agccacgccc tggaactgcc 1020
atatcaccag cgtctgcacc gtctggaggc acgttggttc ctggataaat acgaaccgaa 1080
agaaccgcat caccagctgc tgctggagct ggcgaagctg gattttaaca tggtacagac 1140
cctgcaccag aaagagctgc aagatctgtc ccgctggtgg accgagatgg gcctggctag 1200
caaactggat tttgtacgcg accgcctgat ggaagtttat ttctgggcac tgggtatggc 1260
gccagacccg cagtttggtg aatgtcgcaa agctgttact aaaatgtttg gtctggtgac 1320
gatcatcgat gacgtgtatg acgtttatgg cactctggac gaactgcaac tgttcaccga 1380
tgctgtagag cgctgggacg ttaacgctat taacaccctg ccggactata tgaaactgtg 1440
tttcctggca ctgtacaaca ccgttaacga cacgtcctat tctattctga aagagaaagg 1500
tcataacaac ctgtcctatc tgacgaaaag ctggcgtgaa ctgtgcaaag cctttctgca 1560
agaggcgaaa tggtccaaca acaaaattat cccggctttc tccaagtacc tggaaaacgc 1620
cagcgtttcc tcctccgggtg tagcgctgct ggcgccgtct tacttttccg tatgccagca 1680
gcaggaagac atctccgacc acgcgctgcg ttcccctgacc gacttccatg gtctggtgcg 1740
ttctagctgc gttatcttcc gcctgtgcaa cgatctggcc acctctgcgg cggagctgga 1800
acgtggcgag actaccaatt ctatcattag ctacatgcac gaaaacgatg gtaccagcga 1860
ggaacaggcc cgcgaagaac tgcgtaaact gatcgacgcc gaatggaaaa agatgaatcg 1920
tgaacgcgtt agcgactcca ccctgctgcc taaagcgttc atggaaatcg cagttaacat 1980
ggcacgtgtt tcccactgca cctaccagta tggcgatggt ctgggtcgcc cagactacgc 2040
gactgaaaac cgcatcaaac tgctgctgat tgaccctttc ccgattaacc agctgatgta 2100
tgtctaactg cagctggtac catatgggaa ttcgaagctt tctagaacaa aaactcatct 2160
cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg 2220
tctccagctt ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc 2280
agaacgcaga agcggtctga taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cggtggtccc 2340
acctgacccc atgccgaact cagaagtgaa acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc 2400
tccccatgcg agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag 2460
actgggcctt tcgttttatc tgttgtttgt cggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc 2520
cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg agggtggcgg gcaggacgcc 2580
cgccataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg 2640
cgtttctaca aactctttit gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat 2700
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 2760
acatttccgt gtcgcccttа ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg ttttgctca 2820
cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 2880
catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt 2940
tccaatgatg agcacttttа aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtgttgacgc 3000
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 3060
accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc 3120
cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 3180
ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 3240
accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 3300
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 3360
attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc 3420
ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 3480
tgcagcactg gggccagatg gtaagcccic ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 3540
tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa 3600
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 3660
ttttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 3720
ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 3780
ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 3840
agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaacictt tttccgaagg taactggctt 3900
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 3960
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 4020
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 4080
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 4140
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 4200
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 4260
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatctita tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 4320
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 4380
cgcggcctti ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc 4440
gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg 4500
ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcctgat 4560
gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag 4620
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac 4680
tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccctg acgggcttgt 4740
ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag 4800
aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagcaga tcaattcgcg cgcgaaggcg 4860
aagcggcatg catttacgtt gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc ggtatggcat 4920
gatagcgccc ggaagagagt caattcaggg tggtgaatgt gaaaccagta acgttatacg 4980
atgtcgcaga gtatgccggt gtctcttatc agaccgtttc ccgcgtggtg aaccaggcca 5040
gccacgtttc tgcgaaaacg cgggaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca 5100

ttcccaaccg cgtggcacaa caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca 5160
cctccagtct ggccctgcac gcgccgtcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgccg 5220
atcaactggg tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta 5280
aagcggcggt gcacaatctt ctcgcgcaac gcgtcagtgg gctgatcatt aactatccgc 5340
tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatttc 5400
ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatttt ctcccatgaa gacggtacgc 5460
gactgggcgt ggagcatctg gtcgcattgg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggcc 5520
cattaagttc tgtctcggcg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctcactcgca 5580
atcaaattca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac 5640
aaaccatgca aatgctgaat gagggcatcg ttcccactgc gatgctggtt gccaacgatc 5700
agatggcgct gggcgcaatg cgcgccatta ccgagtccgg gctgcgcgtt ggtgcggata 5760
tctcggtagt gggatacgac gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgtcaacca 5820
ccatcaaaca ggattttcgc ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct 5880
ctcagggcca ggcggtgaag ggcaatcagc tgttgcccgt ctcactggtg aaaagaaaaa 5940
ccaccctggc gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc 6000
agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg 6060
agttagcgcg aattgatctg 6080

<210> 3
<211> 7404
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3
ttctcatgtt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa 60
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg 120
caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg cttggttatg ccggtactgc cgggcctctt 180
gcgggatatc cggatatagt tcctccttic agcaaaaaac ccctcaagac ccgtttagag 240
gccccaaggg gttatgctag ttattgctca gcggtggcag cagccaactc agcttccttt 300
cgggctttgt tagcagccgg atccctgcag ttagacatac atcagctggt taatcgggaa 360
agggtcaatc agcagcagtt tgatgcggtt ttcagtcgcg tagtctgggc gacccagacc 420
atcgccatac tggtaggtgc agtgggaaac acgtgccatg ttaactgcga tttccatgaa 480
cgctttaggc agcagggtgg agtcgctaac gcgttcacga ttcatctttt tccattcggc 540
gtcgatcagt ttacgcagtt cttcgcgggc ctgttcctcg ctggtaccat cgttttcgtg 600
catgtagcta atgatagaat tggtagtctc gccacgttcc agctccgccg cagaggtggc 660
cagatcgttg cacaggcgga agataacgca gctagaacgc accagaccat ggaagtcggt 720
cagggaacgc agcgcgtggt cggagatgtc ttcctgctgc tggcatacgg aaaagtaaga 780
cggcgccagc agcgctacac cggaggagga aacgctggcg ttttccaggt acttggagaa 840
agccgggata attttgttgt tggaccattt cgcctcttgc agaaaggctt tgcacagttc 900
acgccagctt ttcgtcagat aggacaggtt gttatgacct ttctctttca gaatagaata 960
ggacgtgtcg ttaacggtgt tgtacagtgc caggaaacac agtttcatat agtccggcag 1020
ggtgttaata gcgttaacgt cccagcgctc tacagcatcg gtgaacagtt gcagttcgtc 1080
cagagtgcca taaacgtcat acacgtcatc gatgatcgtc accagaccaa acattttagt 1140
aacagcttig cgacattcac caaactgcgg gtctggcgcc atacccagtg cccagaaata 1200
aacttccatc aggcggtcgc gtacaaaatc cagtttgcta gccaggccca tctcggtcca 1260
ccagcgggac agatcttgca gctctttctg gtgcagggtc tgtaccatgt taaaatccag 1320
cttcgccagc tccagcagca gctggtgatg cggttcttic ggttcgtatt tatccaggaa 1380
ccaacgtgcc tccagacggt gcagacgctg gtgatatggc agttccaggg cgtggctcac 1440
ttgttctgca accttggtat taatgccttc tttcaggttg ttcttcaggt gggtgatgga 1500
aaaggtacgc gcctcctcca gcaggttctc accctcgaaa cccaggtaag acgcttcata 1560
caggctcagc aggccttgga cgtcaccttt cagttcaccg ctgaaaccac cttctttatc 1620
cttgaaacgc tcaaaaacat cctgagaaac ctcgaaaccg tgctgacgca gcagacggaa 1680
agacagagcg gttgcgtgca ggtcagattt gttcttttig ttttcgtcca gcagtacgat 1740
gttttccagg gcttttaatga tgtcttttic aaatttgtag gtcagaccca ggcgctgcac 1800
atcgtcgatc agctccagca gggacagcgg ctgggtgtct acacggttga tcatgcagcg 1860
aacttcttcc tccagtttgg tcgctttctc ctccagcttt tccactttca ggtcgttctc 1920
cagggattgc aggaattcga aattccacag gtttggctga tagtttgcgg aacgacggga 1980
attatgctcg gtaatctgag taaattgaga agaggtcgca cacatatgac gaccttcgat 2040
atggccgctg ctgtgatgat gatgatgatg atgatgatga tggcccatgg tatatctcct 2100
tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagag gggaattgtt atccgctcac aattccccta 2160
tagtgagtcg tattaatttc gcgggatcga gatctcgatc ctctacgccg gacgcatcgt 2220
ggccggcatc accggcgcca caggtgcggt tgctggcgcc tatatcgccg acatcaccga 2280
tggggaagat cgggctcgcc acttcgggct catgagcgct tgtttcggcg tgggtatggt 2340
ggcaggcccc gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc ttgcatgcac cattccttgc 2400
ggcggcggtg ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc ttcctaatgc aggagtcgca 2460
taagggagag cgtcgagatc ccggacacca tcgaatggcg caaaacctit cgcggtatgg 2520
catgatagcg cccggaagag agtcaattca gggtggtgaa tgtgaaacca gtaacgttat 2580
acgatgtcgc agagtatgcc ggtgtctctt atcagaccgt ttcccgcgtg gtgaaccagg 2640
ccagccacgt ttctgcgaaa acgcgggaaa aagtggaagc ggcgatggcg gagctgaatt 2700
acattcccaa ccgcgtggca caacaactgg cgggcaaaca gtcgttgctg attggcgttg 2760
ccacctccag tctggccctg cacgcgccgt cgcaaattgt cgcggcgatt aaatctcgcg 2820
ccgatcaact gggtgccagc gtggtggtgt cgatggtaga acgaagcggc gtcgaagcct 2880
gtaaagcggc ggtgcacaat cttctcgcgc aacgcgtcag tgggctgatc attaactatc 2940

cgctggatga ccaggatgcc attgctgtgg aagctgcctg cactaatgtt ccggcgttat 3000
ttcttgatgt ctctgaccag acacccatca acagtattat tttctcccat gaagacggta 3060
cgcgactggg cgtggagcat ctggtcgcat tgggtcacca gcaaatcgcg ctgttagcgg 3120
gcccattaag ttctgtctcg gcgcgtctgc gtctggctgg ctggcataaa tatctcactc 3180
gcaatcaaat tcagccgata gcggaacggg aaggcgactg gagtgccatg tccggttttc 3240
aacaaaccat gcaaatgctg aatgagggca tcgttcccac tgcgatgctg gttgccaacg 3300
atcagatggc gctgggcgca atgcgcgcca ttaccgagtc cgggctgcgc gttggtgcgg 3360
atatctcggt agtgggatac gacgataccg aagacagctc atgttatatc ccgccgttaa 3420
ccaccatcaa acaggatttt cgcctgctgg ggcaaaccag cgtggaccgc ttgctgcaac 3480
tctctcaggg ccaggcggtg aagggcaatc agctgttgcc cgtctcactg gtgaaaagaa 3540
aaaccaccct ggcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 3600
tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 3660
gtaagttagc tcactcatta ggcaccggga tctcgaccga tgcccttgag agccttcaac 3720
ccagtcagct ccttccggtg ggcgcggggc atgactatcg tcgccgcact tatgactgtc 3780
ttctttatca tgcaactcgt aggacaggtg ccggcagcgc tctgggtcat tttcggcgag 3840
gaccgctttc gctggagcgc gacgatgatc ggcctgtcgc ttgcggtatt cggaatcttg 3900
cacgccctcg ctcaagcctt cgtcactggt cccgccacca aacgtttcgg cgagaagcag 3960
gccattatcg ccggcatggc ggccgacgcg ctgggctacg tcttgctggc gttcgcgacg 4020
cgaggctgga tggccttccc cattatgatt cttctcgctt ccggcggcat cgggatgccc 4080
gcgttgcagg ccatgctgtc caggcaggta gatgacgacc atcagggaca gcttcaagga 4140
tcgctcgcgg ctcttaccag cctaacttcg atcactggac cgctgatcgt cacggcgatt 4200
tatgccgcct cggcgagcac atggaacggg ttggcatgga ttgtaggcgc cgccctatac 4260
cttgtctgcc tccccgcgtt gcgtcgcggt gcatggagcc gggccacctc gacctgaatg 4320
gaagccggcg gcacctcgct aacggattca ccactccaag aattggagcc aatcaattct 4380
tgcggagaac tgtgaatgcg caaaccaacc cttggcagaa catatccatc gcgtccgcca 4440
tctccagcag ccgcacgcgg cgcatctcgg gcagcgttgg gtcctggcca cggggtgcgc a 4500
tgatcgtgct ccigtcgttg aggacccggc taggctggcg gggttgcctt actggttagc 4560
agaatgaatc accgatacgc gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgcaaa acgtctgcga 4620
cctgagcaac aacatgaatg gtcttcggtt tccgtgtttc gtaaagtctg gaaacgcgga 4680
agtcagcgcc ctgcaccatt atgttccgga tctgcatcgc aggatgctgc tggctaccct 4740
gtggaacacc tacatctgta ttaacgaagc gctggcattg accctgagtg attttctct 4800
ggtcccgccg catccatacc gccagttgtt taccctcaca acgttccagt aaccgggcat 4860
gttcatcatc agtaacccgt atcgtgagca tcctctctcg tttcatcggt atcattaccc 4920
ccatgaacag aaatcccccc tacacggagg catcagtgac caaacaggaa aaaaccgccc 4980
ttaacatggc ccgctttatc agaagccaga cattaacgct tctggagaaa ctcaacgagc 5040
tggacgcgga tgaacaggca gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgct gatgagcttt 5100
accgcagctg cctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 5160
cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 5220
cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggcg cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg 5280
gagtgtatac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat 5340
atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 5400
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 5460
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 5520
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 5580
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 5640
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 5700
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 5760
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 5820
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 5880
cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 5940
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 6000
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 6060
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 6120
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 6180
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat ttggtcatg 6240
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 6300
atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 6360
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 6420
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 6480
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 6540
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 6600
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tgcaggcatc 6660
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 6720
cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc 6780
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 6840
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 6900
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aacacgggat 6960
aataccgcgc cacatagcag aacttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 7020
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 7080
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 7140
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc 7200
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 7260
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 7320
ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 7380
acgaggccct ttcgtcttca agaa 7404

<210> 4
<211> 6266
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 4
cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt 60
ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt 120
aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg 180
gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt gtatcgatta 240
aataaggagg aataaaccat gtgtgcgacc tcttctcaat ttactcagat taccgagcat 300
aattcccgtc gttccgcaaa ctatcagcca aacctgtgga atttcgaatt cctgcaatcc 360
ctggagaacg acctgaaagt ggaaaagctg gaggagaaag cgaccaaact ggaggaagaa 420
gttcgctgca tgatcaaccg tgtagacacc cagccgctgt ccctgctgga gctgatcgac 480
gatgtgcagc gcctgggtct gacctacaaa tttgaaaaag acatcattaa agccctggaa 540
aacatcgtac tgctggacga aaacaaaaag aacaaatctg acctgcacgc aaccgctctg 600
tctttccgtc tgctgcgtca gcacggtttc gaggtttctc aggatgtttt tgagcgtttc 660
aaggataaag aaggtggttt cagcggtgaa ctgaaaggtg acgtccaagg cctgctgagc 720
ctgtatgaag cgtcttacct gggtttcgag ggtgagaacc tgctggagga ggcgcgtacc 780
ttttccatca cccacctgaa gaacaacctg aaagaaggca ttaataccaa ggttgcagaa 840
caagtgagcc acgccctgga actgccatat caccagcgtc tgcaccgtct ggaggcacgt 900
tggttcctgg ataaatacga accgaaagaa ccgcatcacc agctgctgct ggagctggcg 960
aagctggatt ttaacatggt acagacccta caccagaaag agctgcaaga tctgtcccgc 1020
tggtggaccg agatgggcct ggctagcaaa ctggattttg tacgcgaccg cctgatggaa 1080
gttttatttct gggcactggg tatggcgcca gacccgcagt ttggtgaatg tcgcaaagct 1140
gttactaaaa tgtttggtct ggtgacgatc atcgatgacg tgtatgacgt ttatggcact 1200
ctggacgaac tgcaactgtt caccgatgct gtagagcgct gggacgttaa cgctattaac 1260
accctgccgg actatatgaa actgtgtttc ctggcactgt acaacaccgt taacgacacg 1320
tcctatttcta ttctgaaaga gaaaggtcat aacaacctgt cctatctgac gaaaagctgg 1380
cgtgaactgt gcaaagcctt tctgcaagag gcgaaatggt ccaacaacaa aattatcccg 1440
gcttttctcca agtacctgga aaacgccagc gtttcctcct ccggtgtagc gctgctggcg 1500
ccgtcttact tttccgtatg ccagcagcag gaagacatct ccgaccacgc gctgcgttcc 1560
ctgaccgact tccatggtct ggtgcgttct agctgcgtta tcttccgcct gtgcaacgat 1620
ctggccacct ctgcggcgga gctggaacgt ggcgagacta ccaattctat cattagctac 1680
atgcacgaaa acgatggtac cagcgaggaa caggcccgcg aagaactgcg taaactgatc 1740
gacgccgaat ggaaaaagat gaatcgtgaa cgcgttagcg actccaccct gctgcctaaa 1800
gcgttcatgg aaatcgcagt taacatggca cgtgtttccc actgcaccta ccagtatggc 1860
gatggtctgg gtcgcccaga ctacgcgact gaaaaccgca tcaaactgct gctgattgac 1920
cctttcccga ttaaccagct gatgtatgtc taactgcagg tcgactctag aggatccccg 1980
ggtaccgagc tcgaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 2040
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga 2100
agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct 2160
gatgcggtat tttctcctta cgcatctgtg cggtatttca caccgcatat ggtgcactct 2220
cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc 2280
tgacgagctt agtaaagccc tcgctagatt ttaatgcgga tgttgcgatt acttcgccaa 2340
ctattgcgat aacaagaaaa agccagcctt tcatgatata tctcccaatt tgtgtagggc 2400
ttattatgca cgcttaaaaa taataaaagc agacttgacc tgatagtttg gctgtgagca 2460
attatgtgct tagtgcatct aacgcttgag ttaagccgcg ccgcgaagcg gcgtcggctt 2520
gaacgaattg ttagacatta tttgccgact accttggtga tctcgccttt cacgtagtgg 2580
acaaattctt ccaactgatc tgcgcgcgag gccaagcgat cttcttcttg tccaagataa 2640
gcctgtctag cttcaagtat gacgggctga tactgggccg gcaggcgctc cattgcccag 2700
tcggcagcga tcatccttcgg cgcgatttta ccggttactg cgctgtacca aatgcgggac 2760
aacgtaagca ctacatttcg ctcatcgcca gcccagtcgg gcggcgagtt ccatagcgtt 2820
aaggtttcat ttagcgcctc aaatagatcc tgttcaggaa ccggatcaaa gagttcctcc 2880
gccgctggac ctaccaaggc aacgctatgt tctcttgctt ttgtcagcaa gatagccaga 2940
tcaatgtcga tcgtggctgg ctcgaagata cctgcaagaa tgtcattgcg ctgccattct 3000
ccaaattgca gttcgcgctt agctggataa cgccacggaa tgatgtcgtc gtgcacaaca 3060
atggtgactt ctacagcgcg gagaatctcg ctctctccag gggaagccga agtttccaaa 3120
aggtcgttga tcaaagctcg ccgcgttgtt tcatcaagcc ttacggtcac cgtaaccagc 3180
aaatcaatat cactgtgtgg cttcaggccg ccatccactg cggagccgta caaatgtacg 3240
gccagcaacg tcggttcgag atggcgctcg atgacgccaa ctacctctga tagttgagtc 3300
gatacttcgg cgatcaccgc ttccctcatg atgtttaact ttgttttagg gcgactgccc 3360
tgctgcgtaa catcgttgct gctccataac atcaaacatc gacccacggc gtaacgcgct 3420
tgctgcttgg atgcccgagg catagactgt accccaaaaa aacagtcata acaagccatg 3480
aaaaccgcca ctgcgccgtt accaccgctg cgttcggtca aggttctgga ccagttgcgt 3540
gagcgcatac gctacttgca ttacagctta cgaaccgaac aggcttatgt ccactgggtt 3600
cgtgccttca tccgtttcca cggtgtgcgt cacccggcaa ccttgggcag cagcgaagtc 3660
gaggcatttc tgtcctggct ggcgaacgag cgcaaggttt cggtctccac gcatcgtcag 3720
gcattggcgg ccttgctgtt cttctacggc aaggtgctgt gcacggatct gccctggctt 3780
caggagatcg gaagacctcg gccgtcgcgg cgcttgccgg tggtgctgac cccggatgaa 3840
gtggttcgca tcctcggttt tctggaaggc gagcatcgtt tgttcgccca gcttctgtat 3900
ggaacgggca tgcggatcag tgagggtttg caactgcggg tcaaggatct ggatttcgat 3960
cacggcacga tcatcgtgcg ggagggcaag ggctccaagg atcgggcctt gatgttaccc 4020
gagagcttgg cacccagcct gcgcgagcag gggaattaat tcccacgggt tttgctgccc 4080
gcaaacgggc tgttctggtg ttgctagttt gttatcagaa tcgcagatcc ggcttcagcc 4140

ggtttgccgg ctgaaagcgc tatttcttcc agaattgcca tgatttttic cccacgggag 4200
gcgtcactgg ctcccgtgtt gtcggcagct ttgattcgat aagcagcatc gcctgtttca 4260
ggctgtctat gtgtgactgt tgagctgtaa caagttgtct caggtgttca atttcatgtt 4320
ctagttgctt tgttttactg gtttcacctg ttctattagg tgttacatgc tgttcatctg 4380
ttacattgtc gatctgttca tggtgaacag ctttgaatgc accaaaaact cgtaaaagct 4440
ctgatgtatc tatcttttit acaccgtttt catctgtgca tatggacagt tttcccttig 4500
atatgtaacg gtgaacagtt gttctacttt tgtttgttag tcttgatgct tcactgatag 4560
atacaagagc cataagaacc tcagatcctt ccgtatttag ccagtatgtt ctctagtgtg 4620
gttcgttgtt tttgcgtgag ccatgagaac gaaccattga gatcatactt actttgcatg 4680
tcactcaaaa attttgcctc aaaactggtg agctgaattt ttgcagttaa agcatcgtgt 4740
agtgtttttc ttagtccgtt atgtaggtag gaatctgatg taatggttgt tggtattttg 4800
tcaccattca tttttatctg gttgttctca agttcggtta cgagatccat ttgtctatct 4860
agttcaacit ggaaaatcaa cgtatcagtc gggcggcctc gcttatcaac caccaatttc 4920
atattgctgt aagtgtttaa atctttactt attggtttca aaacccattg gttaagcctt 4980
ttaaactcat ggtagttatt ttcaagcatt aacatgaact taaattcatc aaggctaatc 5040
tctatatttg ccttgtgagt tttcttttgt gttagttctt ttaataacca ctcataaatc 5100
ctcatagagt atttgttttc aaaagactta acatgttcca gattatattt tatgaatttt 5160
tttaactgga aaagataagg caatatctct tcactaaaaa ctaattctaa tttttcgctt 5220
gagaacttgg catagtttgt ccactggaaa atctcaaagc ctttaaccaa aggattcctg 5280
atttccacag ttctcgtcat cagctctctg gttgctttag ctaatacacc ataagcattt 5340
tccctactga tgttcatcat ctgagcgtat tggttataag tgaacgatac cgtccgttct 5400
ttccttgtag ggttttcaat cgtggggttg agtagtgcca cacagcataa aattagcttg 5460
gtttcatgct ccgttaagtc atagcgacta atcgctagtt catttgcttt gaaaacaact 5520
aattcagaca tacatctcaa ttggtctagg tgattttaat cactatacca attgagatgg 5580
gctagtcaat gataattact agtccttttc ctttgagttg tgggtatctg taaattctgc 5640
tagaccttig ctggaaaact tgtaaattct gctagaccct ctgtaaattc cgctagacct 5700
ttgtgtgttt ttttgttta tattcaagtg gttataattt atagaataaa gaaagaataa 5760
aaaaagataa aaagaatага tcccagcccc gtgtataact cactacttta gtcagttccg 5820
cagtattaca aaaggatgtc gcaaacgctg tttgctcctc tacaaaacag accttaaaac 5880
cctaaaggct taagtagcac cctcgcaagc tcgggcaaat cgctgaatat tccttttgtc 5940
tccgaccatc aggcacctga gtcgctgtct ttttcgtgac attcagttcg ctgcgctcac 6000
ggctctggca gtgaatgggg gtaaatggca ctacaggcgc ctttiatgga ttcatgcaag 6060
gaaactaccc ataatacaag aaaagcccgt cacgggcttc tcagggcgtt ttatggcggg 6120
tctgctatgt ggtgctatct gacttttigc tgttcagcag ttcctgccct ctgattticc 6180
agtctgacca cticggatta tcccgtgaca ggtcattcag actggctaat gcacccagta 6240
aggcagcggt atcatcaaca ggctta 6266

<210> 5
<211> 6592
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5
gaattgctcc attttcttct gctatcaaaa taacagactc gtgattttcc aaacgagctt 60
tcaaaaaagc ctctgcccct tgcaaatcgg atgcctgtct ataaaattcc cgatattggt 120
taaacagcgg cgcaatggcg gccgcatctg atgtctttgc ttggcgaatg ttcatcttat 180
tictttcctc ctctcaataa tttttttcatt ctatcccttt tctgtaaagt ttatttttca 240
gaatactttt atcatcatgc tttgaaaaaa tatcacgata atatccattg ttctcacgga 300
agcacacgca ggtcatttga acgaattttt tcgacaggaa tttgccggga ctcaggagca 360
tttaacctaa aaaagcatga catttcagca taatgaacat ttactcatgt ctatttttcgt 420
tcttttctgt atgaaaatag ttatttcgag tctctacgga aatagcgaga gatgatatac 480
ctaaatagag ataaaatcat ctcaaaaaaa tgggtctact aaaatattat tccatctatt 540
acaataaatt cacagaatag tcttttaagt aagtctactc tgaatttttt taaaaggaga 600
gggtaaagag tgtgtgcgac ctcttctcaa tttactcaga ttaccgagca taatttccgt 660
cgttccgcaa actatcagcc aaacctgtgg aatttcgaat tcctgcaatc cctggagaac 720
gacctgaaag tggaaaagct ggaggagaaa gcgaccaaac tggaggaaga agttcgctgc 780
atgatcaacc gtgtagacac ccagccgctg tccctgctgg agctgatcga cgatgtgcag 840
cgcctgggtc tgacctacaa atttgaaaaa gacatcatta aagccctgga aaacatcgta 900
ctgctggacg aaaacaaaaa gaacaaatct gacctgcacg caaccgctct gtcttccgt 960
ctgctgcgtc agcacggttt cgaggtttct caggatgttt ttgagcgttt caaggataaa 1020
gaaggtggtt tcagcggtga actgaaaggt gacgtccaag gcctgctgag cctgtatgaa 1080
gcgtcttacc tgggtttcga gggtgagaac ctgctggagg aggcgcgtac cttttccatc 1140
acccacctga agaacaacct gaaagaaggc attaatacca aggttgcaga acaagtgagc 1200
cacgccctgg aactgccata tcaccagcgt ctgcaccgtc tggaggcacg ttggttcctg 1260
gataaatacg aaccgaaaga accgcatcac cagctgctgc tggagctggc gaagctggat 1320
tttaacatgg tacagaccct gcaccagaaa gagctgcaag atctgtcccg ctggtggacc 1380
gagatgggcc tggctagcaa actggatttt gtacgcgacc gcctgatgga agttttattc 1440
tgggcactgg gtatggcgcc agacccgcag tttggtgaat gtcgcaaagc tgttactaaa 1500
atgttiggtc tggtgacgat catcgatgac gtgtatgacg tttatggcac tctggacgaa 1560
ctgcaactgt tcaccgatgc tgtagagcgc tgggacgtta acgctattaa caccctgccg 1620
gactatatga aactgtgttt cctggcactg tacaacaccg ttaacgacac gtcctattct 1680
attctgaaag agaaaggtca taacaacctg tcctatctga cgaaaagctg gcgtgaactg 1740
tgcaaagcct ttctgcaaga ggcgaaatgg tccaacaaca aaattatccc ggctttctcc 1800

aagtacctgg aaaacgccag cgtttcctcc tccggtgtag cgctgctggc gccgtcttac 1860
ttttccgtat gccagcagca ggaagacatc tccgaccacg cgctgcgttc cctgaccgac 1920
ttccatggtc tggtgcgttc tagctgcgtt atcttccgcc tgtgcaacga tctggccacc 1980
tctgcggcgg agctggaacg tggcgagact accaattcta tcattagcta catgcacgaa 2040
aacgatggta ccagcgagga acaggcccgc gaagaactgc gtaaactgat cgacgccgaa 2100
tggaaaaaga tgaatcgtga acgcgttagc gactccaccc tgctgcctaa agcgttcatg 2160
gaaatcgcag ttaacatggc acgtgtttcc cactgcacct accagtatgg cgatggtctg 2220
ggtcgcccag actacgcgac tgaaaaccgc atcaaactgc tgctgattga ccctttcccg 2280
attaaccagc tgatgtatgt ctaaaaaaaa ccggccttgg ccccgccggt tttttattat 2340
ttttcttcct ccgcatgttc aatccgctcc ataatcgacg gatggctccc tctgaaaatt 2400
ttaacgagaa acggcgggtt gacccggctc agtcccgtaa cggccaagtc ctgaaacgtc 2460
tcaatcgccg cttcccggtt tccggtcagc tcaatgccgt aacggtcggc ggcgttttcc 2520
tgataccggg agacggcatt cgtaatcgga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag 2580
ctttgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag 2640
acggtcacag ctttgtctgt a agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca 2700
gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgacccagt cacgtagcga tagcggagtg 2760
tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt 2820
gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttcct 2880
cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa 2940
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 3000
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc 3060
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga 3120
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 3180
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 3240
ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 3300
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 3360
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 3420
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 3480
acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 3540
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt tttttgtttt 3600
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 3660
cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat 3720
caaaaaggat cgaagtcggt tcagaaaaag aaggatatgg atctggagct gtaatataaa 3780
aaccttcttc aactaacggg gcaggttagt gacattagaa aaccgactgt aaaaagtaca 3840
gtcggcatta tctcatatta taaaagccag tcattaggcc tatctgacaa ttcctgaata 3900
gagttcataa acaatcctgc atgataacca tcacaaacag aatgatgtac ctgtaaagat 3960
agcggtaaat atattgaatt acctttatta atgaattttc ctgctgtaat aatgggtaga 4020
aggtaattac tattattatt gatatttaag ttaaacccag taaatgaagt ccatggaata 4080
atagaaagag aaaaagcatt ttcaggtata ggtgttttgg gaaacaattt aaaagaacca 4140
ttatatttct ctacatcaga aaggtataaa tcataaaact ctttgaagtc attctttaca 4200
ggagtccaaa taccagagaa tgttttagat acaccatcaa aaattgtata aagtggctct 4260
aacttatccc aataacctaa ctctccgtcg ctattgtaac cagttctaaa agctgtattt 4320
gagtttatca cccttgtcac taagaaaata aatgcagggt aaaatttata tccttcttgt 4380
tttatgttc ggtataaaac actaatatca atttctgtgg ttatactaaa agtcgtttgt 4440
tggttcaaat aatgattaaa tatctctttt ctcttccaat tgtctaaatc aattttatta 4500
aagttcattt gatatgcctc ctaaatttct atctaaagtg aatttaggag gcttacttgt 4560
ctgctttctt cattagaatc aatccttttt taaagtcaat attactgtaa cataaatata 4620
tattttaaaa atatcccact ttatccaatt ttcgtttgtt gaactaatgg gtgctttagt 4680
tgaagaataa agaccacatt aaaaaatgtg gtcttttgtg ttttttaaa ggattgagc 4740
gtacgcgaaa aatcctttc tttctttctt atcttgataa taagggtaac tattgccggt 4800
tgtccattca tggctgaact ctgcttcctc tgttgacatg acacacatca tctcaatatc 4860
cgaatagggc ccatcagtct gacgaccaag agagccataa acaccaatag ccttaacatc 4920
atccccatat ttatccaata ttcgttcctt aatttcatga acaatcttca ttctttctic 4980
tctagtcatt attattggtc cattcactat tctcattccc ttttcagata attttagatt 5040
tgcttttcta aataagaata tttggagagc accgttctta ttcagctatt aataactcgt 5100
cttcctaagc atccttcaat ccttttaata acaattatag catctaatct tcaacaaact 5160
ggcccgtttg ttgaactact ctttaataaa ataatttttc cgttcccaat tccacattgc 5220
aataatagaa aatccatctt catcggcttt ttcgtcatca tctgtatgaa tcaaatcgcc 5280
ttcttctgtg tcatcaaggt ttaatttttt atgtatttct tttaacaaac caccatagga 5340
gattaacctt ttacggtgta aaccttcctc caaatcagac aaacgtttca aattctttic 5400
ttcatcatcg gtcataaaat ccgtatcctt tacaggatat tttgcagttt cgtcaattgc 5460
cgattgtata tccgatttat atttatttit cggtcgaatc atttgaactt ttacatttgg 5520
atcatagtct aatttcattg ccttttttcca aaattgaatc catgttttt gattcacgta 5580
gttttctgtt attctaaaat aagttggttc cacacatacc attacatgca tgtgctgatt 5640
ataagaatta tctttattat ttattgtcac atccgttgca cgcataaaac caacaagatt 5700
tttattaatt tttttatatt gcatcattcg gcgaaatcct tgagccatat ctgtcaaact 5760
cttatttaat tcttcgccat cataaacatt tttaactgtt aatgtgagaa acaaccaacg 5820
aactgttggc ttttgtttaa taacttcagc aacaaccttt tgtgactgaa tgccatgttt 5880
cattgctctc ctccagttgc acattggaca aagcctggat ttgcaaaacc acactcgata 5940
ccacttttct tcgcctgttt cacgattttg tttatactct aatatttcag cacaatcttt 6000
tactctttca gccttttttaa attcaagaat atgcagaagt tcaaagtaat caacattagc 6060
gattttcttt tctctccatg gtctcacttt tccacttttt gtcttgtcca ctaaaaccct 6120
tgatttttca tctgaataaa tgctactatt aggacacata atattaaaag aaaccccccat 6180
ctatttagtt atttgtttag tcacttataa ctttaacaga tggggttttt ctgtgcaacc 6240
aattttaagg gttttcaata ctttaaaaca catacatacc aacacttcaa cgcacctttc 6300
agcaactaaa ataaaaatga cgttatttct atatgtatca agataagaaa gaacaagttc 6360
aaaaccatca aaaaaagaca cctttcagg tgcttttttt attttataaa ctcattccct 6420
gatctcgact tcgttcttit tttacctctc ggttatgagt tagttcaaat tcgttctttt 6480

taggttctaa atcgtgtttt tcttggaatt gtgctgtttt atcctttacc ttgtctacaa 6540
acccccttaaa aacgttttta aaggctttta agccgtctgt acgttcctta ag 6592

<210> 6
<211> 1695
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 6
atgtgtgcaa cctcctccca gtttactcag attaccgagc ataattctcg acgatctgct 60
aactaccagc cgaacctttg gaactttgag tttctccagt ctctcgaaaa tgacctgaag 120
gtggaaaagc tcgaggagaa ggcgaccaaa ctcgaggagg aggtgcgatg tatgatcaac 180
agagttgaca cccaacccct gtctttgctg gagctgatcg acgatgtgca gcggttgggt 240
ttgacttata aattcgagaa ggacattatc aaggcactgg agaacattgt gctcctcgac 300
gagaacaaga agaacaagtc tgatcttcac gctaccgctc tctctttccg acttcttcga 360
caacacggct tcgaggtgtc gcaggacgtc ttcgagagat ttaaggacaa ggagggagga 420
tttagcggcg agctgaaggg agacgttcag ggtcttctct ccttgtacga ggcgtcctac 480
ctgggattcg agggagagaa cctcctggag gaagctcgta cattttccat cactcacctt 540
aagaataacc ttaaggaggg aattaacacc aaggtggccg agcaggtttc tcacgccctg 600
gagctcccct accaccaacg gctccataga ctggaggctc gttggttcct ggacaaatat 660
gagccaaagg agcctcatca tcagttgctg ttggagttgg ccaagctgga cttcaatatg 720
gttcagacgc tgcaccaaaa ggagttgcag gacctgtctc gatggtggac cgagatggga 780
ttggcctcga agctggattt tgtccgtgac cgacttatgg aggtctattt ttgggccctt 840
ggaatggcgc ctgaccccca gttcggagag tgccggaagg cggtgacgaa gatgttcggt 900
cttgtgacta tcatcgacga cgtctacgat gtctacggca cactcgacga gttgcagctg 960
ttcactgacg ccgtcgagcg atgggatgtg aacgccatta atactctccc tgactatatg 1020
aagctgtgct tcctggctct gtacaacact gtcaacgata cctcgtactc tatcctcaag 1080
gagaagggac acaacaatct ctcctacttg accaaatcct ggcgagaact gtgcaaggct 1140
ttctgcagg aggctaaatg gtccaataac aagatcattc ctgcttttc taaatacctg 1200
gaaaatgcct cggtgtcgag ctctggcgtc gccctttctgg ccccttccta cttctccgtc 1260
tgccagcagc aggaggatat ttccgatcat gctcttagat cgctgaccga ttttcacggc 1320
ctcgtgcgat cttcctgcgt gatttttcgg ttgtgtaatg accttgcgac ctctgctgct 1380
gagctggaac gaggcgagac tacaaattcc attatttctt acatgcacga aaacgatgga 1440
acatctgaag aacaggctag agaggaactg cgaaagttga tcgacgccga gtggaagaag 1500
atgaacagag agcgggtgtc cgactctacc ctgcttccca aggccttcat ggagatcgcc 1560
gtgaacatgg ctcgagtttc ccattgtact taccagtacg gtgacggcct gggtcgtccg 1620
gactacgcta cagagaaccg aatcaagctg ctgctcatcg acccccttccc tatcaaccaa 1680
ttgatgtacg tgtaa 1695

<210> 7
<211> 8191
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7
tcgaccggtg agaagaacag catcgggaca agggaaggaa gaacaaagac aaagaaaaca 60
aaagaaagca attgaaaaca aaacaaaaca attttcattc ctctcttat cattcctttt 120
ctttcttttt ctctcattca acgcactcca tcgtatccgt attcctctta tttttttctct 180
ttctctatat ccatttcttt ctctctaggt gtgtcctctc tctctcttca atttctctac 240
tccgcattcc aacgcatcct tcccccaacc tcccatttcc tccttacggc ccgatagcga 300
tcgtctttcc ctcgctatca ctcgctaccg gccctcctc tgcaccgtaa cctcctacgt 360
attaccata tcataaagtt ttttccgacg cttatcgctg acccccctgtc gccctcctat 420
tggcttccgg attatcttct tgtccataag gtgatccatg cttcctgaag attcccgaaa 480
tgtgtccact ttggcgggga atcattccat ccacttcttt ctctctcgct ttcctcattc 540
ggcgctcccc ttccgcgtct cattggtctt ccgctccgtt tttgctttgc cgatgttact 600
tggggagagg tgcgataatc ctttcgcaaa aactcggttt gacgcctccc atggtataaa 660
tagtgggtgg tggacaggtg ccttcgcttt tctttaagca agagaatccc attgtcttga 720
ctatcacgaa ttcacataca ttatgaagat caccgctgtc attgcccttt tattctcact 780
tgctgctgcc tcacctattc cagttgccga tcctggtgtg gtttcagtta gcaagtcata 840
tgctgatttc cttcgtgttt accaaagttg gaacactttt gctaatcctg atagacccaa 900
ccttaagaag agaaatgata cacctgcaag tggatatcaa gttgaaaaag tcgtaatttt 960
gtcacgtcac ggtgttaggg cccctacaaa aatgactcaa accatgcgtg atgtcactcc 1020
taatacatgg ccagaatggc ccgttaaatt aggatatatt acaccaagag gtgaacactt 1080
gatatcactt atgggcggtt tttaccgtca aaaattccag caacaaggaa tcctttctca 1140
gggctcctgt cctactccta actccatata tgtctgggct gacgtcgatc agcgtacttt 1200
aaaaactggt gaagcattcc ttgctggttt ggcaccacaa tgtggcttga caattcatca 1260
ccaacaaaat cttgagaaag ctgatcctct ttttcatccc gttaaagctg gaacctgctc 1320
tatggataaa actcaagttc aacaagctgt tgagaaggag gcacaaactc ctatagataa 1380
tttgaatcaa cattacatcc cctttttagc tttaatgaat acaacattaa attttagtac 1440
ttctgcctgg tgccaaaaac actctgctga taaatcctgt gacctaggtt tatccatgcc 1500

ttctaaattg tccataaaag ataatggtaa caaggtcgca ttggatggag ctattggtct 1560
atcctctact ttggccgaga ttttttcttct tgaatatgct caaggcatgc ctcaagctgc 1620
ttggggtaac atccactcag agcaagagtg ggcttccttg ctaaagttgc ataatgttca 1680
attcgatttg atggcccgaa cacttatat tgctcgacat aacggtactc ctttattgca 1740
agctatatca aatgcccttа atcccaacgc cactgaatca aaacttccag atatttcacc 1800
tgataacaaa atattgttca ttgcaggtca tgacacaaat attgctaata tagccggcat 1860
gttaaatatg cgttggacat taccaggtca accagataat actcctccag gtggtgccct 1920
agtatttgaa cgtcttgctg ataaaagtgg aaaacaatat gtttctgtat ctatggttta 1980
tcaaacacta gaacaacttc gatcacagac tccccttct ctaaatcagc ctgccggatc 2040
tgttcaactt aaaattccag gttgcaatga tcaaacagcc gagggttact gtcctctttc 2100
cacttttaca agagttgttt cccaatctgt tgaacctgga tgccaacttc aataatgagg 2160
atccaagtaa gggaatgaga atgtgatcca cttttaattc ctaatgaata catgcctata 2220
gttctttttct tttgttcttt atgtcgtttt tcgatggtac ggccgttgtc aatctcagtt 2280
tgtgtgcttg gttgcagctt ggtttcaaat ctgttcatct catgaatctt ttaccatttc 2340
accacacgtt tataccattc tctcatagaa tcttcatcaa accatctcgg ggttagagtg 2400
gaaagaaagt cttgttcttt tatttccttt ttttccatctt caaggctttt cttttcttcc 2460
tcctcctcgt tcatcttgag gtttgacgtg tctgtttaga attttgagct gttgcagcat 2520
cttatttttt gttttgcgaa aacgaagcgc tttactctct tcatcagttg gacgattgta 2580
cctttgaaaa ccaactactt ttgcatgttt tgtatagaaa tcaatgatat tagaatccca 2640
tcctttaatt tctttcaaag tagttgagct atagttaagt gtaagggccc tactgcgaaa 2700
gcatttgcca aggatgtttt cattaatcaa gaacgaaagt taggggatcg aagacgatca 2760
gataccgtcg tagtcttaac cataaactat gccgactagg gatcgggcaa tgtttcattt 2820
atcgacttgc tcggcacctt acgagaaatc aaagtctttg ggttccgggg ggagtatggt 2880
cgcaaggctg aaacttaaag gaattgacgg aagggcacca caatggagtg gagcctgcgg 2940
cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga catagtaagg attgacagat 3000
tgagagctct ttcttgattc tatgggtggt ggtgcatggc cgttcttagt tggtggagtg 3060
atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc tgctaaatag ctggatcagc 3120
catttggct gatcattagc ttcttagagg gactattggc ataaagccaa tggaagtttg 3180
aggcaataac aggtctgtga tgcccttaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacactgac 3240
ggagccaacg agttgaaaaa aatctttga ttttttatcc ttggccggaa ggtctgggta 3300
atcttgttaa actccgtcgt gctggggata gagcattgca attattgcgg ccgctcctca 3360
attcgatgtt gcagatttta caagttttta aaatgtattt cattattact ttttatatgc 3420
ctaataaaaa agccatagtt taatctatag ataacttttt ttccagtgca ctaacggacg 3480
ttacatttcc atacaaaact gcgtagttaa agctaaggaa aagttaatat catgttaatt 3540
aaatacgcta tttacaataa gacattgaac tcatttatat cgttgaatat gaataaccaa 3600
tttcagcgaa tttttaacaa acatcgttca cctcgtttaa ggatatcttg tgtatggggt 3660
gttgacttgc tttatcgaat aattaccgta cctgtaattg gcttgctgga tatagcggta 3720
gtctaatatc tagcaaaaat cttttgggtg aaaaggcttg caatttcacg acaccgaact 3780
atttgtcatt ttttaataag gaagttttcc ataaattcct gtaatctcg gttgatctaa 3840
ttgaaaagag tagttttgca tcacgatgag gagggctttt gtagaaagaa atacgaacga 3900
aacgaaaatc agcgttgcca tcgctttgga caaagctccc ttacctgaag agtcgaattt 3960
tattgatgaa cttataactt ccaagcatgc aaaccaaaag ggagaacaag taatccaagt 4020
agacacggga attggattct tggatcacat gtatcatgca ctggctaaac atgcaggctg 4080
gagcttacga ctttactcaa gaggtgattt aatcatcgat gatcatcaca ctgcagaaga 4140
tactgctatt gcacttggta ttgcattcaa gcaggctatg ggtaacttig ccggcgttaa 4200
aagatttgga catgcttatt gtccacttga cgaagctctt tctagaagcg tagttgactt 4260
gtcgggacgg ccctatgctg ttatcgattt gggattaaag cgtgaaaagg ttggggaatt 4320
gtcctgtgaa atgatccctc acttactata ttcctttcg gtagcagctg gaattacttt 4380
gcatgttacc tgcttatatg gtagtaatga ccatcatcgt gctgaaagcg ctttttaaatc 4440
tctggctgtt gccatgcgcg cggctactag tcttactgga agttctgaag tcccaagcac 4500
gaagggagtg ttgtaaagat gaattggatt atgtcaggaa aagaacgaca attttgcatc 4560
caaattgtct aaattttaga gttgcttgaa aacaatagaa ccttacttgc tttataatta 4620
cgttaattag aagcgttatc tcgtgaagga atatagtacg tagccgtata aattgaattg 4680
aatgttcagc ttatagaata gagacacttt gctgttcaat gcgtcgtcac ttaccatact 4740
cactttatta tacgacttta agtataaact ccgcggttat ggtaaaatta atgatgcaca 4800
aacgtccgat tccatatggg tacactacaa ttaaatactt ttaagctgat cccccacaca 4860
ccatagcttc aaaatgttic tactcctttt ttactcttcc agattttctc ggactccgcg 4920
catcgccgta ccacttcaaa acacccaagc acagcatact aaattticcc tctttcttcc 4980
tctagggtgt cgttaattac ccgtactaaa ggtttggaaa agaaaaaaga gaccgcctcg 5040
tttcttttic ttcgtcgaaa aaggcaataa aaatttttat cacgtttctt tttcttgaaa 5100
ttttttttit tagttttttt ctctttcagt gacctccatt gatatttaag ttaataaacg 5160
gtcttcaatt tctcaagttt cagttttcatt tttcttgttc tattacaact ttttttactt 5220
cttgttcatt agaaagaaag catagcaatc taatctaagg gcggtgttga caattaatca 5280
tcggcatagt atatcggcat agtataatac gacaaggtga ggaactaaac catggccaag 5340
ttgaccagtg ccgttccggt gctcaccgcg cgcgacgtcg ccggagcggt cgagttctgg 5400
accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgccgg tgtggtccgg 5460
gacgacgtga ccctgttcat cagcgcggtc caggaccagg tggtgccgga caacaccctg 5520
gcctgggtgt gggtgcgcgg cctggacgag ctgtacgccg agtggtcgga ggtcgtgtcc 5580
acgaacttcc gggacgcctc cgggccggcc atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg 5640
cgggagttcg ccctgcgcga cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag 5700
gactgacacg tccgacggcg gcccacgggt ccaggcctc ggagatccgt ccccctttic 5760
ctttgtcgat atcatgtaat tagttatgtc acgcttacat tcacgccctc cccccacatc 5820
cgctctaacc gaaaaggaag gagttagaca acctgaagtc taggtcccta tttatttttt 5880
tatagttatg ttagtattaa gaacgttatt tatatttcaa atttttcttt tttttctgta 5940
cagacgcgag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt cccccgtagg 6000
gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctaggggggg 6060
ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct cgtaagcgca caaggactgc 6120
tcccaaagat cctaggcggg atttgccga tttcggccta aaggaaccgg aacacgtaga 6180

aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 6240
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 6300
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 6360
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 6420
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 6480
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 6540
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 6600
ggcgcccggt tcttttigtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 6660
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 6720
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 6780
tgtcatctcg ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 6840
tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 6900
gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 6960
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 7020
atctcgtcgt gatccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 7080
ttttctggatt caacgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 7140
tggataccgg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 7200
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 7260
tcttctgaat tgaaaaaggt accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 7320
tcattttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat 7380
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 7440
ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 7500
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg 7560
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca 7620
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc 7680
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 7740
taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca gcagccagct tggagcgaac 7800
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga 7860
agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 7920
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg 7980
acttgagcgt cgattttigt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag 8040
caacgcggcc ttttiacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 8100
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc 8160
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga g 8191

<210> 8
<211> 1724
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 8
gaattcaaaa caaaatgtgt gcaacctcct cccagtttac tcagattacc gagcataatt 60
ctcgacgatc tgctaactac cagccgaacc tttggaactt tgagtttctc cagtctctcg 120
aaaatgacct gaaggtggaa aagctcgagg agaaggcgac caaactcgag gaggaggtgc 180
gatgtatgat caacagagtt gacacccaac ccctgtcttt gctggagctg atcgacgatg 240
tgcagcggtt gggtttgact tataaattcg agaaggacat tatcaaggca ctggagaaca 300
ttgtgctcct cgacgagaac aagaagaaca agtctgatct tcacgctacc gctctctctt 360
tccgacttct tcgacaacac ggcttcgagg tgtcgcagga cgtcttcgag agatttaagg 420
acaaggaggg aggatttagc ggcgagctga agggagacgt tcagggtctt ctctccttgt 480
acgaggcgtc ctacctggga ttcgagggag agaacctcct ggaggaagct cgtacatttt 540
ccatcactca ccttaagaat aaccttaagg agggaattaa caccaaggtg gccgagcagg 600
tttctcacgc cctggagctc ccctaccacc aacggctcca tagactggag gctcgttggt 660
tcctggacaa atatgagcca aaggagcctc atcatcagtt gctgttggag ttggccaagc 720
tggacttcaa tatggttcag acgctgcacc aaaaggagtt gcaggaccig tctcgatggt 780
ggaccgagat gggattggcc tcgaagctgg attttgtccg tgaccgactt atggaggtct 840
attttgggc ccttggaatg gcgcctgacc cccagttcgg agagtgccgg aaggcggtga 900
cgaagatgtt cggtcttgtg actatcatcg acgacgtcta cgatgtctac ggcacactcg 960
acgagttgca gctgttcact gacgccgtcg agcgatggga tgtgaacgcc attaatactc 1020
tccctgacta tatgaagctg tgcttcctgg ctctgtacaa cactgtcaac gatacctcgt 1080
actctatcct caaggagaag ggacacaaca atctctccta cttgaccaaa tcctggcgag 1140
aactgtgcaa ggcttttctg caggaggcta aatggtccaa taacaagatc attcctgctt 1200
tttctaaata cctggaaaat gcctcggtgt cgagctctgg cgtcgccctt ctggcccctt 1260
cctactctc cgtctgccag cagcaggagg atatttccga tcatgctctt agatcgctga 1320
ccgatttica cggcctcgtg cgatcttcct gcgtgatttt tcggttgtgt aatgaccttg 1380
cgacctctgc tgctgagctg gaacgaggcg agactacaaa ttccattatt tcttacatgc 1440
acgaaaacga tggaacatct gaagaacagg ctagagagga actgcgaaag ttgatcgacg 1500
ccgagtggaa gaagatgaac agagagcggg tgtccgactc taccctgctt cccaaggcct 1560
tcatggagat cgccgtgaac atggctcgag tttcccattg tacttaccag tacggtgacg 1620
gcctgggtcg tccggactac gctacagaga accgaatcaa gctgctgctc atcgaccccct 1680
tccctatcaa ccaattgatg tacgtgtaat agtctagagg atcc 1724

<210> 9
<211> 1641

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 9
tgaagcacgt agaagcgcca actacgaacc caactcctgg gattatgact ttctgctgtc 60
ttctgacacc gacgagtcga tcgaggttta taaggataag gccaagaaac ttgaggccga 120
ggtcagacga gagattaaca acgagaaggc cgagttcctg acccttcttg agctgatcga 180
caacgttcaa cgacttggtc ttggttaccg tttcgaatcc gatatccgac gtgcattgga 240
tcgatttgtc tcgtccggag gtttcgatgg tgtgactaag acgtcgctgc acgccacagc 300
tctttccttc agactgttgc ggcagcatgg atttgaggtt tcccaggaag cctttttctgg 360
tttcaaggat cagaacggaa acttttttgga gaatctcaag gaggacacca aggccatcct 420
gtcgttgtat gaggcctcgt tcctggctct tgagggcgag aatatttctgg atgaggctcg 480
ggttttcgct atttcgcacc tgaaggagtt gtcggaggaa aagatcggaa aggaactggc 540
cgagcaggtc aaccatgcac ttgaacttcc cctgcatcga cgtacccagc gactggaggc 600
cgtgtggagc atcgaggcgt acagaaaaaa ggaggatgct aatcaggttc tgctcgaact 660
cgctatcctc gactataaca tgattcagag cgtgtaccag cgtgacttgc gagagacaag 720
ccggtggtgg cgacgggtgg gactggccac gaagctccac tttgctaaag atcgattgat 780
tgagtcgttc tactgggcag tgggtgtggc ctttgagcct cagtactccg actgccgaaa 840
ctccgttgca aagatgtttt cttttgtcac tatcatcgac gacatctacg atgtttacgg 900
cactctcgat gaactcgaac tcttcacgga cgctgtcgag cgatgggatg tgaatgccat 960
taatgatctg ccagattata tgaagttgtg tttcttggcg ctctacaaca caattaatga 1020
aattgcctac gacaacctca aggacaaggg agagaacatt ctgccctacc ttactaaagc 1080
ctgggccgac ctgtgtaacg ccttttttgca ggaagccaag tggctctata acaaatctac 1140
tcctacattt gatgactact tcggcaacgc ttggaagtct tccagcggcc ctctccagtt 1200
gatcttcgct tactttgcag tggtccagaa catcaagaaa gaggagattg agaacctcca 1260
gaagtatcac gacatcatct cccgaccttc gcacatcttt cgactgtgca atgaccttgc 1320
ctccgcatcc gctgagattg cccgaggaga aacagccaat tctgtgtcgt gttacatgcg 1380
tacaaagggc atctccgagg agctggctac cgagtctgtg atgaacctga tcgatgaaac 1440
ctgtaagaag atgaacaaag agaaactggg cggttctctg ttcgccaaac catttgttga 1500
aaccgcgatc aatctggctc gtcagtctca ttgtacttac cataacggtg acgcgcacac 1560
ttcgccggac gaattgaccc gtaagcgtgt gctttcggtg attaccgagc cgatcctgcc 1620
gttcgaaaga taataggatc c 1641

<210> 10
<211> 8804
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 10
gctggtacca tatgggaatt cgaagctttc tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc 60
tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcatc atcattgagt ttaaacggtc tccagcttgg 120
ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag 180
cggtctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtcccac ctgaccccat 240
gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc cccatgcgag 300
agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggccttic 360
gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg 420
atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg ccataaactg 480
ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa 540
ctctttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgcttaacc ggaattgcca 600
gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttctcg 660
ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agctctgatc aagagacagg atgaggatcg 720
tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg 780
ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg 840
ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 900
gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca 960
gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg 1020
gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat 1080
gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc catticgacca ccaagcgaaa 1140
catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg 1200
gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg 1260
cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg 1320
gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat 1380
caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac 1440
cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc 1500
cttcttgacg agttcttctg acatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 1560
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcctttit ttctgcgcgt 1620
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 1680
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 1740
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1800
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 1860
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 1920
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 1980

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2040
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2100
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2160
gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc 2220
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 2280
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 2340
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 2400
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 2460
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 2520
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 2580
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 2640
cgcgcgaggc agcagatcaa ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca 2700
ccatcgaatg gtgcaaaacc tttcgcggta tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat 2760
tcagggtggt gaatgtgaaa ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat gccggtgtct 2820
cttatcagac cgtttcccgc gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg 2880
aaaaagtgga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacaacaac 2940
tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc 3000
cgtcgcaaat tgtcgcggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg 3060
tgtcgatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg 3120
cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg 3180
tggaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacaccca 3240
tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg 3300
cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggcccatt aagttctgtc tcggcgcgtc 3360
tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg atagcggaac 3420
gggaaggcga ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg 3480
gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg 3540
ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata 3600
ccgaagacag ctcatgttat atcccgccgt caaccaccat caaacaggat tttcgcctgc 3660
tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaagggca 3720
atcagctgtt gcccgtctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa 3780
ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac 3840
tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agcgcgaatt gatctggttt 3900
gacagcttat catcgactgc acggtgcacc aatgcttctg gcgtcaggca gccatcggaa 3960
gctgtggtat ggctgtgcag gtcgtaaatc actgcataat tcgtgtcgct caaggcgcac 4020
tcccgttctg gataatgttt tttgcgccga catcataacg gttctggcaa atattctgaa 4080
atgagctgtt gacaattaat catccggctc gtataatgtg tggaattgtg agcggataac 4140
aatttcacac aggaaacagc gccgctgaga aaaagcgaag cggcactgct ctttaacaat 4200
ttatcagaca atctgtgtgg gcactcgacc ggaattatcg attaacttta ttattaaaaa 4260
ttaaagaggt atatattaat gtatcgatta aataaggagg aataaaccat gtgtgcgacc 4320
tcttctcaat ttactcagat taccgagcat aattcccgtc gttccgcaaa ctatcagcca 4380
aacctgtgga atttcgaatt cctgcaatcc ctggagaacg acctgaaagt ggaaaagctg 4440
gaggagaaag cgaccaaact ggaggaagaa gttcgctgca tgatcaaccg tgtagacacc 4500
cagccgctgt ccctgctgga gctgatcgac gatgtgcagc gcctgggtct gacctacaaa 4560
ttgaaaaag acatcattaa agcccttggaa aacatcgtac tgctggacga aaacaaaaag 4620
aacaaatctg acctgcacgc aaccgctctg tctttccgtc tgctgcgtca gcacggttc 4680
gaggtttctc aggatgtttt tgagcgttc aaggataaag aaggtggttt cagcggtgaa 4740
ctgaaaggtg acgtccaagg cctgctgagc ctgtatgaag cgtcttacct gggtttcgag 4800
ggtgagaacc tgctggagga ggcgcgtacc ttttccatca cccacctgaa gaacaacctg 4860
aaagaaggca ttaataccaa ggttgcagaa caagtgagcc acgccctgga actgccatat 4920
caccagcgtc tgcaccgtct ggaggcacgt tggttcctgg ataaatacga accgaaagaa 4980
ccgcatcacc agctgctgct ggagctggcg aagctggatt ttaacatggt acagaccctg 5040
caccagaaag agctgcaaga tctgtcccgc tggtggaccg agatgggcct ggctagcaaa 5100
ctggatttg tacgcgaccg cctgatggaa gtttatttct gggcactggg tatggcgcca 5160
gacccgcagt ttggtgaatg tcgcaaagct gttactaaaa tgtttggtct ggtgacgatc 5220
atcgatgacg tgtatgacgt ttatggcact ctggacgaac tgcaactgtt caccgatgct 5280
gtagagcgct gggacgttaa cgctattaac accctgccgg actatatgaa actgtgttc 5340
ctggcactgt acaacaccgt taacgacacg tcctattcta ttctgaaaga gaaaggtcat 5400
aacaacctgt cctatctgac gaaaagctgg cgtgaactgt gcaaagcctt tctgcaagag 5460
gcgaaatggt ccaacaacaa aattatcccg gctttctcca agtacctgga aaacgccagc 5520
gtttcctcct ccggtgtagc gctgctggcg ccgtcttact tttccgtatg ccagcagcag 5580
gaagacatct ccgaccacgc gctgcgttcc ctgaccgact tccatggtct ggtgcgttct 5640
agctgcgtta tcttccgcct gtgcaacgat ctggccacct ctgcggcgga gctggaacgt 5700
ggcgagacta ccaattctat cattagctac atgcacgaaa acgatggtac cagcgaggaa 5760
caggcccgcg aagaactgcg taaactgatc gacgccgaat ggaaaaagat gaatcgtgaa 5820
cgcgttagcg actccaccct gctgcctaaa gcgttcatgg aaatcgcagt taacatggca 5880
cgtgtttccc actgcaccta ccagtatggc gatggtctgg gtcgcccaga ctacgcgact 5940
gaaaaccgca tcaaactgct gctgattgac ccttttcccga ttaaccagct gatgtatgtc 6000
taactgcatc gcccttagga ggtaaaaaaa aatgactgcc gacaacaata gtatgcccca 6060
tggtgcagta tctagttacg ccaaattagt gcaaaaccaa acacctgaag acattttgga 6120
agagtttcct gaaattattc cattacaaca aagacctaat acccgatcta gtgagacgtc 6180
aaatgacgaa agcggagaaa catgtttttc tggtcatgat gaggagcaaa ttaagttaat 6240
gaatgaaaat tgtattgttt tggattggga cgataatgct attggtgccg gtaccaagaa 6300
agtttgtcat ttaatggaaa atattgaaaa gggtttacta catcgtgcat tctccgtctt 6360
tatttttcaat gaacaaggtg aattactttt acaacaaaga gccactgaaa aaataacttt 6420
cccgatctt tggactaaca catgctgctc tcatccacta tgtattgatg acgaattagg 6480
tttgaagggt aagctagacg ataagattaa gggcgctatt actgcggcgg tgagaaaact 6540
agatcatgaa ttaggtattc cagaagatga aactaagaca aggggtaagt ttcacttttt 6600
aaacagaatc cattacatgg caccaagcaa tgaaccatgg ggtgaacatg aaattgatta 6660

catcctattt tataagatca acgctaaaga aaactigact gtcaacccaa acgtcaatga 6720
agttagagac ttcaaatggg tttcaccaaa tgatttgaaa actatgtttg ctgacccaag 6780
ttacaagttt acgccttggt ttaagattat ttgcgagaat tacttattca actggtggga 6840
gcaattagat gacctttctg aagtggaaaa tgacaggcaa attcatagaa tgctataaca 6900
acgcgtcctg cattcgccct taggaggtaa aaaaacatga gttttgatat tgccaaatac 6960
ccgaccctgg cactggtcga ctccacccag gagttacgac tgttgcccgaa agagagttta 7020
ccgaaactct gcgacgaact gcgccgctat ttactcgaca gcgtgagccg ttccagcggg 7080
cacttcgcct ccgggctggg cacggtcgaa ctgaccgtgg cgctgcacta tgtctacaac 7140
accccgttig accaattgat ttgggatgtg gggcatcagg cttatccgca taaaattttg 7200
accggacgcc gcgacaaaat cggcaccatc cgtcagaaag gcggtctgca cccgttcccg 7260
tggcgcggcg aaagcgaata tgacgtatta agcgtcgggc attcatcaac ctccatcagt 7320
gccggaattg gtattgcggt tgctgccgaa aaagaaggca aaaatcgccg caccgtctgt 7380
gtcattggcg atggcgcgat taccgcaggc atggcgtttg aagcgatgaa tcacgcgggc 7440
gatatccgtc ctgatatgct ggtgattctc aacgacaatg aaatgtcgat ttccgaaaat 7500
gtcggcgcgc tcaacaacca tctggcacag ctgctttccg gtaagcttta ctcttcactg 7560
cgcgaaggcg ggaaaaaagt tttctctggc gtgccgccaa ttaaagagct gctcaaacgc 7620
accgaagaac atattaaagg catggtagtg cctggcacgt tgtttgaaga gctgggcttt 7680
aactacatcg gcccggtgga cggtcacgat gtgctggggc ttatcaccac gctaaagaac 7740
atgcgcgacc tgaaaggccc gcagttcctg catatcatga ccaaaaaagg tcgtggttat 7800
gaaccggcag aaaaagaccc gatcactttc cacgccgtgc ctaaatttga tccctccagc 7860
ggttgtttgc cgaaaagtag cggcggtttg ccgagctatt caaaaatctt tggcgactgg 7920
ttgtgcgaaa cggcagcgaa agacaacaag ctgatggcga ttactccggc gatgcgtgaa 7980
ggttccggca tggtcgagtt ttcacgtaaa ttcccggatc gctacttcga cgtggcaatt 8040
gccgagcaac acgcggtgac ctttgctgcg ggtctggcga ttggtgggta caaacccatt 8100
gtcgcgattt actccacttt cctgcaacgc gcctatgatc aggtgctgca tgacgtggcg 8160
attcaaaagc ttccggtcct gttcgccatc gaccgcgcgg gcattgttgg tgctgacggt 8220
caaacccatc agggtgcttt tgatctctct tacctgcgct gcataccgga aatggtcatt 8280
atgaccccga gcgatgaaaa cgaatgtcgc cagatgctct ataccggcta tcactataac 8340
gatggcccgt cagcggtgcg ctacccgcgt ggcaacgcgg tcggcgtgga actgacgccg 8400
ctggaaaaac taccaattgg caaaggcatt gtgaagcgtc gtggcgagaa actggcgatc 8460
cttaactttg gtacgctgat gccagaagcg gcgaaagtcg ccgaatcgct gaacgccacg 8520
ctggtcgata tgcgtttigt gaaaccgctt gatgaagcgt taattctgga aatggccgcc 8580
agccatgaag cgctggtcac cgtagaagaa aacgccatta tgggcggcgc aggcagcggc 8640
gtgaacgaag tgctgatggc ccatcgtaaa ccagtacccg tgctgaacat tggcctgccg 8700
gacttctita ttccgcaagg aactcaggaa gaaatgcgcg ccgaactcgg cctcgatgcc 8760
gctggtatgg aagccaaaat caaggcctgg ctggcataac tgca 8804

<210> 11
<211> 10992
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc 420
gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttа ggaggtaaaa 480
aaacatgtca ttaccgttct taacttctgc accgggaaag gttattattt ttggtgaaca 540
ctctgctgtg tacaacaagc ctgccgtcgc tgctagtgtg tctgcgttga gaacctacct 600
gctaataagc gagtcatctg caccagatac tattgaattg gacttcccgg acattagctt 660
taatcataag tggtccatca atgatttcaa tgccatcacc gaggatcaag taaactccca 720
aaaattggcc aaggctcaac aagccaccga tggcttgtct caggaactcg ttagtctttt 780
ggatccgttg ttagctcaac tatccgaatc cttccactac catgcagcgt tttgtttcct 840
gtatatgttt gtttgcctat gcccccatgc caagaatatt aagttttctt taaagtctac 900
tttacccatc ggtgctgggt tgggctcaag cgcctctatt tctgtatcac tggccttagc 960
tatggcctac ttgggggggt taataggatc taatgacttg gaaaagctgt cagaaaacga 1020
taagcatata gtgaatcaat gggccttcat aggtgaaaag tgtattcacg gtacccctic 1080
aggaatagat aacgctgtgg ccacttatgg taatgccctg ctatttgaaa aagactcaca 1140
taatggaaca ataaacacaa acaattttaa gttcttagat gatttcccag ccattccaat 1200
gatcctaacc tatactagaa ttccaaggtc tacaaaagat cttgttgctc gcgttcgtgt 1260
gttggtcacc gagaaatttc ctgaagttat gaagccaatt ctagatgcca tgggtgaatg 1320
tgccctacaa ggcttagaga tcatgactaa gttaagtaaa tgtaaaggca ccgatgacga 1380
ggctgtagaa actaataatg aactgtatga acaactattg gaattgataa gaataaatca 1440
tggactgctt gtctcaatcg gtgtttctca tcctggatta gaacttatta aaaatctgag 1500
cgatgatttg agaattggct ccacaaaact taccggtgct ggtggcggcg gttgctcttt 1560
gacttigtta cgaagagaca ttactcaaga gcaaattgac agcttcaaaa agaaattgca 1620
agatgatttt agttacgaga catttgaaac agacttgggt gggactggct gctgtttgtt 1680
aagcgcaaaa aatttgaata aagatcttaa aatcaaatcc ctagtattcc aattatttga 1740
aaataaaact accacaaagc aacaaattga cgatctatta ttgccaggaa acacgaattt 1800

accatggact tcataagcta atttgcgata ggcctgcacc cttaaggagg aaaaaaacat 1860
gtcagagttg agagccttca gtgccccagg gaaagcgtta ctagctggtg gatatttagt 1920
tttagataca aaatatgaag cattgtagt cggattatcg gcaagaatgc atgctgtagc 1980
ccatccttac ggttcattgc aagggtctga taagtttgaa gtgcgtgtga aaagtaaaca 2040
atttaaagat ggggagtggc tgtaccatat aagtcctaaa agtggcttca ttcctgtttc 2100
gataggcgga tctaagaacc ctttcattga aaaagttatc gctaacgtat ttagctactt 2160
taaacctaac atggacgact actgcaatag aaacttgttc gttattgata ttttctctga 2220
tgatgcctac cattctcagg aggatagcgt taccgaacat cgtggcaaca gaagattgag 2280
ttttcattcg cacagaattg aagaagttcc caaaacaggg ctgggctcct cggcaggttt 2340
agtcacagtt ttaactacag ctttggcctc cttttttgta tcggacctgg aaaataatgt 2400
agacaaatat agagaagtta ttcataattt agcacaagtt gctcattgtc aagctcaggg 2460
taaaattgga agcgggtttg atgtagcggc ggcagcatat ggatctatca gatatagaag 2520
attcccaccc gcattaatct ctaatttgcc agatattgga agtgctactt acggcagtaa 2580
actggcgcat ttggttgatg aagaagactg gaatattacg attaaaagta accatttacc 2640
ttcgggatta actttatgga tgggcgatat taagaatggt tcagaaacag taaaactggt 2700
ccagaaggta aaaaattggt atgattcgca tatgccagaa agcttgaaaa tatatacaga 2760
actcgatcat gcaaattcta gatttatgga tggactatct aaactagatc gcttacacga 2820
gactcatgac gattacagcg atcagatatt tgagtctctt gagaggaatg actgtacctg 2880
tcaaaagtat cctgaaatca cagaagttag agatgcagtt gccacaatta gacgttcctt 2940
tagaaaaata actaaagaat ctggtgccga tatcgaacct cccgtacaaa ctagcttatt 3000
ggatgattgc cagaccttaa aaggagttct tacttgctta atacctggtg ctggtggtta 3060
tgacgccatt gcagtgatta ctaagcaaga tgttgatctt agggctcaaa ccgctaatga 3120
caaaagattt tctaaggttc aatggctgga tgtaactcag gctgactggg gtgttaggaa 3180
agaaaaagat ccggaaactt atcttgataa ataacttaag gtagctgcat gcagaattcg 3240
cccttaagga ggaaaaaaaa atgaccgttt acacagcatc cgttaccgca cccgtcaaca 3300
tcgcaaccct taagtattgg gggaaaaggg acacgaagtt gaatctgccc accaattcgt 3360
ccatatcagt gacttttatcg caagatgacc tcagaacgtt gacctctgcg gctactgcac 3420
ctgagtttga acgcgacact ttgtggttaa atggagaacc acacagcatc gacaatgaaa 3480
gaactcaaaa ttgtctgcgc gacctacgcc aattaagaaa ggaaatggaa tcgaaggacg 3540
cctcattgcc cacattatct caatggaaac tccacattgt ctccgaaaat aactttccta 3600
cagcagctgg tttagcttcc tccgctgctg gctttgctgc attggtctct gcaattgcta 3660
agttatacca attaccacag tcaacttcag aaatatctag aatagcaaga aaggggtctg 3720
gttcagcttg tagatcgttg tttggcggat acgtggcctg ggaaatggga aaagctgaag 3780
atggtcatga ttccatggca gtacaaatcg cagacagctc tgactggcct cagatgaaag 3840
cttgtgtcct agttgtcagc gatattaaaa aggatgtgag ttccactcag ggtatgcaat 3900
tgaccgtggc aacctccgaa ctatttaaag aaagaattga acatgtcgta ccaaagagat 3960
ttgaagtcat gcgtaaagcc attgttgaaa aagatttcgc caccttgca aaggaaacaa 4020
tgatggattc caactctttc catgccacat gtttggactc tttcccttcca atattctaca 4080
tgaatgacac ttccaagcgt atcatcagtt ggtgccacac cattaatcag tttacggag 4140
aaacaatcgt tgcatacacg tttgatgcag gtccaaatgc tgtgttgtac tacttagctg 4200
aaaatgagtc gaaactcttt gcatttatct ataaattgtt tggctctgtt cctggatggg 4260
acaagaaatt tactactgag cagcttgagg ctttcaacca tcaatttgaa tcatctaact 4320
ttactgcacg tgaattggat cttgagttgc aaaaggatgt tgccagagtg attttaactc 4380
aagtcggttc aggcccacaa gaaacaaacg aatctttgat tgacgcaaag actggtctac 4440
caaaggaata agatcaattc gctgcatcgc cttaggagg taaaaaaaaa tgactgccga 4500
caacaatagt atgccccatg gtgcagtatc tagttacgcc aaattagtgc aaaaccaaac 4560
acctgaagac atttttggaag agtttcctga aattattcca ttacaacaaa gacctaatac 4620
ccgatctagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tgtttttctg gtcatgatga 4680
ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattg tattgttttg gattgggacg ataatgctat 4740
tggtgccggt accaagaaag tttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg gtttactaca 4800
tcgtgcattc tccgtcttta ttttcaatga acaaggtgaa ttacttttac aacaaagagc 4860
cactgaaaaa ataacttttcc ctgatctttg gactaacaca tgctgctctc atccactatg 4920
tattgatgac gaattaggtt tgaagggtaa gctagacgat aagattaagg gcgctattac 4980
tgcggcggtg agaaaactag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa ctaagacaag 5040
gggtaagttt cacttttaa acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg aaccatgggg 5100
tgaacatgaa attgattaca tcctatttta taagatcaac gctaaagaaa acttgactgt 5160
caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaatg atttgaaaac 5220
tatgtttgct gacccaagtt acaagtttac gccttggttt aagattattt gcgagaatta 5280
cttattcaac tggtgggagc aattagatga cctttctgaa gtggaaaatg acaggcaaat 5340
tcatagaatg ctataacaac gcgtcctgca ttcgcccttа ggaggtaaaa aaacatgtgt 5400
gcgacctctt ctcaatttac tcagattacc gagcataatt cccgtcgttc cgcaaactat 5460
cagccaaacc tgtggaattt cgaattcctg caatccctgg agaacgacct gaaagtggaa 5520
aagctggagg agaaagcgac caaactggag gaagaagttc gctgcatgat caaccgtgta 5580
gacacccagc cgctgtccct gctggagctg atcgacgatg tgcagcgcct gggtctgacc 5640
tacaaatttg aaaaagacat cattaaagcc ctggaaaaca tcgtactgct ggacgaaaac 5700
aaaaagaaca aatctgacct gcacgcaacc gctctgtctt tccgtctgct gcgtcagcac 5760
ggtttcgagg tttctcagga tgttttgag cgtttcaagg ataaagaagg tggtttcagc 5820
ggtgaactga aaggtgacgt ccaaggcctg ctgagcctgt atgaagcgtc ttacctgggt 5880
ttcgagggtg agaacctgct ggaggaggcg cgtacctttt ccatcaccca cctgaagaac 5940
aacctgaaag aaggcattaa taccaaggtt gcagaacaag tgagccacgc cctggaactg 6000
ccatatcacc agcgtctgca ccgtctggag gcacgttggt tcctggataa atacgaaccg 6060
aaagaaccgc atcaccagct gctgctggag ctggcgaagc tggattttaa catggtacag 6120
accctgcacc agaaagagct gcaagatctg tcccgctggt ggaccgagat gggcctggct 6180
agcaaactgg attttgtacg cgaccgcctg atggaagttt atttctgggc actgggtatg 6240
gcgccagacc cgcagtttgg tgaatgtcgc aaagctgtta ctaaaatgtt tggtctggtg 6300
acgatcatcg atgacgtgta tgacgtttat ggcactctgg acgaactgca actgttcacc 6360
gatgctgtag agcgctggga cgttaacgct attaacaccc tgccggacta tatgaaactg 6420
tgtttcctgg cactgtacaa caccgttaac gacacgtcct attctattct gaaagagaaa 6480

ggtcataaca acctgtccta tctgacgaaa agctggcgtg aactgtgcaa agcctttctg 6540
caagaggcga aatggtccaa caacaaaatt atcccggctt tctccaagta cctggaaaac 6600
gccagcgttt cctcctccgg tgtagcgctg ctggcgccgt cttacttttc cgtatgccag 6660
cagcaggaag acatctccga ccacgcgctg cgttccctga ccgacttcca tggtctggtg 6720
cgttctagct gcgttatctt ccgcctgtgc aacgatctgg ccacctctgc ggcggagctg 6780
gaacgtggcg agactaccaa ttctatcatt agctacatgc acgaaaacga tggtaccagc 6840
gaggaacagg cccgcgaaga actgcgtaaa ctgatcgacg ccgaatggaa aaagatgaat 6900
cgtgaacgcg ttagcgactc caccctgctg cctaaagcgt tcatggaaat cgcagttaac 6960
atggcacgtg tttcccactg cacctaccag tatggcgatg gtctgggtcg cccagactac 7020
gcgactgaaa accgcatcaa actgctgctg attgaccctt tcccgattaa ccagctgatg 7080
tatgtctaac tgcagctggt accatatggg aattcgaagc tttctagaac aaaaactcat 7140
ctcagaagag gatctgaata gcgccgtcga ccatcatcat catcatcatt gagtttaaac 7200
ggtctccagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt tcagcctgat acagattaaa 7260
tcagaacgca gaagcggtct gataaaacag aatttgcctg gcggcagtag cgcggtggtc 7320
ccaccctgacc ccatgccgaa ctcagaagtg aaacgccgta gcgccgatgg tagtgtgggg 7380
tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa 7440
agactgggcc tttcgttta tctgttgttt gtcggtgaac gctctcctga gtaggacaaa 7500
tccgccggga gcggatttga acgttgcgaa gcaacggccc ggagggtggc gggcaggacg 7560
cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt 7620
tgcgtttcta caaactcttt ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctt 7680
aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact 7740
ggatggcttt ctcgccgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagctct gatcaagaga 7800
caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg 7860
cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg 7920
ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt 7980
ccggtgccct gaatgaactg caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg 8040
gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc gggaagggac tggctgctat 8100
tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat 8160
ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg 8220
accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg 8280
atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc 8340
tcaaggcgag catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc 8400
cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg 8460
tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg 8520
gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca 8580
tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgacgcat gaccaaaatc ccttaacgtg 8640
agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 8700
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg 8760
tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 8820
cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact 8880
ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg 8940
gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 9000
ggtcgggctg aacgggggtt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 9060
aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg 9120
cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 9180
ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc 9240
gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 9300
ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc 9360
ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc 9420
gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcctg atgcggtatt 9480
ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct 9540
gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat 9600
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 9660
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 9720
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagca gatcaattcg cgcgcgaagg cgaagcggca 9780
tgcatttacg ttgacaccat cgaatggtgc aaaacctttc gcggtatggc atgatagcgc 9840
ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca 9900
gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt 9960
tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtggaagcg gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac 10020
cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag tcgttgctga ttggcgttgc cacctccagt 10080
ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc gcggcgatta aatctcgcgc cgatcaactg 10140
ggtgccagcg tggtggtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg 10200
gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt gggctgatca ttaactatcc gctggatgac 10260
caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc 10320
tctgaccaga cacccatcaa cagtattatt ttctcccatg aagacggtac gcgactgggc 10380
gtggagcatc tggtcgcatt gggtcaccag caaatcgcgc tgttagcggg cccattaagt 10440
tctgtctcgg cgcgtctgcg tctggctggc tggcataaat atctcactcg caatcaaatt 10500
cagccgatag cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt ccggtttttca acaaaccatg 10560
caaatgctga atgagggcat cgttcccact gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg 10620
ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc gggctgcgcg ttggtgcgga tatctcggta 10680
gtgggatacg acgataccga agacagctca tgttatatcc cgccgtcaac caccatcaaa 10740
caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc 10800
caggcggtga agggcaatca gctgttgccc gtctcactgg tgaaaagaaa aaccaccctg 10860
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 10920
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagcg 10980
cgaattgatc tg 10992

<210> 12
<211> 8703
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 12
cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagattc tgaaatgagc 60
tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 120
acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa caatttatca 180
gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta aaaattaaag 240
aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc gagctcagga 300
ggtaaaaaaa catgaaaaca gtagttatta ttgatgcatt acgaacacca attggaaaat 360
ataaaggcag cttaagtcaa gtaagtgccg tagacttagg aacacatgtt acaacacaac 420
ttttaaaaag acattccact atttctgaag aaattgatca agtaatcttt ggaaatgttt 480
tacaagctgg aaatggccaa aatcccgcac gacaaatagc aataaacagc ggtttgtctc 540
atgaaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctgcggatc aggaatgaag gccgttattt 600
tggcgaaaca attgattcaa ttaggagaag cggaagtttt aattgctggc gggattgaga 660
atatgtccca agcacctaaa ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc tacgatgcgc 720
cttttctag tatgatgtat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag gcaatgggct 780
taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtaactag agaagagcaa gatcaatttt 840
ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaagcaga agggatattc gctgacgaaa 900
tagccccatt agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaagggatt cgccctaatt 960
cgagcgttga gaagctagga acgcttaaaa cagttttaa agaagacggt actgtaacag 1020
cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg cttctgcttt gattattgct tcacaagaat 1080
atgccgaagc acacggtctt ccttatttag ctattattcg agacagtgtg gaagtcggta 1140
ttgatccagc ctatatggga atttcgccga ttaaagccat tcaaaaactg ttagcgcgca 1200
atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt gcagcaactt 1260
caatcgtggt ccaaagagaa ctggctttac cagaggaaaa ggtcaacatt tatggtggcg 1320
gtatttcatt aggtcatgcg attggtgcca caggtgctcg tttattaacg agtttaagtt 1380
atcaattaaa tcaaaaagaa aagaaatatg gagtggcttc tttatgtatc ggcggtggct 1440
taggactcgc tatgctacta gagagacctc agcaaaaaaa aaacagccga ttttatcaaa 1500
tgagtcctga ggaacgcctg gcttctcttc ttaatgaagg ccagatttct gctgatacaa 1560
aaaaagaatt tgaaaatacg gctttatctt cgcagattgc caatcatatg attgaaaatc 1620
aaatcagtga aacagaagtg ccgatgggcg ttggcttaca tttaacagtg gacgaaactg 1680
attatttggt accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgcggctttg agtaatggtg 1740
caaaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt ggacaaatcg 1800
ttttttacga tgttgcagat cccgagtcat tgattgataa actacaagta agagaagcgg 1860
aagttttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc ggcggcttaa 1920
gagatttgca atatcgtact tttgatgaat catttgtatc tgtcgacttt ttagtagatg 1980
ttaaggatgc aatgggggca aatatcgtta acgctatgtt ggaaggtgtg gccgagttgt 2040
tccgtgaatg gtttgcggag caaaagattt tattcagtat tttaagtaat tatgccacgg 2100
agtcggttgt tacgatgaaa acggctattc cagtttcacg tttaagtaag gggagcaatg 2160
gccgggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcatta gatccttatc 2220
gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgtagtt ttagctacag 2280
gaaatgatac acgcgctgtt agcgcttctt gtcatgcttt tgcggtgaag gaaggtcgct 2340
accaaggctt gactagttgg acgctggatg gcgaacaact aattggtgaa atttcagttc 2400
cgcttgcttt agccacggtt ggcggtgcca caaaagtctt acctaaatct caagcagctg 2460
ctgatttgtt agcagtgacg gatgcaaaag aactaagtcg agtagtagcg gctgttggtt 2520
tggcacaaaa tttagcggcg ttacgggcct tagtctctga aggaattcaa aaaggacaca 2580
tggctctaca agcacgttct ttagcgatga cggtcggagc tactggtaaa gaagttgagg 2640
cagtcgctca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgatgaacca agaccgagcc atggctattt 2700
taaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaaacat gacaattggg attgataaaa 2760
ttagtttttt tgtgcccccc tattatattg atatgacggc actggctgaa gccagaaatg 2820
tagaccctgg aaaatttcat attggtattg ggcaagacca aatggcggtg aacccaatca 2880
gccaagatat tgtgacattt gcagccaatg ccgcagaagc gatcttgacc aaagaagata 2940
aagaggccat tgatatggtg attgtcggga ctgagtccag tatcgatgag tcaaaagcgg 3000
ccgcagttgt cttacatcgt ttaatgggga ttcaaccttt cgctcgctct ttcgaaatca 3060
aggaagcttg ttacggagca acagcaggct tacagttagc taagaatcac gtagccttac 3120
atccagataa aaaagtcttg gtcgtagcgg cagatattgc aaaatatggc ttaaattctg 3180
gcggtgagcc tacacaagga gctggggcgg ttgcaatgtt agttgctagt gaaccgcgca 3240
ttttggcttt aaaagaggat aatgtgatgc tgacgcaaga tatctatgac ttttggcgtc 3300
caacaggcca cccgtatcct atggtcgatg gtcctttgtc aaacgaaacc tacatccaat 3360
ctttgccca agtctgggat gaacataaaa aacgaaccgg tcttgatttt gcagattatg 3420
atgctttagc gttccatatt ccttacacaa aaatgggcaa aaaagcctta ttagcaaaaa 3480
tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaattttagc ccgttatgaa gaaagtatcg 3540
tctatagtcg tcgcgtagga aacttgtata cgggttcact ttatctggga ctcatttccc 3600
ttttagaaaa tgcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaat tggtttattc agttatggtt 3660
ctggtgctgt cgctgaattt ttcactggtg aattagtagc tggttatcaa aatcatttac 3720
aaaaagaaac tcatttagca ctgctggata atcggacaga actttctatc gctgaatatg 3780
aagccatgtt tgcagaaact ttagacacag acattgatca aacgttagaa gatgaattaa 3840
aatatagtat ttctgctatt aataataccg ttcgttctta tcgaaactaa gagatctgca 3900
gctggtacca tatgggaatt cgaagcttgg gcccgaacaa aaactcatct cagaagagga 3960
tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg tctccagctt 4020
ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc agaacgcaga 4080

agcggtctga taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cggtggtccc acctgacccc 4140
atgccgaact cagaagtgaa acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc tccccatgcg 4200
agaglaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag actgggcctt 4260
tcgttttatc tgttgtttgt cggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc cgccgggagc 4320
ggattigaac gttgcgaagc aacggcccgg agggtggcgg gcaggacgcc cgccataaac 4380
tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg cgtttctaca 4440
aactctttit gtttatttti ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 4500
ccctgataaa tgcttcaata atctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgcccct 4560
cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggtatttt ctccttacgc 4620
atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg 4680
catagttaag ccagccccga cacccgccaa cacccgctga cgagcttagt aaagcccicg 4740
ctagatttta atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc 4800
cagccttica tgatatatct cccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc ttaaaaataa 4860
taaaagcaga cttgacctga tagtttggct gtgagcaatt atgtgcttag tgcatctaac 4920
gcttgagtta agccgcgccg cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgtta gacattatit 4980
gccgactacc ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca attcttcca actgatctgc 5040
gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac 5100
gggctgatac tgggccggca ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat ccttcggcgc 5160
gatttgccg gttactgcgc tgtaccaaat gcgggacaac gtaagcacta catticgctc 5220
atcgccagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta gcgcctcaaa 5280
tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttcctccgcc gctggaccta ccaaggcaac 5340
gctatgttct cttgctttig tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggctc 5400
gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc 5460
tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgcggag 5520
aatctcgctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg 5580
cgttgtttca tcaagccita cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt 5640
caggccgcca tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg 5700
gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc 5760
cctcatgatg tttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat cgttgctgct 5820
ccataacatc aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttggatg cccgaggcat 5880
agactgtacc ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc 5940
accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgct acttgcatta 6000
cagcttacga accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gccttcatcc gtttccacgg 6060
tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc 6120
gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt 6180
ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggaa gacctcggcc 6240
gtcgcggcgc ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcatcc tcggttttct 6300
ggaaggcgag catcgtttgt tcgcccagct tctgtatgga acgggcatgc ggatcagtga 6360
gggttigcaa ctgcgggtca aggatctgga tttcgatcac ggcacgatca tcgtgcggga 6420
gggcaagggc tccaaggatc gggccttgat gttacccgag agcttggcac ccagcctgcg 6480
cgagcagggg aattaattcc cacgggtttt gctgcccgca aacgggctgt tctggtgttg 6540
ctagtttgtt atcagaatcg cagatccggc ttcagccggt ttgccggctg aaagcgctat 6600
ttcttccaga attgccatga ttttttcccc acgggaggcg tcactggctc ccgtgttgtc 6660
ggcagcttig attcgataag cagcatcgcc tgtttcaggc tgtctatgtg tgactgttga 6720
gctgtaacaa gttgtctcag gtgttcaatt tcatgttcta gttgctttgt tttactggtt 6780
tcacctgttc tattaggtgt tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcatgg 6840
tgaacagctt tgaatgcacc aaaaactcgt aaaagctctg atgtatctat cttttttaca 6900
ccgttttcat ctgtgcatat ggacagtttt ccctttgata tgtaacggtg aacagttgtt 6960
ctactttigt ttgttagtct tgatgcttca ctgatagata caagagccat aagaacctca 7020
gatccttccg tatttagcca tgatgttctc tagtgtggtt cgttgttttt gcgtgagcca 7080
tgagaacgaa ccattgagat catacttact ttgcatgtca ctcaaaaatt ttgcctcaaa 7140
actggtgagc tgaatttttg cagttaaagc atcgtgtagt gtttttctta gtccgttatg 7200
taggtaggaa tctgatgtaa tggttgttgg tattttgtca ccattcattt ttatctggtt 7260
gttctcaagt tcggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttgga aaatcaacgt 7320
atcagtcggg cggcctcgct tatcaaccac caatttcata ttgctgtaag tgtttaaatc 7380
tttacttatt ggtttcaaaa cccattggtt aagccttita aactcatggt agttatttic 7440
aagcattaac atgaacttaa attcatcaag gctaatctct atatttgcct tgtgagtttt 7500
cttttgtgtt agttctttta ataaccactc ataaatcctc atagagtatt tgttttcaaa 7560
agacttaaca tgttccagat tatattttat gaatttttit aactggaaaa gataaggcaa 7620
tatctcttca ctaaaaacta attctaattt ttcgcttgag aacttggcat agtttgtcca 7680
ctggaaaatc tcaaagcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag 7740
ctctctggtt gctttagcta atacaccata agcatttitc ctactgatgt tcatcatctg 7800
agcgtattgg ttataagtga acgataccgt ccgttctttc cttgtagggt tttcaatcgt 7860
ggggttgagt agtgccacac agcataaaat tagcttggtt tcatgctccg ttaagtcata 7920
gcgactaatc gctagttcat ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattg 7980
gtctaggtga ttttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgat aattactagt 8040
ccttttcctt tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag accttttgctg gaaaactigt 8100
aaatttctgct agaccctctg taaattccgc tagacctttg tgtgtttttt ttgtttatat 8160
tcaagtggtt ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc 8220
cagccctgtg tataactcac tactttagtc agttccgcag tattacaaaa ggatgtcgca 8280
aacgctgttt gctcctctac aaaacagacc ttaaaaccct aaaggcttaa gtagcaccct 8340
cgcaagctcg ggcaaatcgc tgaatattcc ttttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc 8400
gctgtctttt tcgtgacatt cagttcgctg cgctcacggc tctggcagtg aatgggggta 8460
aatggcacta caggcgcctt ttatggattc atgcaaggaa actacccata atacaagaaa 8520
agcccgtcac gggcttctca gggcgtttta tggcgggtct gctatgtggt gctatctgac 8580
ttttgctgt tcagcagttc ctgcccctig atttccagt ctgaccactt cggattatcc 8640
cgtgacaggt cattcagact ggctaatgca cccagtaagg cagcggtatc atcaacaggc 8700
tta 8703

<210> 13
<211> 9371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
tgtaacctit gctttcaaat gagtagaaat aatgcacatc catgtttgta tcgtgcaaat 60
aaagtgtttc atccgtagga aaaaatgact ttagtatctg ttccgctttt tctgatgaaa 120
tgtgctcccc gacaaaattg aatgaatcat ggacatttgc tggctttgat acagcgaaag 180
cagccgttcc tatgttatat atcggattta acagcaggac aaaaaaacacc atgacagcca 240
tcgtcaccca cttattcaca cgcacataaa ccttccttga cttttggaac agatgatagc 300
tcatcaaaaa tcccgccatt gccaaataaa tcgtatatgg cattactgca ccataatctt 360
ttgagatttg attgggatat ggcgcaagca gcaagacaag cagtccgata atcagcgtat 420
aaaataagcc tagtaagatc ttatccgttc tccaatacag cttgaaaaac actacattca 480
acgcaatggg aagagtgatg atgaaaaaca gaaacacgaa tgcaatcggc tccatcccat 540
ccgggtattc cttccaatac gaaaagaaac taaaaatcat ttgtacgatc ggcaaactga 600
caacagcaag gtcgaacgta taaaacttac ccttccgcc atgatcacgc ggcatcagca 660
tatagtgaaa agccgtcagc agcacatatc cgtataacaa aaaatgcagc agcggcagca 720
gttcttttcc gtcctctctt aagtaagcgc tggtgaagtt tgttgattgc acctggtgaa 780
taagttcaac agacactccc gccagcagca caatccgcaa tataacaccc gccaagaaca 840
ttgtgcgctg ccggtttatt ttgggatgat gcaccaaaag atataagccc gccagaacaa 900
caattgacca ttgaatcagc agggtgcttt gtctgcttaa tataaaataa cgttcgaaat 960
gcaatacata atgactgaat aactccaaca cgaacaacaa ctccatttte ttctgctatc 1020
aaaataacag actcgtgatt ttccaaacga gctttcaaaa aagcctctgc ccctigcaaa 1080
tcggatgcct gtctataaaa ttcccgatat tggttaaaca gcggcgcaat ggcggccgca 1140
tctgatgtct ttgcttggcg aatgttcatc ttatttcttc ctccctctca ataatttttt 1200
cattctatcc cttttctgta aagtttattt ttcagaatac ttttatcatc atgcttigaa 1260
aaaatatcac gataatatcc attgttctca cggaagcaca cgcaggtcat ttgaacgaat 1320
tttttcgaca ggaatttgcc gggactcagg agcatttaac ctaaaaaagc atgacatttc 1380
agcataatga acatttactc atgtctattt tcgttctttt ctgtatgaaa atagttattt 1440
cgagtctcta cggaaatagc gagagatgat atacctaaat agagataaaa tcatctcaaa 1500
aaaatgggtc tactaaaata ttattccatc tattacaata aattcacaga atagtctttt 1560
aagtaagtct actctgaatt ttttaaaag gagagggtaa agagtgtcat taccgttctt 1620
aacttctgca ccgggaaagg ttattatttt tggtgaacac tctgctgtgt acaacaagcc 1680
tgccgtcgct gctagtgtgt ctgcgttgag aacctacctg ctaataagcg agtcatctgc 1740
accagatact attgaattgg acttcccgga cattagcttt aatcataagt ggtccatcaa 1800
tgatttcaat gccatcaccg aggatcaagt aaactcccaa aaattggcca aggctcaaca 1860
agccaccgat ggcttgtctc aggaactcgt tagtcttttg gatccgttgt tagctcaact 1920
atccgaatcc ttccactacc atgcagcgtt ttgtttcctg tatatgtttg tttgcctatg 1980
cccccatgcc aagaatatta agttttcttt aaagtctact ttacccatcg gtgctgggtt 2040
gggctcaagc gcctctattt ctgtatcact ggccttagct atggcctact tgggggggtt 2100
aataggatct aatgacttgg aaaagctgtc agaaaacgat aagcatatag tgaatcaatg 2160
ggccttcata ggtgaaaagt gtatticacgg taccccttca ggaatagata acgctgtggc 2220
cacttatggt aatgccctgc tatttgaaaa agactcacat aatggaacaa taaacacaaa 2280
caattttaag ttcttagatg atttcccagc cattccaatg atcctaacct atactagaat 2340
tccaaggtct acaaaagatc ttgttgctcg cgttcgtgtg ttggtcaccg agaaatttcc 2400
tgaagttatg aagccaattc tagatgccat gggtgaatgt gccctacaag gcttagagat 2460
catgactaag ttaagtaaat gtaaaggcac cgatgacgag gctgtagaaa ctaataatga 2520
actgtatgaa caactattgg aattgataag aataaatcat ggactgcttg tctcaatcgg 2580
tgtttctcat cctggattag aacttattaa aaatctgagc gatgatttga gaattggctc 2640
cacaaaactt accggtgctg gtggcggcgg ttgctctttg actttgttac gaagagacat 2700
tactcaagag caaattgaca gcttcaaaaa gaaattgcaa gatgatttta gttacgagac 2760
atttgaaaca gacttgggtg ggactggctg ctgtttgtta agcgcaaaaa atttgaataa 2820
agatcttaaa atcaaatccc tagtatttca attatttgaa aataaaacta ccacaaagca 2880
acaaattgac gatctattat tgccaggaaa cacgaatttа ccatggactt cataaaagga 2940
gagggtgtca gagttgagag ccttcagtgc cccagggaaa gcgttactag ctggtggata 3000
tttagttita gatacaaaat atgaagcatt tgtagtcgga ttatcggcaa gaatgcatgc 3060
tgtagcccat ccttacggtt cattgcaagg gtctgataag tttgaagtgc gtgtgaaaag 3120
taaacaattt aaagatgggg agtggctgta ccatataagt cctaaaagtg gcttcattcc 3180
tgtttcgata ggcggatcta agaaccctit cattgaaaaa gttatcgcta acgtatttag 3240
ctactttaaa cctaacatgg acgactactg caatagaaac ttgttcgtta ttgatatttt 3300
ctctgatgat gcctaccatt ctcaggagga tagcgttacc gaacatcgtg gcaacagaag 3360
attgagtttt cattcgcaca gaattgaaga agttcccaaa acagggctgg gctcctcggc 3420
aggtttagtc acagttttaa ctacagcttt ggcctccttt tttgtatcgg acctggaaaa 3480
taatgtagac aaatatagag aagttattca taatttagca caagttgctc attgtcaagc 3540
tcagggtaaa attggaagcg ggtttgatgt agcggcggca gcatatggat ctatcagata 3600
tagaagattc ccacccgcat taatctctaa tttgccagat attggaagtg ctacttacgg 3660
cagtaaactg gcgcatttgg ttgatgaaga agactggaat attacgatta aaagtaacca 3720
tttaccttcg ggattaactt tatggatggg cgatattaag aatggttcag aaacagtaaa 3780
actggtccag aaggtaaaaa attggtatga ttcgcatatg ccagaaagct tgaaaatata 3840
tacagaactc gatcatgcaa attctagatt tatggatgga ctatctaaac tagatcgctt 3900
acacgagact catgacgatt acagcgatca gatatttgag tctcttgaga ggaatgactg 3960

tacctgtcaa aagtatcctg aaatcacaga agttagagat gcagttgcca caattagacg 4020
ttcctttaga aaaataacta aagaatctgg tgccgatatc gaacctcccg tacaaactag 4080
cttattggat gattgccaga ccttaaaagg agttcttact tgcttaatac ctggtgctgg 4140
tggttatgac gccattgcag tgattactaa gcaagatgtt gatcttaggg ctcaaaccgc 4200
taatgacaaa agatttttcta aggttcaatg gctggatgta actcaggctg actggggtgt 4260
taggaaagaa aaagatccgg aaacttatct tgataaataa aaggagaggg tgaccgttta 4320
cacagcatcc gttaccgcac ccgtcaacat cgcaacccct aagtattggg ggaaaagggga 4380
cacgaagttg aatctgccca ccaattcgtc catatcagtg actttatcgc aagatgacct 4440
cagaacgttg acctctgcgg ctactgcacc tgagtttgaa cgcgacactt tgtggttaaa 4500
tggagaacca cacagcatcg acaatgaaag aactcaaaat tgtctgcgcg acctacgcca 4560
attaagaaag gaaatggaat cgaaggacgc ctcattgccc acattatctc aatggaaact 4620
ccacattgtc tccgaaaata actttcctac agcagctggt ttagcttcct ccgctgctgg 4680
ctttgctgca ttggtctctg caattgctaa gttataccaa ttaccacagt caacttcaga 4740
aatatctaga atagcaagaa aggggtctgg ttcagcttgt agatcgttgt ttggcggata 4800
cgtggcctgg gaaatgggaa aagctgaaga tggtcatgat tccatggcag tacaaatcgc 4860
agacagctct gactggcctc agatgaaagc ttgtgtccta gttgtcagcg atattaaaaa 4920
ggatgtgagt tccactcagg gtatgcaatt gaccgtggca acctccgaac tatttaaaga 4980
aagaattgaa catgtcgtac caaagagatt tgaagtcatg cgtaaagcca ttgttgaaaa 5040
agatttcgcc acctttgcaa aggaaacaat gatggattcc aactctttcc atgccacatg 5100
tttggactct ttcctccaa tattctacat gaatgacact tccaagcgta tcatcagttg 5160
gtgccacacc attaatcagt tttacggaga aacaatcgtt gcatacacgt ttgatgcagg 5220
tccaaatgct gtgttgtact acttagctga aaatgagtcg aaactctttg catttatcta 5280
taaattgttt ggctctgttc ctggatggga caagaaattt actactgagc agcttgaggc 5340
tttcaaccat caatttgaat catctaactt tactgcacgt gaattggatc ttgagttgca 5400
aaaggatgtt gccagagtga ttttaactca agtcggttca ggcccacaag aaacaaacga 5460
atctttgatt gacgcaaaga ctggtctacc aaaggaataa aaggagaggg tgactgccga 5520
caacaatagt atgccccatg gtgcagtatc tagttacgcc aaattagtgc aaaaccaaac 5580
acctgaagac attttggaag agtttcctga aattattcca ttacaacaaa gacctaatac 5640
ccgatctagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tgtttttctg gtcatgatga 5700
ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattg tattgttttg gattgggacg ataatgctat 5760
tggtgccggt accaagaaag tttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg gtttactaca 5820
tcgtgcattc tccgtctttta ttttcaatga acaaggtgaa ttacttttac aacaaagagc 5880
cactgaaaaa ataactttcc ctgatctttg gactaacaca tgctgctctc atccactatg 5940
tattgatgac gaattaggtt tgaagggtaa gctagacgat aagattaagg gcgctattac 6000
tgcggcggtg agaaaactag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa ctaagacaag 6060
gggtaagttt cacttttaa acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg aaccatgggg 6120
tgaacatgaa attgattaca tcctatttta taagatcaac gctaaagaaa acttgactgt 6180
caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaatg atttgaaaac 6240
tatgtttgct gacccaagtt acaagtttac gccttggttt aagattattt gcgagaatta 6300
cttattcaac tggtgggagc aattagatga cctttctgaa gtggaaaatg acaggcaaat 6360
tcatagaatg ctataaaaaa aaccggcctt ggccccgccg gttttttatt attttctttc 6420
ctccgcatgt tcaatccgct ccataatcga cggatggctc cctctgaaaa ttttaacgag 6480
aaacggcggg ttgacccggc tcagtcccgt aacggccaag tcctgaaacg tctcaatcgc 6540
cgcttcccgg tttccggtca gctcaatgcc gtaacggtcg gcggcgtttt cctgataccg 6600
ggagacggca ttcgtaattt gaatacatac gaacaaatta ataaagtgaa aaaaatactt 6660
cggaaacatt taaaaaataa ccttattggt acttacatgt ttggatcagg agttgagagt 6720
ggactaaaac caaatagtga tcttgacttt ttagtcgtcg tatctgaacc attgacagat 6780
caaagtaaag aaatacttat acaaaaaatt agacctattt caaaaaaaat aggagataaa 6840
agcaacttac gatatattga attaacaatt attattcagc aagaaatggt accgtggaat 6900
catcctccca aacaagaatt tatttatgga gaatggttac aagagcttta tgaacaagga 6960
tacattcctc agaaggaatt aaattcagat ttaaccataa tgctttacca agcaaaacga 7020
aaaaataaaa gaatatacgg aaattatgac ttagaggaat tactacctga tattccattt 7080
tctgatgtga gaagagccat tatggattcg tcagaggaat taatagataa ttatcaggat 7140
gatgaaacca actctatatt aactttatgc cgtatgattt taactatgga cacgggtaaa 7200
atcataccaa aagatattgc gggaaatgca gtggctgaat cttctccatt agaacatagg 7260
gagagaattt tgttagcagt tcgtagttat cttggagaga atattgaatg gactaatgaa 7320
aatgtaaatt taactataaa ctatttaaat aacagattaa aaaaattata atgtaacctt 7380
tgctttcaaa tgagtagaaa taatgcacat ccatgtttgt atcgtgcaaa taaagtgttt 7440
catccgtagg aaaaaatgac tttagtatct gttccgcttt ttctgatgaa atgtgctccc 7500
cgacaaaatt gaatgaatca tggacatttg ctggctttga tacagcgaaa gcagccgttc 7560
ctatgttata tatcggattt aacagcagga caaaaaacac catgacagcc atcgtcaccc 7620
acttattcac acgcacataa acctttcctg acttttggaa cagatgatag ctcatcaaaa 7680
atcccgccat tgccaaataa atcgtatatg gcattactgc accataatct tttgagattt 7740
gattgggata tggcgcaagc agcaagacaa gcagtccgat aatcagcgta taaaataagc 7800
ctagtaagat cttatccgtt ctccaataca gcttgaaaaa cactacattc aacgcaatgg 7860
gaagagtgat gatgaaaaac agaaacacga atgcaatcgg ctccatccca tccgggtatt 7920
cctccaata cgaaaagaaa ctaaaaatca tttgtacgat cggcaaactg acaacagcaa 7980
ggtcgaacgt ataaaactta ccctttccgc catgatcacg cggcatcagc atatagtgaa 8040
aagccgtcag cagcacatat ccgtataaca aaaaatgcag cagcggcagc agttctttc 8100
cgtcctctct taagtaagcg ctggtgaagt ttgttgattg cacctggtga ataagttcaa 8160
cagacactcc cgccagcagc acaatccgca atataacacc cgccaagaac attgtgcgct 8220
gccggtttat tttgggatga tgcaccaaaa gatataagcc cgccagaaca acaattgacc 8280
attgaatcag cagggtgctt tgtctgctta atataaaata acgttcgaaa tgcaatacat 8340
aatgactgaa taactccaac acgaacaaca aaagtgcgca ttttataaaa gctaatgatt 8400
cagtccacat aattgataga cgaattctgc tacaggtcac gtggctatgt gaaggatcgc 8460
gcgtccagtt aagagcaaaa acattgacaa aaaaatttat ttatgctaaa atttactatt 8520
aatatatttg tatgtataat aagattctcc tggccagggg aatcttattt tttgtggagg 8580
atcatttcat gaggaaaaat gagtccagct taacgtctct aatttcagct tttgcccgtg 8640

catatcacag ccgatatgac acacctctta ttttgatga ttttatcgca aaagatctca 8700
ttaacgaaaa agagtttatc gacatcagta aaaatatgat tcaagaaata tcgtttttca 8760
acaaagagat cgccgaacgt cttcaaaatg atcctgaaaa aatattaaaa tgggttgcac 8820
aaatccagct gtctccaacg cccctagcac gtgcttctta ttgtgaaaaa gtcttgcaca 8880
acgaattaat cctgggggca aaacagtatg tcattcttgg agcgggactg gatactttct 8940
gctttcggca tccagaatta gaaaacagct tacaggtttt cgaggttgat catccggcca 9000
cacagcaatt gaaaaaaaat aagctgaagg atgcaaatct gacaattccg ggtcatcttc 9060
attttgttcc tatggatttc accaaaacgt tttcgtatga tcctctctta gatgaaggat 9120
ttaaaaacac aaaaacattc ttcagccttc tcggagtgtc ttattatgta acacgggaag 9180
aaaatgcaag cttgatcagc aatttatttt ctcatgtccc gcctggaagc tctattgttt 9240
ttgattatgc ggacgaaaca cttttacag caaaagggac gtcgaatcga gttgaacata 9300
tggtgaagat ggctgccgca agcggggaac cgatgaaatc atgtttcact tatcaagaga 9360
ttgaacatct g 9371

<210> 14
<211> 4339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 14
tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat tcatatcagg attatcaata 60
ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa actcaccgag gcagttccat 120
aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc gtccaacatc aatacaacct 180
attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga aatcaccatg agtgacgact 240
gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc agacttgttc aacaggccag 300
ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac cgttattcat tcgtgattgc 360
gcctgagcga ggcgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac aattacaaac aggaatcgag 420
tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat tttcacctga atcaggatat 480
tcttctaata cctggaacgc tgttttccg gggatcgcag tggtgagtaa ccatgcatca 540
tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagtggca taaattccgt cagccagttt 600
agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac ctttgccatg tttcagaaac 660
aactctggcg catcgggctt cccatacaag cgatagattg tcgcacctga ttgcccgaca 720
ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca tgttggaatt taatcgcggc 780
ctcgacgttt cccgttgaat atggctcata ttcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt 840
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa 900
ataggggtca gtgttacaac caattaacca attctgaaca ttatcgcgag cccatttata 960
cctgaatatg gctcataaca ccccttgttt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc 1020
tgaccccatg ccgaactcag aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggactcc 1080
ccatgcgaga gtagggaact gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact 1140
gggcctttcg cccgggctaa ttagggggtg tcgcccttta gtcgctgaac atgtgctctg 1200
tttctaccga gaacgtttcc ttcactgaga cggaaaccga ggcacgtcgt agcgcgaact 1260
acgagccgaa tagctgggac tacgatttcc tgctgtcttc cgatactgac gaatctattg 1320
aggtgtacaa agacaaagca aagaaactgg aggctgaagt gcgccgcgaa attaacaacg 1380
agaaagctga attcctgact ctgctggagc tgatcgataa cgtacagcgc ctgggtctgg 1440
gttaccgctt cgaatctgat atccgtcgcg cactggatcg tttcgtaagc agcggcggtt 1500
tcgatggcgt gaccaaaacg agcctgcacg ctaccgcgct gtccttccgt ctgctgcgtc 1560
agcacggctt cgaagtttct caggaagcat tctccggttt caaagatcaa aacggtaact 1620
tcctggaaaa cctgaaagaa gacactaagg cgatcctgag cctgtatgag gcaagctttc 1680
tggccctgga gggtgagaac atcctggatg aggcgcgcgt attcgccatc tcccatctga 1740
aagagctgtc tgaagagaaa atcggtaagg aactggcaga gcaggttaat cacgcactgg 1800
aactgccgct gcatcgtcgt acccagcgtc tggaggcggt ttggtccatc gaagcgtacc 1860
gcaaaaagga ggatgctaac caggttctgc tggaactggc catcctggac tacaacatga 1920
tccagtccgt ttaccagcgt gatctgcgtg aaacctcccg ttggtggcgc cgtgtgggcc 1980
tggcgaccaa actgcacttc gctaaggacc gcctgattga gtctttttac tgggcagtcg 2040
gcgttgcgtt cgaacctcag tattctgact gccgtaacag cgttgcgaaa atgttcagct 2100
tcgttactat tatcgacgac atctacgacg tttacggtac tctggacgag ctggaactgt 2160
ttaccgacgc tgtcgaacgt tgggatgtta acgccatcaa cgatctgcct gactacatga 2220
aactgtgctt cctggcactg tataacacga tcaacgaaat tgcatacgac aacctgaaag 2280
acaaaggtga aaacatcctg ccgtacctga ctaaagcgtg ggcggatctg tgtaacgctt 2340
ttctgcaaga agcgaaatgg ctgtataaca aatccactcc gaccttgac gattatttcg 2400
gcaatgcctg gaaatccagc tctggcccgc tgcaactgat cttcgcttat tttgcggttg 2460
tccaaaacat caaaaaggag gaaattgaaa acctgcaaaa ataccacgat atcattagcc 2520
gtccttctca tatctttcgc ctgtgcaacg acctggcaag cgcgtccgca gagatcgcac 2580
gtggcgaaac cgctaactct gtttcctgct acatgcgcac caagggcatt tccgaagagc 2640
tggcaaccga gagcgtaatg aatctgatcg acgaaacctg taagaaaatg aacaaagaaa 2700
aactgggtgg ctccctgttc gctaaaccgt tcgtagagac tgctattaac ctggcacgtc 2760
agagccactg cacctaccac aatggtgacg cacatactag cccggatgaa ctgactcgta 2820
aacgtgtact gtctgttatc accgaaccga ttctgccgtt cgaacgttaa ctgcagcgtc 2880
aatcgaaagg gcgacacaaa atttatttcta aatgcataat aaatactgat aacatcttat 2940
agtttgtatt atattttgta ttatcgttga catgtataat tttgatatca aaaactgatt 3000
ttccctttat tatttttcgag atttatttttc ttaatttctct ttaacaaact agaaatattg 3060
tatatacaaa aaatcataaa taatagatga atagtttaat tataggtgtt catcaatcga 3120
aaaagcaacg tatcttatti aaagtgcgtt gctttttttct catttataag gttaaataat 3180

tctcatatat caagcaaagt gacaggcgcc cttaaatatt ctgacaaatg ctctttccct 3240
aaactccccc cataaaaaaa cccgccgaag cgggttttta cgttatttgc ggattaacga 3300
ttactcgtta tcagaaccgc ccagggggcc cgagcttaag actggccgtc gttttacaac 3360
acagaaagag tttgtagaaa cgcaaaaagg ccatccgtca ggggccttct gcttagtttg 3420
atgcctggca gttccctact ctcgccttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg 3480
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 3540
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 3600
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccccctga cgagcatcac 3660
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 3720
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 3780
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 3840
ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 3900
cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 3960
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 4020
gctacagagt tcttgaagtg gtgggctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggt 4080
atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 4140
aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 4200
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 4260
gacgcgcgcg taactcacgt taagggattt tggtcatgag cttgcgccgt cccgtcaagt 4320
cagcgtaatg ctctgcttt 4339

<210> 15
<211> 6065
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttatttatta 360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatgtgctc 420
tgtttctacc gagaacgttt ccttcactga gacggaaacc gaggcacgtc gtagcgcgaa 480
ctacgagccg aatagctggg actacgattt cctgctgtct tccgatactg acgaatctat 540
tgaggtgtac aaagacaaag caaagaaact ggaggctgaa gtgcgccgcg aaattaacaa 600
cgagaaagct gaattcctga ctctgctgga gctgatcgat aacgtacagc gcctgggtct 660
gggttaccgc ttcgaatctg atatccgtcg cgcactggat cgtttcgtaa gcagcggcgg 720
tttcgatggc gtgaccaaaa cgagcctgca cgctaccgcg ctgtccttcc gtctgctgcg 780
tcagcacggc ttcgaagttt ctcaggaagc attctccggt ttcaaagatc aaaacggtaa 840
cttcctggaa aacctgaaag aagacactaa ggcgatcctg agcctgtatg aggcaagctt 900
tctggccctg gagggtgaga acatcctgga tgaggcgcgc gtattcgcca tctcccatct 960
gaaagagctg tctgaagaga aaatcggtaa ggaactggca gagcaggtta atcacgcact 1020
ggaactgccg ctgcatcgtc gtacccagcg tctggaggcg gtttggtcca tcgaagcgta 1080
ccgcaaaaag gaggatgcta accaggttct gctggaactg gccatcctgg actacaacat 1140
gatccagtcc gtttaccagc gtgatctgcg tgaaacctcc cgttggtggc gccgtgtggg 1200
cctggcgacc aaactgcact tcgctaagga ccgcctgatt gagtcttttt actgggcagt 1260
cggcgttgcg ttcgaacctc agtatttctga ctgccgtaac agcgttgcga aaatgttcag 1320
cttcgttact attatcgacg acatctacga cgtttacggt actctggacg agctggaact 1380
gtttaccgac gctgtcgaac gttgggatgt taacgccatc aacgatctgc ctgactacat 1440
gaaactgtgc ttcctggcac tgtataacac gatcaacgaa attgcatacg acaacctgaa 1500
agacaaaggt gaaaacatcc tgccgtacct gactaaagcg tgggcggatc tgtgtaacgc 1560
ttttctgcaa gaagcgaaat ggctgtataa caaatccact ccgacctttg acgattattt 1620
cggcaatgcc tggaaatcca gctctggccc gctgcaactg atcttcgctt attttgcggt 1680
tgtccaaaac atcaaaaagg aggaaattga aaacctgcaa aaataccacg atatcattag 1740
ccgtccttct catatctttc gcctgtgcaa cgacctggca agcgcgtccg cagagatcgc 1800
acgtggcgaa accgctaact ctgtttcctg ctacatgcgc accaagggca tttccgaaga 1860
gctggcaacc gagagcgtaa tgaatctgat cgacgaaacc tgtaagaaaa tgaacaaaga 1920
aaaactgggt ggctccctgt tcgctaaacc gttcgtagag actgctatta acctggcacg 1980
tcagagccac tgcacctacc acaatggtga cgcacatact agcccggatg aactgactcg 2040
taaacgtgta ctgtctgtta tcaccgaacc gattctgccg ttcgaacgtt aactgcagct 2100
ggtaccatat gggaattcga agctttctag aacaaaaact catctcagaa gaggatctga 2160
atagcgccgt cgaccatcat catcatcatc attgagttta aacggtctcc agcttggctg 2220
ttttggcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg 2280
tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc 2340
gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg gggtctcccc atgcgagagt 2400
agggaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gccttttcgtt 2460
ttatctgttg tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt 2520
tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcca taaactgcca 2580
ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc 2640
ttttttgttta ttttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 2700
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 2760
ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt 2820
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct 2880

caacagcggt aagatcctig agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac 2940
ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact 3000
cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 3060
gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 3120
taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 3180
tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 3240
agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 3300
caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 3360
ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 3420
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc 3480
agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 3540
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 3600
agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 3660
gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc 3720
gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttti 3780
tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 3840
gccggatcaa gagctaccaa ctcttttttc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 3900
accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 3960
accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 4020
gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 4080
ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 4140
atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag 4200
gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 4260
cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 4320
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 4380
gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 4440
tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 4500
cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggt attttctcct 4560
tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga 4620
tgccgcatag ttaagccagt atacactccg ctatcgctac gtgactgggt catggctgcg 4680
ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 4740
gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca 4800
tcaccgaaac gcgcgaggca gcagatcaat tcgcgcgcga aggcgaagcg gcatgcattt 4860
acgttgacac catcgaatgg tgcaaaacct ttcgcggtat ggcatgatag cgcccggaag 4920
agagtcaatt cagggtggtg aatgtgaaac cagtaacgtt atacgatgtc gcagagtatg 4980
ccggtgtctc ttatcagacc gtttcccgcg tggtgaacca ggccagccac gtttctgcga 5040
aaacgcggga aaaagtggaa gcggcgatgg cggagctgaa ttacattccc aaccgcgtgg 5100
cacaacaact ggcgggcaaa cagtcgttgc tgattggcgt tgccacctcc agtctggccc 5160
tgcacgcgcc gtcgcaaatt gtcgcggcga ttaaatctcg cgccgatcaa ctgggtgcca 5220
gcgtggtggt gtcgatggta gaacgaagcg gcgtcgaagc ctgtaaagcg gcggtgcaca 5280
atcttctcgc gcaacgcgtc agtgggctga tcattaacta tccgctggat gaccaggatg 5340
ccattgctgt ggaagctgcc tgcactaatg ttccggcgtt atttcttgat gtctctgacc 5400
agacacccat caacagtatt attttctccc atgaagacgg tacgcgactg ggcgtggagc 5460
atctggtcgc attgggtcac cagcaaatcg cgctgttagc gggcccatta agttctgtct 5520
cggcgcgtct gcgtctggct ggctggcata aatatctcac tcgcaatcaa attcagccga 5580
tagcggaacg ggaaggcgac tggagtgcca tgtccggttt tcaacaaacc atgcaaatgc 5640
tgaatgaggg catcgttccc actgcgatgc tggttgccaa cgatcagatg gcgctgggcg 5700
caatgcgcgc cattaccgag tccgggctgc gcgttggtgc ggatatctcg gtagtgggat 5760
acgacgatac cgaagacagc tcatgttata tcccgccgtc aaccaccatc aaacaggatt 5820
ttcgcctgct ggggcaaacc agcgtggacc gcttgctgca actctctcag ggccaggcgg 5880
tgaagggcaa tcagctgttg cccgtctcac tggtgaaaag aaaaaccacc ctggcgccca 5940
atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 6000
tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gcgcgaattg 6060
atctg 6065

<210> 16
<211> 6912
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 16
ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg 60
tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag cagatcaatt cgcgcgcgaa 120
ggcgaagcgg catgcattta cgttgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tcgcggtatg 180
gcatgatagc gcccggaaga gagtcaattc agggtggtga atgtgaaacc agtaacgtta 240
tacgatgtcg cagagtatgc cggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag 300
gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat 360
tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcgtt 420
gccacctcca gtctggccct gcacgcgccg tcgcaaattg tcgcggcgat taaatctcgc 480
gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc 540
tgtaaagcgg cggtgcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat 600
ccgctggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt tccggcgtta 660
tttcttgatg tctctgacca gacacccatc aacagtatta tttctcccat tgaagacggt 720

acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg 780
ggcccattaa gttctgtctc ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact 840
cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat gtccggtttt 900
caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac 960
gatcagatgg cgctgggcgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg 1020
gatatctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgtca 1080
accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa 1140
ctctctcagg gccaggcggt gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga 1200
aaaaccaccc tggcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta 1260
atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa 1320
tgtgagttag cgcgaattga tctggtttga cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa 1380
tgcttctggc gtcaggcagc catcggaagc tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac 1440
tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgaca 1500
tcataacggt tctggcaaat attctgaaat gagctgttga caattaatca tccggctcgt 1560
ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcgc cgctgagaaa 1620
aagcgaagcg gcactgctct ttaacaattt atcagacaat ctgtgtgggc actcgaccgg 1680
aattatcgat taactttatt attaaaaatt aaagaggtat atattaatgt atcgattaaa 1740
taaggaggaa taaaccatgt gtgcgacctc ttctcaattt actcagatta ccgagcataa 1800
ttcccgtcgt tccgcaaact atcagccaaa cctgtggaat ttcgaattcc tgcaatccct 1860
ggagaacgac ctgaaagtgg aaaagctgga ggagaaagcg accaaactgg aggaagaagt 1920
tcgctgcatg atcaaccgtg tagacaccca gccgctgtcc ctgctggagc tgatcgacga 1980
tgtgcagcgc ctgggtctga cctacaaatt tgaaaaagac atcattaaag ccctggaaaa 2040
catcgtactg ctggacgaaa acaaaaagaa caaatctgac ctgcacgcaa ccgctctgtc 2100
tttccgtctg ctgcgtcagc acggtttcga ggtttctcag gatgtttttg agcgtttcaa 2160
ggataaagaa ggtggtttca gcggtgaact gaaaggtgac gtccaaggcc tgctgagcct 2220
gtatgaagcg tcttacctgg gtttcgaggg tgagaacctg ctggaggagg cgcgtacctt 2280
ttccatcacc cacctgaaga acaacctgaa agaaggcatt aataccaagg ttgcagaaca 2340
agtgagccac gccctggaac tgccatatca ccagcgtctg caccgtctgg aggcacgttg 2400
gttcctggat aaatacgaac cgaaagaacc gcatcaccag ctgctgctgg agctggcgaa 2460
gctggatttt aacatggtac agaccctgca ccagaaagag ctgcaagatc tgtcccgctg 2520
gtggaccgag atgggcctgg ctagcaaact ggattttgta cgcgaccgcc tgatggaagt 2580
ttatttctgg gcactgggta tggcgccaga cccgcagttt ggtgaatgtc gcaaagctgt 2640
tactaaaatg tttggtctgg tgacgatcat cgatgacgtg tatgacgttt atggcactct 2700
ggacgaactg caactgttca ccgatgctgt agagcgctgg gacgttaacg ctattaacac 2760
cctgccggac tatatgaaac tgtgtttcct ggcactgtac aacaccgtta acgacacgtc 2820
ctattctatt ctgaaagaga aaggtcataa caacctgtcc tatctgacga aaagctggcg 2880
tgaactgtgc aaagccttic tgcaagaggc gaaatggtcc aacaacaaaa ttatcccggc 2940
tttctccaag tacctggaaa acgccagcgt ttcctcctcc ggtgtagcgc tgctggcgcc 3000
gtcttacttt tccgtatgcc agcagcagga agacatctcc gaccacgcgc tgcgttccct 3060
gaccgacttc catggtctgg tgcgttctag ctgcgttatc ttccgcctgt gcaacgatct 3120
ggccacctct gcggcggagc tggaacgtgg cgagactacc aattctatca ttagctacat 3180
gcacgaaaac gatggtacca gcgaggaaca ggcccgcgaa gaactgcgta aactgatcga 3240
cgccgaatgg aaaaagatga atcgtgaacg cgttagcgac tccaccctgc tgcctaaagc 3300
gttcatggaa atcgcagtta acatggcacg tgtttcccac tgcacctacc agtatggcga 3360
tggtctgggt cgcccagact acgcgactga aaaccgcatc aaactgctgc tgattgaccc 3420
tttcccgatt aaccagctga tgtatgtcta actgcatcgc ccttaggagg taaaaaaaaa 3480
tgactgccga caacaatagt atgccccatg gtgcagtatc tagttacgcc aaattagtgc 3540
aaaaccaaac acctgaagac attttggaag agtttcctga aattattcca ttacaacaaa 3600
gacctaatac ccgatctagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tgttttctg 3660
gtcatgatga ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattg tattgttttg gattgggacg 3720
ataatgctat tggtgccggt accaagaaag tttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg 3780
gtttactaca tcgtgcattc tccgtctttа ttttcaatga acaaggtgaa ttactttac 3840
aacaaagagc cactgaaaaa ataactttcc ctgatctttg gactaacaca tgctgctctc 3900
atccactatg tattgatgac gaattaggtt tgaagggtaa gctagacgat aagattaagg 3960
gcgctattac tgcggcggtg agaaaactag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa 4020
ctaagacaag gggtaagttt cacttttaa acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg 4080
aaccatgggg tgaacatgaa attgattaca icctatttta taagatcaac gctaaagaaa 4140
acttgactgt caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaatg 4200
atttgaaaac tatgtttgct gacccaagtt acaagtttac gccttggttt aagattattt 4260
gcgagaatta cttattcaac tggtgggagc aattagatga cctttctgaa gtggaaaatg 4320
acaggcaaat tcatagaatg ctataacaac gcgtcctgca gctggtacca tatgggaatt 4380
cgaagcttic tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat 4440
catcatcatc atcattgagt ttaaacggtc tccagcttgg ctgttttggc ggatgagaga 4500
agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag cggtctgata aaacagaatt 4560
tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtcccac ctgaccccat gccgaactca gaagtgaaac 4620
gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc cccatgcgag agtagggaac tgccaggcat 4680
caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggccttic gttttatctg ttgtttgtcg 4740
gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa 4800
cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg ccataaactg ccaggcatca aattaagcag 4860
aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa ctcttttgt ttatttttct 4920
aaatacattc aaatatgtat ccgcttaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 4980
ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttctcg ccgccaagga tctgatggcg 5040
caggggatca agctctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga 5100
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 5160
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 5220
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcaag acgaggcagc 5280
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 5340
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 5400

tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 5460
gcttgatccg gctacctgcc catccgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg 5520
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 5580
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg aggatctcgt 5640
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg 5700
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 5760
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 5820
tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 5880
acatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 5940
agatcaaagg atcttcttga gatcctttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 6000
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc 6060
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 6120
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc 6180
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 6240
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 6300
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 6360
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 6420
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 6480
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 6540
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc ctttgctgg ccttttgctc 6600
acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 6660
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag 6720
cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 6780
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc 6840
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc 6900
gccctgacgg gc 6912

<210> 17
<211> 7902
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 17
ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg 60
tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag cagatcaatt cgcgcgcgaa 120
ggcgaagcgg catgcattta cgttgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tcgcggtatg 180
gcatgatagc gcccggaaga gagtcaattc agggtggtga atgtgaaacc agtaacgtta 240
tacgatgtcg cagagtatgc cggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag 300
gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat 360
tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcgtt 420
gccacctcca gtctggccct gcacgcgccg tcgcaaattg tcgcggcgat taaatctcgc 480
gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc 540
tgtaaagcgg cggtgcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat 600
ccgctggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt tccggcgtta 660
tttcttgatg tctctgacca gacacccatc aacagtatta ttttctccca tgaagacggt 720
acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg 780
ggcccattaa gttctgtctc ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact 840
cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat gtccggtttt 900
caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac 960
gatcagatgg cgctgggcgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg 1020
gatatctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgtca 1080
accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa 1140
ctctctcagg gccaggcggt gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga 1200
aaaaccaccc tggcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta 1260
atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa 1320
tgtgagttag cgcgaattga tctggtttga cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa 1380
tgcttctggc gtcaggcagc catcggaagc tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac 1440
tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgaca 1500
tcataaccgt tctggcaaat attctgaaat gagctgttga caattaatca tccggctcgt 1560
ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcgc cgctgagaaa 1620
aagcgaagcg gcactgctct ttaacaattt atcagacaat ctgtgtgggc actcgaccgg 1680
aattatcgat taactttatt attaaaaatt aaagaggtat atattaatgt atcgattaaa 1740
taaggaggaa taaaccatgt gtgcgacctc ttctcaattt actcagatta ccgagcataa 1800
ttcccgtcgt tccgcaaact atcagccaaa cctgtggaat ttcgaattcc tgcaatccct 1860
ggagaacgac ctgaaagtgg aaaagctgga ggagaaagcg accaaactgg aggaagaagt 1920
tcgctgcatg atcaaccgtg tagacaccca gccgctgtcc ctgctggagc tgatcgacga 1980
tgtgcagcgc ctgggtctga cctacaaatt tgaaaaagac atcattaaag ccctggaaaa 2040
catcgtactg ctggacgaaa acaaaaagaa caaatctgac ctgcacgcaa ccgctctgtc 2100
tttccgtctg ctgcgtcagc acggtttcga ggtttctcag gatgtttttg agcgtttcaa 2160
ggataaagaa ggtggtttca gcggtgaact gaaaggtgac gtccaaggcc tgctgagcct 2220
gtatgaagcg tcttacctgg gtttcgaggg tgagaacctg ctggaggagg cgcgtacctt 2280
ttccatcacc cacctgaaga acaacctgaa agaaggcatt aataccaagg ttgcagaaca 2340
agtgagccac gccctggaac tgccatatca ccagcgtctg caccgtctgg aggcacgttg 2400

gttcctggat aaatacgaac cgaaagaacc gcatcaccag ctgctgctgg agctggcgaa 2460
gctggatttt aacatggtac agaccctgca ccagaaagag ctgcaagatc tgtcccgctg 2520
gtggaccgag atgggcctgg ctagcaaact ggattttgta cgcgaccgcc tgatggaagt 2580
ttatttctgg gcactgggta tggcgccaga cccgcagttt ggtgaatgtc gcaaagctgt 2640
tactaaaatg tttggtctgg tgacgatcat cgatgacgtg tatgacgttt atggcactct 2700
ggacgaactg caactgttca ccgatgctgt agagcgctgg gacgttaacg ctattaacac 2760
cctgccggac tatatgaaac tgtgtttcct ggcactgtac aacaccgtta acgacacgtc 2820
ctatttctatt ctgaaagaga aaggtcataa caacctgtcc tatctgacga aaagctggcg 2880
tgaactgtgc aaagccttic tgcaagaggc gaaatggtcc aacaacaaaa ttatcccggc 2940
tttctccaag tacctggaaa acgccagcgt ttcctcctcc ggtgtagcgc tgctggcgcc 3000
gtcttacttt tccgtatgcc agcagcagga agacatctcc gaccacgcgc tgcgttccct 3060
gaccgacttc catggtctgg tgcgttctag ctgcgttatc ttccgcctgt gcaacgatct 3120
ggccacctct gcggcggagc tggaacgtgg cgagactacc aattctatca ttagctacat 3180
gcacgaaaac gatggtacca gcgaggaaca ggcccgcgaa gaactgcgta aactgatcga 3240
cgccgaatgg aaaaagatga atcgtgaacg cgttagcgac tccaccctgc tgcctaaagc 3300
gttcatggaa atcgcagtta acatggcacg tgtttcccac tgcacctacc agtatggcga 3360
tggtctgggt cgcccagact acgcgactga aaaccgcatc aaactgctgc tgattgaccc 3420
tttcccgatt aaccagctga tgtatgtcta actgcattcg cccttaggag gtaaaaaaac 3480
atgagttttg atattgccaa atacccgacc ctggcactgg tcgactccac ccaggagtta 3540
cgactgttgc cgaaagagag tttaccgaaa ctctgcgacg aactgcgccg ctatttactc 3600
gacagcgtga gccgttccag cgggcacttc gcctccgggc tgggcacggt cgaactgacc 3660
gtggcgctgc actatgtcta caacaccccg tttgaccaat tgatttggga tgtggggcat 3720
caggcttatc cgcataaaat tttgaccgga cgccgcgaca aaatcggcac catccgtcag 3780
aaaggcggtc tgcacccgtt cccgtggcgc ggcgaaagcg aatatgacgt attaagcgtc 3840
gggcattcat caacctccat cagtgccgga attggtattg cggttgctgc cgaaaaagaa 3900
ggcaaaaatc gccgcaccgt ctgtgtcatt ggcgatggcg cgattaccgc aggcatggcg 3960
tttgaagcga tgaatcacgc gggcgatatc cgtcctgata tgctggtgat tctcaacgac 4020
aatgaaatgt cgatttccga aaatgtcggc gcgctcaaca accatctggc acagctgctt 4080
tccggtaagc tttactcttc actgcgcgaa ggcgggaaaa aagttttctc tggcgtgccg 4140
ccaattaaag agctgctcaa acgcaccgaa gaacatatta aaggcatggt agtgcctggc 4200
acgttgtttg aagagctggg ctttaactac atcggcccgg tggacggtca cgatgtgctg 4260
gggcttatca ccacgctaaa gaacatgcgc gacctgaaag gcccgcagtt cctgcatatc 4320
atgaccaaaa aaggtcgtgg ttatgaaccg gcagaaaaag acccgatcac tttccacgcc 4380
gtgcctaaat ttgatcccic cagcggttgt ttgccgaaaa gtagcggcgg tttgccgagc 4440
tattcaaaaa tctttggcga ctggttgtgc gaaacggcag cgaaagacaa caagctgatg 4500
gcgattactc cggcgatgcg tgaaggttcc ggcatggtcg agttttcacg taaattcccg 4560
gatcgctact tcgacgtggc aattgccgag caacacgcgg tgacctttgc tgcgggtctg 4620
gcgattggtg ggtacaaacc cattgtcgcg atttactcca ctttcctgca acgcgcctat 4680
gatcaggtgc tgcatgacgt ggcgattcaa aagcttccgg tcctgttcgc catcgaccgc 4740
gcgggcattg ttggtgctga cggtcaaacc catcagggtg cttttgatct ctcttacctg 4800
cgctgcatac cggaaatggt cattatgacc ccgagcgatg aaaacgaatg tcgccagatg 4860
ctctataccg gctatcacta taacgatggc ccgtcagcgg tgcgctaccc gcgtggcaac 4920
gcggtcggcg tggaactgac gccgctggaa aaactaccaa ttggcaaagg cattgtgaag 4980
cgtcgtggcg agaaactggc gatccttaac tttggtacgc tgatgccaga agcggcgaaa 5040
gtcgccgaat cgctgaacgc cacgctggtc gatatgcgtt ttgtgaaacc gcttgatgaa 5100
gcgttaattc tggaaatggc cgccagccat gaagcgctgg tcaccgtaga agaaaacgcc 5160
attatgggcg gcgcaggcag cggcgtgaac gaagtgctga tggcccatcg taaaccagta 5220
cccgtgctga acattggcct gccggacttc tttattccgc aaggaactca ggaagaaatg 5280
cgcgccgaac tcggcctcga tgccgctggt atggaagcca aaatcaaggc ctggctggca 5340
taactgcagc tggtaccata tgggaattcg aagctttcta gaacaaaaac tcatctcaga 5400
agaggatctg aatagcgccg tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt aaacggtctc 5460
cagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa 5520
cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct 5580
gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc 5640
catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg 5700
ggccttcgt tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc 5760
gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg tggcgggcag gacgcccgcc 5820
ataaactgcc aggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc tttttgcgtt 5880
tctacaaact cttttgttt attttttctaa atacattcaa atatgtatcc gcttaaccgg 5940
aattgccagc tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg 6000
ctttctcgcc gccaaggatc tgatggcgca ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat 6060
gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 6120
tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg 6180
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg 6240
ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc 6300
cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg 6360
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 6420
tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc 6480
aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg 6540
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg 6600
cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 6660
tcatggtgga aaatggccgc tttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 6720
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 6780
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgatttcgcag cgcatcgcct 6840
tctatcgcct tcttgacgag ttcttctgac gcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 6900
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcctttttt 6960
tttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 7020
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 7080

taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 7140
caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 7200
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 7260
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 7320
gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 7380
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 7440
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 7500
tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 7560
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt 7620
ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga 7680
ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc 7740
ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 7800
atgccgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc 7860
gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gc 7902

<210> 18
<211> 6783
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa 60
tggcgaatgg cgcctgatgc ggtatttttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg 120
catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca 180
cccgccaaca cccgctgacg agcttagtaa agccctcgct agattttaat gcggatgttg 240
cgattacttc gccaactatt gcgataacaa gaaaaagcca gcctttcatg atatatctcc 300
caatttgtgt agggcttatt atgcacgctt aaaaataata aaagcagact tgacctgata 360
gtttggctgt gagcaattat gtgcttagtg catctaacgc ttgagttaag ccgcgccgcg 420
aagcggcgtc ggcttgaacg aattgttaga cattatttgc cgactacctt ggtgatctcg 480
cctttcacgt agtggacaaa ttcttccaac tgatctgcgc gcgaggccaa gcgatcttct 540
tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg ggccggcagg 600
cgctccattg cccagtcggc agcgacatcc ttcggcgcga ttttgccggt tactgcgctg 660
taccaaatgc gggacaacgt aagcactaca tttcgctcat cgccagccca gtcgggcggc 720
gagttccata·gcgttaaggt ttcatttagc gcctcaaata gatcctgttc aggaaccgga 780
tcaaagagtt cctccgccgc tggacctacc aaggcaacgc tatgttctct tgcttttgtc 840
agcaagatag ccagatcaat gtcgatcgtg gctggctcga agatacctgc aagaatgtca 900
ttgcgctgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgcca cggaatgatg 960
tcgtcgtgca caacaatggt gacttctaca gcgcggagaa tctcgctctc tccaggggaa 1020
gccgaagttt ccaaaaggtc gttgatcaaa gctcgccgcg ttgtttcatc aagccttacg 1080
gtcaccgtaa ccagcaaatc aatatcactg tgtggcttca ggccgccatc cactgcggag 1140
ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggt tcgagatggc gctcgatgac gccaactacc 1200
tctgatagtt gagtcgatac ttcggcgatc accgcttccc tcatgatgtt taactttgtt 1260
ttagggcgac tgccctgctg cgtaacatcg ttgctgctcc ataacatcaa acatcgaccc 1320
acggcgtaac gcgcttgctg cttggatgcc cgaggcatag actgtacccc aaaaaaacag 1380
tcataacaag ccatgaaaac cgccactgcg ccgttaccac cgctgcgttc ggtcaaggtt 1440
ctggaccagt tgcgtgagcg catacgctac ttgcattaca gcttacgaac cgaacaggct 1500
tatgtccact gggttcgtgc cttcatccgt ttccacggtg tgcgtcaccc ggcaaccttg 1560
ggcagcagcg aagtcgaggc atttctgtcc tggctggcga acgagcgcaa ggtttcggtc 1620
tccacgcatc gtcaggcatt ggcggccttg ctgttcttct acggcaaggt gctgtgcacg 1680
gatctgccct ggcttcagga gatcggaaga cctcggccgt cgcggcgctt gccggtggtg 1740
ctgaccccgg atgaagtggt tcgcatcctc ggttttctgg aaggcgagca tcgtttgttc 1800
gcccagcttc tgtatggaac gggcatgcgg atcagtgagg gtttgcaact gcgggtcaag 1860
gatctggatt tcgatcacgg cacgatcatc gtgcgggagg gcaagggctc caaggatcgg 1920
gccttgatgt tacccgagag cttggcaccc agcctgcgcg agcaggggaa ttaattccca 1980
cgggttttgc tgcccgcaaa cgggctgttc tggtgttgct agtttgttat cagaatcgca 2040
gatccggctt cagccggttt gccggctgaa agcgctattt cttccagaat tgccatgatt 2100
ttttccccac gggaggcgtc actggctccc gtgttgtcgg cagctttgat tcgataagca 2160
gcatcgcctg tttcaggctg tctatgtgtg actgttgagc tgtaacaagt tgtctcaggt 2220
gttcaatttc atgttctagt tgctttgttt tactggtttc acctgttcta ttaggtgtta 2280
catgctgttc atctgttaca ttgtcgatct gttcatggtg aacagctttg aatgcaccaa 2340
aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct ttttacacc gttttcatct gtgcatatgg 2400
acagtttcc ctttgatatg taacggtgaa cagttgttct acttttgttt gttagtcttg 2460
atgcttcact gatagataca agagccataa gaacctcaga tccttccgta tttagccagt 2520
atgttctcta gtgtggttcg ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca 2580
tacttacttt gcatgtcact caaaaatttt gcctcaaaac tggtgagctg aatttttgca 2640
gttaaagcat cgtgtagtgt tttcttagt ccgttatgta ggtaggaatc tgatgtaatg 2700
gttgttggta ttttgtcacc attcatttt atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga 2760
tccatttgtc tatctagttc aacttggaaa atcaacgtat cagtcgggcg gcctcgctta 2820
tcaaccacca atttcatatt gctgtaagtg tttaaatctt tacttatttgg tttcaaaacc 2880
catggttaa gccttttaaa ctcatggtag ttatttttcaa gcattaacat gaacttaaat 2940
tcatcaaggc taatctctat atttgccttg tgagttttct tttgtgttag ttctttttaat 3000
aaccactcat aaatcctcat agagtatttg tttttcaaaag acttaacatg ttccagatta 3060
tattttatga attttttttaa ctggaaaaga taaggcaata tctcttcact aaaaactaat 3120

tctaattttt cgcttgagaa ctiggcatag tttgtccact ggaaaatctc aaagcctita 3180
accaaaggat tcctgatttc cacagttctc gtcatcagct ctctggttgc tttagctaat 3240
acaccataag cattttccct actgatgttc atcatctgag cgtattggtt ataagtgaac 3300
gataccgtcc gttctttcct tgtagggttt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag 3360
cataaaatta gcttggttic atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt 3420
gctttgaaaa caactaattc agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta 3480
taccaattga gatgggctag tcaatgataa ttactagtcc ttttccttig agtigtgggt 3540
atctgtaaat tctgctagac ctttgctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta 3600
aattccgcta gaccttigtg tgtttttttt gtttatattc aagtggttat aatttataga 3660
ataaagaaag aataaaaaaa gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta 3720
ctttagtcag ttccgcagta ttacaaaagg atgtcgcaaa cgctgtttgc tcctctacaa 3780
aacagacctt aaaaccctaa aggcttaagt agcacccicg caagctcggg caaatcgctg 3840
aatatticti ttgtctccga ccatcaggca cctgagtcgc tgtctttttc gtgacattca 3900
gttcgctgcg ctcacggctc tggcagtgaa tgggggtaaa tggcactaca ggcgccttit 3960
atggattcat gcaaggaaac tacccataat acaagaaaag cccgtcacgg gcttctcagg 4020
gcgttttatg gcgggtctgc tatgtggtgc tatctgactt tttgctgttc agcagttcct 4080
gccctctgat tttccagtct gaccacttcg gattatcccg tgacaggtca ttcagactgg 4140
ctaatgcacc cagtaaggca gcggtatcat caacaggctt acccgtctta ctgtcgggaa 4200
ttcgcgttgg ccgattcatt aatgcagatt ctgaaatgag ctgttgacaa ttaatcatcc 4260
ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagcgccgc 4320
tgagaaaaag cgaagcggca ctgctcttta acaatttatc agacaatctg tgtgggcact 4380
cgaccggaat tatcgattaa ctttattatt aaaaattaaa gaggtatata ttaatgtatc 4440
gattaaataa ggaggaataa accatgtgtg cgacctcttc tcaatttact cagattaccg 4500
agcataattc ccgtcgttcc gcaaactatc agccaaacct gtggaatttc gaattcctgc 4560
aatccctgga gaacgacctg aaagtggaaa agctggagga gaaagcgacc aaactggagg 4620
aagaagttcg ctgcatgatc aaccgtgtag acacccagcc gctgtccctg ctggagctga 4680
tcgacgatgt gcagcgcctg ggtctgacct acaaatttga aaaagacatc attaaagccc 4740
tggaaaacat cgtactgctg gacgaaaaca aaaagaacaa atctgacctg cacgcaaccg 4800
ctctgtcttt ccgtctgctg cgtcagcacg gtttcgaggt ttctcaggat gttttgagc 4860
gtttcaagga taaagaaggt ggtttcagcg gtgaactgaa aggtgacgtc caaggcctgc 4920
tgagcctgta tgaagcgtct tacctgggtt tcgagggtga gaacctgctg gaggaggcgc 4980
gtacctttic catcacccac ctgaagaaca acctgaaaga aggcattaat accaaggttg 5040
cagaacaagt gagccacgcc ctggaactgc catatcacca gcgtctgcac cgtctggagg 5100
cacgttggtt cctggataaa tacgaaccga aagaaccgca tcaccagctg ctgctggagc 5160
tggcgaagct ggatttiaac atggtacaga ccctgcacca gaaagagctg caagatctgt 5220
cccgctggtg gaccgagatg ggcctggcta gcaaactgga ttttgtacgc gaccgcctga 5280
tggaagttta tttctgggca ctgggtatgg cgccagaccc gcagtttggt gaatgtcgca 5340
aagctgttac taaaatgttt ggtctggtga cgatcatcga tgacgtgtat gacgtttatg 5400
gcactctgga cgaactgcaa ctgttcaccg atgctgtaga gcgctgggac gttaacgcta 5460
ttaacaccct gccggactat atgaaactgt gttiectggc actgtacaac accgttaacg 5520
acacgtccta ttctatictg aaagagaaag gtcataacaa cctgtcctat ctgacgaaaa 5580
gctggcgtga actgtgcaaa gccttttctgc aagaggcgaa atggtccaac aacaaaatta 5640
tcccggcttt ctccaagtac ctggaaaacg ccagcgttic ctcctccggt gtagcgctgc 5700
tggcgccgtc ttacttttcc gtatgccagc agcaggaaga catctccgac cacgcgctgc 5760
gttccctgac cgacttccat ggtctggtgc gttctagctg cgttatcttc cgcctgtgca 5820
acgatctggc cacctctgcg gcggagctgg aacgtggcga gactaccaat tctatcatta 5880
gctacatgca cgaaaacgat ggtaccagcg aggaacaggc ccgcgaagaa ctgcgtaaac 5940
tgatcgacgc cgaatggaaa aagatgaatc gtgaacgcgt tagcgactcc acccigctgc 6000
ctaaagcgtt catggaaatc gcagttaaca tggcacgtgt ttcccactgc acctaccagt 6060
atggcgatgg tctgggtcgc ccagactacg cgactgaaaa ccgcatcaaa ctgctgctga 6120
ttgaccctit cccgattaac cagctgatgt atgtctaact gcagctggta ccatatggga 6180
attcgaagct ttctagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac 6240
catcatcatc atcatcattg agtttaaacg gtctccagct tggctgtttt ggcggatgag 6300
agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggtctg ataaaacaga 6360
atttgcctgg cggcagtagc gcggtggtcc cacctgaccc catgccgaac tcagaagtga 6420
aacgccgtag cgccgatggt agtgtggggt ctccccatgc gagagtaggg aactgccagg 6480
catcaaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttgtttg 6540
tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttgcgaag 6600
caacggcccg gagggtggcg ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag 6660
cagaaggcca tcctgacgga tggcctttit gcgtttctac aaactctttt tgtttatttt 6720
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 6780
aat 6783

<210> 19
<211> 6783
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19
cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagatta ttgaagcatt 60
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa 120
aaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat ccgtcaggat ggccttctgc ttaatttgat 180
gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc gccaccctcc gggccgttgc ttcgcaacgt 240

tcaaatccgc tcccggcgga tttgtcctac tcaggagagc gttcaccgac aaacaacaga 300
taaaacgaaa ggcccagtct ttcgactgag cctttcgttt tatttgatgc ctggcagttc 360
cctactctcg catggggaga ccccacacta ccatcggcgc tacggcgttt cacttctgag 420
ttcggcatgg ggtcagggtgg gaccaccgcg ctactgccgc caggcaaatt ctgttttatc 480
agaccgcttc tgcgttctga tttaatctgt atcaggctga aaatcttctc tcatccgcca 540
aaacagccaa gctggagacc gtttaaactc aatgatgatg atgatgatgg tcgacggcgc 600
tattcagatc ctcttctgag atgagttttt gttctagaaa gcttcgaatt cccatatggt 660
accagctgca gttagacata catcagctgg ttaatcggga aagggtcaat cagcagcagt 720
ttgatgcggt tttcagtcgc gtagtctggg cgacccagac catcgccata ctggtaggtg 780
cagtgggaaa cacgtgccat gttaactgcg atttccatga acgctttagg cagcagggtg 840
gagtcgctaa cgcgttcacg attcatcttt ttccattcgg cgtcgatcag tttacgcagt 900
tcttcgcggg cctgttcctc gctggtacca tcgttttcgt gcatgtagct aatgatagaa 960
ttggtagtct cgccacgttc cagctccgcc gcagaggtgg ccagatcgtt gcacaggcgg 1020
aagataacgc agctagaacg caccagacca tggaagtcgg tcagggaacg cagcgcgtgg 1080
tcggagatgt cttcctgctg ctggcatacg gaaaagtaag acggcgccag cagcgctaca 1140
ccggaggagg aaacgctggc gttttccagg tacttggaga aagccgggat aattttgttg 1200
ttggaccatt tcgcctcttg cagaaaggct ttgcacagtt cacgccagct tttcgtcaga 1260
taggacaggt tgttatgacc tttctctttc agaatagaat aggacgtgtc gttaacggtg 1320
ttgtacagtg ccaggaaaca cagtttcata tagtccggca gggtgttaat agcgttaacg 1380
tcccagcgct ctacagcatc ggtgaacagt tgcagttcgt ccagagtgcc ataaacgtca 1440
tacacgtcat cgatgatcgt caccagacca aacattttag taacagcttt gcgacattca 1500
ccaaactgcg ggtctggcgc catacccagt gcccagaaat aaacttccat caggcggtcg 1560
cgtacaaaat ccagtttgct agccaggccc atctcggtcc accagcggga cagatcttgc 1620
agctctttct ggtgcagggt ctgtaccatg ttaaaatcca gcttcgccag ctccagcagc 1680
agctggtgat gcggttcttt cggttcgtat ttatccagga accaacgtgc ctccagacgg 1740
tgcagacgct ggtgatatgg cagttccagg gcgtggctca cttgttctgc aaccttggta 1800
ttaatgcctt ctttcaggtt gttcttcagg tgggtgatgg aaaaggtacg cgcctcctcc 1860
agcaggttct caccctcgaa acccaggtaa gacgcttcat acaggctcag caggccttgg 1920
acgtcacctt tcagttcacc gctgaaacca ccttctttat ccttgaaacg ctcaaaaaca 1980
tcctgagaaa cctcgaaacc gtgctgacgc agcagacgga aagacagagc ggttgcgtgc 2040
aggtcagatt tgttcttttt gttttcgtcc agcagtacga tgttttccag ggctttaatg 2100
atgtcttttt caaatttgta ggtcagaccc aggcgctgca catcgtcgat cagctccagc 2160
agggacagcg gctgggtgtc tacacggttg atcatgcagc gaacttcttc ctccagtttg 2220
gtcgctttct cctccagctt ttccactttc aggtcgttct ccagggattg caggaattcg 2280
aaattccaca ggtttggctg atagtttgcg gaacgacggg aattatgctc ggtaatctga 2340
gtaaattgag aagaggtcgc acacatggtt tattcctcct tatttaatcg atacattaat 2400
atatacctct ttaatttttа ataataaagt taatcgataa ttccggtcga gtgcccacac 2460
agattgtctg ataaattgtt aaagagcagt gccgcttcgc ttttctcag cggcgctgtt 2520
tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacatt atacgagccg gatgattaat 2580
tgtcaacagc tcatttcaga atctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt 2640
cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggtatttt ctccttacgc 2700
atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg 2760
catagttaag ccagccccga cacccgccaa cacccgctga cgagcttagt aaagccctcg 2820
ctagatttta atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc 2880
cagcctttca tgatataatct cccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc ttaaaaataa 2940
taaaagcaga cttgacctga tagtttggct gtgagcaatt atgtgcttag tgcatctaac 3000
gcttgagtta agccgcgccg cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgtta gacattatтt 3060
gccgactacc ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca actgatctgc 3120
gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac 3180
gggctgatac tgggccggca ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat ccttcggcgc 3240
gattttgccg gttactgcgc tgtaccaaat gcgggacaac gtaagcacta catttcgctc 3300
atcgccagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta gcgcctcaaa 3360
tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttcctccgcc gctggaccta ccaaggcaac 3420
gctatgttct cttgctttig tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggctc 3480
gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc 3540
tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgcggag 3600
aatctcgctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg 3660
cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt 3720
caggccgcca tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg 3780
gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc 3840
cctcatgatg tttaactttg ttttagggcg actgcccctgc tgcgtaacat cgttgctgct 3900
ccataacatc aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttggatg cccgaggcat 3960
agactgtacc ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc 4020
accgctgcgt tcggtcaagg tctggaacca gttgcgtgag cgcatacgct acttgcatta 4080
cagcttacga accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gccttcatcc gtttccacgg 4140
tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc 4200
gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt 4260
ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggaa gacctcggcc 4320
gtcgcggcgc ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcatcc tcggtttttct 4380
ggaaggcgag catcgtttgt tcgcccagct tctgtatgga acgggcatgc ggatcagtga 4440
gggtttgcaa ctgcgggtca aggatctgga tttcgatcac ggcacgatca tcgtgcgggа 4500
gggcaagggc tccaaggatc gggccttgat gttacccgag agcttggcac ccagcctgcg 4560
cgagcagggg aattaattcc cacgggtttt gctgcccgca aacgggctgt tctggtgttg 4620
ctagtttgtt atcagaatcg cagatccggc ttcagccggt ttgccggctg aaagcgctat 4680
ttcttccaga attgccatga ttttttcccc acgggaggcg tcactggctc ccgtgttgtc 4740
ggcagctttg attcgataag cagcatcgcc tgtttcaggc tgtctatgtg tgactgttga 4800
gctgtaacaa gttgtctcag gtgttcaatt tcatgttcta gttgctttgt ttttactggtt 4860
tcacctgttc tattaggtgt tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcatgg 4920

tgaacagctt tgaatgcacc aaaaactcgt aaaagctctg atgtatctat cttttttaca 4980
ccgttttcat ctgtgcatat ggacagtttt ccctttgata tgtaacggtg aacagttgtt 5040
ctactttttgt ttgttagtct tgatgcttca ctgatagata caagagccat aagaacctca 5100
gatccttccg tatttagcca gtatgttctc tagtgtggtt cgttgttttt gcgtgagcca 5160
tgagaacgaa ccattgagat catacttact ttgcatgtca ctcaaaaatt ttgcctcaaa 5220
actggtgagc tgaatttttg cagttaaagc atcgtgtagt gttttcttta gtccgttatg 5280
taggtaggaa tctgatgtaa tggttgttgg tattttgtca ccattcattt ttatctggtt 5340
gtttctcaagt tcggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttgga aaatcaacgt 5400
atcagtcggg cggcctcgct tatcaaccac caatttcata ttgctgtaag tgtttaaatc 5460
tttacttatt ggtttcaaaa cccattggtt aagccttta aactcatggt agtttatttc 5520
aagcattaac atgaacttaa attcatcaag gctaatctct atatttgcct tgtgagtttt 5580
cttttgtgtt agtttttta ataaccactc ataaatcctc atagagtatt tgttttcaaa 5640
agacttaaca tgttccagat tatattttat gaatttttt aactggaaaa gataaggcaa 5700
tatctcttca ctaaaaacta atttctaattt ttcgcttgag aacttggcat agtttgtcca 5760
ctggaaaatc tcaaagcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag 5820
ctctctggtt gctttagcta atacaccata agcatttttcc ctactgatgt tcatcatctg 5880
agcgtattgg ttataagtga acgataccgt ccgttctttc cttgtagggt tttcaatcgt 5940
ggggttgagt agtgccacac agcataaaat tagcttggtt tcatgctccg ttaagtcata 6000
gcgactaatc gctagttcat ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattg 6060
gtctaggtga ttttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgat aattactagt 6120
ccttttcctt tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag acctttgctg gaaaacttgt 6180
aaattctgct agacccctcg taaattccgc tagacctttg tgtgtttttt ttgtttatat 6240
tcaagtggtt ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc 6300
cagccctgtg tataactcac tactttagtc agttccgcag tattacaaaa ggatgtcgca 6360
aacgctgttt gctcctctac aaaacagacc ttaaaaccct aaaggcttaa gtagcaccct 6420
cgcaagctcg ggcaaaatcgc tgaatattcc tttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc 6480
gctgtctttt tcgtgacatt cagttcgctg cgctcacggc tctggcagtg aatgggggta 6540
aatggcacta caggcgcctt ttatggattc atgcaaggaa actacccata atacaagaaa 6600
agcccgtcac gggcttctca gggcgtttta tggcgggtct gctatgtggt gctatctgac 6660
ttttgctgt tcagcagttc ctgcccctg attttccagt ctgaccactt cggatttatcc 6720
cgtgacaggt cattcagact ggctaatgca cccagtaagg cagcggtatc atcaacaggc 6780
tta 6783

<210> 20
<211> 7687
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20
ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgccctccc caacagttgc gcagcctgaa 60
tggcgaatgg cgcctgatgc ggtatttttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg 120
catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca 180
cccgccaaca cccgctgacg agcttagtaa agccctcgct agattttaat gcggatgttg 240
cgattacttc gccaactatt gcgataacaa gaaaaagcca gcctttcatg atatatctcc 300
caatttgtgt agggcttatt atgcacgctt aaaaataata aaagcagact tgacctgata 360
gtttggctgt gagcaattat gtgcttagtg catctaacgc ttgagttaag ccgcgccgcg 420
aagcggcgtc ggcttgaacg aattgttaga cattatttgc cgactacctt ggtgatctcg 480
cctttcacgt agtggacaaa ttcttccaac tgatctgcgc gcgaggccaa gcgatcttct 540
tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg ggccggcagg 600
cgctccattg cccagtcggc agcgacatcc ttcggcgcga tttgccggt tactgcgctg 660
taccaaatgc gggacaacgt aagcactaca tttcgctcat cgccagccca gtcgggcggc 720
gagttccata gcgttaaggt ttcattagc gcctcaaata gatcctgttc aggaaccgga 780
tcaaagagtt cctccgccgc tggacctacc aaggcaacgc tatgttctct tgcttttgtc 840
agcaagatag ccagatcaat gtcgatcgtg gctggctcga agatacctgc aagaatgtca 900
ttgcgctgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgcca cggaatgatg 960
tcgtcgtgca caacaatggt gacttctaca gcgcggagaa tctcgctctc tccaggggaa 1020
gccgaagttt ccaaaaggtc gttgatcaaa gctcgccgcg ttgtttcatc aagccttacg 1080
gtcaccgtaa ccagcaaatc aatatcactg tgtggcttca ggccgccatc cactgcggag 1140
ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggt tcgagatggc gctcgatgac gccaactacc 1200
tctgatagtt gagtcgatac ttcggcgatc accgcttccc tcatgatgtt taactttgtt 1260
ttagggcgac tgccctgctg cgtaacatcg ttgctgctcc ataacatcaa acatcgaccc 1320
acggcgtaac gcgcttgctg cttggatgcc cgaggcatag actgtacccc aaaaaaacag 1380
tcataacaag ccatgaaaac cgccactgcg ccgttaccac cgctgcgttc ggtcaaggtt 1440
ctggaccagt tgcgtgagcg catacgctac ttgcattaca gcttacgaac cgaacaggct 1500
tatgtccact gggttcgtgc cttcatccgt ttccacggtg tgcgtcaccc ggcaaccttg 1560
ggcagcagcg aagtcgaggc atttctgtcc tggctggcga acgagcgcaa ggtttcggtc 1620
tccacgcatc gtcaggcatt ggcggccttg ctgttcttct acggcaaggt gctgtgcacg 1680
gatctgccct ggcttcagga gatcggaaga cctcggccgt cgcggcgctt gccggtggtg 1740
ctgaccccgg atgaagtggt tcgcatcctc ggttttctgg aaggcgagca tcgtttgttc 1800
gcccagcttc tgtatggaac gggcatgcgg atcagtgagg gtttgcaact gcgggtcaag 1860
gatctggatt tcgatcacgg cacgatcatc gtgcgggagg gcaagggctc caaggatcgg 1920
gccttgatgt tacccgagag cttggcaccc agcctgcgcg agcaggggaa ttaattccca 1980
cgggttttgc tgcccgcaaa cgggctgttc tggtgttgct agtttgttat cagaatcgca 2040

gatccggctt cagccggttt gccggctgaa agcgctattt cttccagaat tgccatgatt 2100
ttttccccac gggaggcgtc actggctccc gtgttgtcgg cagctttgat tcgataagca 2160
gcatcgcctg tttcaggctg tctatgtgtg actgttgagc tgtaacaagt tgtctcaggt 2220
gttcaatttc atgttctagt tgctttgttt tactggtttc acctgttcta ttaggtgtta 2280
catgctgttc atctgttaca ttgtcgatct gttcatggtg aacagctttg aatgcaccaa 2340
aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct tttttacacc gttttcatct gtgcatatgg 2400
acagttttcc ctttgatatg taacggtgaa cagttgttct acttttgttt gttagtcttg 2460
atgcttcact gatagataca agagccataa gaacctcaga tccttccgta tttagccagt 2520
atgttctcta gtgtggttcg ttgttttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca 2580
tacttacttt gcatgtcact caaaaatttt gcctcaaaac tggtgagctg aatttttgca 2640
gttaaagcat cgtgtagtgt ttttcttagt ccgttatgta ggtaggaatc tgatgtaatg 2700
gttgttggta ttttgtcacc attcatttttt atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga 2760
tccatttgtc tatctagttc aacttggaaa atcaacgtat cagtcgggcg gcctcgctta 2820
tcaaccacca atttcatatt gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc 2880
catggttaa gccttttaaa ctcatggtag ttatttttcaa gcattaacat gaacttaaat 2940
tcatcaaggc taatctctat atttgccttg tgagttttct tttgtgttag ttctttttaat 3000
aaccactcat aaatcctcat agagtatttg ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta 3060
tattttatga attttttttaa ctggaaaaga taaggcaata tctcttcact aaaaactaat 3120
tctaatttti cgcttgagaa cttggcatag tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta 3180
accaaaggat tcctgatttc cacagttctc gtcatcagct ctctggttgc tttagctaat 3240
acaccataag cattticcct actgatgttc atcatctgag cgtattggtt ataagtgaac 3300
gataccgtcc gttctttcct tgtagggttt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag 3360
cataaaatta gcttggtttc atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt 3420
gctttgaaaa caactaattc agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta 3480
taccaattga gatgggctag tcaatgataa ttactagtcc ttttccttig agttgtgggt 3540
atctgtaaat tctgctagac ctttgctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta 3600
aattccgcta gaccttigtg tgttttttti gtttatattc aagtggttat aatttataga 3660
ataaagaaag aataaaaaaa gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta 3720
ctttagtcag ttccgcagta ttacaaaagg atgtcgcaaa cgctgtttgc tcctctacaa 3780
aacagacctt aaaaccctaa aggcttaagt agcacccicg caagctcggg caaatcgctg 3840
aatattcctt ttgtctccga ccatcaggca cctgagtcgc tgtctttttc gtgacattca 3900
gttcgctgcg ctcacggctc tggcagtgaa tgggggtaaa tggcactaca ggcgccttit 3960
atggattcat gcaaggaaac tacccataat acaagaaaag cccgtcacgg gctttctcagg 4020
gcgttttatg gcgggtctgc tatgtggtgc tatctgactt tttgctgttc agcagttcct 4080
gccctctgat tttccagtct gaccacttcg gattatcccg tgacaggtca ttcagactgg 4140
ctaatgcacc cagtaaggca gcggtatcat caacaggctt acccgtctta ctgtcgggaa 4200
ttcgcgttgg ccgattcatt aatgcagatt ctgaaatgag ctgttgacaa ttaatcatcc 4260
ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagcgccgc 4320
tgagaaaaag cgaagcggca ctgctctita acaatttatc agacaatctg tgtgggcact 4380
cgaccggaat tatcgattaa ctttattatt aaaaattaaa gaggtatata ttaatgtatc 4440
gattaaataa ggaggaataa accatgtgtg cgacctcttc tcaatttact cagattaccg 4500
agcataattc ccgtcgttcc gcaaactatc agccaaacct gtggaatttc gaattcctgc 4560
aatccctgga gaacgacctg aaagtggaaa agctggagga gaaagcgacc aaactggagg 4620
aagaagttcg ctgcatgatc aaccgtgtag acacccagcc gctgtcccig ctggagctga 4680
tcgacgatgt gcagcgcctg ggtctgacct acaaatttga aaaagacatc attaaagccc 4740
tggaaaacat cgtactgctg gacgaaaaca aaaagaacaa atctgacctg cacgcaaccg 4800
ctctgtcttt ccgtctgctg cgtcagcacg gtttcgaggt ttctcaggat gttttgagc 4860
gtttcaagga taaagaaggt ggtttcagcg gtgaactgaa aggtgacgtc caaggcctgc 4920
tgagcctgta tgaagcgtct taccigggtt tcgagggtga gaacctgctg gaggaggcgc 4980
gtaccttttc catcacccac ctgaagaaca acctgaaaga aggcattaat accaaggttg 5040
cagaacaagt gagccacgcc ctggaactgc catatcacca gcgtctgcac cgtctggagg 5100
cacgttggtt cctggataaa tacgaaccga aagaaccgca tcaccagctg ctgctggagc 5160
tggcgaagct ggattttaac atggtacaga ccctgcacca gaaagagctg caagatctgt 5220
cccgctggtg gaccgagatg ggcctggcta gcaaactgga ttttgtacgc gaccgcctga 5280
tggaagttta tttctgggca ctgggtatgg cgccagaccc gcagtttggt gaatgtcgca 5340
aagctgttac taaaatgttt ggtctggtga cgatcatcga tgacgtgtat gacgtttatg 5400
gcactctgga cgaactgcaa ctgttcaccg atgctgtaga gcgctgggac gttaacgcta 5460
ttaacaccct gccggactat atgaaactgt gtttcctggc actgtacaac accgttaacg 5520
acacgtccta ttctattctg aaagagaaag gtcataacaa cctgtcctat ctgacgaaaa 5580
gctggcgtga actgtgcaaa gcctttctgc aagaggcgaa atggtccaac aacaaaatta 5640
tcccggcttt ctccaagtac ctggaaaacg ccagcgtttc ctcctccggt gtagcgctgc 5700
tggcgccgtc ttacttttcc gtatgccagc agcaggaaga catctccgac cacgcgctgc 5760
gttcccigac cgacttccat ggtctggtgc gttctagctg cgttatcttc cgcctgtgca 5820
acgatctggc cacctctgcg gcggagctgg aacgtggcga gactaccaat tctatcatta 5880
gctacatgca cgaaaacgat ggtaccagcg aggaacaggc ccgcgaagaa ctgcgtaaac 5940
tgatcgacgc cgaatggaaa aagatgaatc gtgaacgcgt tagcgactcc accctgctgc 6000
ctaaagcgtt catggaaatc gcagttaaca tggcacgtgt ttcccactgc acctaccagt 6060
atggcgatgg tctgggtcgc ccagactacg cgactgaaaa ccgcatcaaa ctgctgctga 6120
ttgacccttt cccgattaac cagctgatgt atgtctaact gcatcgccct taggaggtaa 6180
aaaaaaatga ctgccgacaa caatagtatg ccccatggtg cagtatctag ttacgccaaa 6240
ttagtgcaaa accaaacacc tgaagacatt ttggaagagt ttcctgaaat tattccatta 6300
caacaaagac ctaataccog atctagtgag acgtcaaatg acgaaagcgg agaaacatgt 6360
ttttctggtc atgatgagga gcaaattaag ttaatgaatg aaaattgtat tgttttggat 6420
tgggacgata atgctattgg tgccggtacc aagaaagttt gtcatttaat ggaaaatatt 6480
gaaaagggtt tactacatcg tgcattctcc gtctttattt tcaatgaaca aggtgaatta 6540
ctttttacaac aaagagccac tgaaaaaata acttttcctg atcttttggac taacacatgc 6600
tgctctcatc cactatgtat tgatgacgaa ttaggtttga agggtaagct agacgataag 6660
attaagggcg ctattactgc ggcggtgaga aaactagatc atgaattagg tattccagaa 6720

gatgaaacta agacaagggg taagtttcac tttttaaaca gaatccatta catggcacca 6780
agcaatgaac catggggtga acatgaaatt gattacatcc tattttataa gatcaacgct 6840
aaagaaaact tgactgtcaa cccaaacgtc aatgaagtta gagacttcaa atgggtttca 6900
ccaaatgatt tgaaaactat gtttgctgac ccaagttaca agtttacgcc ttggtttaag 6960
attatttgcg agaattactt attcaactgg tgggagcaat tagatgacct ttctgaagtg 7020
gaaaatgaca ggcaaattca tagaatgcta taacgacgcg tcctgcagct ggtaccatat 7080
gggaattcga agctttctag aacgaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgccgt 7140
cgaccatcat catcatcatc attgagttta aacggtctcc agcttggctg ttttggcgga 7200
tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg tctgataaaa 7260
cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc gaactcagaa 7320
gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg gggtctcccc atgcgagagt agggaactgc 7380
caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt ttatctgttg 7440
tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt tgaacgttgc 7500
gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcca taaactgcca ggcatcaaat 7560
taagcagaag gccatcctga cggatggcct tttgcgtttc tacaaactc ttttgtttta 7620
ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 7680
caataat 7687

<210> 21
<211> 8675
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagatta ttgaagcatt 60
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa 120
aaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat ccgtcaggat ggccttctgc ttaatttgat 180
gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc gccaccctcc gggccgttgc ttcgcaacgt 240
tcaaatccgc tcccggcgga tttgtcctac tcaggagagc gttcaccgac aaacaacaga 300
taaaacgaaa ggcccagtct ttcgactgag cctttcgttt tatttgatgc ctggcagttc 360
cctactctcg catggggaga ccccacacta ccatcggcgc tacggcgttt cacttctgag 420
ttcggcatgg ggtcaggtgg gaccaccgcg ctactgccgc caggcaaatt ctgttttatc 480
agaccgcttc tgcgttctga tttaatctgt atcaggctga aaatcttctc tcatccgcca 540
aaacagccaa gctggagacc gtttaaactc aatgatgatg atgatgatgg tcgacggcgc 600
tattcagatc ctcttctgag atgagttttt gttctagaaa gcttcgaatt cccatatggt 660
accagctgca gttatgccag ccaggccttg attttggctt ccataccagc ggcatcgagg 720
ccgagttcgg cgcgcattic ttcctgagtt ccttgcggaa taaagaagtc cggcaggcca 780
atgttcagca cgggtactgg tttacgatgg gccatcagca cttcgttcac gccgctgcct 840
gcgccgccca taatggcgtt ttcttctacg gtgaccagcg cttcatggct ggcggccatt 900
tccagaatta acgcttcatc aagcggtttc acaaaacgca tatcgaccag cgtggcgttc 960
agcgattcgg cgactttcgc cgcttctggc atcagcgtac caaagttaag gatcgccagt 1020
ttctcgccac gacgcttcac aatgcctttg ccaattggta gtttttccag cggcgtcagt 1080
tccacgccga ccgcgttgcc acgcgggtag cgcaccgctg acgggccatc gttatagtga 1140
tagccggtat agagcatctg gcgacattcg ttttcatcgc tcggggtcat aatgaccatt 1200
tccggtatgc agcgcaggta agagagatca aaagcaccct gatgggtttg accgtcagca 1260
ccaacaatgc ccgcgcggtc gatggcgaac aggaccggaa gctttlgaat cgccacgtca 1320
tgcagcacct gatcataggc gcgttgcagg aaagtggagt aaatcgcgac aatgggtttg 1380
tacccaccaa tcgccagacc cgcagcaaag gtcaccgcgt gttgctcggc aattgccacg 1440
tcgaagtagc gatccgggaa tttacgtgaa aactcgacca tgccggaacc ttcacgcatc 1500
gccggagtaa tcgccatcag cttgttgtct ttcgctgccg tttcgcacaa ccagtcgcca 1560
aagatttttg aatagctcgg caaaccgccg ctacttttcg gcaaacaacc gctggaggga 1620
tcaaatttag gcacggcgtg gaaagtgatc gggtcttttt ctgccggttc ataaccacga 1680
ccttttttgg tcatgatatg caggaactgc gggcctttca ggtcgcgcat gttctttagc 1740
gtggtgataa gccccagcac atcgtgaccg tccaccgggc cgatgtagtt aaagcccagc 1800
tcttcaaaca acgtgccagg cactaccatg cctttaatat gttcttcggt gcgtttgagc 1860
agctctttaa ttggcggcac gccagagaaa acttttttcc cgccttcgcg cagtgaagag 1920
taaagcttac cggaaagcag ctgtgccaga tggttgttga gcgcgccgac attttcggaa 1980
atcgacattt cattgtcgtt gagaatcacc agcatatcag gacggatatc gcccgcgtga 2040
ttcatcgctt caaacgccat gcctgcggta atcgcgccat cgccaatgac acagacggtg 2100
cggcgatttt tgccttcttt ttcggcagca accgcaatac caattccggc actgatggag 2160
gttgatgaat gcccgacgct taatacgtca tattcgcttt cgccgcgcca cgggaacggg 2220
tgcagaccgc ctttctgacg gatggtccg attttgtcgc ggcgtccggt caaaatttta 2280
tgcggataag cctgatgccc cacatcccaa atcaattggt caaacggggt gttgtagaca 2340
tagtgcagcg ccacggtcag ttcgaccgtg cccagcccgg aggcgaagtg cccgctggaa 2400
cggctcacgc tgtcgagtaa atagcggcgc agttcgtcgc agagtttcgg taaactctct 2460
ttcggcaaca gtcgtaactc ctgggtggag tcgaccagtg ccagggtcgg gtatttggca 2520
atatcaaaac tcatgttttt ttacctccta agggcgaatg cagttagaca tacatcagct 2580
ggttaatcgg gaaagggtca atcagcagca gtttgatgcg gttttcagtc gcgtagtctg 2640
ggcgacccag accatcgcca tactggtagg tgcagtggga aacacgtgcc atgttaactg 2700
cgatttccat gaacgcttta ggcagcaggg tggagtcgct aacgcgttca cgattcatct 2760
ttttccattc ggcgtcgatc agtttacgca gttcttcgcg ggcctgttcc tcgctggtac 2820
catcgttttc gtgcatgtag ctaatgatag aattggtagt ctcgccacgt tccagctccg 2880
ccgcagaggt ggccagatcg ttgcacaggc ggaagataac gcagctagaa cgcaccagac 2940

catggaagtc ggtcagggaa cgcagcgcgt ggtcggagat gtcttcctgc tgctggcata 3000
cggaaaagta agacggcgcc agcagcgcta caccggagga ggaaacgctg gcgttttcca 3060
ggtacttgga gaaagccggg ataatttttgt tgttggacca tttcgcctct tgcagaaagg 3120
ctttgcacag ttcacgccag cttttcgtca gataggacag gttgttatga cctttctctt 3180
tcagaataga ataggacgtg tcgttaacgg tgttgtacag tgccaggaaa cacagtttca 3240
tatagtccgg cagggtgtta atagcgttaa cgtcccagcg ctctacagca tcggtgaaca 3300
gttgcagttc gtccagagtg ccataaacgt catacacgtc atcgatgatc gtcaccagac 3360
caaacatttt agtaacagct ttgcgacatt caccaaactg cgggtctggc gccataccca 3420
gtgcccagaa ataaacttcc atcaggcggt cgcgtacaaa atccagtttg ctagccaggc 3480
ccatctcggt ccaccagcgg gacagatctt gcagctcttt ctggtgcagg gtctgtacca 3540
tgttaaaatc cagcttcgcc agctccagca gcagctggtg atgcggttct ttcggttcgt 3600
atttatccag gaaccaacgt gcctccagac ggtgcagacg ctggtgatat ggcagttcca 3660
gggcgtggct cacttgttct gcaaccttgg tattaatgcc ttctttcagg ttgttcttca 3720
ggtgggtgat ggaaaaggta cgcgcctcct ccagcaggtt ctcaccctcg aaacccaggt 3780
aagacgcttc atacaggctc agcaggcctt ggacgtcacc tttcagttca ccgctgaaac 3840
caccttcttt atccttgaaa cgctcaaaaa catcctgaga aacctcgaaa ccgtgctgac 3900
gcagcagacg gaaagacaga gcggttgcgt gcaggtcaga tttgttcttt ttgttttcgt 3960
ccagcagtac gatgttttcc agggctttaa tgatgtcttt ttcaaatttg taggtcagac 4020
ccaggcgctg cacatcgtcg atcagctcca gcagggacag cggctgggtg tctacacggt 4080
tgatcatgca gcgaacttct tcctccagtt tggtcgcttt ctcctccagc ttttccactt 4140
tcaggtcgtt ctccagggat tgcaggaatt cgaaattcca caggtttggc tgatagtttg 4200
cggaacgacg ggaattatgc tcggtaatct gagtaaattg agaagaggtc gcacacatgg 4260
tttattcctc cttatttaat cgatacatta atatatacct ctttaatttt taataataaa 4320
gttaatcgat aattccggtc gagtgcccac acagattgtc tgataaattg ttaaagagca 4380
gtgccgcttc gcttttttctc agcggcgctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca 4440
attccacaca ttatacgagc cggatgatta attgtcaaca gctcatttca gaatctggcg 4500
taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga 4560
atggcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg 4620
gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc 4680
aacacccgct gacgagctta gtaaagccct cgctagattt taatgcggat gttgcgatta 4740
cttcgccaac tattgcgata acaagaaaaa gccagccttt catgatatat ctcccaattt 4800
gtgtagggct tattatgcac gcttaaaaat aataaaagca gacttgacct gatagtttgg 4860
ctgtgagcaa ttatgtgctt agtgcatcta acgcttgagt taagccgcgc cgcgaagcgg 4920
cgtcggcttg aacgaattgt tagacattat ttgccgacta ccttggtgat ctcgcctttc 4980
acgtagtgga caaattcttc caactgatct gcgcgcgagg ccaagcgatc ttcttcttgt 5040
ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg acgggctgat actgggccgg caggcgctcc 5100
attgcccagt cggcagcgac atccttcggc gcgattttgc cggttactgc gctgtaccaa 5160
atgcgggaca acgtaagcac tacatttcgc tcatcgccag cccagtcggg cggcgagttc 5220
catagcgtta aggtttcatt tagcgcctca aatagatcct gttcaggaac cggatcaaag 5280
agttcctccg ccgctggacc taccaaggca acgctatgtt ctcttgcttt tgtcagcaag 5340
atagccagat caatgtcgat cgtggctggc tcgaagatac ctgcaagaat gtcattgcgc 5400
tgccattctc caaattgcag ttcgcgctta gctggataac gccacggaat gatgtcgtcg 5460
tgcacaacaa tggtgacttc tacagcgcgg agaatctcgc tctctccagg ggaagccgaa 5520
gtttccaaaa ggtcgttgat caaagctcgc cgcgttgttt catcaagcct tacggtcacc 5580
gtaaccagca aatcaatatc actgtgtggc ttcaggccgc catccactgc ggagccgtac 5640
aaatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga tggcgctcga tgacgccaac tacctctgat 5700
agttgagtcg atacttcggc gatcaccgct tccctcatga tgtttaactt tgttttaggg 5760
cgactgccct gctgcgtaac atcgttgctg ctccataaca tcaaacatcg acccacggcg 5820
taacgcgctt gctgcttgga tgcccgaggc atagactgta ccccaaaaaa acagtcataa 5880
caagccatga aaaccgccac tgcgccgtta ccaccgctgc gttcggtcaa ggttctggac 5940
cagttgcgtg agcgcatacg ctacttgcat tacagcttac gaaccgaaca ggcttatgtc 6000
cactgggttc gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc acccggcaac cttgggcagc 6060
agcgaagtcg aggcatttct gtcctggctg gcgaacgagc gcaaggtttc ggtctccacg 6120
catcgtcagg cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg 6180
ccctggcttc aggagatcgg aagacctcgg ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc 6240
ccggatgaag tggttcgcat cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcgcccag 6300
cttctgtatg gaacgggcat gcggatcagt gagggtttgc aactgcgggt caaggatctg 6360
gatttcgatc acggcacgat catcgtgcgg gagggcaagg gctccaagga tcgggccttg 6420
atgttacccg agagcttggc acccagcctg cgcgagcagg ggaattaatt cccacgggtt 6480
ttgctgcccg caaacgggct gttctggtgt tgctagtttg ttatcagaat cgcagatccg 6540
gcttcagccg gtttgccggc tgaaagcgct atttcttcca gaattgccat gattttttcc 6600
ccacgggagg cgtcactggc tcccgtgttg tcggcagctt tgattcgata agcagcatcg 6660
cctgtttcag gctgtctatg tgtgactgtt gagctgtaac aagttgtctc aggtgttcaa 6720
tttcatgttc tagttgcttt gttttactgg tttcacctgt tctattaggt gttacatgct 6780
gttcatctgt tacattgtcg atctgttcat ggtgaacagc tttgaatgca ccaaaaactc 6840
gtaaaagctc tgatgtatct atcttttta caccgttttc atctgtgcat atggacagtt 6900
ttccctttga tatgtaacgg tgaacagttg ttctacttttt gttttgttagt cttgatgctt 6960
cactgatataga tacaagagcc ataagaacct cagatccttc cgtatttagc cagtatgttc 7020
tctagtgtgg ttcgttgttt ttgcgtgagc catgagaacg aaccattgag atcatactta 7080
ctttgcatgt cactcaaaaa ttttgcctca aaactggtga gctgaatttt tgcagttaaa 7140
gcatcgtgta gtgtttttct tagtccgtta tgtaggtagg aatctgatgt aatggttgtt 7200
ggtatttttgt caccattcat ttttatctgg ttgttctcaa gttcggttac gagatccatt 7260
tgtctatcta gttcaacttg gaaaatcaac gtatcagtcg ggcggcctcg cttatcaacc 7320
accaatttca tattgctgta agtgtttaaa tctttacttа ttggtttcaa aacccattgg 7380
ttaagccttt taaactcatg gtagttattt tcaagcatta acatgaactt aaattcatca 7440
aggctaatct ctatatttgc cttgtgagtt ttcttttgtg ttagttcttt taataaccac 7500
tcataaatcc tcatagagta tttgttttca aaagacttaa catgttccag attatatttt 7560
atgaatttttt ttaactggaa aagataaggc aatatctctt cactaaaaac taattctaat 7620

ttttcgcttg agaacttggc atagtttgtc cactggaaaa tctcaaagcc tttaaccaaa 7680
ggatttcctga tttccacagt tctcgtcatc agctctctgg ttgctttagc taatacacca 7740
taagcatttt ccctactgat gttcatcatc tgagcgtatt ggttataagt gaacgatacc 7800
gtccgttctt tccttgtagg gttttcaatc gtggggttga gtagtgccac acagcataaa 7860
attagcttgg tttcatgctc cgttaagtca tagcgactaa tcgctagttc attgctttg 7920
aaaacaacta attcagacat acatctcaat tggtctaggt gattttaatc actataccaa 7980
ttgagatggg ctagtcaatg ataattacta gtcctttttcc tttgagttgt gggtatctgt 8040
aaatttctgct agacctttgc tggaaaactt gtaaattctg ctagacccctc tgtaaatttcc 8100
gctagacctt tgtgtgtttt ttttgtttat attcaagtgg ttataattta tagaataaag 8160
aaagaataaa aaaagataaa aagaatagat cccagccctg tgtataactc actactttag 8220
tcagttccgc agtattacaa aaggatgtcg caaacgctgt ttgctcctct acaaaacaga 8280
ccttaaaacc ctaaaggctt aagtagcacc ctcgcaagct cgggcaaatc gctgaatatt 8340
ccttttgtct ccgaccatca ggcacctgag tcgctgtctt ttttcgtgaca ttcagttcgc 8400
tgcgctcacg gctctggcag tgaatggggg taaatggcac tacaggcgcc ttttatggat 8460
tcatgcaagg aaactaccca taatacaaga aaagcccgtc acgggcttct cagggcgttt 8520
tatggcgggt ctgctatgtg gtgctatctg actttttgct gttcagcagt tcctgccctc 8580
tgattttcca gtctgaccac ttcggattat cccgtgacag gtcattcaga ctggctaatg 8640
cacccagtaa ggcagcggta tcatcaacag gctta 8675

<210> 22
<211> 8032
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata 60
cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 120
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 180
gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa 240
agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg 300
cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 360
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa 420
ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg 480
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 540
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga 600
acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 660
tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt ttttgtttg caagcagcag 720
attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 780
gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc 840
ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag 900
taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt 960
ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag 1020
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca 1080
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 1140
ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 1200
gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg 1260
tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatccccc 1320
atgttgtgca aaaaagcggt tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg 1380
gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca 1440
tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 1500
atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 1560
agaacttaa aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 1620
ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca 1680
tcttttactt tcaccagcgt tttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 1740
aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat 1800
tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa 1860
aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa 1920
accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc 1980
gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca 2040
gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt 2100
ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac 2160
catagatctg gagctgtaat ataaaaacct tcttcaacta acggggcagg ttagtgacat 2220
tagaaaaccg actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa gccagtcatt 2280
aggcctatct gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcatgat aaccatcaca 2340
aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacctt tattaatgaa 2400
ttttcctgct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ttattgatat ttaagttaaa 2460
cccagtaaat gaagtccatg gaataatага aagagaaaaa gcattttcag gtataggtgt 2520
tttgggaaac aattcccccg aaccattata tttctctaca tcagaaaggt ataaatcata 2580
aaactctttg aagtcattct ttacaggagt ccaaatacca gagaatgttt tagatacacc 2640
atcaaaaatt gtataaagtg gctctaactt atcccaataa cctaactctc cgtcgctatt 2700
gtaaccagtt ctaaaagctg tatttgagtt tatcaccctt gtcactaaga aaataaatgc 2760
agggtaaaat ttatatcctt ctttgttttat gtttcggtat aaaacactaa tatcaatttc 2820
tgtggttata ctaaaagtcg tttgttggtt caaataatga ttaaatatct cttttctctt 2880

ccaattgtct aaatcaattt tattaaagtt catttgatat gcctcctaaa tttttatcta 2940
aagtgaattt aggaggctta cttgtctgct ttcttcatta gaatcaatcc ttttttaaaa 3000
gtcaatatta ctgtaacata aatatatatt ttaaaaatat cccactttat ccaattttcg 3060
tttgttgaac taatgggtgc tttagttgaa gaataaaaga cctatgcggt gtgaaatacc 3120
gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa 3180
ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg 3240
atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa 3300
aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcactccatt ttcttctgct atcaaaataa 3360
cagactcgtg atttttccaaa cgagctttca aaaaagcctc tgcccccttgc aaatcggatg 3420
cctgtctata aaattcccga tattggttaa acagcggcgc aatggcggcc gcatctgatg 3480
tctttgcttg gcgaatgttc atcttatttc ttcctccctc tcaataattt tttcattcta 3540
tcccttttct gtaaagttta ttttcagaa tacttttatc atcatgcttt gaaaaaatat 3600
cacgataata tccattgttc tcacggaagc acacgcaggt catttgaacg aatttttcg 3660
acaggaattt gccgggactc aggagcattt aacctaaaaa agcatgacat ttcagcataa 3720
tgaacattta ctcatgtcta ttttcgttct tttctgtatg aaaatagtta tttcgagtct 3780
ctacggaaat agcgagagat gatataccta aatagagata aaatcatctc aaaaaaatgg 3840
gtctactaaa atattattcc atctattaca ataaattcac agaatagtct tttaagtaag 3900
tctactctga attttttttaa aaggagaggg taaagagtga aaacagtagt tattattgat 3960
gcattacgaa caccaattgg aaaatataaa ggcagcttaa gtcaagtaag tgccgtagac 4020
ttaggaacac atgttacaac acaacttttа aaaagacatt ccactatttc tgaagaaatt 4080
gatcaagtaa tctttggaaa tgttttacaa gctggaaatg gccaaaatcc cgcacgacaa 4140
atagcaataa acagcggttt gtctcatgaa attcccgcaa tgacggttaa tgaggtctgc 4200
ggatcaggaa tgaaggccgt tattttggcg aaacaattga ttcaattagg agaagcggaa 4260
gttttaattg ctggcgggat tgagaatatg tcccaagcac ctaaattaca acgttttaat 4320
tacgaaacag aaagctacga tgcgcctttt tctagtatga tgtatgatgg attaacggat 4380
gcctttagtg gtcaggcaat gggcttaact gctgaaaatg tggccgaaaa gtatcatgta 4440
actagagaag agcaagatca attttctgta cattcacaat taaaagcagc tcaagcacaa 4500
gcagaaggga tattcgctga cgaaatagcc ccattagaag tatcaggaac gcttgtggag 4560
aaagatgaag ggattcgccc taattcgagc gttgagaagc taggaacgct taaaacagtt 4620
tttaaagaag acggtactgt aacagcaggg aatgcatcaa ccattaatga tggggcttct 4680
gctttgatta ttgcttcaca agaatatgcc gaagcacacg gtcttcctta tttagctatt 4740
attcgagaca gtgtggaagt cggtattgat ccagcctata tgggaatttc gccgattaaa 4800
gccattcaaa aactgttagc gcgcaatcaa cttactacgg aagaaattga tctgtatgaa 4860
atcaacgaag catttgcagc aacttcaatc gtggtccaaa gagaactggc tttaccagag 4920
gaaaaggtca acatttatgg tggcggtatt tcattaggtc atgcgattgg tgccacaggt 4980
gctcgtttat taacgagttt aagttatcaa ttaaatcaaa aagaaaagaa atatggagtg 5040
gcttctttat gtatcggcgg tggcttagga ctcgctatgc tactagagag acctcagcaa 5100
aaaaaaaaca gccgatttta tcaaatgagt cctgaggaac gcctggcttc tcttcttaat 5160
gaaggccaga tttctgctga tacaaaaaaa gaatttgaaa atacggcttt atcttcgcag 5220
attgccaatc atatgattga aaatcaaatc agtgaaacag aagtgccgat gggcgttggc 5280
ttacatttaa cagtggacga aactgattat ttggtaccaa tggcgacaga agagccctca 5340
gttattgcgg ctttgagtaa tggtgcaaaa atagcacaag gatttaaaac agtgaatcaa 5400
caacgcttaa tgcgtggaca aatcgttttt tacgatgttg cagatcccga gtcattgatt 5460
gataaactac aagtaagaga agcggaagtt tttcaacaag cagagttaag ttatccatct 5520
atcgttaaac ggggcggcgg cttaagagat ttgcaatatc gtacttttga tgaatcattt 5580
gtatctgtcg acttttttagt agatgttaag gatgcaatgg gggcaaatat cgttaacgct 5640
atgttggaag gtgtggccga gttgttccgt gaatggtttg cggagcaaaa gattttattc 5700
agtatttttaa gtaattatgc cacggagtcg gttgttacga tgaaaacggc tattccagtt 5760
tcacgtttaa gtaaggggag caatggccgg gaaattgctg aaaaaattgt tttagcttca 5820
cgctatgctt cattagatcc ttatcgggca gtcacgcata acaaaggaat catgaatggc 5880
attgaagctg tagttttagc tacaggaaat gatacacgcg ctgttagcgc ttcttgtcat 5940
gctttgcgg tgaaggaagg tcgctaccaa ggcttgacta gttggacgct ggatggcgaa 6000
caactaattg gtgaaatttc agttccgctt gctttagcca cggttggcgg tgccacaaaa 6060
gtcttaccta aatctcaagc agctgctgat ttgttagcag tgacggatgc aaaagaacta 6120
agtcgagtag tagcggctgt tggtttggca caaaatttag cggcgttacg ggccttagtc 6180
tctgaaggaa ttcaaaaagg acacatggct ctacaagcac gttctttagc gatgacggtc 6240
ggagctactg gtaaagaagt tgaggcagtc gctcaacaat taaaacgtca aaaaacgatg 6300
aaccaagacc gagccatggc tattttaaat gatttaagaa aacaataaaa ggagaggtg 6360
acaattggga ttgataaaat tagttttttt gtgccccctt attatattga tatgacggca 6420
ctggctgaag ccagaaatgt agaccctgga aaatttcata ttggtattgg gcaagaccaa 6480
atggcggtga acccaatcag ccaagatatt gtgacatttg cagccaatgc cgcagaagcg 6540
atcttgacca aagaagataa agaggccatt gatatggtga ttgtcgggac tgagtccagt 6600
atcgatgagt caaaagcggc cgcagttgtc ttacatcgtt taatggggat tcaacctttc 6660
gctcgctctt tcgaaatcaa ggaagcttgt tacggagcaa cagcaggctt acagttagct 6720
aagaatcacg tagccttaca tccagataaa aaagtcttgg tcgtagcggc agatattgca 6780
aaatatggct taaattctgg cggtgagcct acacaaggag ctggggcggt tgcaatgtta 6840
gttgctagtg aaccgcgcat tttggcttta aaagaggata atgtgatgct gacgcaagat 6900
atctatgact tttggcgtcc aacaggccac ccgtatccta tggtcgatgg tccttgtca 6960
aacgaaacct acatccaatc ttttgcccaa gtctgggatg aacataaaaa acgaaccggt 7020
cttgattttg cagattatga tgctttagcg ttccatattc cttacacaaa aatgggcaaa 7080
aaagccttat tagcaaaaat ctccgaccaa actgaagcag aacaggaacg aattttagcc 7140
cgttatgaag aaagtatcgt ctatagtcgt cgcgtaggaa acttgtatac gggttcactt 7200
tatctgggac tcatttccct tttagaaaat gcaacgactt taaccgcagg caatcaaatt 7260
ggtttattca gttatggttc tggtgctgtc gctgaatttt tcactggtga attagtagct 7320
ggttatcaaa atcatttaca aaaagaaact catttagcac tgctggataa tcggacagaa 7380
cttctatcg ctgaatatga agccatgttt gcagaaactt tagacacaga cattgatcaa 7440
acgttagaag atgaattaaa atatagtatt tctgctatta ataataccgt tcgttcttat 7500
cgaaactaaa aaaaaccggc cttggccccg ccggtttttt attatttttc ttcctccgca 7560

tgttcaatcc gctccataat cgacggatgg ctcctctga aaattttaac gagaaacggc 7620
gggttgaccc ggctcagtcc cgtaacggcc aagtcctgaa acgtctcaat cgccgcttcc 7680
cggtttccgg tcagctcaat gccgtaacgg tcggcggcgt tttcctgata ccgggagacg 7740
gcattcgtaa tcgggatccc cgggtaccga gctcgaattc gtaatcatgt catagctgtt 7800
tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 7860
gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact 7920
gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 7980
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg ac 8032

<210> 23
<211> 8000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc 420
gagctcagga ggtaaaaaaa catgaaaaca gtagttatta ttgatgcatt acgaacacca 480
attggaaaat ataaaggcag cttaagtcaa gtaagtgccg tagacttagg aacacatgtt 540
acaacacaac ttttaaaaag acatttccact atttctgaag aaattgatca agtaatcttt 600
ggaaatgttt tacaagctgg aaatggccaa aatcccgcac gacaaatagc aataaacagc 660
ggtttgtctc atgaaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctgcggatc aggaatgaag 720
gccgttattt tggcgaaaca attgattcaa ttaggagaag cggaagtttt aattgctggc 780
gggattgaga atatgtccca agcacctaaa ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc 840
tacgatgcgc cttttctag tatgatgtat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag 900
gcaatgggct taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtaactag agaagagcaa 960
gatcaatttt ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaagcaga agggatattc 1020
gctgacgaaa tagccccatt agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaagggatt 1080
cgccctaatt cgagcgttga gaagctagga acgcttaaaa cagtttttaa agaagacggt 1140
actgtaacag cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg cttctgcttt gattattgct 1200
tcacaagaat atgccgaagc acacggtctt ccttatttag ctattattcg agacagtgtg 1260
gaagtcggta ttgatccagc ctatatggga atttcgccga ttaaagccat tcaaaaactg 1320
ttagcgcgca atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt 1380
gcagcaactt caatcgtggt ccaaagagaa ctggctttac cagaggaaaa ggtcaacatt 1440
tatggtggcg gtatttcatt aggtcatgcg attggtgcca caggtgctcg tttattaacg 1500
agtttaagtt atcaattaaa tcaaaaagaa aagaaatatg gagtggcttc tttatgtatc 1560
ggcggtggct taggactcgc tatgctacta gagagacctc agcaaaaaaa aaacagccga 1620
ttttatcaaa tgagtcctga ggaacgcctg gctctcttc ttaatgaagg ccagatttct 1680
gctgatacaa aaaaagaatt tgaaaatacg gctttatctt cgcagattgc caatcatatg 1740
attgaaaatc aaatcagtga aacagaagtg ccgatgggcg ttggcttaca tttaacagtg 1800
gacgaaactg attatttggt accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgcggctttg 1860
agtaatggtg caaaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt 1920
ggacaaatcg tttttacga tgttgcagat cccgagtcat tgattgataa actacaagta 1980
agagaagcgg aagttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc 2040
ggcggcttaa gagatttgca atatcgtact tttgatgaat cattgtatc tgtcgacttt 2100
ttagtagatg ttaaggatgc aatgggggca aatatcgtta acgctatgtt ggaaggtgtg 2160
gccgagttgt tccgtgaatg gtttgcggag caaaagattt tattcagtat tttaagtaat 2220
tatgccacgg agtcggttgt tacgatgaaa acggctattc cagtttcacg tttaagtaag 2280
gggagcaatg gccgggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcatta 2340
gatccttatc gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgtagtt 2400
ttagctacag gaaatgatac acgcgcgtgt agcgcttctt gtcatgcttt tgcggtgaag 2460
gaaggtcgct accaaggctt gactagttgg acgctggatg gcgaacaact aattggtgaa 2520
atttcagttc cgcttgcttt agccacggtt ggcggtgcca caaaagtctt acctaaatct 2580
caagcagctg ctgatttgtt agcagtgacg gatgcaaaag aactaagtcg agtagtagcg 2640
gctgttggtt tggcacaaaa tttagcggcg ttacgggcct tagtctctga aggaattcaa 2700
aaaggacaca tggctctaca agcacgttct ttagcgatga cggtcggagc tactggtaaa 2760
gaagttgagg cagtcgctca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgatgaacca agaccgagcc 2820
atggctattt taaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaaacat gacaattggg 2880
attgataaaa ttagttttct tgtgcccccc tattatattg atatgacggc actggctgaa 2940
gccagaaatg tagacgctgg aaaatttcat attggtattg ggcaagacca aatggcggtg 3000
aacccaatca gccaagatat tgtgacattt gcagccaatg ccgcagaagc gatcttgacc 3060
aaagaagata aagaggccat tgatatggtg attgtcggga ctgagtccag tatcgatgag 3120
tcaaaagcgg ccgcagttgt cttacatcgt ttaatgggga ttcaaccttt cgctcgctct 3180
ttcgaaatca aggaagcttg ttacggagca acagcaggct tacagttagc taagaatcac 3240
gtagccttac atccagataa aaaagtcttg gtcgtagcgg cagatattgc aaaatatggc 3300
ttaaatttctg gcggtgagcc tacacaagga gctggggcgg ttgcaatgtt agttgctagt 3360
gaaccgcgca ttttggcttt aaaagaggat aatgtgatgc tgacgcaaga tatctatgac 3420
ttttggcgtc caacaggcca cccgtatcct atggtcgatg gtcctttgtc aaacgaaacc 3480

tacatccaat ctttgccca agtctgggat gaacataaaa aacgaaccgg tcttgatttt 3540
gcagattatg atgctttagc gttccatatt ccttacacaa aaatgggcaa aaaagcctta 3600
ttagcaaaaa tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaattttagc ccgttatgaa 3660
gaaagtatcg tctatagtcg tcgcgtagga aacttgtata cgggttcact ttatctggga 3720
ctcatttccc ttttagaaaa tgcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaat tggtttattc 3780
agttatggtt ctggtgctgt cgctgaattt ttcactggtg aattagtagc tggttatcaa 3840
aatcatttac aaaaagaaac tcatttagca ctgctggata atcggacaga actttctatc 3900
gctgaatatg aagccatgtt tgcagaaact ttagacacag acattgatca aacgttagaa 3960
gatgaattaa aatataglat ttctgctatt aataataccg ttcgttctta tcgaaactaa 4020
gagatctgca gctggtacca tatgggaatt cgaagcttgg gcccgaacaa aaactcatct 4080
cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg 4140
tctccagctt ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc 4200
agaacgcaga agcggtctga taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cggtggtccc 4260
acctgacccc atgccgaact cagaagtgaa acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc 4320
tccccatgcg agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag 4380
actgggcctt tcgttttatc tgttgtttgt cggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc 4440
cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg agggtggcgg gcaggacgcc 4500
cgccataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg 4560
cgtttctaca aactcttttt gtttatttttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat 4620
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 4680
acatttccgt gtcgcccttа ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca 4740
cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 4800
catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt 4860
tccaatgatg agcacttttа aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtgttgacgc 4920
cgggcaagag caactcggtc gccgcatаca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 4980
accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc 5040
cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 5100
ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 5160
accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 5220
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 5280
attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc 5340
ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 5400
tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 5460
tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa 5520
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 5580
ttttttaatt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 5640
ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 5700
ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 5760
agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 5820
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 5880
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 5940
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 6000
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 6060
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 6120
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 6180
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 6240
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 6300
cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggccttt gctcacatgt tctttcctgc 6360
gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg 6420
ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcctgat 6480
gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag 6540
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac 6600
tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccctg acgggcttgt 6660
ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag 6720
aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagcaga tcaattcgcg cgcgaaggcg 6780
aagcggcatg catttacgtt gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc ggtatggcat 6840
gatagcgccc ggaagagagt caattcaggg tggtgaatgt gaaaccagta acgttatacg 6900
atgtcgcaga gtatgccggt gtctcttatc agaccgtttc ccgcgtggtg aaccaggcca 6960
gccacgtttc tgcgaaaacg cgggaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca 7020
ttcccaaccg cgtggcacaa caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca 7080
cctccagtct ggccctgcac gcgccgtcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgccg 7140
atcaactggg tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta 7200
aagcggcggt gcacaatctt ctcgcgcaac gcgtcagtgg gctgatcatt aactatccgc 7260
tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatttc 7320
ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatttt ctcccatgaa gacggtacgc 7380
gactgggcgt ggagcatctg gtcgcattgg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggcc 7440
cattaagttc tgtctcggcg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctcactcgca 7500
atcaaattca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac 7560
aaaccatgca aatgctgaat gagggcatcg ttcccactgc gatgctggtt gccaacgatc 7620
agatggcgct gggcgcaatg cgcgccatta ccgagtccgg gctgcgcgtt ggtgcggata 7680
tctcggtagt gggatacgac gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgtcaacca 7740
ccatcaaaca ggattttcgc ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct 7800
ctcagggcca ggcggtgaag ggcaatcagc tgttgcccgt ctcactggtg aaaagaaaaa 7860
ccaccctggc gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc 7920
agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg 7980
agttagcgcg aattgatctg 8000

<210> 24
<211> 10433
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24
cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagattc tgaaatgagc 60
tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 120
acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa caatttatca 180
gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta aaaattaaag 240
aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc gagctcagga 300
ggtaaaaaaa catgaaaaca gtagttatta ttgatgcatt acgaacacca attggaaaat 360
ataaaggcag cttaagtcaa gtaagtgccg tagacttagg aacacatgtt acaacacaac 420
ttttaaaaag acatttccact atttctgaag aaattgatca agtaatcttt ggaaatgttt 480
tacaagctgg aaatggccaa aatcccgcac gacaaatagc aataaacagc ggttgtctc 540
atgaaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctgcggatc aggaatgaag gccgttattt 600
tggcgaaaca attgattcaa ttaggagaag cggaagtttt aattgctggc gggattgaga 660
atatgtccca agcacctaaa ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc tacgatgcgc 720
cttttctag tatgatgtat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag gcaatgggct 780
taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtaactag agaagagcaa gatcaatttt 840
ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaagcaga agggatattc gctgacgaaa 900
tagccccatt agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaagggatt cgccctaatt 960
cgagcgttga gaagctagga acgcttaaaa cagtttttaa agaagacggt actgtaacag 1020
cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg cttctgcttt gattattgct tcacaagaat 1080
atgccgaagc acacggtctt cctttatttag ctattattcg agacagtgtg gaagtcggta 1140
ttgatccagc ctatatggga atttcgccga ttaaagccat tcaaaaactg ttagcgcgca 1200
atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt gcagcaactt 1260
caatcgtggt ccaaagagaa ctggctttac cagaggaaaa ggtcaacatt tatggtggcg 1320
gtatttcatt aggtcatgcg attggtgcca caggtgctcg tttattaacg agtttaagtt 1380
atcaattaaa tcaaaaagaa aagaaatatg gagtggcttc tttatgtatc ggcggtggct 1440
taggactcgc tatgctacta gagagacctc agcaaaaaaa aaacagccga ttttatcaaa 1500
tgagtcctga ggaacgcctg gctttctttc ttaatgaagg ccagatttct gctgatacaa 1560
aaaaagaatt tgaaaatacg gctttatctt cgcagattgc caatcatatg attgaaaatc 1620
aaatcagtga aacagaagtg ccgatgggcg ttggcttaca tttaacagtg gacgaaactg 1680
attattggt accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgcggctttg agtaatggtg 1740
caaaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt ggacaaatcg 1800
tttttacga tgttgcagat cccgagtcat tgattgataa actacaagta agagaagcgg 1860
aagttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc ggcggcttaa 1920
gagatttgca atatcgtact tttgatgaat catttgtatc tgtcgacttt ttagtagatg 1980
ttaaggatgc aatgggggca aatatcgtta acgctatgtt ggaaggtgtg gccgagttgt 2040
tccgtgaatg gtttgcggag caaaagattt tattcagtat tttaagtaat tatgccacgg 2100
agtcggttgt tacgatgaaa acggctattc cagtttcacg tttaagtaag gggagcaatg 2160
gccgggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcatta gatccttatc 2220
gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgtagtt ttagctacag 2280
gaaatgatac acgcgctgtt agcgcttctt gtcatgcttt tgcggtgaag gaaggtcgct 2340
accaaggctt gactagttgg acgctggatg gcgaacaact aattggtgaa atttcagttc 2400
cgcttgcttt agccacggtt ggcggtgcca caaaagtctt acctaaatct caagcagctg 2460
ctgatttgtt agcagtgacg gatgcaaaag aactaagtcg agtagtagcg gctgttggtt 2520
tggcacaaaa tttagcggcg ttacgggcct tagtcttctga aggaattcaa aaaggacaca 2580
tggctctaca agcacgttct ttagcgatga cggtcggagc tactggtaaa gaagttgagg 2640
cagtcgctca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgatgaacca agaccgagcc atggctattt 2700
taaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaaacat gacaattggg attgataaaa 2760
ttagtttttt tgtgcccccc tattatattg atatgacggc actggctgaa gccagaaatg 2820
tagaccctgg aaaatttcat attggtattg ggcaagacca aatggcggtg aacccaatca 2880
gccaagatat tgtgacattt gcagccaatg ccgcagaagc gatcttgacc aaagaagata 2940
aagaggccat tgatatggtg attgtcggga ctgagtccag tatcgatgag tcaaaagcgg 3000
ccgcagttgt cttacatcgt ttaatgggga ttcaaccttt cgctcgctct ttcgaaatca 3060
aggaagcttg ttacggagca acagcaggct tacagttagc taagaatcac gtagccttac 3120
atccagataa aaaagtcttg gtcgtagcgg cagatattgc aaaatatggc ttaaattctg 3180
gcggtgagcc tacacaagga gctggggcgg ttgcaatgtt agttgctagt gaaccgcgca 3240
ttttggcttt aaaagaggat aatgtgatgc tgacgcaaga tatctatgac ttttggcgtc 3300
caacaggcca cccgtatcct atggtcgatg gtccttgtc aaacgaaacc tacatccaat 3360
ctttgccca agtctgggat gaacataaaa aacgaaccgg tcttgatttt gcagattatg 3420
atgctttagc gttccatatt ccttacacaa aaatgggcaa aaaagcctta ttagcaaaaa 3480
tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaattttagc ccgttatgaa gaaagtatcg 3540
tctatagtcg tcgcgtagga aacttgtata cgggttcact ttatctggga ctcatttccc 3600
ttttagaaaa tgcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaat tggtttattc agttatggtt 3660
ctggtgctgt cgctgaattt ttcactggtg aattagtagc tggttatcaa aatcatttac 3720
aaaaagaaac tcatttagca ctgctggata atcggacaga actttctatc gctgaatatg 3780
aagccatgtt tgcagaaact ttagacacag acattgatca aacgttagaa gatgaattaa 3840
aatatagtat ttctgctatt aataataccg ttcgttctta tcgaaactaa agatctgcat 3900
cctgcattcg ccctttaggag gtaaaaaaac atgtgtgcga cctcttctca atttactcag 3960
attaccgagc ataattcccg tcgttccgca aactatcagc caaacctgtg gaatttcgaa 4020
ttcctgcaat ccctggagaa cgaccttgaaa gtggaaaagc tggaggagaa agcgaccaaa 4080

ctggaggaag aagttcgctg catgatcaac cgtgtagaca cccagccgct gtccctgctg 4140
gagctgatcg acgatgtgca gcgcctgggt ctgacctaca aatttgaaaa agacatcatt 4200
aaagccctgg aaaacatcgt actgctggac gaaaacaaaa agaacaaatc tgacctgcac 4260
gcaaccgctc tgtctttccg tctgctgcgt cagcacggtt tcgaggtttc tcaggatgtt 4320
tttgagcgtt tcaaggataa agaaggtggt ttcagcggtg aactgaaagg tgacgtccaa 4380
ggcctgctga gcctgtatga agcgtcttac ctgggtttcg agggtgagaa cctgctggag 4440
gaggcgcgta cctttttcat cacccacctg aagaacaacc tgaaagaagg cattaatacc 4500
aaggttgcag aacaagtgag ccacgccctg gaactgccat atcaccagcg tctgcaccgt 4560
ctggaggcac gttggttcct ggataaatac gaaccgaaag aaccgcatca ccagctgctg 4620
ctggagctgg cgaagctgga ttttaacatg gtacagaccc tgcaccagaa agagctgcaa 4680
gatctgtccc gctggtggac cgagatgggc ctggctagca aactggattt tgtacgcgac 4740
cgcctgatgg aagtttattt ctgggcactg ggtatggcgc cagacccgca gtttggtgaa 4800
tgtcgcaaag ctgttactaa aatgtttggt ctggtgacga tcatcgatga cgtgtatgac 4860
gtttatggca ctctggacga actgcaactg ttcaccgatg ctgtagagcg ctgggacgtt 4920
aacgctatta acaccctgcc ggactatatg aaactgtgtt tcctggcact gtacaacacc 4980
gttaacgaca cgtcctattc tattctgaaa gagaaaggtc ataacaacct gtcctatctg 5040
acgaaaagct ggcgtgaact gtgcaaagcc tttctgcaag aggcgaaatg gtccaacaac 5100
aaaattatcc cggcttctc caagtacctg gaaaacgcca gcgtttcctc ctccggtgta 5160
gcgctgctgg cgccgtctta ctttccgta tgccagcagc aggaagacat ctccgaccac 5220
gcgctgcgtt ccctgaccga cttccatggt ctggtgcgtt ctagctgcgt tatcttccgc 5280
ctgtgcaacg atctggccac ctctgcggcg gagctggaac gtggcgagac taccaattct 5340
atcattagct acatgcacga aaacgatggt accagcgagg aacaggcccg cgaagaactg 5400
cgtaaactga tcgacgccga atggaaaaag atgaatcgtg aacgcgttag cgactccacc 5460
ctgctgccta aagcgttcat ggaaatcgca gttaacatgg cacgtgtttc ccactgcacc 5520
taccagtatg gcgatggtct gggtcgccca gactacgcga ctgaaaaccg catcaaactg 5580
ctgctgattg accctttccc gattaaccag ctgatgtatg tctaactgca gctggtacca 5640
tatgggaatt cgaagcttgg gcccgaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc 5700
gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg tctccagctt ggctgttttg 5760
gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc agaacgcaga agcggtctga 5820
taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cggtggtccc acctgacccc atgccgaact 5880
cagaagtgaa acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc tccccatgcg agagtaggga 5940
actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag actgggcctt tcgttttatc 6000
tgttgtttgt cggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc cgccgggagc ggatttgaac 6060
gttgcgaagc aacggcccgg agggtggcgg gcaggacgcc cgccataaac tgccaggcat 6120
caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg cgtttctaca aactcttttt 6180
gtttatttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa 6240
tgcttcaata atctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt 6300
gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg 6360
tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag 6420
ccagcccga cacccgccaa cacccgctga cgagcttagt aaagccctcg ctagatttta 6480
atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc cagcctttca 6540
tgatatatct cccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc ttaaaaataa taaaagcaga 6600
cttgacctga tagtttggct gtgagcaatt atgtgcttag tgcatctaac gcttgagtta 6660
agccgcgccg cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgtta gacattattt gccgactacc 6720
ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca actgatctgc gcgcgaggcc 6780
aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac gggctgatac 6840
tgggccggca ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat ccttcggcgc gattttgccg 6900
gttactgcgc tgtaccaaat gcgggacaac gtaagcacta catttcgctc atcgccagcc 6960
cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta gcgcctcaaa tagatcctgt 7020
tcaggaaccg gatcaaagag ttcctccgcc gctggaccta ccaaggcaac gctatgttct 7080
cttgctttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggctc gaagatacct 7140
gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc tggataacgc 7200
cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgcggag aatctcgctc 7260
tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg cgttgtttca 7320
tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt caggccgcca 7380
tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg gcgctcgatg 7440
acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc cctcatgatg 7500
tttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat cgttgctgct ccataacatc 7560
aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttggatg cccgaggcat agactgtacc 7620
ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc accgctgcgt 7680
tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgct acttgcatta cagcttacga 7740
accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gccttcatcc gtttccacgg tgtgcgtcac 7800
ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc gaacgagcgc 7860
aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt ctacggcaag 7920
gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggaa gacctcggcc gtcgcggcgc 7980
ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcatcc tcggttttct ggaaggcgag 8040
catcgtttgt tcgcccagct tctgtatgga acgggcatgc ggatcagtga gggtttgcaa 8100
ctgcgggtca aggatctgga tttcgatcac ggcacgatca tcgtgcggga gggcaagggc 8160
tccaaggatc gggccttgat gttacccgag agcttggcac ccagcctgcg cgagcagggg 8220
aattaattcc cacgggtttt gctgcccgca aacgggctgt tctggtgttg ctagtttgtt 8280
atcagaatcg cagatccggc ttcagccggt ttgccggctg aaagcgctat ttcttccaga 8340
attgccatga ttttttcccc acgggaggcg tcactggctc ccgtgttgtc ggcagctttg 8400
attcgataag cagcatcgcc tgtttcaggc tgctatgtgg tgactgttga gctgtaacaa 8460
gttgtctcag gtgttcaatt tcatgttcta gttgctttgt tttactggtt tcacctgttc 8520
tattaggtgt tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcatgg tgaacagctt 8580
tgaatgcacc aaaaactcgt aaaagctctg atgtatctat ctttttttaca ccgttttcat 8640
ctgtgcatat ggacagtttt ccctttgata tgtaacggtg aacagttgtt ctacttttgt 8700
ttgttagtct tgatgcttca ctgatagata caagagccat aagaacctca gatccttccg 8760

tatttagcca gtatgttctc tagtgtggtt cgttgttttt gcgtgagcca tgagaacgaa 8820
ccattgagat catacttact ttgcatgtca ctcaaaaatt ttgcctcaaa actggtgagc 8880
tgaatttttg cagttaaagc atcgtgtagt gttttttctta gtccgttatg taggtaggaa 8940
tctgatgtaa tggttgttgg tattttgtca ccattcattt ttatctggtt gttctcaagt 9000
tcggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttgga aaatcaacgt atcagtcggg 9060
cggcctcgct tatcaaccac caatttcata ttgctgtaag tgtttaaatc tttacttatt 9120
ggtttcaaaa cccattggtt aagcctttta aactcatggt agttatttte aagcattaac 9180
atgaacttaa attcatcaag gctaatctct atatttgcct tgtgagtttt cttttgtgtt 9240
agttctttta ataaccactc ataaatcctc atagagtatt tgttttcaaa agacttaaca 9300
tgttccagat tatattttat gaatttttttt aactggaaaa gataaggcaa tatctcttca 9360
ctaaaaacta attctaattt ttcgcttgag aacttggcat agtttgtcca ctggaaaatc 9420
tcaaagcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag ctctctggtt 9480
gctttagcta atacaccata agcatttttcc ctactgatgt tcatcatctg agcgtattgg 9540
ttataagtga acgataccgt ccgttctttc cttgtagggt tttcaatcgt ggggttgagt 9600
agtgccacac agcataaaat tagcttggtt tcatgctccg ttaagtcata gcgactaatc 9660
gctagttcat ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattg gtctaggtga 9720
ttttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgat aattactagt ccttttcctt 9780
tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag acctttgctg gaaaacttgt aaattctgct 9840
agacccttctg taaattccgc tagacctttg tgtgtttttt ttgtttatat tcaagtggtt 9900
ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc cagccctgtg 9960
tataactcac tactttagtc agttccgcag tattacaaaa ggatgtcgca aacgctgttt 10020
gctcctctac aaaacagacc ttaaaaccct aaaggcttaa gtagcaccct cgcaagctcg 10080
ggcaaatcgc tgaatattcc ttttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc gctgtctttt 10140
tcgtgacatt cagttcgctg cgctcacggc tctggcagtg aatgggggta aatggcacta 10200
caggcgcctt ttatggattc atgcaaggaa actacccata atacaagaaa agcccgtcac 10260
gggcttctca gggcgttta tggcgggtct gctatgtggt gctatctgac ttttgctgt 10320
tcagcagttc ctgccctctg attttccagt ctgaccactt cggattatcc cgtgacaggt 10380
cattcagact ggctaatgca cccagtaagg cagcggtatc atcaacaggc tta 10433

<210> 25
<211> 10356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25
caagaaaaat gccccgctta cgcagggcat ccatttatta ctcaaccgta accgattttg 60
ccaggttacg cggctggtca acgtcggtgc ctttgatcag cgcgacatgg taagccagca 120
gctgcagcgg aacggtgtag aagatcggtg caatcacctc ttccacatgc ggcatctcga 180
tgatgtgcat gttatcgcta cttacaaaac ccgcatcctg atcggcgaag acatacaact 240
gaccgccacg cgcgcgaact tcttcaatgt tggatttcag tttttccagc aattcgttgt 300
tcggtgcaac aacaataacc ggcatatcgg catcaattag cgccagcgga ccgtgtttca 360
gttcgccagc agcgtaggct tcagcgtgaa tgtaagagat ctctttcaac ttcaatgcgc 420
cttccagcgc gattgggtac tgatcgccac ggcccaggaa cagcgcgtga tgtttgtcag 480
agaaatcttc tgccagcgct tcaatgcgtt tgtcctgaga cagcatctgc tcaatacggc 540
tcggcagcgc ctgcagacca tgcacgatgt catgttcaat ggaggcatcc agacctttca 600
ggcgagacag cttcgccacc agcatcaaca gcacagttaa ctgagtggtg aatgctttag 660
tggatgccac gccgatttct gtacccgcgt tggtcattag cgccagatcg gattcgcgca 720
ccagagaaga acccggaacg ttacagattg ccagtgaacc aaggtaaccc agctctttcg 780
acagacgcag gccagccagg gtatccgcgg tttcgccaga ctgtgacacg atcgcccttc 840
ccaacagttg cgcagcctat acgtacggca gtttaaggtt tacacctata aaagagagag 900
ccgttatcgt ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgccgg ggcgacggat 960
ggtgatcccc ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctcccgtg aactttaccc 1020
ggtggtgcat atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc 1080
ggtctccgtt atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg acatcaaaaa 1140
cgccattaac ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc atgagattat caaaaaggat 1200
cttcacctag atccttttca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gaccccggat 1260
gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt 1320
agcttgcagt gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga 1380
accggaattg ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg 1440
gatggctttc tcgccgccaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagctctg atcaagagac 1500
aggatgagga tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc 1560
ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc 1620
cgccgtgttc cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgaccctgtc 1680
cggtgccctg aatgaactgc aagacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg 1740
cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt 1800
gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc 1860
catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gcccattcga 1920
ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga 1980
tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct 2040
caaggcgagc atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc 2100
gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt 2160
ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag agcttggcgg 2220
cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat 2280

cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgaattatt aacgcttaca atttcctgat 2340
gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatacagg tggcacttit 2400
cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat 2460
ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat agcacgtgag gagggccacc 2520
atggccaagt tgaccagtgc cgttccggtg ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc 2580
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cctagtaacg gccgccagtg tgctggaatt 2640
caggcagttc aacctgttga tagtacgtac taagctctca tgtttcacgt actaagctct 2700
catgtttaac gtactaagct ctcatgttta acgaactaaa ccctcatggc taacgtacta 2760
agctctcatg gctaacgtac taagctctca tgtttcacgt actaagctct catgtttgaa 2820
caataaaatt aatataaatc agcaacttaa atagcctcta aggttttaag ttttataaga 2880
aaaaaaagaa tatataaggc ttttaaagct tttaaggttt aacggttgtg gacaacaagc 2940
cagggatgta acgcactgag aagcccttag agcctctcaa agcaattttc agtgacacag 3000
gaacacttaa cggctgacag cctgaattct gcagatatct gttttccac tcttcgttca 3060
ctttcgccag gtagctggtg aagacgaagg aagtcccgga gccatctgcg cggcgtacta 3120
cagcaatgtt ttgtgaaggc agtttcagac ccggattcag tttggcgatg gcttcatcat 3180
cccacttctt gattttgccc aggtagatgt cgccgagggt tttaccatcc agcaccagtt 3240
cgccagactt cagccctgga atgttaaccg ccagcaccac gccgccaatc acggtcggga 3300
actggaacag accttcctga gccagttttt cgtcagacag cggcgcgtca gaggcaccaa 3360
aatcaacggt attagcgata atctgtttta cgccaccgga agaaccgata ccctggtagt 3420
taacttttatt accggtttct ttctggtaag tgtcagccca tttggcatac accggcgcag 3480
ggaaggttgc acctgcacct gtcaggcttg cttctgcaaa cacagagaaa gcactcatcg 3540
ataaggtcgc ggcgacaaca gttgcgacgg tggtacgcat aactttcata atgtctcctg 3600
ggaggattca taaagcattg tttgtttggct acgagaagca aaataggaca aacaggtgac 3660
agttatatgt aaggaatatg acagttttat gacagagaga taaagtcttc agtctgattt 3720
aaataagcgt tgatattcag tcaattacaa acattaataa cgaagagatg acagaaaaat 3780
tttcattctg tgacagagaa aaagtagccg aagatgacgg tttgtcacat ggagttggca 3840
ggatgtttga ttaaaagcaa ttaaccctca ctaaagggcg gccgcgaagt tcctattctc 3900
tagaaagtat aggaacttca ttctaccggg taggggaggc gcttttccca aggcagtctg 3960
gagcatgcgc tttagcagcc ccgctgggca cttggcgcta cacaagtggc ctctggcctc 4020
gcacacattc cacatccacc ggtaggcgcc aaccggctcc gttctttggt ggccccttcg 4080
cgccaccttc cactcctccc ctagtcagga agttcccccc cgccccgcag ctcgcgtcgt 4140
gcaggacgtg acaaatggaa gtagcacgtc tcactagtct cgtgcagatg gacagcaccg 4200
ctgagcaatg gaagcgggta ggccttiggg gcagcggcca atagcagctt tgctccttcg 4260
ctttctgggc tcagaggctg ggaaggggtg ggtccggggg cgggctcagg ggcgggctca 4320
ggggcggggc gggcgcccga aggtcctccg gaggcccggc attctgcacg cttcaaaagc 4380
gcacgtctgc cgcgctgttc tcctcttcct catctccggg cctttcgacc tgcagcagca 4440
cgtgttgaca attaatcatc ggcatagtat atcggcatag tataatacga caaggtgagg 4500
aactaaacca tggagaaaaa aatcactgga tataccaccg ttgatatatc ccaatggcat 4560
cgtaaagaac attttgaggc atttcagtca gttgctcaat gtacctataa ccagaccgtt 4620
cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcacaa gttttatccg 4680
gcctttattc acattcttgc ccgcctgatg aatgctcatc cggaattccg tatggcaatg 4740
aaagacggtg agctggtgat atgggatagt gttcacccit gttacaccgt tttccatgag 4800
caaactgaaa cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg gcagtttcta 4860
cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctattt ccctaaaggg 4920
tttattgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcac cagttttgat 4980
ttaaacgtgg ccaatatgga caacttcttc gcccccgttt tcaccatggg caaatattat 5040
acgcaaggcg acaaggtgct gatgccgctg gcgattcagg ttcatcatgc cgtttgtgat 5100
ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgatga gtggcagggc 5160
ggggcgtaag cgggactctg gggttcgaat aaagaccgac caagcgacgt ctgagagctc 5220
cctggcgaat tcggtaccaa taaaagagct ttatttttcat gatctgtgtg ttggtttttg 5280
tgtgcggcgc ggaagttcct attctctaga aagtatagga acttcctcga gccctatagt 5340
gagtcgtatt agcccttgac gatgccacat cctgagcaaa taattcaacc actaattgtg 5400
agcggataac acaaggagga aacagctatg tcattaccgt tcttaactic tgcaccggga 5460
aaggttatta ttttttggtga acactctgct gtgtacaaca agcctgccgt cgctgctagt 5520
gtgtctgcgt tgagaaccta cctgctaata agcgagtcat ctgcaccaga tactattgaa 5580
ttggacttcc cggacattag ctttaatcat aagtggtcca tcaatgattt caatgccatc 5640
accgaggatc aagtaaactc ccaaaaattg gccaaggctc aacaagccac cgatggcttg 5700
tctcaggaac tcgttagtct tttggatccg ttgttagctc aactatccga atccttccac 5760
taccatgcag cgttttgttt cctgtatatg tttgtttgcc tatgcccccа tgccaagaat 5820
attaagtttt ctttaaagtc tactttaccc atcggtgctg ggttgggctc aagcgcctct 5880
atttctgtat cactggcctt agctatggcc tacttggggg ggttaatagg atctaatgac 5940
ttggaaaaagc tgtcagaaaa cgataagcat atagtgaatc aatgggcctt cataggtgaa 6000
aagtgtattc acggtacccc ttcaggaata gataacgctg tggccactta tggtaatgcc 6060
ctgctattig aaaaagactc acataatgga acaataaaca caaacaattt taagttctta 6120
gatgatttcc cagccattcc aatgatccta acctatacta gaattccaag gtctacaaaa 6180
gatcttgttg ctcgcgttcg tgtgttggtc accgagaaat ttcctgaagt tatgaagcca 6240
attctagatg ccatgggtga atgtgcccta caaggcttag agatcatgac taagttaagt 6300
aaatgtaaag gcaccgatga cgaggctgta gaaactaata atgaactgta tgaacaacta 6360
ttggaattga taagaataaa tcatggactg cttgtctcaa tcggtgtttc tcatcctgga 6420
ttagaactta ttaaaaatct gagcgatgat ttgagaattg gctccacaaa acttaccggt 6480
gctggtggcg gcggttgctc tttgacttig ttacgaagag acattactca agagcaaatt 6540
gacagcttca aaaagaaatt gcaagatgat tttagttacg agacatttga aacagacttg 6600
ggtgggactg gctgctgttt gttaagcgca aaaaatttga ataaagatct taaaatcaaa 6660
tccctagtat tccaattatt tgaaaataaa actaccacaa agcaacaaat tgacgatcta 6720
ttattgccag gaaacacgaa tttaccatgg acttcataag ctaatttgcg ataggcctgc 6780
acccttaagg aggaaaaaaa catgtcagag ttgagagcct tcagtgcccc agggaaagcg 6840
ttactagctg gtggatattt agttttagat acaaaatatg aagcatttgt agtcggatta 6900
tcggcaagaa tgcatgctgt agcccatcct tacggttcat tgcaagggtc tgataagttt 6960

gaagtgcgtg tgaaaagtaa acaatttaaa gatggggagt ggctgtacca tataagtcct 7020
aaaagtggct tcattcctgt ttcgataggc ggatctaaga accctttcat tgaaaaagtt 7080
atcgctaacg tatttagcta ctttaaacct aacatggacg actactgcaa tagaaacttg 7140
ttcgttattg atatttttctc tgatgatgcc taccatttctc aggaggatag cgttaccgaa 7200
catcgtggca acagaagatt gagttttcat tcgcacagaa ttgaagaagt tcccaaaaca 7260
gggctgggct cctcggcagg tttagtcaca gttttaacta cagctttggc ctcctttttt 7320
gtatcggacc tggaaaataa tgtagacaaa tatagagaag ttatttcataa tttagcacaa 7380
gttgctcatt gtcaagctca gggtaaaatt ggaagcgggt ttgatgtagc ggcggcagca 7440
tatggatcta tcagatatag aagatttccca cccgcatttaa tctctaattt gccagatatt 7500
ggaagtgcta cttacggcag taaactggcg catttggttg atgaagaaga ctggaatatt 7560
acgattaaaa gtaaccattt accttcggga ttaactttat ggatgggcga tattaagaat 7620
ggttcagaaa cagtaaaact ggtccagaag gtaaaaaatt ggtatgattc gcatatgcca 7680
gaaagcttga aaatatatac agaactcgat catgcaaatt ctagatttat ggatggacta 7740
tctaaactag atcgcttaca cgagactcat gacgattaca gcgatcagat atttgagtct 7800
cttgagagga atgactgtac ctgtcaaaag tatcctgaaa tcacagaagt tagagatgca 7860
gttgccacaa ttagacgttc ctttagaaaa ataactaaag aatctggtgc cgatatcgaa 7920
cctcccgtac aaactagctt attggatgat tgccagacct taaaaggagt tcttacttgc 7980
ttaatacctg gtgctggtgg ttatgacgcc attgcagtga ttactaagca agatgttgat 8040
cttagggctc aaaccgctaa tgacaaaaga ttttctaagg ttcaatggct ggatgtaact 8100
caggctgact ggggtgttag gaaagaaaaa gatccggaaa cttatcttga taaataactt 8160
aaggtagctg catgcagaat tcgcccttaa ggaggaaaaa aaaatgaccg tttacacagc 8220
atccgttacc gcacccgtca acatcgcaac ccttaagtat tgggggaaaa gggacacgaa 8280
gttgaatctg cccaccaatt cgtccatatc agtgacttta tcgcaagatg acctcagaac 8340
gttgacctct gcggctactg cacctgagtt tgaacgcgac actttgtggt taaatggaga 8400
accacacagc atcgacaatg aaagaactca aaattgtctg cgcgacctac gccaattaag 8460
aaaggaaatg gaatcgaagg acgcctcatt gcccacatta tctcaatgga aactccacat 8520
tgtctccgaa aataacttic ctacagcagc tggtttagct tcctccgctg ctggctttgc 8580
tgcattggtc tctgcaattg ctaagttata ccaattacca cagtcaactt cagaaatatc 8640
tagaatagca agaaaggggt ctggttcagc ttgtagatcg ttgtttggcg gatacgtggc 8700
ctgggaaatg ggaaaagctg aagatggtca tgattccatg gcagtacaaa tcgcagacag 8760
ctctgactgg cctcagatga aagcttgtgt cctagttgtc agcgdtatta aaaaggatgt 8820
gagttccact cagggtatgc aattgaccgt ggcaacctcc gaactattta aagaaagaat 8880
tgaacatgtc gtaccaaaga gatttgaagt catgcgtaaa gccattgttg aaaaagattt 8940
cgccaccttt gcaaaggaaa caatgatgga ttccaactct ttccatgcca catgtttgga 9000
ctctttccct ccaatattct acatgaatga cacttccaag cgtatcatca gttggtgcca 9060
caccattaat cagttttacg gagaaacaat cgttgcatac acgtttgatg caggtccaaa 9120
tgctgtgttg tactacttag ctgaaaatga gtcgaaactc tttgcattta tctataaatt 9180
gtttggctct gttcctggat gggacaagaa atttactact gagcagcttg aggctttcaa 9240
ccatcaattt gaatcatcta actttactgc acgtgaattg gatcttgagt tgcaaaagga 9300
tgttgccaga gtgattttaa ctcaagtcgg ttcaggccca caagaaacaa acgaatcttt 9360
gattgacgca aagactggtc taccaaagga ataagatcaa ttcgctgcat cgcccttagg 9420
aggtaaaaaa aaatgactgc cgacaacaat agtatgcccc atggtgcagt atctagttac 9480
gccaaattag tgcaaaacca aacacctgaa gacattttgg aagagtttcc tgaaattatt 9540
ccattacaac aaagacctaa tacccgatct agtgagacgt caaatgacga aagcggagaa 9600
acatgttttt ctggtcatga tgaggagcaa attaagttaa tgaatgaaaa ttgtattgtt 9660
ttggattggg acgataatgc tattggtgcc ggtaccaaga aagtttgtca tttaatggaa 9720
aatattgaaa agggtttact acatcgtgca ttctccgtct ttatttttcaa tgaacaaggt 9780
gaattacttt tacaacaaag agccactgaa aaaataactt tccctgatct ttggactaac 9840
acatgctgct ctcatccact atgtattgat gacgaattag gtttgaaggg taagctagac 9900
gataagatta agggcgctat tactgcggcg gtgagaaaac tagatcatga attaggtatt 9960
ccagaagatg aaactaagac aaggggtaag tttcactttt taaacagaat ccattacatg 10020
gcaccaagca atgaaccatg gggtgaacat gaaattgatt acatcctatt ttataagatc 10080
aacgctaaag aaaacttgac tgtcaaccca aacgtcaatg aagttagaga cttcaaatgg 10140
gtttcaccaa atgatttgaa aactatgttt gctgacccaa gttacaagtt tacgccttgg 10200
tttaagatta tttgcgagaa ttacttattc aactggtggg agcaattaga tgacctttct 10260
gaagtggaaa atgacaggca aattcataga atgctataac aacgcgtcta caaataaaaa 10320
aggcacgtca gatgacgtgc cttttttctt ggggcc 10356

<210> 26
<211> 6974
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26
gtgcggccgc aagcttgtcg acggagctcg aattcggatc cctgcagtta gacatacatc 60
agctggttaa tcgggaaagg gtcaatcagc agcagtttga tgcggttttc agtcgcgtag 120
tctgggcgac ccagaccatc gccatactgg taggtgcagt gggaaacacg tgccatgtta 180
actgcgattt ccatgaacgc tttaggcagc agggtggagt cgctaacgcg ttcacgattc 240
atcttttccc attcggcgtc gatcagttta cgcagttctt cgcgggcctg ttcctcgctg 300
gtaccatcgt tttcgtgcat gtagctaatg atagaattgg tagtctcgcc acgttccagc 360
tccgccgcag aggtggccag atcgttgcac aggcggaaga taacgcagct agaacgcacc 420
agaccatgga agtcggtcag ggaacgcagc gcgtggtcgg agatgtcttc ctgctgctgg 480
catacggaaa agtaagacgg cgccagcagc gctacaccgg aggaggaaac gctggcgttt 540

tccaggtact tggagaaagc cgggataatt ttgttgttgg accatttcgc ctcttgcaga 600
aaggctttgc acagttcacg ccagcttttc gtcagatagg acaggttgtt atgaccttte 660
tctttcagaa tagaatagga cgtgtcgtta acggtgttgt acagtgccag gaaacacagt 720
ttcatatagt ccggcagggt gttaatagcg ttaacgtccc agcgctctac agcatcggtg 780
aacagttgca gttcgtccag agtgccataa acgtcataca cgtcatcgat gatcgtcacc 840
agaccaaaca ttttagtaac agctttgcga cattcaccaa actgcgggtc tggcgccata 900
cccagtgccc agaaataaac ttccatcagg cggtcgcgta caaaatccag tttgctagcc 960
aggcccatct cggtccacca gcggggacaga tcttgcagct cttctggtg cagggtctgt 1020
accatgttaa aatccagctt cgccagctcc agcagcagct ggtgatgcgg ttctttcggt 1080
tcgtatttat ccaggaacca acgtgcctcc agacggtgca gacgctggtg atatggcagt 1140
tccagggcgt ggctcacttg ttctgcaacc ttggtattaa tgccttcttt caggttgttc 1200
ttcaggtggg tgatggaaaa ggtacgcgcc tcctccagca ggttctcacc ctcgaaaccc 1260
aggtaagacg cttcatacag gctcagcagg ccttggacgt caccttttcag ttcaccgctg 1320
aaaccacctt ctttatcctt gaaacgctca aaaacatcct gagaaacctc gaaaccgtgc 1380
tgacgcagca gacggaaaga cagagcggtt gcgtgcaggt cagatttgtt cttttgttt 1440
tcgtccagca gtacgatgtt ttccagggct ttaatgatgt cttttcaaa tttgtaggtc 1500
agacccaggc gctgcacatc gtcgatcagc tccagcaggg acagcggctg ggtgtctaca 1560
cggttgatca tgcagcgaac ttcttcctcc agtttggtcg ctttctcctc cagctttcc 1620
actttcaggt cgttctccag ggattgcagg aattcgaaat tccacaggtt tggctgatag 1680
tttgcggaac gacgggaatt atgctcggta atctgagtaa attgagaaga ggtcgcacac 1740
atggtatatc tccttcttaa agttaaacaa aattatttct agaggggaat tgttatccgc 1800
tcacaattcc cctatagtga gtcgtattaa tttcgcggga tcgagatctc gatcctctac 1860
gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacaggtg cggttgctgg cgcctatatc 1920
gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag cgcttgtttc 1980
ggcgtgggta tggtggcagg ccccgtggcc gggggactgt tgggcgccat ctccttgcat 2040
gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc tactactggg ctgcttccta 2100
atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga gatccccggac accatcgaat ggcgcaaaac 2160
ctttcgcggt atggcatgat agcgcccgga agagagtcaa ttcagggtgg tgaatgtgaa 2220
accagtaacg ttatacgatg tcgcagagta tgccggtgtc tcttatcaga ccgtttcccg 2280
cgtggtgaac caggccagcc acgtttctgc gaaaacgcgg gaaaaagtgg aagcggcgat 2340
ggcggagctg aattacattc ccaacgcgt ggcacaacaa ctggcgggca aacagtcgtt 2400
gctgattggc gttgccacct ccagtctggc cctgcacgcg ccgtcgcaaa ttgtcgcggc 2460
gattaaatct cgcgccgatc aactgggtgc cagcgtggtg gtgtcgatgg tagaacgaag 2520
cggcgtcgaa gcctgtaaag cggcggtgca caatcttctc gcgcaacgcg tcagtgggct 2580
gatcattaac tatccgctgg atgaccagga tgccattgct gtggaagctg cctgcactaa 2640
tgttccggcg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc atcaacagta ttattttctc 2700
ccatgaagac ggtacgcgac tgggcgtgga gcatctggtc gcattgggtc accagcaaat 2760
cgcgctgtta gcgggcccat taagttctgt ctcggcgcgt ctgcgtctgg ctggctggca 2820
taaatatctc actcgcaatc aaattcagcc gatagcggaa cgggaaggcg actggagtgc 2880
catgtccggt tttcaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag ggcatcgttc ccactgcgat 2940
gctggttgcc aacgatcaga tggcgctggg cgcaatgcgc gccattaccg agtccgggct 3000
gcgcgttggt gcggatatct cggtagtggg atacgacgat accgaagaca gctcatgtta 3060
tatcccgccg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgcctg ctgggcaaa ccagcgtgga 3120
ccgcttgctg caactctctc agggccaggc ggtgaagggc aatcagctgt tgcccgtctc 3180
actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt 3240
ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc 3300
gcaacgcaat taatgtaagt tagctcactc attaggcacc gggatctcga ccgatgccct 3360
tgagagcctt caacccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg 3420
cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg 3480
tcatttttcgg cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg 3540
tattcggaat cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tggtcccgcc accaaacgtt 3600
tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcggcccc acgggtgcgc atgatcgtgc 3660
tccttgcgtt gaggacccgg ctaggctggc ggggttgcct tactggttag cagaatgaat 3720
caccgatacg cgagcgaacg tgaagcgact gctgctgcaa aacgctctgcg acctgagcaa 3780
caacatgaat ggtcttcggt ttccgtgttt cgtaaagtct ggaaacgcgg aagtcagcgc 3840
cctgcaccat tatgttccgg atctgcatcg caggatgctg ctggctaccc tgtggaacac 3900
ctacatctgt attaacgaag cgctggcatt gaccctgagt gatttttctc tggtcccgcc 3960
gcatccatac cgccagttgt ttaccctcac aacgttccag taaccgggca tgttcatcat 4020
cagtaacccg tatcgtgagc atcctctctc gtttcatcgg tatcattacc cccatgaaca 4080
gaaatccccc ttacacggag gcatcagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg 4140
cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg 4200
atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct 4260
gcctcgcgcg tttcggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 4320
tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 4380
gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 4440
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt 4500
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg 4560
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag 4620
gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 4680
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 4740
cgccccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca 4800
ggactataaa gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 4860
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctcccct cgggaagcgt ggcgctttct 4920
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 4980
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag 5040
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc 5100
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 5160
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 5220

gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 5280
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 5340
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gaacaataaa 5400
actgtctgct tacataaaca gtaatacaag gggtgttatg agccatattc aacgggaaac 5460
gtcttgctct aggccgcgat taaattccaa catggatgct gatttatatg ggtataaatg 5520
ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga 5580
tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga 5640
gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat 5700
ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgatc cccgggaaaa cagcattcca 5760
ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg cagtgttcct 5820
gcgccggttg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg 5880
tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga 5940
cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac ttttgccatt 6000
ctcaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta ttttgacga 6060
ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga 6120
tcttgccatc ctatggaact gcctcggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt 6180
tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga 6240
tgagtttttc taagaattaa ttcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 6300
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaaatt gtaaacgtta 6360
atatttttgt taaaattcgc gttaaatttt gttaaatcag ctcatttttt aaccaatagg 6420
ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg 6480
ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa 6540
aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca agttttttgg 6600
ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagcccccga tttagagctt 6660
gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa ggagcgggcg 6720
ctagggcgct ggcaagtgta gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc gccgcgctta 6780
atgcgccgct acagggcgcg tcccattcgc caatccggat atagttcctc ctttcagcaa 6840
aaaacccctc aagacccgtt tagaggcccc aaggggttat gctagttatt gctcagcggt 6900
ggcagcagcc aactcagctt cctttcgggc tttgttagca gccggatctc agtggtggtg 6960
gtggtggtgc tcga 6974

<210> 27
<211> 3913
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27
gcggccgcgc ccttgacgat gccacatcct gagcaaataa ttcaaccact aattgtgagc 60
ggataacaca aggaggaaac agccatggta tcctgttctg cgccgggtaa gatttacctg 120
ttcggtgaac acgccgtagt ttatggcgaa actgcaattg cgtgtgcggt ggaactgcgt 180
acccgtgttc gcgcggaact caatgactct atcactattc agagccagat cggccgcacc 240
ggtctggatt tcgaaaagca cccttatgtg tctgcggtaa ttgagaaaat gcgcaaatct 300
attcctatta acggtgtttt cttgaccgtc gattccgaca tcccggtggg ctccggtctg 360
ggtagcagcg cagccgttac tatcgcgtct attggtgcgc tgaacgagct gttcggcttt 420
ggcctcagcc tgcaagaaat cgctaaactg ggccacgaaa tcgaaattaa agtacagggt 480
gccgcgtccc caaccgatac gtatgtttct accttcggcg gcgtggttac catcccggaa 540
cgtcgcaaac tgaaaactcc ggactgcggc attgtgattg gcgataccgg cgttttctcc 600
tccaccaaag agttagtagc taacgtacgt cagctgcgcg aaagctaccc ggatttgatc 660
gaaccgctga tgacctctat tggcaaaatc tctcgtatcg gcgaacaact ggttctgtct 720
ggcgactacg catccatcgg ccgcctgatg aacgtcaacc agggtctcct ggacgccctg 780
ggcgttaaca tcttagaact gagccagctg atctattccg ctcgtgcggc aggtgcgttt 840
ggcgctaaaa tcacgggcgc tggcggcggt ggctgtatgg ttgcgctgac cgctccggaa 900
aaatgcaacc aagtggcaga agcggtagca ggcgctggcg gtaaagtgac tatcactaaa 960
ccgaccgagc aaggtctgaa agtagattaa gccttgactt aatagctgct tatttcgccc 1020
ttatggtacc tagtaggagg aaaaaaacat ggaaatgcgt caaccggctg tcgcaggtca 1080
attctaccca ctgcgttgcg agaacctgga aaacgaactg aaacgctgct tcgaaggcct 1140
ggagatccgc gaacaagaag tgctgggcgc agtctgtccg cacgccggtt atatgtactc 1200
tggcaaagtt gcggcgcacg tctatgccac tctgccggaa gctgatacct acgtaatctt 1260
cggcccgaac cacaccggct acggtagccc tgtctctgtg agccgtgaaa cttggaagac 1320
cccgttgggc aatatcgatg ttgaccttgga actggcggac ggcttcctgg gttccatcgt 1380
agatgcggat gaactcggtc acaaatacga acactctatc gaagttcagc tgccgtttct 1440
gcaataccgt tttgaacgcg atttcaaaat tctgccaatc tgcatgggta tgcaagacga 1500
agaaaccgcg gtcgaagtag gtaacctgct ggcggatctg atcagcgagt ccggtaaacg 1560
tgctgtgatc atcgcaagct ctgatttcac ccactatgag acggctgaac gtgccaaaga 1620
aatcgattcc gaagttattg attctatcct gaacttttgac atctctggca tgtacgatcg 1680
cctgtatcgc cgtaacgcct ctgtttgcgg ttacggcccg atcaccgcta tgctgacggc 1740
aagcaaaaag ctgggcggct ctcgtgcgac tttgctgaaa tacgcaaaca gcggtgacgt 1800
gtccggtgat aaagacgctg tggtgggcta cgccgccatc atcgttgagt aagctgatta 1860
aaggttgaac agataggatt tcgtcatgga tcctacaagg aggaaaaaaa catgaatgct 1920
tctaatgaac cggtgattct gaaactgggt ggctctgcta ttaccgacaa aggtgcctac 1980
gaaggcgtag ttaaggaagc tgatttgctg cgcatcgcac aggaagttag cggtttccgt 2040
ggcaagatga tcgtggttca tggtgctggt agcttcggcc atacgtacgc gaagaaatac 2100
ggcctggacc gtaccttcga cccagagggc gcaattgtta ctcatgaatc tgttaaaaag 2160

ctcgcctcca aagttgtagg tgctctgaat agcttcggcg tgcgtgctat cgcggtgcat 2220
cctatggact gcgcagtatg ccgtaacggt cgtatcgaaa cgatgtatct ggactccatc 2280
aagttaatgc tggaaaaagg tctggtgccg gttctgcacg gcgacgtcgc aatggatatt 2340
gaactgggca cttgtatcct gtccggtgat caaatcgttc cttacctggc caaagaactg 2400
ggtatctccc gcctcggcct gggcagcgca gaggatggtg tgctggatat ggagggcaaa 2460
cctgtaccgg aaatcacccc agaaactttc gaagagttcc gccactgcat cggtggttct 2520
ggttctactg atgtaaccgg tggcatgctg ggcaaagtgc tggaacttct ggaattgagc 2580
aaaaattctt ccattactag ctacattttc aacgctggta aagcagacaa catctaccgc 2640
tttctgaatg gtgagtccat cggcactcgc atcagcccgg acaagcgtgt ttaagctagt 2700
tattaaccta aatgctctaa accagttatg agctctacaa ggaggaaaaa aacatgatta 2760
acactaccag ccgccgcaaa attgaacacc tgaaactctg cgcagaatcc ccggttgaag 2820
cgcgtcaggt atctgccggc tttgaagacg ttactctgat ccaccgcgct ttaccggagc 2880
tgaacatgga tgaactggac ctcagcgttg atttcctggg taaacgcatc aaagcgccgt 2940
tcctgattgc gtctatcacg ggtggtcacc cagataccat cccggttaac gctgcgctgg 3000
cagctgctgc tgaggagctg ggtgttggca tcggcgttgg ctctcagcgc gcggccattg 3060
atgatccgag ccaggaagac agcttccgtg tagtgcgtga tgaagcccca gatgcgtttg 3120
tttatggcaa cgtcggcgca gcacagatcc gtcagtatgg tgttgaaggt gttgaaaaac 3180
tgatcgaaat gattgacgca gatgccttgg caatccacct gaacttttctg caagaagcgg 3240
tccaaccgga aggtgaccgc gacgcgaccg gttgcctgga catgattacc gaaatttgct 3300
ctcagattaa aactccggta atcgtgaaag aaaccggtgc aggcattagc cgtgaagatg 3360
cgattctgtt ccagaaagct ggcgtgagcg caatcgacgt tggcggcgcg ggcggcacct 3420
cctgggctgg cgtcgaggtc taccgtgcta aagaaagccg tgactctgtt agcgagcgtt 3480
taggtgagct gttttgggat ttcggcattc cgacggtagc ttctctgatt gaatcccgcg 3540
tttccttgcc gctgatcgca accggcggta tccgtaacgg tctggacatt gctaaaagca 3600
ttgctctcgg cgcaagcgct gccagcgccg ctctgccgtt cgttggtccg tccctggagg 3660
gcaaagaatc cgttgtacgt gtgctgagct gcatgctgga agaatttaaa gcagcaatgt 3720
ttttgtgcgg ttgcggcaac atcaaagacc tgcacaactc tccagtagtg gtaactggtt 3780
ggacccgcga atacctggag cagcgcggtt ttaacgttaa ggacctctcc ctgccgggca 3840
acgctctgta agcttcaacg cgtctacaaa taaaaaaggc acgtcagatg acgtgccttt 3900
tttctgtct aga 3913

<210> 28
<211> 6848
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatgtgtgc 420
gacctcttct caatttactc agattaccga gcataattcc cgtcgttccg caaactatca 480
gccaaacctg tggaatttcg aattcctgca atccctggag aacgacctga aagtggaaaa 540
gctggaggag aaagcgacca aactggagga agaagttcgc tgcatgatca accgtgtaga 600
cacccagccg ctgtccctgc tggagctgat cgacgatgtg cagcgcctgg gtctgaccta 660
caaatttgaa aaagacatca ttaaagcctt ggaaaacatc gtactgctgg acgaaaacaa 720
aaagaacaaa tctgacctgc acgcaaccgc tctgtctttc cgtctgctgc gtcagcacgg 780
tttcgaggtt tctcaggatg tttttgagcg tttcaaggat aaagaaggtg gtttcagcgg 840
tgaactgaaa ggtgacgtcc aaggcctgct gagcctgtat gaagcgtctt acctgggttt 900
cgagggtgag aacctgctgg aggaggcgcg taccttttcc atcacccacc tgaagaacaa 960
cctgaaagaa ggcattaata ccaaggttgc agaacaagtg agccacgccc tggaactgcc 1020
atatcaccag cgtctgcacc gtctggaggc acgttggttc ctggataaat acgaaccgaa 1080
agaaccgcat caccagctgc tgctggagct ggcgaagctg gattttaaca tggtacagac 1140
cctgcaccag aaagagctgc aagatctgtc ccgctggtgg accgagatgg gcctggctag 1200
caaactggat tttgtacgcg accgcctgat ggaagtttat ttctgggcac tgggtatggc 1260
gccagacccg cagtttggtg aatgtcgcaa agctgttact aaaatgtttg gtctggtgac 1320
gatcatcgat gacgtgtatg acgtttatgg cactctggac gaactgcaac tgttcaccga 1380
tgctgtagag cgctgggacg ttaacgctat taacaccctg ccggactata tgaaactgtg 1440
tttcctggca ctgtacaaca ccgttaacga cacgtcctat tctattctga aagagaaagg 1500
tcataacaac ctgtcctatc tgacgaaaag ctggcgtgaa ctgtgcaaag cctttctgca 1560
agaggcgaaa tggtccaaca acaaaattat cccggctttc tccaagtacc tggaaaacgc 1620
cagcgtttcc tcctccggtg tagcgctgct ggcgccgtct tacttttccg tatgccagca 1680
gcaggaagac atctccgacc acgcgctgcg ttccctgacc gacttccatg gtctggtgcg 1740
ttctagctgc gttatcttcc gcctgtgcaa cgatctggcc acctctgcgg cggagctgga 1800
acgtggcgag actaccaatt ctatcattag ctacatgcac gaaaacgatg gtaccagcga 1860
ggaacaggcc cgcgaagaac tgcgtaaact gatcgacgcc gaatggaaaa agatgaatcg 1920
tgaacgcgtt agcgactcca ccctgctgcc taaagcgttc atggaaatcg cagttaacat 1980
ggcacgtgtt tcccactgca cctaccagta tggcgatggt ctgggtcgcc cagactacgc 2040
gactgaaaac cgcatcaaac tgctgctgat tgaccctttc ccgattaacc agctgatgta 2100
tgtctaactg cataaaggag gtaaaaaaac atggtatcct gttctgcgcc gggtaagatt 2160
tacctgttcg gtgaacacgc cgtagtttat ggcgaaactg caattgcgtg tgcggtggaa 2220
ctgcgtaccc gtgttcgcgc ggaactcaat gactctatca ctattcagag ccagatcggc 2280

cgcaccggtc tggatttcga aaagcaccct tatgtgtctg cggtaattga gaaaatgcgc 2340
aaatctattc ctattaacgg tgttttcttg accgtcgatt ccgacatccc ggtgggctcc 2400
ggtctgggta gcagcgcagc cgttactatc gcgtctattg gtgcgctgaa cgagctgttc 2460
ggctttggcc tcagcctgca agaaatcgct aaactgggcc acgaaatcga aattaaagta 2520
cagggtgccg cgtccccaac cgatacgtat gtttctacct tcggcggcgt ggttaccatc 2580
ccggaacgtc gcaaactgaa aactccggac tgcggcattg tgattggcga taccggcgtt 2640
ttctcctcca ccaaagagtt agtagctaac gtacgtcagc tgcgcgaaag ctacccggat 2700
ttgatcgaac cgctgatgac ctctattggc aaaatctctc gtatcggcga acaactggtt 2760
ctgtctggcg actacgcatc catcggccgc ctgatgaacg tcaaccaggg tctcctggac 2820
gccctgggcg ttaacatctt agaactgagc cagctgatct attccgctcg tgcggcaggt 2880
gcgtttggcg ctaaaatcac gggcgctggc ggcggtggct gtatggttgc gctgaccgct 2940
ccggaaaaat gcaaccaagt ggcagaagcg gtagcaggcg ctggcggtaa agtgactatc 3000
actaaaccga ccgagcaagg tctgaaagta gattaaagtc tagttaaagt ttaaacggtc 3060
tccagcttgg ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag 3120
aacgcagaag cggtctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtcccac 3180
ctgaccccat gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc 3240
cccatgcgag agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac 3300
tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg 3360
ccgggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg 3420
ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg 3480
tttctacaaa ctctttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgcttaacc 3540
ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat 3600
ggctttctcg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agctctgatc aagagacagg 3660
atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg 3720
ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc 3780
cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg 3840
tgccctgaat gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt 3900
tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg 3960
cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat 4020
catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca 4080
ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca 4140
ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa 4200
ggcgagcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa 4260
tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc 4320
ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga 4380
atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc 4440
cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg acgcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 4500
ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 4560
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg 4620
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 4680
gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt 4740
agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 4800
taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc 4860
gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact 4920
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga 4980
caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 5040
aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt 5100
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt 5160
acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga 5220
ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 5280
gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc ggtatttttct 5340
ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc 5400
tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg ggtcatggct 5460
gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca 5520
tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg 5580
tcatcaccga aacgcgcgag gcagcagatc aattcgcgcg cgaaggcgaa gcggcatgca 5640
tttacgttga caccatcgaa tggtgcaaaa cctttcgcgg tatggcatga tagcgcccgg 5700
aagagagtca attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat gtcgcagagt 5760
atgccggtgt ctcttatcag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc cacgtttctg 5820
cgaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt cccaacgcgg 5880
tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc tccagtctgg 5940
ccctgcacgc gccgtcgcaa attgtcgcgg cgattaaatc tcgcgccgat caactgggtg 6000
ccagcgtggt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa gcggcggtgc 6060
acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgctg gatgaccagg 6120
atgccattgc tgtggaagct gcctgcacta atgttccggc gttatttctt gatgtctctg 6180
accagacacc catcaacagt attatttttct cccatgaaga cggtacgcga ctgggcgtgg 6240
agcatctggt cgcattgggt caccagcaaa tcgcgctgtt agcgggccca ttaagttctg 6300
tctcggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataaatatct cactcgcaat caaattcagc 6360
cgatagcgga acgggaaggc gactggagtg ccatgtccgg ttttcaacaa accatgcaaa 6420
tgctgaatga gggcatcgtt cccactgcga tgctggttgc caacgatcag atggcgctgg 6480
gcgcaatgcg cgccattacc gagtccgggc tgcgcgttgg tgcggatatc tcggtagtgg 6540
gatacgacga taccgaagac agctcatgtt atatcccgcc gtcaaccacc atcaaacagg 6600
attttcgcct gctggggcaa accagcgtgg accgcttgct gcaactctct cagggccagg 6660
cggtgaaggg caatcagctg ttgcccgtct cactggtgaa aagaaaaacc accctggcgc 6720
ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac 6780
aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagcgcgaa 6840
ttgatctg 6848

<210> 29
<211> 6647
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29
aagggcgagc tcaacgatcc ggctgctaac aaagcccgaa aggaagctga gttggctgct 60
gccaccgctg agcaataact agcataaccc cttggggcct ctaaacgggt cttgaggagt 120
tttttgctga aaggaggaac tatatccgga tatcccgcaa gaggcccggc agtaccggca 180
taaccaagcc tatgcctaca gcatccaggg tgacggtgcc gaggatgacg atgagcgcat 240
tgttagattt catacacggt gcctgactgc gttagcaatt taactgtgat aaactaccgc 300
attaaagctt atcgatgata agctgtcaaa catgagaatt aattcttgaa gacgaaaggg 360
cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc 420
aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaataca 480
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 540
aaggaagagt atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga 600
gaggctattc ggctatgact gggcacaact gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt 660
ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct 720
gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg 780
cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt 840
gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc 900
tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc 960
gaaacatcgc atcgagcggg cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga 1020
tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg 1080
catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac acatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat 1140
ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg 1200
ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc 1260
tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta 1320
tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg 1380
acgcctaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 1440
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 1500
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 1560
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 1620
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 1680
gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 1740
agaacictgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 1800
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 1860
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 1920
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 1980
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 2040
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 2100
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 2160
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 2220
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 2280
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc 2340
ggtatttctc cttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg caatggtgca ctctcagtac 2400
aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg 2460
gtcatggctg cgccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg 2520
ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 2580
ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagctgcggt aaagctcatc agcgtggtcg 2640
tgaagcgatt cacagatgtc tgcctgttca tccgcgtcca gctcgttgag tttctccaga 2700
agcgttaatg tctggcttct gataaagcgg gccatgttaa gggcggtttt ttcctgtttg 2760
gtcactgatg cctccgtgta aggggattt ctgttcatgg gggtaatgat accgatgaaa 2820
cgagagagga tgctcacgat acgggttact gatgatgaac atgcccggtt actggaacgt 2880
tgtgagggta aacaactggc ggtatggatg cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt 2940
caatgccagc gcttcgttaa tacagatgta ggtgttccac aggqtagcca gcagcatcct 3000
gcgatgcaga tccggaacat aatggtgcag ggcgctgact tccgcgtttc cagactttac 3060
gaaacacgga aaccgaagac cattcatgtt gttgctcagg tcgcagacgt tttgcagcag 3120
cagtcgcttc acgttcgctc gcgtatcggt gattcattct gctaaccagt aaggcaaccc 3180
cgccagccta gccgggtcct caacgacagg agcacgatca tgcgcacccg tggccaggac 3240
ccaacgctgc ccgagatgcg ccgcgtgcgg ctgctggaga tggcggacgc gatggatatg 3300
ttctgccaag ggttggtttg cgcattcaca gttctccgca agaattgatt ggctccaatt 3360
cttggagtgg tgaatccgtt agcgaggtgc cgccggcttc cattcaggtc gaggtggccc 3420
ggctccatgc accgcgacgc aacgcgggga ggcagacaag gtatagggcg gcgcctacaa 3480
tccatgccaa cccgttccat gtgctcgccg aggcggcata aatcgccgtg acgatcagcg 3540
gtccaatgat cgaagttagg ctggtaagag ccgcgagcga tccttgaagc tgtccctgat 3600
ggtcgtcatc tacctgcctg gacagcatgg cctgcaacgc gggcatcccg atgccgccgg 3660
aagcgagaag aatcataatg gggaaggcca tccagcctcg cgtcgcgaac gccagcaaga 3720
cgtagcccag cgcgtcggcc gccatgccgg cgataatggc ctgcttctcg ccgaaacgtt 3780
tggtggcggg accagtgacg aaggcttgag cgagggcgtg caagattccg aataccgcaa 3840
gcgacaggcc gatcatcgtc gcgctccagc gaaagcggtc ctcgccgaaa atgacccaga 3900
gcgctgccgg cacctgtcct acgagttgca tgataaagaa gacagtcata agtgcggcga 3960
cgatagtcat gccccgcgcc caccggaagg agctgactgg gttgaaggct ctcaagggca 4020

tcggtcgaga tcccggtgcc taatgagtga gctaacttac attaattgcg ttgcgctcac 4080
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 4140
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgcc agggtggttt tttttttcac cagtgagacg 4200
ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg ccctgagaga gttgcagcaa gcggtccacg 4260
ctggtttgcc ccagcaggcg aaaatcctgt ttgatggtgg ttaacggcgg gatataacat 4320
gagctgtctt cggtatcgtc gtatcccact accgagatat ccgcaccaac gcgcagcccg 4380
gactcggtaa tggcgcgcat tgcgcccagc gccatctgat cgttggcaac cagcatcgca 4440
gtgggaacga tgccctcatt cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga catggcactc 4500
cagtcgcctt cccgttccgc tatcggctga atttgattgc gagtgagata tttatgccag 4560
ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc 4620
tggtgaccca atgcgaccag atgctccacg cccagtcgcg taccgtcttc atgggagaaa 4680
ataatactgt tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg aacattagtg 4740
caggcagctt ccacagcaat ggcatcctgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca 4800
ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggcttcgac gccgcttcgt 4860
tctaccatcg acaccaccac gctggcaccc agttgatcgg cgcgagattt aatcgccgcg 4920
acaatttgcg acggcgcgtg cagggccaga ctggaggtgg caacgccaat cagcaacgac 4980
tgtttgcccg ccagttgttg tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc 5040
gcttccactt tttcccgcgt tttcgcagaa acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa 5100
acggtctgat aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac tggtttcaca 5160
ttcaccaccc tgaattgact ctcttccggg cgctatcatg ccataccgcg aaaggttttg 5220
cgccattcga tggtgtccgg gatctcgacg ctctccctta tgcgactcct gcattaggaa 5280
gcagcccagt agtaggttga ggccgttgag caccgccgcc gcaaggaatg gtgcatgcaa 5340
ggagatggcg cccaacagtc ccccggccac ggggcctgcc accataccca cgccgaaaca 5400
agcgctcatg agcccgaagt ggcgagcccg atcttcccca tcggtgatgt cggcgatata 5460
ggcgccagca accgcacctg tggcgccggt gatgccggcc acgatgcgtc cggcgtagag 5520
gatcgagatc tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta taggggaatt gtgagcggat 5580
aacaatttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata catatgcggg 5640
gttctcatca tcatcatcat catggtatgg ctagcatgac tggtggacag caaatgggtc 5700
gggatctgta cgacgatgac gataaggatc atcccttcac catggtatcc tgttctgcgc 5760
cggggtaagat ttacctgttc ggtgaacacg ccgtagttta tggcgaaact gcaattgcgt 5820
gtgcggtgga actgcgtacc cgtgttcgcg cggaactcaa tgactctatc actatttcaga 5880
gccagatcgg ccgcaccggt ctggatttcg aaaagcaccc ttatgtgtct gcggtaattg 5940
agaaaatgcg caaatctatt cctattaacg gtgttttctt gaccgtcgat tccgacatcc 6000
cggtgggctc cggtctgggt agcagcgcag ccgttactat cgcgtctatt ggtgcgctga 6060
acgagctgtt cggctttggc ctcagcctgc aagaaatcgc taaactgggc cacgaaatcg 6120
aaattaaagt acagggtgcc gcgtccccaa ccgatacgta tgtttctacc ttcggcggcg 6180
tggttaccat cccggaacgt cgcaaactga aaactccgga ctgcggcatt gtgattggcg 6240
ataccggcgt tttctcctcc accaaagagt tagtagctaa cgtacgtcag ctgcgcgaaa 6300
gctacccgga tttgatcgaa ccgctgatga cctctattgg caaaatctct cgtatcggcg 6360
aacaactggt tctgtctggc gactacgcat ccatcggccg cctgatgaac gtcaaccagg 6420
gtctcctgga cgccctgggc gttaacatct tagaactgag ccagctgatc tattccgctc 6480
gtgcggcagg tgcgtttggc gctaaaatca cgggcgctgg cggcggtggc tgtatggttg 6540
cgctgaccgc tccggaaaaa tgcaaccaag tggcagaagc ggtagcaggc gctggcggta 6600
aagtgactat cactaaaccg accgagcaag gtctgaaagt agattaa 6647

<210> 30
<211> 6957
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320

tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
cccttgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagactttа 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt ctttcacca gtgagacggg caacagctga ttgccctca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggttttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagccccgat cttcccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caatttcccct ctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatаca tatgcgttgt agcgtgtcca ccgaaaatgt 5100
gtctttcacc gaaactgaaa ccgaagctcg tcgttctgcg aactacgaac ctaacagctg 5160
ggactatgat tacctgctgt cctccgacac ggacgagtcc atcgaagtat acaaagacaa 5220
agcgaaaaag ctggaagccg aagttcgtcg cgagattaat aacgaaaaag cagaatttct 5280
gaccctgctg gaactgattg acaacgtcca gcgcctgggc ctgggttacc gtttcgagtc 5340
tgatatccgt ggtgcgctgg atcgcttcgt ttcctccggc ggcttcgatg cggtaaccaa 5400
gacttccctg cacggtacgg cactgtcttt ccgtctgctg cgtcaacacg gttttgaggt 5460
ttctcaggaa gcgttcagcg gcttcaaaga ccaaaacggc aacttcctgg agaacctgaa 5520
ggaagatatc aaagctatcc tgagcctgta cgaggccagc ttcctggctc tggaaggcga 5580
aaacatcctg gacgaggcga aggttttcgc aatctctcat ctgaaagaac tgtctgaaga 5640
aaagatcggt aaagagctgg cagaacaggt gaaccatgca ctggaactgc cactgcatcg 5700
ccgtactcag cgtctggaag cagtatggtc tatcgaggcc taccgtaaaa aggaggacgc 5760
gaatcaggtt ctgctggagc tggcaattct ggattacaac atgatccagt ctgtatacca 5820
gcgtgatctg cgtgaaacgt cccgttggtg gcgtcgtgtg ggtctggcga ccaaactgca 5880
cttgctcgt gaccgcctga ttgagagctt ctactgggcc gtggtgtag cattcgaacc 5940
gcaatactcc gactgccgta actccgtcgc aaaaatgttt tctttcgtaa ccattatcga 6000

cgatatctac gatgtatacg gcaccctgga cgaactggag ctgtttactg atgcagttga 6060
gcgttgggac gtaaacgcca tcaacgacct gccggattac atgaaactgt gctttctggc 6120
tctgtataac actattaacg aaatcgccta cgacaacctg aaagataaag gtgagaacat 6180
cctgccgtat ctgaccaaag cctgggctga cctgtgcaac gctttcctgc aagaagccaa 6240
gtggctgtac aacaaatcta ctccgacctt tgacgactac ttcggcaacg catggaaatc 6300
ctcttctggc ccgctgcaac tggtgttcgc tlacttcgct gtcgtgcaga acattaaaaa 6360
ggaagagatc gaaaacctgc aaaaatacca tgacaccatc tctcgtcctt cccatatctt 6420
ccgtctgtgc aatgacctgg ctagcgcgtc tgcggaaatt gcgcgtggtg aaaccgcaaa 6480
tagcgtttct tgttacatgc gcactaaagg tatctccgaa gaactggcta ccgaaagcgt 6540
gatgaatctg atcgatgaaa cctggaaaaa gatgaacaag gaaaaactgg gtggtagcct 6600
gttcgcgaaa ccgttcgtgg aaaccgcgat caacctggca cgtcaatctc actgcactta 6660
tcataacggc gacgcgcata cctctccgga tgagctgacc cgcaaacgcg tttgtctgt 6720
aatcactgaa ccgatttctgc cgttgaacg ctaaggatcc gaattcgagc tccgtcgaca 6780
agcttgcggc cgcactcgag caccaccacc accaccactg agatccggct gctaacaaag 6840
cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taaccccttg 6900
gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggat 6957

<210> 31
<211> 6957
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttatttcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgtttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaatttccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
ccctgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatcctttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagactttа 3000

cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt ctttcaccga gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagccccgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caatttcccct ctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacа tatgcgttgt agcgtgtcca ccgaaaatgt 5100
gtctttcacc gaaactgaaa ccgaaacgcg tcgttctgcg aactacgaac ctaacagctg 5160
ggactatgat tacctgctgt cctccgacac ggacgagtcc atcgaagtat acaaagacaa 5220
agcgaaaaag ctggaagccg aagttcgtcg cgagattaat aacgaaaaag cagaatttct 5280
gaccctgccg gaactgattg acaacgtcca gcgcctgggc ctgggttacc gtttcgagtc 5340
tgatatccgt cgtgcgctgg atcgcttcgt ttcctccggc ggcttcgatg cggtaaccaa 5400
gacttccctg cacgcgacgg cactgtcttt ccgtctgctg cgtcaacacg gttttgaggt 5460
ttctcaggaa gcgttcagcg gcttcaaaga ccaaaacggc aacttcctga aaaacctgaa 5520
ggaagatatc aaagctatcc tgagcctgta cgaggccagc ttcctggctc tggaaggcga 5580
aaacatcctg gacgaggcga aggttttcgc aatctctcat ctgaaagaac tgtctgaaga 5640
aaagatcggt aaagatctgg cagaacaggt gaaccatgca ctggaactgc cactgcatcg 5700
ccgtactcag cgtctggaag caglatggtc tatcgaggcc taccgtaaaa aggaggacgc 5760
ggatcaggtt ctgctggagc tggcaattct ggattacaac atgatccagt ctgtatacca 5820
gcgtgatctg cgtgaaacgt cccgttggtg gcgtcgtgtg ggtctggcga ccaaactgca 5880
ctttgctcgt gaccgcctga ttgagagctt ctactgggcc gtgggtgtag cattcgaacc 5940
gcaatactcc gactgccgta actccgtcgc aaaaatgttt tctttcgtaa ccattatcga 6000
cgatatctac gatgtatacg gcaccctgga cgaactggag ctgtttactg acgcagttga 6060
gcgttgggac gtaaacgcca tcgacgatct gccggattac atgaaactgt gctttctggc 6120
tctgtataac actattaacg aaatcgccta cgacaacctg aaagataaag gtgagaacat 6180
cctgccgtat ctgaccaaag cctgggctga ccgtgtcaac gctttcctgc aagaagccaa 6240
gtggctgtac aacaaatcta ctccgacctt tgacgaatac ttcggcaacg catggaaatc 6300
ctcttctggc ccgctgcaac tggtgttcgc ttacttcgct gtcgtgcaga acattaaaaa 6360
ggaagagatc gataacctgc aaaaatacca tgacatcatc tctcgtcctt cccatatctt 6420
ccgtctgtgc aatgacctgg ctagcgcgtc tgcggaaatt gcgcgtggtg aaaccgcaaa 6480
tagcgtttct tgttacatgc gcactaaagg tatctccgaa gaactggcta ccgaaagcgt 6540
gatgaatctg atcgatgaaa cctggaaaaa gatgaacaag gaaaaactgg gtggtagcct 6600
gttcgcgaaa ccgttcgtgg aaaccgcgat caacctggca cgtcaatctc actgcactta 6660
tcataacggc gacgcgcata cctctccgga tgagctgacc cgcaaacgcg ttctgtctgt 6720
aatcactgaa ccgattctgc cgtttgaacg ctaaggatcc gaattcgagc tccgtcgaca 6780
agcttgcggc cgcactcgag caccaccacc accaccactg agatccggct gctaacaaag 6840
cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taaccccttg 6900
gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggat 6957

<210> 32
<211> 6957
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
cttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgatttа taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatatttтt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa ataaaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
cttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
cccttgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatccctaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aaggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta tacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt ctttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgcttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680

tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caatttcccc tctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacа tatgcgttgt agcgtgtcca ccgaaaatgt 5100
gtctttctct gaaactgaaa ccgaaacgcg tcgttctgcg aactacgaac ctaacagctg 5160
ggactatgat tacctgctgt cctccgacac ggacgagtcc atcgaagtac acaaagacaa 5220
agcgaaaaag ctggaagccg aagttcgtcg cgagattaat aacgaaaaag cagaatttct 5280
gaccctgctg gaactgattg acaacgtcca gcgcctgggc ctgggttacc gtttcgagtc 5340
tgatatccgt cgtgcgctgg atcgcttcgt ttcctccggc ggcttcgatg gcgtaaccaa 5400
gacttccctg cacggtacgg cactgtcttt ccgtctgctg cgtcaacacg gttttgaggt 5460
ttctcaggaa gcgttcagcg gcttcaaaga ccaaaacggc aacttcctgg agaacctgaa 5520
ggaagatatc aaagctatcc tgagcctgta cgaggccagc ttcctggctc tggaaggcga 5580
aaacatcctg gacgaggcga aggtttcgc aatctctcat ctgaaagaac tgtctgaaga 5640
aaagatcggt aaagagctgg cagaacaggt gtcccatgca ctggaactgc cactgcatcg 5700
ccgtactcag cgtctggaag cagtatggtc tatcgaggcc taccgtaaaa aggaggacgc 5760
gaaccaggtt ctgctggagc tggcaattct ggattacaac atgatccagt ctgtatacca 5820
gcgtgatctg cgtgaaacgt cccgttggtg gcgtcgtgtg ggtctggcga ccaaactgca 5880
ctttgctcgt gaccgcctga ttgagagctt ctactgggcc gtgggtgtag cattcgaacc 5940
gcaatactcc gactgccgta actccgtcgc aaaaatgttt tctttcgtaa ccattatcga 6000
cgatatctac gatgtatacg gcaccctgga cgaactggag ctgtttactg atgcagttga 6060
gcgttgggac gtaaacgcca tcaacgacct gccggattac atgaaactgt gctttctggc 6120
tctgtataac actattaacg aaatcgccta cgacaacctg aaagataaag gtgagaacat 6180
cctgccgtat ctgaccaaag cctgggctga cctgtgcaac gctttcctgc aagaagccaa 6240
gtggctgtac aacaaatcta ctccgacctt tgacgactac ttcggcaacg catggaaatc 6300
ctcttctggc ccgctgcaac tgatcttcgc ttacttcgct gtcgtgcaga acattaaaaa 6360
ggaagagatc gaaaacctgc aaaaatacca tgacatcatc tctcgtcctt cccatatctt 6420
ccgtctgtgc aatgacctgg ctagcgcgtc tgcggaaatt gcgcgtggtg aaaccgcaaa 6480
tagcgtttct tgttacatgc gcactaaagg tatctccgaa gaactggcta ccgaaagcgt 6540
gatgaatctg atcgatgaaa cctggaaaaa gatgaacaag gaaaaactgg gtggtagcct 6600
gttcgcgaaa ccgttcgtgg aaaccgcgat caacctggca cgtcaatctc actgcactta 6660
tcataacggc gacgcgcata cctctccgga tgagctgacc cgcaaacgcg ttctgtctgt 6720
aatcactgaa ccgattctgc cgtttgaacg ctaaggatcc gaattcgagc tccgtcgaca 6780
agcttgcggc cgcactcgag caccaccacc accaccactg agatccggct gctaacaaag 6840
cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taaccccttg 6900
gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggat 6957

<210> 33
<211> 560
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 33
Met Arg Cys Ser Val Ser Thr Glu Asn Val Ser Phe Ser Glu Thr Glu
1 5 10 15
Thr Glu Thr Arg Arg Ser Ala Asn Tyr Glu Pro Asn Ser Trp Asp Tyr
20 25 30
Asp Tyr Leu Leu Ser Ser Asp Thr Asp Glu Ser Ile Glu Val His Lys
35 40 45
Asp Lys Ala Lys Lys Leu Glu Ala Glu Val Arg Arg Glu Ile Asn Asn
50 55 60
Glu Lys Ala Glu Phe Leu Thr Leu Leu Glu Leu Ile Asp Asn Val Gln
65 70 75 80
Arg Leu Gly Leu Gly Tyr Arg Phe Glu Ser Asp Ile Arg Arg Ala Leu
85 90 95
Asp Arg Phe Val Ser Ser Gly Gly Phe Asp Gly Val Thr Lys Thr Ser
100 105 110
Leu His Gly Thr Ala Leu Ser Phe Arg Leu Leu Arg Gln His Gly Phe
115 120 125
Glu Val Ser Gln Glu Ala Phe Ser Gly Phe Lys Asp Gln Asn Gly Asn
130 135 140
Phe Leu Glu Asn Leu Lys Glu Asp Ile Lys Ala Ile Leu Ser Leu Tyr
145 150 155 160
Glu Ala Ser Phe Leu Ala Leu Glu Gly Glu Asn Ile Leu Asp Glu Ala
165 170 175
Lys Val Phe Ala Ile Ser His Leu Lys Glu Leu Ser Glu Glu Lys Ile
180 185 190
Gly Lys Glu Leu Ala Glu Gln Val Ser His Ala Leu Glu Leu Pro Leu
195 200 205
His Arg Arg Thr Gln Arg Leu Glu Ala Val Trp Ser Ile Glu Ala Tyr
210 215 220

```
Arg Lys Lys Glu Asp Ala Asn Gln Val Leu Leu Glu Leu Ala Ile Leu
225                 230                 235                 240
Asp Tyr Asn Met Ile Gln Ser Val Tyr Gln Arg Asp Leu Arg Glu Thr
                245                 250                 255
Ser Arg Trp Trp Arg Arg Val Gly Leu Ala Thr Lys Leu His Phe Ala
            260                 265                 270
Arg Asp Arg Leu Ile Glu Ser Phe Tyr Trp Ala Val Gly Val Ala Phe
        275                 280                 285
Glu Pro Gln Tyr Ser Asp Cys Arg Asn Ser Val Ala Lys Met Phe Ser
    290                 295                 300
Phe Val Thr Ile Ile Asp Asp Ile Tyr Asp Val Tyr Gly Thr Leu Asp
305                 310                 315                 320
Glu Leu Glu Leu Phe Thr Asp Ala Val Glu Arg Trp Asp Val Asn Ala
                325                 330                 335
Ile Asn Asp Leu Pro Asp Tyr Met Lys Leu Cys Phe Leu Ala Leu Tyr
            340                 345                 350
Asn Thr Ile Asn Glu Ile Ala Tyr Asp Asn Leu Lys Asp Lys Gly Glu
        355                 360                 365
Asn Ile Leu Pro Tyr Leu Thr Lys Ala Trp Ala Asp Leu Cys Asn Ala
    370                 375                 380
Phe Leu Gln Glu Ala Lys Trp Leu Tyr Asn Lys Ser Thr Pro Thr Phe
385                 390                 395                 400
Asp Asp Tyr Phe Gly Asn Ala Trp Lys Ser Ser Ser Gly Pro Leu Gln
                405                 410                 415
Leu Ile Phe Ala Tyr Phe Ala Val Val Gln Asn Ile Lys Lys Glu Glu
            420                 425                 430
Ile Glu Asn Leu Gln Lys Tyr His Asp Ile Ile Ser Arg Pro Ser His
        435                 440                 445
Ile Phe Arg Leu Cys Asn Asp Leu Ala Ser Ala Ser Ala Glu Ile Ala
    450                 455                 460
Arg Gly Glu Thr Ala Asn Ser Val Ser Cys Tyr Met Arg Thr Lys Gly
465                 470                 475                 480
Ile Ser Glu Glu Leu Ala Thr Glu Ser Val Met Asn Leu Ile Asp Glu
                485                 490                 495
Thr Trp Lys Lys Met Asn Lys Glu Lys Leu Gly Gly Ser Leu Phe Ala
            500                 505                 510
Lys Pro Phe Val Glu Thr Ala Ile Asn Leu Ala Arg Gln Ser His Cys
        515                 520                 525
Thr Tyr His Asn Gly Asp Ala His Thr Ser Pro Asp Glu Leu Thr Arg
    530                 535                 540
Lys Arg Val Leu Ser Val Ile Thr Glu Pro Ile Leu Pro Phe Glu Arg
545                 550                 555                 560
```

<210> 34
<211> 6963
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 34

```
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
cccttgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatccctaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
```

gatcctttit ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc ctttgctggg cctttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg gggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagactita 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgttig gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca ccigtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt ctttticacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac atacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagccccgat cttcccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaataa 5040
ttttgttiaa ctttaagaag gagatataca tatgcatatg cgttgtagcg tgtccaccga 5100
aaatgtgtct ttcaccgaaa ctgaaaccga aacgcgtcgt tctgcgaact acgaacctaa 5160
cagctgggac tatgattacc tgctgtcctc cgacacggac gagtccatcg aagtatacaa 5220
agacaaagcg aaaaagctgg aagccgaagt tcgtcgcgag attaataacg aaaaagcaga 5280
atttctgacc ctgctggaac tgattgacaa cgtccagcgc ctgggcctgg gttaccgttt 5340
cgagtctgat atccgtcgtg cgctggatcg cttcgtttcc tccggcggct tcgatgcggt 5400
aaccaagact tccctgcacg cgacggcact gtctttccgt ctgctgcgtc aacacggttt 5460
tgaggtttct caggaagcgt tcagcggctt caaagaccaa aacggcaact tcctggagaa 5520
cctgaaggaa gatatcaaag ctatcctgag cctgtacgag gccagcttcc tggctctgga 5580
aggcgaaaac atcctggacg aggcgaaggt tttcgcaatc tctcatctga aagaactgtc 5640
tgaagaaaag atcggtaaag atctggcaga acaggtgaac catgcactgg aactgccact 5700
gcatcgccgt actcagcgtc tggaagcagt actgtctatc gaggcctacc gtaaaaagga 5760
ggacgcggat caggttctgc tggagctggc aattctggat tacaacatga tccagtctgt 5820
ataccagcgt gatctgcgtg aaacgtcccg ttggtggcgt cgtgtgggtc tggcgaccaa 5880
actgcacttt gctcgtgacc gcctgattga gagcttctac tgggccgtgg gtgtagcatt 5940
cgaaccgcaa tactccgact gccgtaactc cgtcgcaaaa atgttttctt tcgtaaccat 6000
tatcgacgat atctacgatg tatacggcac cctggacgaa ctggagctgt ttactaacgc 6060
agttgagcgt tgggacgtaa acgccatcga cgatctgccg gattacatga aactgtgctt 6120
tctggctctg tataacacta ttaacgaaat cgcctacgac aacctgaaag aaaaaggtga 6180

gaacatcctg ccgtatctga ccaaagcctg ggctgacctg tgcaacgctt tcctgcaaga 6240
agccaagtgg ctgtacaaca aatctactcc gaccttttgac gaatacttcg gcaacgcatg 6300
gaaatcctct tctggcccgc tgcaactggt gttcgcttac ttcgctgtcg tgcagaacat 6360
taaaaaggaa gagatcgaaa acctgcaaaa ataccatgac atcatctctc gtccttccca 6420
tatcttccgt ctgtgcaatg acctggctag cgcgtctgcg gaaattgcgc gtggtgaaac 6480
cgcaaatagc gtttcttgtt acatgcgcac taaaggtatc tccgaagaac tggctaccga 6540
aagcgtgatg aatctgatcg atgaaacctg gaaaaagatg aacaaggaaa aactgggtgg 6600
tagcctgttc gcgaaaccgt tcgtggaaac cgcgatcaac ctggcacgtc aatctcactg 6660
cacttatcat aacggcgacg cgcatacctc tccggatgag ctgacccgca aacgcgttct 6720
gtctgtaatc actgaaccga ttctgccgtt tgaacgctaa ggatccgaat tcgagctccg 6780
tcgacaagct tgcggccgca ctcgagcacc accaccacca ccactgagat ccggctgcta 6840
acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac 6900
ccccttgggg ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct gaaaggagga actatatccg 6960
gat 6963

<210> 35
<211> 6966
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 35
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt tttcgccctt tgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatatttttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgtttttccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
ccctttgtatt actgttttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatccctaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatcctttttt tctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gccttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgaggga aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagactttа 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120

ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgttig gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt ctttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caatttcccct ctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgtgctct gtttctaccg agaacgtttc 5100
cttcactgag acggaaaccg aggcacgtcg tagcgcgaac tacgagccga atagctggga 5160
ctacgatttc ctgctgtctt ccgatactga cgaatctatt gaggtgtaca aagacaaagc 5220
aaagaaactg gaggctgaag tgcgccgcga aattaacaac gagaaagctg aattcctgac 5280
tctgctggag ctgatcgata acgtacagcg cctgggtctg ggttaccgct tcgaatctga 5340
tatccgtcgc gcactggatc gtttcgtaag cagcggcggt ttcgatggcg tgaccaaaac 5400
gagcctgcac gctaccgcgc tgtccttccg tctgctgcgt cagcacggct tcgaagtttc 5460
tcaggaagca ttctccggtt tcaaagatca aaacggtaac ttcctggaaa acctgaaaga 5520
agacactaag gcgatcctga gcctgtatga ggcaagcttt ctggccctgg agggtgagaa 5580
catcctggat gaggcgcgcg tattctccat ctcccatctg aaagagctgt ctgaagagaa 5640
aatcggtaag gaactggcag agcaggttaa tcacgcactg gaactgccgc tgcatcgtcg 5700
tacccagcgt ctggaggcgg tttggtccat cgaagcgtac cgcaaaaagg aggatgctaa 5760
ccaggttctg ctggaactgg ccatcctgga ctacaacatg atccagtccg tttaccagcg 5820
tgatctgcgt gaaacctccc gttggtggcg ccgtgtgggc ctggcgacca aactgcactt 5880
cgctaaggac cgcctgattg agtctttta ctgggcagtc ggcgttgcgt tcgaacctca 5940
gtattctgac tgccgtaaca gcgttgcgaa aatgttcagc ttcgttacta ttatcgacga 6000
catctacgac gtttacggta ctctggacga gctggaactg tttaccgacg ctgtcgaacg 6060
ttgggatgtt aacgccatca acgatctgcc tgactacatg aaactgtgct tcctggcact 6120
gtataacacg atcaacgaaa ttgcatacga caacctgaaa gacaaaggtg aaaacatcct 6180
gccgtacctg actaaagcgt gggcggatct gtgtaacgct tttctgcaag aagcgaaatg 6240
gctgtataac aaatccactc cgaccttiga cgattatttc ggcaatgcct ggaaatccag 6300
ctctggcccg ctgcaactga tcttcgctta ttttgcggtt gtccaaaaca tcaaaaagga 6360
ggaaattgaa aacctgcaaa aataccacga tatcattagc cgtccttctc atatctttcg 6420
cctgtgcaac gacctggcaa gcgcgtccgc agagatcgca cgtggcgaaa ccgctaactc 6480
tgtttcctgc tacatgcgca ccaagggcat ttccgaagag ctggcaaccg agagcgtaat 6540
gaatctgatc gacgaaacct gtaagaaaat gaacaaagaa aaactgggtg gctcccigtt 6600
cgctaaaccg ttcgtagaga ctgctattaa cctggcacgt cagagccact gcacctacca 6660
caatggtgac gcacatacta gcccggatga actgactcgt aaacgtgtac tgtctgttat 6720
caccgaaccg attctgccgt tcgaacgtta actgcagctg gtaggatccg aattcgagct 6780
ccgtcgacaa gcttgcggcc gcactcgagc accaccacca ccaccactga gatccggctg 6840
ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat 6900
aaccccttgg ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga ggaactatat 6960
ccggat 6966

<210> 36
<211> 5679
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 36
aagggcgaat actgcagata tccatcacac tggcggccgc tcgagcatgc atctagaggg 60

cccaattcgc cctatagtga gtcgtattac aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt 120
gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc cccttcgcc 180
agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgcccct cccaacagtt gcgcagcctg 240
aatggcgaat ggacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc 300
gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc tagcgcccgc tccttcgct ttcttcccct 360
ccttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag 420
ggttccgatt tagtgctta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt 480
cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt 540
tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt 600
cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt 660
aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa ttcagggcgc aagggctgct aaaggaagcg 720
gaacacgtag aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg 780
ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct 840
tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc 900
tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttctgcc 960
gccaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt 1020
tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 1080
attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct 1140
gtcagcgcag gggcgcccgg ttcttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga 1200
actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc 1260
tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 1320
gcaggatccc ctgtcatccc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 1380
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca 1440
tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga 1500
cgaagagcat cagggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc 1560
cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 1620
aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca 1680
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg 1740
cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct tctatcgcct 1800
tcttgacgag ttcttctgaa ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc 1860
gccctttattc cctttttgc ggcatttttgc cttcctgttt ttgctcaccc agaaacgctg 1920
gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 1980
ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc 2040
acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa 2100
ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 2160
aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt 2220
gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 2280
ttttgcaca acatgggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat 2340
gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg 2400
cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 2460
atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt 2520
attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg 2580
ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 2640
gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg 2700
tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa 2760
aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatcccttа acgtgagttt 2820
tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 2880
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 2940
ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag 3000
atataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 3060
gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat 3120
aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg 3180
ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg 3240
agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac 3300
aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccagggga 3360
aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt 3420
ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta 3480
cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat 3540
tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg 3600
accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaaccgcct 3660
ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa 3720
gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggct 3780
ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac 3840
acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagcttggta ccgagctcgg atccactagt 3900
aacggccgcc agtgtgctgg aattcgccct tgatcatgca ttcgccctta ggaggtaaaa 3960
aaacatgtgt gcgacctctt ctcaatttac tcagattacc gagcataatt cccgtcgttc 4020
cgcaaactat cagccaaacc tgtggaattt cgaatttcctg caatccctgg agaacgacct 4080
gaaagtggaa aagctggagg agaaagcgac caaactggag gaagaagttc gctgcatgat 4140
caaccgtgta gacacccagc cgctgtccct gctggagctg atcgacgatg tgcagcgcct 4200
gggtctgacc tacaaatttg aaaaagacat cattaaagcc ctggaaaaca tcgtactgct 4260
ggacgaaaac aaaaagaaca aatctgacct gcacgcaacc gctctgtctt tccgtctgct 4320
gcgtcagcac ggtttcgagg tttctcagga tgttttgag cgtttcaagg ataaagaagg 4380
tggtttcagc ggtgaactga aaggtgacgt ccaaggcctg ctgagcctgt atgaagcgtc 4440
ttacctgggt ttcgagggtg agaacctgct ggaggaggcg cgtacctttt ccatcaccca 4500
cctgaagaac aacctgaaag aaggcattaa taccaaggtt gcagaacaag tgagccacgc 4560
cctggaactg ccatatcacc agcgtctgca ccgtctggag gcacgttggt tcctggataa 4620
atacgaaccg aaagaaccgc atcaccagct gctgctggag ctggcgaagc tggattttaa 4680
catggtacag accctgcacc agaaagagct gcaagatctg tcccgctggt ggaccgagat 4740

gggcctggct agcaaactgg attttgtacg cgaccgcctg atggaagttt atttctgggc 4800
actgggtatg gcgccagacc cgcagtttgg tgaatgtcgc aaagctgtta ctaaaatgtt 4860
tggtctggtg acgatcatcg atgacgtgta tgacgtttat ggcactctgg acgaactgca 4920
actgttcacc gatgctgtag agcgctggga cgttaacgct attaacaccc tgccggacta 4980
tatgaaactg tgtttcctgg cactgtacaa caccgttaac gacacgtcct attctattct 5040
gaaagagaaa ggtcataaca acctgtccta tctgacgaaa agctggcgtg aactgtgcaa 5100
agcctttctg caagaggcga aatggtccaa caacaaaatt atcccggctt tctccaagta 5160
cctggaaaac gccagcgttt cctcctccgg tgtagcgctg ctggcgccgt cttactttic 5220
cgtatgccag cagcaggaag acatctccga ccacgcgctg agttccctga ccgacttcca 5280
tggtctggtg cgttctagct gcgttatctt ccgcctgtgc aacgatctgg ccacctctgc 5340
ggcggagctg gaacgtggcg agactaccaa ttctatcatt agctacatgc acgaaaacga 5400
tggtaccagc gaggaacagg cccgcgaaga actgcgtaaa ctgatcgacg ccgaatggaa 5460
aaagatgaat cgtgaacgcg ttagcgactc caccctgctg cctaaagcgt tcatggaaat 5520
cgcagttaac atggcacgtg tttcccactg cacctaccag tatggcgatg gtctgggtcg 5580
cccagactac gcgactgaaa accgcatcaa actgctgctg attgacccti tcccgattaa 5640
ccagctgatg tatgtctaac tgcagggatc cgtcgaccg 5679

<210> 37
<211> 6974
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 37
gtgcggccgc aagcttgtcg acggagctcg aattcggatc cctgcagtta gacatacatc 60
agctggttaa tcgggaaagg gtcaatcagc agcagtttga tgcggttttc agtcgcgtag 120
tctgggcgac ccagaccatc gccatactgg taggtgcagt gggaaacacg tgccatgtta 180
actgcgattt ccatgaacgc tttaggcagc agggtggagt cgctaacgcg ttcacgattc 240
atcttttttcc attcggcgtc gatcagttta cgcagttctt cgcgggcctg ttcctcgctg 300
gtaccatcgt tttcgtgcat gtagctaatg atagaattgg tagtctcgcc acgttccagc 360
tccgccgcag aggtggccag atcgttgcac aggcggaaga taacgcagct agaacgcacc 420
agaccatgga agtcggtcag ggaacgcagc gcgtggtcgg agatgtcttc ctgctgctgg 480
catacggaaa agtaagacgg cgccagcagc gctacaccgg aggaggaaac gctggcgttt 540
tccaggtact tggagaaagc cgggataatt ttgttgttgg accatttcgc ctcttgcaga 600
aaggctttgc acagttcacg ccagctttic gtcagatagg acaggttgtt atgacctttc 660
tctttcagaa tagaatagga cgtgtcgtta acggtgttgt acagtgccag gaaacacagt 720
ttcatatagt ccggcagggt gttaatagcg ttaacgtccc agcgctctac agcatcggtg 780
aacagttgca gttcgtccag agtgccataa acgtcataca cgtcatcgat gatcgtcacc 840
agaccaaaca ttttagtaac agctttgcga cattcaccaa actgcgggtc tggcgccata 900
cccagtgccc agaaataaac ttccatcagg cggtcgcgta caaaatccag tttgctagcc 960
aggcccatct cggtccacca gcgggacaga tcttgcagct ctttctggtg cagggtctgt 1020
accatgttaa aatccagctt cgccagctcc agcagcagct ggtgatgcgg ttctttcggt 1080
tcgtatttat ccaggaacca acgtgcctcc agacggtgca gacgctggtg atatggcagt 1140
tccagggcgt ggctcacttg ttctgcaacc ttggtattaa tgccttcttt caggttgttc 1200
ttcaggtggg tgatggaaaa ggtacgcgcc tcctccagca ggttctcacc ctcgaaaccc 1260
aggtaagacg cttcatacag gctcagcagg ccttggacgt caccttttcag ttcaccgctg 1320
aaaccacctt ctttatcctt gaaacgctca aaaacatcct gagaaacctc gaaaccgtgc 1380
tgacgcagca gacggaaaga cagagcggtt gcgtgcaggt cagatttgtt cttttgtttt 1440
tcgtccagca gtacgatgtt ttccagggct ttaatgatgt cttttttcaaa tttgtaggtc 1500
agacccaggc gctgcacatc gtcgatcagc tccagcaggg acagcggctg ggtgtctaca 1560
cggttgatca tgcagcgaac ttcttcctcc agtttggtcg ctttctcctc cagcttttcc 1620
actttcaggt cgttctccag ggattgcagg aattcgaaat tccacaggtt tggctgatag 1680
tttgcggaac gacgggaatt atgctcggta atctgagtaa attgagaaga ggtcgcacac 1740
atggtatatc tccttcttaa agttaaacaa aattatttct agaggggaat tgttatccgc 1800
tcacaattcc cctatagtga gtcgtattaa tttcgcggga tcgagatctc gatcctctac 1860
gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacaggtg cggttgctgg cgcctatatc 1920
gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag cgcttgtttc 1980
ggcgtgggta tggtggcagg ccccgtggcc gggggactgt tgggcgccat ctccttgcat 2040
gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc tactactggg ctgcttccta 2100
atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga gatcccggac accatcgaat ggcgcaaaac 2160
ctttcgcggt atggcatgat agcgcccgga agagagtcaa ttcagggtgg tgaatgtgaa 2220
accagtaacg ttatacgatg tcgcagagta tgccggtgtc tcttatcaga ccgtttcccg 2280
cgtggtgaac caggccagcc acgtttctgc gaaaacgcgg gaaaaagtgg aagcggcgat 2340
ggcggagctg aattacattc ccaaccgcgt ggcacaacaa ctggcgggca aacagtcgtt 2400
gctgattggc gttgccacct ccagtctggc cctgcacgcg ccgtcgcaaa ttgtcgcggc 2460
gattaaatct cgcgccgatc aactgggtgc cagcgtggtg gtgtcgatgg tagaacgaag 2520
cggcgtcgaa gcctgtaaag cggcggtgca caatcttctc gcgcaacgcg tcagtgggct 2580
gatcattaac tatccgctgg atgaccagga tgccattgct gtggaagctg cctgcactaa 2640
tgttccggcg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc atcaacagta ttatttctcc 2700
ccatgaagac ggtacgcgac tgggcgtgga gcatctggtc gcattgggtc accagcaaat 2760
cgcgctgtta gcgggcccat taagttctgt ctcggcgcgt ctgcgtctgg ctggctggca 2820
taaatatctc actcgcaatc aaattcagcc gatagcggaa cgggaaggcg actggagtgc 2880
catgtccggt tttcaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag ggcatcgttc ccactgcgat 2940
gctggttgcc aacgatcaga tggcgctggg cgcaatgcgc gccattaccg agtccgggct 3000

gcgcgttggt gcggatatct cggtagtggg atacgacgat accgaagaca gctcatgtta 3060
tatcccgccg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgcctg ctggggcaaa ccagcgtgga 3120
ccgcttgctg caactctctc agggccaggc ggtgaagggc aatcagctgt tgcccgtctc 3180
actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt 3240
ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc 3300
gcaacgcaat taatgtaagt tagctcactc attaggcacc gggatctcga ccgatgccct 3360
tgagagcctt caacccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg 3420
cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg 3480
tcatttcggt cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg 3540
tattcggaat cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tggtcccgcc accaaacgtt 3600
tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcggcccc acgggtgcgc atgatcgtgc 3660
tcctgtcgtt gaggacccgg ctaggctggc ggggttgcct tactggttag cagaatgaat 3720
caccgatacg cgagcgaacg tgaagcgact gctgctgcaa aacgtctgcg acctgagcaa 3780
caacatgaat ggtcttcggt ttccgtgttt cgtaaagtct ggaaacgcgg aagtcagcgc 3840
cctgcaccat tatgttccgg atctgcatcg caggatgctg ctggctaccc tgtggaacac 3900
ctacatctgt attaacgaag cgctggcatt gacccgagtt gattttctc tggtcccgcc 3960
gcatccatac cgccagttgt ttaccctcac aacgttccag taaccgggca tgttcatcat 4020
cagtaacccg tatcgtgagc atcctctctc gtttcatcgg tatcattacc cccatgaaca 4080
gaaatccccc ttacacggag gcatcagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg 4140
cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg 4200
atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct 4260
gcctcgcgcg tttcggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 4320
tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 4380
gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 4440
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt 4500
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg 4560
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag 4620
gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 4680
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 4740
cgccccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca 4800
ggactataaa gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 4860
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 4920
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 4980
gtgcacgaac ccccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag 5040
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc 5100
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 5160
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 5220
gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 5280
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat ctttctacg 5340
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gaacaataaa 5400
actgtctgct tacataaaca gtaatacaag gggtgttatg agccatattc aacgggaaac 5460
gtcttgctct aggccgcgat taaattccaa catggatgct gatttatatg ggtataaatg 5520
ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga 5580
tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga 5640
gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat 5700
ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgatc cccgggaaaa cagcattcca 5760
ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg cagtgttcct 5820
gcgccggttg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg 5880
tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga 5940
cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac ttttgccatt 6000
ctcaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataaccttа ttttgacga 6060
ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga 6120
tcttgccatc ctatggaact gcctcggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt 6180
tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga 6240
tgagtttttc taagaattaa ttcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 6300
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaaatt gtaaacgtta 6360
atatttttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatttttt aaccaatagg 6420
ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg 6480
ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa 6540
aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca agttttttgg 6600
ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagcccccga tttagagctt 6660
gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa ggagcgggcg 6720
ctagggcgct ggcaagtgta gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc gccgcgctta 6780
atgcgccgct acagggcgcg tcccattcgc caatccggat atagttcctc ctttcagcaa 6840
aaaaccccctc aagacccgtt tagaggcccc aaggggttat gctagttatt gctcagcggt 6900
ggcagcagcc aactcagctt cctttcgggc tttgttagca gccggatctc agtggtggtg 6960
gtggtggtgc tcga 6974

<210> 38
<211> 1719
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38
gaattcaaaa tgtgtgcaac ttcatcccaa ttcactcaaa tcacagagca taattctaga 60
cgttcagcta actaccaacc aaatctgtgg aattttgaat ttcttcaatc ccttgaaaat 120
gatttgaaag tggaaaagtt ggaggaaaaa gccacaaaac tagaggaaga agttagatgt 180
atgataaaca gagtagatac acaacctctg tcactactag aattgattga cgatgtccag 240
aggctgggtt taacatataa gttcgaaaag gatataatca aagccttaga aaacatagtc 300
cttctagatg aaaacaagaa gaataagtct gacttgcacg caaccgctct gagttttaga 360
ttgctgagac aacatggttt tgaagtaagt caagatgtgt ttgaaaggtt caaagacaaa 420
gagggaggat tctcaggaga attaaaggga gatgtgcagg gtctgttgtc attgtacgag 480
gccagttatt tggggtttga aggggaaaat ctactagagg aggccagaac cttctctata 540
acccatctga agaataactt gaaagaaggc atcaatacaa aagtggctga acaagtttca 600
catgcattgg aattgcccta ccaccaaaga cttcatagac ttgaagccag atggttttg 660
gacaagtatg aaccaaagga gcctcaccat caacttttat tggaattagc aaaactggat 720
tttaacatgg ttcagacatt acaccagaaa gaattgcagg acctatcaag atggtggacg 780
gagatgggtt tagccagcaa gttagatttc gttagagata gattgatgga agtttacttt 840
tgggcactgg gaatggcacc agatcctcaa tttggtgaat gtagaaaggc agttacaaag 900
atgtttggtc tagtaacaat cattgatgat gtttatgatg tgtacggaac tttggatgaa 960
ttacaactat tcaccgacgc agttgaacgt tgggatgtaa acgcaataaa cacgttgcct 1020
gattatatga agctgtgttt tctggcattg tacaacacag tcaatgacac ttcttactcc 1080
attttaaagg agaaagggca taacaatcta tcctattiga caaaatcatg gagggagtta 1140
tgcaaagcat tccttcaaga agctaagtgg tctaacaata agataatccc agcattctcc 1200
aagtatcttg aaaacgcttc cgtatcctcc tccggtgtgg ccctactagc accatcatat 1260
ttttccgtct gccagcagca ggaagatatc tctgatcatg ctttgagatc cttaacagat 1320
tttcatggtc tagtcagatc ctcttgcgtg attttcagat tgtgcaatga tttggctact 1380
tcagccgcag agttagagag gggtgaaacc acgaactcaa ttattagtta tatgcacgag 1440
aatgatggaa catccgaaga acaagcccgt gaagaattaa gaaaactgat cgatgctgaa 1500
tggaagaaga tgaatagaga aagagtttcc gacagcactt tgctgcctaa ggcattcatg 1560
gagatagctg ttaacatggc tagggtttca cactgtacat accaatacgg ggacggtctt 1620
ggaaggcccg actacgccac tgaaaataga attaaactgc tactgattga tcctttcccc 1680
attaaccagt taatgtacgt gtaataggga tccgaattc 1719

<210> 39
<211> 7658
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39
acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt 60
cctcgttctc accggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctcgcgccgc actgctccga 120
acaataaaga ttctacaata ctagcttttа tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac 180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga 240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat 300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc 360
ggtttgtatt actttttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatac 420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac cccggatcgg actactagca gctgtaatac 480
gactcactat agggaatatt aagctatcaa acaagtttgt acaaaaaagc aggctgaatt 540
caaaatgtgt gcaacttcat cccaattcac tcaaatcaca gagcataatt ctagacgttc 600
agctaactac caaccaaatc tgtggaattt tgaatttctt caatccctig aaaatgattt 660
gaaagtggaa aagttggagg aaaaagccac aaaactagag gaagaagtta gatgtatgat 720
aaacagagta gatacacaac ctctgtcact actagaattg attgacgatg tccagaggct 780
gggtttaaca tataagttcg aaaaggatat aatcaaagcc ttagaaaaca tagtccttct 840
agatgaaaac aagaagaata agtctgactt gcacgcaacc gctctgagtt ttagattgct 900
gagacaacat ggttttgaag taagtcaaga tgtgtttgaa aggttcaaag acaaagaggg 960
aggattctca ggagaattaa agggagatgt gcagggtctg ttgtcattgt acgaggccag 1020
ttatttgggg tttgaagggg aaaatctact agaggaggcc agaaccttct ctataaccca 1080
tctgaagaat aacttgaaag aaggcatcaa tacaaaagtg gctgaacaag tttcacatgc 1140
attggaattg ccctaccacc aaagacttca tagacttgaa gccagatggt ttttggacaa 1200
gtatgaacca aaggagcctc accatcaact tttattggaa ttagcaaaac tggattttaa 1260
catggttcag acattacacc agaaagaatt gcaggaccta tcaagatggt ggacggagat 1320
gggtttagcc agcaagttag atttcgttag agatagattg atggaagttt acttttgggc 1380
actgggaatg gcaccagatc ctcaatttgg tgaatgtaga aaggcagtta caaagatgtt 1440
tggtctagta acaatcattg atgatgttta tgatgtgtac ggaacttigg atgaattaca 1500
actattcacc gacgcagttg aacgttggga tgtaaacgca ataaacacgt tgcctgatta 1560
tatgaagctg tgttttctgg cattgtacaa cacagtcaat gacacttctt actccatttt 1620
aaaggagaaa gggcataaca atctatccta tttgacaaaa tcatggaggg agttatgcaa 1680
agcattcctt caagaagcta agtggtctaa caataagata atcccagcat tctccaagta 1740
tcttgaaaac gcttccgtat cctcctccgg tgtggcccta ctagcaccat catattttic 1800
cgtctgccag cagcaggaag atatctctga tcatgcttig agatccttaa cagatttica 1860
tggtctagtc agatcctctt gcgtgatttt cagattgtgc aatgatttgg ctacttcagc 1920
cgcagagtta gagaggggtg aaaccacgaa ctcaattatt agttatatgc acgagaatga 1980
tggaacatcc gaagaacaag cccgtgaaga attaagaaaa ctgatcgatg ctgaatggaa 2040
gaagatgaat agagaaagag tttccgacag cacttigctg cctaaagcat tcatggagat 2100
agctgttaac atggctaggg tttcacactg tacataccaa tacggggacg gtcttggaag 2160
gcccgactac gccactgaaa atagaattaa actgctactg attgatcctt tccccattaa 2220
ccagttaatg tacgtgtaat agggatccga attcacccag ctttcttgta caaagtggtt 2280

cgatctagag ggcccttcga aggtaagcct atccctaacc ctctcctcgg tctcgattct 2340
acgcgtaccg gtcatcatca ccatcaccat tgagtttaaa cccgctgatc ctagagggcc 2400
gcatcatgta attagttatg tcacgcttac attcacgccc tccccccaca tccgctctaa 2460
ccgaaaagga aggagttaga caacctgaag tctaggtccc tatttatttt tttatagtta 2520
tgttagtatt aagaacgtta tttatatttc aaatttttct tttttttctg tacagacgcg 2580
tgtacgcatg taacattata ctgaaaacct tgcttgagaa ggttttggga cgctcgaagg 2640
ctttaatttg caagctgcgg ccctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 2700
tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg 2760
gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 2820
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aagcccagga accgtaaaaa 2880
ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg 2940
acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc 3000
tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc 3060
ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 3120
ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg 3180
ctgcgccttа tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 3240
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 3300
gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 3360
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 3420
caccgctggt agcggtggtt ttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg 3480
atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 3540
acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 3600
ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta 3660
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 3720
tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag cgcttaccat ctggccccag 3780
tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca 3840
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 3900
tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 3960
tgttggcatt gctacaggca tcgtggtgtc actctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 4020
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatccccc atgttgtgca aaaaagcggt 4080
tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 4140
ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 4200
gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 4260
ttgcccggcg tcaatacggg ataataqtgt atcacatagc agaactttaa aagtgctcat 4320
cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 4380
ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 4440
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 4500
gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatgggta taaactgata taattaaatt 4560
gaagctctaa tttgtgagtt tagtatacat gcatttactt ataatacagt tttttagttt 4620
tgctggccgc atcttctcaa atatgcttcc cagcctgctt ttctgtaacg ttcaccctct 4680
accttagcat ccctttccctt tgcaaatagt cctcttccaa caataataat gtcagatcct 4740
gtagagacca catcatccac ggttctatac tgttgaccca atgcgtctcc cttgtcatct 4800
aaacccacac cgggtgtcat aatcaaccaa tcgtaacctt catctcttcc acccatgtct 4860
ctttgagcaa taaagccgat aacaaaatct ttgtcgctct tcgcaatgtc aacagtaccc 4920
ttagtatatt ctccagtaga tagggagccc ttgcatgaca attctgctaa catcaaaagg 4980
cctctaggtt cctttgttac ttcttctgcc gcctgcttca aaccgctaac aatacctggg 5040
cccaccacac cgtgtgcatt cgtaatgtct gcccattctg ctattctgta tacacccgca 5100
gagtactgca atttgactgt attaccaatg tcagcaaatt ttctgtcttc gaagagtaaa 5160
aaattgtact tggcggataa tgccttтagc ggcttaactg tgcccttcat ggaaaaatca 5220
gtcaagatat ccacatgtgt ttttagtaaa caaattttgg gacctaatgc ttcaactaac 5280
tccagtaatt ccttggtggt acgaacatcc aatgaagcac acaagtttgt ttgctttcg 5340
tgcatgatat taaatagctt ggcagcaaca ggactaggat gagtagcagc acgttccttа 5400
tatgtagctt tcgacatgat ttatcttcgt ttcctgcagg tttttgttct gtgcagttgg 5460
gttaagaata ctgggcaatt tcatgtttct tcaacactac atatgcgtat atataccaat 5520
ctaagtctgt gctccttcct tcgttcttcc ttctgttcgg agattaccga atcaaaaaaa 5580
tttcaaagaa accgaaatca aaaaaaagaa taaaaaaaaa atgatgaatt gaattgaaaa 5640
gctagcttat cgatgataag ctgtcaaaga tgagaattaa ttccacggac tatagactat 5700
actagatact ccgtctactg tacgatacac ttccgctcag gtccttgtcc tttaacgagg 5760
ccttaccact cttttgttac tctattgatc cagctcagca aaggcagtgt gatctaagat 5820
tctatcttcg cgatgtagta aaactagcta gaccgagaaa gagactagaa atgcaaaagg 5880
cacttctaca atggctgcca tcattattat ccgatgtgac gctgcagctt ctcaatgata 5940
ttcgaatacg ctttgaggag atacagccta atatccgaca aactgttta cagatttacg 6000
atcgtacttg ttacccatca ttgaattttg aacatccgaa cctgggagtt ttccctgaaa 6060
cagatagtat atttgaacct gtataataat atatagtcta gcgctttacg gaagacaatg 6120
tatgtatttc ggttcctgga gaaactattg catctattgc ataggtaatc ttgcacgtcg 6180
catccccggt tcattttctg cgttccatc ttgcacttca atagcatatc tttgttaacg 6240
aagcatctgt gcttcatttt gtagaacaaa aatgcaacgc gagagcgcta atttttcaaa 6300
caaagaatct gagctgcatt tttacagaac agaaatgcaa cgcgaaagcg ctattttacc 6360
aacgaagaat ctgtgcttca tttttgtaaa acaaaaatgc aacgcgacga gagcgctaat 6420
ttttcaaaca aagaatctga gctgcatttt tacagaacag aaatgcaacg cgagagcgct 6480
atttttaccaa caaagaatct atacttcttt tttgttctac aaaaatgcat cccgagagcg 6540
ctatttttct aacaaagcat cttagattac tttttttctc ctttgtgcgc tctataatgc 6600
agtctcttga taacttttg cactgtaggt ccgttaaggt tagaagaagg ctacttttggt 6660
gtctatttc tcttccataa aaaaagcctg actccacttc ccgcgtttac tgattactag 6720
cgaagctgcg ggtgcatttt ttcaagataa aggcatcccc gattatattc tataccgatg 6780
tggattgcgc atactttgtg aacagaaagt gatagcgttg atgattcttc attggtcaga 6840
aaattatgaa cggtttcttc tatttttgtct ctatatacta cgtataggaa atgtttacat 6900
tttcgtattg ttttcgattc actctatgaa tagttcttac tacaattttt ttgtctaaag 6960

agtaatacta gagataaaca taaaaaatgt agaggtcgag tttagatgca agttcaagga 7020
gcgaaaggtg gatgggtagg ttatataggg atatagcaca gagatatata gcaaagagat 7080
acttttgagc aatgtttgtg gaagcggtat tcgcaatggg aagctccacc ccggttgata 7140
atcagaaaag ccccaaaaac aggaagattg tataagcaaa tatttaaatt gtaaacgtta 7200
atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatttttt aacgaatagc 7260
ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg 7320
ttccagtttc caacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa 7380
aaagggtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca agttttttgg 7440
ggtcgaggtg ccgtaaagca gtaaatcgga aggqtaaacg gatgccccca tttagagctt 7500
gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa ggagcggggg 7560
ctagggcggt gggaagtgta ggggtcacgc tgggcgtaac caccacaccc gccgcgctta 7620
atggggcgct acagggcgcg tggggatgat ccactagt 7658

<210> 40
<211> 1746
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 40
catcttaagc ttgtttaact ttaagaagga gatatacata tgtgcgccac cagcagccag 60
ttcacccaga tcaccgagca taatagccgt cggtccgcga actaccagcc caacctgtgg 120
aacttcgagt tcctgcagag cctggaaaac gacctgaagg tggagaagct cgaagagaag 180
gccaccaagc tggaggagga ggtgcgttgc atgatcaacc gggtggacac ccagcccctg 240
agcctgctgg agctcatcga cgacgtgcag cgcctgggcc tgacctacaa gtttgagaaa 300
gatatcatca aggcgctgga gaacatcgtc ctgctggacg agaataagaa gaacaaaagc 360
gatctgcacg cgaccgccct gagcttccgc ctgctgcggc agcatggctt tgaggtgagc 420
caggacgtgt tcgagcgctt caaggacaaa gaaggggget tctccgggga actgaagggt 480
gacgtgcagg gcctgctgag cctgtacgag gccagctatc tcggtttcga aggcgaaaat 540
ctgctggagg aggcccgtac cttcagcatc acccatctga agaacaacct caaggagggg 600
atcaacacga aggtggccga gcaggtgtcc cacgcgctgg agctgccgta tcatcaacgc 660
ctgcaccgcc tggaggcgcg gtggtttctg gacaagtacg aacccaagga gccgcatcac 720
cagctgctgc tggaactggc caaactcgat ttcaacatgg tccagaccct gcaccaaaaa 780
gagctgcagg acctgagccg gtggtggacc gagatgggcc tcgccagcaa gctggatttc 840
gtgcgggacc gcctgatgga agtgtacttc tgggcgctgg gcatggcgcc ggacccgcag 900
ttcggcgaat gccgcaaggc cgtcaccaag atgttcggtc tggtcaccat tatcgatgac 960
gtctatgacg tgtacggtac cctggacgaa ctgcagctct tcaccgacgc ggtggaacgc 1020
tgggacgtga acgccatcaa cacgctgccc gactatatga agctgtgctt cctggccctg 1080
tacaacaccg tgaacgacac gtcctactcc atcctgaagg agaagggcca caataacctg 1140
agctatctga ccaaaagctg gcgcgaactg tgcaaggcct tcctgcaaga agccaagtgg 1200
agcaataaca agatcatccc cgccttcagc aagtacctgg agaacgccag cgtgtcctcc 1260
agcggggtcg cgctgctggc gccgagctac ttctcggtct gccagcagca ggaagatatc 1320
tcggaccacg ccctccgctc cctgaccgac ttccacggcc tggtgcgctc gtcctgcgtg 1380
atctttcggc tgtgcaacga tctggcgacc tcggcggcgg aactcgaacg cggcgaaacc 1440
accaacagca tcatcagcta catgcacgag aacgacggca cgagcgagga acaggcccgc 1500
gaagagctgc gcaagctgat cgacgccgag tggaagaaaa tgaaccgcga gcgcgtgtcg 1560
gacagcaccc tgctgccgaa ggcgttcatg gagatcgccg tgaacatggc ccgcgtgagc 1620
cactgcacct accaatatgg ggacgggctg ggccgcccgg attacgccac cgagaaccgc 1680
atcaagctgc tgctcatcga cccgttcccc atcaaccagc tgatgtacgt gtgaggatcc 1740
cgtaac 1746

<210> 41
<211> 4768
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 41
ctcgggccgt ctcttgggct tgatcggcct tcttgcgcat ctcacgcgct cctgcggcgg 60
cctgtagggc aggctcatac ccctgccgaa ccgctttttgt cagccggtcg gccacggctt 120
ccggcgtctc aacgcgcttt gagattccca gcttttcggc caatccctgc ggtgcatagg 180
cgcgtggctc gaccgcttgc gggctgatgg tgacgtggcc cactggtggc cgctccaggg 240
cctcgtagaa cgcctgaatg cgcgtgtgac gtgccttgct gccctcgatg ccccgttgca 300
gccctagatc ggccacagcg gccgcaaacg tggtctggtc gcgggtcatc tgcgctttgt 360
tgccgatgaa ctccttggcc gacagcctgc cgtcctgcgt cagcggcacc acgaacgcgg 420
tcatgtgcgg gctggtttcg tcacggtgga tgctggccgt cacgatgcga tccgccccgt 480
acttgtccgc cagccacttg tgcgccttct cgaagaacgc cgcctgctgt tcttggctgg 540
ccgacttcca ccatccgggg ctggccgtca tgacgtactc gaccgccaac acagcgtcct 600
tgcgccgctt ctctggcagc aactcgcgca gtcggcccat cgcttcatcg gtgctgctgg 660
ccgcccagtg ctcgttctct ggcgtcctgc tggcgtcagc gttgggcgtc tcgcgctcgc 720
ggtaggcgtg cttgagactg gccgccacgt tgcccatttt cgccagcttc ttgcatcgca 780
tgatcgcgta tgccgccatg cctgccccctc cctttttggtg tccaaccggc tcgacggggg 840

cagcgcaagg cggtgcctcc ggcgggccac tcaatgcttg agtatactca ctagactttg 900
cttcgcaaag tcgtgaccgc ctacggcggc tgcggcgccc tacgggcttg ctctccgggc 960
ttcgccctgc gcggtcgctg cgctccctig ccagcccgtg gatatgtgga cgatggccgc 1020
gagcggccac cggctggctc gcttcgctcg gcccgtggac aaccctgctg gacaagctga 1080
tggacaggct gcgcctgccc acgagcttga ccacagggat tgcccaccgg ctacccagcc 1140
ttcgaccaca tacccaccgg ctccaactgc gcggcctgcg gccttgcccc atcaattttt 1200
ttaatttttct ctggggaaaa gcctccggcc tgcggcctgc gcgcttcgct tgccggttgg 1260
acaccaagtg gaaggcgggt caaggctcgc gcagcgaccg cgcagcggct tggccttgac 1320
gcgcctggaa cgacccaagc ctatgcgagt gggggcagtc gaaggcgaag cccgcccgcc 1380
tgcccccccga gcctcacggc ggcgagtgcg ggggttccaa gggggcagcg ccaccttggg 1440
caaggccgaa ggccgcgcag tcgatcaaca agccccggag gggccacttt ttgccggagg 1500
gggagccgcg ccgaaggcgt gggggaaccc cgcaggggtg ccctictiig ggcaccaaag 1560
aactagatat agggcgaaat gcgaaagact taaaaatcaa caacttaaaa aaggggggta 1620
cgcaacagct cattgcggca ccccccgcaa tagctcattg cgtaggttaa agaaaatctg 1680
taattgactg ccacttttac gcaacgcata attgttgtcg cgctgccgaa aagttgcagc 1740
tgattgcgca tggtgccgca accgtgcggc accctaccgc atggagataa gcatggccac 1800
gcagtccaga gaaatcggca ttcaagccaa gaacaagccc ggtcactggg tgcaaacgga 1860
acgcaaagcg catgaggcgt gggccgggct tattgcgagg aaacccacgg cggcaatgct 1920
gctgcatcac ctcgtggcgc agatgggcca ccagaacgcc gtggtggtca gccagaagac 1980
actttccaag ctcatcggac gttctttgcg gacggtccaa tacgcagtca aggacttggt 2040
ggccgagcgc tggatctccg tcgtgaagct caacggcccc ggcaccgtgt cggcctacgt 2100
ggtcaatgac cgcgtggcgt ggggccagcc ccgcgaccag ttgcgcctgt cggtgttcag 2160
tgccgccgtg gtggttgatc acgacgacca ggacgaatcg ctgttggggc atggcgacct 2220
gcgccgcatc ccgaccctgt atccgggcga gcagcaacta ccgaccggcc ccggcgagga 2280
gccgcccagc cagcccggca ttccgggcat ggaaccagac ctgccagcct tgaccgaaac 2340
ggaggaatgg gaacggcgcg ggcagcagcg cctgccgatg cccgatgagc cgtgttttct 2400
ggacgatggc gagccgttgg agccgccgac acgggtcacg ctgccgcgcc ggtagcactt 2460
gggttgcgca gcaacccgta agtgcgctgt tccagactat cggctgtagc cgcctcgccg 2520
ccctatacct tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga 2580
cctgaatgga agccggcggc acctcgctaa cggattcacc gttttiatca ggctctggga 2640
ggcagaataa atgatcatat cgtcaattat tacctccacg gggagagcct gagcaaactg 2700
gcctcaggca tttgagaagc acacggtcac actgcttccg gtagtcaata aaccggtaaa 2760
ccagcaatag acataagcgg ctatttaacg accctgccct gaaccgacga ccgggtcgaa 2820
tttgctttcg aatttctgcc atttcatccgc ttattatcac ttattcaggc gtagcaccag 2880
gcgtttaagg gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc cccgccctgc cactcatcgc 2940
agtcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca 3000
aaatattaac gcttacaatt tccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg 3060
atcggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg 3120
attaagttgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga 3180
gcgcgcgtaa tacgactcac tatagggcga attggagctc caccgcggtg gcggccgctc 3240
tagaactagt ggatcccccg ggctgcagga attcgatatc aagcttatcg ataccgtcga 3300
cctcgagggg gggcccggta cccagcttit gttccctita gtgagggtta attgcgcgct 3360
tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 3420
acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac 3480
tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 3540
tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgcatgcata 3600
aaaactgttg taattcatta agcattctgc cgacatggaa gccatcacaa acggcatgat 3660
gaacctgaat cgccagcggc atcagcacct tgtcgccttg cgtataatat ttgcccatgg 3720
acgcacaccg tggaaacgga tgaaggcacg aacccagttg acataagcct gttcggttcg 3780
taaactgtaa tgcaagtagc gtatgcgctc acgcaactgg tccagaacct tgaccgaacg 3840
cagcggtggt aacggcgcag tggcggtttt catggcttgt tatgactgtt ttttgtacа 3900
gtctatgcct cgggcatcca agcagcaagc gcgttacgcc gtgggtcgat gtttgatgtt 3960
atggagcagc aacgatgtta cgcagcagca acgatgttac gcagcagggc agtcgcccta 4020
aaacaaagtt aggtggctca agtatgggca tcattcgcac atgtaggctc ggccctgacc 4080
aagtcaaatc catgcgggct gctcttgatc ttttcggtcg tgagttcgga gacgtagcca 4140
cctactccca acatcagccg gactccgatt acctcgggaa cttgctccgt agtaagacat 4200
tcatcgcgct tgctgccttc gaccaagaag cggttgttgg cgctctcgcg gcttacgttc 4260
tgcccaggtt tgagcagccg cgtagtgaga tctatatcta tgatctcgca gtctccggcg 4320
agcaccggag gcagggcatt gccaccgcgc tcatcaatct cctcaagcat gaggccaacg 4380
cgcttggtgc ttatgtgatc tacgtgcaag cagattacgg tgacgatccc gcagtggctc 4440
tctatacaaa gttgggcata cgggaagaag tgatgcactt tgatatcgac ccaagtaccg 4500
ccacctaaca attcgttcaa gccgagatcg gcttcccggc cgcggagttg ttcggtaaat 4560
tgtcacaacg ccgccaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcgcccgcg ttcctgctgg 4620
cgctgggcct gtttctggcg ctggacttcc cgctgttccg tcagcagctt ttcgcccacg 4680
gccttgatga tcgcggcggc cttggcctgc atatcccgat tcaacggccc cagggcgtcc 4740
agaacgggct tcaggcgctc ccgaaggt 4768

<210> 42
<211> 6466
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 42
ctcgggccgt ctcttgggct tgatcggcct tcttgcgcat ctcacgcgct cctgcggcgg 60
cctgtagggc aggctcatac ccctgccgaa ccgcttttgt cagccggtcg gccacggctt 120

ccggcgtctc aacgcgcttt gagattccca gcttttcggc caatccctgc ggtgcatagg 180
cgcgtggctc gaccgcttgc gggctgatgg tgacgtggcc cactggtggc cgctccaggg 240
cctcgtagaa cgcctgaatg cgcgtgtgac gtgccttgct gccctcgatg ccccgttgca 300
gccctagatc ggccacagcg gccgcaaacg tggtctggtc gcgggtcatc tgcgctttgt 360
tgccgatgaa ctccttggcc gacagcctgc cgtcctgcgt cagcggcacc acgaacgcgg 420
tcatgtgcgg gctggtttcg tcacggtgga tgctggccgt cacgatgcga tccgccccgt 480
acttgtccgc cagccacttg tgcgccttct cgaagaacgc cgcctgctgt tcttggctgg 540
ccgacttcca ccattccggg ctggccgtca tgacgtactc gaccgccaac acagcgtcct 600
tgcgccgctt ctctggcagc aactcgcgca gtcggcccat cgcttcatcg gtgctgctgg 660
ccgcccagtg ctcgttctct ggcgtcctgc tggcgtcagc gttgggcgtc tcgcgctcgc 720
ggtaggcgtg cttgagactg gccgccacgt tgcccatttt cgccagcttc ttgcatcgca 780
tgatcgcgta tgccgccatg cctgcccctc cctttggtg tccaaccggc tcgacggggg 840
cagcgcaagg cggtgcctcc ggcgggccac tcaatgcttg agtatactca ctagactttg 900
cttcgcaaag tcgtgaccgc ctacggcggc tgcggcgccc tacgggcttg ctctccgggc 960
ttcgccctgc gcggtcgctg cgctcccttg ccagccccgtg gatatgtgga cgatggccgc 1020
gagcggccac cggctggctc gcttcgctcg gcccgtggac aaccctgctg gacaagctga 1080
tggacaggct gcgcctgccc acgagcttga ccacagggat tgcccaccgg ctacccagcc 1140
ttcgaccaca tacccaccgg ctccaactgc gcggcctgcg gccttgcccc atcaattttt 1200
ttaatttttct ctggggaaaa gcctccggcc tgcggcctgc gcgcttcgct tgccggttgg 1260
acaccaagtg gaaggcgggt caaggctcgc gcagcgaccg cgcagcggct tggccttgac 1320
gcgcctggaa cgacccaagc ctatgcgagt gggggcagtc gaaggcgaag cccgcccgcc 1380
tgccccccga gcctcacggc ggcgagtgcg ggggttccaa gggggcagcg ccaccttggg 1440
caaggccgaa ggccgcgcag tcgatcaaca agccccggag gggccacttt ttgccggagg 1500
gggagccgcg ccgaaggcgt gggggaaccc cgcaggggtg cccttctttg ggcaccaaag 1560
aactagatat agggcgaaat gcgaaagact taaaaatcaa caacttaaaa aagggggtta 1620
cgcaacagct cattgcggca ccccccgcaa tagctcattg cgtaggttaa agaaaatctg 1680
taattgactg ccacttttac gcaacgcata attgttgtcg cgctgccgaa aagttgcagc 1740
tgattgcgca tggtgccgca accgtgcggc accctaccgc atggagataa gcatggccac 1800
gcagtccaga gaaatcggca ttcaagccaa gaacaagccc ggtcactggg tgcaaacgga 1860
acgcaaagcg catgaggcgt gggccgggct tattgcgagg aaacccacgg cggcaatgct 1920
gctgcatcac ctcgtggcgc agatgggcca ccagaacgcc gtggtggtca gccagaagac 1980
actttccaag ctcatcggac gttcttgcg gacggtccaa tacgcagtca aggacttggt 2040
ggccgagcgc tggatctccg tcgtgaagct caacggcccc ggcaccgtgt cggcctacgt 2100
ggtcaatgac cgcgtggcgt ggggccagcc ccgcgaccag ttgcgcctgt cggtgttcag 2160
tgccgccgtg gtggttgatc acgacgacca ggacgaatcg ctgttggggc atggcgacct 2220
gcgccgcatc ccgaccctgt atccgggcga gcagcaacta ccgaccggcc ccggcgagga 2280
gccgcccagc cagcccggca ttccgggcat ggaaccagac ctgccagcct tgaccgaaac 2340
ggaggaatgg gaacggcgcg ggcagcagcg cctgccgatg cccgatgagc cgtgttttct 2400
ggacgatggc gagccgttgg agccgccgac acgggtcacg ctgccgcgcc ggtagcactt 2460
gggttgcgca gcaacccgta agtgcgctgt tccagactat cggctgtagc cgcctcgccg 2520
ccctatacct tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga 2580
cctgaatgga agccggcggc acctcgctaa cggattcacc gttttatca ggctctggga 2640
ggcagaataa atgatcatat cgtcaattat tacctccacg gggagagcct gagcaaactg 2700
gcctcaggca tttgagaagc acacggtcac actgcttccg gtagtcaata aaccggtaaa 2760
ccagcaatag acataagcgg ctatttaacg accctgccct gaaccgacga ccgggtcgaa 2820
tttgctttcg aatttctgcc attcatccgc ttattatcac ttattcaggc gtagcaccag 2880
gcgtttaagg gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc cccgccctgc cactcatcgc 2940
agtcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca 3000
aaatattaac gcttacaatt tccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg 3060
atcggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg 3120
attaagttgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga 3180
gcgcgcgtaa tacgactcac tatagggcga attggagctc caccgcggtg gcggccgctc 3240
tagaactagt ggatcctcac acgtacatca gctggttgat ggggaacggg tcgatgagca 3300
gcagcttgat gcggttctcg gtggcgtaat ccgggcggcc cagcccgtcc ccatattggt 3360
aggtgcagtg gctcacgcgg gccatgttca cggcgatctc catgaacgcc ttcggcagca 3420
gggtgctgtc cgacacgcgc tcgcggttca ttttcttcca ctcggcgtcg atcagcttgc 3480
gcagctcttc gcgggcctgt tcctcgctcg tgccgtcgtt ctcgtgcatg tagctgatga 3540
tgctgttggt ggtttcgccg cgttcgagtt ccgccgccga ggtcgccaga tcgttgcaca 3600
gccgaaagat cacgcaggac gagcgcacca ggccgtggaa gtcggtcagg gagcggaggg 3660
cgtggtccga gatatcttcc tgctgctggc agaccgagaa gtagctcggc gccagcagcg 3720
cgacccccgct ggaggacacg ctggcgttct ccaggtactt gctgaaggcg gggatgatct 3780
tgttattgct ccacttggct tcttgcagga aggccttgca cagttcgcgc cagcttttgg 3840
tcagatagct caggttattg tggccctttct ccttcaggat ggaggtaggac gtgtcgttca 3900
cggtgttgta cagggccagg aagcacagct tcatatagtc gggcagcgtg ttgatggcgt 3960
tcacgtccca gcgttccacc gcgtcggtga agagctgcag ttcgtccagg gtaccgtaca 4020
cgtcatagac gtcatcgata atggtgacca gaccgaacat cttggtgacg gccttgcggc 4080
attcgccgaa ctgcgggtcc ggcgccatgc ccagcgccca gaagtacact tccatcaggc 4140
ggtcccgcac gaaatccagc ttgctggcga ggcccatctc ggtccaccac cggctcaggt 4200
cctgcagctc ttttggtgc agggtcigga ccatgttgaa atcgagtttg gccagttcca 4260
gcagcagctg gtgatgcggc tccttgggtt cgtacttgtc cagaaaccac cgcgcctcca 4320
ggcggtgcag gcgttgatga tacggcagct ccagcgcgtg ggacacctgc tcggccacct 4380
tcgtgttgat cccctccttg aggttgttct tcagatgggt gatgctgaag gtacgggcct 4440
cctccagcag attttcgcct tcgaaaccga gatagctggc ctcgtacagg ctcagcaggc 4500
cctgcacgtc acccttcagt tccccggaga agcccccttc tttgtccttg aagcgctcga 4560
acacgtcctg gctcacctca aagccatgct gccgcagcag gcggaagctc agggcggtcg 4620
cgtgcagatc gcttttgttc ttcttattct cgtccagcag gacgatgttc tccagcgcct 4680
tgatgatatc tttctcaaac ttgtaggtca ggcccaggcg ctgcacgtcg tcgatgagct 4740
ccagcaggct caggggctgg gtgtccaccc ggttgatcat gcaacgcacc tcctcctcca 4800

gcttggtggc ctctcttcg agcttctcca ccttcaggtc gttttccagg ctctgcagga 4860
actcgaagtt ccacaggttg ggctggtagt tcgcggaccg acggctatta tgctcggtga 4920
tctgggtgaa ctggctgctg gtggcgcaca tatgtatatc tccttcttaa agttaaacaa 4980
gcttatcgat accgtcgacc tcgaggggggg gcccggtacc cagcttttgt tcccttagt 5040
gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt 5100
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg 5160
cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg 5220
gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc 5280
gtattgggcg catgcataaa aactgttgta atticattaag cattctgccg acatggaagc 5340
catcacaaac ggcatgatga acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgcg 5400
tataatattt gcccatggac gcacaccgtg gaaacggatg aaggcacgaa cccagttgac 5460
ataagcctgt tcggttcgta aactgtaatg caagtagcgt atgcgctcac gcaactggtc 5520
cagaaccttg accgaacgca gcggtggtaa cggcgcagtg gcggtttica tggcttgtta 5580
tgactgtttt tttgtacagt ctatgcctcg ggcatccaag cagcaagcgc gttacgccgt 5640
gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa cgatgttacg cagcagcaac gatgttacgc 5700
agcagggcag tcgccctaaa acaaagttag gtggctcaag tatgggcatc attcgcacat 5760
gtaggctcgg ccctgaccaa gtcaaatcca tgcgggctgc tcttgatctt ttcggtcgtg 5820
agttcggaga cgtagccacc tactcccaac atcagccgga ctccgattac ctcgggaact 5880
tgctccgtag taagacattc atcgcgcttg ctgccttcga ccaagaagcg gttgttggcg 5940
cictcgcggc ttacgttctg cccaggtttg agcagccgcg tagtgagatc tatatctatg 6000
atctcgcagt ctccggcgag caccggaggc agggcattgc caccgcgctc atcaatctcc 6060
tcaagcatga ggccaacgcg cttggtgctt atgtgatcta cgtgcaagca gattacggtg 6120
acgatcccgc agtggctctc tatacaaagt tgggcatacg ggaagaagtg atgcactttg 6180
atatcgaccc aagtaccgcc acctaacaat tcgttcaagc cgagatcggc ttcccggccg 6240
cggagttgtt cggtaaattg tcacaacgcc gccaggtggc actttcgggg gaaatgtgcg 6300
cgcccgcgtt cctgctggcg ctgggcctgt ttctggcgct ggacttcccg ctgttccgtc 6360
agcagctttt cgcccacggc cttgatgatc gcggcggcct tggcctgcat atcccgattc 6420
aacggcccca gggcgtccag aacgggcttc aggcgctccc gaaggt 6466

<210> 43
<211> 6957
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 43
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
tttgatttta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
cttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
ccttgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatcctttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280

tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg tttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt ctttcaccca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcattgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagccgcat cttcccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcaccttgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caatttcccct ctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgcgttgt agcgtgtcca ccgaaaatgt 5100
gtctttcacc gaaactgaaa ccgaagctcg tcgttctgcg aactacgaac ctaacagctg 5160
ggactatgat tacctgctgt cctccgacac ggacgagtcc atcgaagtat acaaagacaa 5220
agcgaaaaag ctggaagccg aagttcgtcg cgagattaat aacgaaaaag cagaatttct 5280
gaccctgctg gaactgattg acaacgtcca gcgcctgggc ctgggttacc gtttcgagtc 5340
tgatatccgt ggtgcgctgg atcgcttcgt ttcctccggc ggcttcgatg cggtaaccaa 5400
gacttccctg cacggtacgg cactgtcttt ccgtctgctg cgtcaacacg gttttgaggt 5460
ttctcaggaa gcgttcagcg gcttcaaaga ccaaaacggc aacttcctgg agaacctgaa 5520
ggaagatatc aaagctatcc tgagcctgta cgaggccagc ttcctggctc tggaaggcga 5580
aaacatcctg gacgaggcga aggttttcgc aatctctcat ctgaaagaac tgtctgaaga 5640
aaagatcggt aaagagctgg cagaacaggt gaaccatgca ctggaactgc cactgcatcg 5700
ccgtactcag cgtctggaag cagtatggtc tatcgaggcc taccgtaaaa aggaggacgc 5760
gaatcaggtt ctgctggagc tggcaattct ggattacaac atgatccagt ctgtatacca 5820
gcgtgatctg cgtgaaacgt cccgttggtg gcgtcgtgtg ggtctggcga ccaaactgca 5880
ctttgctcgt gaccgcctga ttgagagctt ctactgggcc gtgggtgtag cattcgaacc 5940
gcaatactcc gactgccgta actccgtcgc aaaaatgttt tctttcgtaa ccattatcga 6000
cgatatctac gatgtatacg gcacccttgga cgaactggag ctgtttactg atgcagttga 6060
gcgttgggac gtaaacgcca tcaacgacct gccggattac atgaaactgt gctttctggc 6120
tctgtataac actattaacg aaatcgccta cgacaacctg aaagataaag gtgagaacat 6180
cctgccgtat ctgaccaaag cctgggctga cctgtgcaac gctttcctgc aagaagccaa 6240
gtggctgtac aacaaatcta ctccgacctt tgacgactac ttcggcaacg catggaaatc 6300
ctcttctggc ccgctgcaac tggtgttcgc ttacttcgct gtcgtgcaga acattaaaaa 6360
ggaagagatc gaaaacctgc aaaaatacca tgacaccatc tctcgtcctt cccatatctt 6420
ccgtctgtgc aatgacctgg ctagcgcgtc tgcggaaatt gcgcgtggtg aaaccgcaaa 6480
tagcgtttct tgttacatgc gcactaaagg tatctccgaa gaactggcta ccgaaagcgt 6540
gatgaatctg atcgatgaaa cctggaaaaa gatgaacaag gaaaaactgg gtggtagcct 6600
gttcgcgaaa ccgttcgtgg aaaccgcgat caacctggca cgtcaatctc actgcactta 6660
tcataacggc gacgcgcata cctctccgga tgagctgacc cgcaaacgcg ttctgtctgt 6720
aatcactgaa ccgattctgc cgtttgaacg ctaaggatcc gaattcgagc tccgtcgaca 6780
agcttgcggc cgcactcgag caccaccacc accaccactg agatccggct gctaacaaag 6840
cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taaccccttg 6900
gggcctctaa acgggtcttg agggggtttt tgctgaaagg aggaactata tccggat 6957

<210> 44
<211> 6068
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 44
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatgagatg 420
tagcgtgtcc accgaaaatg tgtctttcac cgaaactgaa accgaagctc gtcgttctgc 480
gaactacgaa cctaacagct gggactatga ttacctgctg tcctccgaca cggacgagtc 540
catcgaagta tacaaagaca aagcgaaaaa gctggaagcc gaagttcgtc gcgagattaa 600
taacgaaaaa gcagaatttc tgaccctgct ggaactgatt gacaacgtcc agcgcctggg 660
cctgggttac cgtttcgagt ctgatatccg tggtgcgctg gatcgcttcg tttcctccgg 720
cggcttcgat gcggtaacca agacttccct gcacggtacg gcactgtctt tccgtctgct 780
gcgtcaacac ggttttgagg tttctcagga agcgttcagc ggcttcaaag accaaaacgg 840
caacttcctg gagaacctga aggaagatat caaagctatc ctgagcctgt acgaggccag 900
cttcctggct ctggaaggcg aaaacatcct ggacgaggcg aaggttttcg caatctctca 960
tctgaaagaa ctgtctgaag aaaagatcgg taaagagctg gcagaacagg tgaaccatgc 1020
actggaactg ccactgcatc gccgtactca gcgtctggaa gcagtatggt ctatcgaggc 1080
ctaccgtaaa aaggaggacg cgaatcaggt tctgctggag ctggcaattc tggattacaa 1140
catgatccag tctgtatacc agcgtgatct gcgtgaaacg tcccgttggt ggcgtcgtgt 1200
gggtctggcg accaaactgc actttgctcg tgaccgcctg attgagagct tctactgggc 1260
cgtgggtgta gcattcgaac cgcaatactc cgactgccgt aactccgtcg caaaaatgtt 1320
ttctttcgta accattatcg acgatatcta cgatgtatac ggcaccctgg acgaactgga 1380
gctgtttact gatgcagttg agcgttggga cgtaaacgcc atcaacgacc tgccggatta 1440
catgaaactg tgctttctgg ctctgtataa cactattaac gaaatcgcct acgacaacct 1500
gaaagataaa ggtgagaaca tcctgccgta tctgaccaaa gcctgggctg accgtgcaaa 1560
cgctttcctg caagaagcca agtggctgta caacaaatct actccgacct ttgacgacta 1620
cttcggcaac gcatggaaat cctcttctgg cccgctgcaa ctggtgttcg cttacttcgc 1680
tgtcgtgcag aacattaaaa aggaagagat cgaaaacctg caaaaatacc atgacaccat 1740
ctctcgtcct tcccatatct tccgtctgtg caatgacctg gctagcgcgt ctgcggaaat 1800
tgcgcgtggt gaaaccgcaa atagcgtttc ttgttacatg cgcactaaag gtatctccga 1860
agaactggct accgaaagcg tgatgaatct gatcgatgaa acctggaaaa agatgaacaa 1920
ggaaaaactg ggtggtagcc tgttcgcgaa accgttcgtg gaaaccgcga tcaacctggc 1980
acgtcaatct cactgcactt atcataacgg cgacgcgcat acctctccgg atgagctgac 2040
ccgcaaacgc gttctgtctg taatcactga accgattctg ccgtttgaac gctaactgca 2100
gctggtacca tatgggaatt cgaagctttc tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc 2160
tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcatc atcattgagt ttaaacggtc tccagcttgg 2220
ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag 2280
cggtctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtcccac ctgaccccat 2340
gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc cccatgcgag 2400
agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggccttic 2460
gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg 2520
attgaacgt tgcgaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg ccataaactg 2580
ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa 2640
ctctttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc 2700
ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt 2760
cgcccttatt ccctttttig cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct 2820
ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga 2880
tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag 2940
cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt gttgacgccg ggcaagagca 3000
actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga 3060
aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag 3120
tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc 3180
ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa 3240
tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt 3300
gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg 3360
gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt 3420
tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg 3480
gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat 3540
ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact 3600
gtcagaccaa gtttactcat atatactttа gattgattta aaacttcatt tttaatttaa 3660
aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 3720
ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 3780
tttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg 3840
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 3900
gataccaaat actgtcctic tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt 3960

agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 4020
taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc 4080
gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact 4140
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga 4200
caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 4260
aaacgcctgg tatcttiata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt 4320
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttit 4380
acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga 4440
ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 4500
gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc ggtatttict 4560
ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc 4620
tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg ggtcatggct 4680
gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca 4740
tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg 4800
tcatcaccga aacgcgcgag gcagcagatc aattcgcgcg cgaaggcgaa gcggcatgca 4860
tttacgttga caccatcgaa tggtgcaaaa cctttcgcgg tatggcatga tagcgcccgg 4920
aagagagtca attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat gtcgcagagt 4980
atgccggtgt ctcttatcag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc cacgtttctg 5040
cgaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt cccaaccgcg 5100
tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc tccagtctgg 5160
ccctgcacgc gccgtcgcaa attgtcgcgg cgattaaatc tcgcgccgat caactgggtg 5220
ccagcgtggt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa gcggcggtgc 5280
acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgctg gatgaccagg 5340
atgccattgc tgtggaagct gcctgcacta atgttccggc gttatttctt gatgtctctg 5400
accagacacc catcaacagt attatttict cccatgaaga cggtacgcga ctgggcgtgg 5460
agcatctggt cgcattgggt caccagcaaa tcgcgctgtt agcgggccca ttaagttctg 5520
tctcggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataaatatct cactcgcaat caaattcagc 5580
cgatagcgga acgggaaggc gactggagtg ccatgtccgg tttcaacaca accatgcaaa 5640
tgctgaatga gggcatcgtt cccactgcga tgctggttgc caacgatcag atggcgctgg 5700
gcgcaatgcg cgccattacc gagtccgggc tgcgcgttgg tgcggatatc tcggtagtgg 5760
gatacgacga taccgaagac agctcatgtt atatcccgcc gtcaaccacc atcaaacagg 5820
attttcgcct gctggggcaa accagcgtgg accgcttgct gcaactctct cagggccagg 5880
cggtgaaggg caatcagctg ttgcccgtct cactggtgaa aagaaaaacc acccctggcgc 5940
ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac 6000
aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagcgcgaa 6060
ttgatctg 6068

<210> 45
<211> 6906
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 45
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gtttttigcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatgagatg 420
tagcgtgtcc accgaaaatg tgtctttcac cgaaactgaa accgaagctc gtcgttctgc 480
gaactacgaa cctaacagct gggactatga ttacctgctg tcctccgaca cggacgagtc 540
catcgaagta tacaaagaca aagcgaaaaa gctggaagcc gaagttcgtc gcgagattaa 600
taacgaaaaa gcagaatttc tgaccctgct ggaactgatt gacaacgtcc agcgcctggg 660
cctgggttac cgtttcgagt ctgatatccg tggtgcgctg gatcgcttcg tttcctccgg 720
cggcttcgat gcggtaacca agacttccct gcacggtacg gcactgtctt tccgtctgct 780
gcgtcaacac ggttttgagg tttctcagga agcgttcagc ggcttcaaag accaaaacgg 840
caacttcctg gagaacctga aggaagatat caaagctatc ctgagcctgt acgaggccag 900
cttcctggct ctggaaggcg aaaacatcct ggacgaggcg aaggttttcg caatctctca 960
tctgaaagaa ctgtctgaag aaaagatcgg taaagagctg gcagaacagg tgaaccatgc 1020
actggaactg ccactgcatc gccgtactca gcgtctggaa gcagtatggt ctatcgaggc 1080
ctaccgtaaa aaggaggacg cgaatcaggt tctgctggag ctggcaattc tggattacaa 1140
catgatccag tctgtatacc agcgtgatct gcgtgaaacg tcccgttggt ggcgtcgtgt 1200
gggtctggcg accaaactgc actttgctcg tgaccgcctg attgagagct tctactgggc 1260
cgtgggtgta gcattcgaac cgcaatactc cgactgccgt aactccgtcg caaaaatgtt 1320
ttctttcgta accattatcg acgatatcta cgatgtatac ggcaccctgg acgaactgga 1380
gctgtttact gatgcagttg agcgttggga cgtaaacgcc atcaacgacc tgccggatta 1440
catgaaactg tgctttctgg ctctgtataa cactattaac gaaatcgcct acgacaacct 1500
gaaagataaa ggtgagaaca tcctgccgta tctgaccaaa gcctgggctg acctgtgcaa 1560
cgctttccig caagaagcca agtggctgta caacaaatct actccgacct ttgacgacta 1620
cttcggcaac gcatggaaat cctcttctgg cccgctgcaa ctggtgttcg cttacttcgc 1680
tgtcgtgcag aacattaaaa aggaagagat cgaaaacctg caaaaatacc atgacaccat 1740
ctctcgtcct tcccatatct tccgtctgtg caatgacctg gctagcgcgt ctgcggaaat 1800

tgcgcgtggt gaaaccgcaa atagcgtttc ttgttacatg cgcactaaag gtatctccga 1860
agaactggct accgaaagcg tgatgaatct gatcgatgaa acctggaaaa agatgaacaa 1920
ggaaaaactg ggtggtagcc tgttcgcgaa accgttcgtg gaaaccgcga tcaacctggc 1980
acgtcaatct cactgcactt atcataacgg cgacgcgcat acctctccgg atgagctgac 2040
ccgcaaacgc gttctgtctg taatcactga accgattctg ccgtttgaac gctaactgca 2100
taaaggaggt aaaaaaaacat ggtatcctgt tctgcgccgg gtaagattta cctgttcggt 2160
gaacacgccg tagtttatgg cgaaactgca attgcgtgtg cggtggaact gcgtacccgt 2220
gttcgcgcgg aactcaatga ctctatcact attcagagcc agatcggccg caccggtctg 2280
gatttcgaaa agcaccctta tgtgtctgcg gtaattgaga aaatgcgcaa atctatttcct 2340
attaacggtg ttttcttgac cgtcgattcc gacatcccgg tgggctccgg tctgggtagc 2400
agcgcagccg ttactatcgc gtctattggt gcgctgaacg agctgttcgg ctttggcctc 2460
agcctgcaag aaatcgctaa actgggccac gaaatcgaaa ttaaagtaca gggtgccgcg 2520
tccccaaccg atacgtatgt ttctacctic ggcggcgtgg ttaccatccc ggaacgtcgc 2580
aaactgaaaa ctccggactg cggcattgtg attggcgata ccggcgtttt ctcctccacc 2640
aaagagttag tagctaacgt acgtcagctg cgcgaaagct accccgattt gatcgaaccg 2700
ctgatgacct ctattggcaa aatctctcgt atcggcgaac aactggttct gtctggcgac 2760
tacgcatcca tcggccgcct gatgaacgtc aaccagggtc tcctggacgc cctgggcgtt 2820
aacatcttag aactgagcca gctgatctat tccgctcgtg cggcaggtgc gtttggcgct 2880
aaaatcacgg gcgctggcgg cggtggctgt atggttgcgc tgaccgctcc ggaaaaatgc 2940
aaccaagtgg cagaagcggt agcaggcgct ggcggtaaag tgactatcac taaaccgacc 3000
gagcaaggtc tgaaagtaga ttaaagtcta gttaaagttt aaacggtctc cagcttggct 3060
gttttggcgg atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg 3120
gtctgataaa acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc 3180
cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag 3240
tagggaactg ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt 3300
tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat 3360
ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg tggcgggcag gacgcccgcc ataaactgcc 3420
aggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact 3480
cttttgttt attttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 3540
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 3600
ccctttattcc cttttttgcg gcatttttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 3660
tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 3720
tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca 3780
cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac 3840
tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa 3900
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 3960
ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 4020
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 4080
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 4140
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 4200
tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta 4260
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc 4320
cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 4380
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 4440
cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 4500
ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 4560
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcctttit 4620
tttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 4680
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 4740
taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 4800
caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 4860
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 4920
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 4980
gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 5040
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccaggggaa 5100
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 5160
tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 5220
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt 5280
ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga 5340
ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc 5400
ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 5460
atgccgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc 5520
gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc 5580
cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc 5640
atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt 5700
tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc tttcgcggta tggcatgata gcgcccggaa 5760
gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat 5820
gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg 5880
aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg 5940
gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc 6000
ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc 6060
agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac 6120
aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat 6180
gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac 6240
cagacaccca tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag 6300
catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggcccatt aagttctgtc 6360
tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg 6420
atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg 6480

ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc 6540
gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga 6600
tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat atcccgccgt caaccaccat caaacaggat 6660
tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg 6720
gtgaagggca atcagctgtt gcccgtctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc 6780
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag 6840
gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agcgcgaatt 6900
gatctg 6906

<210> 46
<211> 3913
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 46
gcggccgcgc ccttgacgat gccacatcct gagcaaataa ttcaaccact aattgtgagc 60
ggataacaca aggaggaaac agccatggta tcctgttctg cgccgggtaa gatttacctg 120
ttcggtgaac acgccgtagt ttatggcgaa actgcaattg cgtgtgcggt ggaactgcgt 180
acccgtgttc gcgcggaact caatgactct atcactattc agagccagat cggccgcacc 240
ggtctggatt tcgaaaagca cccttatgtg tctgcggtaa ttgagaaaat gcgcaaatct 300
attcctatta acggtgtttt cttgaccgtc gattccgaca tcccggtggg ctccggtctg 360
ggtagcagcg cagccgttac tatcgcgtct attggtgcgc tgaacgagct gttcggcttt 420
ggcctcagcc tgcaagaaat cgctaaactg ggccacgaaa tcgaaattaa agtacagggt 480
gccgcgtccc caaccgatac gtatgtttct accttcggcg gcgtggttac catcccggaa 540
cgtcgcaaac tgaaaactcc ggactgcggc attgtgattg gcgataccgg cgttttctcc 600
tccaccaaag agttagtagc taacgtacgt cagctgcgcg aaagctaccc ggattgatc 660
gaaccgctga tgacctctat tggcaaaatc tctcgtatcg gcgaacaact ggttctgtct 720
ggcgactacg catccatcgg ccgcctgatg aacgtcaacc agggtctcct ggacgccctg 780
ggcgttaaca tcttagaact gagccagctg atctattccg ctcgtgcggc aggtgcgttt 840
ggcgctaaaa tcacgggcgc tggcggcggt ggctgtatgg ttgcgctgac cgctccggaa 900
aaatgcaacc aagtggcaga agcggtagca ggcgctggcg gtaaagtgac tatcactaaa 960
ccgaccgagc aaggtctgaa agtagattaa gccttgactt aatagctgct tatttcgccc 1020
ttatggtacc tagtaggagg aaaaaaacat ggaaatgcgt caaccggctg tcgcaggtca 1080
attctaccca ctgcgttgcg agaacctgga aaacgaactg aaacgctgct tcgaaggcct 1140
ggagatccgc gaacaagaag tgctgggcgc agtctgtccg cacgccggtt atatgtactc 1200
tggcaaagtt gcggcgcacg tctatgccac tctgccggaa gctgatacct acgtaatctt 1260
cggcccgaac cacaccggct acggtagccc tgtctctgtg agccgtgaaa cttggaagac 1320
cccgttgggc aatatcgatg ttgacctgga actggcggac ggcttcctgg gttccatcgt 1380
agatgcggat gaactcggtc acaaatacga acactctatc gaagttcagc tgccgtttct 1440
gcaataccgt tttgaacgcg atttcaaaat tctgccaatc tgcatgggta tgcaagacga 1500
agaaaccgcg gtcgaagtag gtaacctgct ggcggatctg atcagcgagt ccggtaaacg 1560
tgctgtgatc atcgcaagct ctgatttcac ccactatgag acggctgaac gtgccaaaga 1620
aatcgattcc gaagttattg attctatcct gaactttgac atctctggca tgtacgatcg 1680
cctgtatcgc cgtaacgcct ctgtttgcgg ttacggcccg atcaccgcta tgctgacggc 1740
aagcaaaaag ctgggcggct ctcgtgcgac tttgctgaaa tacgcaaaca gcggtgacgt 1800
gtccggtgat aaagacgctg tggtgggcta cgccgccatc atcgttgagt aagctgatta 1860
aaggttgaac agattaggatt tcgtcatgga tcctacaagg aggaaaaaaa catgaatgct 1920
tctaatgaac cggtgattct gaaactgggt ggctctgcta ttaccgacaa aggtgcctac 1980
gaaggcgtag ttaaggaagc tgatttgctg cgcatcgcac aggaagttag cggtttccgt 2040
ggcaagatga tcgtggttca tggtgctggt agcttcggcc atacgtacgc gaagaaatac 2100
ggcctggacc gtaccttcga cccagagggc gcaattgtta ctcatgaatc tgttaaaaag 2160
ctcgcctcca aagttgtagg tgctctgaat agcttcggcg tgcgtgctat cgcggtgcat 2220
cctatggact gcgcagtatg ccgtaacggt cgtatcgaaa cgatgtatct ggactccatc 2280
aagttaatgc tggaaaaagg tctggtgccg gttctgcacg gcgacgtcgc aatggatatt 2340
gaactgggca cttgtatcct gtccggtgat caaatcgttc cttacctggc caaagaactg 2400
ggtatctccc gcctcggcct gggcagcgca gaggatggtg tgctggatat ggagggcaaa 2460
cctgtaccgg aaatcacccc agaaacttic gaagagttcc gccactgcat cggtggttct 2520
ggttctactg atgtaaccgg tggcatgctg ggcaaagtgc tggaacttct ggaattgagc 2580
aaaaattctt ccattactag ctacatttic aacgctggta aagcagacaa catctaccgc 2640
tttctgaatg gtgagtccat cggcactcgc atcagcccgg acaagcgtgt ttaagctagt 2700
tattaaccta aatgctctaa accagttatg agctctacaa ggaggaaaaa aacatgatta 2760
acactaccag ccgccgcaaa attgaacacc tgaaactctg cgcagaatcc ccggttgaag 2820
cgcgtcaggt atctgccggc tttgaagacg ttactctgat ccaccgcgct ttaccggagc 2880
tgaacatgga tgaactggac ctcagcgttg atttcctggg taaacgcatc aaagcgccgt 2940
tcctgattgc gtctatcacg ggtggtcacc cagataccat cccggttaac gctgcgctgg 3000
cagctgctgc tgaggagctg ggtgttggca tcggcgttgg ctctcagcgc gcggccattg 3060
atgatccgag ccaggaagac agcttccgtg tagtgcgtga tgaagcccca gatgcgtttg 3120
tttatggcaa cgtcggcgca gcacagatcc gtcagtatgg tgttgaaggt gttgaaaaac 3180
tgatcgaaat gattgacgca gatgcctigg caatccacct gaacttttcg caagaagcgg 3240
tccaaccgga aggtgaccgc gacgcgaccg gttgcctgga catgattacc gaaatttgct 3300
ctcagattaa aactccggta atcgtgaaag aaaccggtgc aggcattagc cgtgaagatg 3360
cgattctgtt ccagaaagct ggcgtgagcg caatcgacgt tggcggcgcg ggcggcacct 3420
cctgggctgg cgtcgaggtc taccgtgcta aagaaagccg tgactctgtt agcgagcgtt 3480

taggtgagct gttttgggat ttcggcattc cgacggtagc ttctctgatt gaatcccgcg 3540
tttccttgcc gctgatcgca accggcggta tccgtaacgg tctggacatt gctaaaagca 3600
ttgctctcgg cgcaagcgct gccagcgccg ctctgccgtt cgttggtccg tccctggagg 3660
gcaaagaatc cgttgtacgt gtgctgagct gcatgctgga agaatttaaa gcagcaatgt 3720
ttttgtgcgg ttgcggcaac atcaaagacc tgcacaactc tccagtagtg gtaactggtt 3780
ggacccgcga atacctggag cagcgcggtt ttaacgttaa ggacctctcc ctgccgggca 3840
acgctctgta agcttcaacg cgtctacaaa taaaaaaggc acgtcagatg acgtgccttt 3900
tttcttgtct aga 3913

<210> 47
<211> 6647
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 47
aagggcgagc tcaacgatcc ggctgctaac aaagcccgaa aggaagctga gttggctgct 60
gccaccgctg agcaataact agcataaccc cttggggcct ctaaacgggt cttgaggagt 120
tttttgctga aaggaggaac tatatccgga tatcccgcaa gaggcccggc agtaccggca 180
taaccaagcc tatgcctaca gcatccaggg tgacggtgcc gaggatgacg atgagcgcat 240
tgttagattt catacacggt gcctgactgc gttagcaatt taactgtgat aaactaccgc 300
attaaagctt atcgatgata agctgtcaaa catgagaatt aattcttgaa gacgaaaggg 360
cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc 420
aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaatata 480
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 540
aaggaagagt atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga 600
gaggctattc ggctatgact gggcacaact gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt 660
ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct 720
gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg 780
cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt 840
gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc 900
tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc 960
gaaacatcgc atcgagcggg cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga 1020
tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg 1080
catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac acatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat 1140
ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg 1200
ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc 1260
tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta 1320
tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg 1380
acgccctaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 1440
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 1500
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 1560
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 1620
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 1680
gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 1740
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 1800
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 1860
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 1920
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 1980
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 2040
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 2100
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 2160
cggcctttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 2220
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 2280
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc 2340
ggtatttttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg caatggtgca ctctcagtac 2400
aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg 2460
gtcatggctg cgccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg 2520
ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 2580
ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagctgcggt aaagctcatc agcgtggtcg 2640
tgaagcgatt cacagatgtc tgcctgttca tccgcgtcca gctcgttgag tttctccaga 2700
agcgttaatg tctggcttct gataaagcgg gccatgttaa gggcggtttt ttcctgtttg 2760
gtcactgatg cctccgtgta aggggattt ctgttcatgg gggtaatgat accgatgaaa 2820
cgagagagga tgctcacgat acgggttact gatgatgaac atgcccggtt actggaacgt 2880
tgtgagggta aacaactggc ggtatggatg cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt 2940
caatgccagc gcttcgttaa tacagatgta ggtgttccac agggtagcca gcagcatcct 3000
gcgatgcaga tccggaacat aatggtgcag ggcgctgact tccgcgtttc cagactttac 3060
gaaacacgga aaccgaagac cattcatgtt gttgctcagg tcgcagacgt tttgcagcag 3120
cagtcgcttc acgttcgctc gcgtatcggt gattcattct gctaaccagt aaggcaaccc 3180
cgccagccta gccgggtcct caacgacagg agcacgatca tgcgcacccg tggccaggac 3240
ccaacgctgc ccgagatgcg ccgcgtgcgg ctgctggaga tggcggacgc gatggatatg 3300
ttctgccaag ggttggtttg cgcattcaca gttctccgca agaattgatt ggctccaatt 3360
cttggagtgg tgaatccgtt agcgaggtgc cgccggcttc cattcaggtc gaggtggccc 3420
ggctccatgc accgcgacgc aacgcgggga ggcagacaag gtatagggcg gcgcctacaa 3480
tccatgccaa cccgttccat gtgctcgccg aggcggcata aatcgccgtg acgatcagcg 3540
gtccaatgat cgaagttagg ctggtaagag ccgcgagcga tccttgaagc tgtccctgat 3600

ggtcgtcatc tacctgcctg gacagcatgg cctgcaacgc gggcatcccg atgccgccgg 3660
aagcgagaag aatcataatg gggaaggcca tccagcctcg cgtcgcgaac gccagcaaga 3720
cgtagcccag cgcgtcggcc gccatgccgg cgataatggc ctgccttctcg ccgaaacgtt 3780
tggtggcggg accagtgacg aaggcttgag cgagggcgtg caagattccg aataccgcaa 3840
gcgacaggcc gatcatcgtc gcgctccagc gaaagcggtc ctcgccgaaa atgacccaga 3900
gcgctgccgg cacctgtcct acgagttgca tgataaagaa gacagtcata agtgcggcga 3960
cgatagtcat gccccgcgcc caccggaagg agctgactgg gttgaaggct ctcaagggca 4020
tcggtcgaga tcccggtgcc taatgagtga gctaacttac attaattgcg ttgcgctcac 4080
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 4140
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgcc agggtggttt ttcttttcac cagtgagacg 4200
ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg ccctgagaga gttgcagcaa gcggtccacg 4260
ctggtttgcc ccagcaggcg aaaatcctgt ttgatggtgg ttaacggcgg gatataacat 4320
gagctgtctt cggtatcgtc gtatcccact accgagatat ccgcaccaac gcgcagcccg 4380
gactcggtaa tggcgcgcat tgcgcccagc gccatctgat cgttggcaac cagcatcgca 4440
gtgggaacga tgccctcatt cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga catggcactc 4500
cagtcgcctt cccgttccgc tatcggctga atttgattgc gagtgagata tttatgccag 4560
ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc 4620
tggtgaccca atgcgaccag atgctccacg cccagtcgcg taccgtcttc atgggagaaa 4680
ataatactgt tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg aacattagtg 4740
caggcagctt ccacagcaat ggcatcctgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca 4800
ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggcttcgac gccgcttcgt 4860
tctaccatcg acaccaccac gctggcaccc agttgatcgg cgcgagattt aatcgccgcg 4920
acaatttgcg acggcgcgtg cagggccaga ctggaggtgg caacgccaat cagcaacgac 4980
tgttttgccg ccagttgttg tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc 5040
gcttccactt tttcccgcgt tttcgcagaa acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa 5100
acggtctgat aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac tggtttcaca 5160
ttcaccaccc tgaattgact ctcttccggg cgctatcatg ccataccgcg aaaggttttg 5220
cgccattcga tggtgtccgg gatctcgacg ctctcccttа tgcgactcct gcattaggaa 5280
gcagcccagt agtaggttga ggccgttgag caccgccgcc gcaaggaatg gtgcatgcaa 5340
ggagatggcg cccaacagtc ccccggccac ggggcctgcc accatacccа cgccgaaaca 5400
agcgctcatg agcccgaagt ggcgagcccg atcttcccca tcggtgatgt cggcgatata 5460
ggcgccagca accgcacctg tggcgccggt gatgccggcc acgatgcgtc cggcgtagag 5520
gatcgagatc tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta taggggaatt gtgagcggat 5580
aacaattccc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata catatgcggg 5640
gttctcatca tcatcatcat catggtatgg ctagcatgac tggtggacag caaatgggtc 5700
gggatctgta cgacgatgac gataaggatc atccgttcac catggtatcc tgttctgcgc 5760
cgggtaagat ttacctgttc ggtgaacacg ccgtagttta tggcgaaact gcaattgcgt 5820
gtgcggtgga actgcgtacc cgtgttcgcg cggaactcaa tgactctatc actattcaga 5880
gccagatcgg ccgcaccggt ctggatttcg aaaagcaccc ttatgtgtct gcggtaattg 5940
agaaaatgcg caaatctatt cctattaacg gtgttttctt gaccgtcgat tccgacatcc 6000
cggtgggctc cggtctgggt agcagcgcag ccgttactat cgcgtctatt ggtgcgctga 6060
acgagctgtt cggctttggc ctcagcctgc aagaaatcgc taaactgggc cacgaaatcg 6120
aaattaaagt acagggtgcc gcgtccccaa ccgatacgta tgtttctacc ttcggcggcg 6180
tggttaccat cccggaacgt cgcaaactga aaactccgga ctgcggcatt gtgattggcg 6240
ataccggcgt tttctcctcc accaaagagt tagtagctaa cgtacgtcag ctgcgcgaaa 6300
gctacccgga tttgatcgaa ccgctgatga cctctattgg caaaatctct cgtatcggcg 6360
aacaactggt tctgtctggc gactacgcat ccatcggccg cctgatgaac gtcaaccagg 6420
gtctcctgga cgccctgggc gttaacatct tagaactgag ccagctgatc tattccgctc 6480
gtgcggcagg tgcgtttggc gctaaaatca cgggcgctgg cggcggtggc tgtatggttg 6540
cgctgaccgc tccggaaaaa tgcaaccaag tggcagaagc ggtagcaggc gctggcggta 6600
aagtgactat cactaaaccg accgagcaag gtctgaaagt agattaa 6647

<210> 48
<211> 7519
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 48
ctcgggccgt ctcttgggct tgatcggcct tcttgcgcat ctcacgcgct cctgcggcgg 60
cctgtagggc aggctcatac ccctgccgaa ccgcttttgt cagccggtcg gccacggctt 120
ccggcgtctc aacgcgcttt gagattccca gcttttcggc caatccctgc ggtgcatagg 180
cgcgtggctc gaccgcttgc gggctgatgg tgacgtggcc cactggtggc cgctccaggg 240
cctcgtagaa cgcctgaatg cgcgtgtgac gtgccttgct gccctcgatg ccccgttgca 300
gccctagatc ggccacagcg gccgcaaacg tggtctggtc gcgggtcatc tgcgctttgt 360
tgccgatgaa ctccttggcc gacagcctgc cgtcctgcgt cagcggcacc acgaacgcgg 420
tcatgtgcgg gctggtttcg tcacggtgga tgctggccgt cacgatgcga tccgccccgt 480
acttgtccgc cagccacttg tgcgccttct cgaagaacgc cgcctgctgt tcttggctgg 540
ccgacttcca ccattccggg ctggccgtca tgacgtactc gaccgccaac acagcgtcct 600
tgcgccgctt ctctggcagc aactcgcgca gtcggcccat cgcttcatcg gtgctgctgg 660
ccgcccagtg ctcgttctct ggcgtcctgc tggcgtcagc gttgggcgtc tcgcgctcgc 720
ggtaggcgtg cttgagactg gccgccacgt tgcccatttt cgccagcttc ttgcatcgca 780
tgatcgcgta tgccgccatg cctgccccтc ccttttggtg tccaaccggc tcgacggggg 840
cagcgcaagg cggtgcctcc ggcgggccac tcaatgcttg agtatactca ctagacttтg 900

cttcgcaaag tcgtgaccgc ctacggcggc tgcggcgccc tacgggcttg ctctccgggc 960
ttcgccctgc gcggtcgctg cgctccctig ccagcccgtg gatatgtgga cgatggccgc 1020
gagcggccac cggctggctc gcttcgctcg gcccgtggac aaccctgctg gacaagctga 1080
tggacaggct gcgcctgccc acgagcttga ccacagggat tgcccaccgg ctacccagcc 1140
ttcgaccaca tacccaccgg ctccaactgc gcggcctgcg gccttgcccc atcaatttit 1200
ttaatttict ctggggaaaa gcctccggcc tgcggcctgc gcgcttcgct tgccggttgg 1260
acaccaagtg gaaggcgggt caaggctcgc gcagcgaccg cgcagcggct tggccttgac 1320
gcgcctggaa cgacccaagc ctatgcgagt gggggcagtc gaaggcgaag cccgcccgcc 1380
tgcccccccga gcctcacggc ggcgagtgcg ggggttccaa gggggcagcg ccaccttggg 1440
caaggccgaa ggccgcgcag tcgatcaaca agccccggag gggccacttt ttgccggagg 1500
gggagccgcg ccgaaggcgt gggggaaccc cgcaggggtg ccctictiig ggcaccaaag 1560
aactagatat agggcgaaat gcgaaagact taaaaatcaa caacttaaaa aaggggggta 1620
cgcaacagct cattgcggca ccccccgcaa tagctcattg cgtaggttaa agaaaatctg 1680
taattgactg ccactttiac gcaacgcata attgttgtcg cgctgccgaa aagttgcagc 1740
tgattgcgca tggtgccgca accgtgcggc accctaccgc atggagataa gcatggccac. 1800
gcagtccaga gaaatcggca ttcaagccaa gaacaagccc ggtcactggg tgcaaacgga 1860
acgcaaagcg catgaggcgt gggccgggct tattgcgagg aaacccacgg cggcaatgct 1920
gctgcatcac ctcgtggcgc agatgggcca ccagaacgcc gtggtggtca gccagaagac 1980
actttccaag ctcatcggac gttctttgcg gacggtccaa tacgcagtca aggactiggt 2040
ggccgagcgc tggatctccg tcgtgaagct caacggcccc ggcaccgtgt cggcctacgt 2100
ggtcaatgac cgcgtggcgt ggggccagcc ccgcgaccag ttgcgcctgt cggtgttcag 2160
tgccgccgtg gtggttgatc acgacgacca ggacgaatcg ctgttggggc atggcgacct 2220
gcgccgcatc ccgacccigt atccgggcga gcagcaacta ccgaccggcc ccggcgagga 2280
gccgcccagc cagcccggca ttccgggcat ggaaccagac ctgccagcct tgaccgaaac 2340
ggaggaatgg gaacggcgcg ggcagcagcg cctgccgatg cccgatgagc cgtgttttct 2400
ggacgatggc gagccgttgg agccgccgac acgggtcacg ctgccgcgcc ggtagcactt 2460
gggttgcgca gcaacccgta agtgcgctgt tccagactat cggctgtagc cgcctcgccg 2520
ccctatacct tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga 2580
cctgaatgga agccggcggc acctcgctaa cggattcacc gttttiatca ggctctggga 2640
ggcagaataa atgatcatat cgtcaattat tacctccacg gggagagcct gagcaaactg 2700
gcctcaggca tttgagaagc acacggtcac actgcttccg gtagtcaata aaccggtaaa 2760
ccagcaatag acataagcgg ctatttaacg accctgcccc gaaccgacga ccgggtcgaa 2820
tttgctttcg aatttctgcc attcatccgc ttattatcac ttattcaggc gtagcaccag 2880
gcgtttaagg gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc cccgccctgc cactcatcgc 2940
agtcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca 3000
aaatattaac gcttacaatt tccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg 3060
atcggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg 3120
attaagttgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga 3180
gcgcgcgtaa tacgactcac tatagggcga attggagctc caccgcggtg gcggccgctc 3240
tagaactagt ggatcccccg ggctgcatgc tcgagcggcc gccagtgtga tggatatctg 3300
cagaattcgc ccttcttgat atcttagtgt gcgttaacca ccacccacat tggtccctgc 3360
ccgaccgcat agcggccttt ttcatgcagt agcccctgct cgccaacaat ttcgtatacc 3420
gagatgtggt gagattttig cccggcggca atcagatact tgccgctgtg atcaacattg 3480
aagccgcgcg gctgggttic cgttggctgg aagccttctt tactcaacac gctgccatct 3540
tccgaaacgc tgaaaacggt aatcaggctg gcggtacggt cgcaggcgta taaatggcga 3600
ccatccgggg tgatatgaat atcagccgcc caacgggtgt cggagaagtt ttccggcatc 3660
atatccagcg tctggacaca ttcgatatta ccgtgcggat ctttcagttc ccagacatcc 3720
actgagctgt ttaactcatt gacgcaatac gcatattgtt cgtttggatg gaataccata 3780
tgacgcgggc cggcccctic aacggtggtc acttccgcag ggtcctgcgc cacgagatga 3840
ccatcatcgc tgaccgtaaa caggcaaatg cgatcctgct ttaatgccgg aacccacagc 3900
gtacggttgt ccggtgagat attggcggaa tggcaaccgt ccagcccctc gaccacatcg 3960
acgacgccca ctggcaggcc atcttccaga cgcgttacgc tcacgttacc cgcattgtaa 4020
gaacctacaa agacaaactg cccctggtga tcggtggaaa tatgcgtcgg actacccggc 4080
agcgcagact ctgcggcaaa ggtcagtgcg ccatcgtccg gggcgatacg atacgccagg 4140
acgcgaaact cagggcgaac accaacatag agataacgtt tgtccgggct gaccaccatc 4200
ggctgcacct gccccggcac atcgacaacc tgtgtcagcg tcagtgcgcc ttcatgattc 4260
agattccaga cgtgaattig ctggctctca gggctggcga tataaactgt ttgcttcatg 4320
aatgctcctt tgggttacct ccgggaaacg cggttgattt gtttagtggt tgaattattt 4380
gctcaggatg tggcatagtc aagggcgtga cggctcgcta atacaactca ctatagggct 4440
cgaggaagtt cctatacttt ctagagaata ggaacttccg cgccgcacac aaaaaccaac 4500
acacagatca tgaaaataaa gctctttiat tggtaccgaa ttcgccaggg agctctcaga 4560
cgtcgcttgg tcggtctiia ttcgaacccc agagtcccgc ttacgccccg ccctgccact 4620
catcgcagta ctgttgtaat tcattaagca ttctgccgac atggaagcca tcacaaacgg 4680
catgatgaac ctgaatcgcc agcggcatca gcaccttgtc gccttgcgta taatatttgc 4740
ccatggtgaa aacgggggcg aagaagttgt ccatattggc cacgtttaaa tcaaaactgg 4800
tgaaactcac ccagggatig gctgagacga aaaacatatt ctcaataaac cctttaggga 4860
aataggccag gttttcaccg taacacgcca catcttgcga atatatgtgt agaaactgcc 4920
ggaaatcgtc gtggtattca ctccagagcg atgaaaacgt ttcagtttgc tcatggaaaa 4980
cggtgtaaca agggtgaaca ctatcccata tcaccagctc accgtctttc attgccatac 5040
ggaattccgg atgagcattc atcaggcggg caagaatgtg aataaaggcc ggataaaact 5100
tgtgcttatt tttctttacg gtctttaaaa aggccgtaat atccagctga acggtctggt 5160
tataggtaca ttgagcaact gactgaaatg cctcaaaatg ttctttacga tgccattggg 5220
atatatcaac ggtggtatat ccagtgattt ttttctccat ggttiagttc ctcaccttgt 5280
cgtattatac tatgccgata tactatgccg atgattaatt gtcaacacgt gctgctgcag 5340
gtcgaaaggc ccggagatga ggaagaggag aacagcgcgg cagacgtgcg ctttigaagc 5400
gtgcagaatg ccgggcctcc ggaggacctt cgggcgcccg ccccgccctt gagccctgccc 5460
ctgagcccgc ccccggaccc acccctttccc agcctctgag cccagaaagc gaaggagcaa 5520
agctgctatt ggccgctgcc ccaaaggcct acccgcttcc attgctcagc ggtgctgtcc 5580

atctgcacga gactagtgag acgtgctact tccatttgtc acgtcctgca cgacgcgagc 5640
tgcggggcgg gggggaactt cctgactagg ggaggagtgg aaggtggcgc gaaggggcca 5700
ccaaagaacg gagccggttg gcgcctaccg gtggatgtgg aatgtgtgcg aggccagagg 5760
ccacttgtgt agcgccaagt gcccagcggg gctgctaaag cgcatgctcc agactgcctt 5820
gggaaaagcg cctcccctac ccggtagaat gaagttccta tactttctag agaataggaa 5880
cttcgcggcc gccctttagt gagggttaat tcaactgact gtaacagcta aaattagtcg 5940
ctttggcgg taagggcgaa ttccagcaca ctggcggccg ttactagtgg atccgagctc 6000
ggtaccaagc ttgatgcagg aattcgatat caagcttatc gataccgtcg acctcgaggg 6060
ggggcccggt acccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc ttggcgtaat 6120
catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac 6180
gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa ctcacattaa 6240
ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat 6300
gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgcatgcat aaaaactgtt 6360
gtaattcatt aagcattctg ccgacatgga agccatcaca aacggcatga tgaacctgaa 6420
tcgccagcgg catcagcacc ttgtcgcctt gcgtataata tttgcccatg gacgcacacc 6480
gtggaaacgg atgaaggcac gaacccagtt gacataagcc tgttcggttc gtaaactgta 6540
atgcaagtag cgtatgcgct cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac gcagcggtgg 6600
taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgtac agtctatgcc 6660
tcgggcatcc aagcagcaag cgcgttacgc cgtgggtcga tgtttgatgt tatggagcag 6720
caacgatgtt acgcagcagc aacgatgtta cgcagcaggg cagtcgccct aaaacaaagt 6780
taggtggctc aagtatgggc atcattcgca catgtaggct cggcctgac caagtcaaat 6840
ccatgcgggc tgctcttgat cttttcggtc gtgagttcgg agacgtagcc acctactccc 6900
aacatcagcc ggactccgat tacctcggga acttgctccg tagtaagaca ttcatcgcgc 6960
ttgctgcctt cgaccaagaa gcggttgttg gcgctctcgc ggcttacgtt ctgcccaggt 7020
ttgagcagcc gcgtagtgag atctatatct atgatctcgc agtctccggc gagcaccgga 7080
ggcagggcat tgccaccgcg ctcatcaatc tcctcaagca tgaggccaac gcgcttggtg 7140
cttatgtgat ctacgtgcaa gcagattacg gtgacgatcc cgcagtggct ctctatacaa 7200
agttgggcat acgggaagaa gtgatgcact ttgatatcga cccaagtacc gccacctaac 7260
aattcgttca agccgagatc ggcttcccgg ccgcggagtt gttcggtaaa ttgtcacaac 7320
gccgccaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcgcccgc gttcctgctg gcgctgggcc 7380
tgtttctggc gctggacttc ccgctgttcc gtcagcagct tttcgcccac ggccttgatg 7440
atcgcggcgg ccttggcctg catatcccga ttcaacggcc ccagggcgtc cagaacgggc 7500
ttcaggcgct cccgaaggt 7519

<210> 49
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 49
cgtgagatca tatgtgtgcg acctcttctc aatttac 37

<210> 50
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 50
cggtcgacgg atccctgcag ttagacatac atcagctg 38

<210> 51
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 51
catatgaaag cttgtatcga ttaaataagg aggaataaac c 41

<210> 52
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 52

gatcatgcat tcgcccttag gaggtaaaaa aacatgtgtg cgacctcttc tcaatttact 60

<210> 53
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 53
gacatcaatt gctccatttt cttctgctat c 31

<210> 54
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 54
attgagaaga ggtcgcacac actctttacc ctctcctttt a 41

<210> 55
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 55
taaaaggaga gggtaaagag tgtgtgcgac ctcttctcaa t 41

<210> 56
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 56
ccaaggccgg tttttttag acatacatca gctggttaat c 41

<210> 57
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 57
gattaaccag ctgatgtatg tctaaaaaaa accggccttg g 41

<210> 58
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 58
gacatgacgg atccgattac gaatgccgtc tc 32

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 59

gacatgaatt cctccatttt cttctgc 27

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 60
aggagagggt aaagagtgag 20

<210> 61
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 61
cttttccatc acccacctga ag 22

<210> 62
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 62
ggcgaaatgg tccaacaaca aaattatc 28

<210> 63
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 63
gcttatggat cctctagact attacacgta catcaattgg 40

<210> 64
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 64
caccatgtgt gcaacctcct cccagtttac 30

<210> 65
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 65
ggtgaattca gtctactggg gatttcccaaa tctatatata ctgcaggtga c 51

<210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 66
gcaggtggga aactatgcac tcc 23

<210> 67
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 67
cctgaattct gttggattgg aggattggat agtggg 36

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 68
ggtgtcgacg tacggtcgag cttattgacc 30

<210> 69
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 69
ggtgggcccg cattttgcca cctacaagcc ag 32

<210> 70
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 70
ggtgaattct agaggatccc aacgctgttg cctacaacgg 40

<210> 71
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 71
ggtgcggccg ctgtctggac ctggtgagtt tccccg 36

<210> 72
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 72
ggtgggccca ttaaatcagt tatcgtttat ttgatag 37

<210> 73
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 73
ggtgaccagc aagtccatgg gtggtttgat catgg 35

<210> 74
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 74
ggtgcggccg cctttggagt acgactccaa ctatg 35

<210> 75
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 75
gcggccgcag actaaattta tttcagtctc c 31

<210> 76
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 76
gatcaagctt aaccggaatt gccagctg 28

<210> 77
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 77
gatccgatcg tcagaagaac tcgtcaagaa ggc 33

<210> 78
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 78
catcaatgca tcgcccttag gaggtaaaaa aaaatgac 38

<210> 79
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 79
ccttctgcag gacgcgttgt tatagc 26

<210> 80
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 80
gatcatgcat tcgcccttag gaggtaaaaa aacatgagtt ttgatattgc caaatacccg 60

<210> 81
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 81
catgctgcag ttatgccagc caggccttga t 31

<210> 82
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 82
aggaggt 7

<210> 83
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 83
aaggagg 7

<210> 84
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 84
aggaggtaaa aaaacatgtc attaccgttc ttaacttctg c 41

<210> 85
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 85
atggctgcag gcctatcgca aattagctta tgaagtccat ggtaaattcg tg 52

<210> 86
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 86
gaattcgccc ttctgcagct acc 23

<210> 87
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 87
cgactggtgc acccttaagg aggaaaaaaa catgtcag 38

<210> 88

<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 88
gtgctggaat tcgcccttct gcagc 25

<210> 89
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 89
gtagatgcat gcagaattcg cccttaagga gg 32

<210> 90
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 90
gtgtgatgga tatctgcaga attcg 25

<210> 91
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 91
catcaatgca tcgcccttag gaggtaaaaa aacatg 36

<210> 92
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 92
actgaaacgt tttcatcgct c 21

<210> 93
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 93
gagacatgag ctcaggaggt aaaaaaacat gaaaacagta gttattattg 50

<210> 94
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 94
tttatcaatc ccaattgtca tgttttttta cctcctttat tgttttctta aatc 54

<210> 95
<211> 54

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 95
gatttaagaa aacaataaag gaggtaaaaa aacatgacaa ttgggattga taaa 54

<210> 96
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 96
gacatgacat agatctttag tttcgataag aacgaacggt 40

<210> 97
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 97
atgaaaacag tagttattat tgatgc 26

<210> 98
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 98
atgttattgt tttcttaaat catttaaaat agc 33

<210> 99
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 99
atgacaattg ggattgataa aattag 26

<210> 100
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 100
ttagtttcga taagaacgaa cggt 24

<210> 101
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 101
gaaatagccc cattagaagt atc 23

<210> 102
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 102
ttgccaatca tatgattgaa aatc 24

<210> 103
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 103
gctatgcttc attagatcct tatcg 25

<210> 104
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 104
gaaacctaca tccaatcttt tgccc 25

<210> 105
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 105
cttgatgcat cctgcattcg cccttaggag g 31

<210> 106
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 106
ccaggcaaat tctgttttat cag 23

<210> 107
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 107
gcatgctcga gcggccgctt ttaatcaaac atcctgccaa ctc 43

<210> 108
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 108
gatcgaaggg cgatcgtgtc acagtctggc gaaaccg 37

<210> 109
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 109
ctgaattctg cagatatctg ttttttccact cttcgttcac ttt 43

<210> 110
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 110
tctagagggc ccaagaaaaa tgccccgctt acg 33

<210> 111
<211> 111
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 111
gatcgcggcc gcgcccttga cgatgccaca tcctgagcaa ataattcaac cactaattgt 60
gagcggataa cacaaggagg aaacagctat gtcattaccg ttcttaactt c 111

<210> 112
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 112
gatcgggccc caagaaaaaa ggcacgtcat ctgacgtgcc tttttattt gtagacgcgt 60
tgttatagca ttcta 75

<210> 113
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 113
aaagtagccg aagatgacgg tttgtcacat ggagttggca ggatgtttga ttaaaagcaa 60
ttaaccctca ctaaagggcg g 81

<210> 114
<211> 160
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 114
agagtgttca ccaaaaataa taacctttcc cggtgcagaa gttaagaacg gtaatgacat 60
agctgtttcc tcctgtgtt atccgctcac aattagtggt tgaattattt gctcaggatg 120
tggcatcgtc aagggctaat acgactcact atagggctcg 160

<210> 115
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 115
gacatctgca gctccatttt cttctgc 27

<210> 116
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 116
caataataac tactgttttc actctttacc ctctcctttt aa 42

<210> 117
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 117
ttaaaaggag agggtaaaga gtgaaaacag tagttattat tg 42

<210> 118
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 118
cggggccaag gccggttttt tttagtttcg ataagaacga acggt 45

<210> 119
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 119
accgttcgtt cttatcgaaa ctaaaaaaaa ccggccttgg ccccg 45

<210> 120
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 120
caccatggta tcctgttctg cg 22

<210> 121
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 121
ttaatctact ttcagacctt gc 22

<210> 122
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 122
gcgaacgatg cataaaggag gtaaaaaaac atggtatcct gttctgcgcc gggtaagatt 60
tacctg 66

<210> 123
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 123
gggcccgttt aaactttaac tagactttaa tctactttca gaccttgc 48

<210> 124
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 124
caccaaagac ttcatagact 20

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 125
agagatatct tcctgctgct 20

<210> 126
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 126
taatacgact cactataggg 20

<210> 127
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 127
accaattgca cccggcaga 19

<210> 128
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 128
gctaaagcgc atgctccaga c 21

<210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 129
gactggcctc agatgaaagc 20

<210> 130

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 130
caaacatgtg gcatggaaag 20

<210> 131
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 131
gggcccgttt aaactttaac tagactctgc agttagcgtt caaacggcag aa 52

<210> 132
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 132
cgcatgcatg tcatgagatg tagcgtgtcc accgaaaa 38

<210> 133
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 133
acaatttcac acaggaaaca gc 22

<210> 134
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 134
gcactgtctt tccgtctgct gc 22

<210> 135
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 135
ggtttagttc ctcacctttgt c 21

<210> 136
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 136
cgtgaatttg ctggctctca g 21

<210> 137
<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 137
gatagtaacg gctgcgctgc tacc 24

<210> 138
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 138
gacagcttat catcgactgc acg 23

<210> 139
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 139
accgccaaaa gcgactaatt ttagctgtta cagtcagttg aattaaccct cactaaaggg 60
cggccgc 67

<210> 140
<211> 152
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 140
gctggcgata taaactgttt gcttcatgaa tgctccttig ggttacctcc gggaaacgcg 60
gttgatttgt ttagtggttg aattatttgc tcaggatgtg gcatagtcaa gggcgtgacg 120
gctcgctaat acgactcact atagggctcg ag 152

<210> 141
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 141
accgccaaaa gcgactaatt ttagct 26

<210> 142
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 142
cttgatatct tagtgtgcgt taaccaccac 30

八、圖式：

1-
atgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaact
atcagccaaacctgtggcatttcgaattcctgcaatccctggaggaacgacctgaaagtggaaaa
gctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacc
cagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttg
aaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatc
tgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcag
gatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtcc
aaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggagga
ggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggtt
gcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgttctggaggcac
gttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaa
gctggattttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtccgctggtgg
accgagatgggcctggctagcaaactggattttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttct
gggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtt
tggtctggtgccgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaaactgcaactg
ttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaac
tgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaagagaaagg
tcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagag
gcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgttt
cctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacat
ctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatc
ttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaatt
ctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcg
taaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactcccaccctgctg
cctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcaactttccagtatg
gcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgaccc
tttcccgattaaccagctgatgtatgtc
taactgcag
(SEQ ID NO:1)

圖1

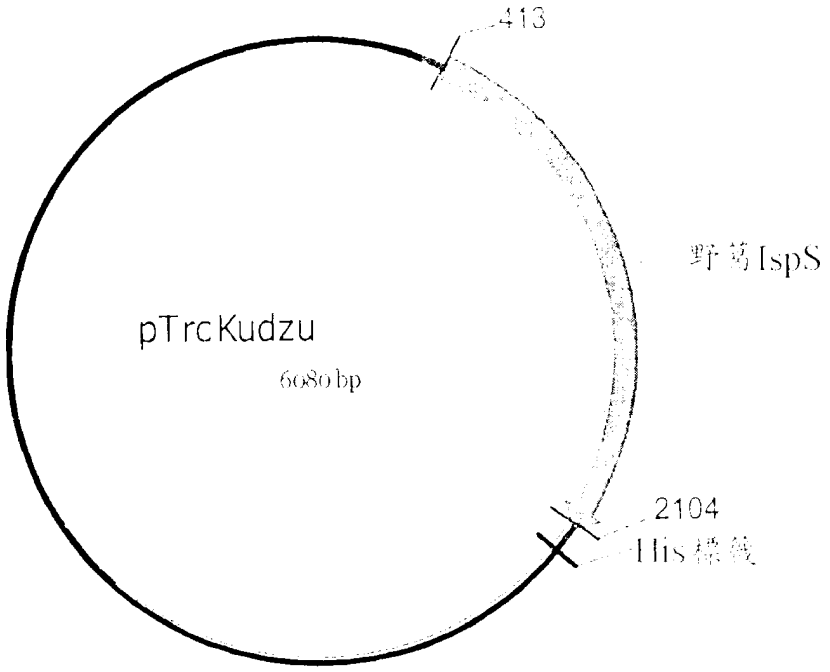


圖2

1-

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactccc
gttctggataatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt
gtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaat
gtatcgattaaataaggaggaataaaccATGtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacc
gagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaat
ccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagt
tcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg
cagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtac
tgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgct
gcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggt
ttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg
gtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcacccacctgaagaacaa
cctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatat
caccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgc
atcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaa
agagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggattttgta
cgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtg
aatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt
ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgct
attaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgaca
cgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg
tgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttc
tccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttact
ttttcgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttcca
tggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtacca
gcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcg
tgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggca
cgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaa
accgcatcaaactgctgctgattgaccctttcccgattaaccagctgatgtatgtcTAActgca
gctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaa
tagcgccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttg
gcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaa
acagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtg
aaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcat
caaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtga
acgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccgg

圖3A

agggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccagcatcaaattaagcagaaggccatcctg
acggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatat
gtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatg
agtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgttttg
ctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggtta
catcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttcca
atgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaag
agcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacaga
aaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgat
aacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgc
acaacatggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc
aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaact
ggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttg
caggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgg
tgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgta
gttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagatag
gtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattga
tttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacc
aaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggat
cttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctacc
agcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagc
agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact
ctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcga
taagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggc
tgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacc
tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggt
aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctt
tatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggg
ggcggagcctatggaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggcc
ttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgccttt
gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaag
cggaagagcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatg
gtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgc
tacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggc
ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag
aggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc
ggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgc
ccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagt
atgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa
aacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaa
caactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgc
cgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtc
gatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgc
gtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcct

圖3B

Gcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttt
ctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatc
gcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaat
atctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgg
ttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaac
gatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggata
tctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccat
caaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc
caggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccacccctggcgc
ccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggt
ttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg
(SEQ ID NO:2)

圖3C

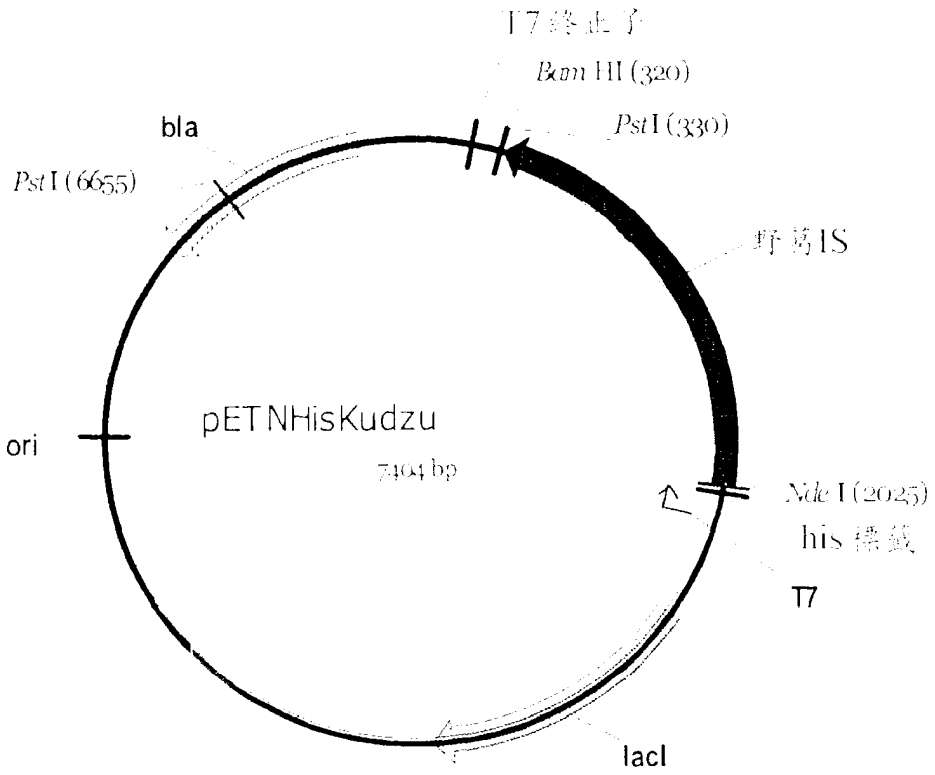

T7終止子
BamHI (320)
PstI (330)
bla
PstI (6655)
野葛IS
pET NHisKudzu
7404 bp
ori
NdeI (2025)
his 標籤
T7
lacI

圖4

1-

ttctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgc
taacgcagtcaggcaccgtgtatgaaatctaacaatgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtca
ccctggatgctgtaggcataggcttggttatgccggtactgccgggcctcttgcgggatatccg
gatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagacccgtttagaggccccaaggggttatg
ctagttattgctcagcggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggctttgttagcagccgg
atcctgcagttagacatacatcagctggttaatcgggaaagggtcaatcagcagcagtttgat
gcggttttcagtcgcgtagtctgggcgacccagaccatcgccatactggtaggtgcagtgggaa
acacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcagggtggagtcgttaacgc
gttcacgattcatcttttttccattcggcgtcgatcagtttacgcagttcttcgcgggcctgttc
ctcgctggtaccatcgttttcgtgcatgtagctaatgatagaattggtagtctcgccacgttcc
agctccgccgcagaggtggccagatcgttgcacaggcggaagataacgcagctagaacgcacca
gaccatggaagtcggtcagggaacgcagcgcgtggtcggagatgtcttcctgctgttggctac
ggaaaagtaagacggcgccagcagcgctacaccggaggaggaaacgctggcgttttccaggtac
ttggagaaagccgggataatttttgttgttggaccatttcgcctcttgcagaaaggctttgcaca
gttcacgccagctttcgtcagataggacaggttgttatgacctttctctttcaggatagaata
ggacgtgtcgttaacggtgttgtacagtgccaggaaacacagtttcatatagtcggcagggtg
ttaatagcgttaacgtcccagcgctctacagcatcggtgaacagttgcagttcgtccagagtgc
cataaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagaccaaacattttagtaacagctttgcg
acattcaccaaactgcgggtctggcgccataccagtgcccagaaataaacttccatcaggcgg
tcgcgtacaaaatccagtttgctagccaggcccatctcggtccaccagcgggacagattcttgca
gctctttctggtgcagggtctgtaccatgttaaaatccagcttcgccagctccagcagcagctg
gtgatgcggttctttcggttcgtatttatccaggaaccaacgtgcctccagacggtgcagacgc
tggtgatatggcagttccagggcgtggctcacttgttctgcaaccttggtattaatgccttctt
tcaggttgttcttcaggtgggtgatggaaaaggtacgcgcctcctccagcaggttctcaccctc
gaaacccaggtaagacgcttcatacaggctcagcaggccttggacgtcacctttcagttcaccg
ctgaaaccaccttctttatccttgaaacgctcaaaaacatcctgagaaacctcgaaacgtgct
gacgcagcagacggaaagacagagcggttgcgtgcaggtcagatttgttcttttttgttttcgtc
cagcagtacgatgttttccagggctttaatgatgtcttttttcaaatttgtaggtcagacccagg
cgctgcacatcgtcgatcagctccagcagggacagcggctgggtgtctacacggttgatcatgc
agcgaacttcttcctccagtttggtcgctttctcctccagcttttccacttttcaggtcgttctc
cagggattgcaggaattcgaaattccacaggtttggctgatagtttgcggaacgacgggaatta
tgctcggtaatctgagtaaattgagaagaggtcgcacacatatgacgaccttcgatatggccgc
tgctgtgatgatgatgatgatgatgatgatgatggcccatggtatatctccttcttaaagttaa
acaaaattatttctagagggaattgttatccgctcacaattcccctatagtgagtcgtattaa
tttcgcgggatcgagatctcgatcctctacgccggacgcatcgtggccggcatcaccggcgcca
caggtgcggttgctggcgcctatatcgccgacatcaccgatggggaagatcgggctcgccactt
cgggctcatgagcgcttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggactgttg
ggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactac
tgggctgcttcctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgagatccccggacaccatcgaat
ggcgcaaaaccttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaa
tgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatacagaccgtttcc
cgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatgg
cggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgat
tggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatct

圖5A

cgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcct
gtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgct
ggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgat
gtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacggtacgcgactgggcg
tggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgt
ctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgata
gcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatg
agggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgc
cattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaa
gacagctcatgttatatcccgccgttaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaa
ccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcc
cgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcg
ttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgc
aacgcaattaatgtaagttagctcactcattaggcaccgggatctcgaccgatgcccttgagag
ccttcaacccagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgcacttatgac
tgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgag
gaccgctttcgctggagcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacg
ccctcgctcaagccttcgtcactggtcccgccaccaaacgtttcggcgagaagcaggccattat
cgccggcatggcggccgacgcgctgggctacgtcttgctggcgttcgcgacgcgaggctggatg
gccttccccattatgattcttctcgcttccggcggcatcgggatgcccgcgttgcaggccatgc
tgtccaggcaggtagatgacgaccatcagggacagcttcaaggatcgctcgcggctcttaccag
cctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatgccgcctcggcgagcacatgg
aacgggttggcatggattgtaggcgccgccctataccttgtctgcctccccgcgttgcgtcgcg
gtgcatggagccgggccacctcgacctgaatggaagccggcggcacctcgctaacggattcacc
actccaagaattggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaatgcgcaaaccaaccctggcc
agaacatatccatcgcgtccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcgggcagcgttgg
gtcctggccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggacccggctaggctggcggggt
tgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgca
aaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtctgga
aacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggcta
ccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgaccctgagtgatttttctct
ggtcccgccgcatccataccgccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttc
atcatcagtaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattacccccatgaac
agaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggccc
gctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaaca
ggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcgt
ttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgt
aagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcgggg
cgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcag
agcagattgtactgagagtgcaccatatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggaga
aaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggc
tgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataa
cgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttg
ctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcaga

圖5B

ggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcg
ctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtg
gcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgg
gctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttga
gtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcaga
gcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaa
ggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctc
ttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacg
cgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtgga
acgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcct
tttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagt
taccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttg
cctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgc
aatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccgga
agggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgcc
gggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcagg
catcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaagg
cgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttg
tcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttac
tgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaa
tagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaacacgggataataccgcgccacata
gcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatctt
accgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttt
actttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataa
gggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatca
gggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggtt
ccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaa
cctataaaaatagcgtatcacgaggccctttcgtcttcaagaa

SEQ ID NO:3

圖5C

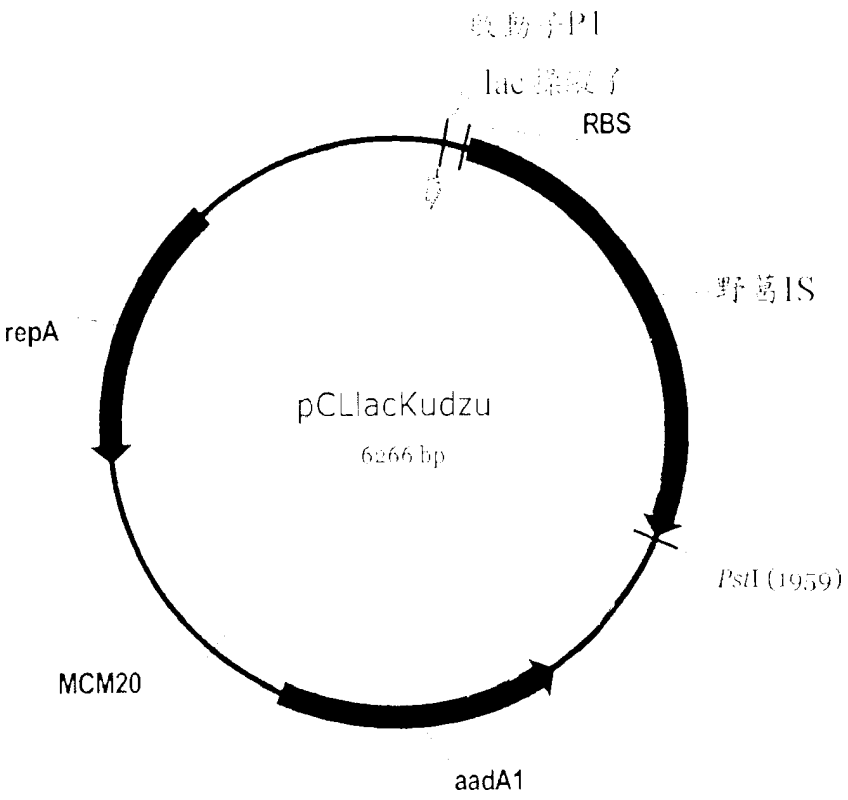


圖6

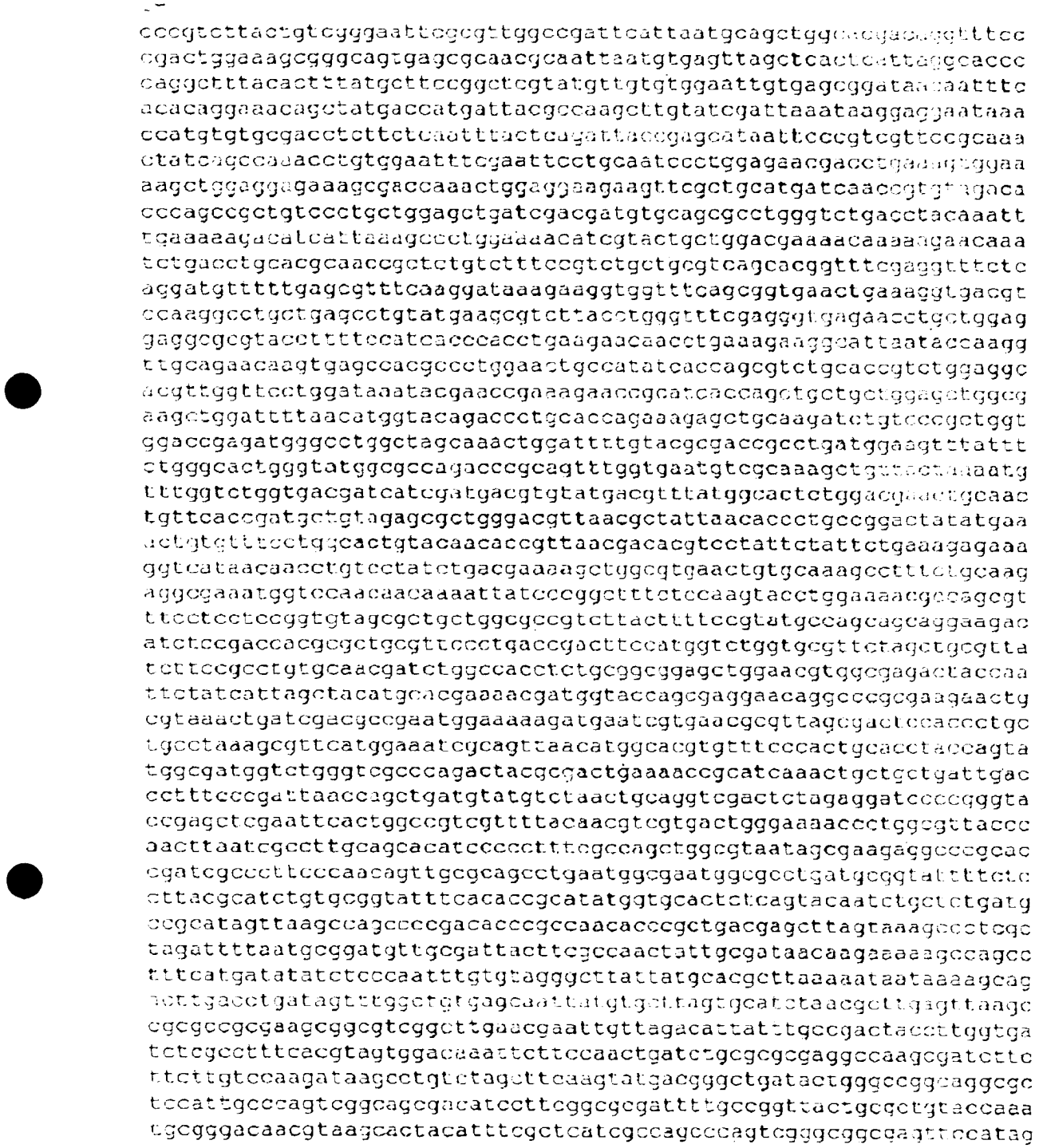

cccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcc
cgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccc
caggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttc
acacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcttgtatcgattaaataaggaggaataaa
ccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaa
ctatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaa
aagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagaca
cccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatt
tgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaa
tctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggttttct
aggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgt
ccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggag
gaggcgcgtacctttttcatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaagg
ttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggc
acgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcg
aagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgctggt
ggaccgagatgggcctggctagcaaactggattttgtacgcgaccgcctgatggaagttattt
ctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttcctaaaatg
tttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaac
tgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaa
actgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaagagaaa
ggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaag
aggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgt
ttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagac
atctccgaccacgcgctgcgttcctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgtta
tcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaa
ttctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactg
cgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgc
tgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagta
tggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgac
cctttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgcaggtcgactctagaggatccccgggta
ccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccc
aacttaatcgccttgcagcacatcccccttttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcac
cgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatttctcc
cttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatg
ccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgc
tagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcc
tttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcag
acttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagc
cgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtga
tctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttc
ttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggcaggcgc
tccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgattttgccggttactgcgctgtaccaaa
tgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatag

圖7A

cgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcctcc
gccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcttttgtcagcaagatagccagatcaa
tgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattg
cagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttct
acagcgcggagaatctcgctctctccagggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaag
ctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtgg
cttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcgagatgg
cgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttccctca
tgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccataaacat
caaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagactgtacccca
aaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcggtca
aggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaacaggc
ttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggc
agcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgc
atcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctg
gcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggatgaa
gtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaa
cgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcac
gatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagcttggca
cccagcctgcgcgagcagggggaattaattcccacgggttttgctgcccgcaaacgggctgttct
ggtgttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgcccggctgaaagcgc
tatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggaggcgtcactggctcccgtgttgtcg
gcagctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgt
aacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcacctgtt
ctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttga
atgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatctttttacaccgttttcatctgtgca
tatggacagttttccctttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgttagtctt
gatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatg
ttctctagtgtggttcgttgtttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttac
tttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatc
gtgtagtgtttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtatttttg
tcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctagtt
caacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcatattgct
gtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatgg
tagttatttttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctatatttgccttgt
gagttttcttttgtgttagttctttttaataccactcataaatcctcatagagtatttgtttttc
aaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataaggcaat
atctcttcactaaaaactaattctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactgga
aaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggt
tgctttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggtta
taagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggttttcaatcgtggggttgagtagtgcca
cacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagttcatt
tgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcactatac
caattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttcctttgagttgtgggtatctgta

圖7B

Aattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctag
acctttgtgtgttttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaagaataa
aaaaagataaaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactactttagtcagttccgcagt
attacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaagg
cttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattccttttgtctccgaccatcag
gcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgaat
gggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaag
aaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgact
ttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtctgaccacttcggattatcccgtga
caggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta

SEQ ID NO:4

圖 7C

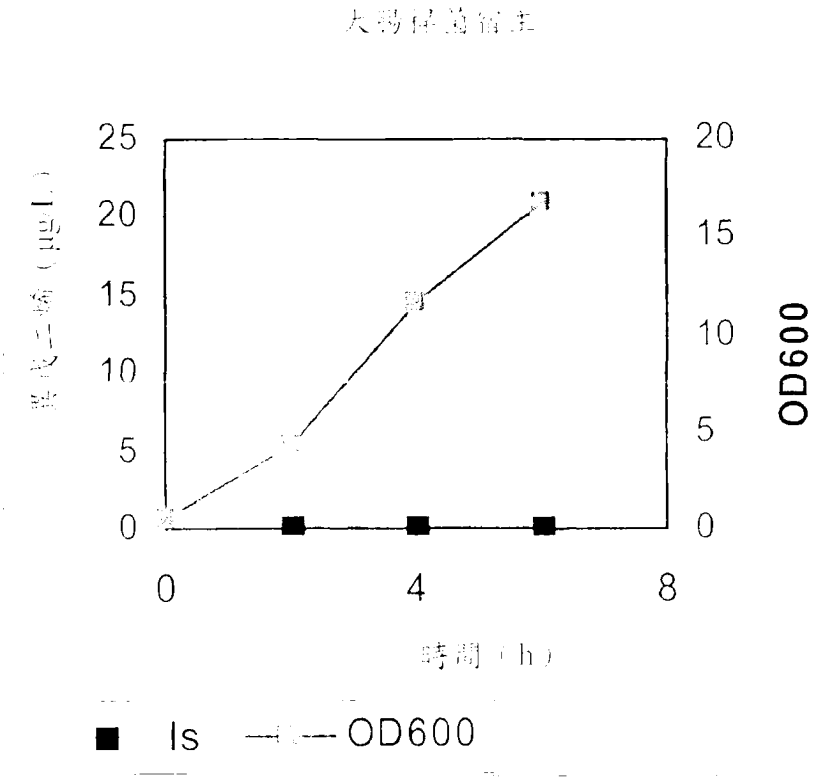


圖8A

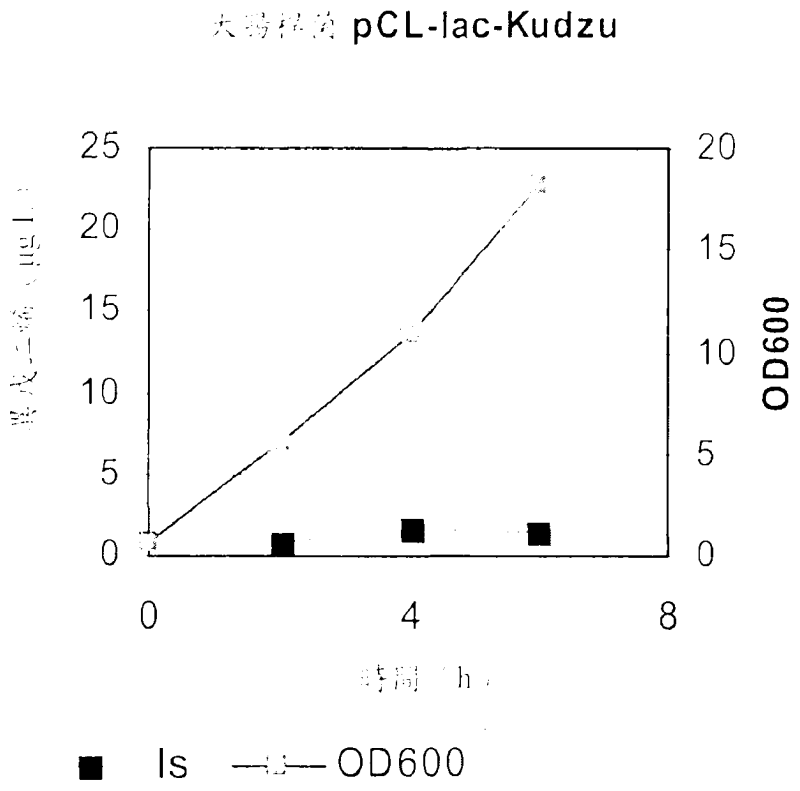

大腸桿菌 pCL-lac-Kudzu
25
20
15
10
5
0
20
15
10
5
0
OD600
0
4
8
時間 (h)
Is
OD600

圖8B

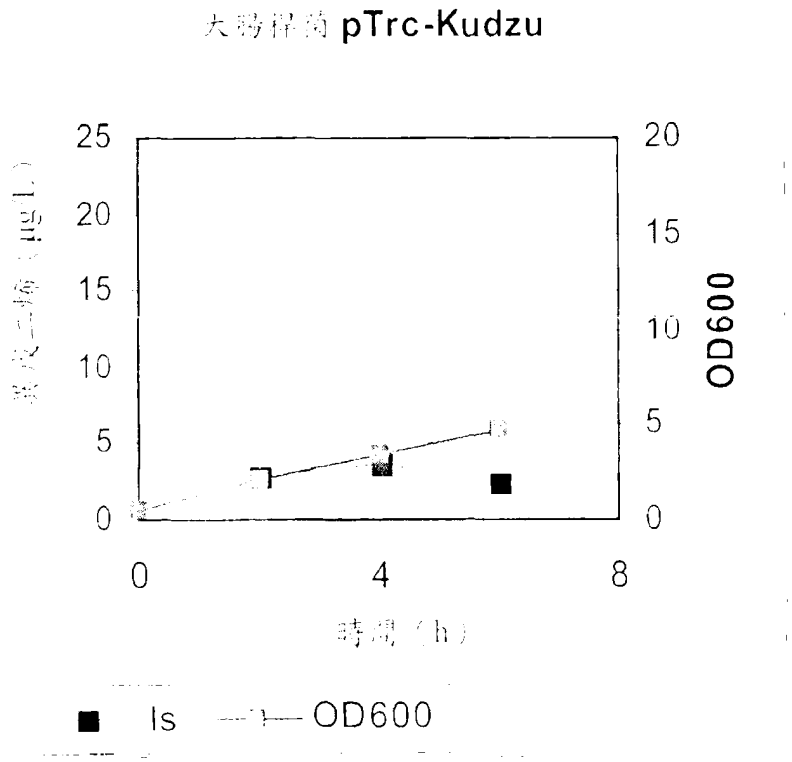


圖8C

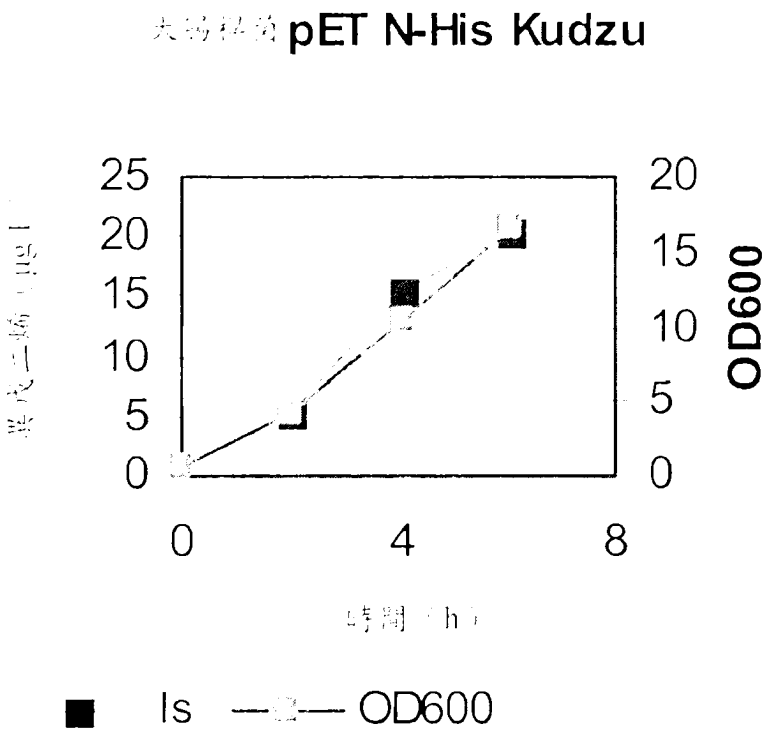

大腸桿菌 pET N-His Kudzu
25
20
15
10
5
0
20
15
10
5
0
OD600
0
4
8
時間（h）
Is
OD600

圖8D

A.

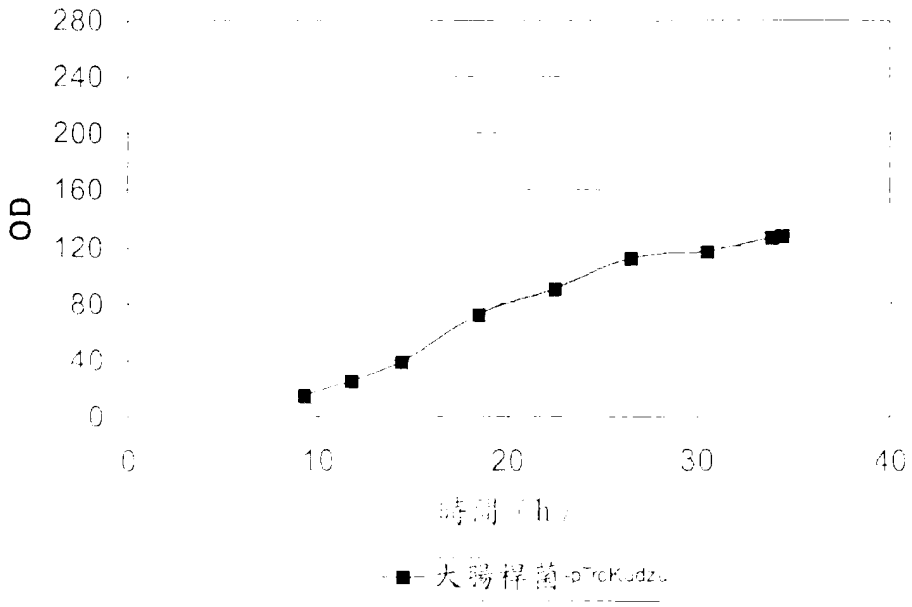


圖9A

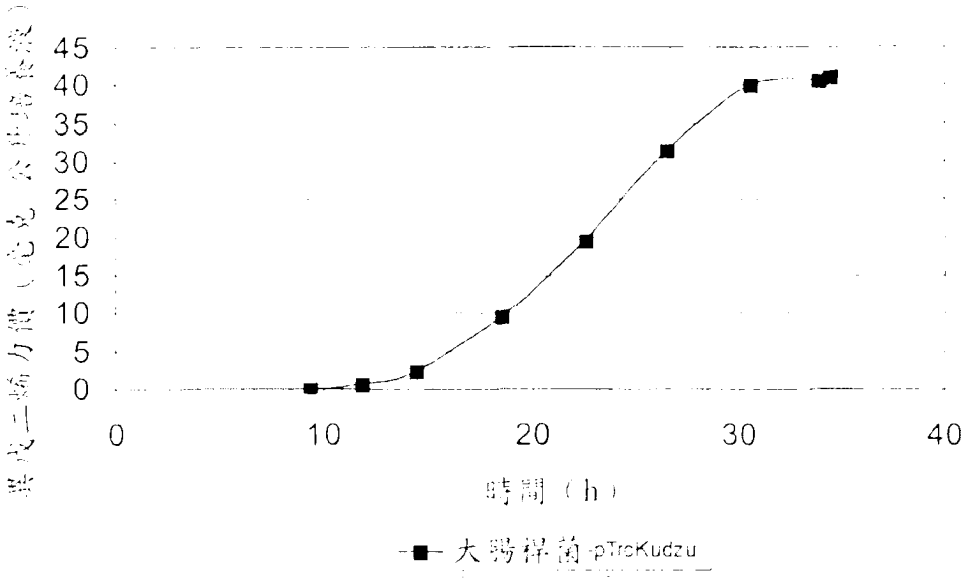


圖9B

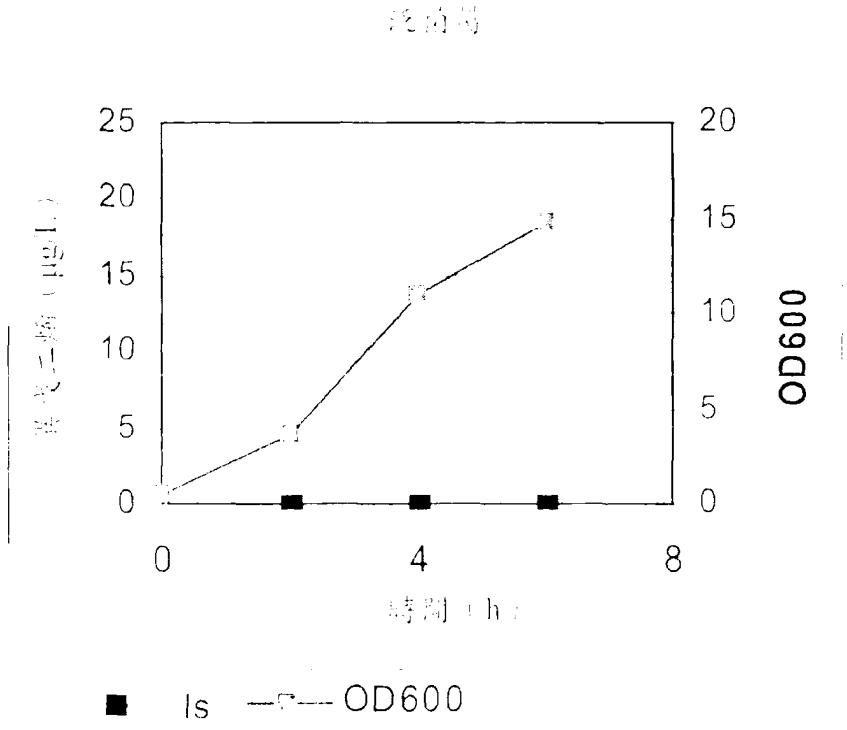


圖10A

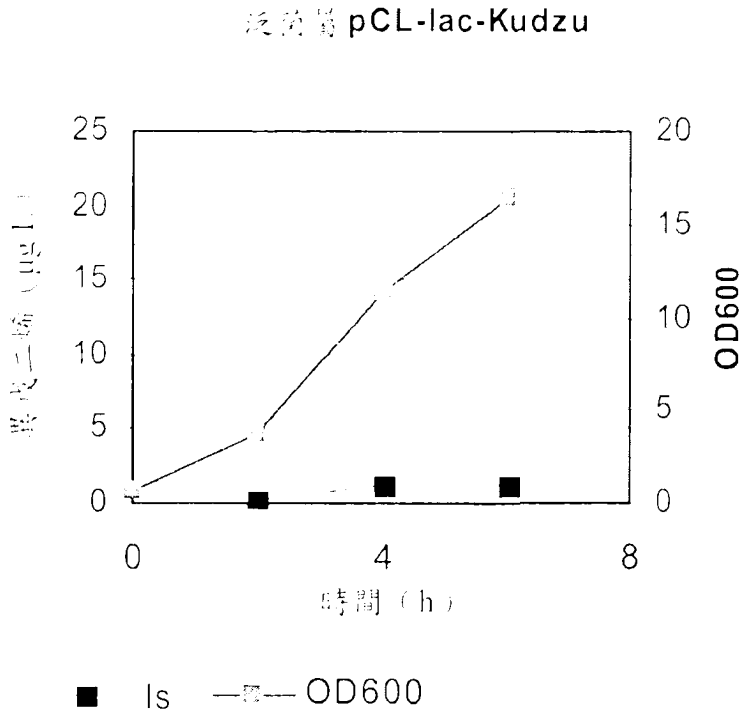


圖10B

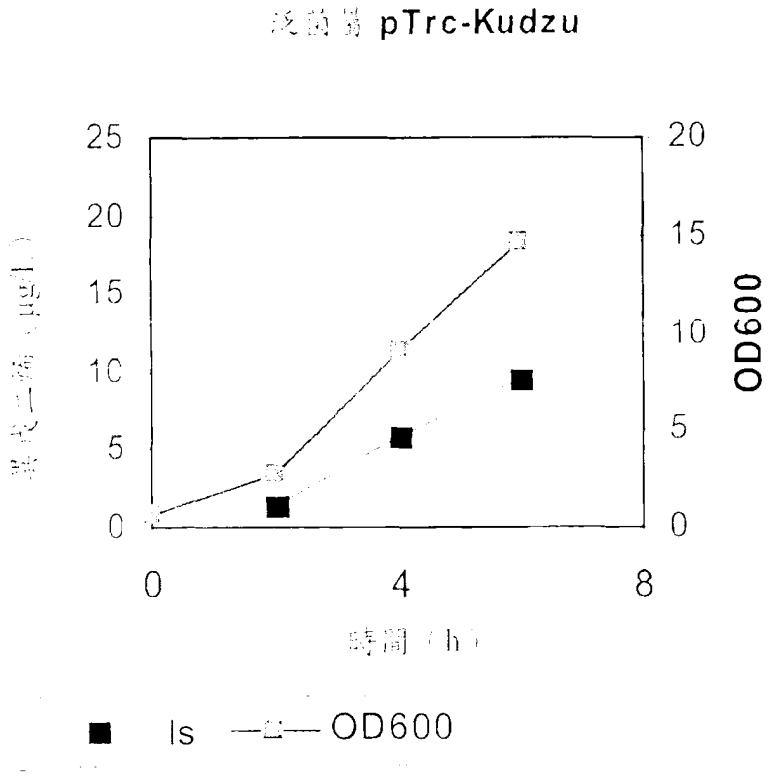


圖10C

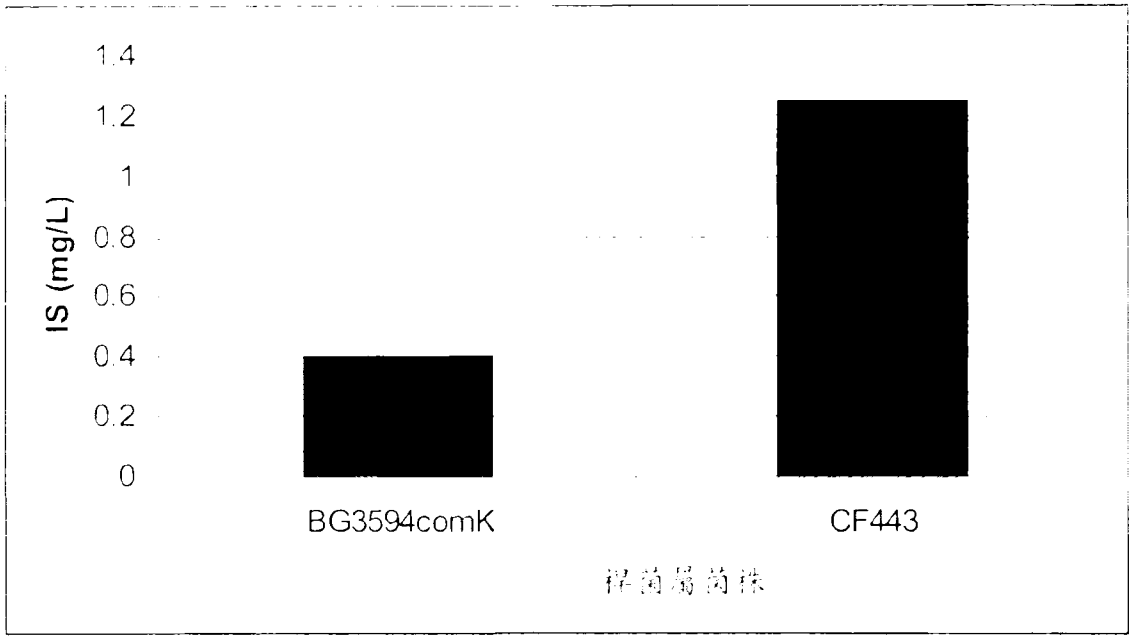


圖11

1-
gaattgctccattttcttctgctatcaaaataacagactcgtgattttccaaacgagctttcaa
aaaagcctctgccccttgcaaatcggatgcctgtctataaaattcccgatattggttaaacagc
ggcgcaatggcggccgcatctgatgtctttgcttggcgaatgttcatcttatttcttcctcccct
ctcaataatttttttcattctatccctttttctgtaaagtttatttttcagaatacttttatcatc
atgctttgaaaaaatatcacgataatatccattgttctcacggaagcacacgcaggtcatttga
acgaatttttttcgacaggaatttgccgggactcaggagcatttaacctaaaaaagcatgacatt
tcagcataatgaacatttactcatgtctatttttcgttcttttctgtatgaaaatagttatttcg
agtctctacggaaatagcgagagatgatatacctaaatagagataaaatcatctcaaaaaaatg
ggtctactaaaatattattccatctattacaataaattcacagaatagtcttttaagtaagtct
actctgaatttttttaaaaggagagggtaaagagtgtgtgcgacctcttctcaatttactcaga
ttaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcct
gcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaa
gaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacg
atgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacat
cgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgt
ctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaag
gtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtctta
cctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttccatcacccacctgaag
aacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagcccacgccctggaactgc
catatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaaga
accgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagaccctgcac
cagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggatt
ttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtt
tggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtat
gacgtttatggcactctggacgaactgcaaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgtta
acgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaa
cgacacgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagc
tggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccgg
ctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgtcgtc
ttactttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgac
ttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctg
cggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatgg
taccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatg
aatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaaca
tggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgac
tgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttttccgattaaccagctgatgtatgtctaa
aaaaaaccggccttggccccgccggttttttattattttcttcctccgcatgttcaatccgct
ccataatcgacggatggctcctctgaaaattttaacgagaaacggcgggttgaccccggctcag
tcccgtaacggccaagtcctgaaacgtctcaatcgccgcttcccggtttccggtcagctcaatg
ccgtaacggtcggcggcgttttcctgataccgggagacggcattcgtaatcggatcctctagag
tcgacctgcaggcatgcaagctttgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgaca
catgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgt
cagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgata

圖12A

gcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatg
cggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcct
cgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggc
ggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccag
caaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctg
acgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagata
ccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccgga
tacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatc
tcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccga
ccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgcca
ctggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttct
tgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaa
gccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagc
ggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctt
tgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcat
gagattatcaaaaaggatcgaagtcggtttcagaaaaagaaggatatggatctggagctgtaata
taaaaaccttcttcaactaacggggcaggttagtgacattagaaaaccgactgtaaaaagtaca
gtcggcattatctcatattataaaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaatagagt
tcataaacaatcctgcatgataaccatcacaaacagaatgatgtacctgtaaagatagcggtaa
atatattgaattacctttattaatgaattttcctgctgtaataatgggtagaaggtaattacta
ttattattgatatttaagttaaacccagtaaatgaagtccatggaataatagaaagagaaaaag
catttcaggtataggtgttttgggaaacaatttaaaaggaccattatatttctctaacatcaga
aaggtataaatcataaaactctttgaagtcattctttacaggagtccaaataccagagaatgtt
ttagatcaccatcaaaaattgtataaagtggctctaacttatcccaataacctaactctccgt
cgctattgtaaccagttctaaaagctgtatttgagtttatcaccttgtcactaagaaaataaa
tgcagggtaaaatttatatccttcttgttttatgtttcggtataaaacactaatatcaatttct
gtggttatactaaaagtcgtttgttggttcaaataatgattaaatatctcttttctcttccaat
tgtctaaatcaatttcattaaagttcatttgatatgcctcctaaatttttatctaaagtgaatt
taggaggcttacttgtctgctttcttcattagaatcaatccttttttaaagtcgtattatctgt
aacataaatatatattttaaaaatatcccactttatccaattttcgtttgttgaactaatgggt
gctttagttgaagaataaagaccacattaaaaaatgtggtcttttgtgttttttaaaggattt
gagcgtacgcgaaaaatccttttctttcttttcttatcttgataataagggtaactattgccggt
tgtccattcatggctgaactctgcttcctctgttgacatgacacacatcatctcaatctccgaa
tagggccatcagtctgacgaccaagagagccataaacaccaatagccttaacatcatccccat
atttatccaatattcgttccttaatttcatgaacaatcttcattctttcttctctagtcattat
tattggtccattcactattctcattccctttcagataatttagatttgctttttttaataag
aatatttggagagcaccgttcttattcagctattaataactcgtcttcctaagcatttcttcaat
ccttttaataacaattatagcatctaatcttcaacaaactggcccgtttgttgaactactcttt
aataaaataatttttccgttcccaattccacattgcaataatagaaaatccatcttcatcggct
ttttcgtcatcatctgtatgaatcaaatcgccttattctgtgtcatcaaggtttaatttttat
gtatttcttttaacaaaccaccataggagattaaccttttacggtgtaaacttcctccaaatc
agacaaacgtttcaaattcttttcttcatcatcggtcataaaatccgtatcctttacaggatat
tttgcagtttcgtcaattgccgattgtatatccgatttatatttatttttcggtcgattttttt
gaacttttacatttggatcatagtctaatttcattgccttttttccaaaattgaatccattgttt

圖12B

ttgattcacgtagttttctgttattctaaaataagttggttccacacataccattacatgcatg
tgctgattataagaatttatctttattatttattgtcacatccgttgcacgcataaaaccaacaa
gatttttattaatttttttatattgcatcattcggcgaaatccttgagccatatctgtcaaact
cttatttaattcttcgccatcataaacatttttaactgttaatgtgagaaacaaccaacgaact
gttggcttttgtttaataacttcagcaacaacctttgtgactgaatgccatgtttcattgctc
tcctccagttgcacattggacaaagcctggatttgcaaaaccacactcgataccactttctttc
gcctgtttcacgattttgtttatactctaatatttcagcacaatcttttactctttcagccttt
ttaaattcaagaatatgcagaagttcaaagtaatcaacattagcgatttttcttttctctccatg
gtctcacttttccacttttgtcttgtccactaaaaccttgatttttcatctgaataaatgct
actattaggacacataatattaaaagaaaccccccatctatttagttatttgtttagtcacttat
aactttaacagatgggggttttctgtgcaaccaattttaagggttttcaatactttaaaacaca
tacataccaacacttcaacgcacctttcagcaactaaaataaaaatgacgttatttctatatgt
atcaagataagaaagaacaagttcaaaaccatcaaaaaaagacacctttcaggtgcttttttt
attttataaactcattcccctgatctcgacttcgttcttttttacctctcggttatgagttagt
tcaaattcgttcttttttaggttctaaatcgtgtttttcttggaattgtgctgttttatccttta
ccttgtctacaaaacccctaaaaacgtttttaaaggcttttaagccgtctgtacgttccttaag

SEQ ID NO 5

圖12C

ATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTTACTCAGATTACCGAGCATAATTCTCGACGATCTGCTAACT
ACCAGCCGAACCTTTGGAACTTTGAGTTTCTCCAGTCTCTCGAAAATGACCTGAAGCTGGAAAA
GCTCGACGAGAAGGCGACCAAACTCGAGGAGGACGTGCGATGTATGATCAACAGAGTTGACACC
CAACCCCTGTCTTTGCTGGAGCTGATCGACGATGTGCAGCGGTTGGGTTTGACTTATAAATTCG
AGAAGGACATTATCAAGGCACTGGAGAACATTGTGCTCCTCGACGAGAACAAGAAGAACAAGTC
TGATCTTCACGCTACCGCTCTCTCTTTCCGACTTCTTCGACAACACGGCTTCGAGGTGTCGCAG
GACGTCTTCGAGAGATTTAAGGACAAGGAGGGAGGATTTAGCGGCGAGCTGAAGGGAGACGTTC
AGGGTCTTCTCTCCTTGTACGAGGCGTCCTACCTGGGATTCGAGGGAGAGAACCTCCTGGAGGA
AGCTCGTACATTTTCCATCACTCACCTTAAGAATAACCTTAAGGAGGGAATTAACACCAAGGTG
GCCGAGCAGGTTTCTCACGCCCTGGAGCTCCCCTACCACCAACGGCTCCATAGACTGGAGGCTC
GTTGGTTCCTGGACAAATATGAGCCAAAGGAGCCTCATCATCAGTTGCTGTTGGAGTTCGCCAA
GCTGGACTTCAATATGGTTCAGACGCTGCACCAAAAGGAGTTGCAGGACCTCTCTCCATGGTGG
ACCGAGATGGGATTGGCCTCGAAGCTGGATTTTGTCCGTGACCGACTTATGGAGGTCTATTTTT
GGGCCCTTGGAATGCCGCCTGACCCCCAGTTCGGAGAGTGCCGGAAGGCGGTGACGAAGATGTT
CGGTCTTGTGACTATCATCGACGACGTCTACGATGTCTACGGCACACTCGACGAGTTGCAGCTG
TTCACTGACGCCGTCGAGCGATGGGATGTGAACGCCATTAATACTCTCCCTGACTATATGAAGC
TGTGCTTCCTGGCTCTGTACAACACTGTCAACGATACCTCGTACTCTATCCTCAAGCAGAAGGG
ACACAACAATCTCTCCTACTTGACCAAATCCTGGCGAGAACTGTGCAAGGCTTTTCTGCAGGAG
GCTAAATGGTCCAATAACAAGATCATTCCTGCTTTTTCTAAATACCTGGAAAATGCCTCGGTGT
CGAGCTCTGGCGTCGCCCTTCTGGCCCCTTCCTACTTCTCCGTCTGCCAGCAGCAGGAGGATAT
TTCCGATCATGCTCTTAGATCGCTGACCGATTTTCACGGCCTCGTGCGATCTTCCTGCGTGATT
TTTCGGTTGTGTAATGACCTTGCGACCTCTGCTGCTGAGCTGGAACGAGCCGAGACTACAAATT
CCATTATTTCTTACATGCACGAAAACGATGGAACATCTGAAGAACAGGCTAGAGAGGAACTGCG
AAAGTTGATCGACGCCGAGTGGAAGAAGATCAACAGAGAGCGGGTGTCCGACTCTACCCTGCTT
CCCAAGGCCTTCATGGAGATCGCCGTGAACATGGCTCGAGTTTCCCATTGCACTTACCACTACG
GTGACGCCCTGGGTCGTCCGGACTACGCTACAGAGAACCGAATCAAGCTGCTGCTCATCGACCC
CTTCCCTATCAACCAATTGATGTACGTGTAA

SEQ ID NO:6

圖13

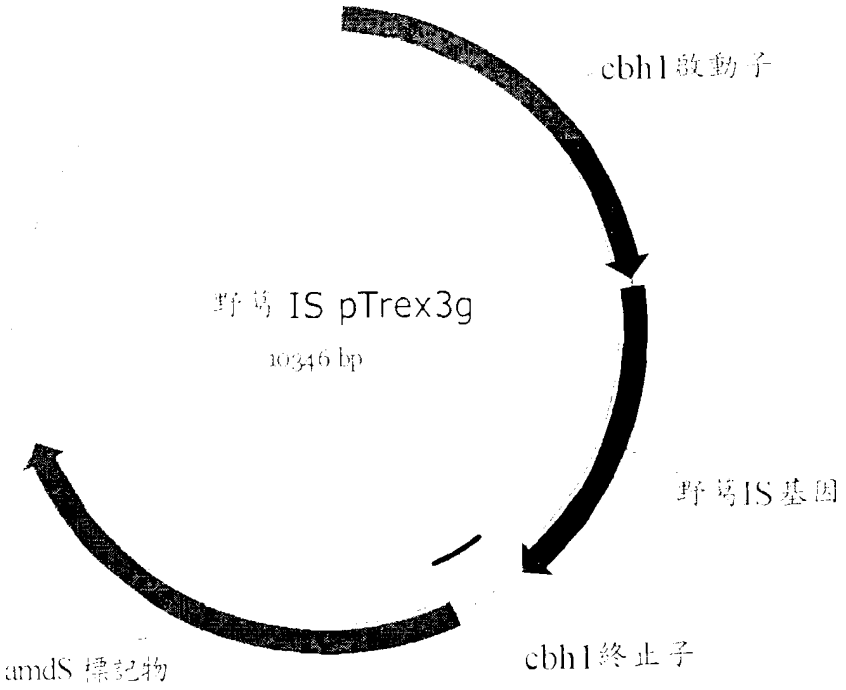


圖14

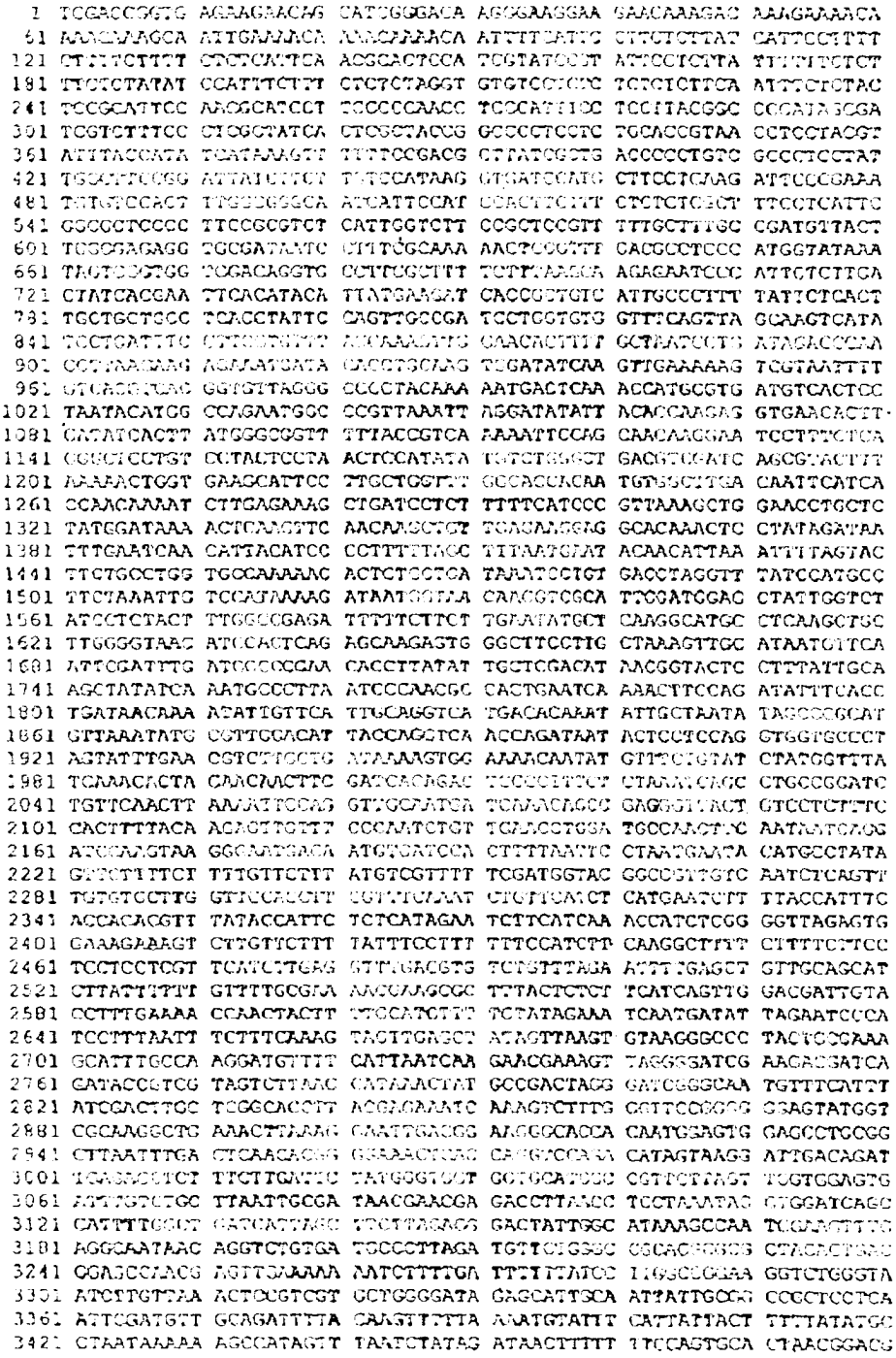


圖15A

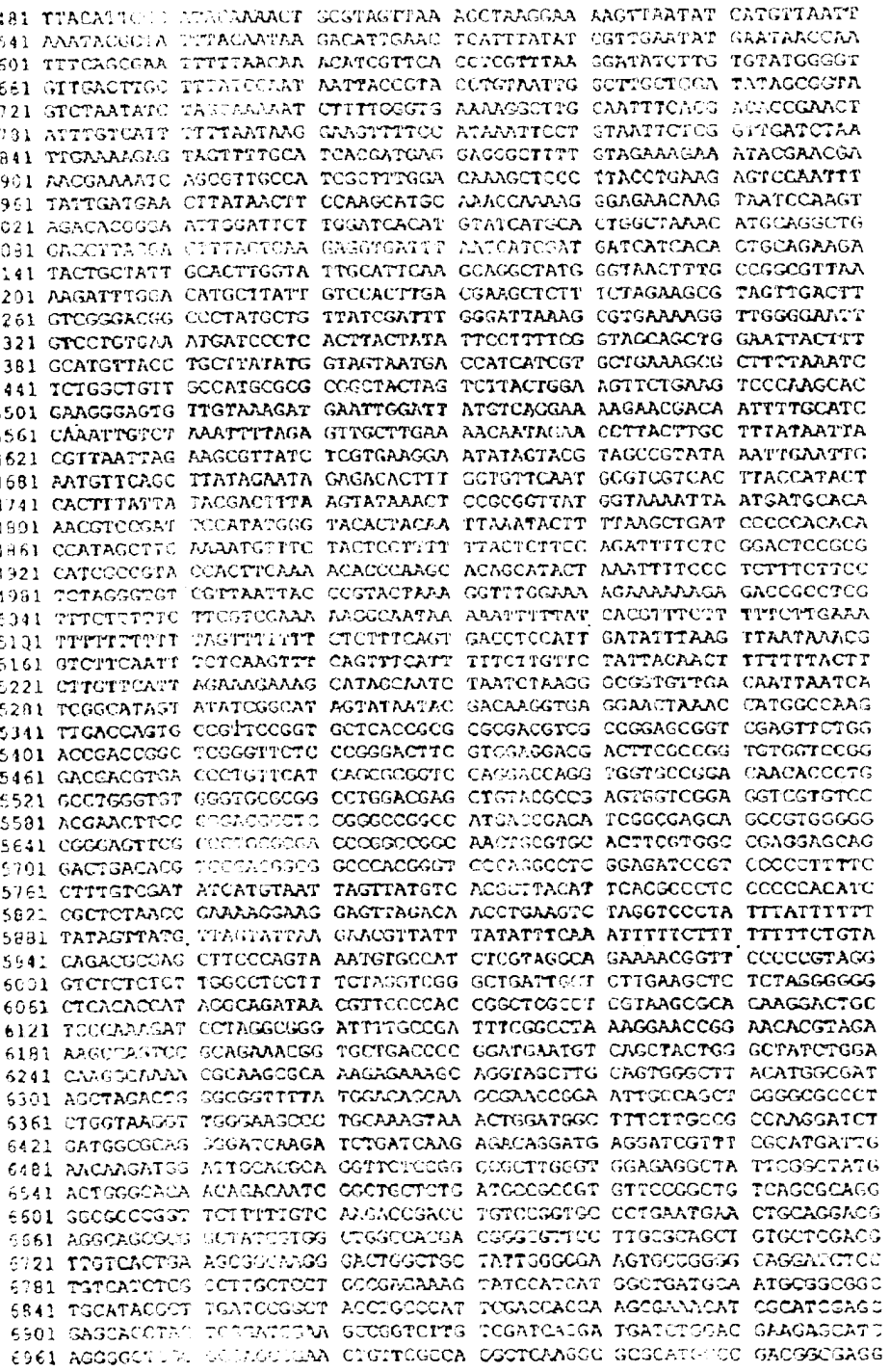


圖15B

```
7021 ATCTCGTCGT CATCGATGGC GATGCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATCGCCGCT
7081 TTTCTGGATT CAACGACTGT GGCCGGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT
7141 TGGATACCCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG GTGGCGAATG GGCTGACCGC TTCCTCGTGC
7201 TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTCGCAGC GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTTGACGAGT
7261 TCTTCTGAAT TGAAAAAGGT AGCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAAACT
7321 TCATTTTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA TGACCAAAAT
7381 CCCTTAACGT GAGTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAGA TCAAAGGATC
7441 TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGCGCGTAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT
7501 ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAACTGG
7561 CTTCAGCAGA GCGCAGATAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA
7621 CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC
7681 TGCTGCCAGT GGCGATAAGT CGTGTCTTAC CGGGTTGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA
7741 TAAGGCGCAG CGGTCGGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA CAGCCCAGCT TGGAGCGAAC
7801 GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA
7861 AGGGAGAAAG GCGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG
7921 GGAGCTTCCA GGGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT GTCGGGTTTC GCCACCTCTG
7981 ACTTGAGCGT CGATTTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG AGCCTATGGA AAAACGCCAG
8041 CAACGCGGCC TTTTTACGGT TCCTGGCCTT TTGCTGGCCT TTTGCTCACA TGTTCTTTCC
8101 TGCGTTATCC CCTGATTCTG TGGATAACCG TATTACCGCC TTTGAGTGAG CTGATACCGC
8161 TCGCCGCAGC CGAACGACCG AGCGCAGCGA G
```

SEQ ID NO:7

圖15C

```
   1 GAATCGAAAA GAAAATGTGT GCAACCTCCT CCCAGTTTAC TCAGATTACC GAGCATAATT
  61 CTCGACGATC TGCTAACTAC CAGCCGAACC TTTGGAACTT TGAGTTTCTC CAGTCTCTCG
 121 AAAATGACCT CAAGGTGCAA AAGCTCGAGG AGAAGGCGAC CAAACTCGAG GAGGAGGTGC
 181 GATGTATGAT GAACAGAGTT GACACCCAAC CCCTGTCTTT GCTGGAGCTG ATCGACGATG
 241 TGCACCGGTT GGGTTTGACT TATAAATTCG AGAAGGACAT TATCAAGGCA CTGGAGAACA
 301 TTGTGCTCCT CGACGAGAAC AAGAAGAACA AGTCTGATCT TCACGCTACC GCTCTCTCTT
 361 TCCGACTTCT TCGACAACAC GGCTTCGAGG TGTCGCAGGA CGTCTTCGAG AGATTTAAGG
 421 ACAAGGACGG AGGATTTAGC GGCGAGCTGA AGCGAGACGT TCAGGGTCTT CTCTCCTTGT
 481 ACGAGGCGTC CTACCTGGGA TTCGAGGGAG AGAACCTCCT GGAGGAAGCT CGTACATTTT
 541 GCATCACTCA CCTTAAGAAT AACCTTAAGG AGGGAATTAA CACCAACGTG GCCGAGCAGG
 601 TTTCTCACGC CGTGGAGCTC CCCTACCACC AACGGCTCCA TAGACTGGAG CCTCGTTGGT
 661 TCCTCGACAA ATATGAGCCA AAGGAGCCTC ATCATCAGTT GCTGTTGGAG TTGGCCAAGC
 721 TGGACTTCAA TATGGTTCAG ACGCTGCACC AAAAGGAGTT GCAGGACCTG TCTCGATGGT
 781 GGACCGAGAT GGGATTGGCC TCGAAGCTGG ATTTTGTCCG TGACCGACTT ATGGAGGTCT
 841 ATTTTTGGGC CGTTGGAATG GCGCCTGACC CCCAGTTCGG AGAGTGCCGC AAGCGGTGA
 901 CGAAGATGTT CGGTCTTGTG ACTATCATCG ACGACGTCTA CGATGTCTAC GGCACACTCG
 961 ACGAGTTGCA GCTGTTCACT GACGCCGTCG AGCGATGGGA TGTGAACGCC ATTAATACTC
1021 TCCCTGACTA TATGAAGCTG TGCTTCCTGG CTCTGTACAA CACTGTCAAC GATACCTCGT
1081 ACTCTATCCT CAAGGAGAAG GGACACAACA ATCTCTCCTA CTTGACCAAA TCCTGGCGAG
1141 AACTGTGCAA GGCTTTTCTG CACGAGGCTA AATGGTCCAA TAACAAGATC ATTCCTGCTT
1201 TTTCTAAATA CCTGGAAAAT GCCTCGGTGT CGAGCTCTGG CGTCGCCCTT CTCGCCCTT
1261 GCTACTTCTC CGTCTGCCAG CAGCAGGAGG ATATTTCCGA TCATGCTCTT AGATCGCTGA
1321 CCGATTTTCA CGGCCTCGTG CGATCTTCCT GCGTGATTTT TCGGTTGTGT AATGACCTTG
1381 CGACCTCTGC TGCTGAGCTG GAACGAGGCG ACACTACAAA TTCCATTATT TCTTACATGC
1441 ACGAAAACGA TGAACATCTT GAAGAACAGG CTAGAGAGGA ACTGCGAAAG TTGATCGACG
1501 CCGAGTGGAA GAAGATGAAG AGAGAGCGGG TGTCCGACTC TACCCTGCTT CCCAAGGCCT
1561 TCATGCAGAT CGCCGTGAAC ATGGCTCGAG TTTCCCATTG TACTTACCAG TACGGTGACG
1621 GCCTGGGTCG TCCGGACTAC GCTACAGAGA ACCGAATCAA GCTGCTGCTC ATCGACCCCT
1681 TCCCTATCAA CGAATTGATG TACGTGTAAT AGTCTAGAGG ATCC
```

SEQ ID NO.8

圖16

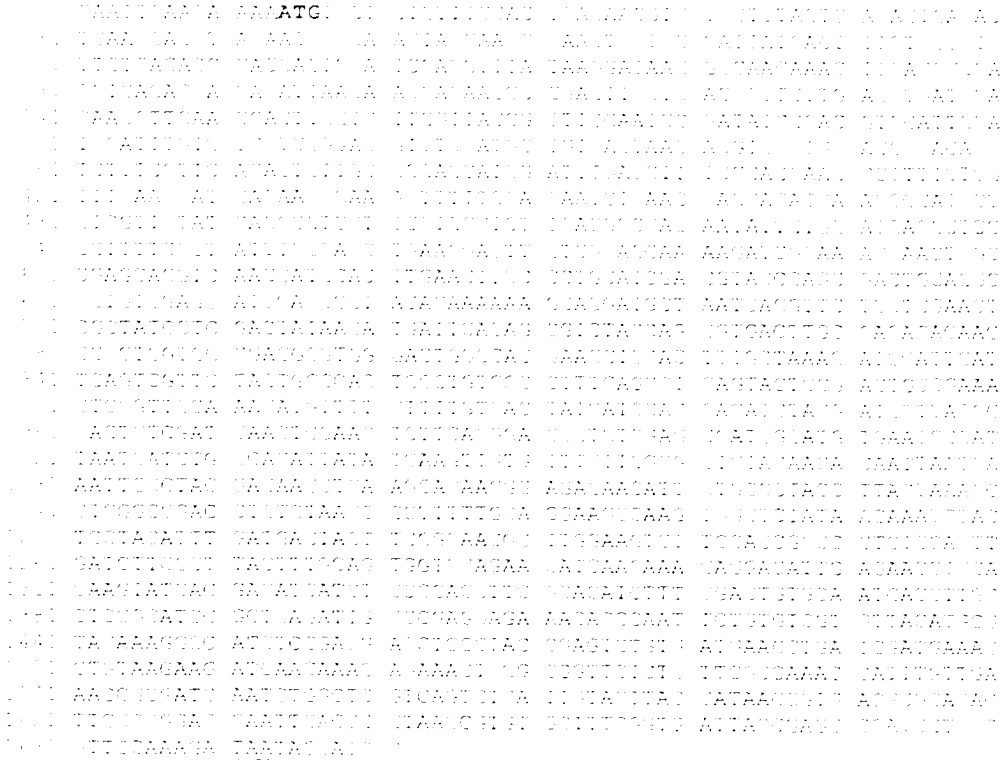


圖17

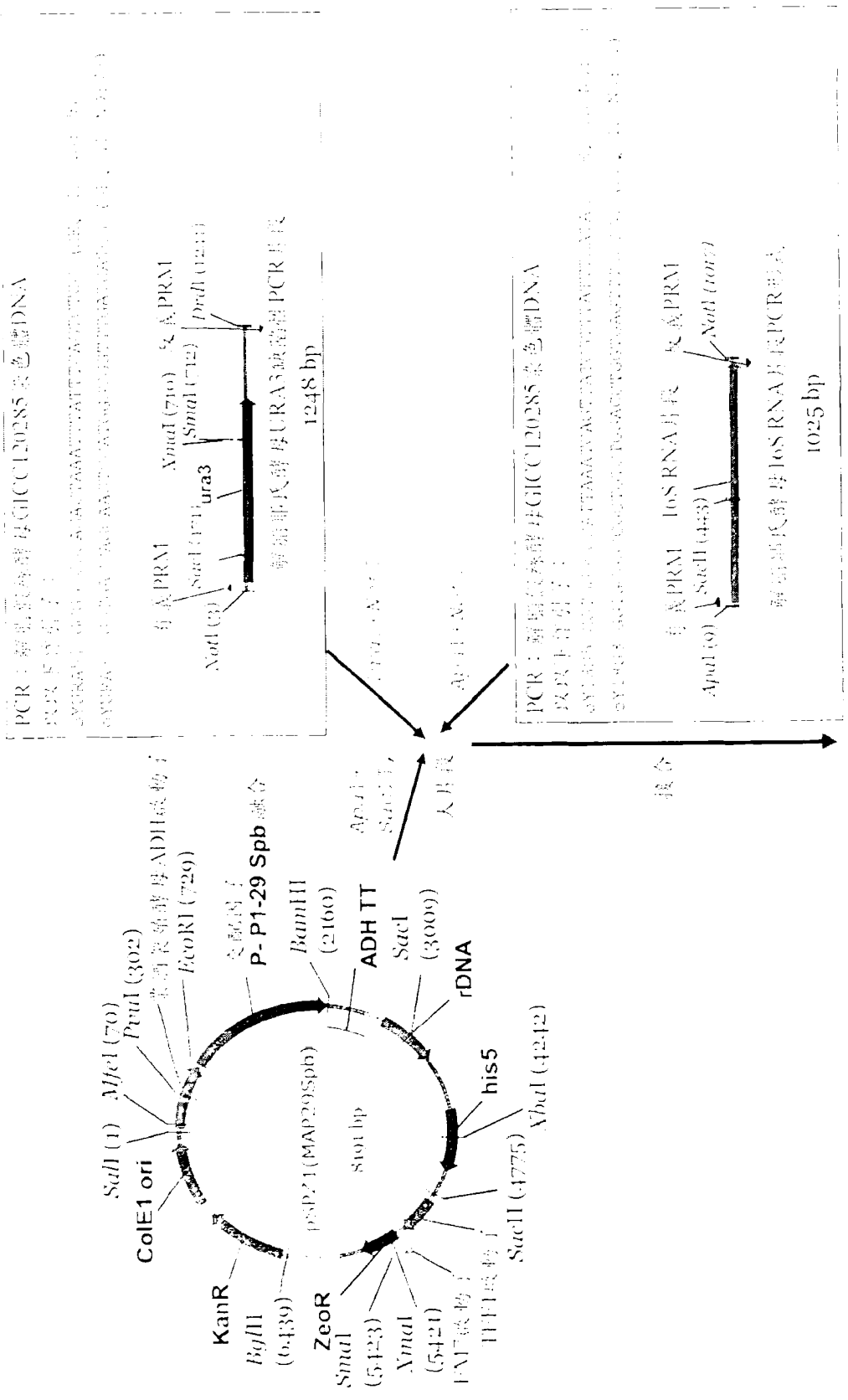

ColE1 ori
KanR
ZeoR
P- P1-29 Spb
ADH TT
rDNA
his5
BamHI (2160)
SacI (3000)
SacII (4775)
EcoRI (729)
PmeI (302)
MfeI (70)
SalI (1)
BglII (6439)
SmaI (5423)
XmaI (5421)
pSP21(MAP29Spb)
8901 bp
NotI (6)
SacII (433)
AgeI (0)
1248 bp
1025 bp

圖18A1

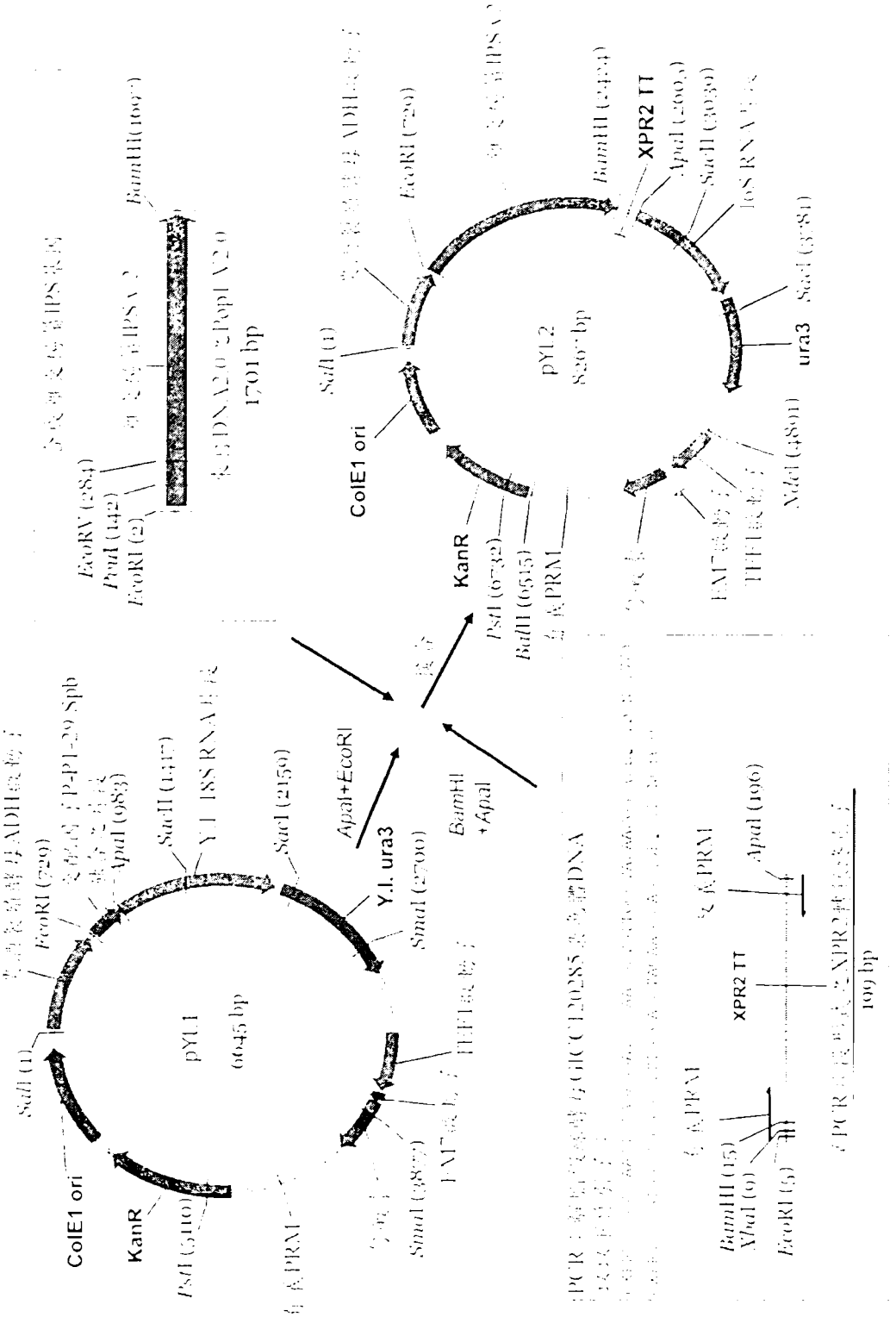

ColE1 ori
KanR
pYL1
6645 bp
Y.l. ura3
pYL2
8200 bp
XPR2 TT
ura3
EcoRV (2884)
PvuI (142)
EcoRI (2)
BamHI (1667)
1701 bp
SalI (1)
EcoRI (729)
SacII (1437)
SacI (2150)
ApaI+EcoRI
SmaI (2700)
BamHI
+ApaI
PstI (6732)
BclII (6515)
ApaI (2603)
SacII (3039)
NdeI (4891)
SacI (5481)
BamHI (15)
XhoI (6)
EcoRI (5)
ApaI (196)
199 bp

圖18A2

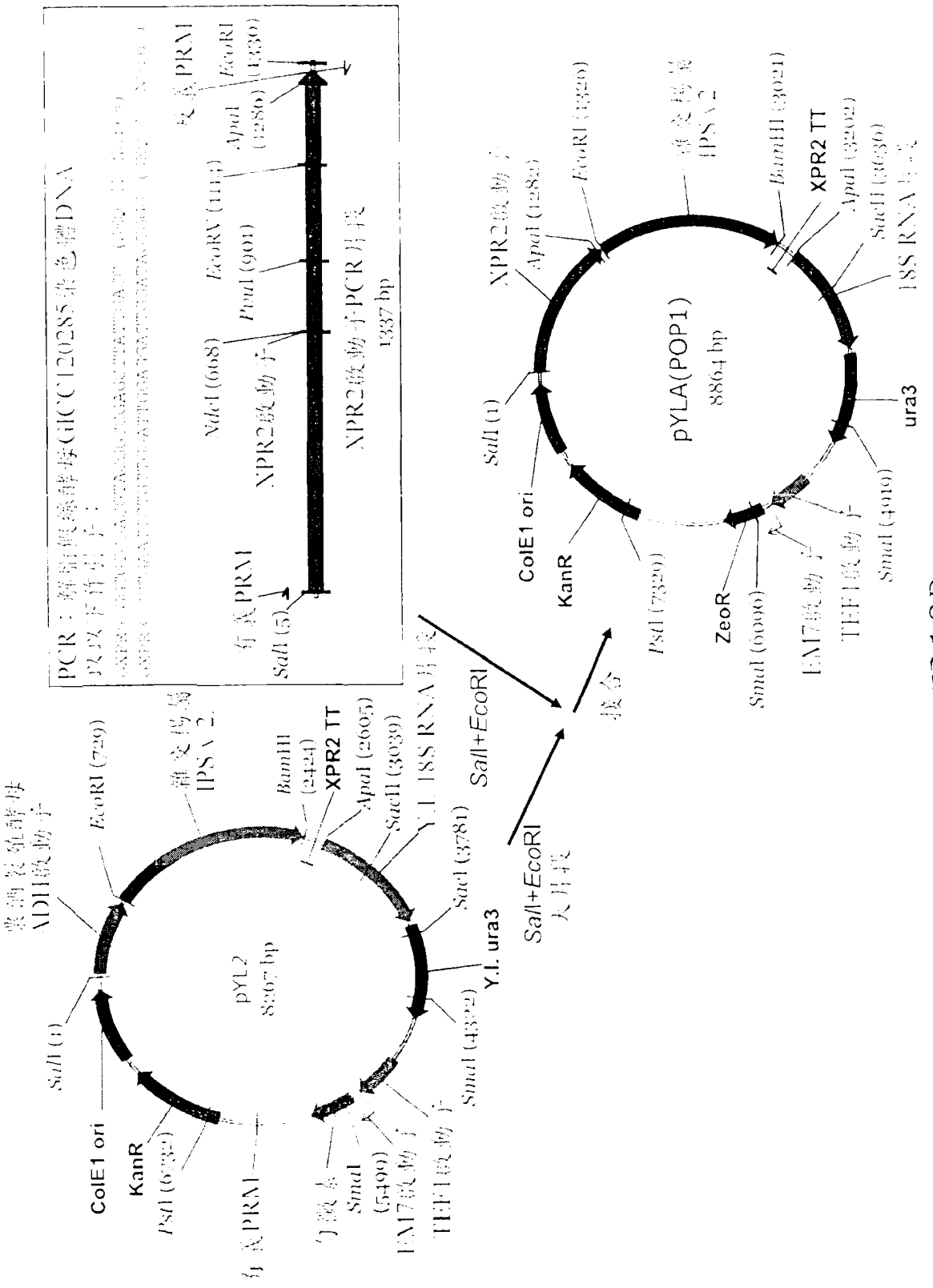

PCR：解脂肪酵母CBS12028S染色體DNA
XPR2啟動子
有義PRI
XPR2啟動子
XPR2啟動子PCR片段
1337 bp
SalI (5)
VdeI (668)
PvuI (901)
EcoRV (1114)
ApaI (1286)
EcoRI (1330)
有義PRI
XPR2啟動子
pYL2
8267 bp
SalI (1)
EcoRI (729)
BamHI (2424)
XPR2 TT
ApaI (2605)
SacII (3039)
SacI (3781)
SmaI (4322)
ColE1 ori
KanR
PstI (6732)
SmaI (5490)
Y.l. 18S RNA片段
Y.l. ura3
SalI+EcoRI
SalI+EcoRI
接合
pYLA(POP1)
8864 bp
SalI (1)
ApaI (1286)
EcoRI (1329)
PstI (7329)
ZeoR
SmaI (6096)
BamHI (3021)
XPR2 TT
ApaI (3202)
SacII (3636)
SmaI (4010)
ura3
ColE1 ori
KanR

圖18B

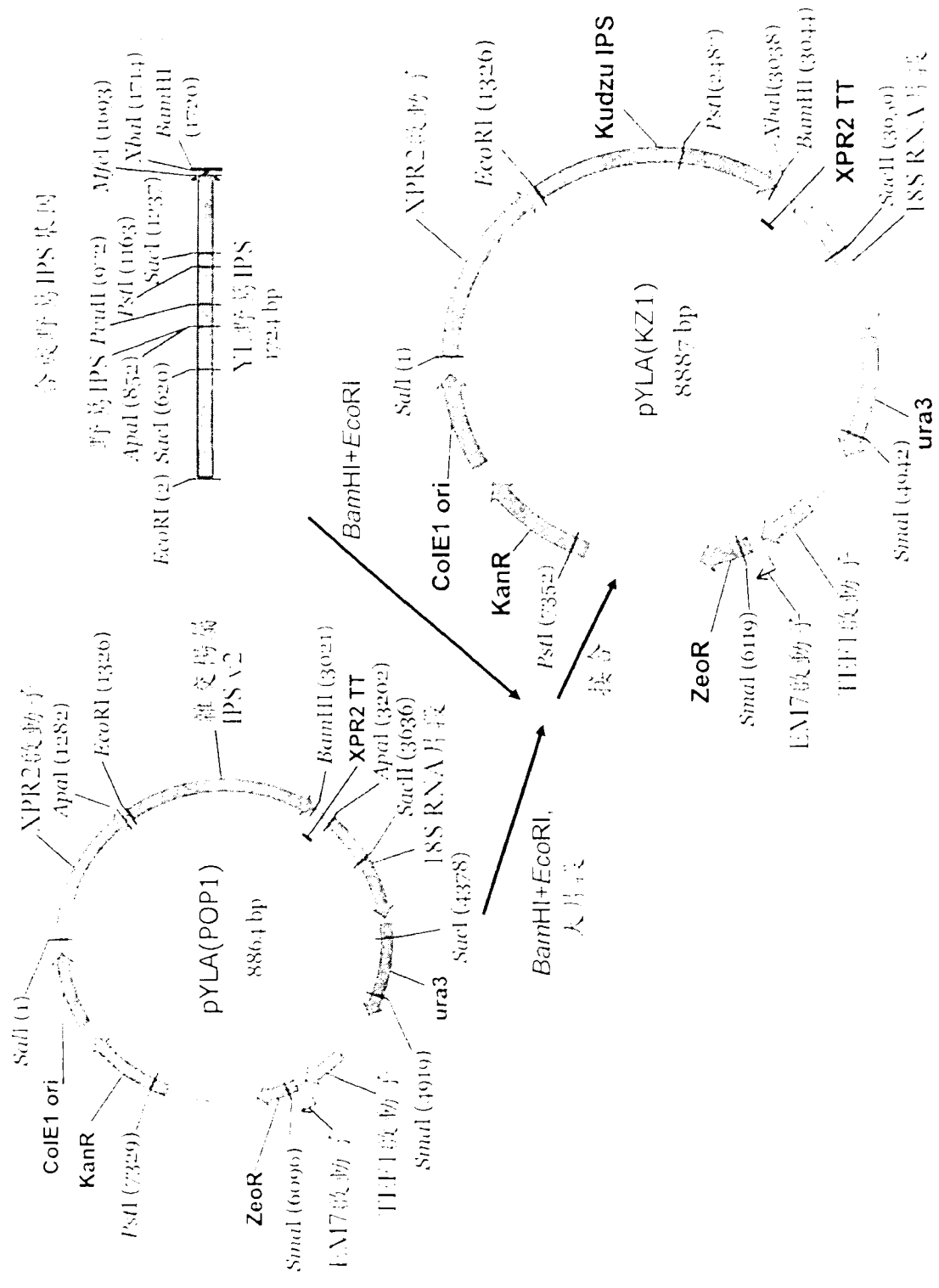

pYLA(POP1)
8864 bp
pYLA(KZ1)
8887 bp
ColE1 ori
KanR
ZeoR
ura3
XPR2 TT
XPR2啟動子
EM7啟動子
TEF1啟動子
18S RNA片段
IPS V2
Kudzu IPS
YLIPS
BamHI+EcoRI
接合

圖18C

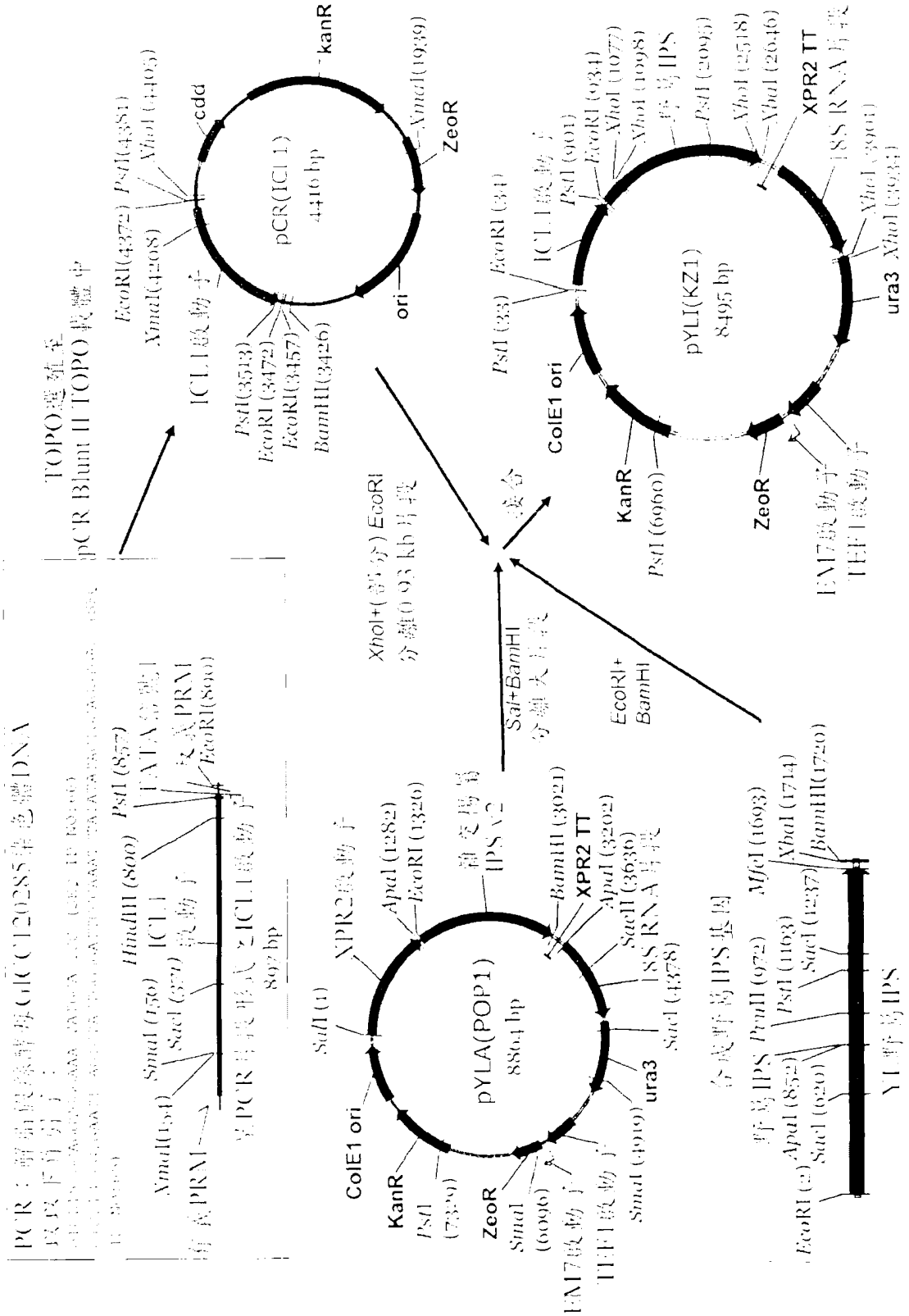

pYLA(POP1)
8804 bp
pYLI(KZ1)
8495 bp
pCR(ICL1)
4416 bp
ColE1 ori
KanR
ZeoR
ura3
XPR2 TT
ICL1
TEF1
EM7
cdd
ori
XhoI(8749) EcoRI
分離0.93 kb片段
Sal+BamHI
EcoRI+
BamHI
連接
TOPO連結至
pCR Blunt II TOPO載體中

圖18D

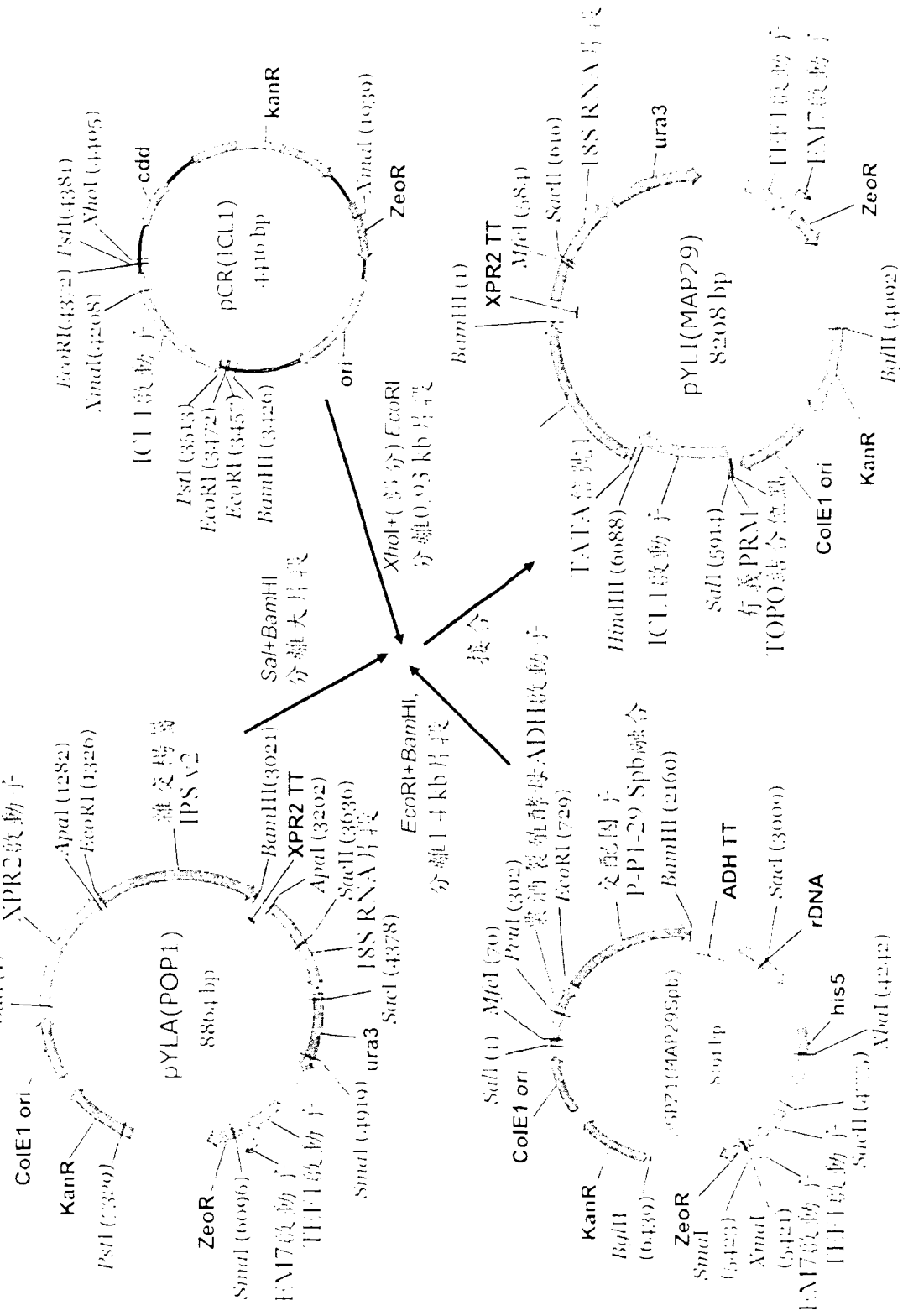

pYLA(POP1)
8864 bp
pYLI(MAP29)
8208 bp
pCR(ICL1)
4416 bp
IPS v2
XPR2 TT
ADH TT
rDNA
ColE1 ori
KanR
ZeoR
kanR
ura3
his5
cdd
ori
Sal+BamHI 分離大片段
EcoRI+BamHI, 分離1.4 kb片段
XhoI+(8.5分) EcoRI 分離0.93 kb片段
接合

圖18E

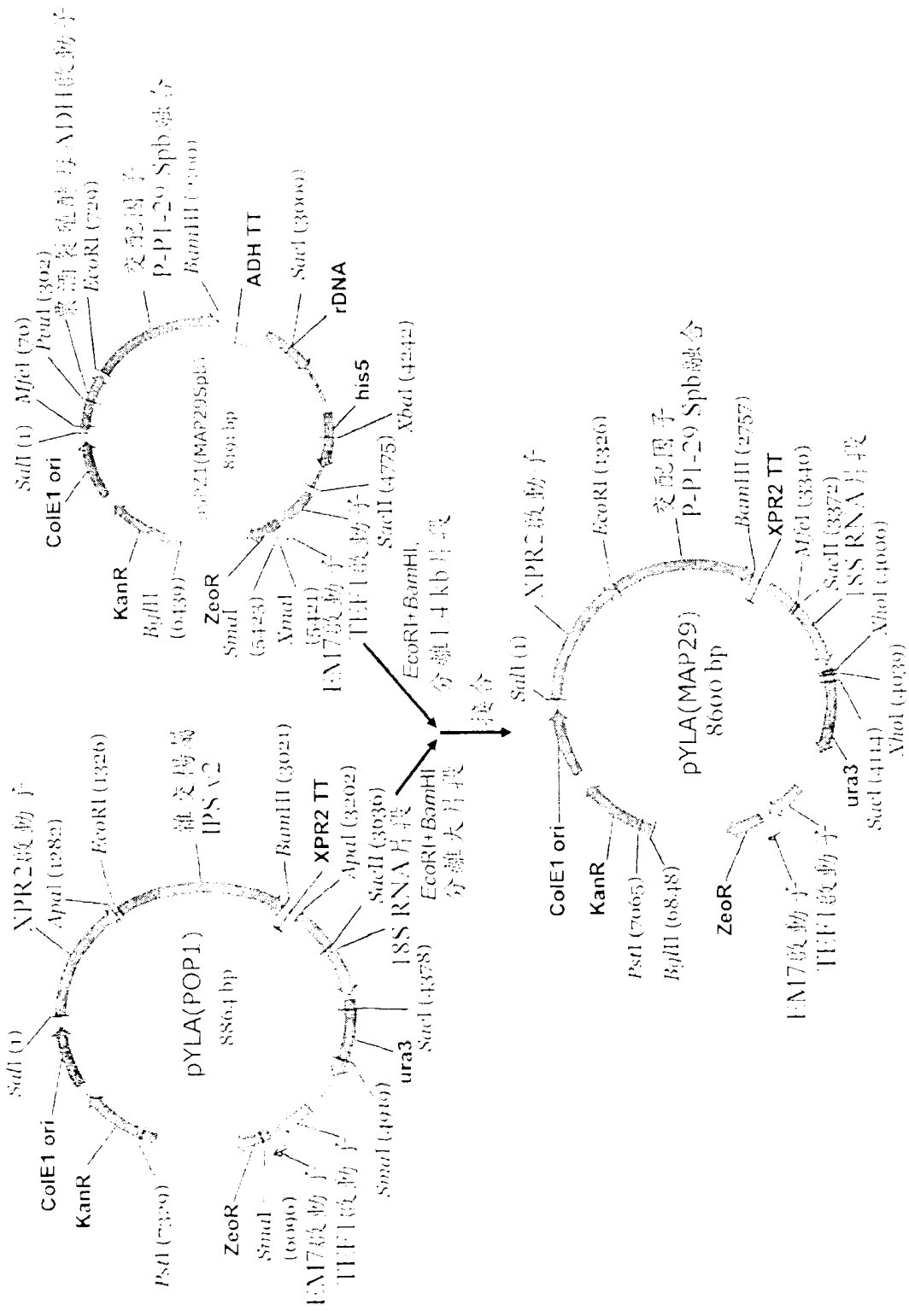

pYLA(POP1)
8864 bp
pYLA(MAP29)
8600 bp
XPR2啟動子
ApaI (1282)
EcoRI (1326)
基因體片段
IPS v2
BamII (3021)
XPR2 TT
ApaI (3202)
SacII (3636)
18S RNA片段
ura3
SacI (4378)
SmaI (4916)
EcoRI+BamHI
分離大片段
ZeoR
SmaI (6090)
EM7啟動子
TEF1啟動子
ColE1 ori
KanR
PstI (7329)
SalI (1)
EcoRI+BamHI,
分離1.4 kb片段
接合
SalI (1)
XPR2啟動子
EcoRI (1326)
質配圖子
P-P1-29 Spb融合
BamHI (2757)
XPR2 TT
MfeI (3340)
SacII (3372)
18S RNA片段
XhoI (4006)
SacI (4114)
XhoI (4039)
ura3
ZeoR
EM7啟動子
TEF1啟動子
ColE1 ori
KanR
PstI (7065)
BglII (6848)
SalI (1)
MfeI (70)
PmaI (302)
質配圖子
P-P1-29 Spb融合
EcoRI (729)
BamHI (1000)
ADH TT
SacI (3000)
rDNA
his5
XbaI (4242)
SacII (4775)
EM7啟動子
TEF1啟動子
ZeoR
SmaI (5423)
XmaI (5421)
KanR
BglII (6439)
ColE1 ori

圖18F

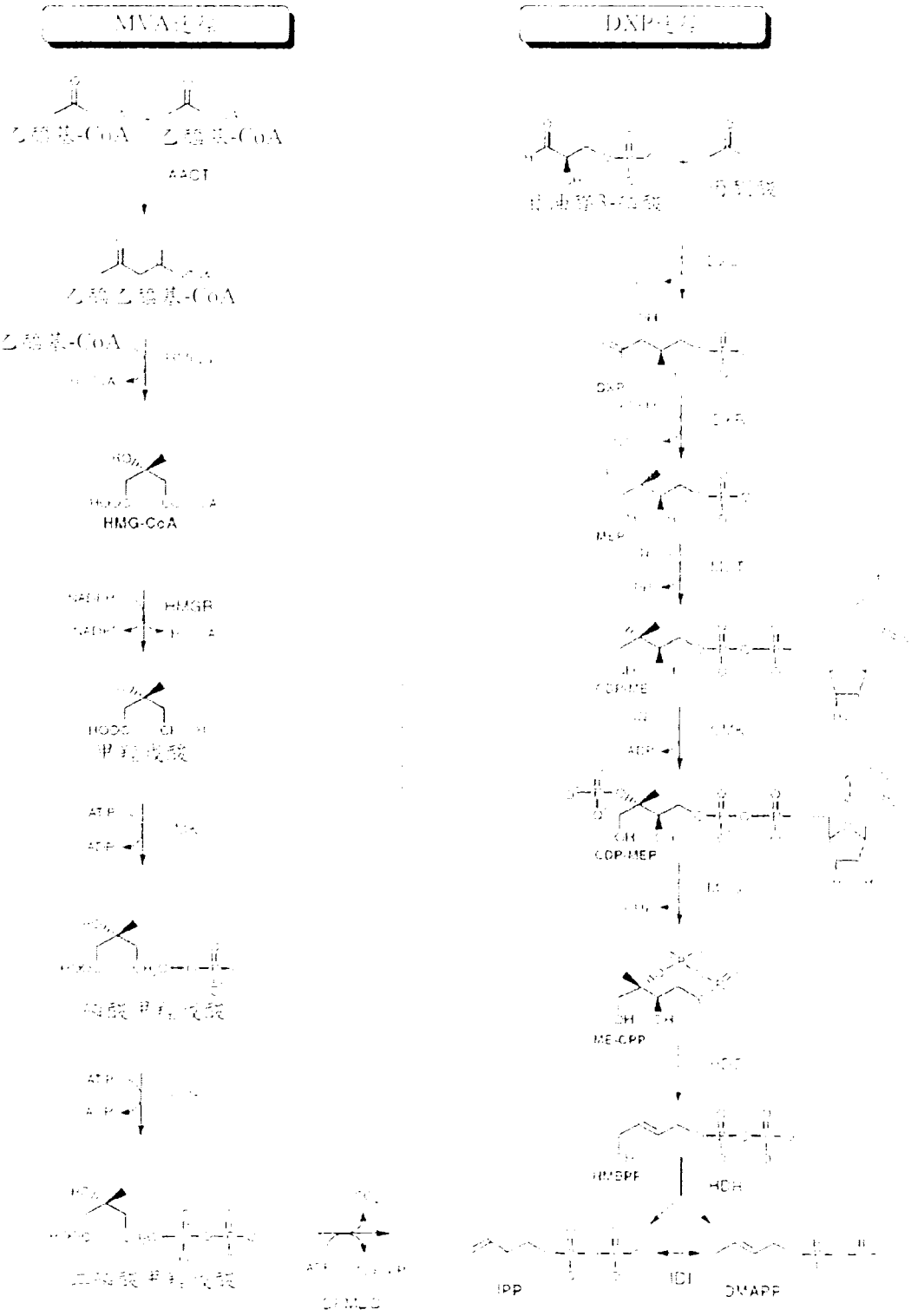

MVA-途徑
DXP-途徑
乙醯基-CoA
乙醯基-CoA
AACT
乙醯乙醯基-CoA
乙醯基-CoA
HMG-CoA
HMGR
甲羥戊酸
ATP
ADP
ATP
ADP
ATP
ATP
IPP
IDI
DMAPP
G3P
MEP
CDP-MEP
ME-CPP
HMBPP
HDR

圖19A

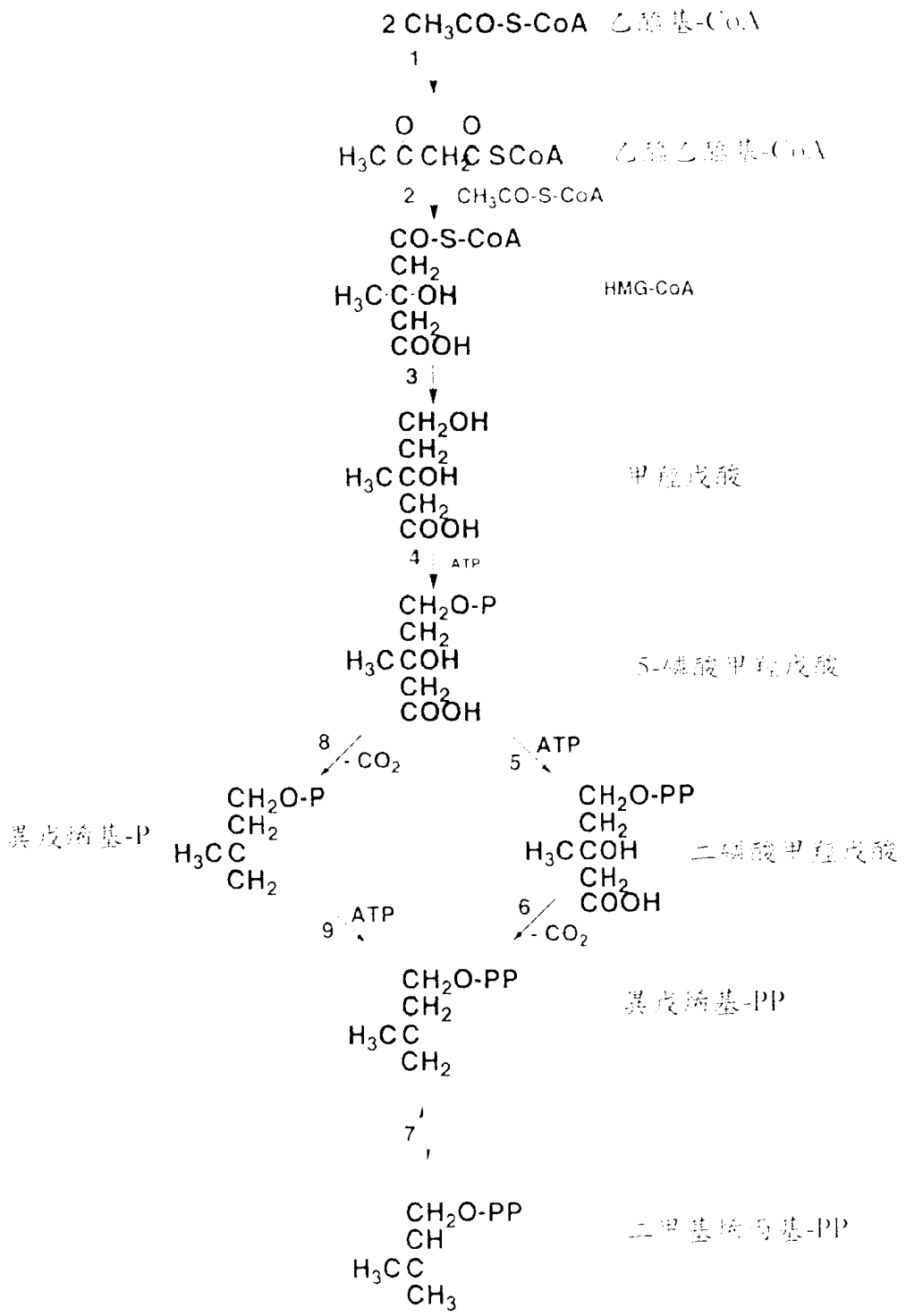

2 CH3CO-S-CoA 乙醯基-CoA
1
乙醯乙醯基-CoA
2 CH3CO-S-CoA
HMG-CoA
3
甲羥戊酸
4 ATP
5-磷酸甲羥戊酸
8 - CO2
5 ATP
異戊烯基-P
二磷酸甲羥戊酸
9 ATP
6 - CO2
異戊烯基-PP
7
二甲基烯丙基-PP

圖19B

圖20A

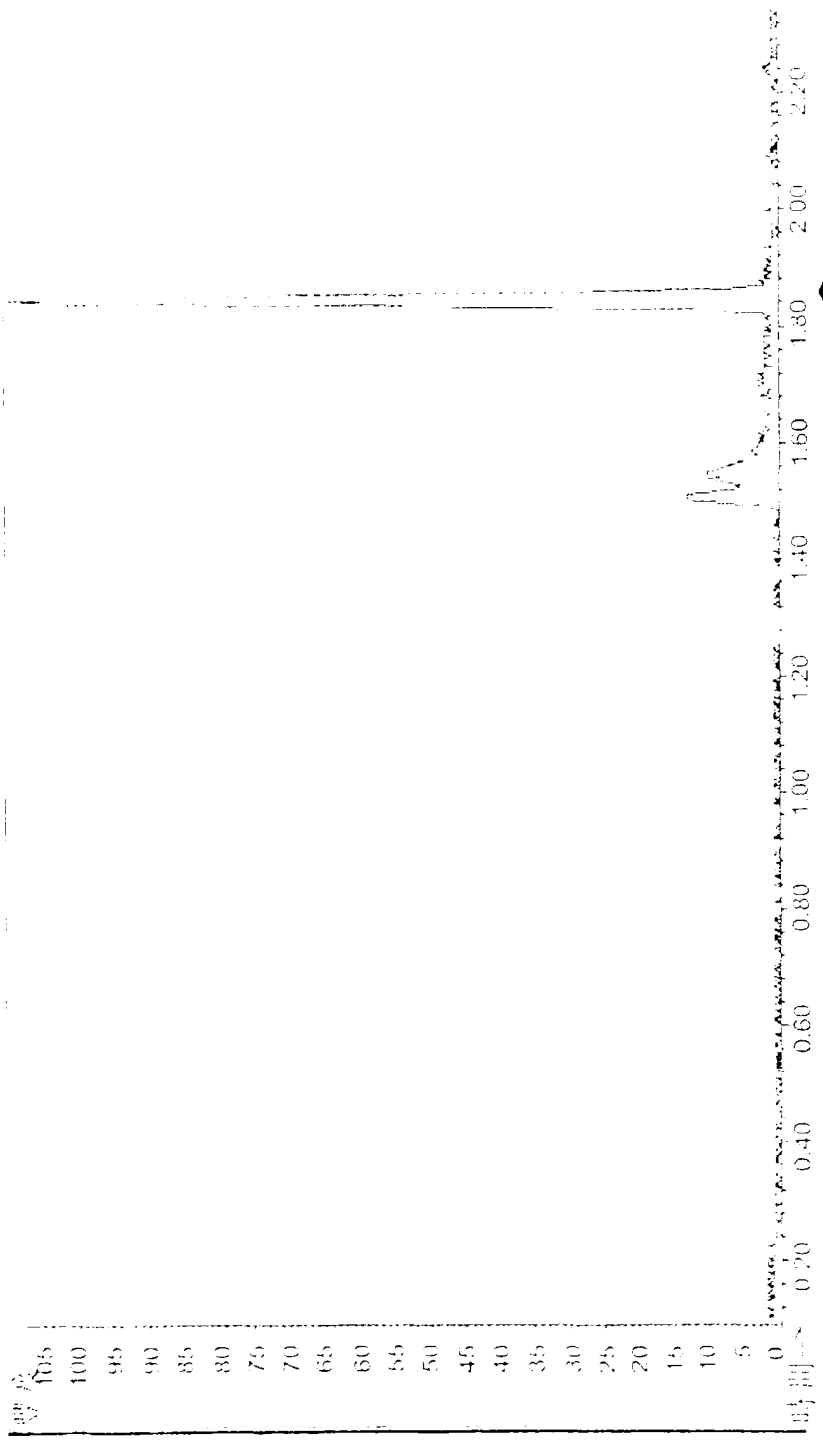

新陽菌K轉基 CLIB122:: pYLA(KZ1)
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1.60
1.80
2.00
2.20

圖20B

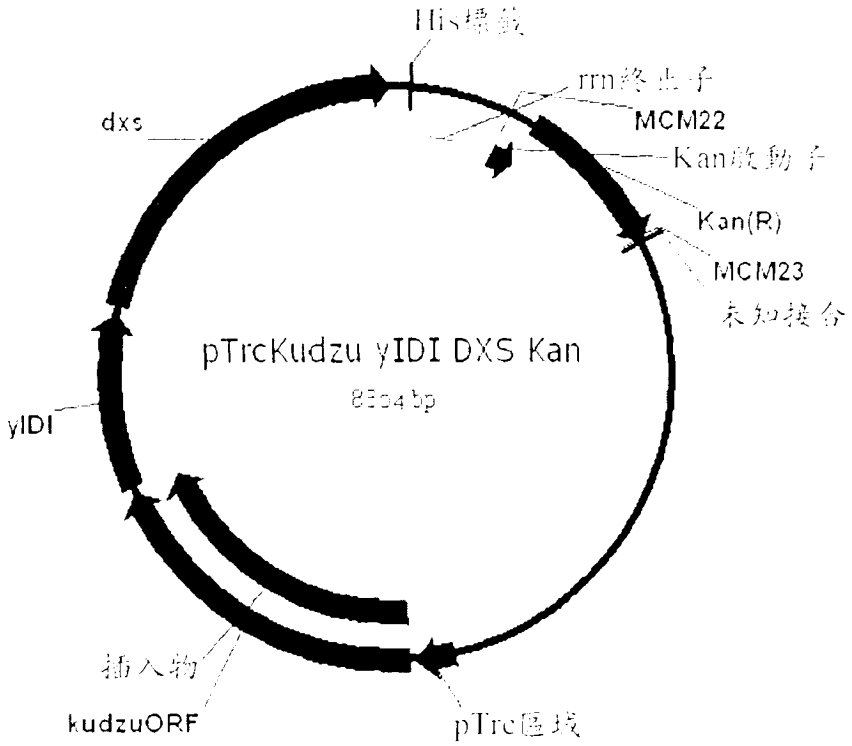

His標籤
rrn終止子
MCM22
Kan啟動子
Kan(R)
MCM23
未知接合
dxs
pTrcKudzu yIDI DXS Kan
8304 bp
yIDI
插入物
kudzuORF
pTrc區域

圖21

1-
gctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaa
tagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttg
gcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaa
acagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtg
aaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcat
caaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtga
acgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccgg
agggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctg
acggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatat
gtatccgcttaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagccctgcaaag
taaactggatggctttctcgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagctctgatcaaga
gacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgct
tgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccg
tgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttttgtcaagaccgacctgtccggtgccct
gaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgca
gctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggc
aggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcg
gcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgag
cgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcagg
ggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgt
cgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattc
atcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgata
ttgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcc
cgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgacatgaccaaaatccc
ttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttga
gatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtgg
tttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgca
gataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagca
ccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgt
gtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggg
gggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgt
gagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggca
gggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcc
tgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagc
ctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctc
acatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagc
tgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagag
cgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactc
tcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgac
tgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgc
tcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttc
accgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgca
tttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaaga

圖22A

gagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggt
gtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcggg
aaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggc
gggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaa
attgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtag
aacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgg
gctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaat
gttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttttctcccatg
aagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgtt
agcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcact
cgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaac
aaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagat
ggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggta
gtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacagg
attttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggt
gaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacg
caaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgac
tggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctggtttgaca
gcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggt
atggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctgga
taatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaat
taatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagc
gccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcac
tcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgat
taaataaggaggaataaaccatgtgtcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataa
ttcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggag
aacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgca
tgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgaccgatgtgcagcgcct
gggtctgacctacaaattttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggac
gaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagc
acggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcgg
tgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgag
ggtgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaag
aaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcg
tctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccag
ctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgc
aagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggattttgtacgcgaccg
cctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgc
aaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggca
ctctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacac
cctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctat
tctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaagctggcgtgaactgt
gcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagta
cctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttactttccgta

圖22B

tgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttcctgaccgacttccatggtctgg
tgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctgga
acgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaa
caggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcg
ttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttc
ccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatc
aaactgctgctgattgacccttttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgcatcgccctt
aggaggtaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacg
ccaaattagtgcaaaaccaaacacctgaagacattttggaagagtttcctgaaattattccatt
acaacaaagacctaatacccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgtttt
tctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacg
ataatgctattggtgccggtaccaagaaagtttgtcatttaatggaaaatattgaaaagggttt
actacatcgtgcattctccgtctttattttcaatgaacaaggtgaattacttttacaacaaaga
gccactgaaaaaataactttcccctgatcttttggactaacacatgctgctctcatccactatgta
ttgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattactgcggc
ggtgagaaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaaggggtaagttt
cacttttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatggggtgaacatgaaattg
attacatcctattttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatga
agttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttac
aagtttacgccttggttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtgtggagcaattag
atgacctttctgaagtggaaaatgacaggcaaaattcatagaatgctataacaacgcgtcctgca
ttcgccttaggaggtaaaaaaacatgagttttgatattgccaaataccccgaccctggcactgg
tcgactccacccaggagttacgactgttgccgaaagagagtttaccgaaactctgcgacgaact
gcgccgctatttactcgacagcgtgagccgttccagcgggcacttcgcctccgggctgggcacg
gtcgaactgaccgtggcgctgcactatgtctacaacaccccgtttgaccaattgatttgggatg
tggggcatcaggcttatccgcataaaattttgaccggacgccgcgacaaaatcggcaccatccg
tcagaaaggcggtctgcacccgttcccgtggcgcggcgaaagcgaatatgacgtattaagcgtc
gggcattcatcaacctccatcagtgccggaattggtattgcggttgctgccgaaaaagaaggca
aaaatcgccgcaccgtctgtgtcattggcgatggcgcgattaccgcaggcatggcgtttgaagc
gatgaatcacgcgggcgatatccgtcctgatatgctggtgattctcaacgacaatgaaatgtcg
atttccgaaaatgtcggcgcgctcaacaaccatctggcacagctgctttccggtaagctttact
cttcactgcgcgaaggcgggaaaaaagttttctctggcgtgccgccaattaaagagctgctcaa
acgcaccgaagaacatattaaaggcatggtagtgcctggcacgttgtttgaagagctgggctttt
aactacatcggcccggtggacggtcacgatgtgctggggcttatcaccacgctaaagaacatgc
gcgacctgaaaggcccgcagttcctgcatatcatgaccaaaaaaggtcgtggttatgaaccggc
agaaaaagacccgatcactttccacgccgtgcctaaatttgatccctccagcggttgtttgccg
aaaagtagcggcggtttgccgagctattcaaaaatctttggcgactggttgtgcgaaacggcag
cgaaagacaacaagctgatggcgattactccggcgatgcgtgaaggttccggcatggtcgagtt
ttcaccgtaaattcccggatcgctacttcgacgtggcaattgccgagcaacacgcggtgacctttt
gctgcgggtctggcgattggtgggtacaaacccattgtcgcgatttactccactttcctgcaac
gcgctatgatcaggtgctgcatgacgtggcgattcaaaagcttccggtcctgttcgccatcga
ccgcgcgggcattgttggtgctgacggtcaaacccatcagggtgcttttgatctcttaccctg
cgctgcataccggaaatggtcattatgaccctgagcgatgaaaacgaatgtcgccagatgctct
ataccggctatcactataacgatggcccgtcagcggtgcgctacccgcgtggcaacgcggtcgg

圖22C

cgtggaactgacgccgctggaaaaactaccaattggcaaaggcattgtgaagcgtaggtggcgag
aaactggcgatccttaactttggtacgctgatgccagaagcggcgaaagtcgccgaatcgctga
acgccacgctggtcgatatgcgtttttgtgaaaccgcttgatgaagcgttaattctggaaatggc
cgccagccatgaagcgctggtcaccgtagaagaaaacgccattatgggcggcgcaggcagcggc
gtgnacgaagtgctgatggcccatcgtaaaccagtacccgtgctgaacattggcctgccggact
tctttattccgcaaggaactcaggaagaaatgcgcgccgaactcggcctcgatgccgctggtat
ggaagccaaaatcaaggcctggctggcataactgca

SEQ ID NO:10

圖22D

pTrcKudzu kan
OD600
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0
1
2
3
4
5
誘導後の時数
◆ OD600
■ 培地中葛根素二糖苷生產力(μg/(L·OD))
● 培地中葛根素二糖苷生產力(μg/L)
25
20
15
10
5
0

圖23-1

pTrcKudzu ylDI kan
OD600
誘導後小時數
OD600
相對生產力(烷氧化合物頂部空間氣體/OD)
相對生產力(烷氧化合物頂部空間氣體/(OD-1))

圖23B

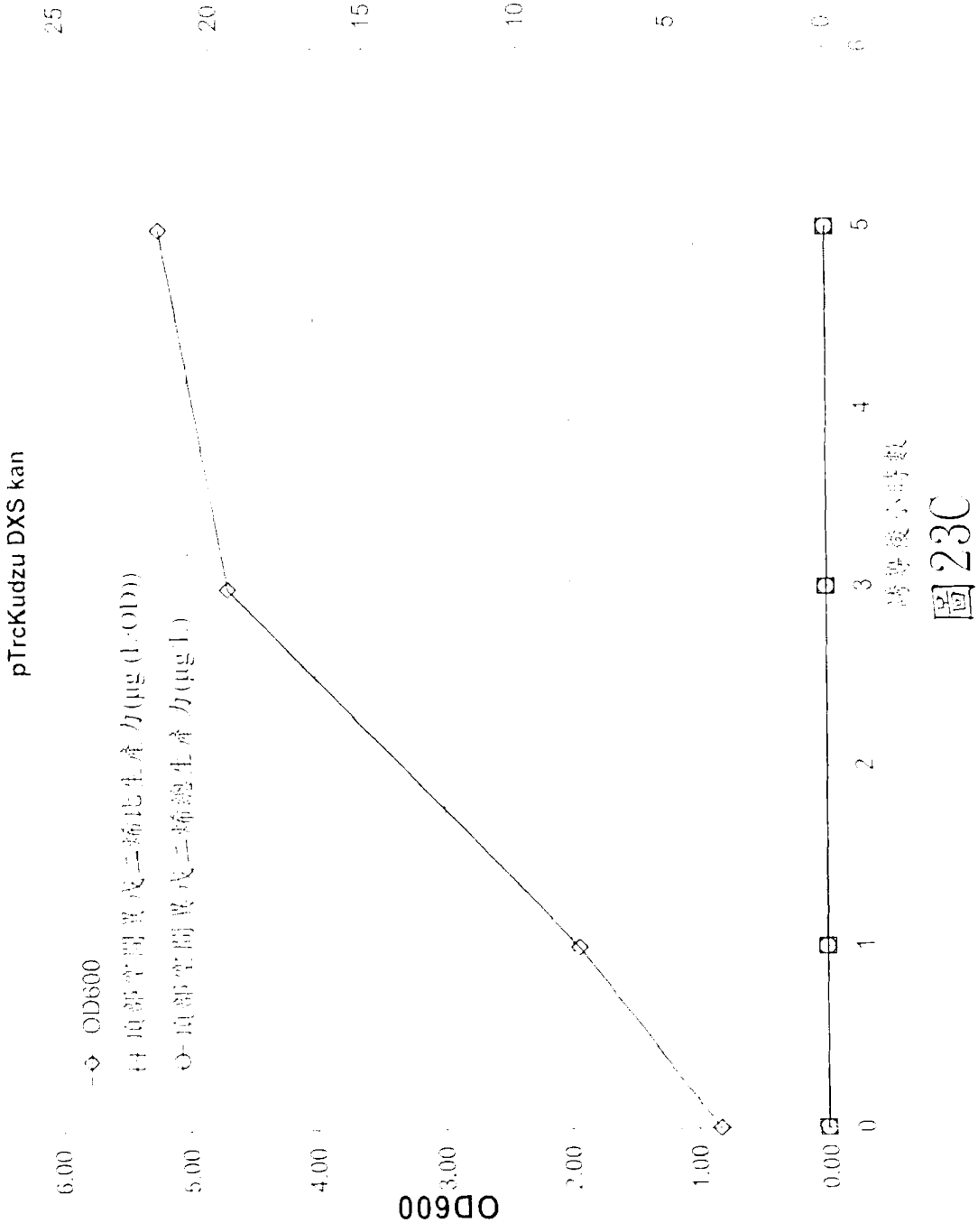

pTrcKudzu DXS kan
OD600
總生產力(微克/公升頂部空間氣體)或
比生產力(微克/(公升頂部空間氣體×OD))
誘導後小時數

圖 23C

pTrcKudzu yIDI DXS kan
OD600
誘導後小時數
OD600
頂部空間異戊二烯生產力(ug/(L*OD))
頂部空間異戊二烯生產力(ug/L)

圖23D

pCL PtrcKudzu
OD600
誘導後小時數
總生產力(微克/公升頂部空間氣體)或
比生產力(微克/(公升頂部空間氣體×OD))
◇—OD600
□—總葛鬱異戊二烯比生產力
((μg/(l·OD)))
○—總葛鬱異戊二烯總生產力(μg/l)

圖23E

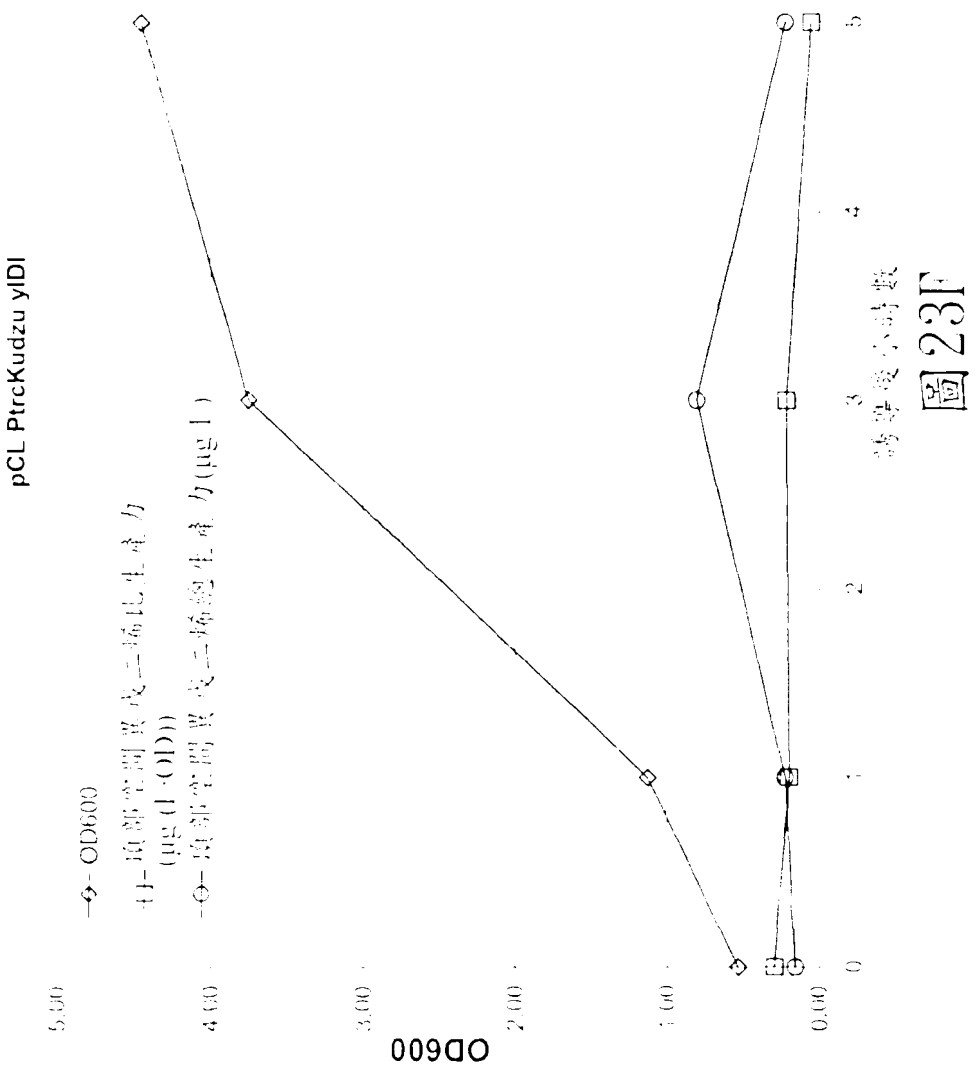

pCL PtrcKudzu ylDI
OD600
-◇- OD600
-□- 葛根素異戊二烯比生產力 (mg/L/OD)
-○- 葛根素異戊二烯總生產力(mg/L)
時間(小時)
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
0
1
2
3
4
5
0
5
10
15
20
25

圖23F

pCL PtrcKudzu DXS
◇ OD600
-□- 頂部空間異戊二烯比生產力(μg/(L·OD))
-○- 頂部空間異戊二烯總生產力(μg/L)
OD600
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0
1
2
3
4
5
培養後小時數
總生產力(微克/公升頂部空間氣體)處
比生產力(微克/(公升頂部空間氣體×OD))
25
20
15
10
5
0

圖 23G

OD600
0.10
1.00
10.00
0
1.20
2.20
3.20
4.20
6.00
時間（時）
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
總生產力(微克/公升頂部空間氣體)或
比生產力(微克/(公升頂部空間氣體·OD))

圖2311

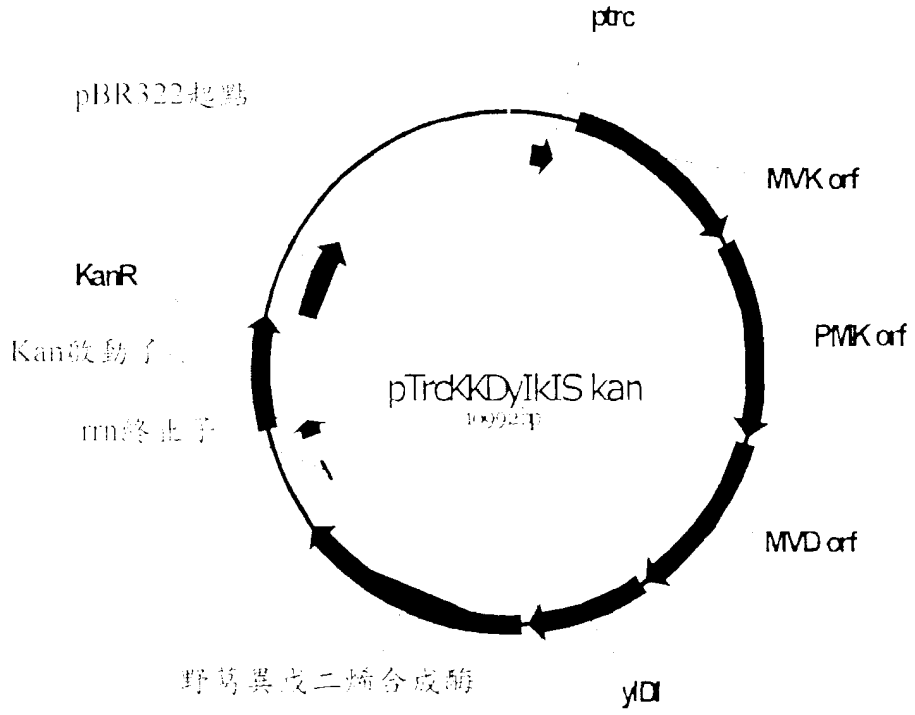

ptrc
pBR322起點
MVK orf
KanR
PMK orf
pTrcKKDyIkIS kan
rrn終止子
MVD orf
野芮異戊二烯合成酶
yIDI

圖24

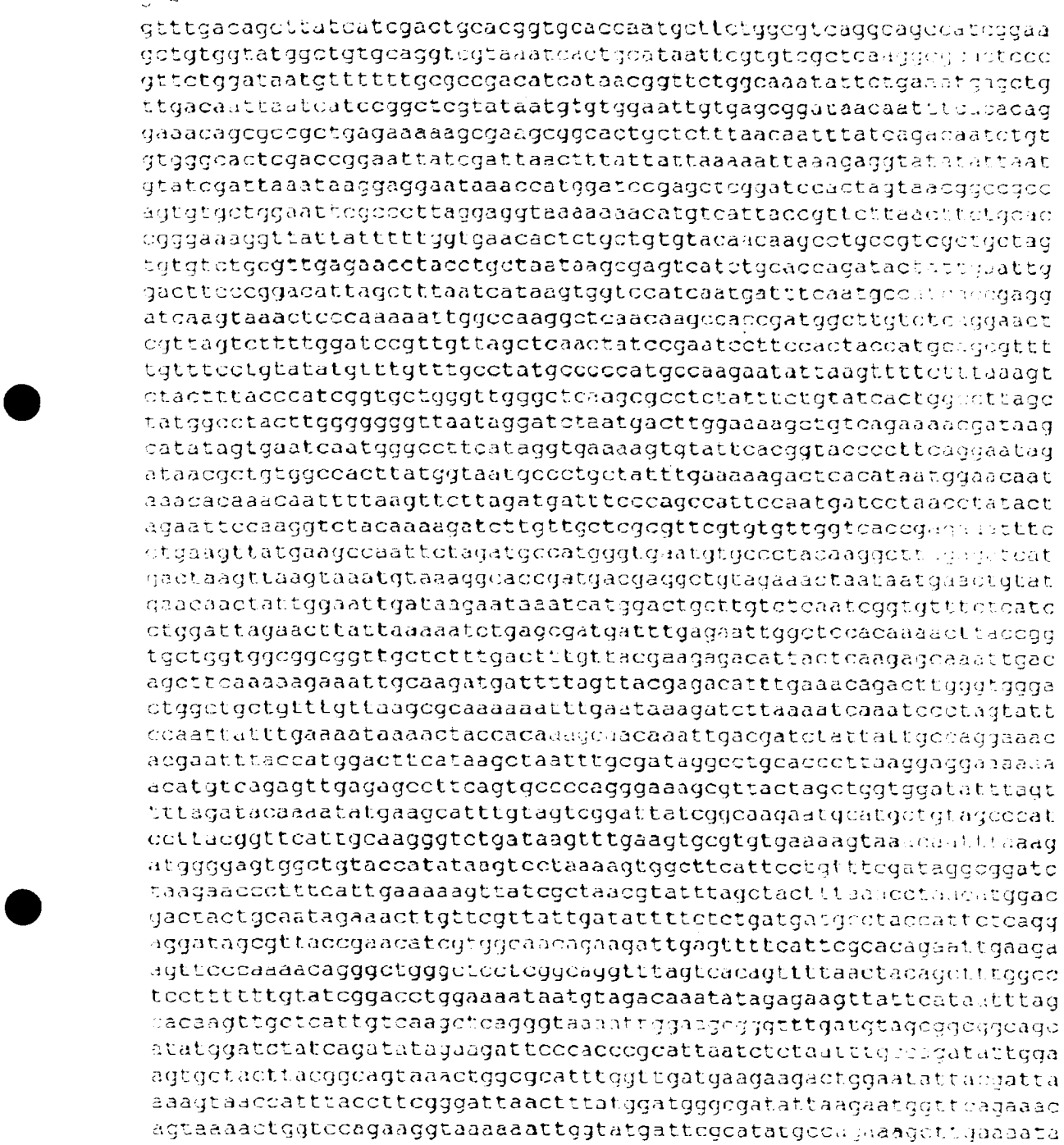


圖25A

tatacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatcgcttac
acgagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtctcttgagaggaatgactgtacctg
tcaaaagtatcctgaaatcacagaagttagagatgcagttgccacaattagacgttcctttaga
aaaataactaaagaatctggtgccgatatcgaacctcccgtacaaactagcttattggatgatt
gccagagcttaaaaggagttcttacttgcttaatacctggtgctggtggttatgacgccatttgc
agtgatttactaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaatgacaaaagatttttctaag
gttcaatggctggatgtaactcaggctgactggggtgttaggaaagaaaaagatccggaaacttt
atcttgataaataacttaaggtagctgcatgcagaattcgcccttaaggaggaaaaaaaaatga
ccgtttacacagcatccgttaccgcacccgtcaacatcgcaacccttaagtattgggggaaaag
ggacacgaagttgaatctgcccaccaattcgtccatatcagtgactttatcgcaagatgacctc
agaacgttgacctctgcggctactgcacctgagtttgaacgcgacactttgtggttaaatggag
aaccacacagcatcgacaatgaaagaactcaaaattgtctgcgcgacctacgccaattaagaaa
ggaaatggaatcgaaggacgcctcattgcccacattatctcaatggaaactccacattgtctcc
gaaaataacttttcctacagcagctggtttagcttcctccgctgctggctttgctgcattggtct
ctgcaattgctaagttataccaattaccacagtcaacttcagaaatatctagaatagcaagaaa
ggggtctggttcagcttgtagatcgttgtttggcggatacgtggcctgggaaatgggaaaagct
gaagatggtcatgattccatggcagtacaaatcgcagacagctctgactggcctcagatgaaag
cttgtgtcctagttgtcagcgatattaaaaaggatgtgagttccactcagggtatgcaattgac
cgtggcaacctccgaactatttaaagaaagaattgaacatgtcgtaccaaagagatttgaagtc
atgcgtaaagccattgttgaaaaagatttcgccacctttgcaaaggaaacaatgatggattcca
actctttccatgccacatgtttggactctttcctccaatattctacatgaatgacacttccaa
gcgtatcatcagttggtgccacaccattaatcagttttacggagaaacaatcgttgcatacacg
tttgatgcaggtccaaatgctgtgttgtactacttagctgaaaatgagtcgaaactctttgcat
ttatctataaattgtttggctctgttcctggatgggacaagaaatttactactgagcagcttga
ggctttcaaccatcaatttgaatcatctaactttactgcacgtgaattggatcttgagttgcaa
aaggatgttgccagagtgattttaactcaagtcggttcaggcccacaagaaacaaacgaatctt
tgattgacgcaaagactggtctaccaaaggaataagatcaattcgctgccatcgcccttaggagg
taaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacgccaaat
tagtgcaaaaccaaacacctgaagacattttggaagagtttcctgaaattattccattacaaca
aagacctaatacccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgtttttctggt
catgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacgataatg
ctattggtgccggtaccaagaaagtttgtcatttaatggaaaatattgaaaagggtttactaca
tcgtgcatttccgtctttatttttcaatgaacaaggtgaattacttttacaacaaagagccact
gaaaaaataactttcccctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatg
acgaattaggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattactgcggcggtgag
aaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagggqtaagtttcacttt
ttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatggggtgaacatgaaattgattaca
tcctatttttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttag
agacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagttt
acgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgacc
tttctgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataacaacgcgtcctgcattggcc
cttaggaggtaaaaaaacatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataatt
cccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatcccctggagaa
cgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatg

圖25B

atcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgg
gtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacga
aaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctggtcagcac
ggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggttcagcggtg
aactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgaggg
tgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaa
ggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcccagcgtc
tgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagct
gctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaa
gatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggattttgtacgcgaccgcc
tgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaa
agctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcact
ctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccc
tgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattc
tattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgc
aaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacc
tggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttactttccgtatg
ccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtg
cgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaac
gtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaaca
ggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgtt
agcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttccc
actgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaa
actgctgctgattgacccttttccgattaaccagctgatgtatgtctaactgcagctggtacca
tatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtc
gaccatcatcatcatcattgagtttaacggtctccagcttggctgttttggcggatgaga
gaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttg
cctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgta
gcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaac
gaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcct
gagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgg
gcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcc
tttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctt
catgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattca
acatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcaccca
gaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaac
tggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgag
cacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactc
ggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatc
ttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgc
ggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatg
ggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacg
agcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaact
acttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggacca
cttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtg
ggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatcta
cacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctca
ctgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaac
ttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatccc
ttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttga
gatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggt
ttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcag
ataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcac
cgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtg
tcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggg
ggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtg
agctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcag
ggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcct
gtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcc
tatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctca
catgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagct
gataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagc
gcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactct
cagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgac
gcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggga
gctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctc
atcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagt
ttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgcgccgtcgtcgtcagatcatta
acccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccatttatacccatataaatca
gcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataa
caccccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgatatatttttatc
ttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctttcccccccccccattattgaa
gcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaaca
aatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatca
tgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatga
cggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgcc
gggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaact
atgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatg
cgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggg
cgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgat
taagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagct
tgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggccgtcgt
tttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccc
cctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgca
gcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcaca
ccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactc
cgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgcc
ctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgc
atgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcag
cgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctc
cagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacccgtac
ctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccat
gttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccct
tgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgatatatttttatcttgtgca
atgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctttcccccccccccattattgaagcattta
tcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggt
tccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaa
cctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaa
cctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcaga
caagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcat
cagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggag
aaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtg
cgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttggg
taacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcct
gcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacg
tcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgcc
agctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatg
gcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatg
gtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaaca
cccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccg
tctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcg
gtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagc
tcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcag
atcattacccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccatttatacccatat
aaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggc
tcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgatatatt
tttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctttcccccccccccatt
attgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaa
taaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccatta
ttatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcgg
tgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcg
gatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggc
ttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgca
cagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgg
gaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaa
ggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgc
caagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggc
cgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagca
catccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagt
tgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtat
ttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccc
cgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttaca
gacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacg
cgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgt
tcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcag
cgccgtcgtcgtcagatcattacccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcc
catttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgttt
cccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgt
tcatgatgatatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctt
tcccccccccccattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttga
atgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacg
tctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcg
tctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcaca
gcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcg
ggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcg
gtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcagg
ctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaag
ggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaa
aacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgag
ctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaactt
aatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatc
gcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttac
gcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgca
tagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcc
cggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcacc
gtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattca
cagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggc
ttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacccgtacctgaagatgaaggatagatc
accgatacgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcc
tcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagc
agacagttttattgttcatgatgatatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttga
gacacaacgtggctttcccccccccccattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgag
cggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaa
aagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtat
cacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctc
ccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgt
cagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgag
agtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgc
cattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattac
gccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttccca
gtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagagga
tccccgggtaccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccct
ggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaag
aggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcg
gtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatc
tgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgac
gggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtg
tcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtgg
tcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaa
gcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacccgtacctgaa
gatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttgg
aatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtatt
actgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgatatatttttatcttgtgcaatgtaa
catcagagattttgagacacaacgtggctttcccccccccccattattgaagcatttatcaggg
ttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgc
gcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctat
aaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctct
gacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagc
ccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagag
cagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaat
accgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggc
ctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacg
ccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcagg
tcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtg
actgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctg
gcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaa
tggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgca
ctctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgc
tgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctcc
gggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaa
gctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgtt
gagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcat
tacccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccatttatacccatataaatc
agcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcata
acaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgatatatttttat
cttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctttcccccccccccattattga
agcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaac
aaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatc
atgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatg
acggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgc
cgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaac
tatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagat
gcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagg
gcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcga
ttaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagc
ttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggccgtcg
ttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatcc
ccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgc
agcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcac
accgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgaca
cccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaa
gctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcga
ggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatc
cgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgccg
tcgtcgtcagatcattacccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccattt
atacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgt
tgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatg
atgatatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctttcccc
ccccccattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtat
ttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaag
aaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgc
gcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgt
ctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtc
ggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtga
aataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgc
aactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggat
gtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgac
ggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaa
ttcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgc
cttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgccctt
cccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatct
gtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagtta
agccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcat
ccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatc
accgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatg
tctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctga
taggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgat
acgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagc
aagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacag
ttttattgttcatgatgatatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacaca
acgtggctttcccccccccccattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggata
catatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgc
cacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgag
gccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggag
acggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgg
gtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgca
ccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcg
ccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagc
tggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacg
acgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatcccc
gggtaccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgt
tacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcc
cgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatt
ttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctc
tgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggct
tgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcaga
ggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtg
aagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgtt
aatgtctggcttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacccgtacctgaagatga
aggatagatcaccgatacgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaattt
aatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgt
ttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgatatatttttatcttgtgcaatgtaacatca
gagattttgagacacaacgtggctttcccccccccccattattgaagcatttatcagggttatt
gtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcaca
tttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaa
ataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgaca
catgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgt
cagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcaga
ttgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccg
catcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctct
tcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccag
ggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcga
ctctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactg
ggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgt
aatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggc
gcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactct
cagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgac
gcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggga
gctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctc
atcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagt
ttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacc
cgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccatttatacccatataaatcagca
tccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacac
cccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgatatatttttatcttg
tgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctttcccccccccccattattgaagca
tttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaat
agggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatga
cattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacgg
tgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccggg
agcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatg
cggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgt
aaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcga
tcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaa
gttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgc
atgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggccgtcgtttt
acaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccct
ttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcc
tgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccg
catatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccg
ccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctg
tgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggca
gctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcg
tccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataggcgcagcgccgtcgt
cgtcagatcattacccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgcgagcccatttatac
ccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaa
tatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatga
tatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggctttcccccccc
ccattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttag
aaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaac
cattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgt
ttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgt
aagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcgggg
ctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaata
ccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaact
gttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgc
tgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggcc
agtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattca
ctggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttg
cagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttccca
acagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgc
ggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagcc
agccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgc
ttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccg
aaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctg
cctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgatagg
cgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacccgtacctgaagatgaaggatagatcaccgatacgc
gagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaaga
cgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagtttt
attgttcatgatgatatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgt
ggctttcccccccccccattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacata
tttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacc
tgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccc
tttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgg
tcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgt
tggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccat
atgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccat
tcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggc
gaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgt
tgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggta
ccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccc
aacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcac
cgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctc
cttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatg
ccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtct
gctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttt
tcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcg
attcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgt
ctggcttctgataggcgcagcgccgtcgtcgtcagatcattacccgtacctgaagatgaaggat
agatcaccgatacgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcg
cggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatg
taagcagacagttttattgttcatgatgatatatttttatcttgtgcaatgtaacatcagagat
tttgagacacaacgtggctttcccccccccccattattgaagcatttatcagggttattgtctc
atgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttcc
ccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaatagg
cgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgc
agctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcaggg
cgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgta
ctgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatca
ggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcg

ggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtg
gccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaaga
gcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcag
cgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgacgcatgaccaaaatcccttaacgtg
agtttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttt
ttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttg
ccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaa
atactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctac
atacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttacc
gggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgt
gcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatg
agaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcgga
acaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggt
ttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaa
aaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttc
tttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgatacgg
ctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgat
gcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtaca
atctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcat
ggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggca
tccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcat
caccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgtt
gacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaat
tcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctctta
tcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtg
gaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaac
agtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgc
ggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagc
ggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatca
ttaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggc
gttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacggt
acgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcc
cattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatca
aattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatg
caaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgg
gcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatcggtagtgggata
cgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgc
ctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggca
atcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgc
ctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagc
gggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

SEQ ID NO 11

圖25D

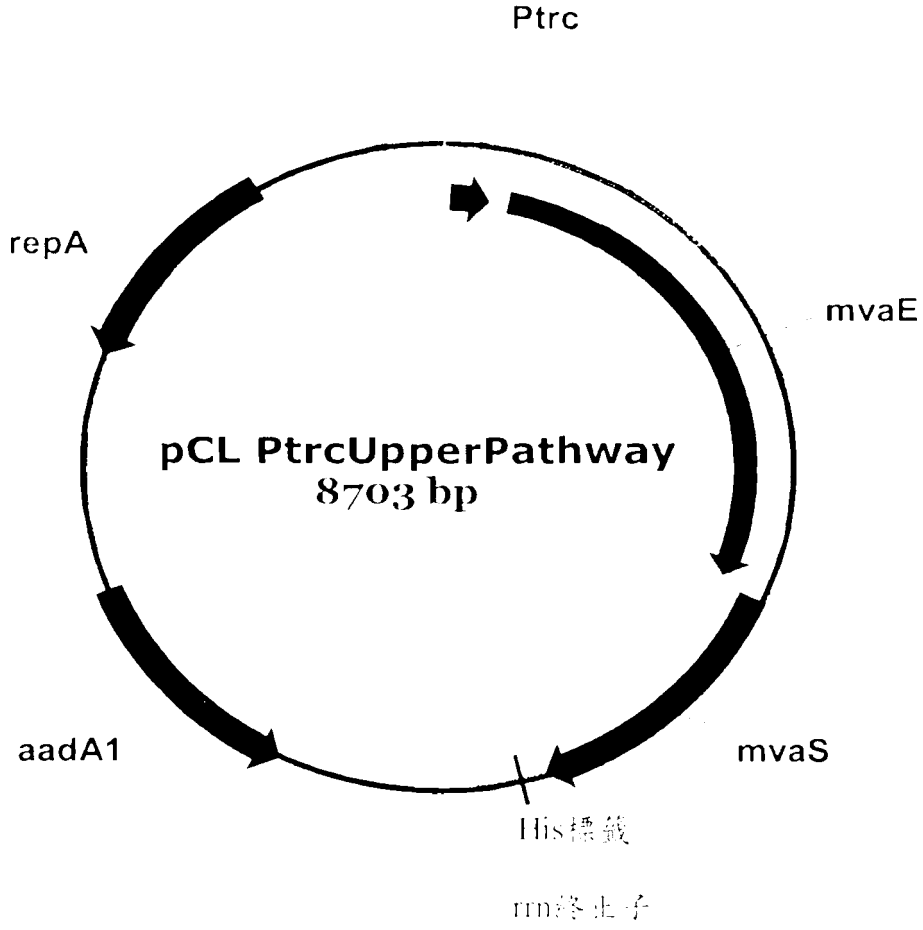

Ptrc
repA
mvaE
pCL PtrcUpperPathway
8703 bp
aadA1
mvaS
His標籤
rrnB終止子

圖26

5'-
cccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgtt
gacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacagga
aacagctatgaccatgattacgaattcgagctcggtacccgggaatttatcgattaactttatt
gggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgt
atcgattaaataaggaggaataaaccatggatccgagctcaggaggtaaaaaaacatgaaaaca
gtagttattattgatgcattacgaacaccaattggaaaatataaaggcagcttaagtcaagtaa
gtgccgtagacttaggaacacatgttacaacacaacttttaaaaagacattccactatttctga
agaaattgatcaagtaatctttggaaatgttttacaagctggaaatggccaaaatcccgcacga
caaatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaattcccgcaatgacggttaatgaggtctgcg
gatcaggaatgaaggccgttattttggcgaaacaattgattcaattaggagaagcggaagtttt
aattgctggcgggattgagaatatgtcccaagcacctaaattacaacgttttaattacgaaaca
gaaagctacgatgcgccttttttctagtatgatgtatgatggattaacggatgcctttagtggtc
aggcaatgggcttaactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaaga
tcaatttttctgtacattcacaattaaaagcagctcaagcacaagcagaagggatattcgctgac
gaaatagcccattagaagtatcaggaacgcttgtggagaaagatgaagggattcgccctaatt
cgagcgttgagaaagctaggaacgcttaaaacagttttaaagaagacggtactgtaacagcagg
gaatgcatcaaccattaatgatgggcttctgctttgattattgcttcacaagaatatgccgaa
gcacacggtcttcctttatttagctattattcgagacagtgtggaagtcggtattgatccagcct
atatgggaattttgccgattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaacttactacgga
agaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgcagcaacttcaatcgtggtccaaagagaa
ctggctttaccagaggaaaaggtcaacatttatggtggcggtatttcattaggtcatgcgattg
gtgccacaggtgctcgtttattaacgagtttaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaata
tggagtggcttctttatgtatcggcggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcag
caaaaaaaaaacagccgatttttatcaaatgagtcctgaggaacgcctggcttctcttcttaatg
aaggccagatttctgctgatacaaaaaaagaatttgaaaatacggctttatcttcgcagattgc
caatcatatgattgaaaatcaaatcagtgaaacagaagtgccgatgggcgttggcttacatttta
acagtggacgaaactgattatttggtaccaatggcgacagaagagccctcagttattgcggctt
tgagtaatggtgcaaaaatagcacaaggatttaaaacagtgaatcaacaacgcttaatgcgtgg
acaaatcgttttttacgatgttgcagatcccgagtcattgattgataaactacaagtaagagaa
gcggaagtttttcaacaagcagagttaagttatccatctatcgttaaacgggcggcggcttaa
gagatttgcaatatcgtacttttgatgaatcatttgtatctgtcgacttttagtagatgttaa
ggatgcaatggggcaaatatcgttaacgctatgttggaaggtgtggccgagttgttccgtgaa
tggtttgcggagcaaaagattttattcagtattttaagtaattatgccacggagtcggttgtta
cgatgaaaacggctattccagtttcacgtttaagtaaggggagcaatggccgggaaattgctga
aaaaattgttttagcttcacgctatgcttcattagatccttatcgggcagtcacgcataacaaa
ggaatcatgaatggcattgaagctgtagttttagctacaggaaatgatacacgcgctgttagcg
cttcttgtcatgcttttgcggtgaaggaaggtcgctaccaaggcttgactagttggacgctgga
tggcgaacaactaattggtgaaatttcagttccgcttgctttagccacggttggcggtgccaca
aaagtcttacctaaatctcaagcagctgctgatttgttagcagtgacggatgcaaaagaactaa
gtcgaggtagtagcggctgttggtttggcacaaaatttagcggcgttacgggccttagtctctga
aggaatttcaaaaaggacacatggctctacaagcacgttctttagcgatgacggtcggagctact
ggtaaagaagttgaggcagtcgctcaacaattaaaaagtccaaaaaaacgatgaatccaagacgag
ccatggcttattttaaatgatttangaaaacaataaaggaggtaaaaaaaacatgacaatttgggat

圖27A

tgataaaattagttttttgtgccccttattatattgatatgacggcactggctgaaggcaga
aatgtagaccctggaaaatttcatattggtattgggcaagaccaaatggcggtgaaccaatca
gccaagatattgtgacatttgcagccaatgccgcagaagcgatcttgaccaaagaagataaaga
ggccattgatatggtgattgtcgggactgagtccagtatcgatgagtcaaaagcggccgcagtt
gtcttacatcgtttaatgggattcaacctttcgctcgctcttttcgaaatcaaggaagcttgtt
acggagcaacagcaggcttacagttagctaagaatcacgtagccttacatccagatcaaaaaagt
cttggtcgtagcggcagatattgcaaaatatggcttaaattctggcggtgagcctacacaagga
gctgggcggttgcaatgttagttgctagtgaaccgcgcatttggctttaaaagaggataatg
tgatgctgacgcaagatatctatgacttttggcgtccaacaggccaccgtatcctatggtcga
tggtcctttgtcaaacgaaacctacatccaatcttttgcccaagtctgggatgaacataaaaaa
cgaacggtcttgattttgcagattatgatgctttagcgttccatattccttacacaaaaatgg
gcaaaaaagccttattagcaaaaatctccgaccaaactgaagcagaacaggaacgaattttagc
ccgttatgaagaaagtatcgtctatagtcgtcgcgtaggaaacttgtatacgggttcactttat
ctgggactcatttccctttagaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatcaaattggtttat
tcagttatggttctggtgctgtcgctgaatttttcactggtgaattagtagctggttatcaaaa
tcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaactttctatcgctgaa
tatgaagccatgtttgcagaaactttagacacagacattgatcaaacgttagaagatgaattaa
aatatagtatttctgctattaataataccgttcgttcttatcgaaactaagagatctgcagctg
gtaccatatgggaattcgaagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaata
gcgccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggc
ggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaac
agaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaa
acgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatca
aataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaac
gctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggag
ggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgac
ggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgt
atccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatctggcgtaatagcgaagaggcc
cgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatt
ttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctc
tgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagcc
ctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagc
cagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaa
agcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagt
taagccgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactacctt
ggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcga
tcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggca
ggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgattttgccggttactgcgctgta
ccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttc
catagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagtt
cctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcttttgtcagcaagatagccag
atccaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctcca
aattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtga
cttctacagcgcggagaatctcgctctctccagggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgat

圖27B

caaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactg
tgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcga
gatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttc
cctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccat
aacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagactgta
ccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttc
ggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaa
caggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaacct
tgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctc
cacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctg
ccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccgg
atgaagtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgta
tggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcac
ggcacgatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagct
tggcacccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacgggttttgctgcccgcaaacgggct
gttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgccggctgaa
agcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggaggcgtcactggctcccgtgt
tgtcggcagctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttga
gctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcac
ctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagc
tttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccgttttcatct
gtgcatatggacagttttcccttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgtta
gtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagcca
gtatgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcata
cttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaa
gcatcgtgtagtgtttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggta
ttttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatc
tagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcata
ttgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaact
catggtagttatttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctatatttgc
cttgtgagttttcttttgtgttagttctttttaataccactcataaatcctcatagagtatttg
ttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataag
gcaatatctcttcactaaaaactaattctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtcca
ctggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctct
ctggttgctttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtatt
ggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggttttcaatcgtggggttgaglag
tgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagt
tcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcac
tataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttcctttgagttgtgggtat
ctgtaaattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattcc
gctagaccttttgtgtgttttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaag
aataaaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactactttagtcagttcc
gcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccct
aaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattcctttgtctccgacc

圖27C

Atcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcag
tgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataat
acaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatc
tgacttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtctgaccacttcggattatcc
cgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta

(SEQ ID NO:121)

圖27D

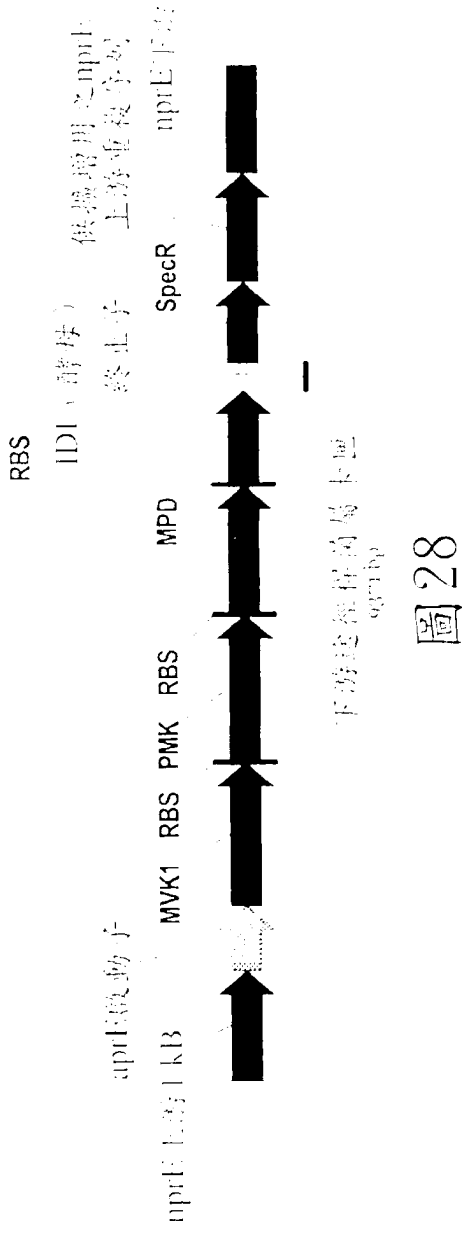


圖 28

5'
tgtaacctttgctttcaaatgagtagaaataatgcacatccatgtttgtatcgtgcaaataaag
tgtttcatccgtaggaaaaaatgactttagtatctgttccgctttttctgatgaaatgtgctcc
ccgacaaaattgaatgaatcatggacatttgctggctttgatacagcgaaagcagccgttccta
tgttatcatatcggatttcaacagcaggacaaaaaacaccatgacagccatcgtcacccacttatt
caacacgcacataaacctttcctgacttttggaacagatgatagctcatcaaaaatcccgccatt
gccaaataaatcgtatatggcattactgcaccataatcttttgagatttgattgggatatggcg
caagcagcaagacaagcagtccgataatcagcgtataaaataagcctagtaagatcttatccgt
tctccaatacagcttgaaaaacactacattcaacgcaatgggaagagtgatgatgaaaaacaga
aacacgaatgcaatcggctccatcccatccgggtattcttccaatacgaaaagaaactaaaaa
tcatttgtacgatcggcaaactgacaacagcaaggtcgaacgtataaaacttaccctttccgcc
atgatcacgcggcatcagcatatagtgaaaagccgtcagcagcacatatccgtataacaaaaaa
tgcagcagcggcagcagttcttttccgtcctctcttaagtaagcgctggtgaagtttgttgatt
gcacctggtgaataagttcaacagacactcccgccagcagcacaatccgcaatataacacccgc
caagaacattgtgcgctgccggtttattttgggatgatgcaccaaaagatataagcccgccaga
acaacaattgaccattgaatcagcagggtgctttgtctgcttaatataaaataacgttcgaaat
gcaatacataatgactgaataactccaacacgaacaacaactccatttttcttctgctatcaaaa
taacagactcgtgattttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgccccttgcaaatcggatgc
ctgtcctataaaattcccgatattggttaaacagcggcgcaatggcggccgcatctgatgtctttt
gcttggcgaatgttcatcttatttcttcctccctctcaataatttttttcattctatccctttttc
tgtaaagtttatttttcagaatacttttatcatcatgctttgaaaaaatatcacgataatatcc
attgttctcacggaagcacacgcaggtcatttgaacgaatttttttcgacaggaatttgccgggg
atcaggagcatttaacctaaaaaagcatgacatttcagcaaaatgaaacatttaacctatgcctat
ttttcgttcttttctgtatgaaaaragttatttcgagtctctacggaaatagcgagagatgatat
acctaaatagagataaaatcatctcaaaaaaatgggtctactaaaatattattccatctatttac
aataaattcacagaatagtcttttaagtaagtctactctgaatttttttaaaaggagagggtaa
agagtgtcattaccgttcttaacttctgcaccgggaaaggttattatttttggtgaacactctg
ctgtgtacaacaagcctgccgtcgctgctagtgtgtctgcgttgagaacctacctgctcataag
cgagtcatctgcaccagatactattgaattggacttcccggacattagctttaatcataagtgg
tccatcaatgatttcaatgccatcaccgaggatcaagtaaactcccaaaaattggccaaggctc
aacaagccaccgatggcttgtctcaggaactcgttagtcttttggatccgttgttagctcaact
atccgaatccttccactaccatgcagcgttttgtttcctgtatatgtttgtttgcctatgcccc
catgccaagaatattaagttttctttaaagtctactttacccatcggtgctgggttgggctcaa
gcgcctctatttctgtatcactggccttagctatggcctacttgggggggttaataggatctaa
tgacttggaaaagctgtcagaaaacgataagcatatagtgaatcaatgggccttcataggtgaa
aagtgtattcacggtacccccttcaggaatagataacgctgtggccacttatggtaatgcccctgc
tatttgaaaaagactcacataatggaacaatataccacaacaattttaagttcttagatgattt
cccagccattccaatgatcctaacctatactagaattccaaggtctacaaaagatcttgttgct
cgcgttcgtgtgttggtcaccgagaaatttcctgaagttatgaagccaattctagatgccatgg
gtgaatgtgccctacaaggcttagagatcatgactaagttaagtaaatgtaaaggcaccgatga
cgaggctgtagaaactaatattgaactgtatgaacaactattggaattgataagaataaatcat
ggactgcttgtctcaatcggtgtttctcatcctggattagaacttattaaaaatctgagcgatg
atttgagaattggctccacaaaacttaccggtgctggtggcggcggttgctctttgactttgtt
acgaagagacattactcaagagcaaattgacagcttcaaaaagaaattgcaagatgatttttagt

圖29A

tacgagacatttgaaacagacttgggtgggactggctgctgtttgttaagcgcaaaaaatttga
atuaagatcttaaaatcaaatccctagtattccaattatttgaaaatuaaactaccacaaagca
acaaattgacgatctattattgccaggaaacacgaatttaccatggacttcataaaaggagagg
gtgtcagagttgagagccttcagtgccccagggaaagcgttactagctggtggatatttagttt
tagatacaaaatatgaagcatttgtagtcggattatcggcaagaatgcatgctgtagcccatcc
ttacggttcattgcaagggtctgataagtttgaagtgcgtgtgaaaagtaaacaatttaaagat
ggggagtggctgtaccatataagtcctaaaagtggcttcattcctgtttcgataggcggatcta
agaaccctttcattgaaaaagttatcgctaacgtatttagctacttttaaacctaacatggacga
ctactgcaatagaaacttgttcgttattgatattttctctgatgatgcctaccattctcaggag
gatagcgttaccgaacatcgtggcaacagaagattgagttttcattcgcacagaattgaagaag
ttcccaaaacagggctgggctcctcggcaggtttagtcacagttttaactacagctttggcctc
ctttttgtatcggacctggaaaataatgtagacaaatatagagaagttattcataatttagca
caagttgctcattgtcaagctcagggtaaaattggaagcgggtttgatgtagcggcggcagcat
atggatctatcagatatagaagattcccaccgcattaatctctaatttgccagatattggaag
tgctacttacggcagtaaactggcgcatttggttgatgaagaagactggaatattacgattaaa
agtaaccatttaccttcgggattaactttatggatgggcgatattaagaatggttcagaaacag
taaaactggtccagaaggtaaaaaattggtatgattcgcatatgccagaaagcttgaaaatata
tacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatcgcttacac
gagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtctcttgagaggaatgactgtacctgtc
aaaagtatcctgaaatcacagaagttagagatgcagttgccacaattagacgttcctttagaaa
aataactaaagaatctggtgccgatatcgaacctcccgtacaaactagcttattggatgattgc
cagaccttaaaaggagttcttacttgcttaatacctggtgctggtggttatgacgccattgcag
tgattactaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaatgacaaaagattttctaaggt
tcaatggctggatgtaactcaggctgactggggtgttaggaaagaaaaagatccggaaacttat
cttgataaataaaaggagagggtgaccgtttacacagcatccgttaccgcacccgtcaacatcg
caacccttaagtattgggggaaaagggacacgaagttgaatctgcccaccaattcgtccatatc
agtgactttatcgcaagatgacctcagaacgttgacctctgcggctactgcacctgagtttgaa
cgcgacactttgtggttaaatggagaaccacacagcatcgacaatgaaagaactcaaaattgtc
tgcgcgacctacgccaattaagaaaggaaatggaatcgaaggacgcctcattgcccacattatc
tcaatggaaactccacattgtctccgaaaataactttcctacagcagctggtttagcttcctcc
gctgctggctttgctgcattggtctctgcaattgctaagttataccaattaccacagtcaactt
cagaaatatctagaatagcaagaaaggggtctggttcagcttgtagatcgttgtttggcggata
cgtggcctgggaaatgggaaaagctgaagatggtcatgattccatggcagtacaaatcgcagac
agctctgactggcctcagatgaaagcttgtgtcctagttgtcagcgatattaaaaaggatgtga
gttccactcagggtatgcaattgaccgtggcaacctccgaactatttaaagaaagaattgaaca
tgtcgtaccaaagagatttgaagtcatgcgtaaagccattgttgaaaaagatttcgccaccttt
gcaaaggaaacaatgatggattccaactctttccatgccacatgtttggactctttccctccaa
tattctacatgaatgacacttccaagcgtatcatcagttggtgccacaccattaatcagtttta
cggagaaacaatcgttgcatacacgtttgatgcaggtccaaatgctgtgttgtactacttagct
gaaaatgagtcgaaactctttgcatttatctataaattgtttggctctgttcctggatgggaca
agaaatttactactgagcagcttgaggctttcaaccatcaatttgaatcatctaactttactgc
acgtgaattggatcttgagttgcaaaaggatgttgccagagtgattttaactcaagtcggttca
ggcccacaagaaacaaacgaatctttgattgacgcaaagactggtctaccaaaggaataaaagg
agagggtgactgccgacaacaatagtatgcccccatggtgcagtatctagttacgccaaattagt

圖29B

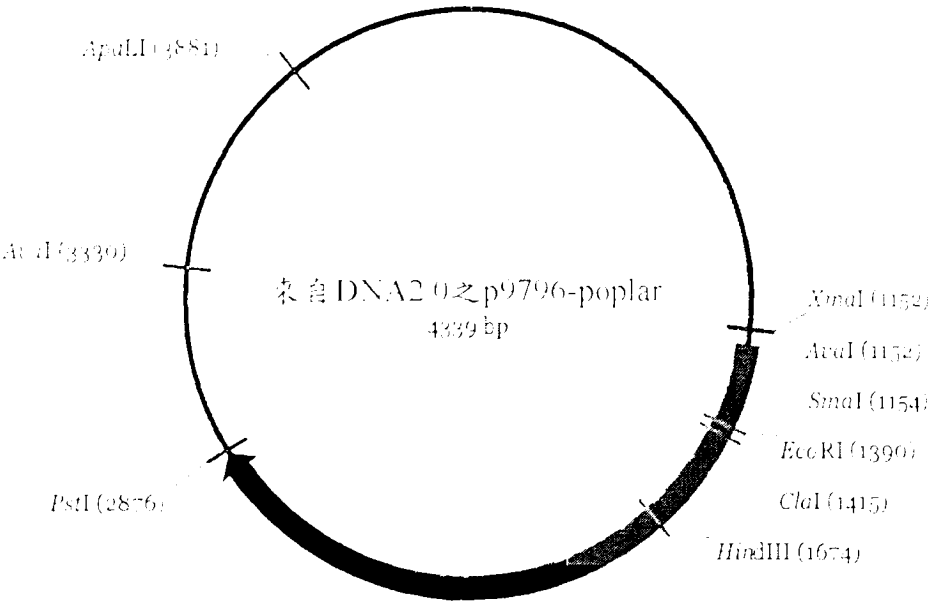
gcaaaaccaaacacctgaagacattttggaagagtttcctgaaattattccattacaattaaga
cctaataccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgtttttctggtcatg
atgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacgataatgctat
tggtgccggtaccaagaaagtttgtcatttaatggaaaatattgaaaagggtttactacatcgt
gcattctccgtctttatttttcaatgaacaaggtgaattacttttacaacaaagagccactgaaa
aaataactttcctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgattgacga
attaggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattactgcggcggtgagaaaa
ctagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaaggggtaagtttcacttttaa
acagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatgcggtgaacatgaaattgattacatcct
attttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagagac
ttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgc
cttggtttaagattatttgcgagaatttacttattcaactggtgggagcaattagatgacctttc
tgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataaaaaaaaaccggccttggccccgccg
gttttttattattttcttcctccgcatgttcaatccgctccataatcgacggatggctcctc
tgaaaattttaacgagaaacggcgggttgacccggctcagtcccgtaacggccaagtcctgaaa
cgtctcaatcgccgcttcccggtttccggtcagctcaatgccgtaacggtcggcggccgtttcc
tgataccgggagacggcattcgtaatttgaatacatacgaacaaattaataaagtgaaaaaaat
acttcggaaacatttaaaaaataaccttattggtacttacatgtttggatcaggagttgagagt
ggactaaaaccaaatagtgatcttgacttttagtcgtcgtatctgaaccattgacagatcaaa
gtaaagaaatacttatacaaaaaattagacctatttcaaaaaaaataggagataaaagcaaactt
acgataatattgaattaacaattattattcagcaagaaatggtaccgtggaatcatcctcccaaa
caagaatttatttatggagaatggttacaagagctttatgaacaaggatacattcctcagaagg
aattaaattcagattttaaccataatgctttaccaagcaaaacgaaaaaataaaagaatatacgg
aaattatgacttagaggaattactacctgatattccatttttctgatgtgagaagagccattatg
gattcgtcagaggaattaatagataattatcaggatgatgaaaccaactctatattaactttat
gccgtatgattttaactatggacacgggtaaaatcataccaaaagatattgcgggaaatgcagt
ggctgaatcttctccattagaacatagggagagaattttgttagcagttcgtagttatcttgga
gagaatattgaatggactaatgaaaatgtaaatttaactataaactatttaaatnacagattaa
aaaaattataatgtaacctttgctttcaaatgagtagaaataatgcacatccatgtttgtatcg
tgcaaataaagtgtttcatccgtaggaaaaaatgactttagtatctgttccgctttttctgatg
aaatgtgctcccgacaaaattgaatgaatcatggacatttgctggctttgatacagcgaaagc
agccgttcctatgttatatatcggatttaacagcaggacaaaaaacaccatgacagccatcgtc
acccacttattcacacgcacataaacctttcctgacttttggaacagatgatagctcatcaaaa
atcccgccattgccaaataaatcgtatatggcattactgcaccataatcttttgagatttgatt
gggatatggcgcaagcagcaagacaagcagtccgataatcagcgtataaaataagcctagtaag
atcttatccgttctccnatacagcttgaaaaacactacattcaacgcaatgggaagagtgatga
tgaaaaacagaaacacgaatgcaatcggctccatcccatccgggtattccttccaatacgaaaa
gaaactaaaaaatcatttgtacgatcggcaaactgacaacagcaaggtcgaacgtatanaacta
ccctttccgccatgatcacgcggcatcagcatatagtgaaaagccgtcagcagcacatatccgt
atancaaaaaaatgcagcagcggcagcagttcttttccgtcctctcttaagtaagcgctggtgaa
gtttgttgattgcacctggtgaataagttcaacagacactcccgccagcagcacaatccgcaat
atanacccgccaagaacattgtgcgctgccggtttattttgggatgatgcaccaaaagatata
agcccgccagaacaacaattgaccattgaatcagcagggtgctttgtctgcttaatatnaatta
acgttcgaaatgcaatacataatgactgaataactccaacacg[illegible]aagtgcgcatttt

圖29C

Ataaaagctaatgattcagtccacataattgatcagcgaattctgctacaggtcacgtggctat
gtgaaggatcgcgcgtccagttaagagcaaaaacattgacaaaaaaatttatttatgctaaaat
ttactattaatatatttgtatgtataataagattctcctggccaggggaatcttatttttgtg
gaggatcatttcatgaggaaaaatgagtccagcttaacgtctctaatttcagcttttgcccgtg
catatcacagccgatatgacacacctcttatttttgatgattttatcgcaaaagatctcattaa
cgaaaaagagtttatcgacatcagtaaaaatatgattcaagaaatatcgtttttcaacaaagag
atcgccgaacgtcttcaaaatgatcctgaaaaaatattaaaatgggttgcacaaatccagctgt
ctccaacgcccctagcacgtgcttcttattgtgaaaaagtcttgcacaacgaattaatcctggg
ggcaaaacagtatgtcattcttggagcgggactggatactttctgctttcggcatccagaatta
gaaaacagcttacaggttttcgaggttgatcatccggccacacagcaattgaaaaaaaataagc
tgaaggatgcaaatctgacaattccgggtcatcttcattttgttcctatggatttcaccaaaac
gttttcgtatgatcctctcttagatgaaggatttaaaaacacaaaaacattcttcagccttctc
ggagtgtcttattatgtaacacgggaagaaaatgcaagcttgatcagcaatttatttttctcatg
tcccgcctggaagctctattgtttttgattatgcggacgaaacacttttttacagcaaaagggac
gtcgaatcgagttgaacatatggtgaagatggctgccgcaagcggggaaccgatgaaatcatgt
ttcacttatcaagagattgaacatctg

SEQ ID NO. 13

圖29D


ApaLI (4881)
AccI (3330)
PstI (2876)
XmaI (1152)
AvaI (1152)
SmaI (1154)
EcoRI (1390)
ClaI (1415)
HindIII (1674)
來自DNA2.0之p9796-poplar
4339 bp

楊屬IS

圖30

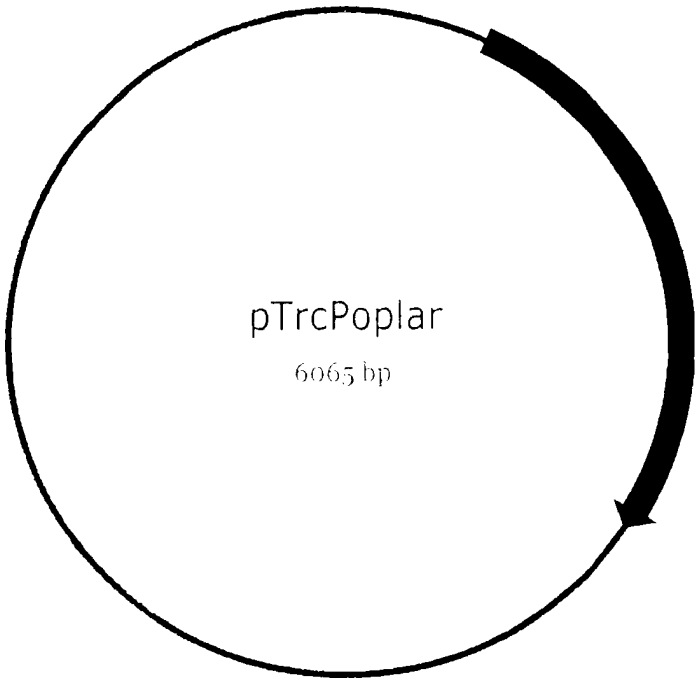
5'-
tagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccat
atttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggc
aagatcctggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccc
tcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatg
gcaaaagtttatgcatttctttccagacttgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaa
atcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgaggcgaaatacgcga
tcgctgttaaaaggacaattacaaacaggaatcgagtgcaaccggcgcaggaacactgccagcg
catcaacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaacgctgtttttccggg
gatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagt
ggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctac
ctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccatacaagcgatagattgtcgc
acctgattgcccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaa
tttaatcgcggcctcgacgtttcccgttgaatatggctcatattcttcctttttcaatattatt
gaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataa
acaaatagggggtcagtgttacaaccaattaaccaattctgaacattatcgcgagcccatttata
cctgaatatggctcataacacccccttgtttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgac
cccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggactccccatgcga
gagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttttcgcc
cgggctaatttagggggtgtcgcccttttagtcgctgaacatgtgctctgtttctaccgagaacgt
ttcattcactgagacggaaaccgaggcacgtcgtagcgcgaactacgagccgaatagctgggac
tacgatttcctgctgtcttccgatactgacgaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaaga
aactggaggctgaagtgcgccgcgaaattaacaacgagaaagctgaattcctgactctgctgga
gctgatcgataacgtacagcgccctgggtctgggttaccgcttcgaatctgatatccgtcgcgca
ctggatcgtttcgtaagcagcggcggtttcgatggcgtgaccaaaacgagcctgcacgctaccg
cgctgtccttccgtctgctgcgtcagcacggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggttt
caaagatcaaaacggtaacttcctggaaaacctgaaagaagacactaaggcgatcctgagcctg
tatgaggcaagctttctggccctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgcgtattcgcca
tctcccatctgaaagagctgttcgaagagaaaatcggtaaggaactggcagagcaggttaatca
cgcactggaactgccgctgcatcgtcgtacccagcgtctggaggcggtttggtccatcgaagcg
taccgcaaaaaggaggatgctaaccaggttctgctggaactggccatcctggactacaacatga
tccagtccgtttaccagcgtgatctgcgtgaaacctcccgttggtggcgccgtgtgggcctggc
gaccaaactgcacttcgctaaggaccgcctgattgagtcttttactgggcagtcggcgttgcg
ttcgaacctcagtattctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactatta
tcgacgacatctacgacgtttacggtactctggacgagctggaactgtttaccgacgctgtcga
acgttgggatgttaacgccatcaacgatctgcctgactacatgaaactgtgcttcctggcactg
tataacacgatcaacgaaattgcatacgacaacctgaaagacaaaggtgaaaacatcctgccgt
acctgactaaagcgtgggcggatctgtgtaacgcttttctgcaagaagcgaaatggctgtatcaa
caaatccactccgacctttgacgattatttcggcaatgcctggaaatccagctctggcccgctg
caactgatcttcgcttattttgcggttgtccaaaacatcaaaaaggaggaaattgaaaacctgc
aaaaatacccacgatatcattagccgtccttctcatatctttcgcctgtgcaacgacctggcaag
cgcgtccgcagagatcgcacgtggcgaaaccgctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaag
ggcatttccgaagagctggcaaccgagagcgtaatgaatctgatcgacgaaaccgtaagaaaa
tgaacaaagaaaaactgggtggctcctgttcgctaaaccgttcgtagagactgctattaacct

圖31A

ggcacgtcagagccactgcacctaccacaatggtgaggcgatatatttagccccggatgaactgact
cgtaaacgtgtactgtctgttatcaccgaccgattctgccgttcgaacgttaactgcagcgtc
aatcgaaagggcgacacaaaatttattctaaatgcataataaatactgataacatcttatagtt
tgtattatattttgtattatcgttgacatgtataattttgatatcaaaaactgatttttccctttt
attatttcgagatttatttcttaattctctttaacaaactagaaatattgtatatacaaaaa
atcataaataatagatgaatagtttaattataggtgttcatcaatcgaaaaagcaacgtatctt
atttaaagtgcgttgctttttttctcatttataaggttaaataattctcatatatcaagcaaagt
gacaggcgcccttaaatattctgacaaatgctctttccctaaactcccccccataaaaaaacccg
ccgaagcgggtttttacgttatttgcggattaacgattactcgttatcagaaccgcccctgggggg
cccgagcttaagactggccgtcgttttacaacacagaaagagtttgtagaaacgcaaaaaggcc
atccgtcagggggcttctgcttagtttgatgcctggcagttccctactctgccttccgcttcc
tcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaagg
cggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggcca
gcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccct
gacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagat
accaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccgg
atacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtat
ctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccg
accgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgcc
actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttc
ttgaagtggtgggctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctga
agccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtag
cggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcct
ttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgacgcgcgcgtaactcacgttaagggat
tttggtcatgagcttgcgccgtcccgtcaagtcagcgtaatgctctgcttt

SEQ ID NO:14

圖31B



楊屬IS

圖32

5'-
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactccc
gttctggataatgtttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt
gtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaat
gtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgctctgtttctaccgagaacgtttccttcact
gagacggaaaccgaggcacgtcgtagcgcgaactacgagccgaatagctgggactacgctttcc
tgctgtcttccgatactgacgaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaagaaactggaggc
tgaagtgccgccgcgaaattaacaacgagaaagctgaattcctgactctgctggagctgatcgat
aacgtacagcgccctgggtctgggttaccgcttcgaatctgatatccgtcgcgcactggatcgtt
tcgtaagcagcggcggtttcgatggcgtgaccaaaacgagcctgcacgctaccgcgctgtcctt
ccgtctgctgcgtcagcacggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggtttcaaagatcaa
aacggtaacttcctggaaaacctgaaagaagacactaaggcgatcctgagcctgtatgaggcaa
gctttctggccctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgcgtattcgccatctccatct
gaaagagctgtctgaagagaaaatcggtaaggaactggcagagcaggttaatcacgcactggaa
ctgccgctgcatcgtcgtacccagcgtctggaggcggtttggtccatcgaagcgtaccgcaaaa
aggaggatgctaaccaggttctgctggaactggccatcctggactacaacatgatccagtccgt
ttaccagcgtgatctgcgtgaaacctcccgttggtggcgccgtgtgggcctggcgaccaaactg
gacttcgctaaggaccgcctgattgagtcttttactgggcagtcggcgttgcgttcgaacctc
agtattctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactattatcgacgacat
ctacgacgtttacggtactctggacgagctggaactgtttaccgacgctgtcgaacgttgggat
gttaacgccatcaacgatctgcctgactacatgaaactgtgcttcctggcactgtataacacga
tcaacgaaattgcatacgacaacctgaaagacaaaggtgaaaacatcctgccgtacctgactaa
agcgtgggcggatctgtgtaacgcttttctgcaagaagcgaaatggctgtataacaatccact
ccgacctttgacgattatttcggcaatgcctggaaatccagctctggcccgctgcaactgatct
tcgcttattttgcggttgtccaaaacatcaaaaaggaggaaattgaaaacctgcaaaaatacca
cgatatcattagccgtccttctcatatctttcgcctgtgcaacgacctggcaagcgcgtccgca
gagatcgcacgtggcgaaaccgctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaagggcatttccg
aagagctggcaaccgagagcgtaatgaatctgatcgacgaaacctgtaagaaaatgaccaaaga
aaaactgggtggctccctgttcgctaaaccgttcgtagagactgctattaacctggcacgtcag
agccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagcccggatgaactgactcgtaaacgtg
tactgtctgttatcaccgaaccgattctgccgttcgaacgttacctgcagctggtaccatatgg
gaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgacca
tcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaaga
ttttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctgg
cggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgcc
gatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaag
gctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagta
ggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcagg
acgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttt
gcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgag
acaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttc

圖33A

cgtgtcgcccttattccctttttttgcggcattttgccttcctgttttgctcacccagaaacgc
tggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatct
caacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttt
aaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgcc
gcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacgga
tggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaac
ttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatc
atgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtga
caccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttact
ctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgc
gctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcg
cggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacg
gggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgatta
agcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattt
ttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgt
gagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctt
tttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgttt
gccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacca
aatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgccta
catacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttac
cgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcg
tgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctat
gagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcgg
aacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcggg
tttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatgga
aaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgtt
ctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgatacc
gctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctga
tgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtac
aatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtca
tggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggc
atccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtca
tcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgt
tgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaa
ttcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctctt
atcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagt
ggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaa
cagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcg
cggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaag
cggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatc
attaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccgg
cgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacgg
tacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggc
ccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatc

圖33B

aaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccat
gcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctg
ggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggat
acgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcg
cctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggc
aatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccg
cctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaag
cgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

SEQ ID NO:15

圖33C

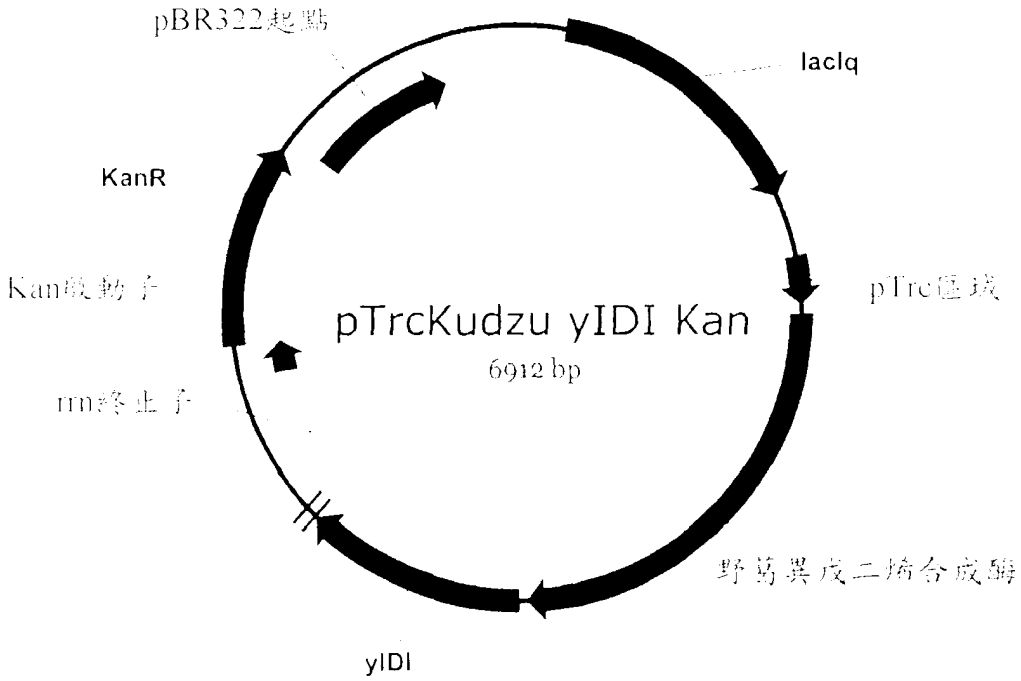

pBR322起點
lacIq
KanR
Kan啟動子
pTrc區域
pTrcKudzu yIDI Kan
6912 bp
rrnB終止子
野葛異戊二烯合成酶
yIDI

圖34

5'-
ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag
aggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc
ggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgc
ccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagt
atgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa
aacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaa
caactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgc
cgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtc
gatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgc
gtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcct
gcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttt
ctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatc
gcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaat
atctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgg
ttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaac
gatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggata
tctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccat
caaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc
caggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgc
ccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggt
ttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactccc
gttctggataatgtttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt
gtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaat
gtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacc
gagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaat
cctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagt
tcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg
cagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtac
tgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgct
gcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggt
ttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg
gtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcacccacctgaaagaacaa
cctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatat
caccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgc
ctcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaacctgcacccagaa
agagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggatttttgta
cgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcaagtttggtg
aatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt

圖35A

ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgct
attaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgaca
cgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg
tgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttc
tccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttact
tttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttcccctgaccgacttcca
tggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtacca
gcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcg
tgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggca
cgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaa
accgcatcaaactgctgctgattgacccttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgca
tcgccgttaggaggtaaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatc
tagttacgccaaattagtgcaaaaccaaacacctgaagacattttggaagagtttcctgaaatt
attccattacaacaaagacctaatacccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaa
catgtttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttgga
ttgggacgataatgctattggtgccggtaccaagaaagtttgtcatttaatggaaaatattgaa
aagggtttactacatcgtgcattctccgtctttatttttcaatgaacaaggtgaattacttttac
aacaaagagccactgaaaaaataactttcccctgatctttggactaacacatgctgctctcatcc
actatgtattgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctatt
actgcggcggtgagaaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaaggg
gtaagtttcacttttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatggggtgaaca
tgaaattgattacatcctatttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaac
gtcaatgaagtcagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacc
caagttacaagtttacgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtggga
gcaattagatgaccttctgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataacaacgc
gtcctgcagctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagag
gatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttgg
ctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggt
ctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaact
cagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactg
ccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgttt
gtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaa
cggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaagg
ccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacat
tcaaatatgtatccgcttaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagcc
ctgcaaagtaaactggatggctttctcgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagctct
gatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctc
cggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctga
tgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtcc
ggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttc
cttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagt
gccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgat

圖35B

gcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatc
gcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaaga
gcatcagggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgag
gatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgctttt
ctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctac
ccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatc
gccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgacatgacc
aaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggat
cttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctacc
agcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagc
agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact
ctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcga
taagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggc
tgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacc
tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggt
aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctt
tatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggg
ggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggcc
ttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgccttt
gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaag
cggaagagcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatg
gtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgc
tacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggc

SEQ ID NO:16

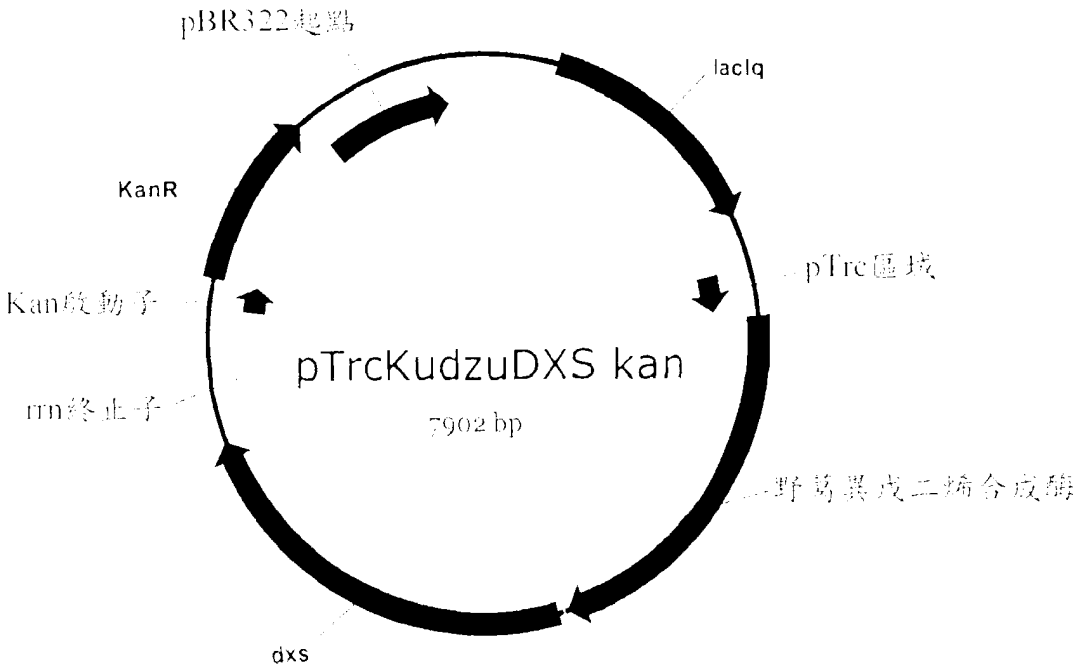

pBR322起點
laclq
KanR
pTrc區域
Kan啟動子
pTrcKudzuDXS kan
7902 bp
rrn終止子
野葛異戊二烯合成酶
dxs

圖36

5'-

ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag
aggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc
ggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgc
ccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagt
atgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa
aacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaa
caactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgc
cgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtc
gatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgc
gtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcct
gcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttt
ctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatc
gcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaat
atctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgg
ttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaac
gatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggata
tctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccat
caaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc
caggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgc
ccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggt
ttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactccc
gttctggataatgtttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt
gtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaat
gtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacc
gagcataattcccgtcgttccgcagactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaat
ccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagt
tcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg
cagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtac
tgctggacgaaaacaaaaaggaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgct
gcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaagtggt
ttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg
gtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgctaccttttccatcacccacctgaagaacaa
cctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctgggtactgccatat
caccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgtttgaaccgc
atcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaa
agagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggatttttgta
cgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtg
aatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt
ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgct

圖37A

attaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgaca
cgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg
tgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttc
tccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttact
tttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttcccctgaccgacttcca
tggtctggtgcgttctagctgcgttatctttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtacca
gcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcg
tgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggca
cgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaa
accgcatcaaactgctgctgattgacccttttccgattaaccagctgatgtatgtctaactgca
ttcgcccttaggaggtaaaaaaacatgagttttgatattgccaaataccgaccctggcactgg
tcgactccacccaggagttacgactgttgccgaaagagagtttaccgaaactctgcgacgaact
gcgccgctatttactcgacagcgtgagccgttccagcgggcacttcgcctccgggctgggcacg
gtcgaactgaccgtggcgctgcactatgtctacaacacccccgtttgaccaattgatttgggatg
tggggcatcaggcttatccgcataaaattttgaccggacgccgcgacaaaatcggcaccatccg
tcagaaaggcggtctgcacccgttcccgtggcgcggcgaaagcgaatatgacgtattaagcgtc
gggcattcatcaacctccatcagtgccggaattggtattgcggttgctgccgaaaaagaaggca
aaaatcgccgcaccgtctgtgtcattggcgatggcgcgattaccgcaggcatggcgtttgaagc
gatgaatcacggggcgatatccgtcctgatatgctggtgattctcaacgacaatgaaatgtcg
atttccgaaaatgtcggcgcgctcaacaaccatctggcacagctgcttcccggtaagctttact
cttcactgcgcgaaggcgggaaaaaagttttctctggcgtgccgccaattaaagagctgctcaa
acgcaccgaagaacatattaaaggcatggtagtgcctggcacgttgtttgaagagctgggcttt
aactacatcggccccggtggacggtcacgatgtgctggggcttatcaccacgctaaagaacatgc
gcgacctgaaaggcccgcagttcctgcatatcatgaccaaaaaaggtcgtggttatgaaccggc
agaaaaagacccgatcactttccacgccgtgcctaaatttgatccctccagcggttgtttgccg
aaaagtagcggcggtttgccgagctattcaaaaatctttggcgactggttgtgcgaaacggcag
cgaaagacaacaagctgatggcgattactccggcgatgcgtgaaggttccggcatggtcgagtt
ttcacgtaaattcccggatcgctacttcgacgtggcaattgccgagcaacacgcggtgaccttt
gctgcgggtctggcgattggtgggtacaaacccattgtcgcgatttactccactttcctgcaac
gcgcctatgatcaggtgctgcatgacgtggcgattcaaaagcttccggtcctgttcgccatcga
ccgcgcgggcattgttggtgctgacggtcaaacccatcagggtgcttttgatctctcttacctg
cgctgcataccggaaatggtcattatgaccccgagcgatgaaaacgaatgtcgccagatgctct
ataccggctatcactataacgatggcccgtcagcggtgcgctacccgcgtggcaacgcggtcgg
cgtggaactgacgccgctggaaaaactaccaattggcaaaggcattgtgaagcgtcgtggcgag
aaactggcgatccttaactttggtacgctgatgccagaagcggcgaaagtcgccgaatcgctga
acgccacgctggtcgatatgcgttttgtgaaaccgcttgatgaagcgttaattctggaaatggc
cgccagccatgaagcgctggtcaccgtagaagaaaacgccattatgggcggcgcaggcagcggc
gtgaacgaagtgctgatggcccatcgtaaaccagtacccgtgctgaacattggcctgccggact
tctttattccgcaaggaactcaggaagaaatgcgcgccgaactcggcctcgatgccgctggtat
ggaagccaaaatcaaggcctggctggcataactgcagctggtaccatatgggaattcgaagctt
tctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcat
cattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgat
acagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcg

圖37B

gtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtgg
ggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaag
actgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcc
gggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataa
actgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaa
ctcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgcttaaccggaattgccagctg
gggcgccctctggtaaggttgggaagccctgcaaagtaaactggatggctttctcgccgccaag
gatctgatggcgcaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgatt
gaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgact
gggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgccc
ggttcttttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcgg
ctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgg
gaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcc
tgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacc
tgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtc
ttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccag
gctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccg
aatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcgg
accgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggc
tgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgc
cttcttgacgagttcttctgacgcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgag
cgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctg
ctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctacca
actctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgt
agccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaat
cctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacga
tagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttgg
agcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcc
cgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagg
gagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttg
agcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggc
ctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccct
gattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacga
ccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtattttctccttac
gcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgca
tagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccc
gccaacacccgctgacgcgccctgacgggc

SEQ ID NO 17

圖37C

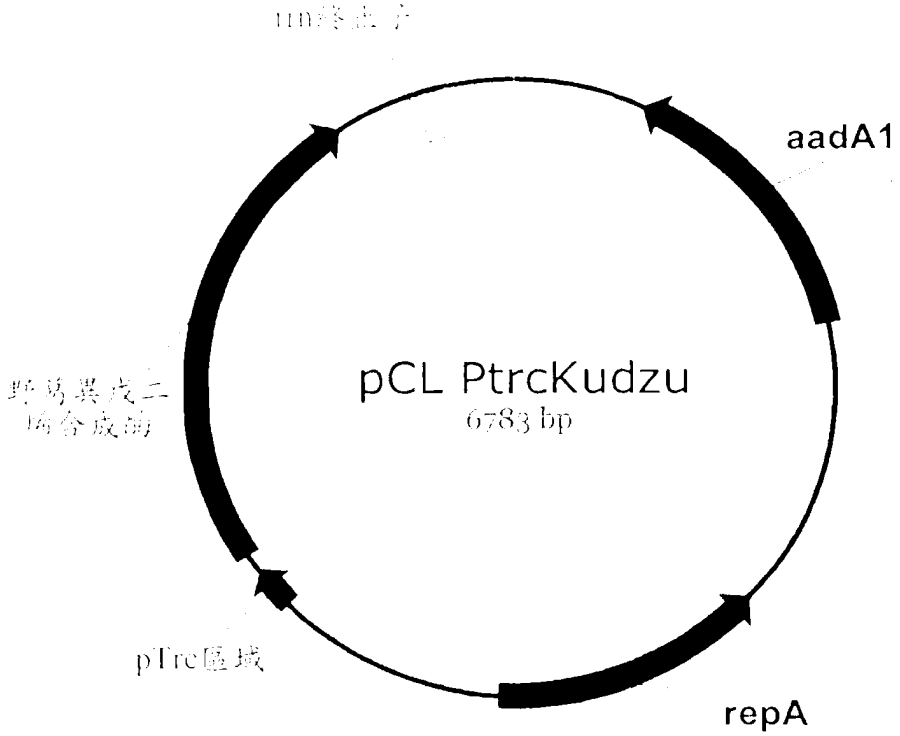


圖38

5' --
ctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggc
gaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggt
gcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacc
cgctgacgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaac
tattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttatt
atgcacgcttaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaatttatgtgc
ttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgtta
gacattatttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactg
atctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatg
acgggctgatactgggccggcaggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcga
tttttgccggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgcc
agcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgt
tcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttg
cttttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaat
gtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatg
tcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctctccagggg[illegible]gccg
aagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgt
aaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgt
acggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcg
atacttcggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctg
cgtaacatcgttgctgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttg
gatgcccgaggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactg
cgccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttg
cattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccgac
ggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcga
acgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacgg
caaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgc
ttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatc
gtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggt
caaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgg
gccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcgagcagggaattaattcccacgggg
ttttgctgccccgcaaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatgcagcatcccggc
ttcagccggtttgccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgg
gaggcgtcactggctcccgtgttgtcggcagctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcag
gctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagt
tgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgt
cgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctat
ctttttacaccgttttcatctgtgcatatggacagttttcccttgatatgtaacgatgaaaca
gttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccat[illegible]gaacct
cagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggttcgttgtttttgcgtgagccatg
agaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaactgact
gagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgtttttcttagtccgttatgtaggtaggaa
tctgatgtaatggttgttggtattttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcgg

圖39A

ttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcg
ctttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacc
cattggttaagccttttaaactcatggtagttatttcaagcattaacatgaacttaaattcat
caaggctaatctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttcttttaataaccactc
ataaatcctcatagagtatttgtttttcaaagacttaacatgttccagattatattttatgaat
ttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcactaaaaactaattctaatttttcgcttg
agaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttc
cacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccataagcattttccctactg
atgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggt
tttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaa
gtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaat
tggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtcc
ttttccttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattc
tgctagaccctctgtaaattccgctagacctttgtgtgttttttttgtttatattcaagtggtt
ataatttatagaataaagaaagaataaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtata
actcactactttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctct
acaaaacagaccttaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctg
aatattcctttgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttc
gctgcgctcacggctctggcagtgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattc
atgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggc
gggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttcca
gtctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggca
gcggtatcatcaacaggcttacccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatg
cagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagc
ggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaac
aatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaat
taaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttc
tcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtgg
aatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcga
ccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtcctgct
ggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaa
gccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccg
ctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgttt
caaggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctg
tatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttcca
tcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagcca
cgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaa
tacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatgg
tacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggc
tagcaaactggatttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcg
ccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatca
tcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtaga
gcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactg
tacaacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcat

圖39B

atctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaa
caaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctcggtgtagcg
ctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgc
gttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacga
tctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatg
cacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccg
aatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatgga
aatcgcagttaacatggcacgtgtttcccgctgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgc
ccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttttcccgattaaccagc
tgatgtatgtctaactgcagctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcat
tctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggt
ctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaac
gcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccc
catgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgaga
gtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttt
atctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacg
ttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaat
taagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttt
tctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataat

SEQ ID NO:18

圖39C

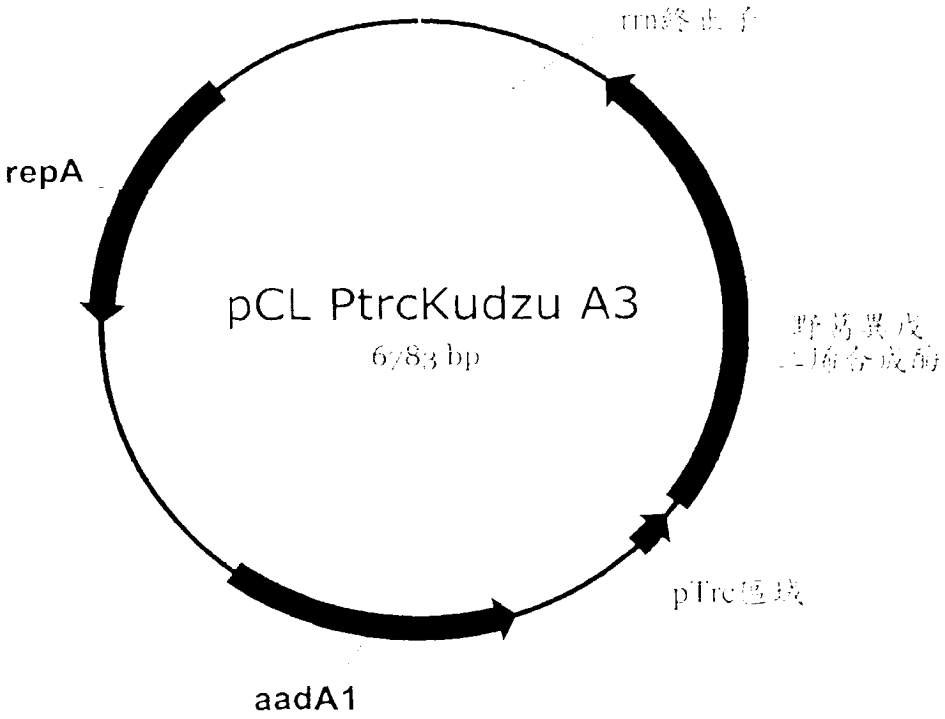


圖40

57 -

ccccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattattgaagcatttatc
agggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggagtt
tgtagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgcttaatttgatgcctggcagttt
atggcgggcgtcctgcccgccaccctccgggccgttgcttcgcaacgttcaaatccgctcccgg
cggatttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacgaaaggcccagtct
ttcgactgagcctttcgttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcatggggagaccc
acactaccatcggcgctacggcgtttcacttctgagttcggcatggggtcaggtgggaccaccg
cgctactgccgccaggcaaattctgttttatcagaccgcttctgcgttctgatttaatctgtat
caggctgaaaatcttctctcatccgccaaaacagccaagctggagaccgtttaaactcaatgat
gatgatgatgatggtcgacggcgctattcagatcctcttctgagatgagtttttgttctagaaa
gcttcgaattcccatatggtaccagctgcagttagacatacatcagctggttaatcgggaaagg
gtcaatcagcagcagtttgatgcggttttcagtcgcgtagtctgggcgacccagaccatcgcca
tactggtaggtgcagtgggaaacacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggca
gcagggtggagtcgctaacgcgttcacgattcatcttttccattcggcgtcgatcagtttacg
cagttcttcgcgggcctgttcctcgctggtaccatcgttttcgtgcatgtagctaatgatagaa
ttggtagtctcgccacgttccagctccgccgcagaggtggccagatcgttgcacaggcggaaga
taacgcagctagaacgcaccagaccatggaagtcggtcagggaacgcagcgcgtggtcggagat
gtcttcctgctgctggcatacggaaaagtaagacggcgccagcagcgctacaccggaggaggaa
acgctggcgttttccaggtacttggagaaagccgggataatttgttgttggaccatttcgcct
cttgcagaaaggctttgcacagttcacgccagcttttcgtcagataggacaggttgttatgacc
tttctctttcagaatagaataggacgtgtcgttaacggtgttgtacagtgccaggaaacacagt
ttcatatagtccggcagggtgttaatagcgttaacgtcccagcgctctacagcatcggtgaaca
gttgcagttcgtccagagtgccataaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagaccaaa
cattttagtaacagctttgcgacattcaccaaactgcgggtctggcgccataccagtgccccag
aaataaacttccatcaggcggtcgcgtacaaaatccagtttgctagccaggcccatctcggtcc
accagcgggacagatcttgcagctctttctggtgcagggtctgtaccatgttaaaatccagctt
cgccagctccagcagcagctggtgatgcggttctttcggttcgtatttatccaggaacccaacgt
gcctccagacggtgcagacgctggtgatatggcagttccagggcgtggctcacttgttctgcaa
ccttggtattaatgccttctttcaggttgttcttcaggtgggtgatggaaaaggtacgcgcctc
ctccagcaggttctcaccctcgaaacccaggtaagacgcttcatacaggctcagcaggccttgg
acgtcacctttcagttcaccgctgaaaccaccttctttatccttgaaacgctcaaaaacatcct
gagaaacctcgaaaccgtgctgacgcagcagacggaaagacagagcggttgcgtgcaggtcaga
tttgttctttttgttttcgtccagcagtacgatgttttccagggctttaatgatgtctttttca
aatttgtaggtcagacccaggcgctgcacatcgtcgatcagctccagcagggacagcggctggg
tgtctacacggttgatcatgcagcgaacttcttcctccagtttggtcgctttctcctccagctt
ttccactttcaggtcgttctccagggattgcaggaattcgaaattccacaggtttggctgatag
tttgcggaacgacgggaattatgctcggtaatctgagtaaattgagaagaggtcgcaccatgg
tttattcctccttatttaatcgatacattaatatatacctctttaatttttaataataaagtta
atcgataattcaggtcgagtgccaccacagattgtctgataaattgttaaagagcagtgccgct
tcgcttttctcagcggcgctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacatt
atacgagccggatgattaattgtcaacagctcatttcagaatctggcgtaatagcgaagaggcc
cgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatt
ttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctc

圖41A

tgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagcc
ctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagc
cagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaa
agcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagt
taagccgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactacctt
ggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcga
tcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggca
ggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgattttgccggttactgcgctgta
ccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttc
catagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagtt
cctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcttttgtcagcaagatagccag
atcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctcca
aattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtga
cttctacagcgcggagaatctcgctctctccaggggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgat
caaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactg
tgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcga
gatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttc
cctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccat
aacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagactgta
ccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttc
ggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaa
caggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaacct
tgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctc
cacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctg
ccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccgg
atgaagtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgta
tggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcac
ggcacgatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagct
tggcacccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacgggttttgctgcccgcaaacgggct
gttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgccggctgaa
agcgctatttcttccagaattgccatgatttttttccccacgggaggcgtcactggctcccgtgt
tgtcggcagctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttga
gctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcac
ctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagc
tttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccgttttcatct
gtgcatatggacagttttcccttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgtta
gtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagcca
gtatgttctctagtgtggttcgttgtttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcata
cttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaa
gcatcgtgtagtgttttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggta
ttttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatc
tagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcata
ttgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaact
catggtagttatttttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctatatttgc

圖41B

cttgtgagtttctttgtgttagttcttttaataaccactcataaatcctcatagagtatttg
ttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataag
gcaatatctcttcactaaaaactaattctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtcca
ctggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctct
ctggttgctttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtatt
ggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggttttcaatcgtggggttgagtag
tgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagt
tcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcac
tatgccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttcctttgagttgtgggtat
ctgtaaattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattcc
gctgacctttgtgtgttttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaag
aataaaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactactttagtcagttcc
gcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccct
aaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattcctttgtctccgacc
atcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcag
tgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataat
acaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatc
tgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtctgaccacttcggattatcc
cgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta

SEQ ID NO:19

圖41C

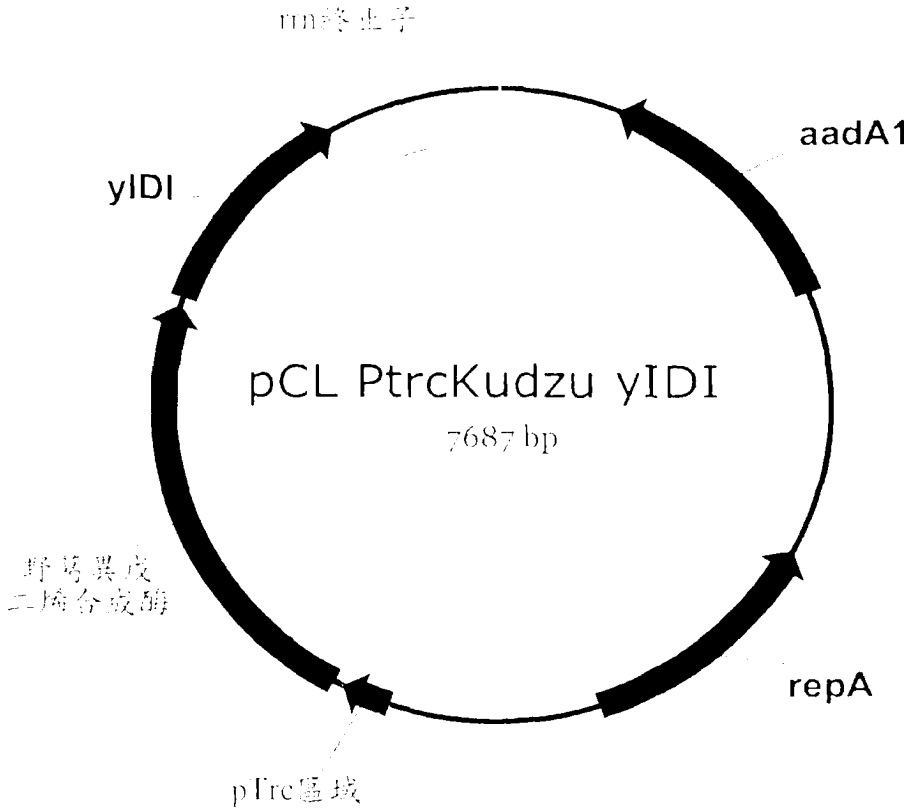

rrnB終止子
aadA1
ylDI
pCL PtrcKudzu yIDI
7687 bp
野葛異戊
二烯合成酶
repA
pTrc區域

圖42

5'-
ctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggc
gaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggt
gcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacc
cgctgacgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaac
tattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttatt
atgcacgcttaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgc
ttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgtta
gacattatttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactg
atctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatg
acgggctgatactgggccggcaggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcga
ttttgccggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgcc
agcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgt
tcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttg
cttttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaat
gtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatg
tcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctctccagggaagccg
aagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgt
aaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgt
acggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcg
atacttcggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctg
cgtaacatcgttgctgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttg
gatgcccgaggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactg
cgccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctactt
gcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccac
ggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcga
acgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacgg
caaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgc
ttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatc
gtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggt
caaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtcgggagggcaagggctccaaggatcgg
gccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcgagcaggggaattaatcccacggg
ttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggc
ttcagccggtttgccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgg
gaggcgtcactggctcccgtgttgtcggcagctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcag
gctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagt
tgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgt
cgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctat
cttttttacaccgttttcatctgtgcatatggacagttttcccttgatatgtaacggtgaaca
gttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacct
cagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatg
agaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaatttgcctcaaaactggt
gagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgtttttcttagtccgttatgtaggtaggaa
tctgatgtaatggttgttggtattttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcgg

圖43A

ttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcg
cttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacc
cattggttaagccttttaaactcatggtagttatttcaagcattaacatgaacttaaattcat
caaggctaatctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttctttttaataccactc
ataaatcctcatagagtatttgtttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaat
ttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcactaaaaactaattctaatttttcgcttg
agaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttc
cacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccataagcatttttccctactg
atgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggt
tttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaa
gtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaat
tggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtcc
ttttccttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattc
tgctagaccctctgtaaattccgctagacctttgtgtgttttttttgtttatattcaagtggtt
ataatttatagaataaagaaagaataaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtata
actcactactttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctct
acaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctg
aatattcctttgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttc
gctgcgctcacggctctggcagtgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattc
atgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggc
gggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttcca
gtctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggca
gcggtatcatcaacaggcttacccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatg
cagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagc
ggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaac
aatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaat
taaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtcgacctcttc
tcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtgg
aatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcga
ccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgct
ggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaa
gccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccg
ctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgttt
caaggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctg
tatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttcca
tcacccacctgaagaacaacctgaaagaagcgcattataccaaggttgcagaacaagtgagcca
cgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaa
tacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatgg
tacagaccctgcatcagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggc
tagcaaactggatttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcg
ccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatca
tcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtaga
gcgctgggacgttaccgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactg
tacaacaccgttaacgacacgtcctatttctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcct

圖43B

atctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaa
caaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcg
ctgctggcgccgtcttactttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgc
gttcccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacga
tctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatg
cacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccg
aatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatgga
aatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgc
ccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttttccgattaaccagc
tgatgtatgtctaactgcatcgcccttaggaggtaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagta
tgccccatggtgcagtatctagttacgccaaattagtgcaaaaccaaacacctgaagacatttt
ggaagagtttcctgaaattattccattacaacaaagacctaatacccgatctagtgagacgtca
aatgacgaaagcggagaaacatgtttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatg
aaaattgtattgttttggattgggacgataatgctattggtgccggtaccaagaaagtttgtca
tttaatggaaaatattgaaaagggtttactacatcgtgcattctccgtctttatttcaatgaa
caaggtgaattactttacaacaaagagccactgaaaaaataactttcccctgatcttggacta
acacatgctgctctcatccactatgtattgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacga
taagattaagggcgctattactgcggcggtgagaaaactagatcatgaatttggtatttccagaa
gatgaaactaagacaaggggtaagtttcacttttaaacagaatccattacatggcaccaagca
atgaaccatggggtgaacatgaaattgattacatcctatttttataagatcaacgctaaaggaaaa
cttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgattttg
aaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgccttggtttaagattatttgcgagaatt
acttattcaactggtgggagcaattagatgaccttctgaagtggaaaatgacaggcaaattca
tagaatgctataacgacgcgtcctgcagctggtaccatatgggaattcgaagcttctagaacg
caaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagtt
taaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaa
atcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccca
cctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctcccc
atgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcct
ttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcgga
tttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccagg
catcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttg
tttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctt
caataat

SEQ ID NO:20

圖43C

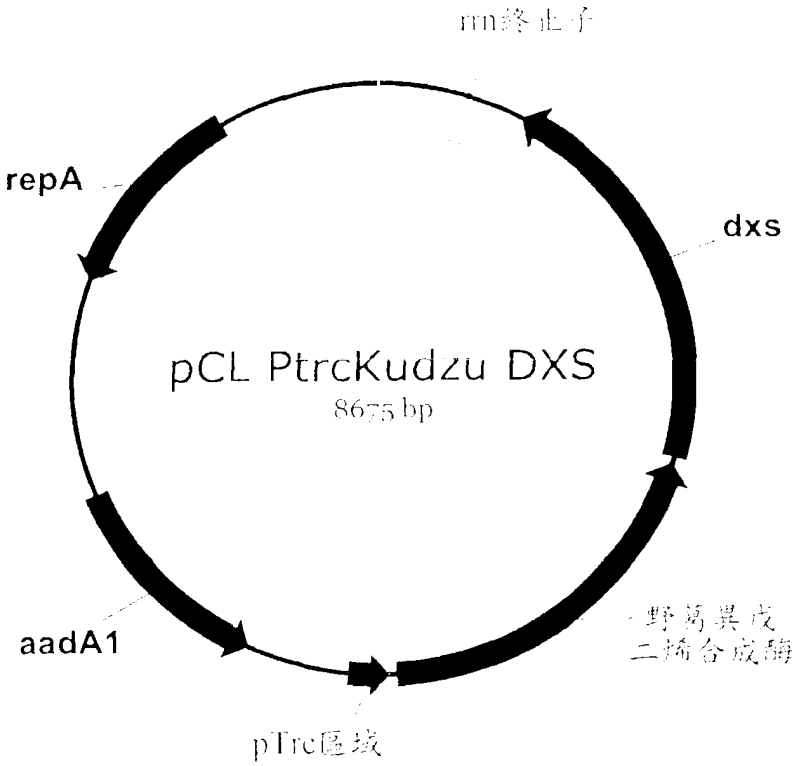

rrn終止子
repA
dxs
pCL PtrcKudzu DXS
8675 bp
aadA1
葛異戊
二烯合成酶
pTrc區域

圖44

5'-
ccegtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattattgaaagcatttatc
agggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagagtt
tgtagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgcttaatttgatgcctggcagttt
atggcgggcgtcctgcccgccaccctccgggccgttgcttcgcaacgttcaaatccgctcccgg
cggatttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacgaaaggcccagtct
ttccgactgagcctttcgttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcatgggagacccc
acactaccatcggcgctacggcgtttcacttctgagttcggcatgggtcaggtgggaccaccg
cgctactgccgccaggcaaattctgttttatcagaccgcttctgcgttctgatttaatctgtat
caggctgaaaatcttctctcatccgccaaaacagccaagctggagaccgtttaaactcaatgat
gatgatgatgatggtcgacggcgctattcagatcctcttctgagatgagttttttgttctagaaa
gcttcgaattcccatatggtaccagctgcagttatgccagccaggccttgattttggcttccat
accagcggcatcgaggccgagttcggcgcgcatttcttcctgagttccttgcggaataaagaag
tccggcaggccaatgttcagcacgggtactggtttacgatgggccatcagcacttcgttcacgc
cgctgcctgcgccgcccataatggcgttttcttctacggtgaccagcgcttcatggctggcggc
catttccagaattaacgcttcatcaagcggtttcacaaaacgcatatcgaccagcgtggcgttc
agcgattcggcgactttcgccgcttctggcatcagcgtaccaaagttaaggatcgccagtttct
cgccacgacgcttcacaatgcctttgccaattggtagttttttccagcggcgtcagttccacgcc
gaccgcgttgccacgcgggtagcggcaccgctgacgggccatcgttatagtgatagccggtatag
agcatctggcgacattcgttttcatcgctcgggggtcataatgaccatttccggtatgcagcgca
ggtaagagagatcaaaagcaccctgatgggtttgaccgtcagcaccaacaatgcccgcgcggtc
gatggcgaacaggaccggaagcttttgaatcgccacgtcatgcagcacctgatcataggcgcgt
tgcaggaaagtggagtaaatcgcgacaatgggtttgtacccaccaatcgccagacccgcagcaa
aggtcaccgcgtgttgctcggcaattgccacgtcgaagtagcgatccgggaatttacgtgaaaa
ctcgaccatgccggaaccttcacgcatcgccggagtaatcgccatcagcttgttgtctttcgct
gccgtttcgcacaacccagtcgccaaagatttttgaatagctcggcaaaccgccgctacttttcg
gcaaacaaccgctggagggatcaaatttaggcacggcgtggaaagtgatcgggtcttttttctgc
cggttcataaccacgacctttttttggtcatgatatgcaggaactgcgggcctttcaggtcgcgc
atgttctttagcgtggtgataagccccagcacatcgtgaccgtccaccgggccgatgtagttaa
agcccagcttcttcaaacaacgtgccaggcactaccatgcctttaatatgttcttcggtccgttt
gagcagctctttaattggcggcacgccagagaaaaacttttttcccgccttcgcgccgtgcagag
taaagcttaccggaaagcagctgtgccagatggttgttgagcgcgccgacatttttcggaaatcg
acatttcattgtcgttgagaatcaccagcatatcaggacggatatcgcccgcgtgattcatcgc
ttcaaacgccatgcctgcggtaatcgcgccatcgccaatgacacagacggtgcggcgatttttg
ccttcttttttcggcagcaacgcaataccaattccggcactgatggaggttgatgaatgcccga
cgcttaatacgtcatattcgctttcgccgcgccacgggaacgggtgcagaccgccttctgacg
gatggtgccgattttgtcgcggcgtccggtcaaaattttatgcggatcagcctgatgccccaca
tcccaaatcaattggtcaaacggggtgttgtagacatagtgcagcgccacggtcagttcgaccg
tgcccagcccggaggcgaagtgccccgctggaacggctcacgctgtcgagtaaatagcggcgcag
ttcgtcgcagagtttcggtaaactctctttcggcaacagtcgtaactcctgggtggagtcgacc
agtgccagggtcgggtatttggcaatatcaaaactcatgttttttacctcctaagggcgaatg
cagttagacatatcatcagctggttaatcgggaaagggtcaatcagcagcagtttgatcgggttt
tcagttcgcgtagtctgggcgacccagaccatcgccatactggtaggtgcagtgggaaacacgtg
ccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcagggtggagtcgctaacgcgttcacg

圖45A

attcatcttttccattcggcgtcgatcagtttacgcagttcttcgcgggcctgttcctcgctg
gtaccatcgttttcgtgcatgtagctaatgatagaattggtagtctcgccacgttccagctccg
ccgccagaggtggccagatcgttgcacaggcggaagataacgcagctagaacgcaccagaccatg
gaagtcggtcagggaacgcagcgcgtggtcggagatgtcttcctgctgctggcatacggaaaag
taagacggcgccagcagcgctacaccggaggaggaaacgctggcgttttccaggtacttggaga
aagccgggataatttttgttgttggaccatttcgcctcttgcagaaaggctttgcacagttcacg
ccagcttttcgtcagataggacaggttgttatgacctttctctttcagaatagaataggacgtg
tcgttaacggtgttgtacagtgccaggaaaacacagtttcatatagtccggcagggtgttaatag
cgttaacgtcccagcgctctacagcatcggtgaacagttgcagttcgtccagagtgccataaac
gtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagaccaaacattttagtaacagctttgcgacattca
ccaaactgcgggtctggcgccatacccagtgcccagaaataaacttccatcaggcggtcgcgta
caaaatccagtttgctagccaggcccatctcggtccaccagcgggacagatcttgcagctcttt
ctggtgcagggtctgtaccatgttaaaatccagcttcgccagctccagcagcagctggtgatgc
ggttctttcggttcgtatttatccaggaaccaacgtgcctccagacggtgcagacgctggtgat
atggcagttccagggcgtggctcacttgttctgcaaccttggtattaatgccttctttcaggtt
gttcttcaggtgggtgatggaaaaggtacgcgcctcctccagcaggttctcaccctcgaaaccc
aggtaagacgcttcatacaggctcagcaggccttggacgtcacctttcagttcaccgctgaaac
cacctttttatcctttgaaacgctcaaaaacatcctgagaaacctcgaaaccgtgctgacgcag
cagacggaaagaccagagcggttgcgtgcaggtcagatttgttcttttgttttcgtccagcagt
acgatgttttccagggctttaatgatgtcttttttcaaatttgtaggtcagacccaggcgctgca
catcgtcgatcagctccagcagggacagcggctgggtgtctacacggttgatcatgcagcgaac
ttcttcctccagtttggtcgctttctcctccagcttttccactttcaggtcgttctccagggat
tgcaggaattcgaaattccacaggtttggctgatagtttgcggaacgacgggaattatgctcgg
taatctgagtaaattgagaagaggtcgcacacatggtttattcctccttatttaatcgatacat
taatatacctcttttaatttttaataataaagttaatcgataattccggtcgagtgcccacac
agattgtctgataaattgttaaagagcagtgccgcttcgcttttttctcagcggcgctgtttcct
gtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacattatacgagccggatgattaattgtcaaca
gctcatttcagaatctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgc
gcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttc
acaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccga
cacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcg
attactcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatatctcccaatttt
gtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggctgt
gagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcgtcggct
tgaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggaca
aattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtc
tagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggcaggcgctccattgcccagtcggcagcgac
atccttcgggcgcgatttgccggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactaca
tttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcct
caaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacctaccaaggcaac
gctatgttctcttgcttttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaag
atacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataac
gccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctc
tccagcggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagc

圖45B

cttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcgg
agccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctc
tgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaactttgttttaggg
cgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaac
gcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagactgtaccccaaaaaacagtcataacaagccat
gaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgag
cgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgcct
tcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttct
gtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttg
ctgttctttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaagacctc
ggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggttttct
ggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggt
ttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtgcgggagggcaagg
gctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcgagcagggaa
ttaattcccacgggttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcaga
atcgcagatccggcttcagccggtttgccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatga
ttttttccccacgggaggcgtcactggctcccgtgttgtcggcagctttgattcgataagcagc
atcgcctgttttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaa
tttcatgttctcgttgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttc
atctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagc
tctgatgtatctatctttttacaccgttttcatctgtgcatatggacagttttcccttigata
tgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaag
agccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggttcgttgttt
ttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaatttt
gcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtccgt
tatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtattttgtcaccattcatttttatctggtt
gttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatca
gtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttta
ttggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatggtagttatttcaagcattaacat
gaacttaaattcatcaaggctaatctctatatttgccttgtgagtttctttttgtgttagttct
ttttaataccactcataaatcctcatagagtatttgtttttcaaaagacttaacatgttccagat
tatattttatgaatttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcactaaaaactaattc
taatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaa
ggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccataag
cattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttc
tttccttgtagggtttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggttt
tcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacgactaattcag
acatacatctcaattggtctaggtgatttttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatg
ataattactagtccttttcctttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagacctttgctgga
aaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctagacctttgtgtgttttttttgttt
atattcaagtggttataatttatagaataaagaaagaataaaaaaagataaaaagaatagatcc
cagccctgtgtataactcactactttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacg
ctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagct
cgggcaaatcgctgaatattccttttgtctccgaccatcaggcaccctgagtcgctgtctttttc

圖45C

Gtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgaatggggtaaatggcactacaggcg
cctttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctca
gggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgc
cctctgattttccagtctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatg
cacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta

SEQ ID NO:21

圖45D

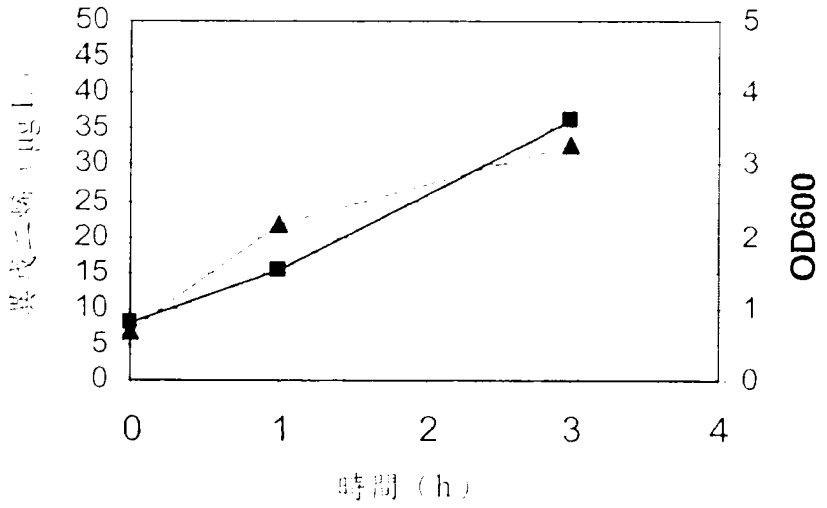


圖46A

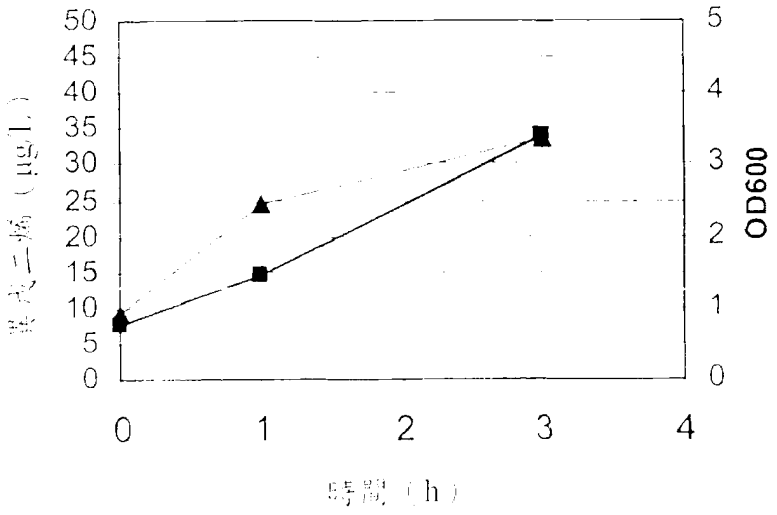


圖46B

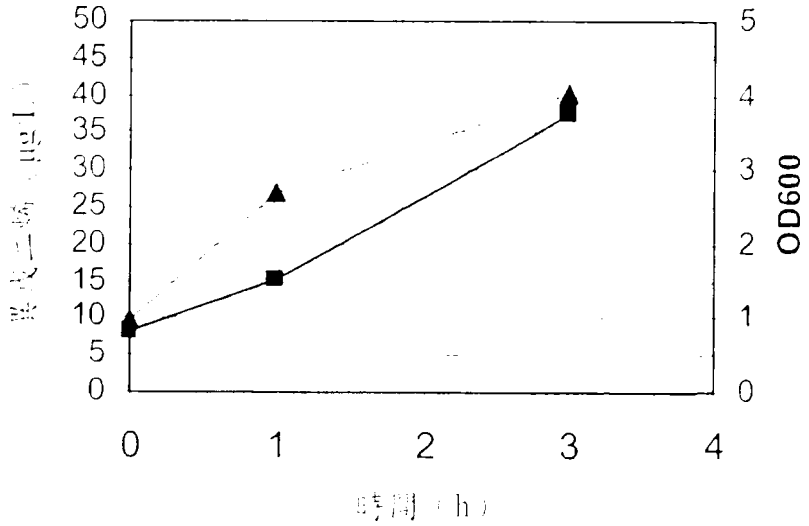


圖46C

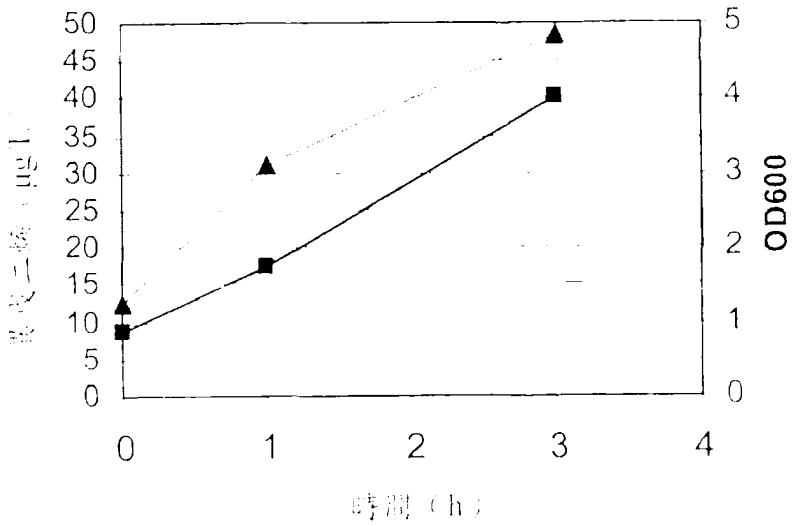


圖46D

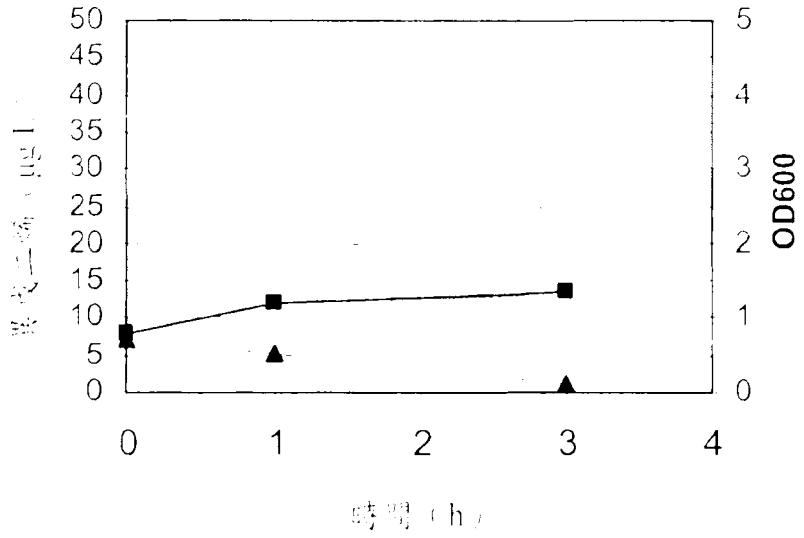


圖46E

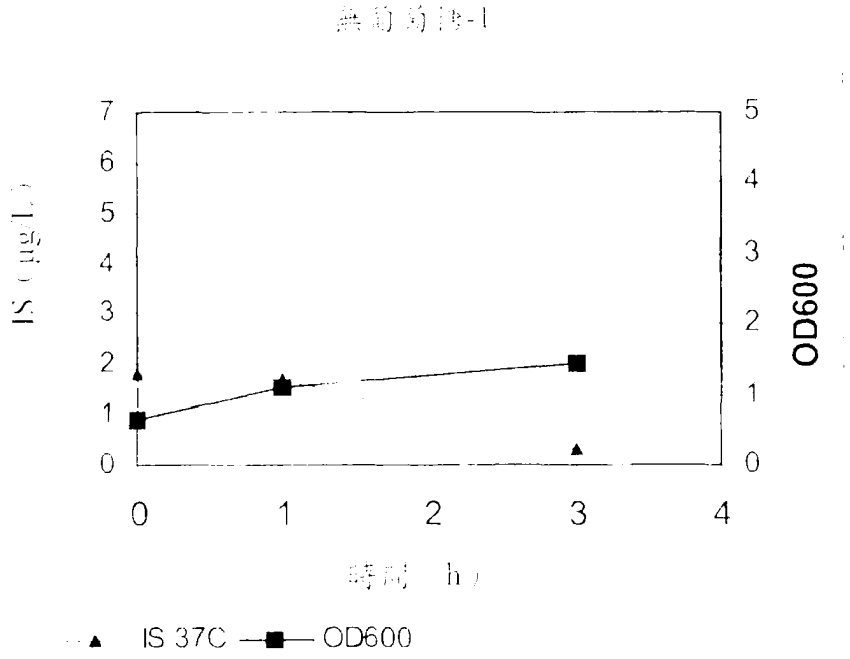


圖47A

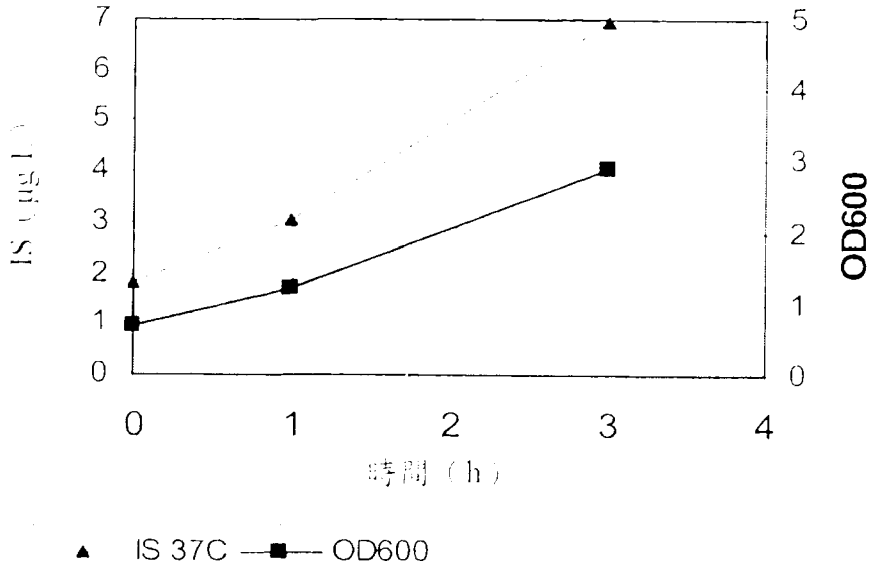


圖47B

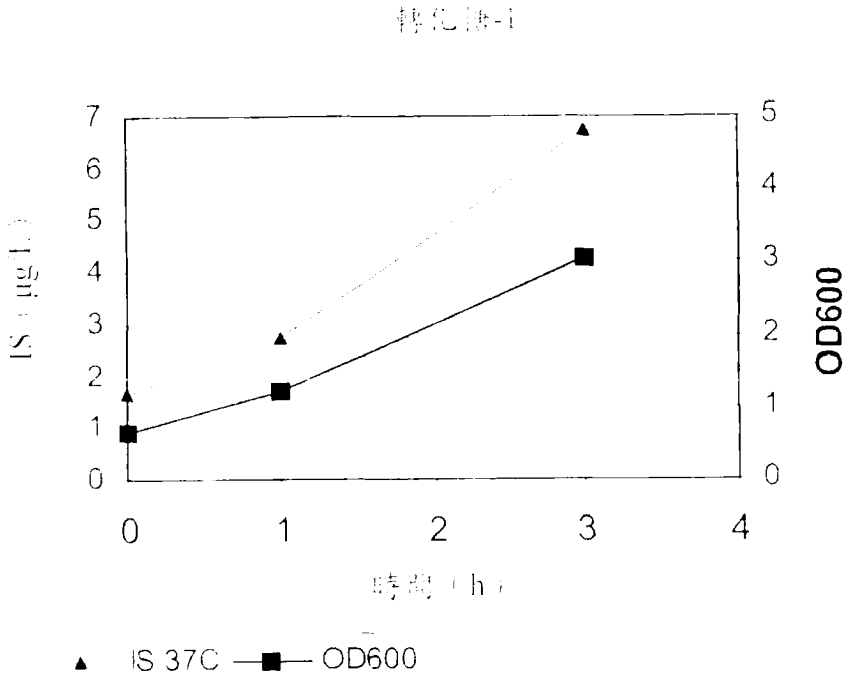


圖47C

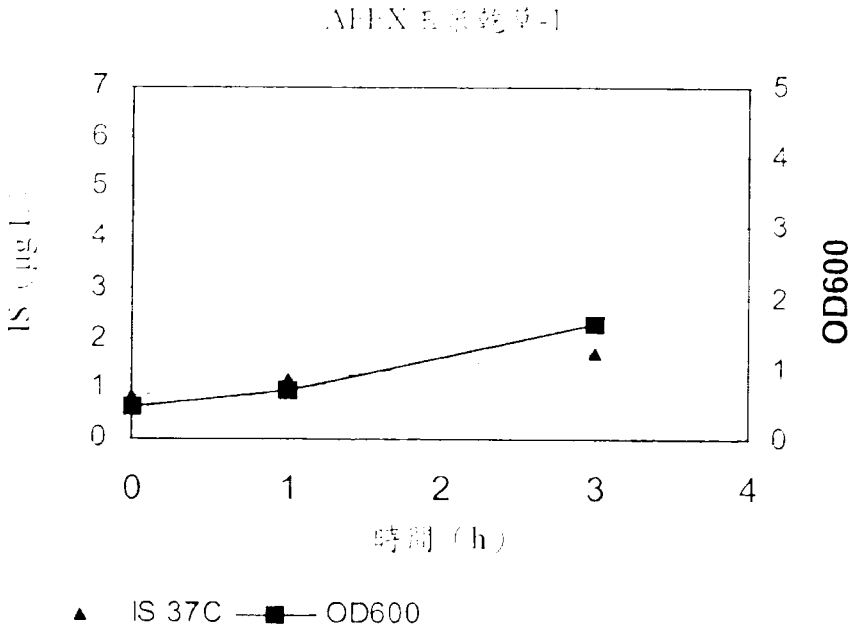


圖47D

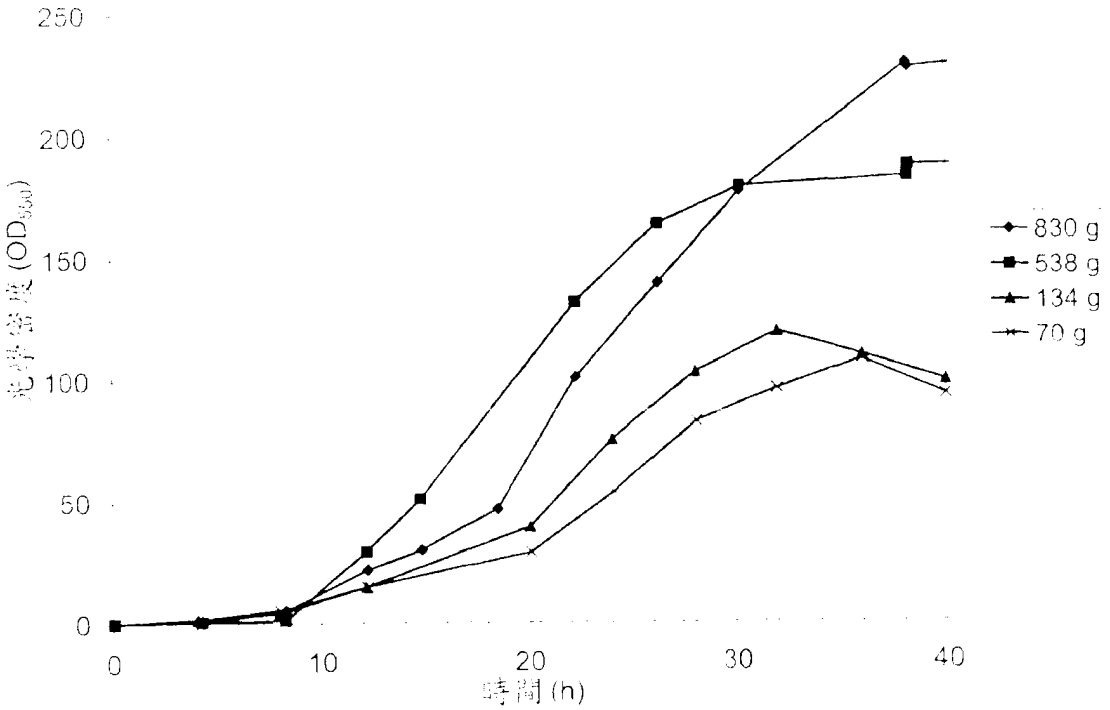


圖48A

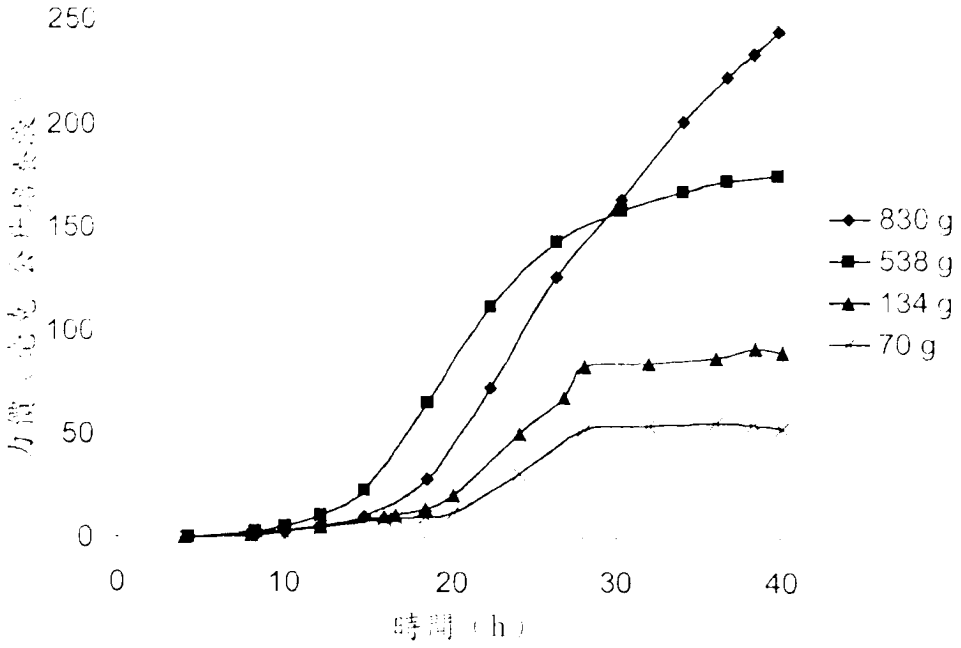


圖48B

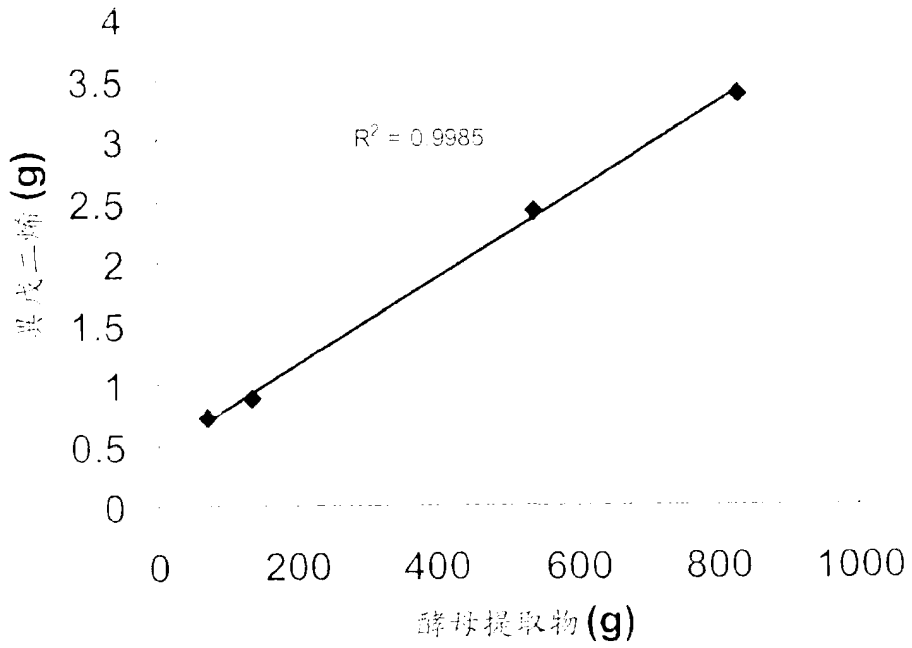


圖48C

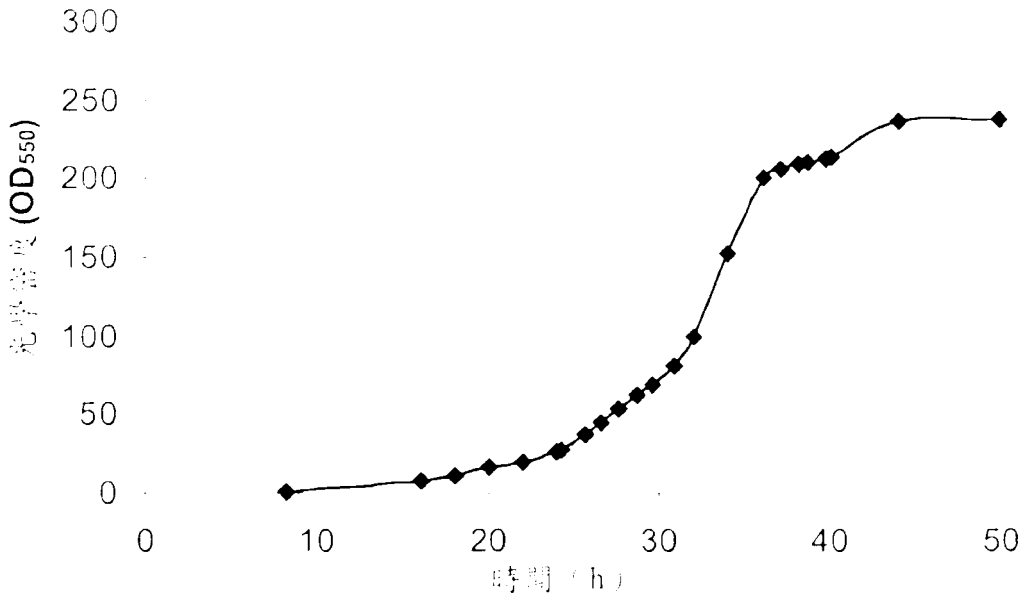


圖49A

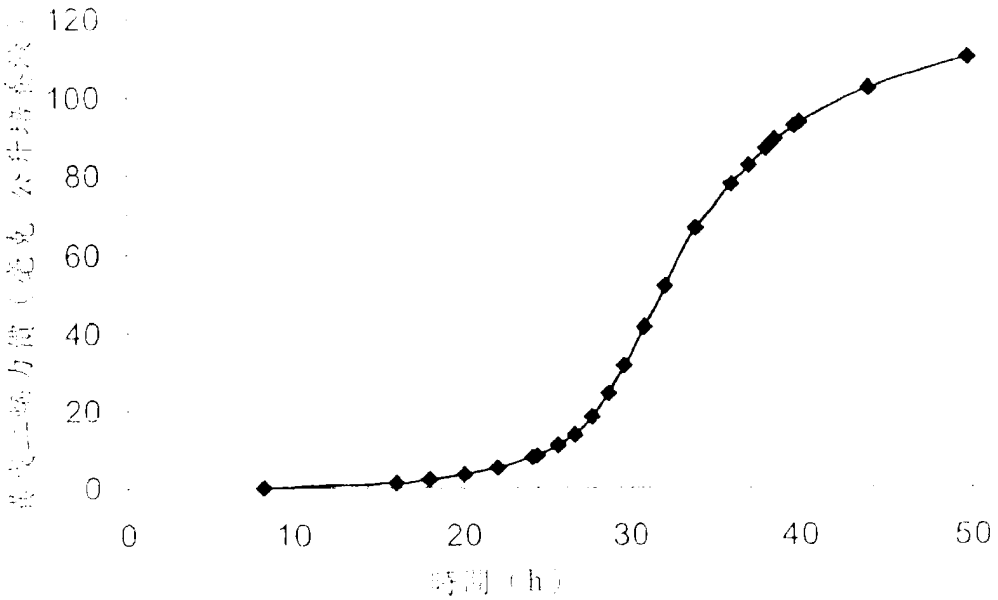


圖49B

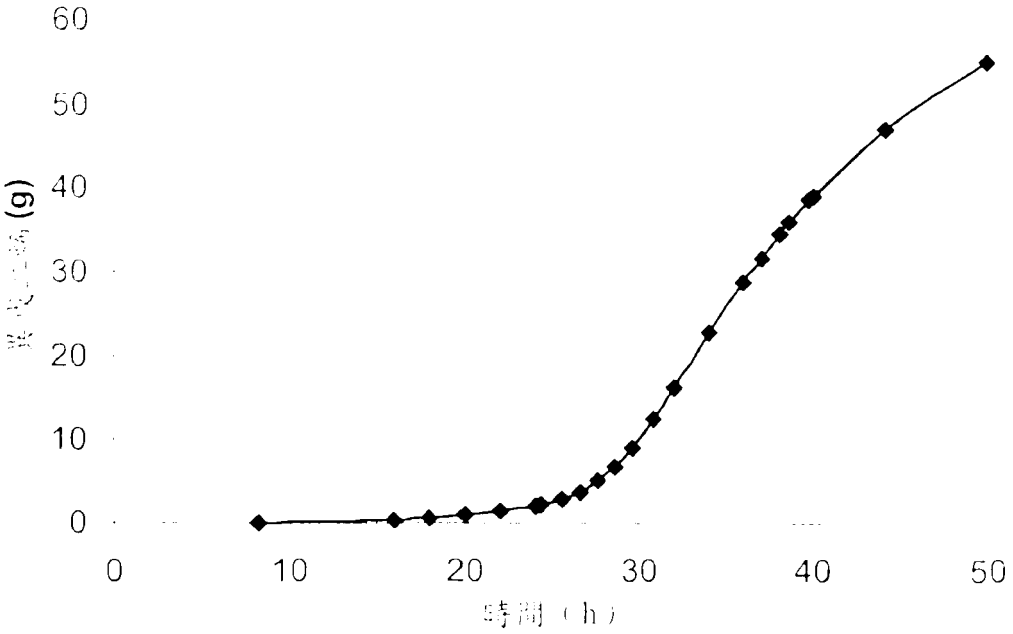


圖49C

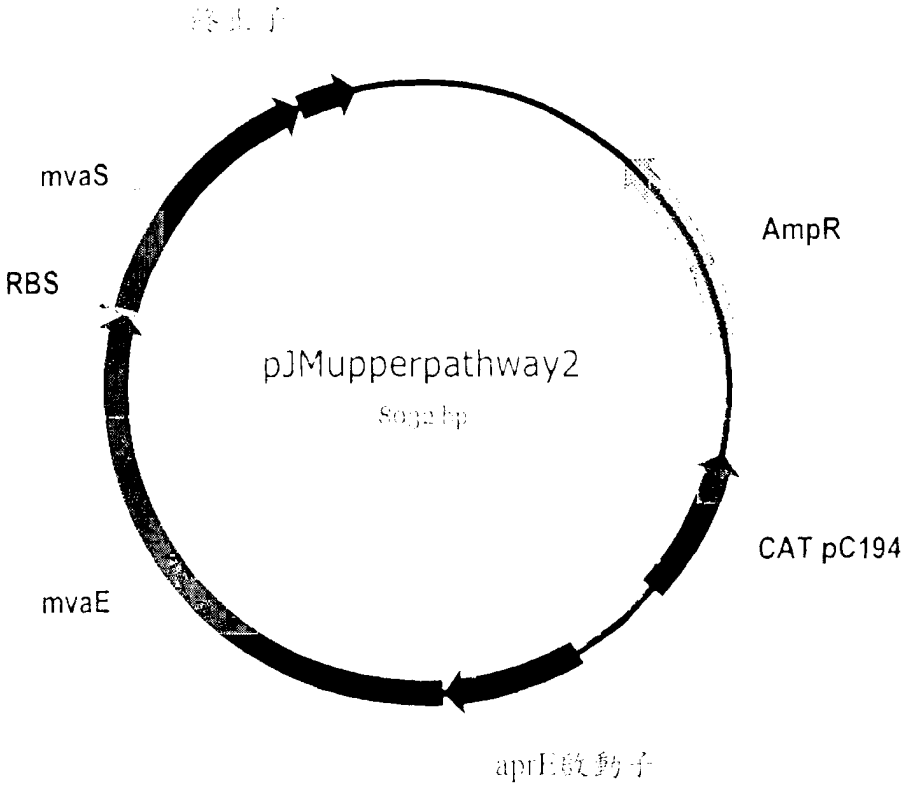


圖50

5'-

tcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggt
tatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccag
gaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcac
aaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttc
cccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgc
ctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtg
taggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgcct
tatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc
cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtgg
cctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttacct
tcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttt
tgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttct
acggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaa
aaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatata
tgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgt
ctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggct
taccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatc
agcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctcc
atccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgca
acgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcag
ctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagc
tccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatgg
cagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagta
ctcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaata
cgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcgg
ggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacc
caactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaa
aatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttc
aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtattta
gaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaa
accattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgc
gtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtct
gtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcgg
ggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatagatctggagctg
taatataaaaaccttcttcaactaacggggcaggttagtgacattagaaaaccgactgtaaaaa
gtacagtcggcattatctcatattataaaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaat
tgagttcataaacaatcctgcatgataaccatcacaaacagaatgatgtaacctgtaaagatagc
ggtaaatatattgaattacctttattaatgaatttttcctgctgtaataatgggtagaaggtaat
tactattattattgatatttaagttaaacccagtaaatgaagtccatggaataatagaaagaga
tttaagcatttttcaggtataggtgttttgggaaacaatttcccctgaaccatttatattttctaca
ttcagaaaggtataaatcataaaactctttgaagtcattctttacaggagtccaaataccagaga
atgttttagatacaccatcaaaaattgtataaagtggctctaacttatcccaattaaccttaactc
tccgtcgctattgtaaccagttctaaaagctgtatttgagtttatcacccttgtcactaagaaa
atcaaatgcagggtaaaatttatatccttcttgttttatgtttc

圖51A

ggtataaaacactaatatcaatttctgtggttatactaaaagtcgtttgttggttcaaataatg
attaaatatctcttttctcttccaattgtctaaatcaattttattaaagttcatttgatatgcc
tcctaaatttttatctaaagtgaatttaggaggcttacttgtctgctttcttcattagaatcaa
tcctttttttaaaagtcaatattactgtaacataaatatattttttaaaaatatcccacttttatc
caatttttcgtttgttgaactaatgggtgctttagttgaagaataaaagacctatgcggtgtgaa
ataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgca
actgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatg
tgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacg
gccagtgccaagcttgcatgcctgcactccatttttcttctgctatcaaaataacagactcgtga
ttttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgcccttgcaaatcggatgcctgtctataaaatt
cccgatattggttaaacagcggcgcaatggcggccgcatctgatgtctttgcttggcgaatgtt
catcttatttcttcctcctctcaataatttttttcattctatccctttttctgtaaagtttattt
ttcagaatacttttatcatcatgctttgaaaaaatatcacgataatatccattgttctcacgga
agcacacgcaggtcatttgaacgaatttttttcgacaggaatttgccgggactcaggagcattta
acctaaaaaaagcatgacatttcagcataatgaacatttactcatgtctatttttcgttctttttct
gtatgaaaatagttatttcgagtctctacggaaatagcgagagatgatatacctaaatagagat
aaaatcatctcaaaaaaatgggtctactaaaatattattccatctattacaataaattcacaga
atagtcttttaagtaagtctactctgaatttttttaaaaggagagggtaaagagtgaaaacagt
agttattattgatgcattacgaacaccaattggaaaatataaaggcagcttaagtcaagtaagt
gccgtagacttaggaacacatgttacaacacaacttttaaaaagacattccactatttctgaag
aaattgatcaagtaatctttggaaatgttttacaagctggaaatggccaaaatcccgcacgaca
aatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaattcccgcaatgacggttaatgaggtctgcgga
tcaggaatgaaggccgttattttggcgaaacaattgattcaattaggagaagcggaagttttaa
ttgctggcgggattgagaatatgtcccaagcacctaaattacaacgttttaattacgaaacaga
aagctacgatgcgccttttttctagtatgatgtatgatggattaacggatgcctttagtggtcag
gcaatgggcttaactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaagatc
aattttctgtacattcacaattaaaagcagctcaagcacaagcagaagggatattcgctgacga
aatagccccattagaagtatcaggaacgcttgtggagaaagatgaagggattcgccctaattcg
agcgttgagaagctaggaacgcttaaaacagtttttaaagaagacggtactgtaacagcaggga
atgcatcaaccattaatgatgggcttctgctttgattattgcttcacaagaatatgccgaagc
acacggtcttccttatttagctattattcgagacagtgtggaagtcggtattgatccagcctat
atgggaatttcgccgattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaacttactacggaag
aaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgcagcaacttcaatcgtggtccaaagagaact
ggctttaccagaggaaaaggtcaacatttatggtggcggtatttcattaggtcatgcgattggt
gccacaggtgctcgtttattaacgagtttaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaatatg
gagtggcttctttatgtatcggcggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcagca
aaaaaaaaacagccgatttttatcaaatgagtcctgaggaacgcctggcttctcttcttaatgaa
ggccagatttctgctgatacaaaaaaagaatttgaaaatacggctttatcttcgcagattgcca
atcatatgattgaaaatcaaatcagtgaaacagaagtgccgatgggcgttggcttacatttaac
agtggacgaaactgattatttggtaccaatggcgacagaagagccctcagttattgcggctttg
agtaatggtgcaaaaatagcacaaggatttaaaacagtgaatcaacaacgcttaatgcgtggac
aaatcgtttttacgatgttgcagatcccgagtcattgattgataaactacaagtaagagaagc
ggaagtttttcaacaagcagagttaagttatccatctatcgttaaacgggcggcggcttaaga
gatttgcaatatcgtactttgatgaatcatttgtatctgtcgacttttagtagatgttaagg
atgcaatgggcgcctatcgttaacgctatgttggaaggtgtg

圖51B

gccgagttgttccgtgaatggtttgcggagcaaaagattttattcagtattttaagtaaattatg
ccacggagtcggttgttacgatgaaaacggctattccagtttcacgtttaagtaaggggagcaa
tggccgggaaattgctgaaaaaattgttttagcttcacgctatgcttcattagatccttatcgg
gcagtcacgcataacaaaggaatcatgaatggcattgnaagctgtagttttagctacaggaaatg
atacacgcgctgttagcgcttcttgtcatgcttttgcggtgaaggaaggtcgctaccaaggctt
gactagttggacgctggatggcgaacaactaattggtgaaatttcagttccgcttgctttagcc
acggttggcggtgccacaaaagtcttacctaaatctcaagcagctgctgatttgttagcagtga
cggatgcaaaagaactaagtcgagtagtagcggctgttggtttggcacaaaatttagcggcgtt
acgggccttagtctctgaaggaattcaaaaaggacacatggctctacaagcacgttctttagcg
atgacggtcggagctactggtaaagaagttgaggcagtcgctcaacaattaaaacgtcaaaaaa
cgatgaaccaagaccgagccatggctattttaaatgatttaagaaaaacaataaaaggagagggt
gacaattgggattgataaaattagttttttgtgccccttattatattgatatgacggcactg
gctgaagccagaaatgtagaccctggaaaatttcatattggtattgggcaagacaaatggcgg
tgaacccaatcagccaagatattgtgacatttgcagccaatgccgcagaagcgatcttgaccaa
agaagataaagaggccattgatatggtgattgtcgggactgagtccagtatcgatgagtcaaaa
gcggccgcagttgtcttacatcgtttaatggggattcaaccttcgctcgctctttcgaaatca
aggaagcttgttacggagcaacagcaggcttacagttagctaagaatcacgtagccttacatcc
agataaaaaagtcttggtcgtagcggcagatattgcaaaatatggcttaaattctggcggtgag
cctacacaaggagctgggcggttgcaatgttagttgctagtgaaccgcgcattttggctttaa
aagaggataatgtgatgctgacgcaagatatcatgacttttggcgtccaacaggccacccgta
tcctatggtcgatggtcctttgtcaaacgaaacctacatccaatcttttgcccaagtctgggat
gaacataaaaaacgaaccggtcttgattttgcagattatgatgctttagcgttccatattcctt
acacaaaaatgggcaaaaaagccttattagcaaaaatctccgaccaaactgaagcagaacagga
acgaattttagcccgttatgaagaaagtatcgtctatagtcgtcgcgtaggaaacttgtatacg
ggttcactttatctgggactcatttccctttagaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatc
aaattggtttattcagttatggttctggtgctgtcgctgaatttttcactggtgattttagtagc
tggttatcaaaatcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggaagaacctt
tctatcgctgaatatgaagccatgtttgcaggaactttagacacagacattgatcaaacgttag
aagatgattaaaatatagtatttctgctattaataataccgttcgttcttatcgaaactaaaa
aaaaccggccttggccccgccggttttttattattttcttcctccgcatgttcaatccgctcc
ataatcgacggatggctccctctgaaaattttaacgagaaacggcgggttgacccggctcagtc
ccgtaacggccaagtcctgaaacgtctcaatcgccgcttcccggtttccggtcagccaatgcc
gtaacggtcggcggcgttttcctgataccgggagacggcattcgtaatcgggatcccccgggtac
cgagctcgaattcgtaatcatgtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaatt
ccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaac
tcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgca
ttaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcg
ctcactgac

SEQ ID NO:22

圖 51C

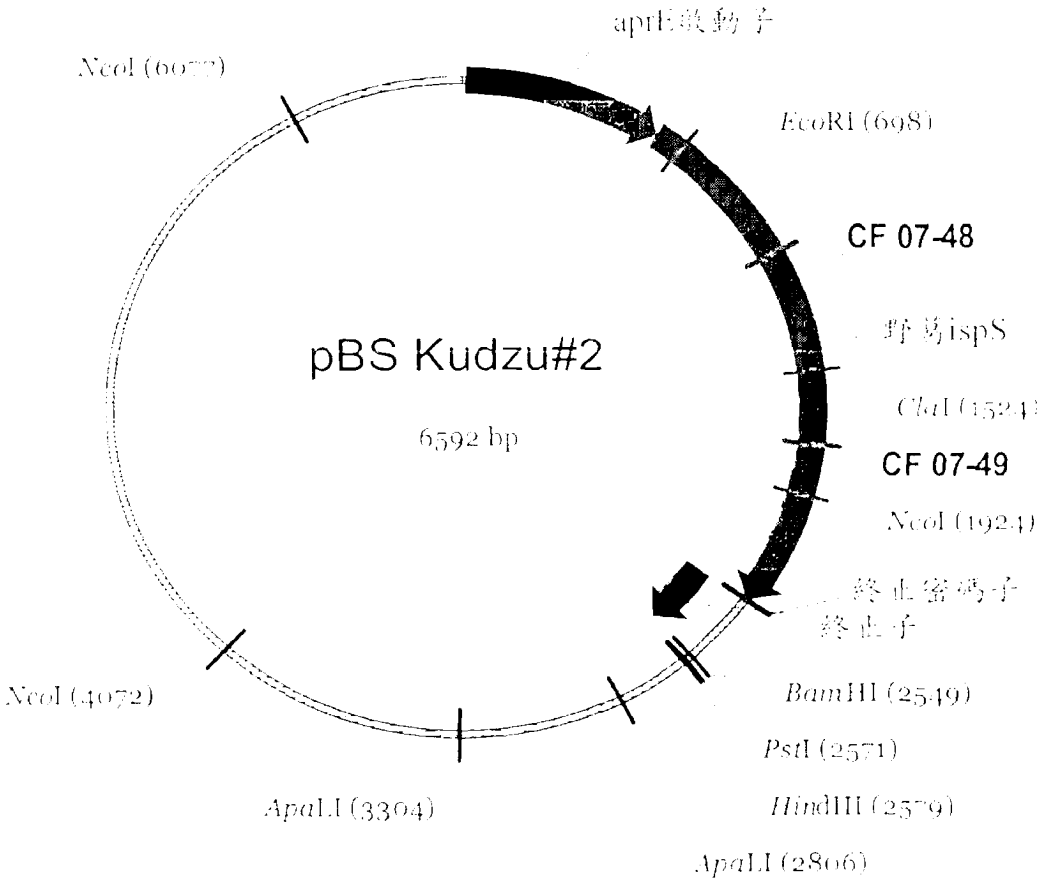

aprE啟動子
NcoI (6077)
EcoRI (698)
CF 07-48
野葛ispS
ClaI (1524)
CF 07-49
NcoI (1924)
終止密碼子
終止子
BamHI (2549)
PstI (2571)
HindIII (2579)
ApaLI (2806)
NcoI (4072)
ApaLI (3304)
pBS Kudzu#2
6592 bp

圖52

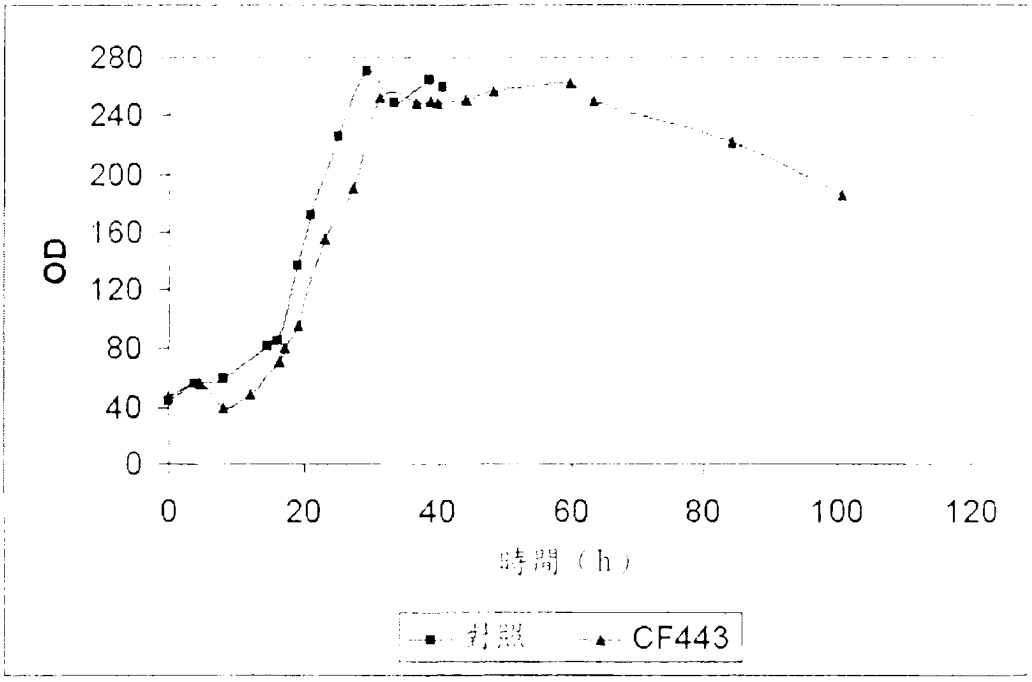


圖53A

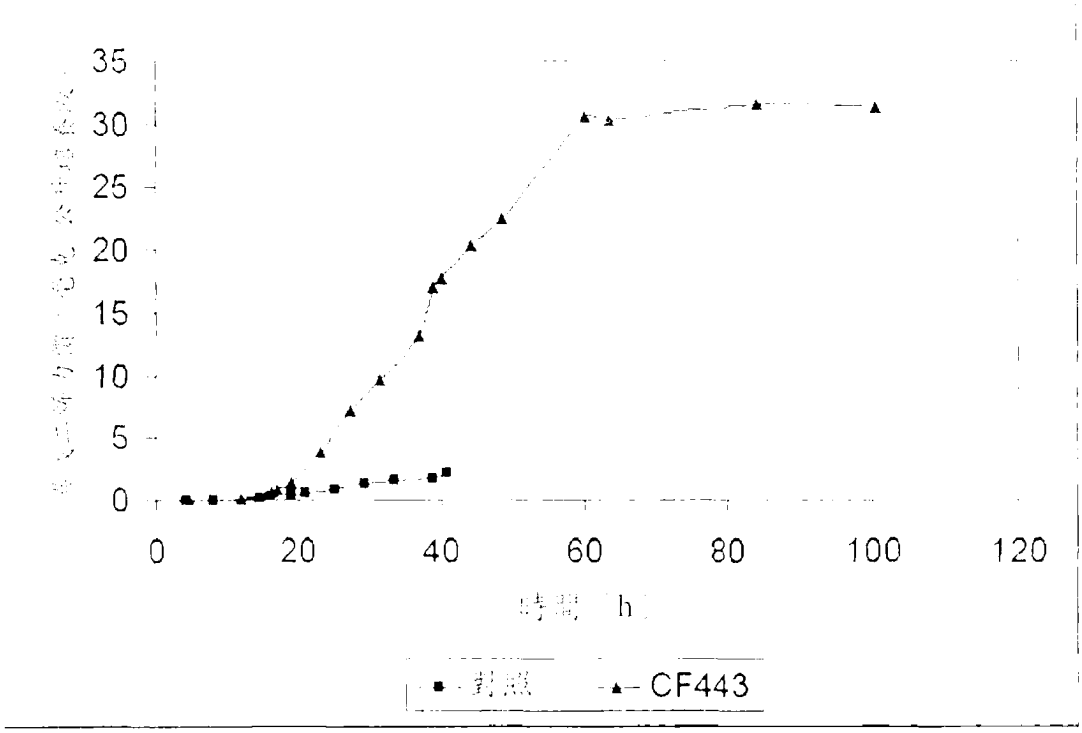


圖53B

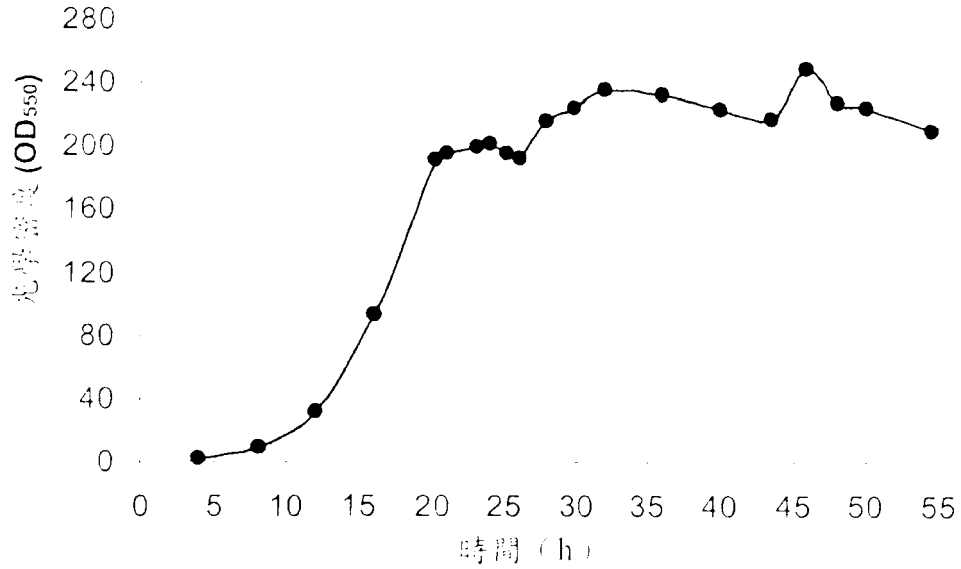

280
240
200
160
120
80
40
0
光學密度 (OD550)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
時間（h）

圖54

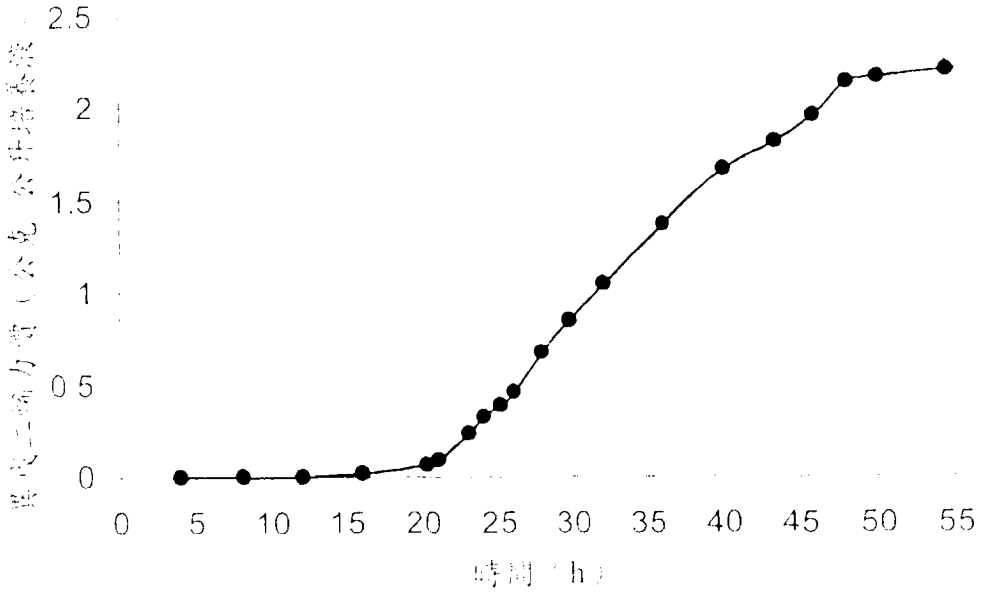


圖55

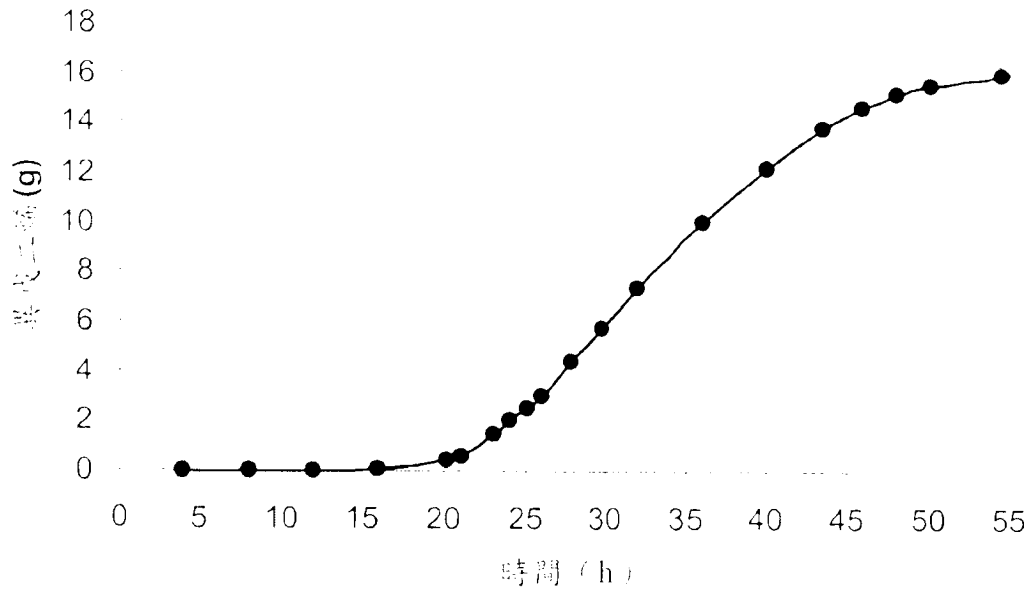


圖56

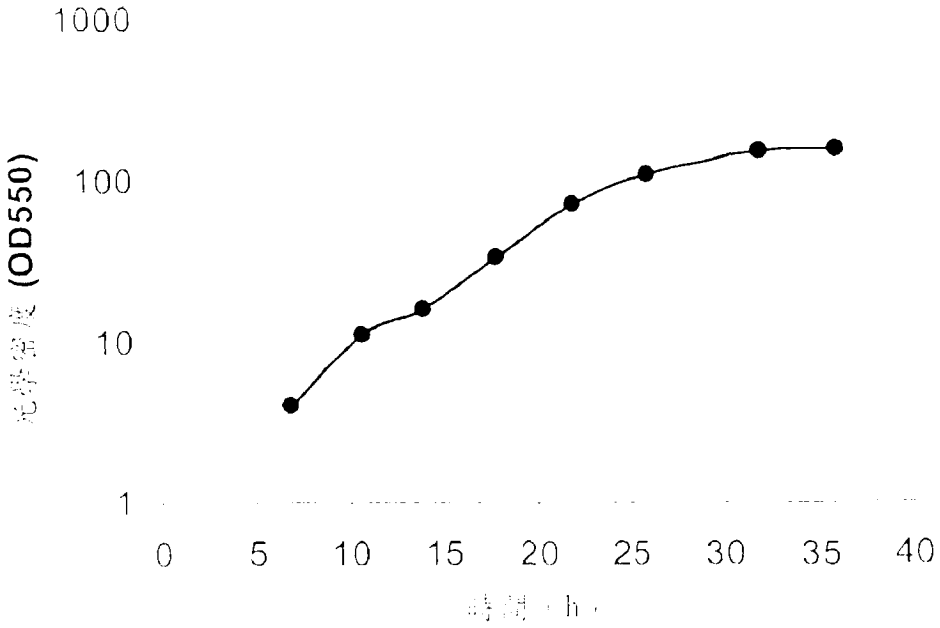


圖57

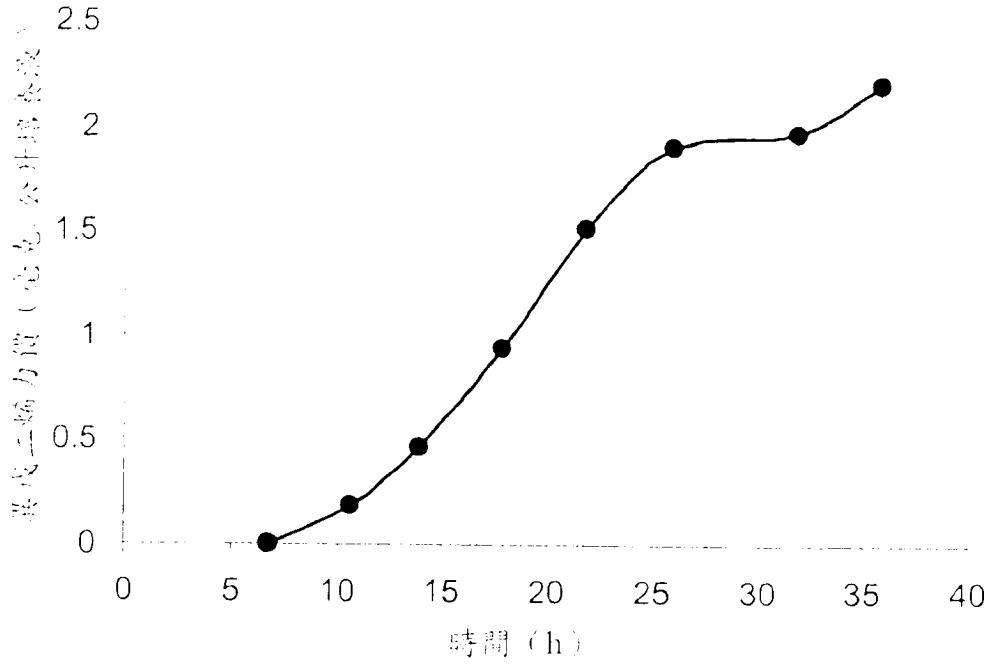


圖58

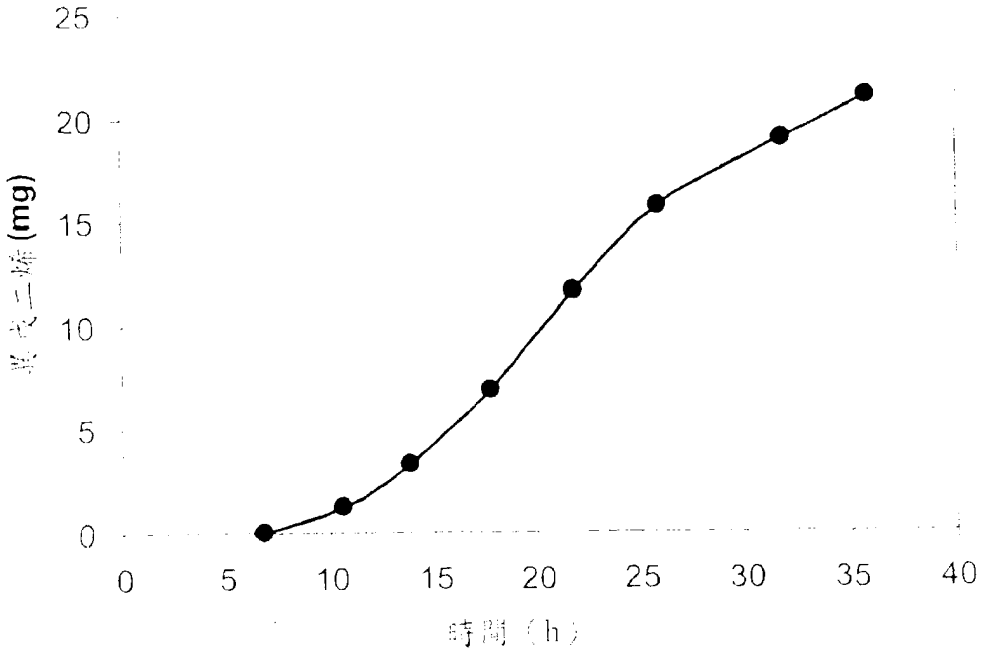


圖59

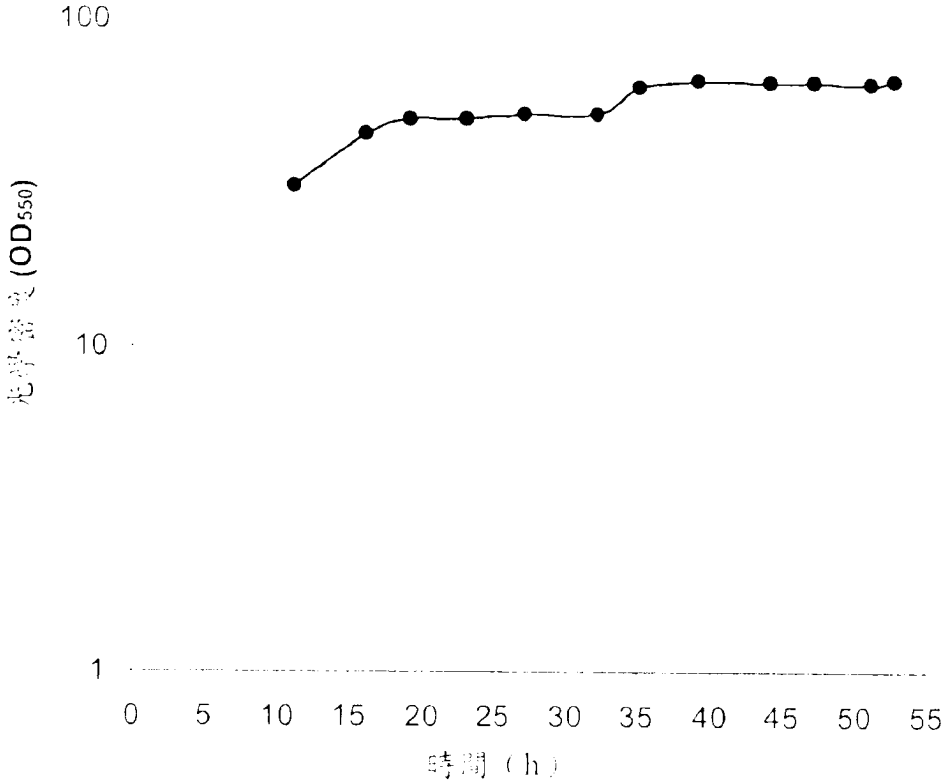


圖60A

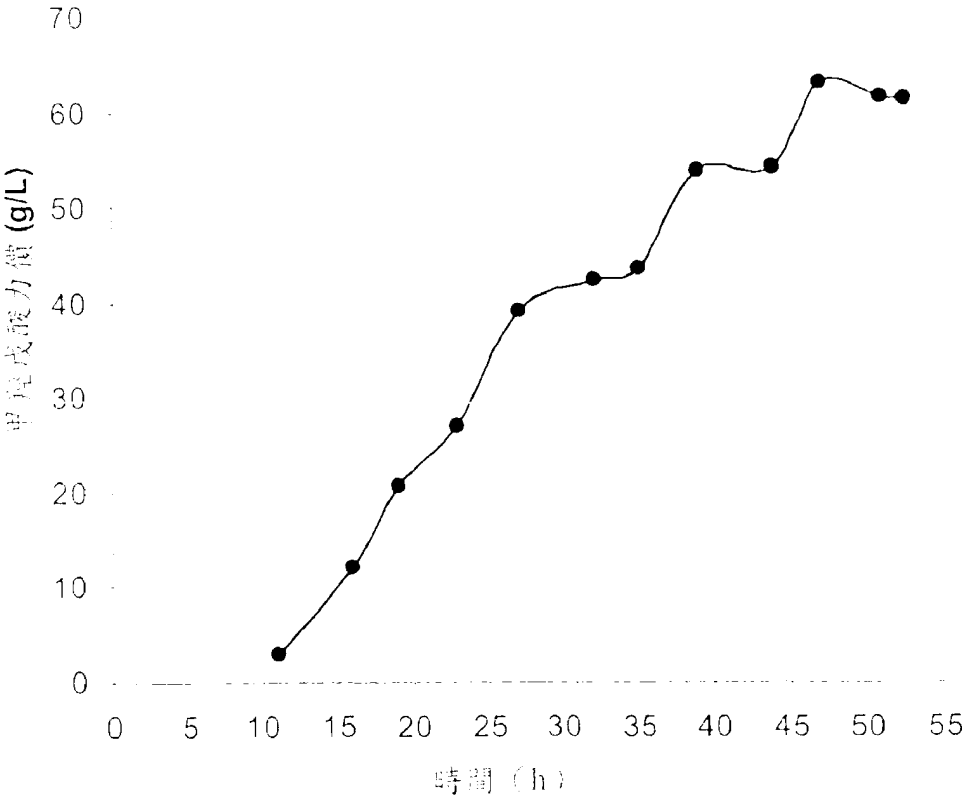


圖60B

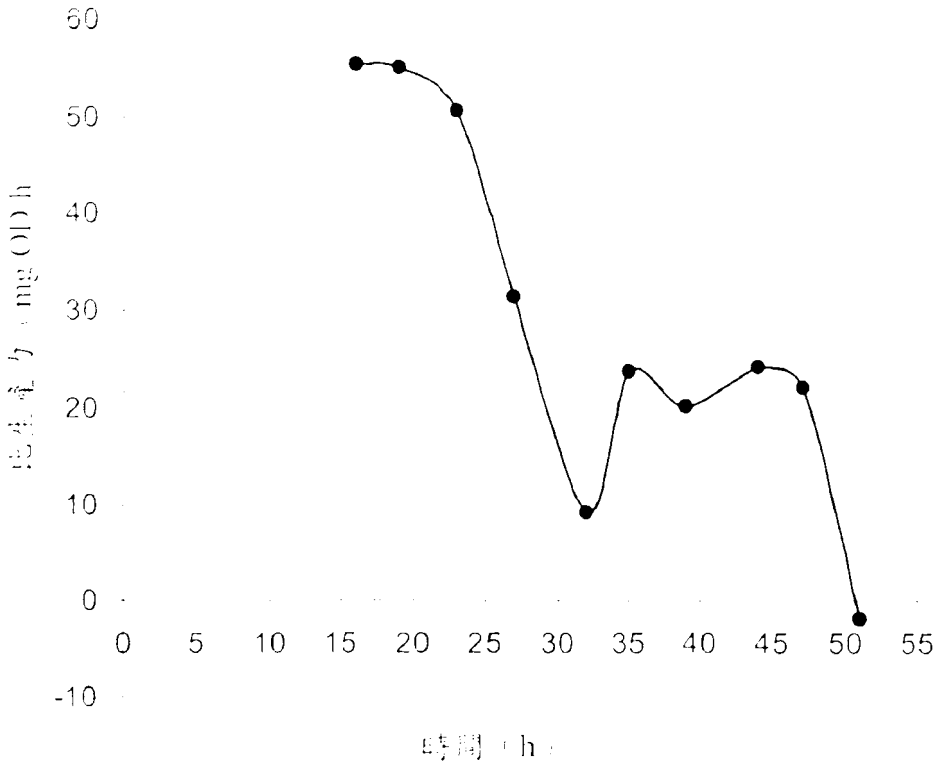


圖60C

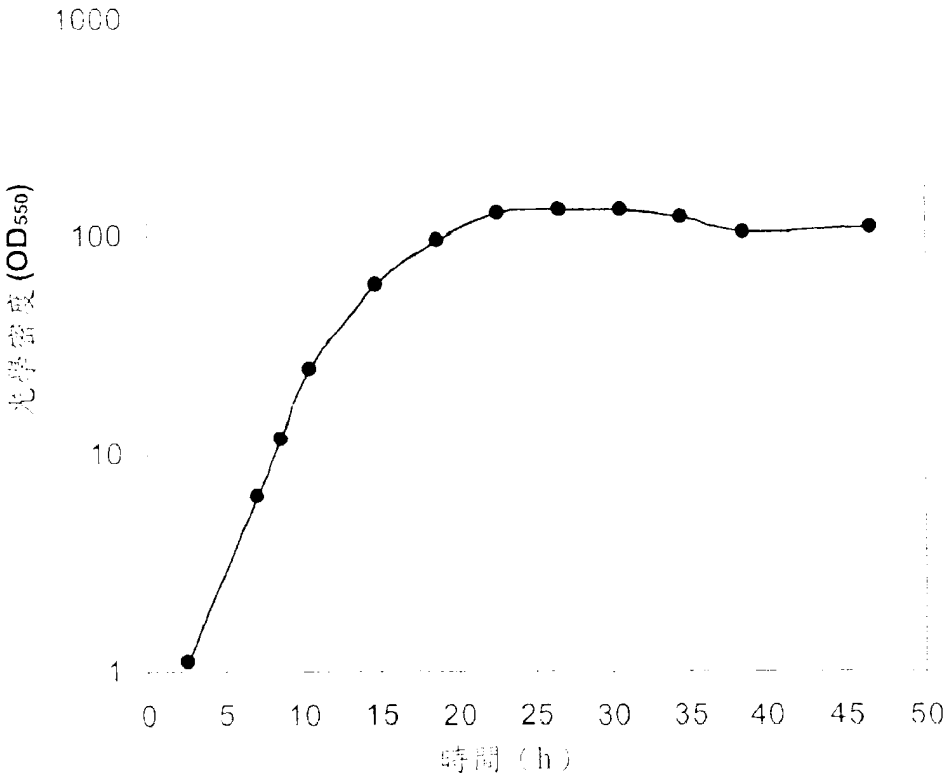


圖61A

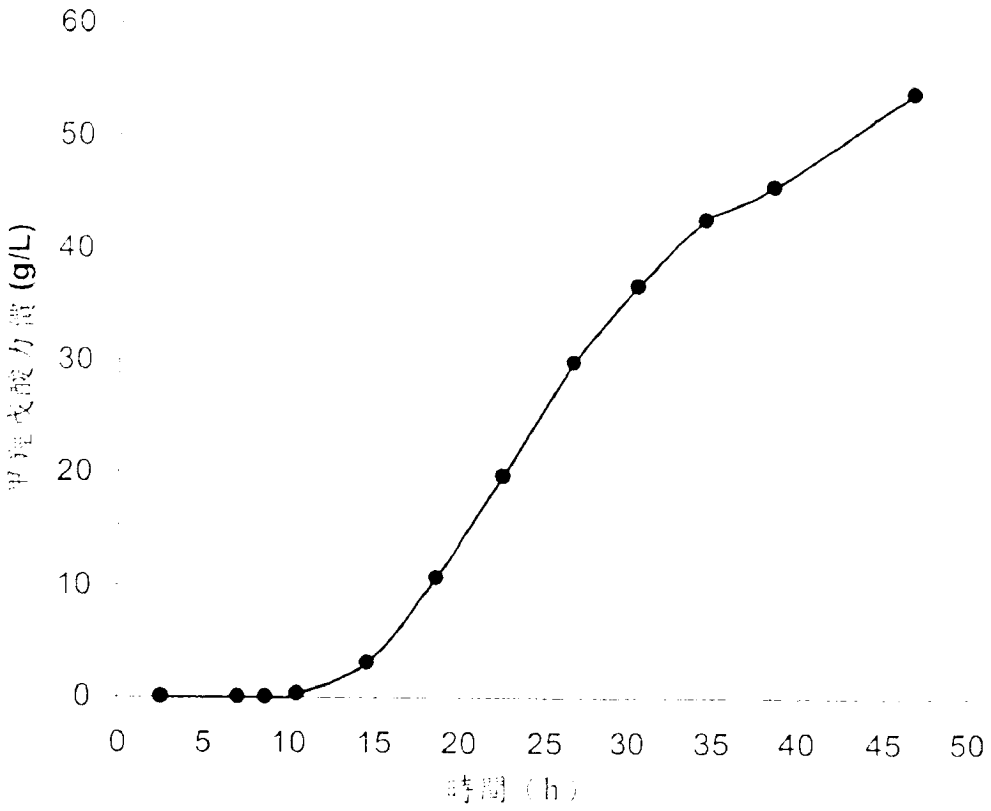


圖61B

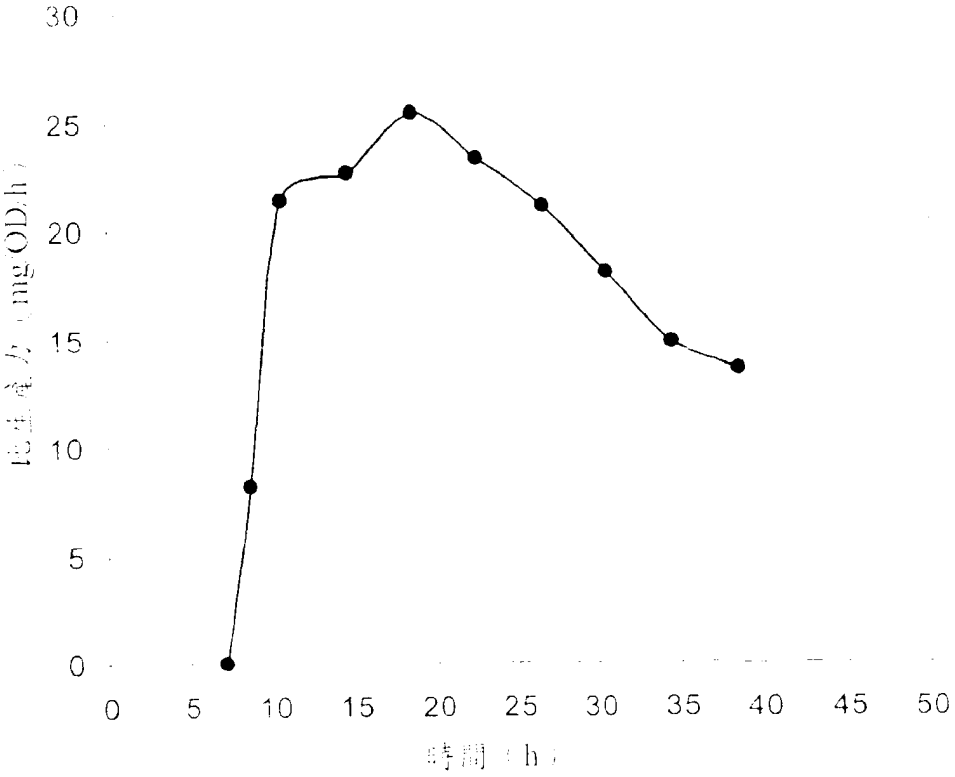


圖61C

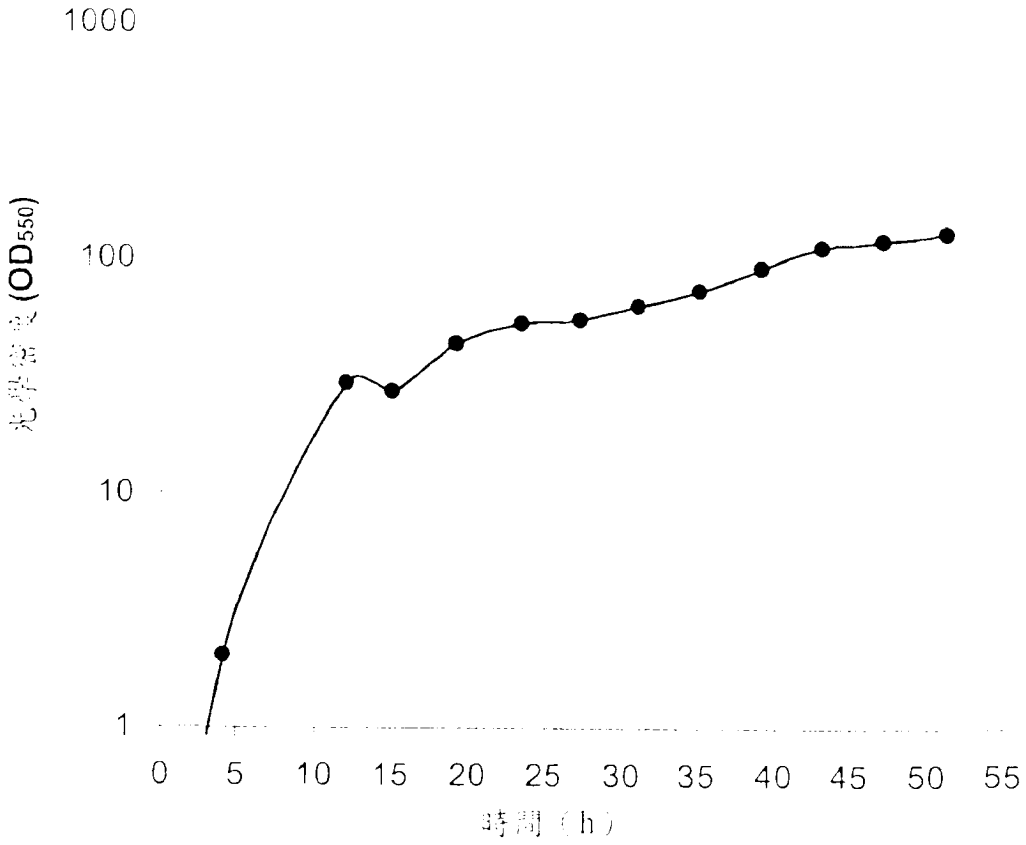


圖62A

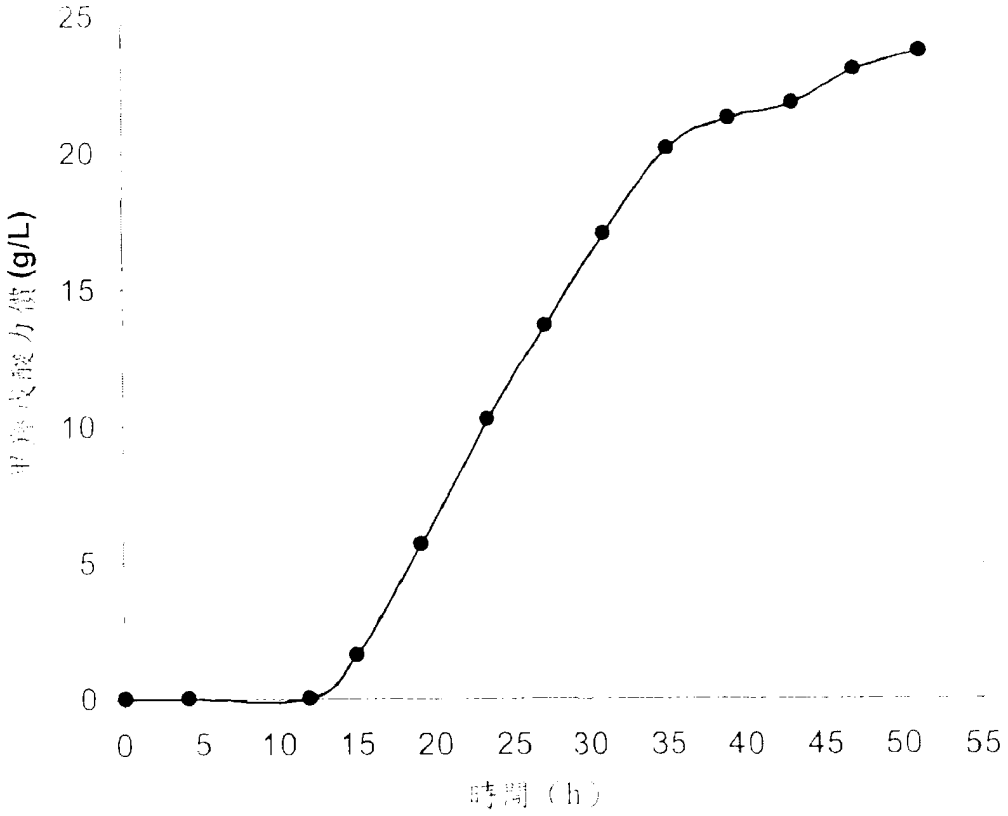


圖62B

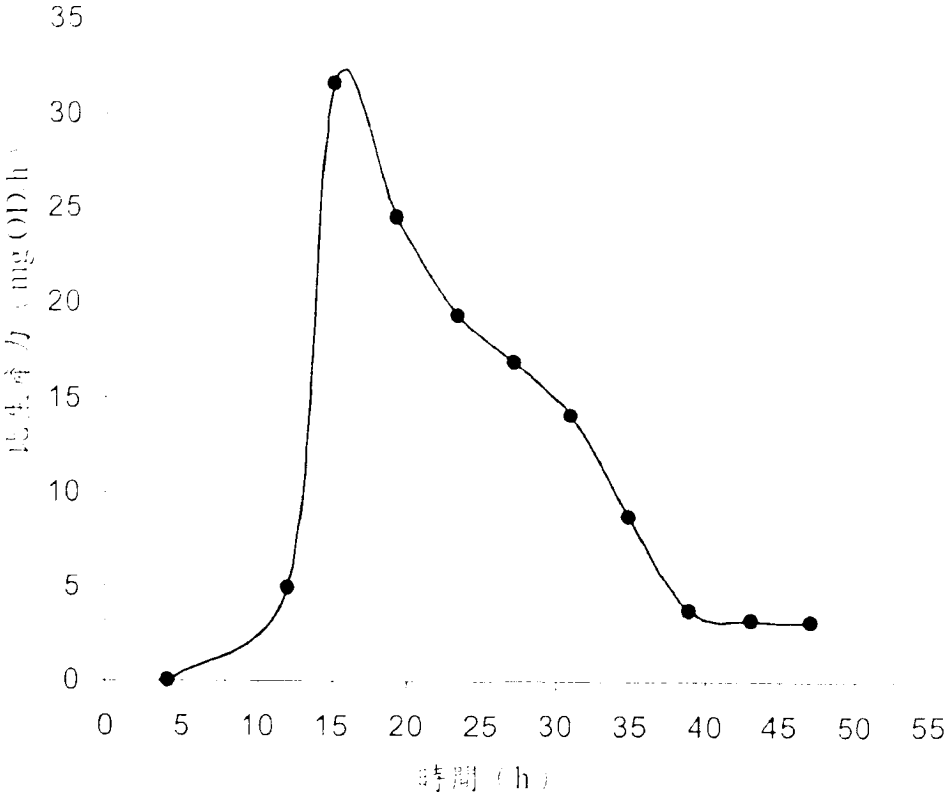


圖62C

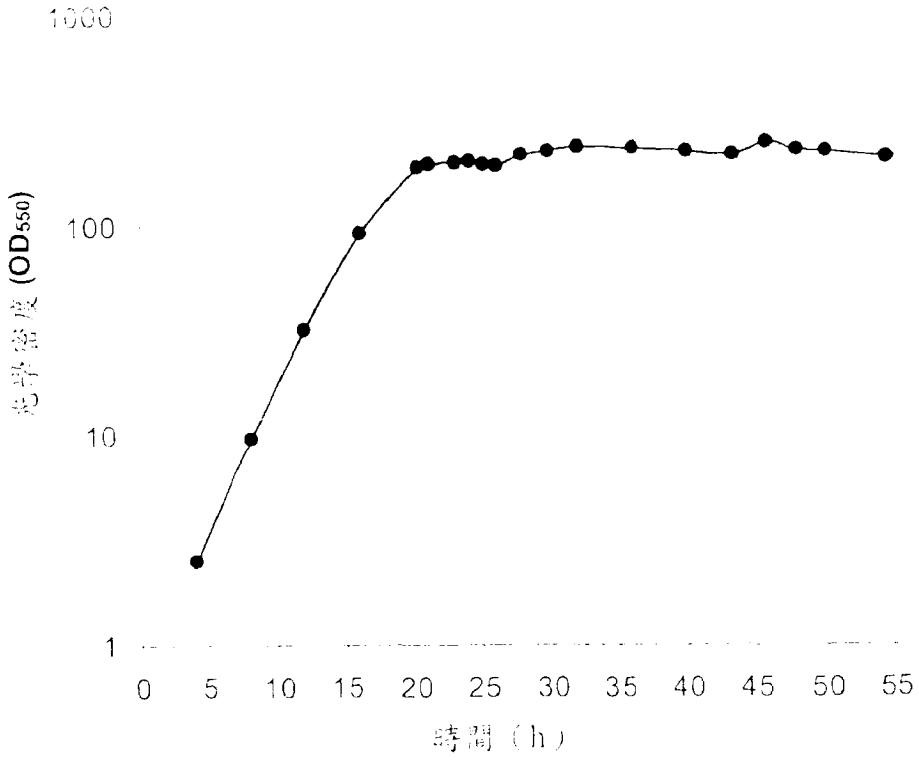


圖63A

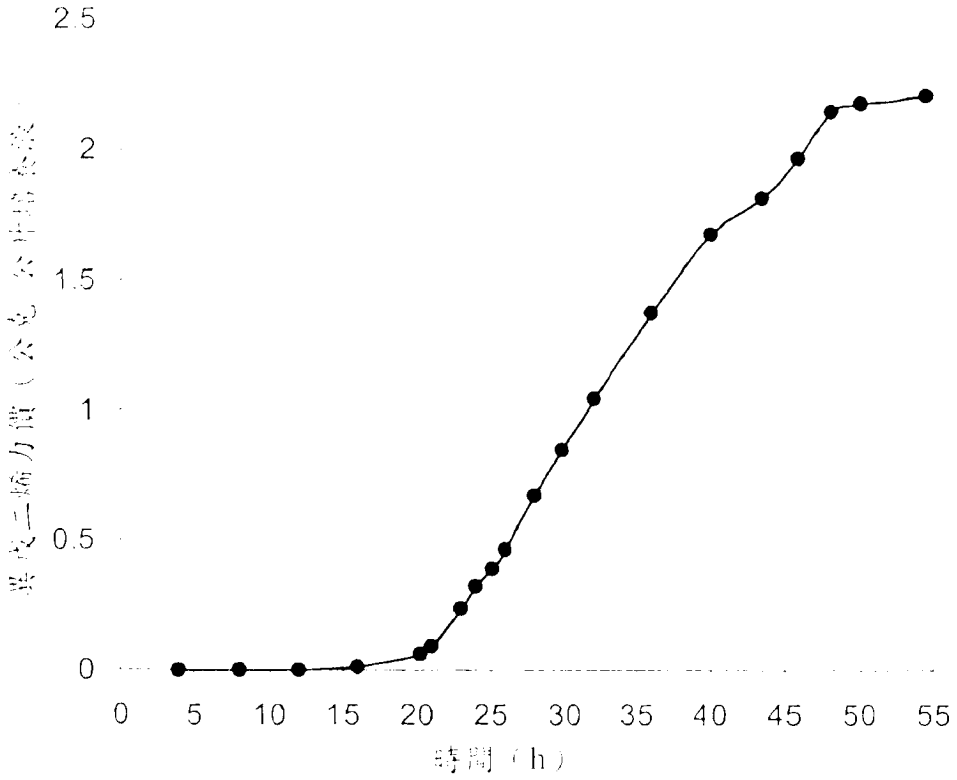


圖63B

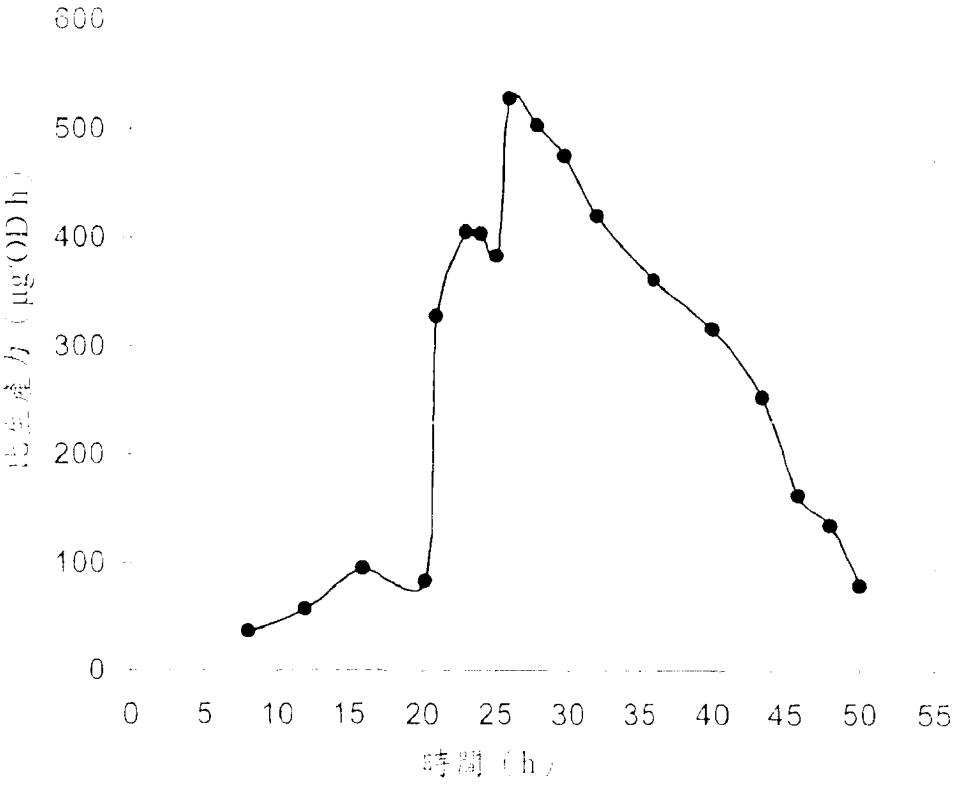


圖63C

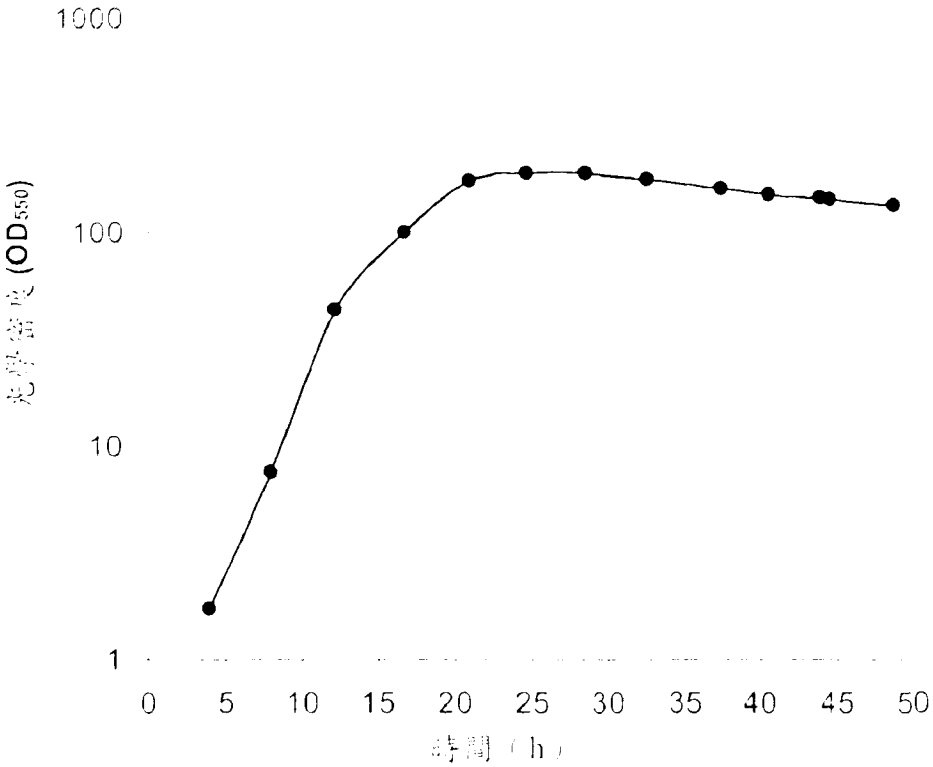


圖64A

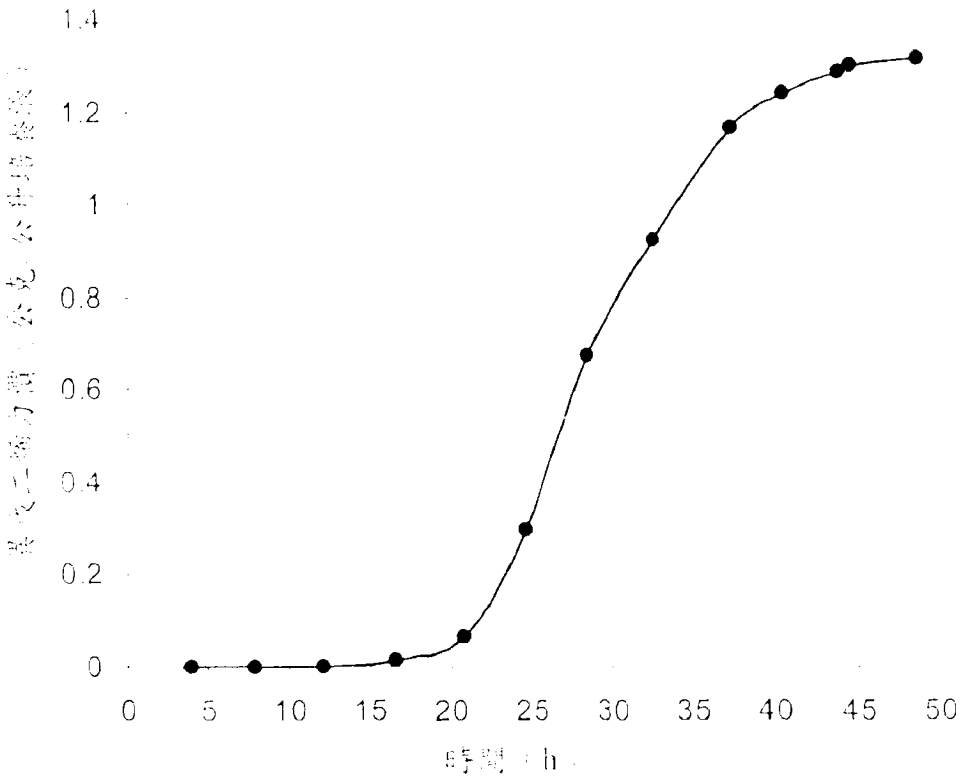


圖64B

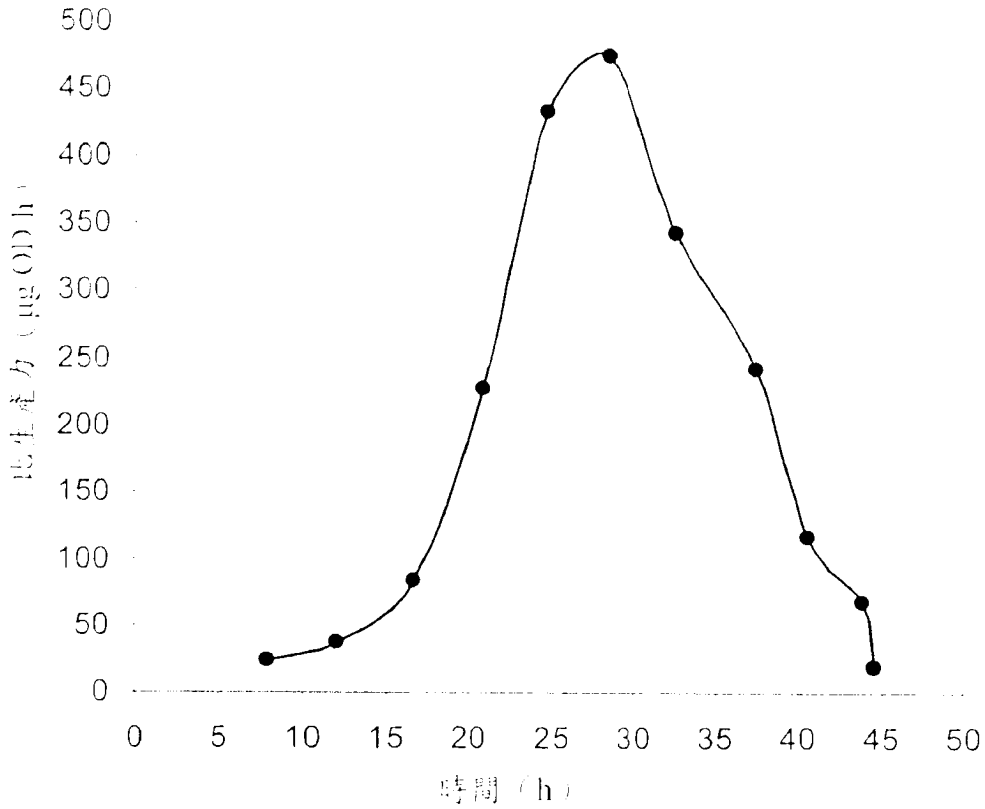

500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
時間（h）

圖64C

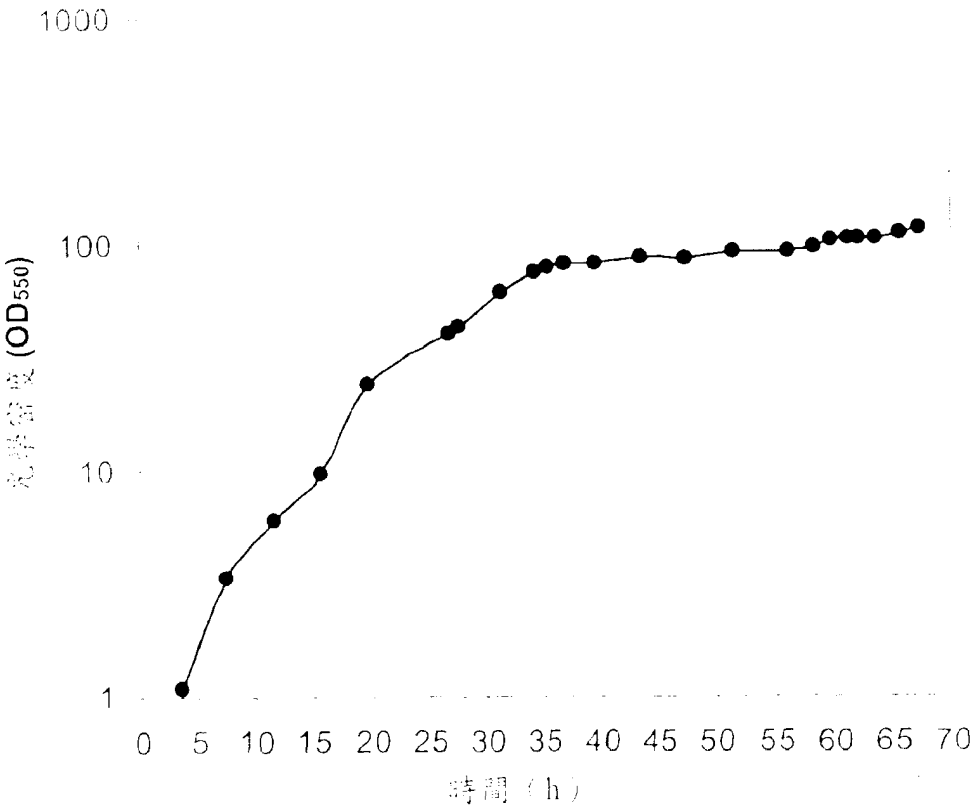

1000
100
10
1
菌體濃度 (OD550)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
時間（h）

圖65A

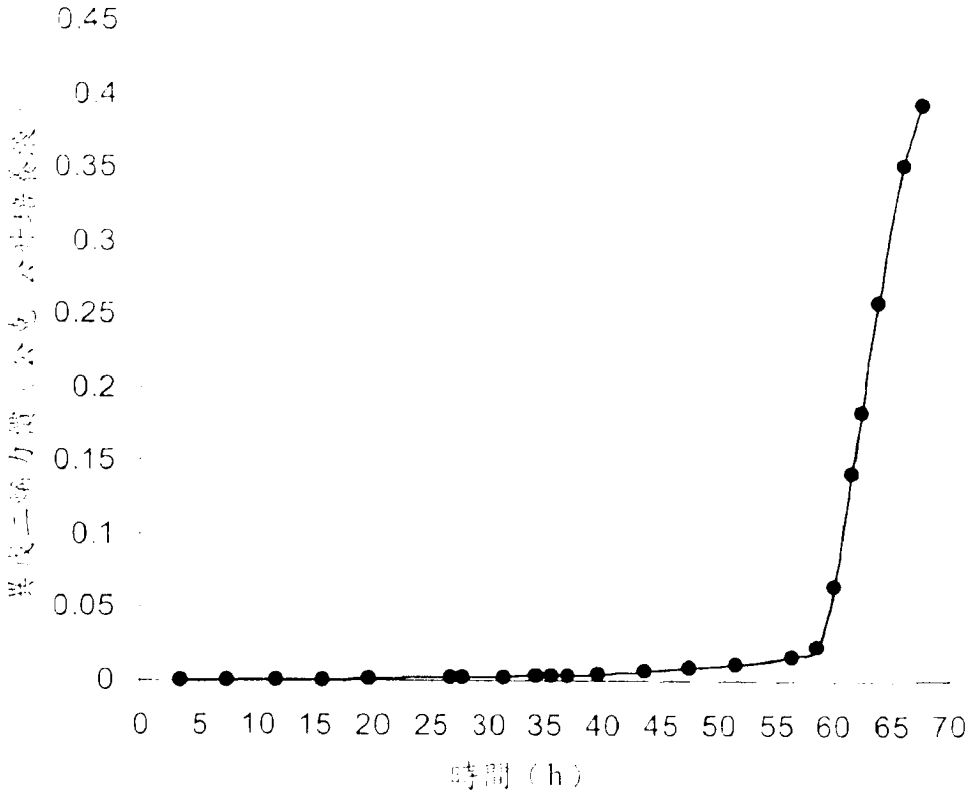

0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
時間（h）

圖65B

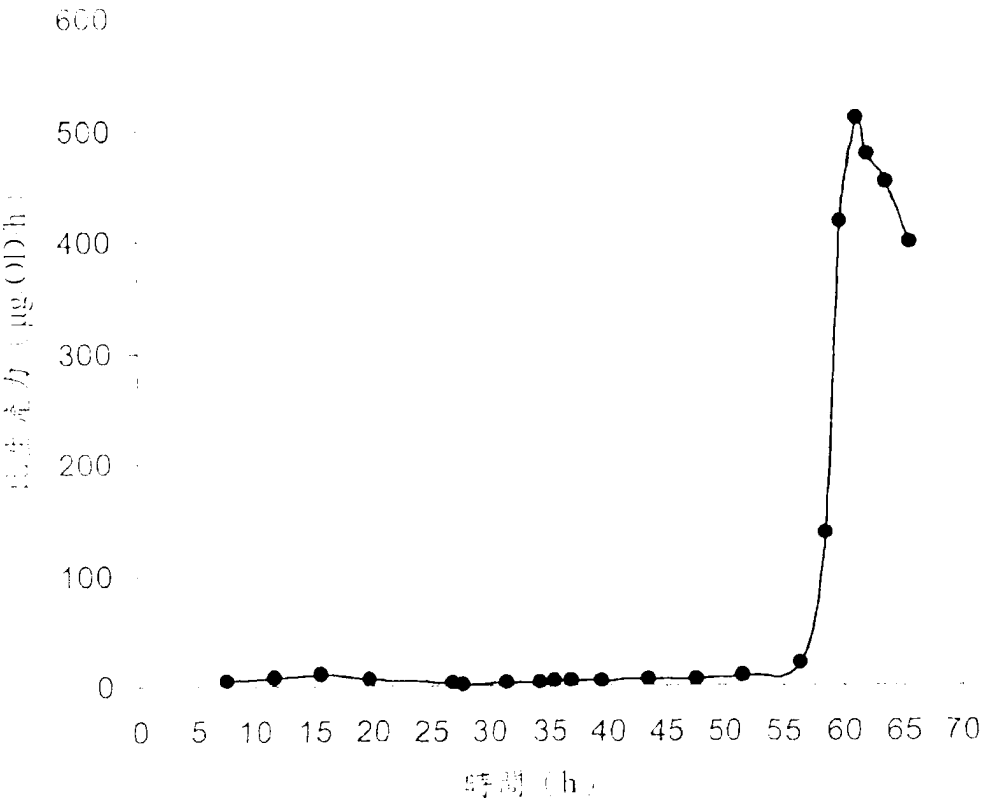

600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
時間（h）

圖65C

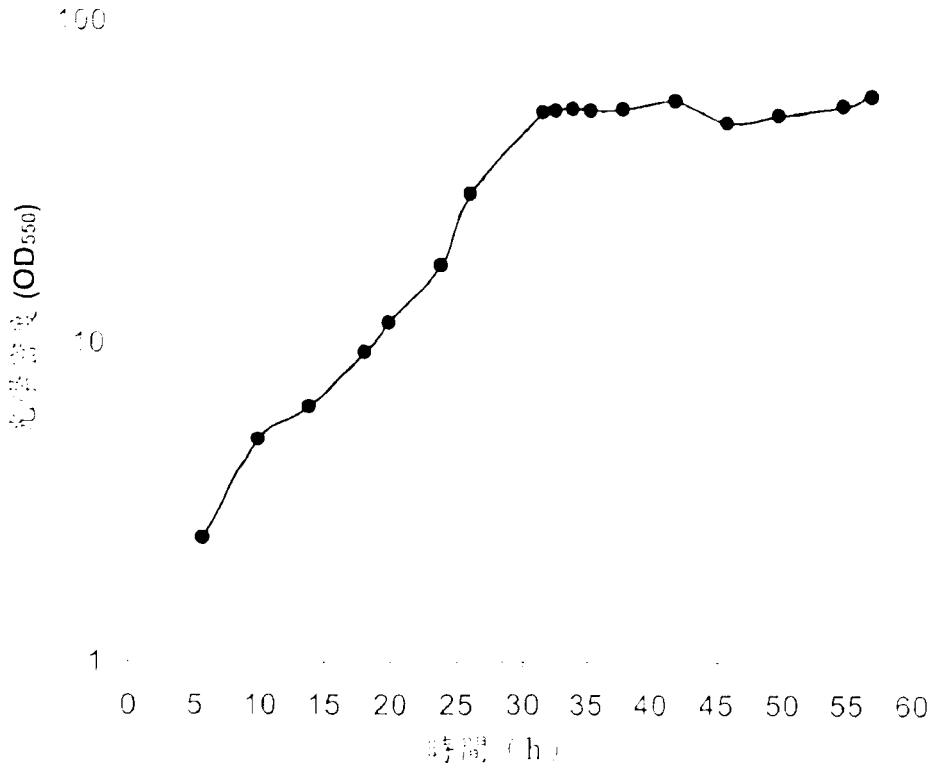


圖66A

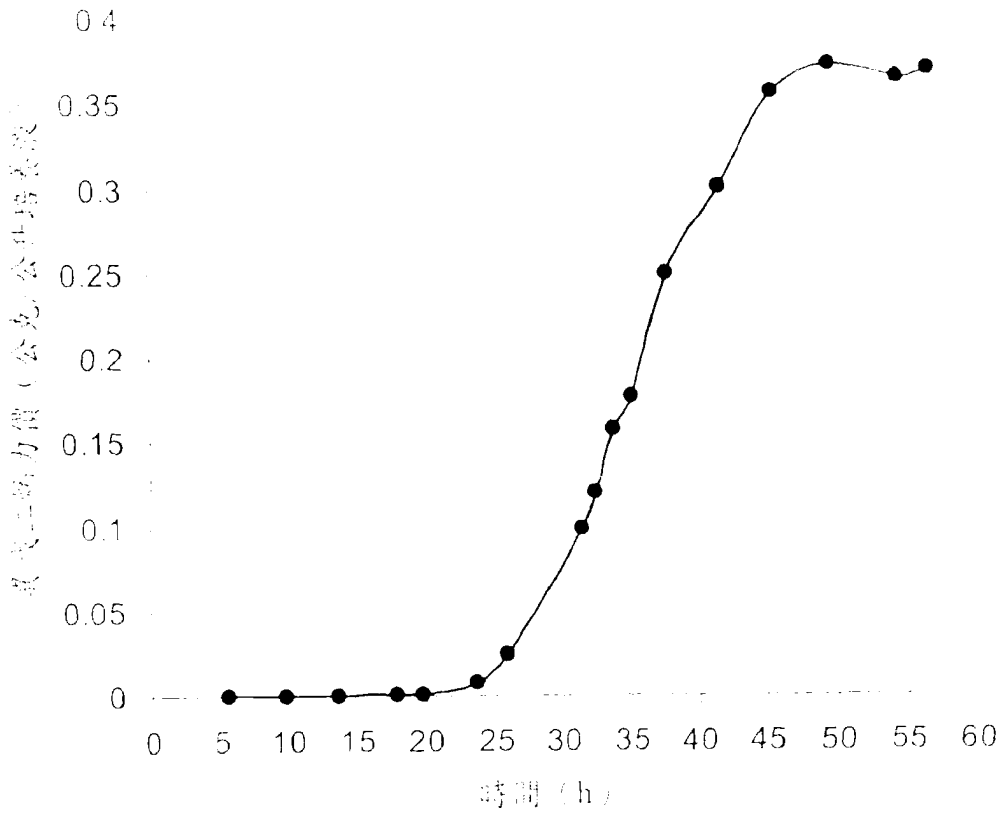


圖66B

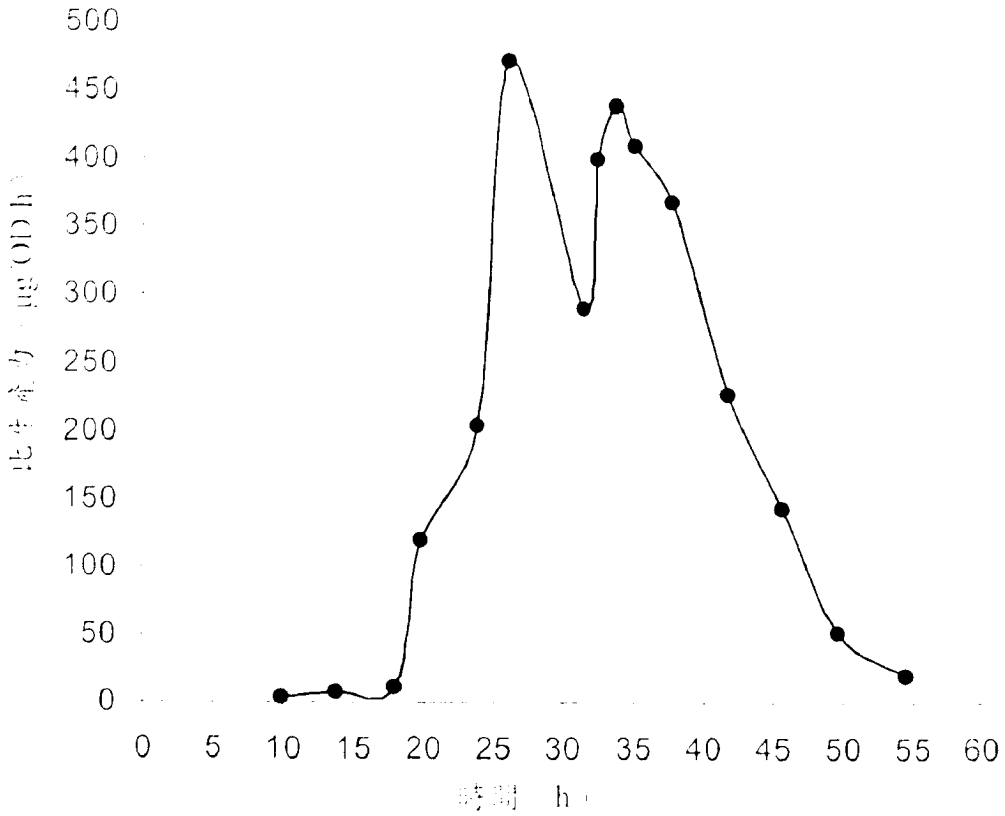

500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
h

圖66C

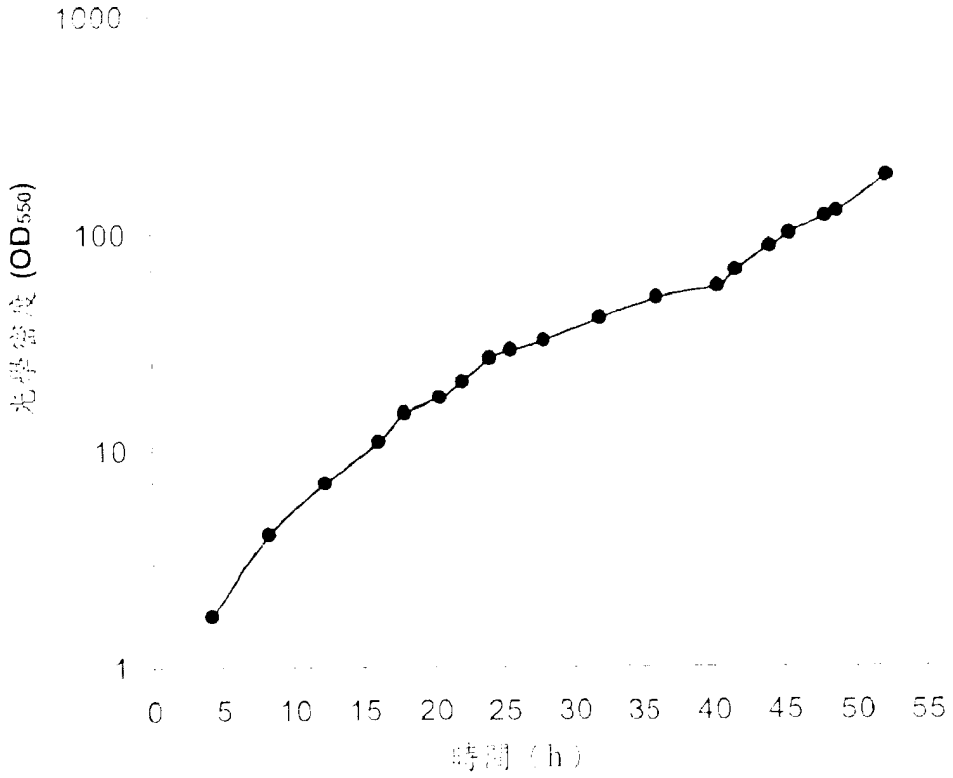


圖67A

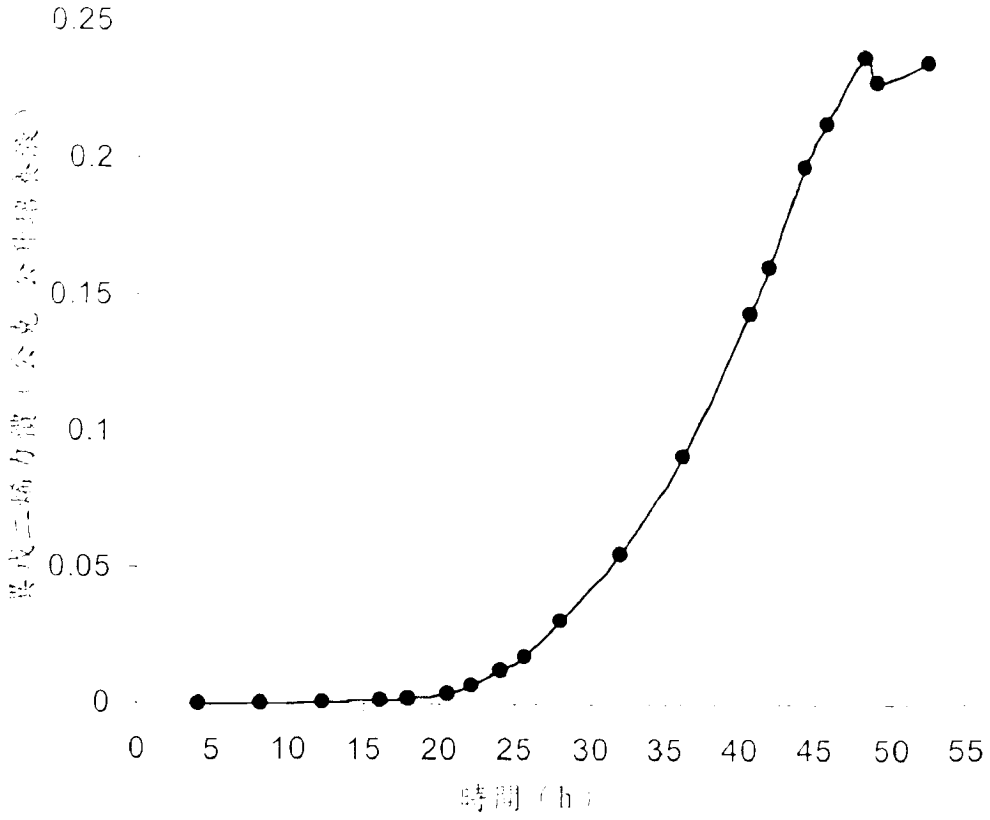


圖67B

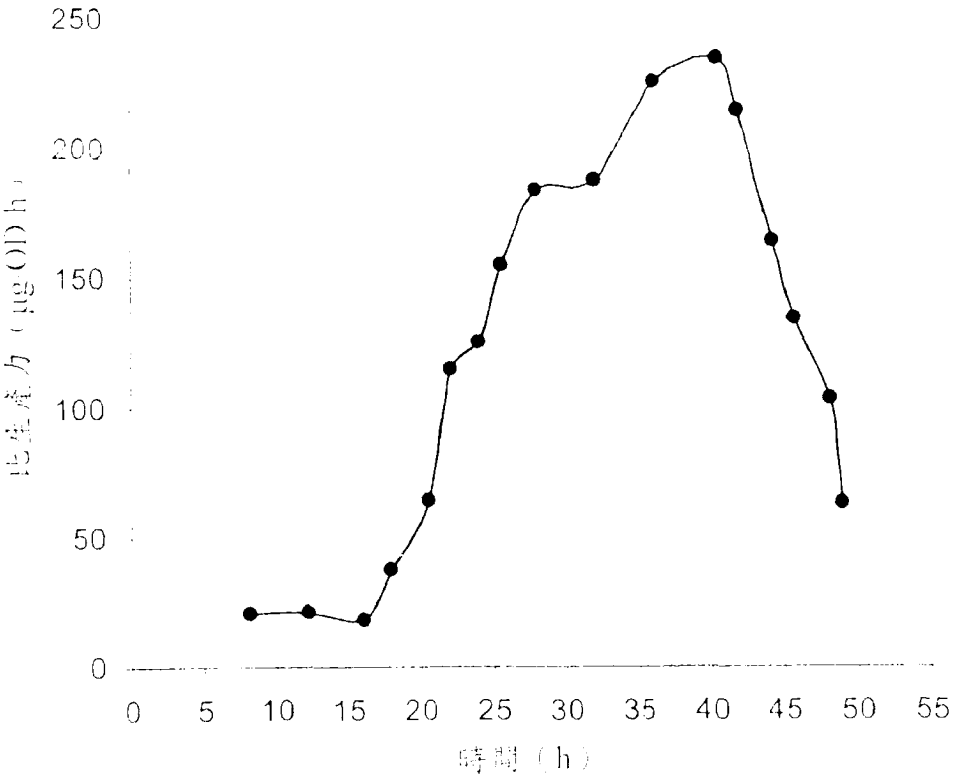


圖67C

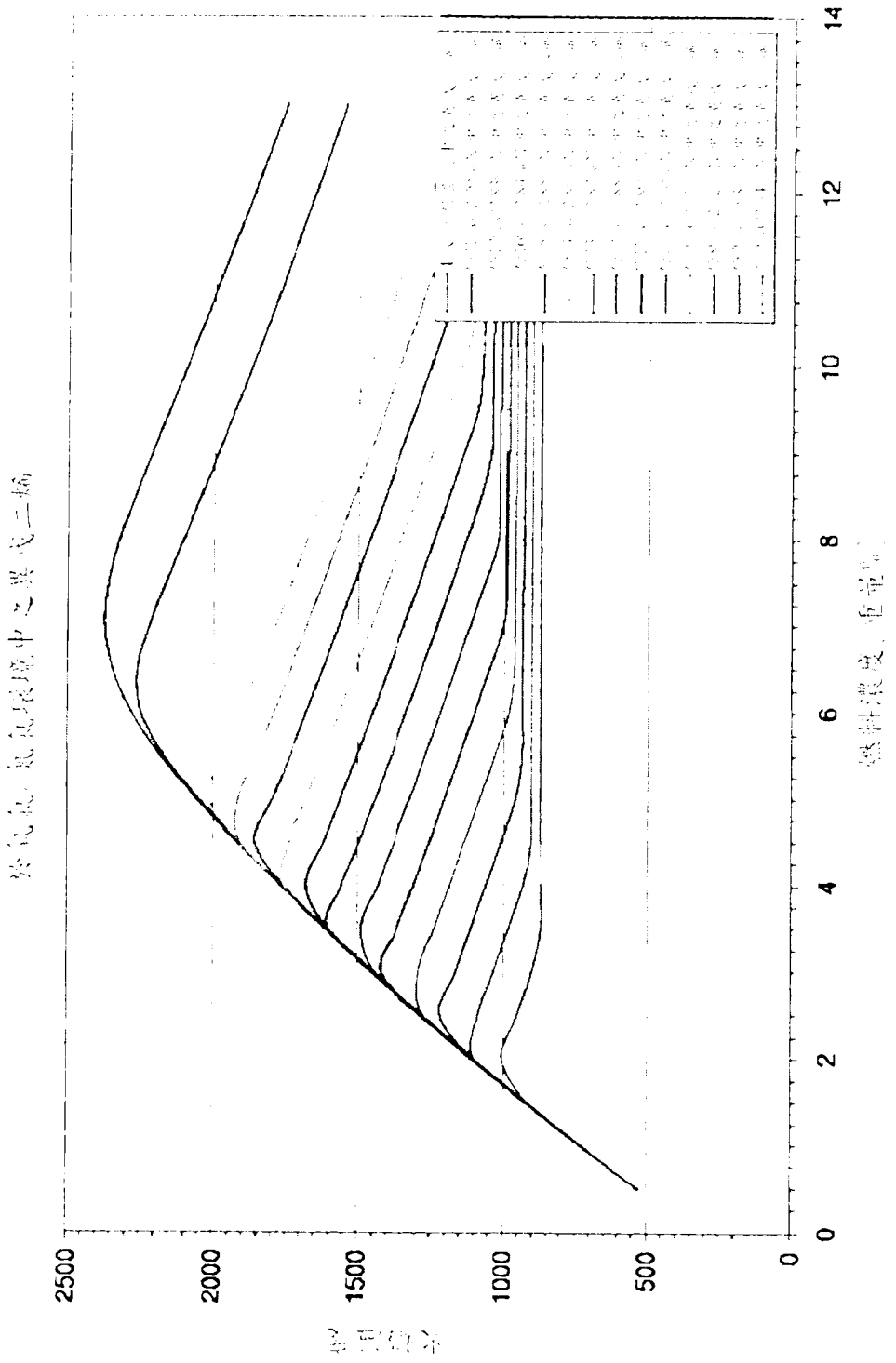


圖68

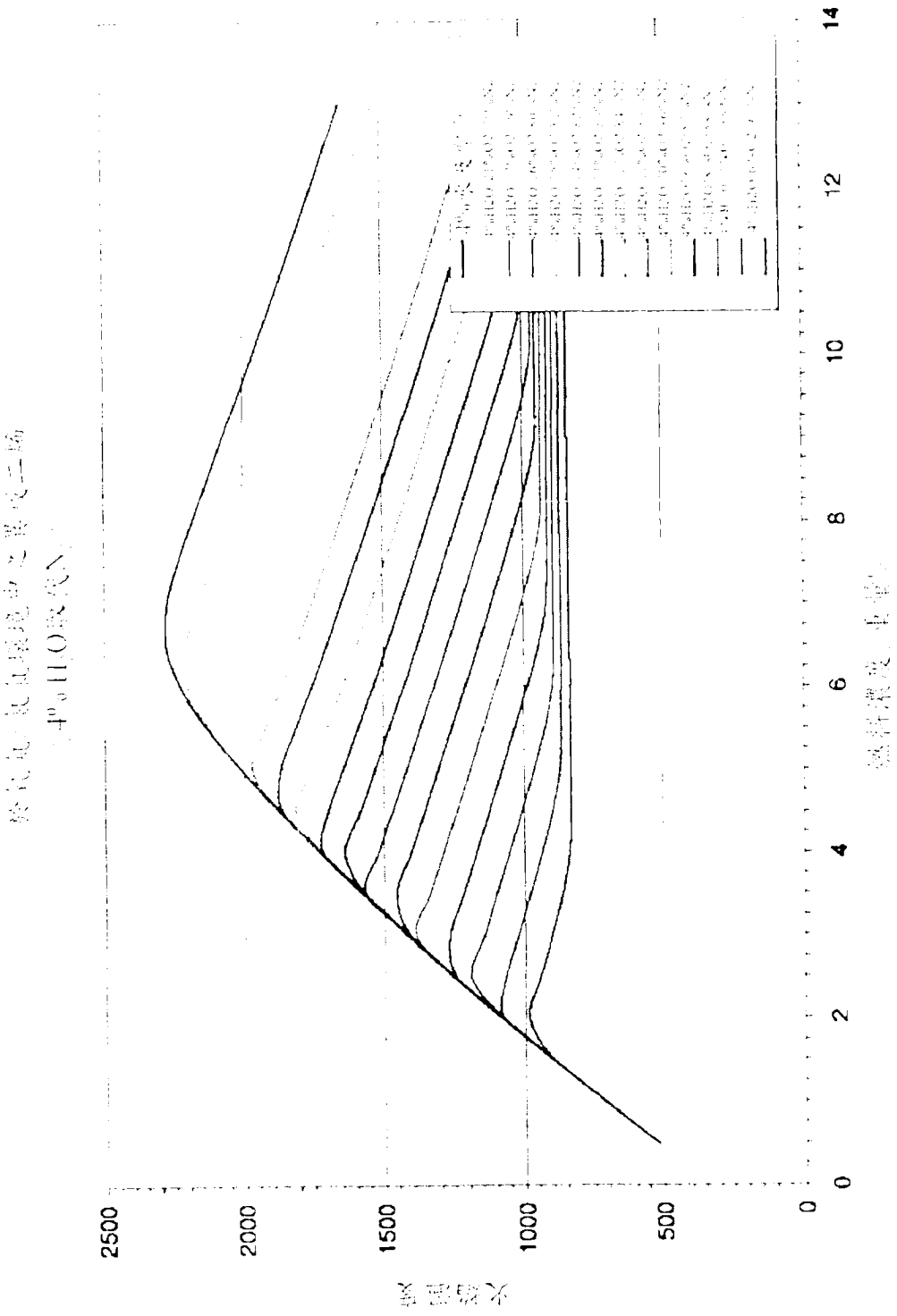


圖69

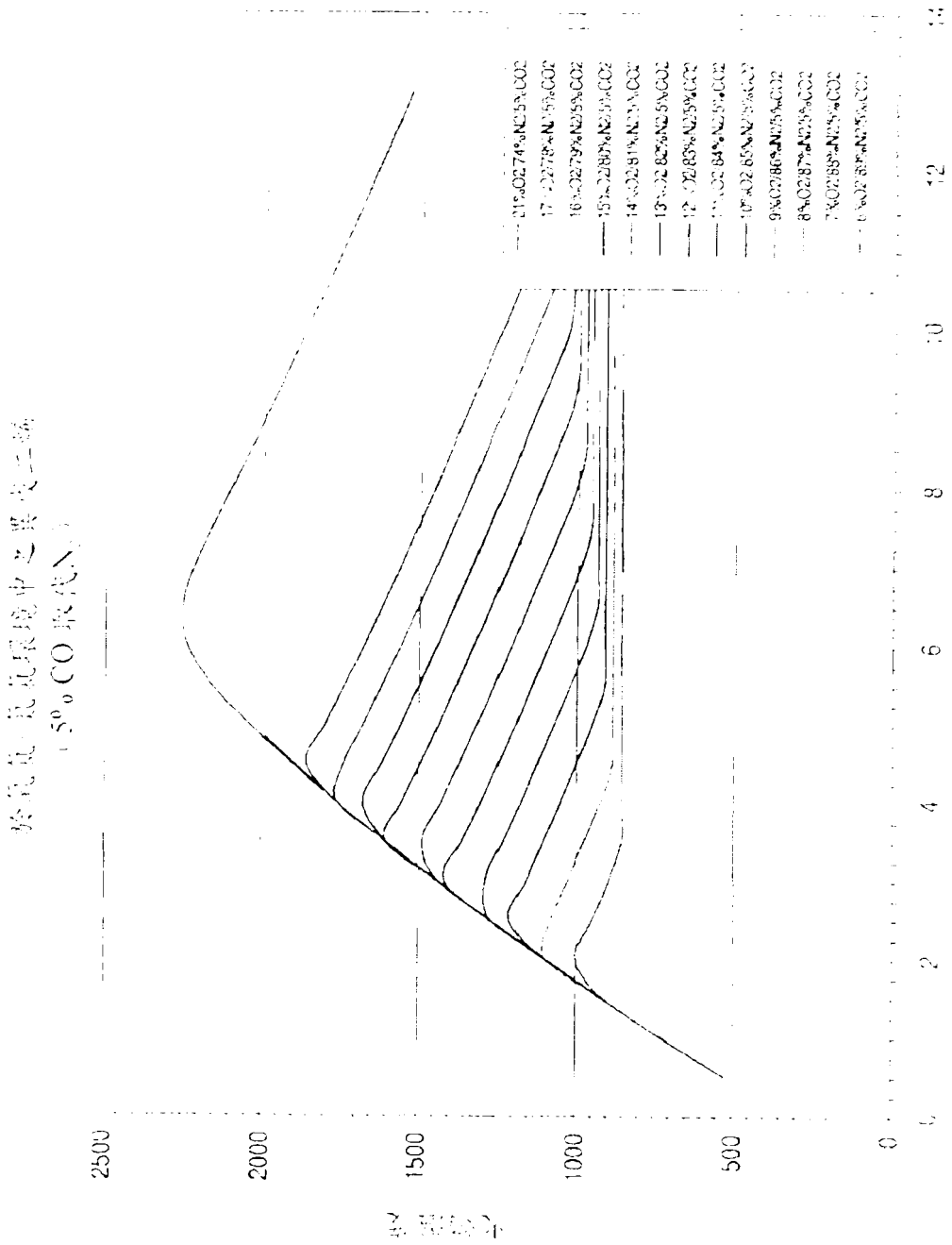


圖70

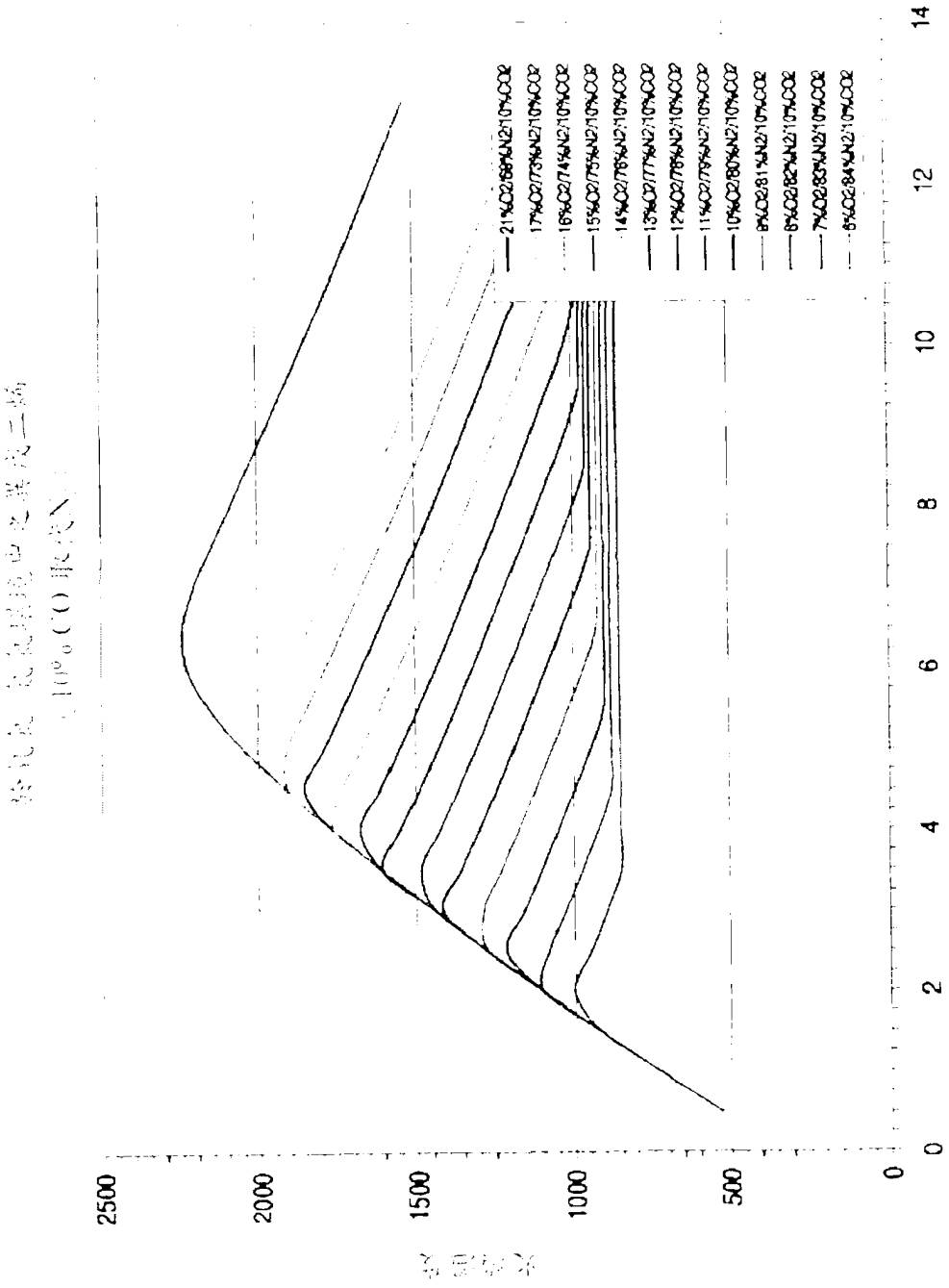


圖71

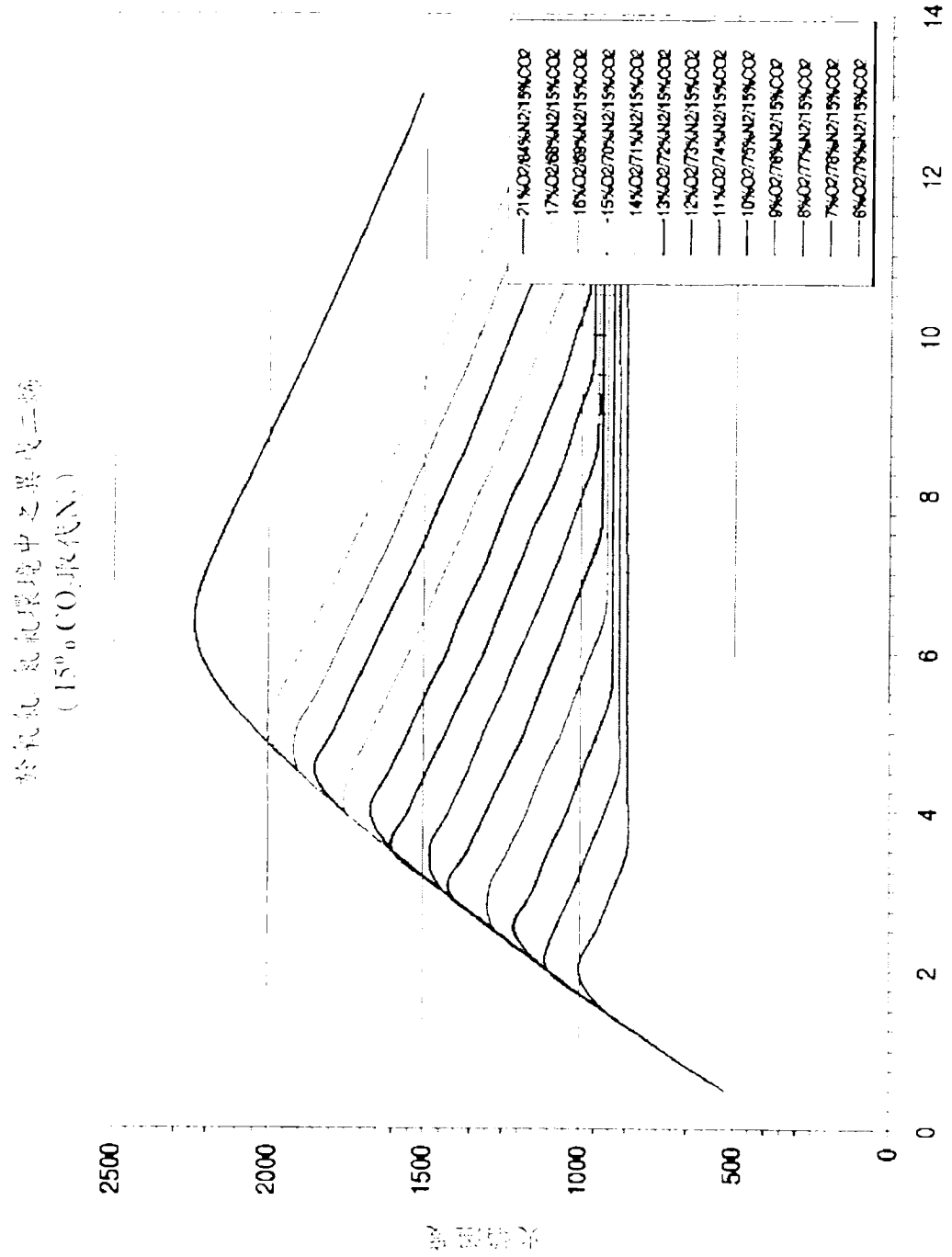

2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
21%O2/84%N2/15%CO2
17%O2/68%N2/15%CO2
16%O2/68%N2/15%CO2
15%O2/70%N2/15%CO2
14%O2/71%N2/15%CO2
13%O2/72%N2/15%CO2
12%O2/73%N2/15%CO2
11%O2/74%N2/15%CO2
10%O2/75%N2/15%CO2
9%O2/76%N2/15%CO2
8%O2/77%N2/15%CO2
7%O2/78%N2/15%CO2
6%O2/79%N2/15%CO2

圖72

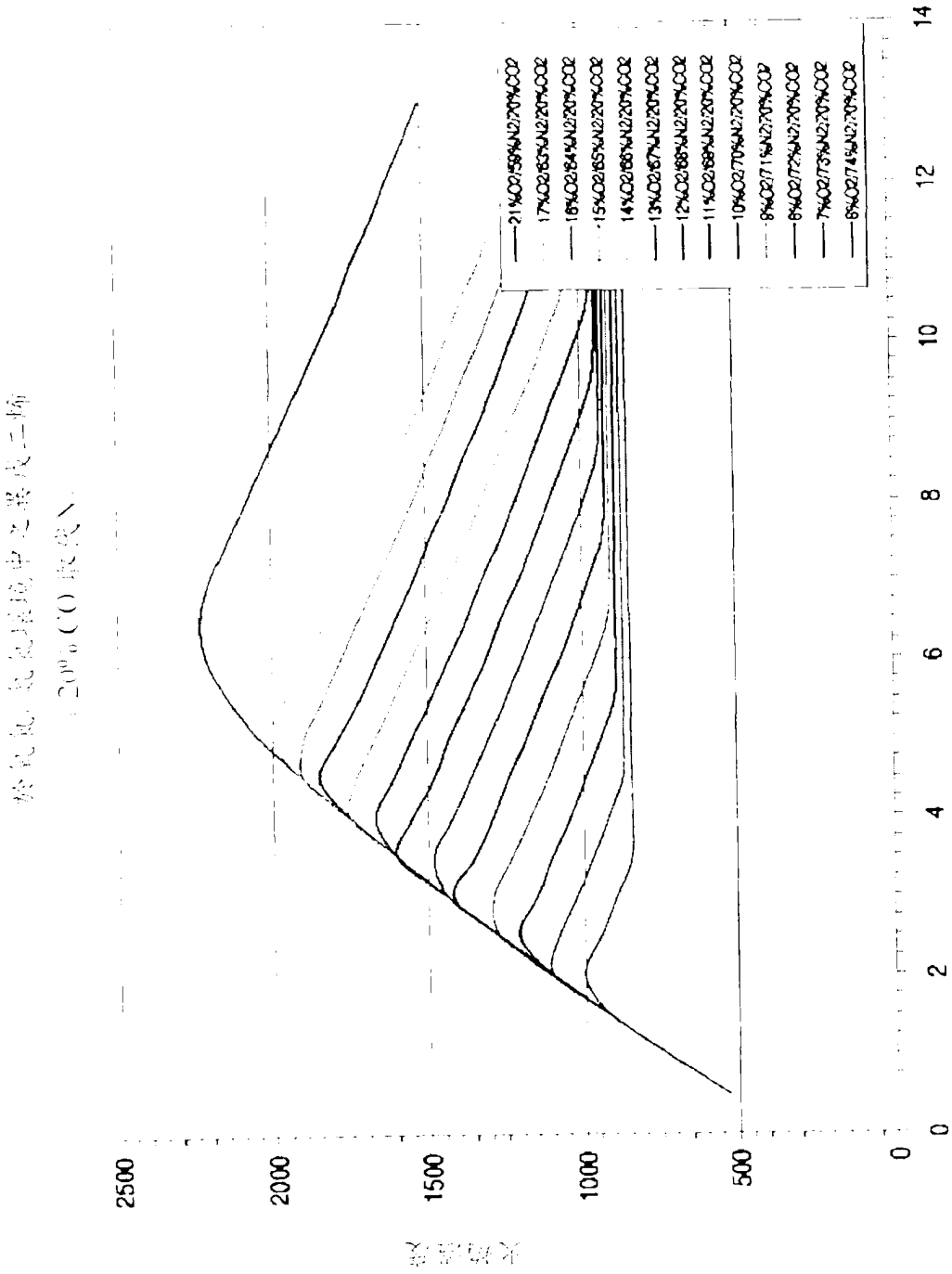

2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
21%O2/79%N2/20%CO2
17%O2/83%N2/20%CO2
16%O2/84%N2/20%CO2
15%O2/85%N2/20%CO2
14%O2/86%N2/20%CO2
13%O2/87%N2/20%CO2
12%O2/88%N2/20%CO2
11%O2/89%N2/20%CO2
10%O2/70%N2/20%CO2
9%O2/71%N2/20%CO2
8%O2/72%N2/20%CO2
7%O2/73%N2/20%CO2
6%O2/74%N2/20%CO2

圖 3

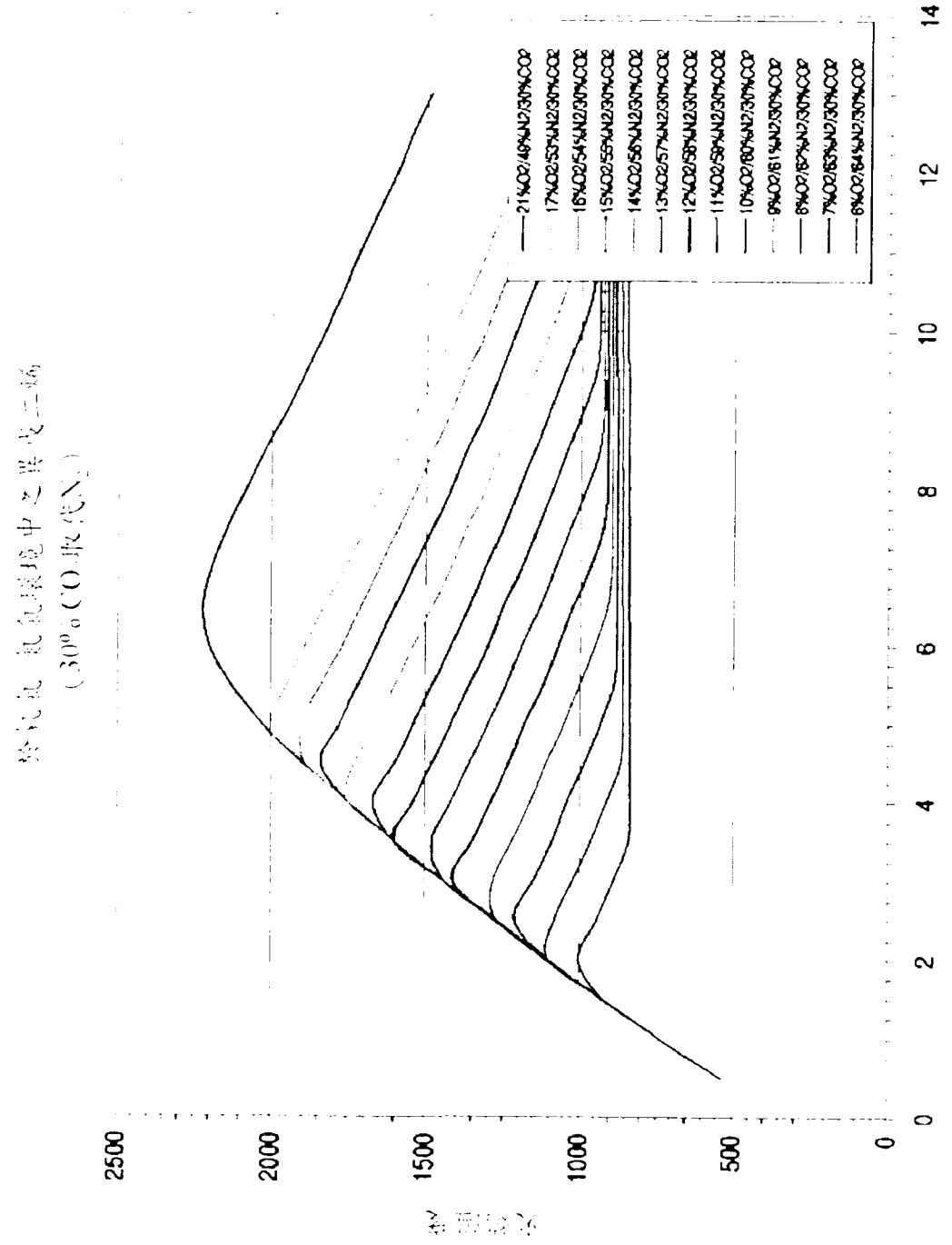

2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
21%CO2/49%N2/30%CO2
17%CO2/53%N2/30%CO2
16%CO2/54%N2/30%CO2
15%CO2/55%N2/30%CO2
14%CO2/56%N2/30%CO2
13%CO2/57%N2/30%CO2
12%CO2/58%N2/30%CO2
11%CO2/59%N2/30%CO2
10%CO2/60%N2/30%CO2
9%CO2/61%N2/30%CO2
8%CO2/62%N2/30%CO2
7%CO2/63%N2/30%CO2
6%CO2/64%N2/30%CO2

圖74

燃料濃度	氧化劑濃度	燃料組成 異戊二烯	氧化劑組成 H_2O	O_2	N_2	基於100 異戊二烯 H_2O	O_2	N_2	總計	基於理想化學計量之異戊二烯 O_2	N_2	總計
3.10	96.90	100	0	12	88	4.56	36.34	304.64	345.44	1.32	10.59	38.96
3.10	96.90	100	0	13	87	4.56	39.57	301.63	345.01	1.32	11.41	87.74
3.10	96.90	100	0	14	86	4.56	42.79	297.62	344.57	1.32	12.30	86.37
3.10	96.90	100	0	15	85	4.56	45.42	294.16	344.14	1.32	13.20	85.49
3.10	96.90	100	0	16	84	4.56	48.45	290.70	343.71	1.33	14.10	84.04
3.10	96.90	100	0	17	83	4.56	51.48	287.24	343.28	1.33	15.09	83.58
3.50	96.50	100	0	21	79	4.56	63.59	272.40	341.55	1.33	18.62	80.06
3.50	96.50	100	0	11.1	88.9	5.15	36.47	305.39	345.01	1.49	9.70	88.41
4.40	96.60	100	0	12	88	6.47	35.85	305.45	347.78	1.89	10.46	87.63
8.50	94.50	100	0	13	87	8.09	38.39	298.63	345.10	2.38	11.29	86.39
9.60	90.40	100	0	14	86	9.71	40.86	286.87	337.44	2.86	12.11	85.01
7.60	92.40	100	0	15	85	11.18	43.31	280.50	334.99	3.34	12.93	83.73
8.50	91.50	100	0	16	84	12.50	45.75	274.50	332.75	3.76	13.75	82.44
9.60	90.40	100	0	17	83	14.12	48.03	267.97	330.11	4.28	14.55	81.18
13.50	86.50	100	0	21	79	19.85	56.77	244.05	320.67	5.19	17.70	76.17

圖 75A

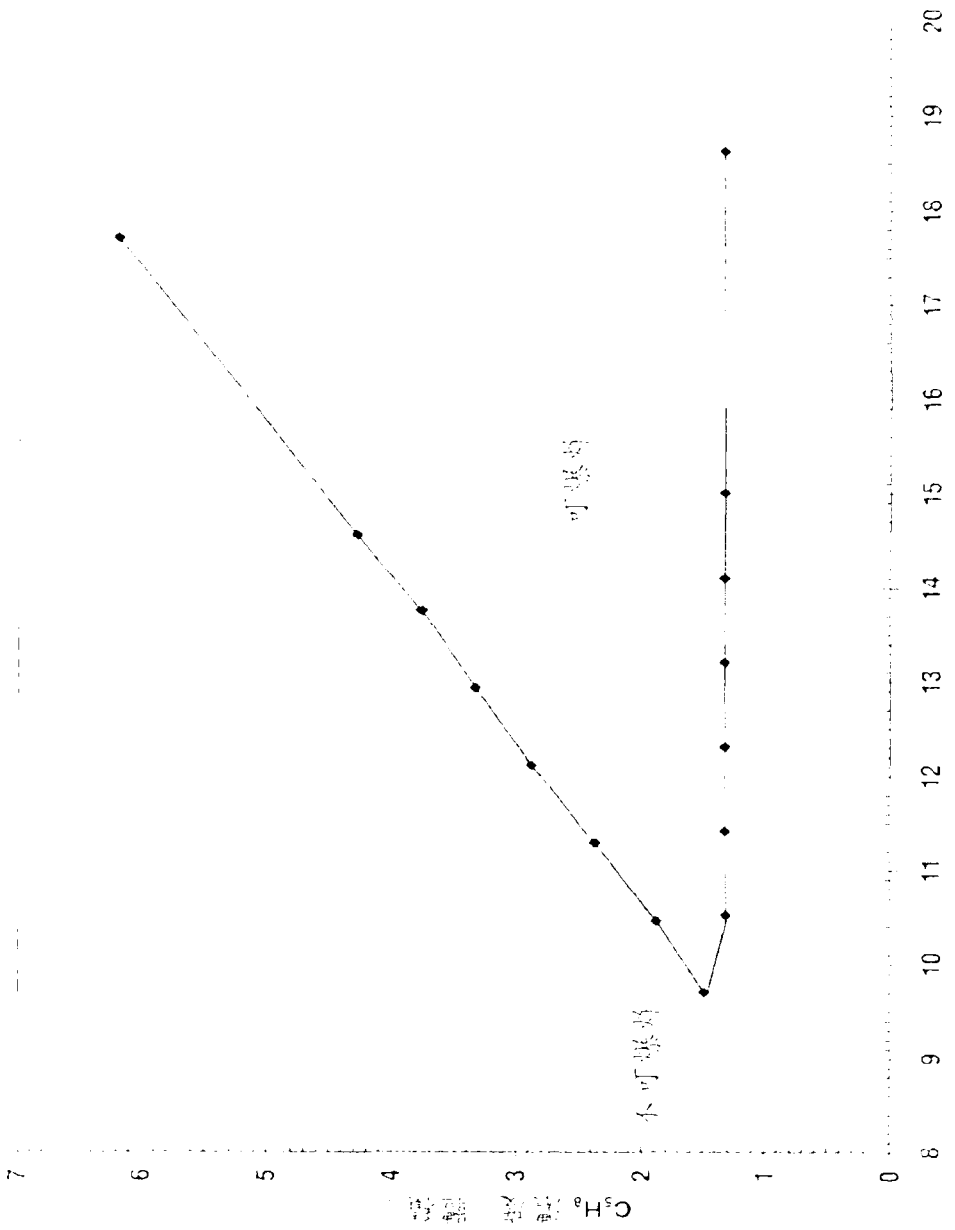


圖75B

燃料組成	氧化劑組成	燃料濃度	氧化劑濃度			基於100 g燃料之莫耳數				基於理想化學式之莫耳數			
			H_2O	O_2	N_2	莫氏三版	H_2O	O_2	N_2	總計	莫氏三版	O_2	H_2O
卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡	卡
3,258	96,748	100	4	12	84	4.78	21.50	36.26	290.24	352.81	1.36	10.28	87.27
3,274	96,726	100	4	13	83	4.81	21.49	39.29	286.72	352.33	1.37	11.15	81.53
3,290	96,710	100	4	14	82	4.84	21.49	42.31	283.27	351.86	1.38	12.02	80.49
3,286	96,712	100	4	15	81	4.84	21.49	45.33	279.77	351.43	1.38	12.93	79.01
3,286	96,714	100	4	16	80	4.83	21.49	48.36	276.33	351.01	1.38	13.79	78.72
3,284	96,716	100	4	17	79	4.83	21.49	51.38	272.88	350.58	1.38	14.66	77.84
3,276	96,724	100	4	21	75	4.82	21.49	63.48	259.08	348.87	1.38	18.19	74.25
3,500	96,500	100	4	11.5	84.5	5.15	21.44	34.68	291.22	352.49	1.46	9.84	96.62
4,400	95,800	100	4	12	84	6.18	21.29	35.93	287.40	350.79	1.76	10.24	81.53
5,300	94,700	100	4	13	83	7.79	21.04	38.47	280.72	348.03	2.24	11.05	80.66
6,400	93,600	100	4	14	82	9.41	20.80	40.95	274.11	345.28	2.73	11.86	79.39
7,400	92,600	100	4	15	81	10.88	20.58	43.41	267.88	342.74	3.18	12.66	78.16
8,500	91,500	100	4	16	80	12.50	20.33	45.75	261.45	340.01	3.68	13.46	76.89
9,400	90,600	100	4	17	79	13.82	20.13	48.13	255.62	337.71	4.09	14.25	75.69
13,300	86,700	100	4	21	75	19.56	19.27	56.90	232.23	327.95	5.96	17.35	72.85

圖 76A

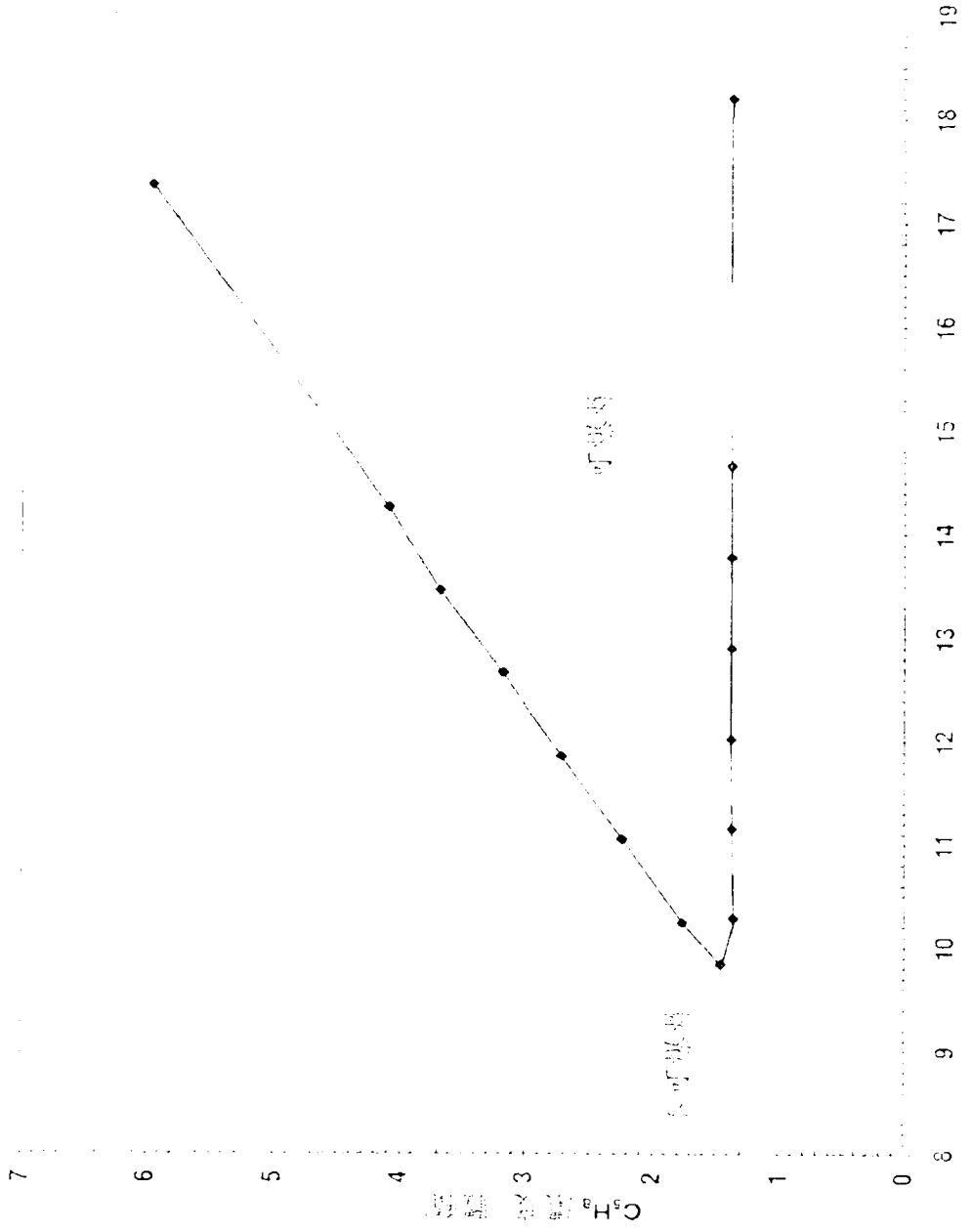


圖 76B

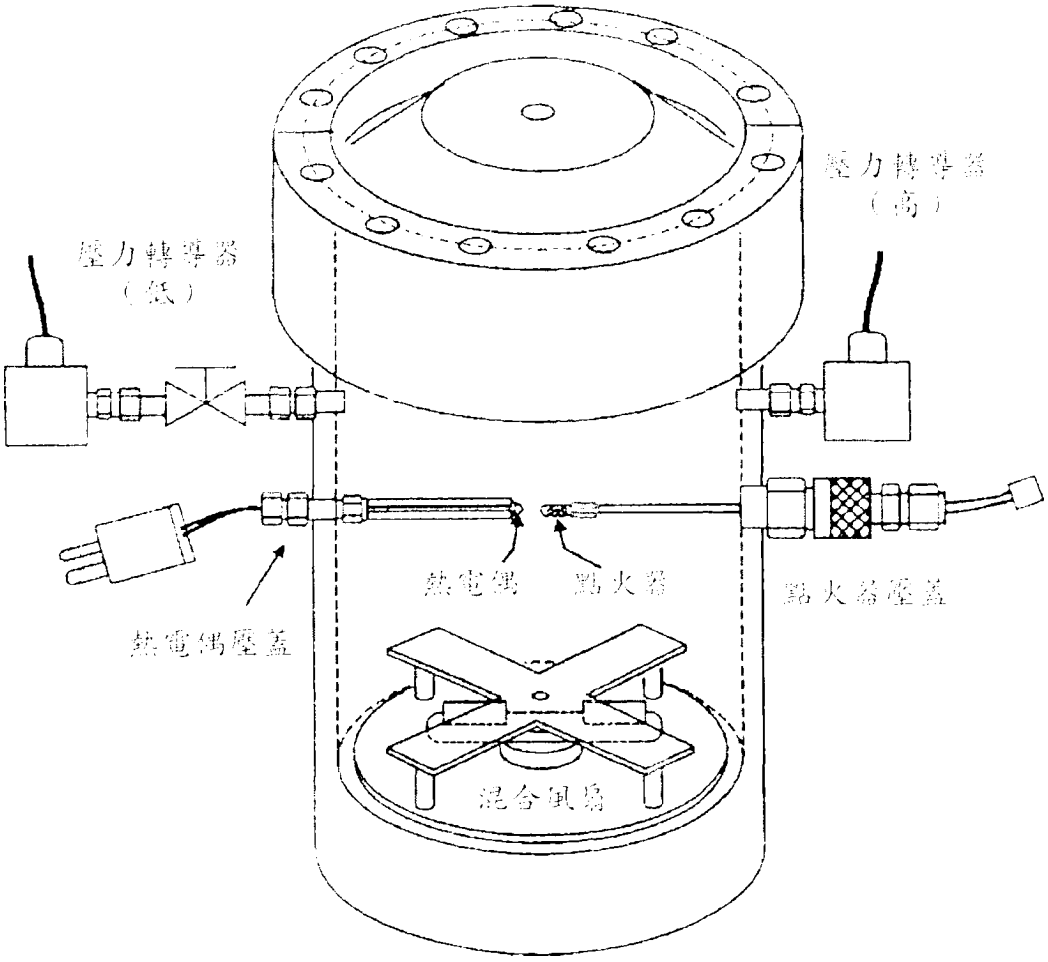


圖77

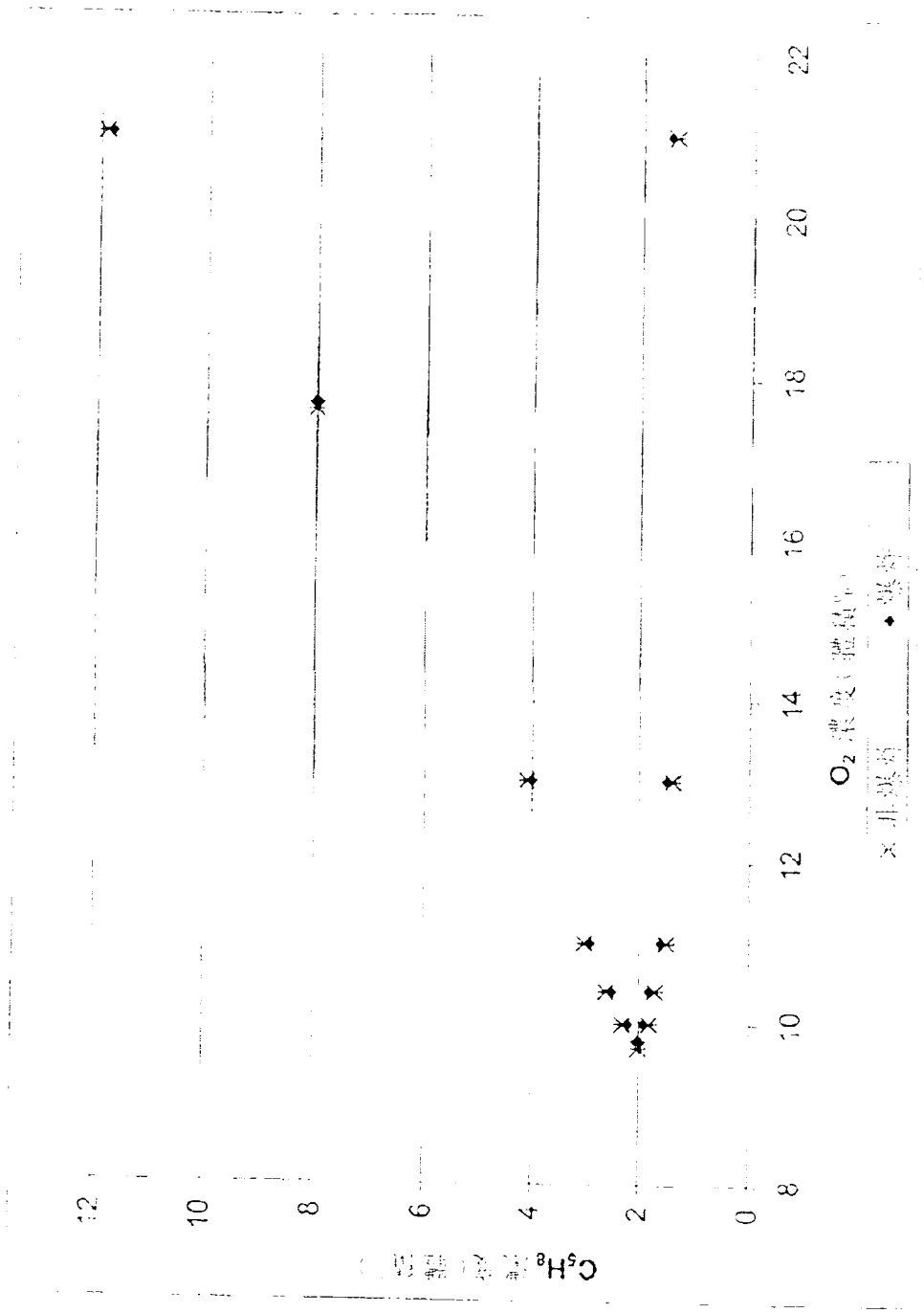


圖 78.1

爆炸		非爆炸	
O2 濃度 (體積%)	**C5H8** 濃度 (體積%)	**O2** 濃度 (體積%)	**C5H8** 濃度 (體積%)
21.0	1.5	21.0	1.4
13.0	1.5	13.0	1.4
11.0	1.6	11.0	1.5
10.4	1.8	10.4	1.7
10.0	1.9	10.0	1.8
9.8	2	9.7	2
10.0	2.2	10.0	2.3
10.4	2.5	10.4	2.6
11.0	2.9	11.0	3.0
13.0	4.0	13.0	4.1
17.7	8.0	17.6	8.0
21.0	11.8	21.0	11.9

圖78B

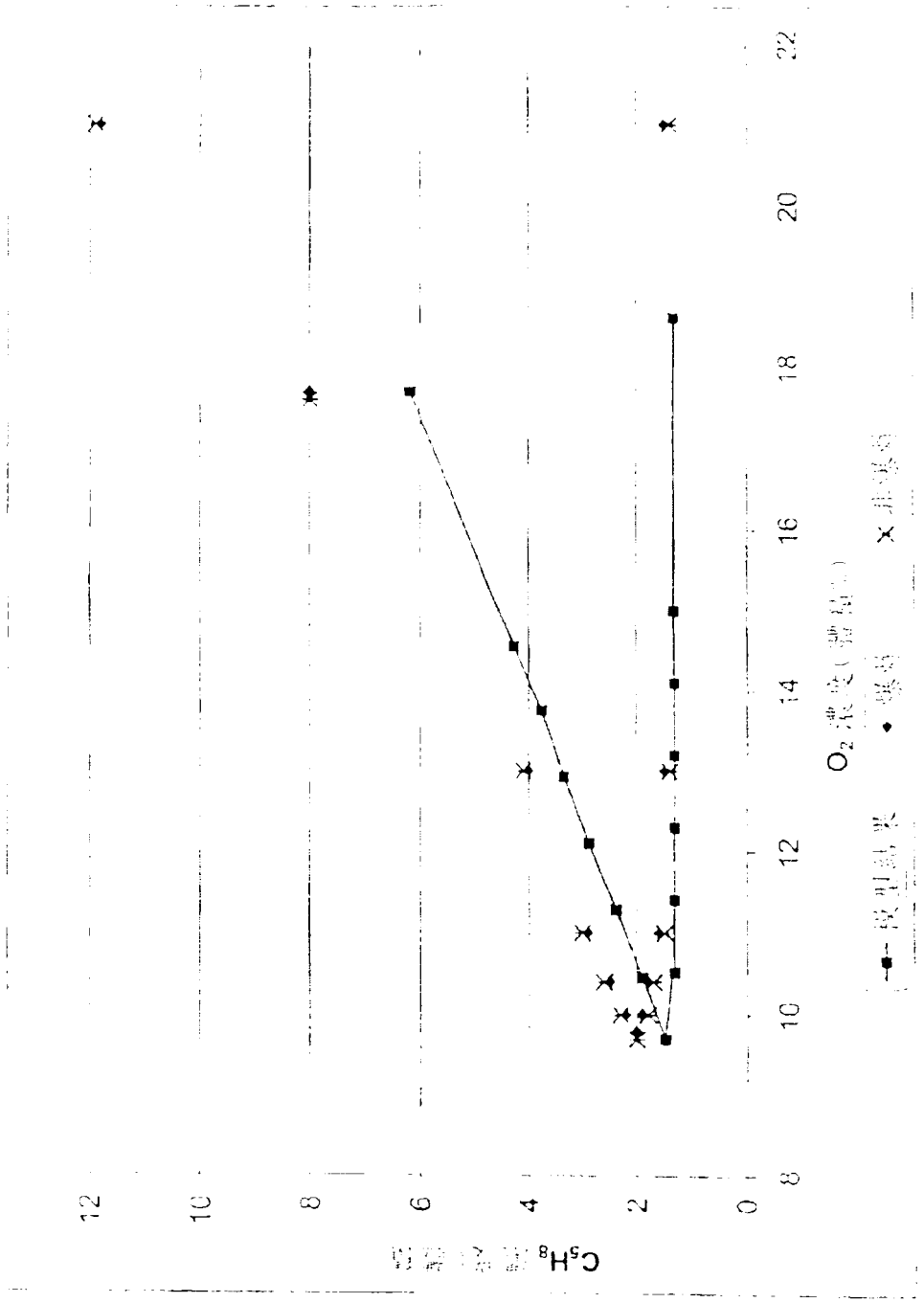


圖 78C

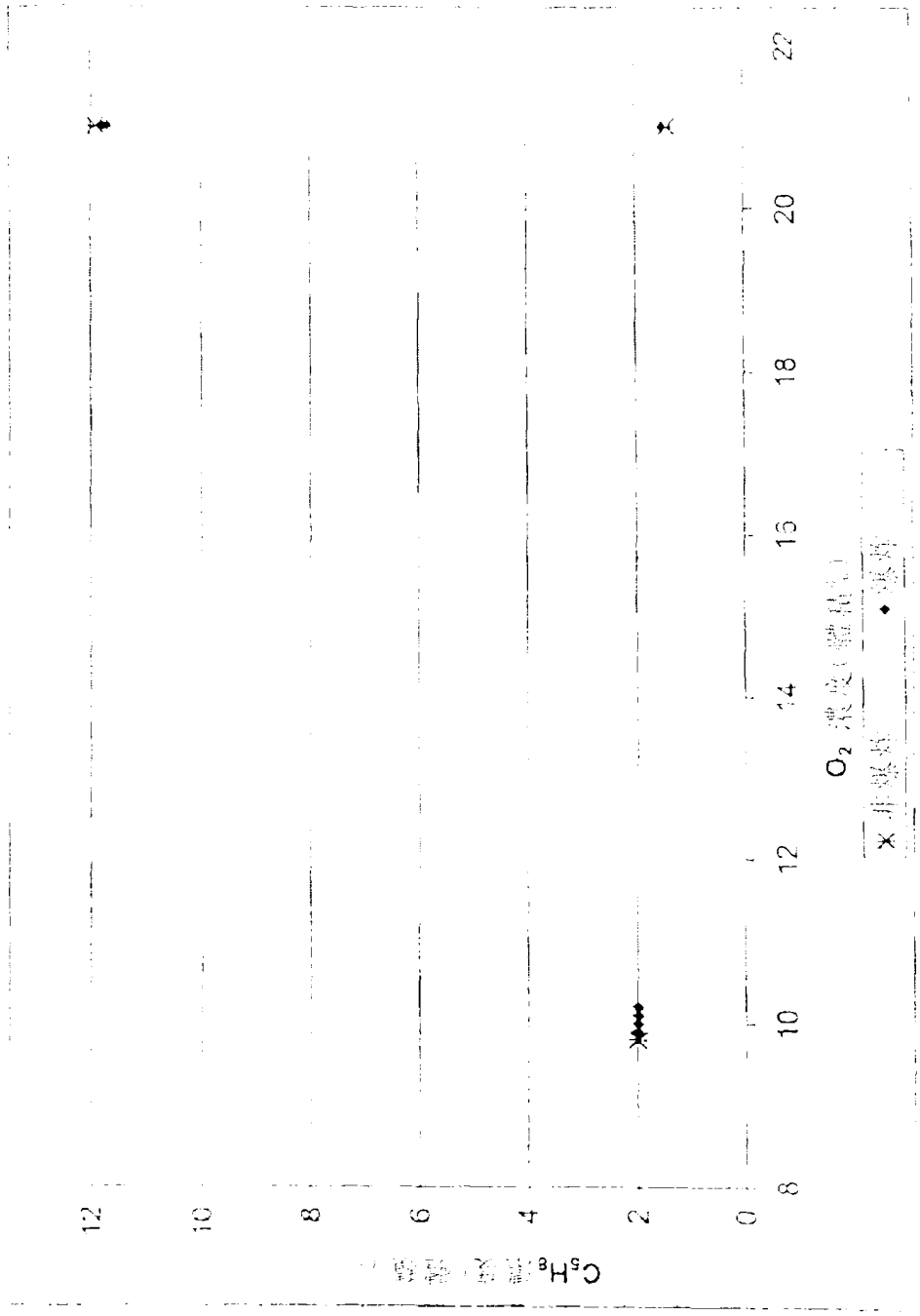


圖79A

濃許		非濃許	
O2 濃度（體積%）	C5H8 濃度（體積%）	O2 濃度（體積%）	C5H8 濃度（體積%）
21.0	11.7	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	1.5	21.0	1.4
21.0	1.5	21.0	1.4
10.2	2.0	21.0	1.4
10.1	2.0	9.8	2.0
10.0	2.0	9.8	2.0
9.9	2.0	9.8	2.0

圖79B

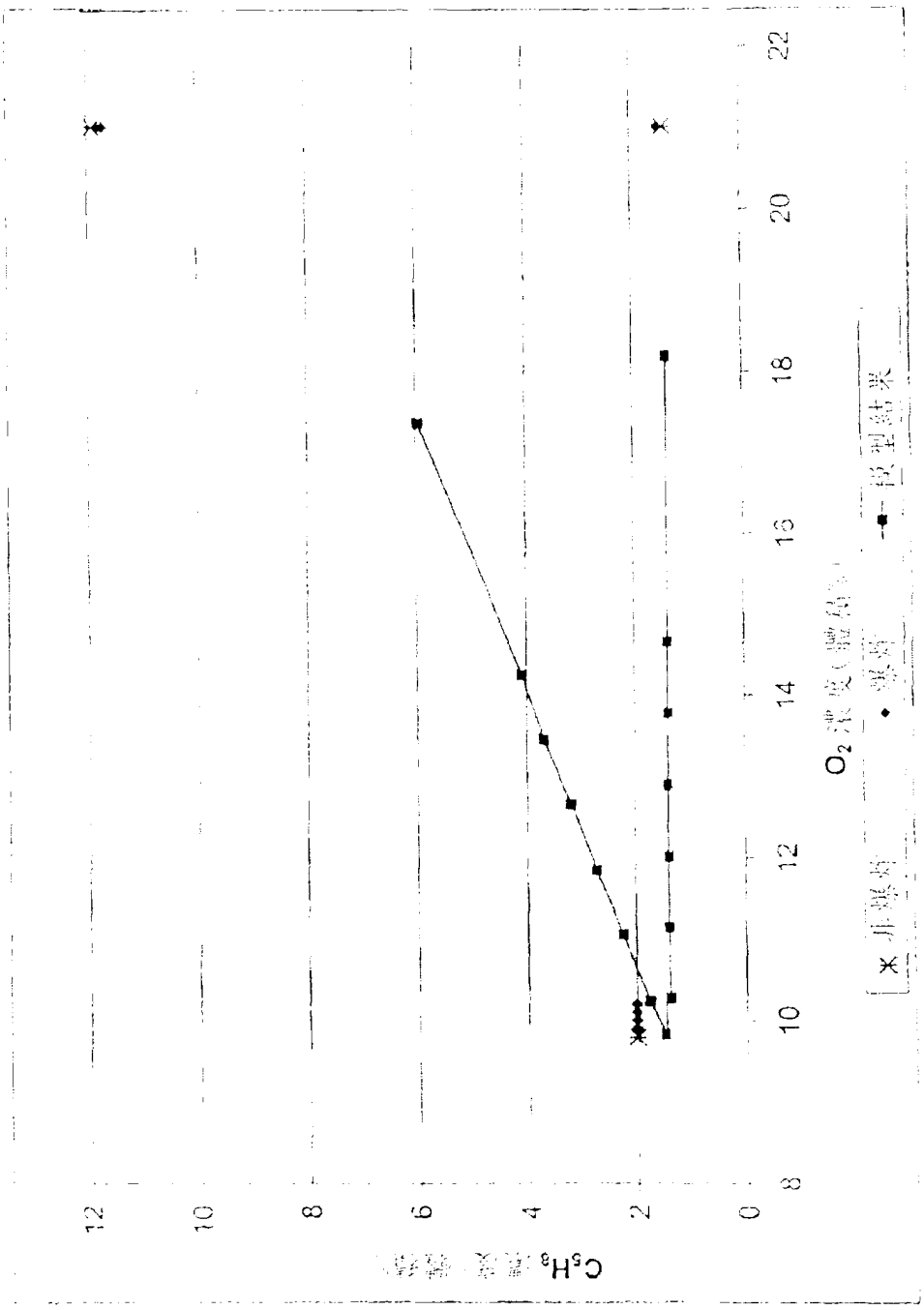


圖 79C

測試	測試編號名稱	溫度 °C	物鏡壓力 psig		分選			成型			結果		Pgm
1	T11120700	40	1.012	12	787	213	1.2	77.6	21.0				1.05
2	T11120701	40	1.016	16	787	213	1.6	77.5	21.0				5.5
3	T11120702	40	1.015	14	789	213	1.4	77.6	21.0				<1.02
4	T11120703	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0				<1.02
5	T11120704	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0				4.91
6	T11120705	40	1.017	18	785	214	1.8	77.2	21.0				5.47
7	T11120706	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0				4.51
8	T11120707	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0				<1.02
9	T11120708	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0				1.05
10	T11120709	40	1.015	102	690	213	10.6	69.6	21.0				1.45
11	T11120710	40	1.014	102	689	213	10.1	68.9	21.0				1.39
12	T11120711	40	1.014	100	685	213	10.5	68.5	21.0				1.34
13	T11120712	40	1.014	113	688	213	11.1	67.9	21.0				1.29
14	T11120713	40	1.014	122	679	213	12.0	67.0	21.0				<1.02
15	T11120714	40	1.014	117	684	213	11.5	67.5	21.0				1.32
16	T11120715	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0				1.08
17	T11130700	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0				1.09
18	T11130701	40	1.014	121	680	213	11.9	67.1	21.0				1.27
19	T11130702	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0				1.26
20	T11130703	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0				1.07
21	T11130704	40	1.015	30	853	132	3.0	84.0	13.0				1.01
22	T11130705	40	1.014	36	846	132	3.6	83.4	13.0				1.28
23	T11130706	40	1.014	39	843	132	3.8	83.1	13.0				1.12
24	T11130707	40	1.015	41	842	132	4.0	83.0	13.0				1.09
25	T11130708	40	1.014	42	840	132	4.1	82.8	13.0				1.06
26	T11130709	40	1.015	42	841	132	4.1	82.9	13.0				1.06
27	T11130710	40	1.014	42	840	132	4.1	82.8	13.0				1.05
28	T11130711	40	1.014	15	867	132	1.5	85.5	13.0				1.09
29	T11130712	40	1.014	16	866	132	1.6	85.4	13.0				4.61
30	T11130713	40	1.014	15	867	132	1.5	85.5	13.0				4
31	T11130714	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0				1.03
32	T11130715	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0				<1.02
33	T11130716	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0				1.03
34	T11130717	40	1.015	20	883	112	2.0	87.0	11.0				1.7
35	T11130718	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0				1.08
36	T11130719	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0				1.8
37	T11130720	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0				1.13
38	T11130721	40	1.015	29	874	112	2.9	86.1	11.0				1.26
39	T11130722	40	1.014	29	873	112	2.9	86.1	11.0				1.1

圖80A

測試	實驗	溫度	初始壓力	分壓				濃度		結果	Pc
				C_2H_4	N_2	O_2	C_2H_6	N_2	O_2		
		°C	psig	psia	psia	psia	psia	mol%	mol%		psig
40	T11140723	40	1014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	非爆炸	1.08
41	T11140724	40	1014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	非爆炸	1.05
42	T11140725	40	1014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	非爆炸	1.05
43	T11140726	40	1014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	非爆炸	<1.02
44	T11140727	40	1014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	非爆炸	<1.02
45	T11140700	40	1014	16	886	112	1.6	87.4	11.0	非爆炸	<1.02
46	T11140701	40	1014	17	885	112	1.7	87.3	11.0	爆炸	1.01
47	T11140702	40	1014	16	886	112	1.6	87.4	11.0	爆炸	1.54
48	T11140703	40	1014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	非爆炸	<1.02
49	T11140704	40	1015	20	899	96	2.0	88.6	9.5	非爆炸	1.05
50	T11140705	40	1014	20	898	96	2.0	88.6	9.5	非爆炸	1.05
51	T11140706	40	1014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	非爆炸	1.05
52	T11140707	40	1015	23	886	106	2.3	87.3	10.4	爆炸	1.19
53	T11140708	40	1014	25	884	105	2.5	87.2	10.4	爆炸	1.09
54	T11140709	40	1014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	非爆炸	1.05
55	T11140710	40	1014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	非爆炸	1.05
56	T11140711	40	1014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	非爆炸	1.07
57	T11140712	40	1014	20	889	105	2.0	87.7	10.4	爆炸	1.21
58	T11140713	40	1014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	非爆炸	1.04
59	T11140714	40	1014	18	891	105	1.8	87.9	10.4	爆炸	1.01
60	T11140715	40	1014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	非爆炸	1.03
61	T11140716	40	1014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	非爆炸	1.03
62	T11140717	40	1014	21	890	103	2.1	87.8	10.2	爆炸	1.1
63	T11140718	40	1014	21	891	102	2.1	87.9	10.1	爆炸	1.09
64	T11140719	40	1014	21	892	101	2.1	88.0	10.0	爆炸	1.09
65	T11140720	40	1014	22	891	101	2.2	87.9	10.0	爆炸	1.1
66	T11140721	40	1014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	非爆炸	1.06
67	T11140722	40	1014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	非爆炸	1.08
68	T11140723	40	1014	19	894	101	1.9	88.2	10.0	爆炸	1.12
69	T11140724	40	1014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	非爆炸	1.06
70	T11140725	40	1014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	非爆炸	1.03
71	T11140726	40	1014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	非爆炸	1.04
72	T11140727	40	1014	20	895	96	2.0	88.3	9.5	非爆炸	1.08
73	T11140728	40	1014	20	895	93	2.0	88.3	9.8	爆炸	1.1
74	T11140729	40	1014	20	896	98	2.0	88.4	9.7	非爆炸	1.06
75	T11140730	40	1014	20	896	98	2.0	88.4	9.7	非爆炸	1.08
76	T11140731	40	1014	20	896	98	2.0	88.4	9.7	非爆炸	1.07
77	T11140732	40	1014	81	761	172	8.0	75.0	17.0	非爆炸	1.04
78	T11140733	40	1014	81	750	183	8.0	74.0	18.0	爆炸	1.3
79	T11140734	40	1014	81	754	179	8.0	74.4	17.7	爆炸	1.24
80	T11140735	40	1014	81	757	176	8.0	74.7	17.4	非爆炸	1.03
81	T11140736	40	1014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	非爆炸	1.05
82	T11140737	40	1014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	非爆炸	1.03
83	T11140738	40	1014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	非爆炸	1.03

圖80B

測試系列2

測試	樣品名稱	溫度	初始壓力	分壓				濃度				結果	P_{CF}
				H_2O	C_6H_6	N_2	O_2	H_2O	C_6H_6	N_2	O_2		
		℃	psia	毫巴	毫巴	毫巴	毫巴	體積%	體積%	體積%	體積%		psia
1	T11150700	40	1014	41	119	641	213	4.0	11.7	63.2	21.0	通過	1.03
2	T11150701	40	1014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	非通過	1.07
3	T11150702	40	1014	41	120	640	213	4.0	11.8	63.1	21.0	通過	1.09
4	T11150703	40	1014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	非通過	1.05
5	T11150704	40	1014	40	120	641	213	3.9	11.8	63.2	21.0	通過	1.03
6	T11150705	40	1014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	非通過	1.05
7	T11150706	40	1014	40	15	746	213	3.9	1.5	73.6	21.0	通過	4.68
8	T11150707	40	1014	41	15	745	213	4.0	1.5	73.5	21.0	通過	5.27
9	T11150708	40	1014	41	14	746	213	4.0	1.4	73.6	21.0	非通過	1.03
10	T11150709	40	1014	42	14	745	213	4.1	1.4	73.5	21.0	非通過	1.03
11	T11160700	40	1014	41	14	746	213	4.0	1.4	73.6	21.0	非通過	1.03
12	T11160701	40	1014	41	20	850	102	4.0	2.0	83.8	10.2	通過	1.11
13	T11160702	40	1014	41	20	851	102	4.0	2.0	83.9	10.1	通過	1.11
14	T11160703	40	1014	41	20	852	101	4.0	2.0	84.0	10.0	通過	1.09
15	T11160704	40	1014	41	20	853	100	4.0	2.0	84.1	9.9	通過	1.09
16	T11160705	40	1014	41	20	854	99	4.0	2.0	84.2	9.8	非通過	1.07
17	T11160706	40	1014	40	20	855	99	3.9	2.0	84.3	9.8	非通過	1.06
18	T11160707	40	1014	41	20	854	99	4.0	2.0	84.2	9.8	非通過	1.09

圖81

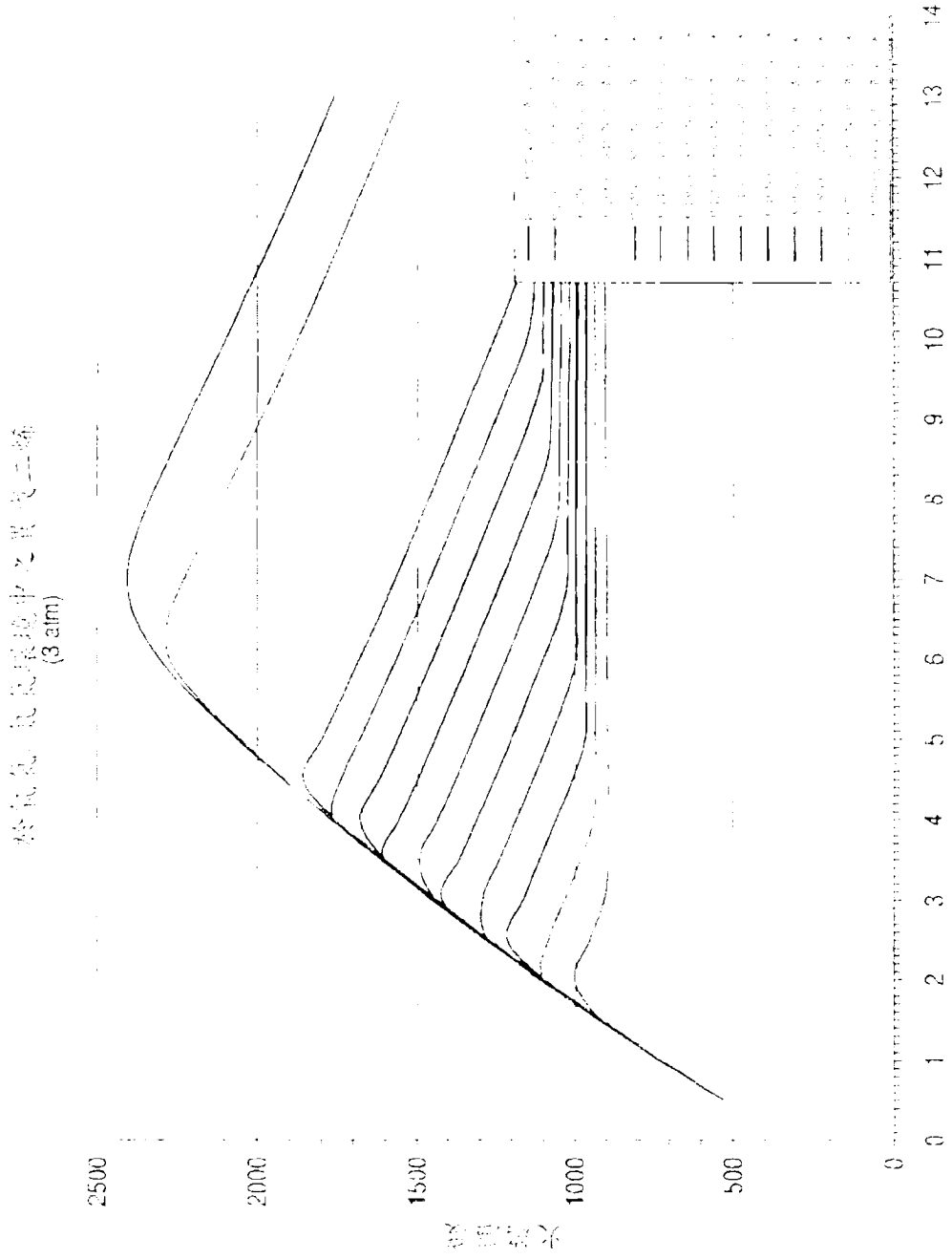


圖82

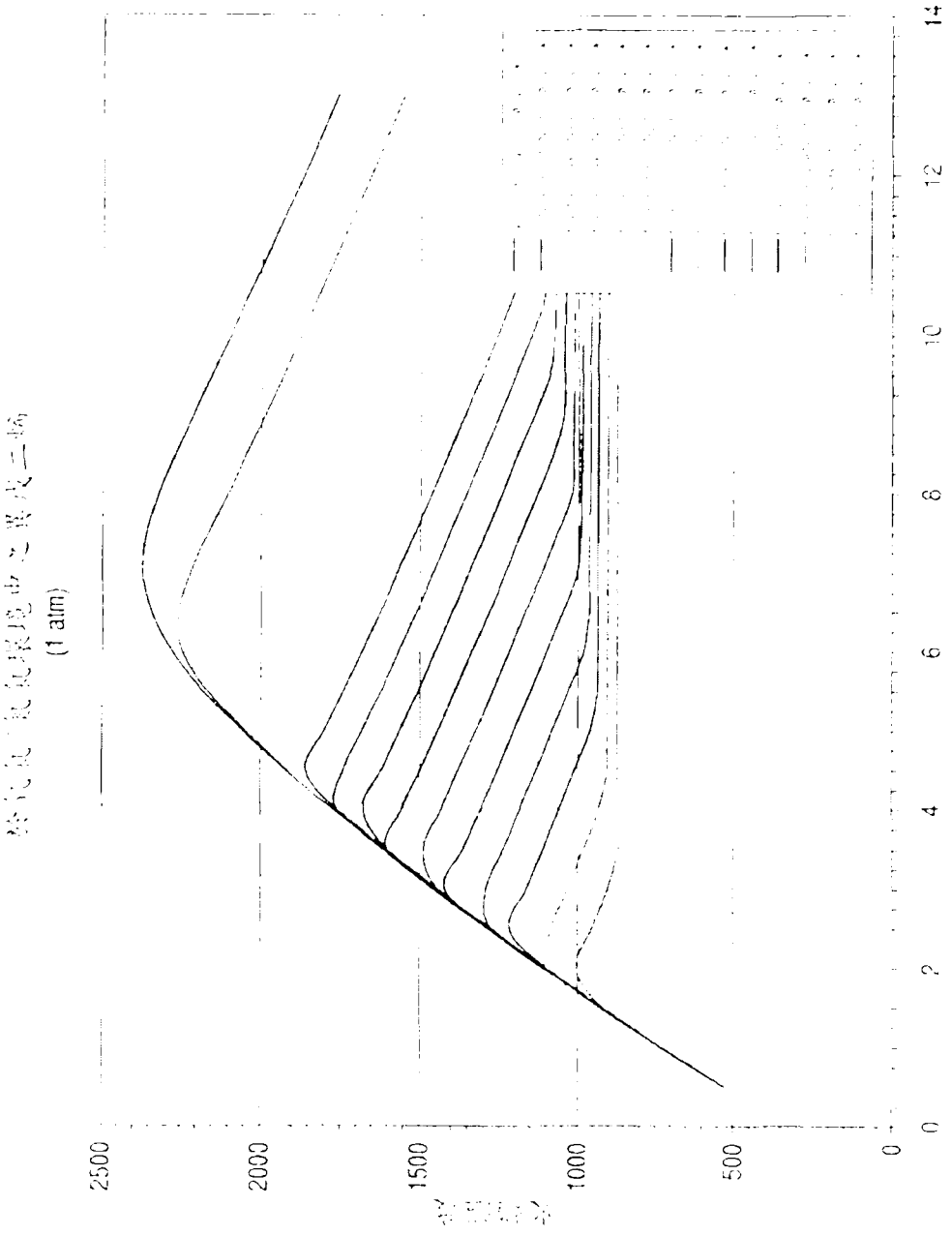


圖83

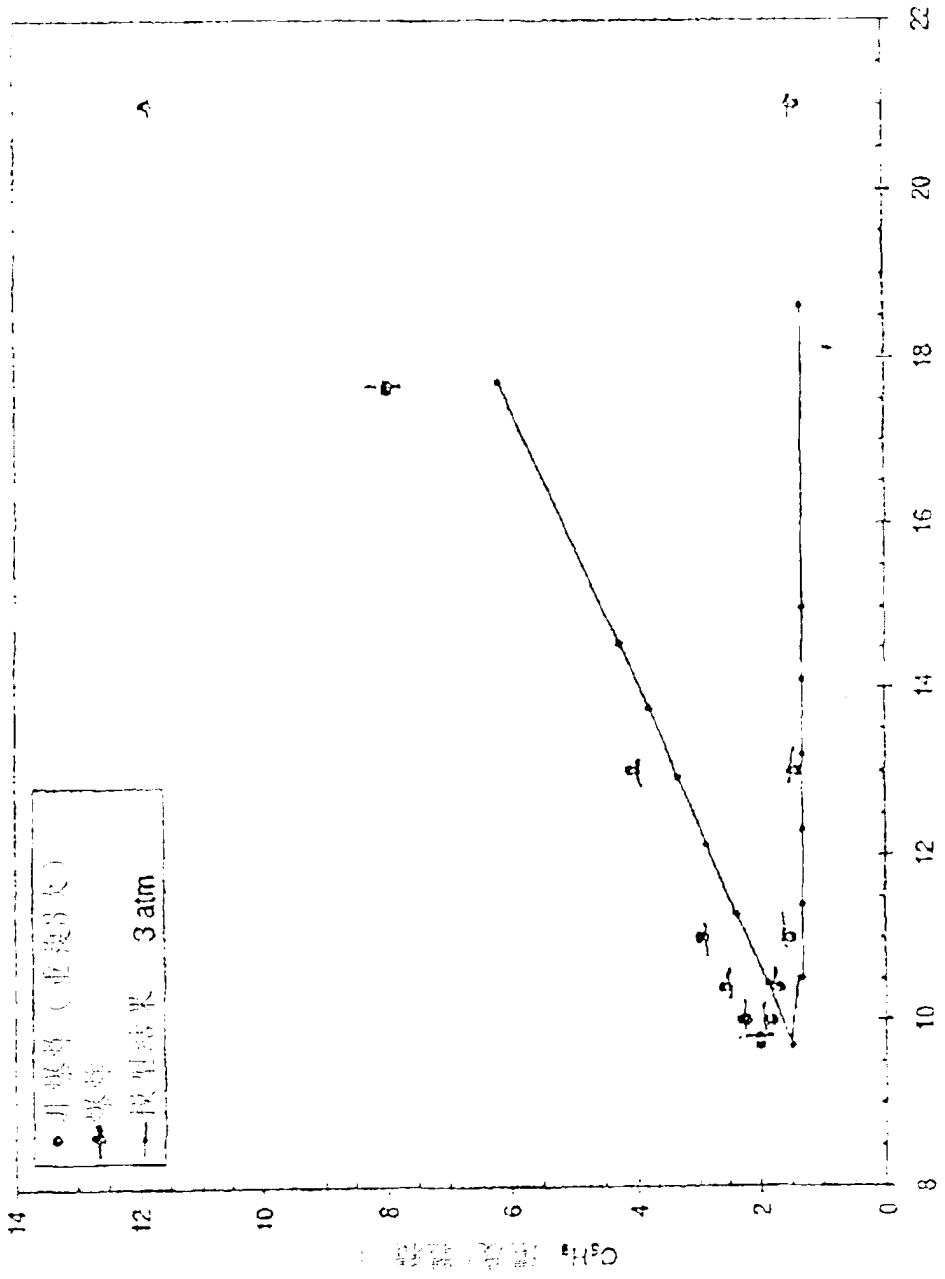


圖84

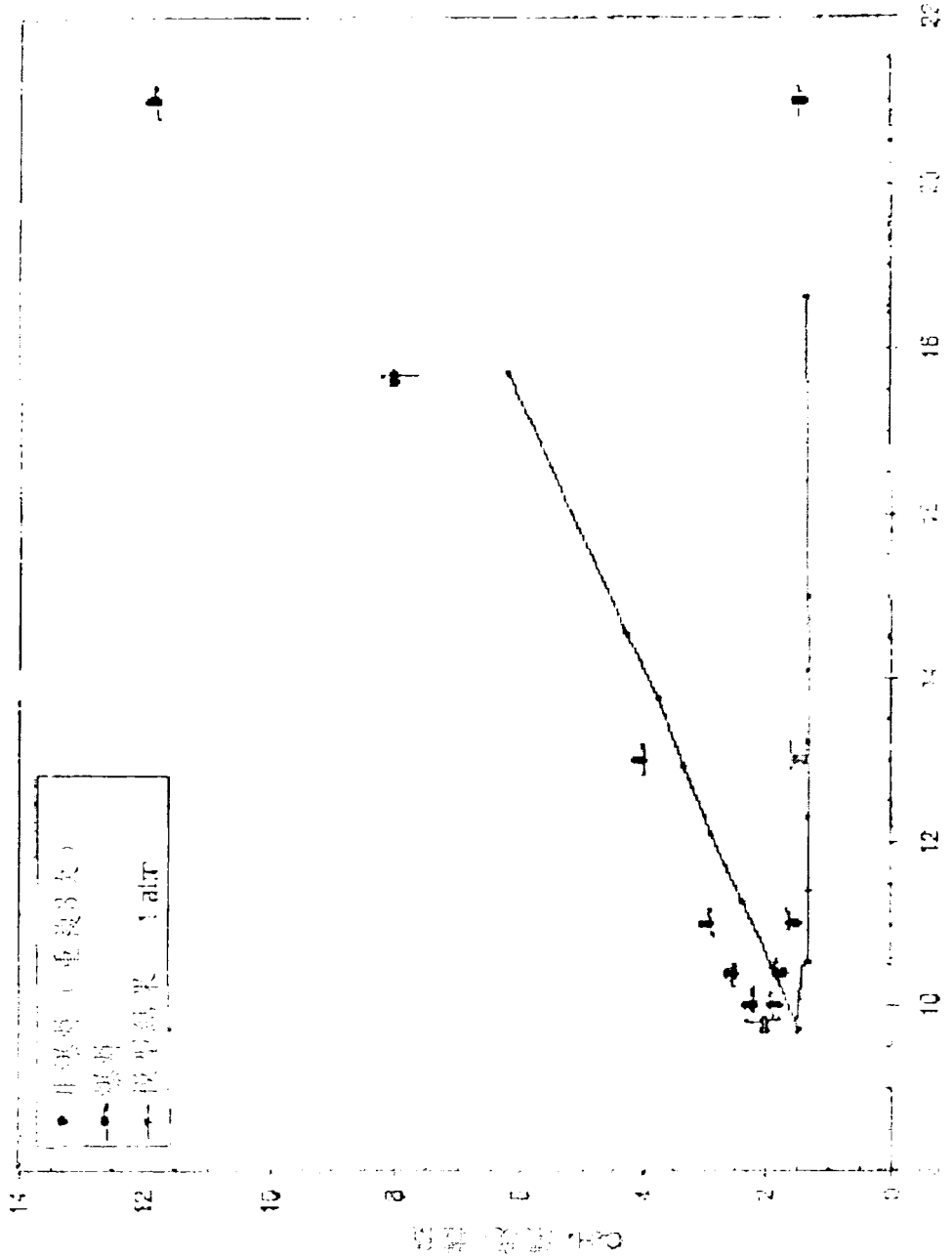


圖85

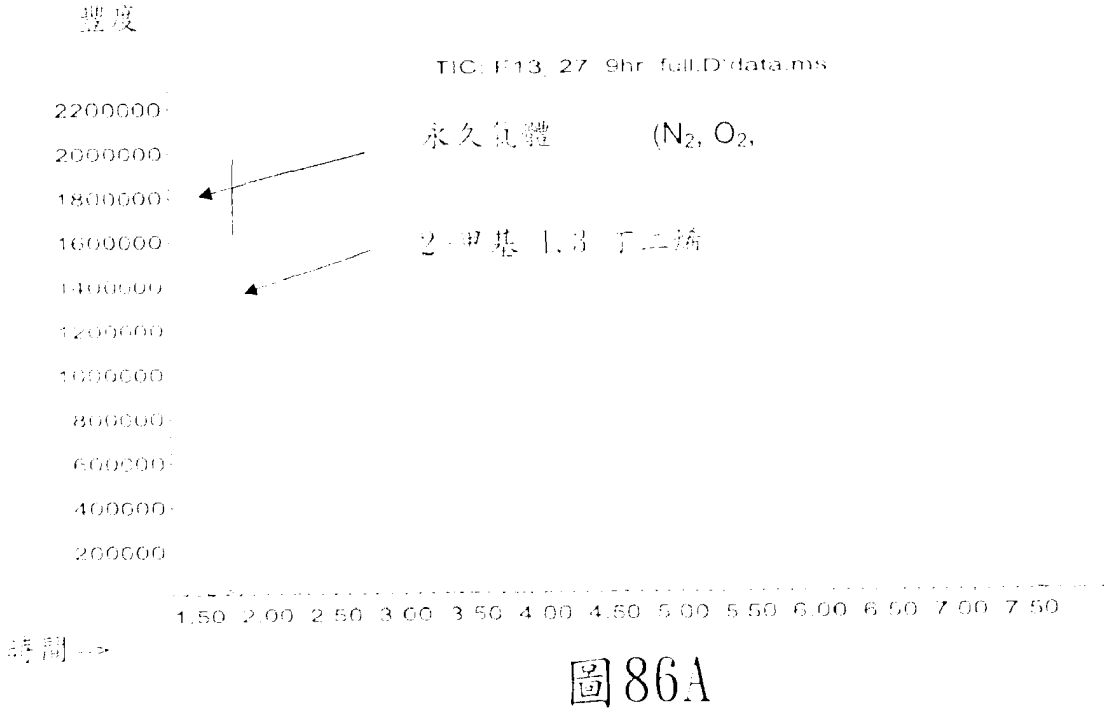

豐度
TIC: F13_27_9hr_full.D\data.ms
2200000
2000000
1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
永久氣體 (N_2, O_2,
2-甲基-1,3-丁二烯
1.50 2.00 2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50
時間 -->

圖86A

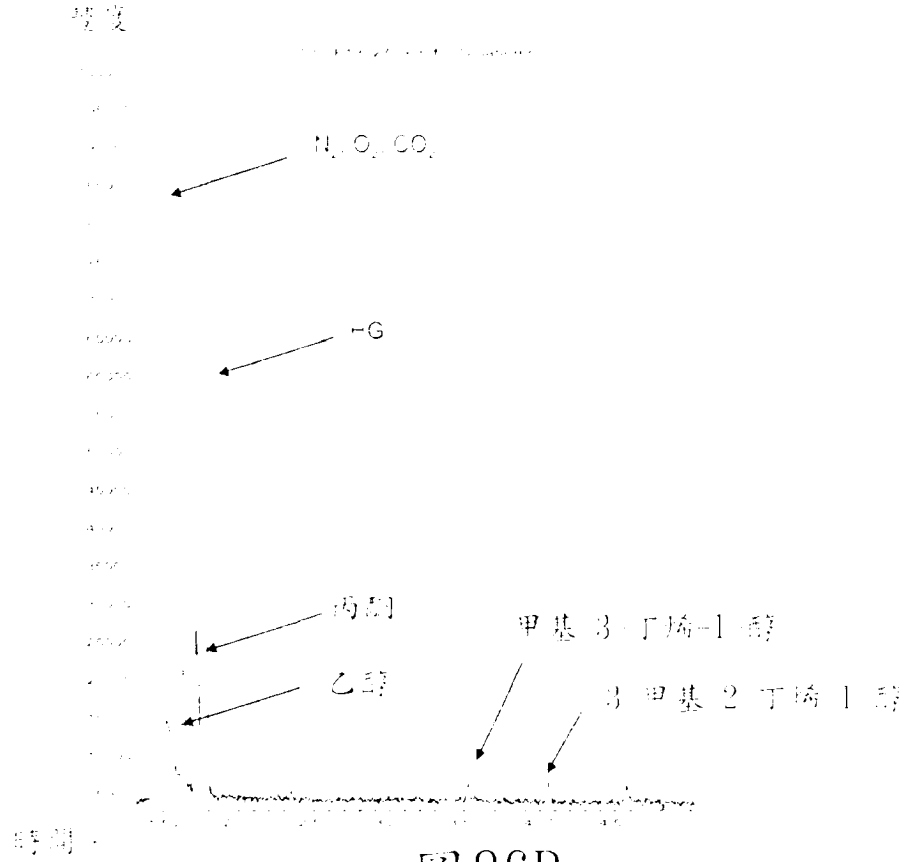


圖86B

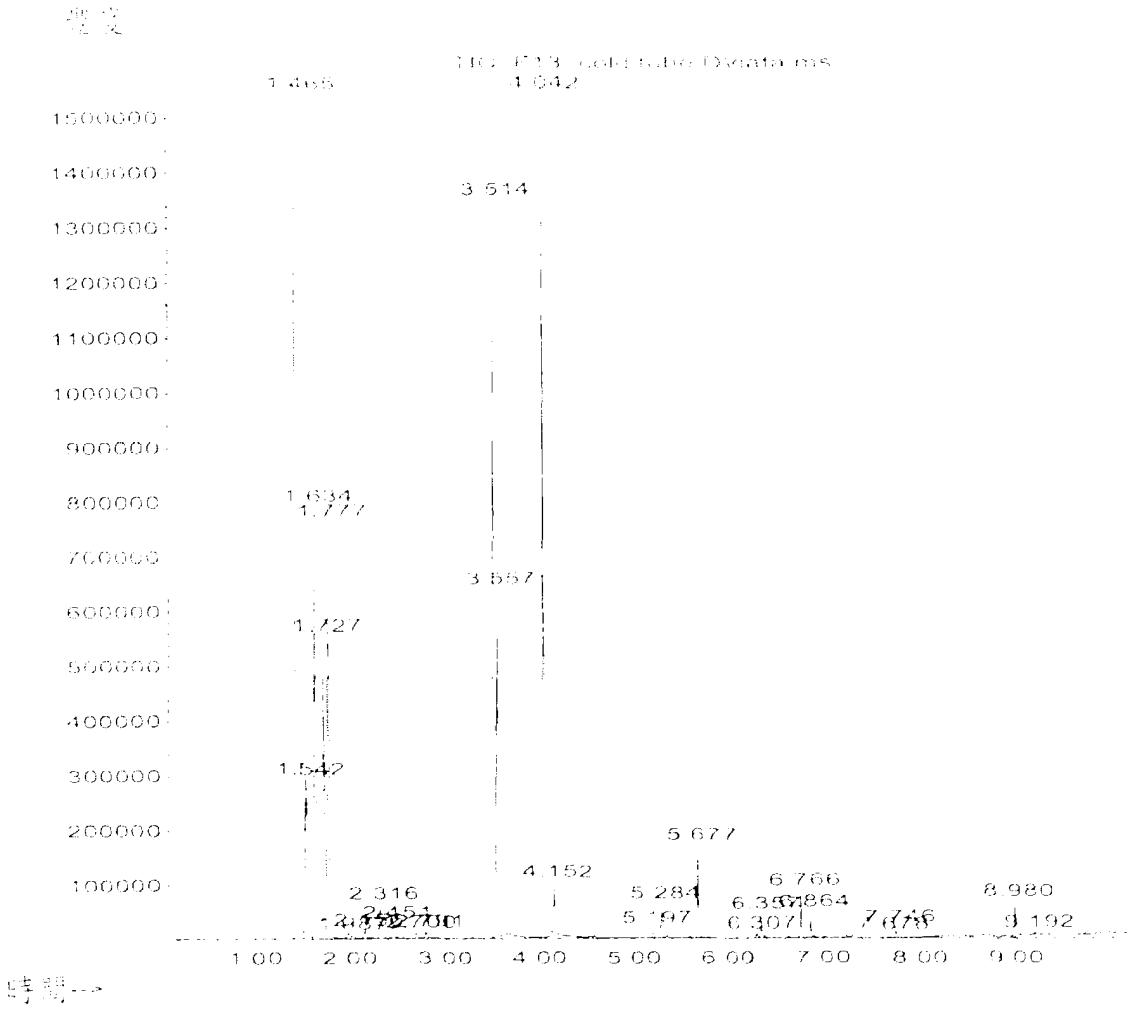

1500000
1400000
1300000
1200000
1100000
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
1.465
1.042
3.514
1.634
1.777
3.557
1.427
1.542
5.677
4.152
2.316
5.284
6.766
6.980
6.307
9.192
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
時間

圖87A

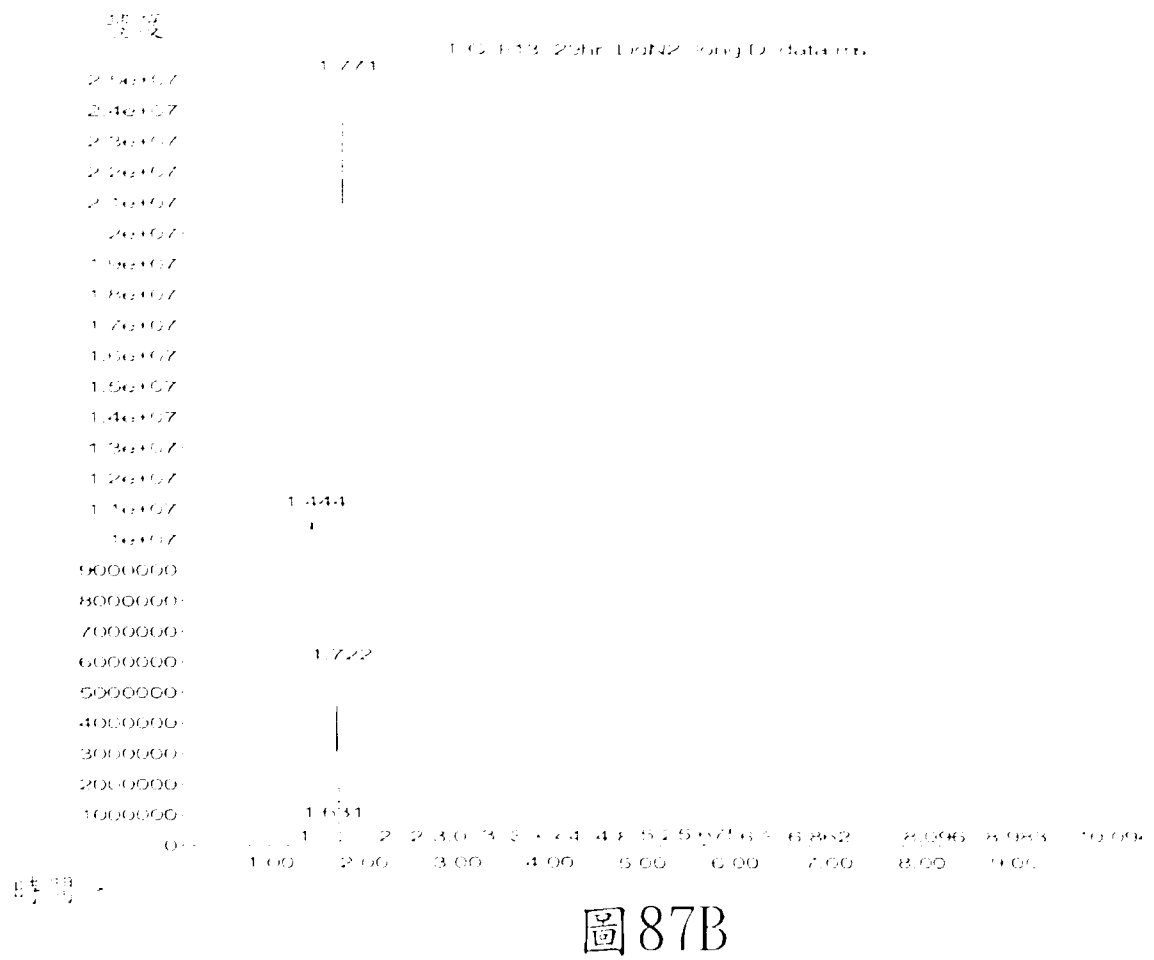


圖87B

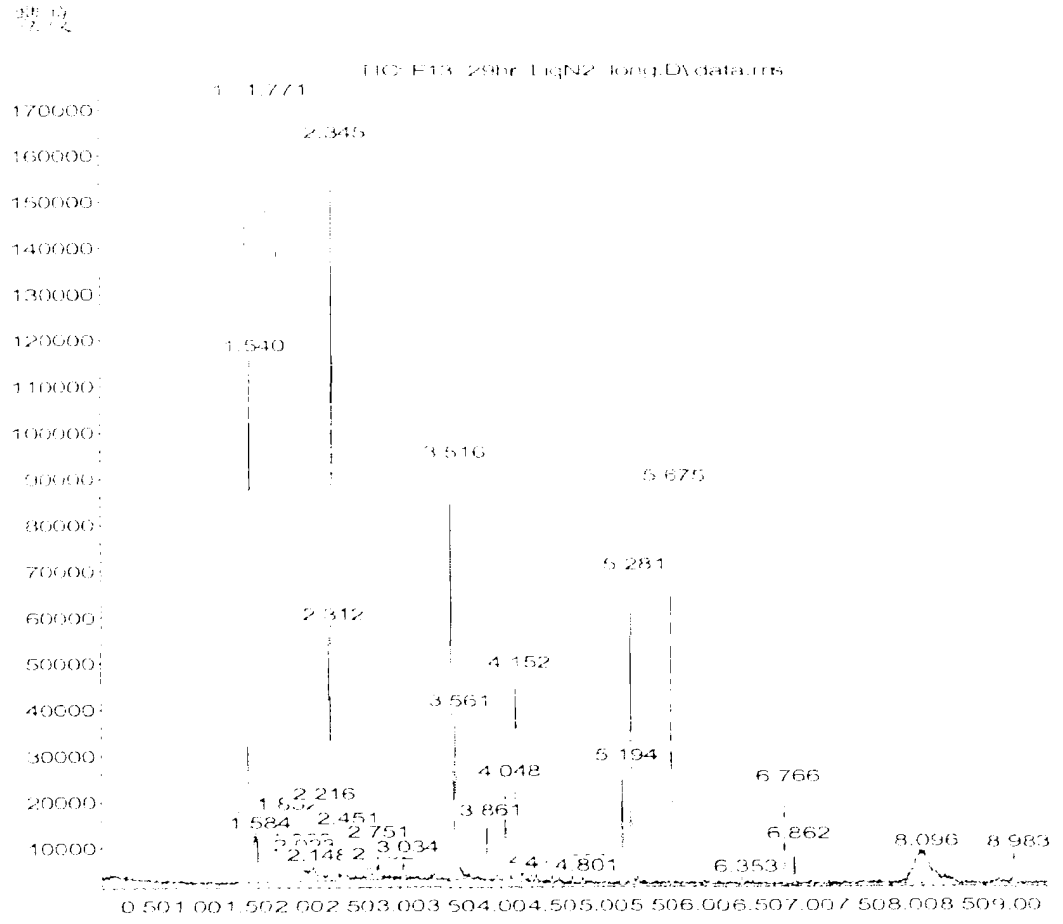

強度
HC-F13-29hr-LiqN2-long.D\data.ms
1.771
2.345
1.540
3.516
5.675
5.281
2.312
4.152
3.561
5.194
4.048
6.766
2.216
1.584
2.451
3.861
2.751
6.862
8.096
8.983
2.148
3.034
4.801
6.353
0.50 1.00 1.50 2.00 2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 8.50 9.00
時間→

圖87C

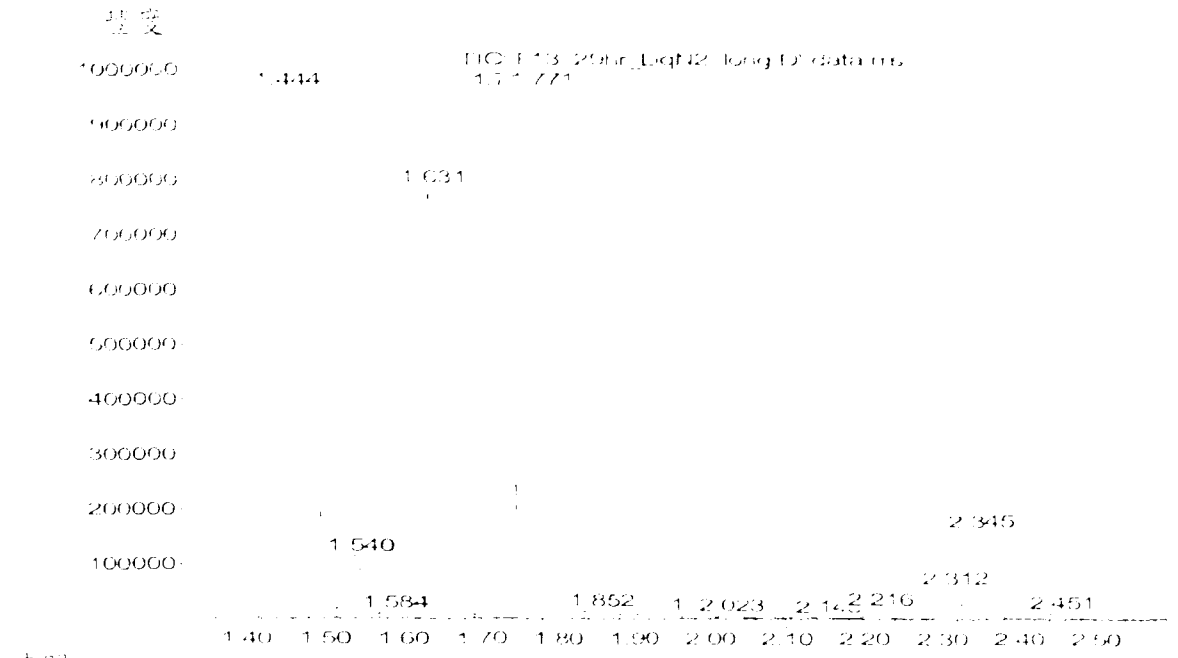

1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
1.444
1.631
1.540
1.584
1.852
2.023
2.216
2.345
2.312
2.451
1.40
1.50
1.60
1.70
1.80
1.90
2.00
2.10
2.20
2.30
2.40
2.50

圖87D

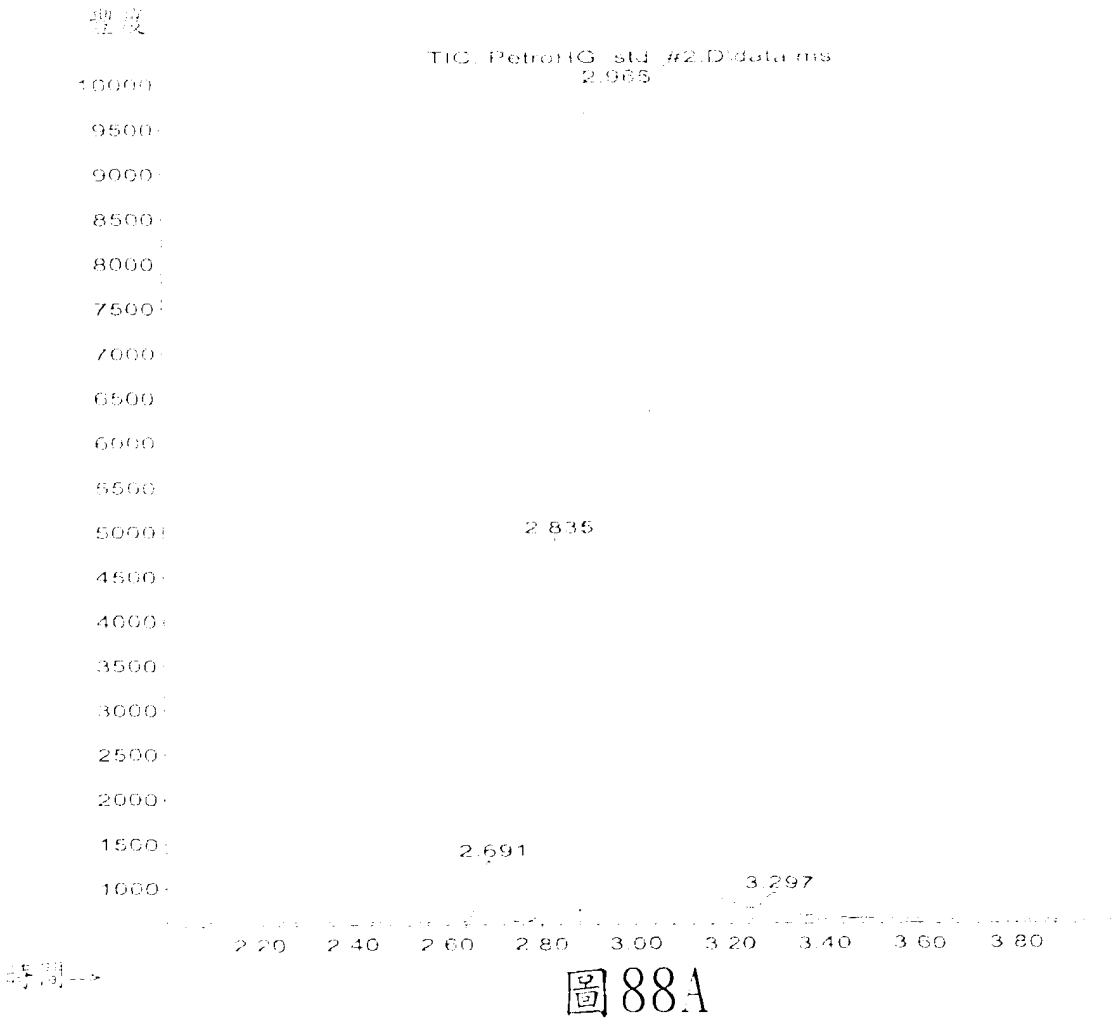

豐度
TIC: PetroHG std #2.D\data.ms
2.965
10000
9500
9000
8500
8000
7500
7000
6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
2.835
2.691
3.297
2.20
2.40
2.60
2.80
3.00
3.20
3.40
3.60
3.80
時間-->

圖88A

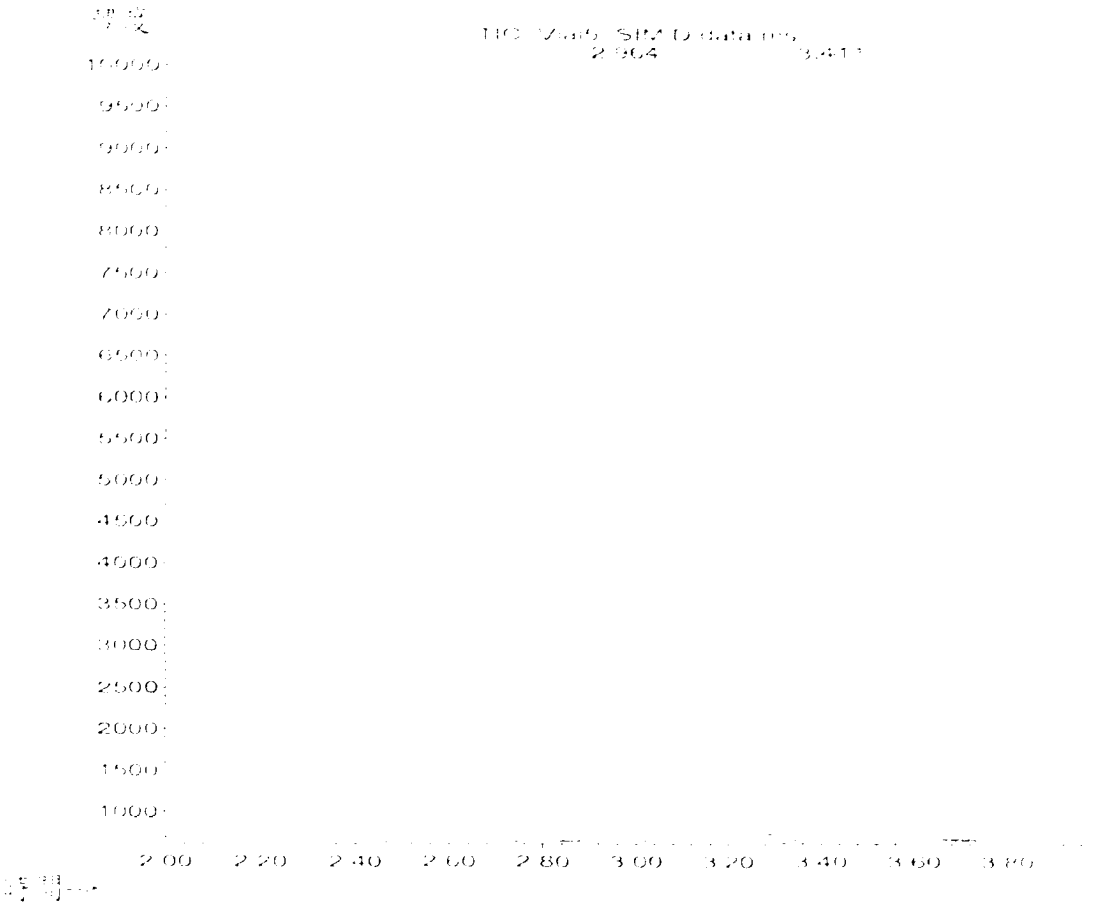

11000
9500
9000
8500
8000
7500
7000
6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
2.00
2.20
2.40
2.60
2.80
3.00
3.20
3.40
3.60
3.80

圖88B

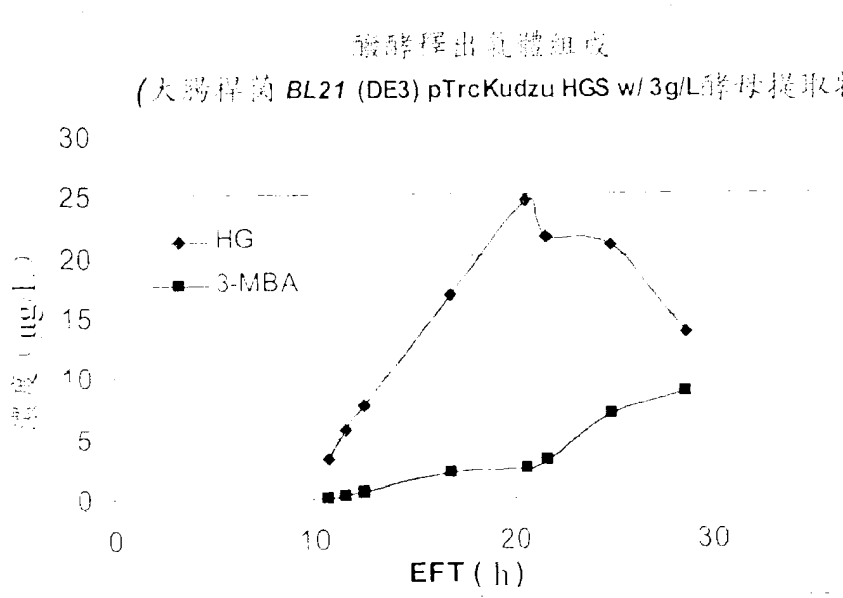
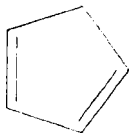
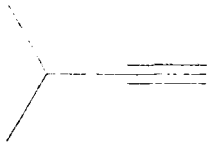

酵素萃出氣體組成
(大腸桿菌 BL21 (DE3) pTrcKudzu HGS w/ 3g/L酵母提取物)
30
25
20
15
10
5
0
HG
3-MBA
0
10
20
30
EFT (h)

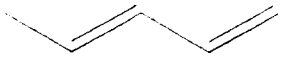
圖89



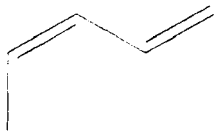
環戊二烯



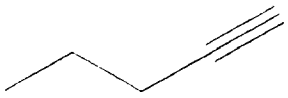
異戊烯　　3-甲基-1-丁烯



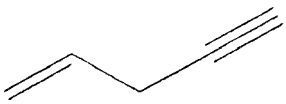
反式間戊二烯



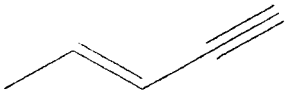
順式間戊二烯



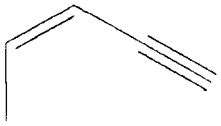
1-戊炔



戊-1-烯-1-炔



反-戊-3-烯-1-炔



順-戊-3-烯-1-炔

圖90

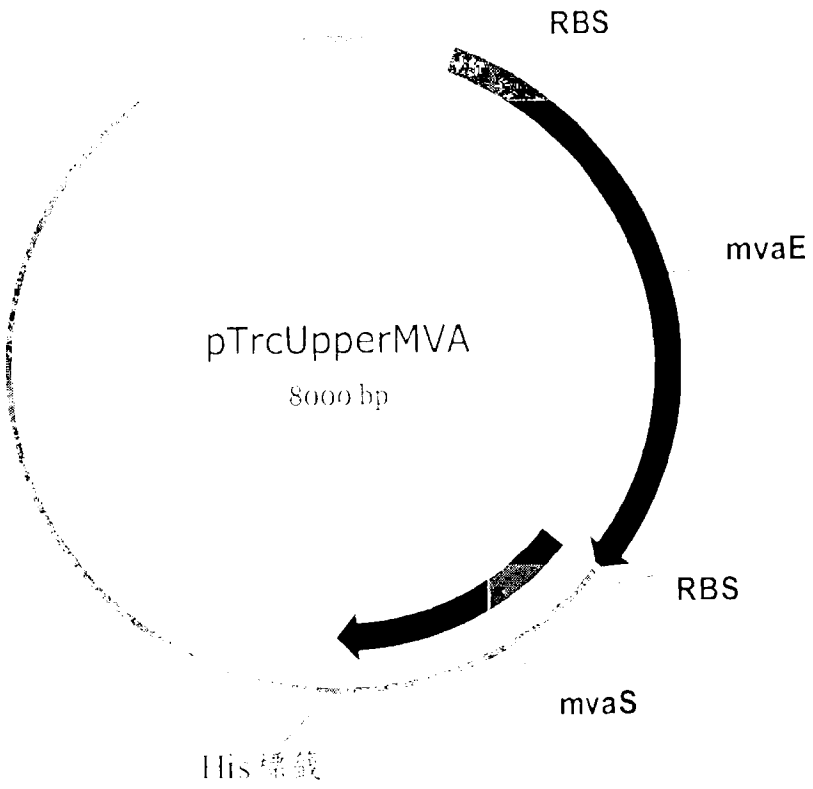


圖91

圖92A

tagctggttatcaaaatcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaactttctatcgctgaatatgaagc
catgtttgcagaaaactttagcacagacattgatcaaacgttagaagatgaattaaaatatagtatttctgctattaataatacggttcg
ttcttatcgaaactaagagatctgcagctggtaccatatgggaattcgaagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagagg
atctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagatt
ttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccca
cctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtgggtctccccatgcgagagtagggaact
gccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagt
aggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaac
tgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacatt
caaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccg
tgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatca
gttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaa
tgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacac
tattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgct
gccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcaca
acatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacg
atgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactg
gatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggt
gagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagt
caggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttt
actcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcc
cttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatct
gctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaact
ggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgc
ctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgat
agttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccg
aactgagataccacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcg
gcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccac
ctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggtt
cctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagct
gataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttt
ctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtata
cactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtc
tgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacg
cgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcg
cggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagta
tgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagc
ggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgcca
cctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtgg
tgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatc
attaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgacc
agacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagca
aatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaat
tcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcg

圖92B

ttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtg
cggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcg
cctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtct
cactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctg
gcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

SEQ ID NO:23

圖 92C

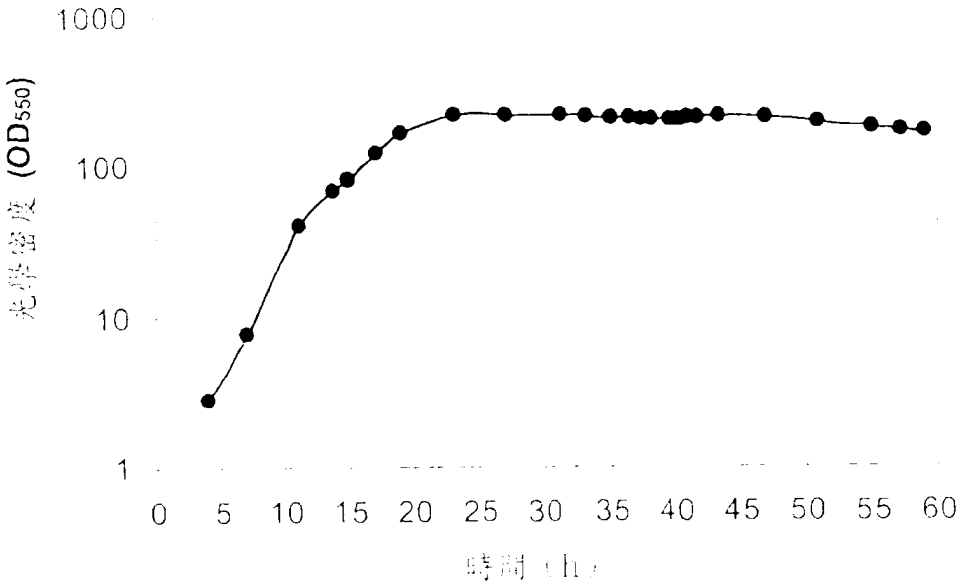


圖93

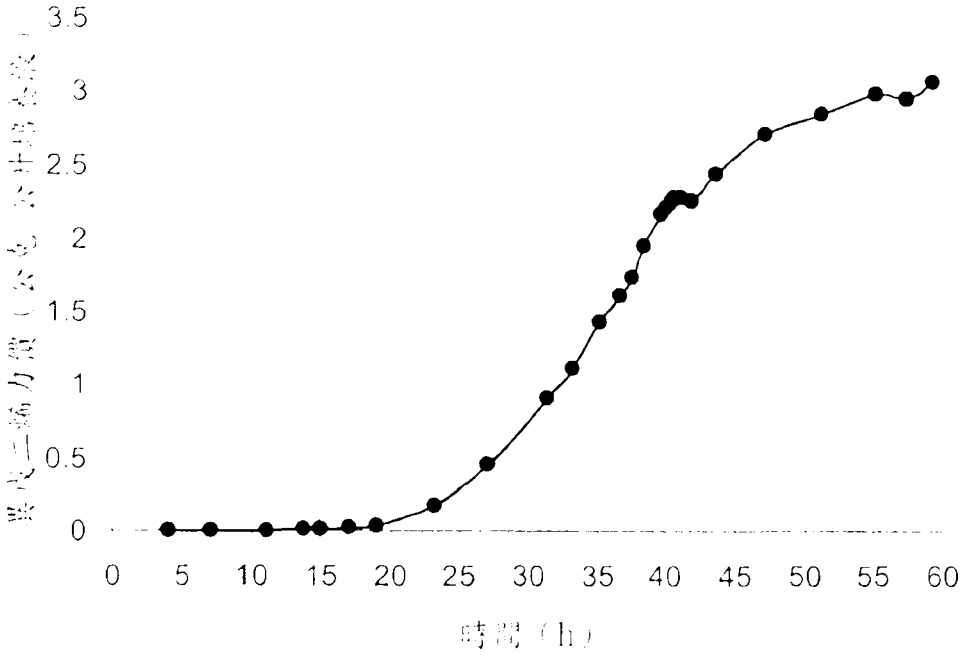


圖94

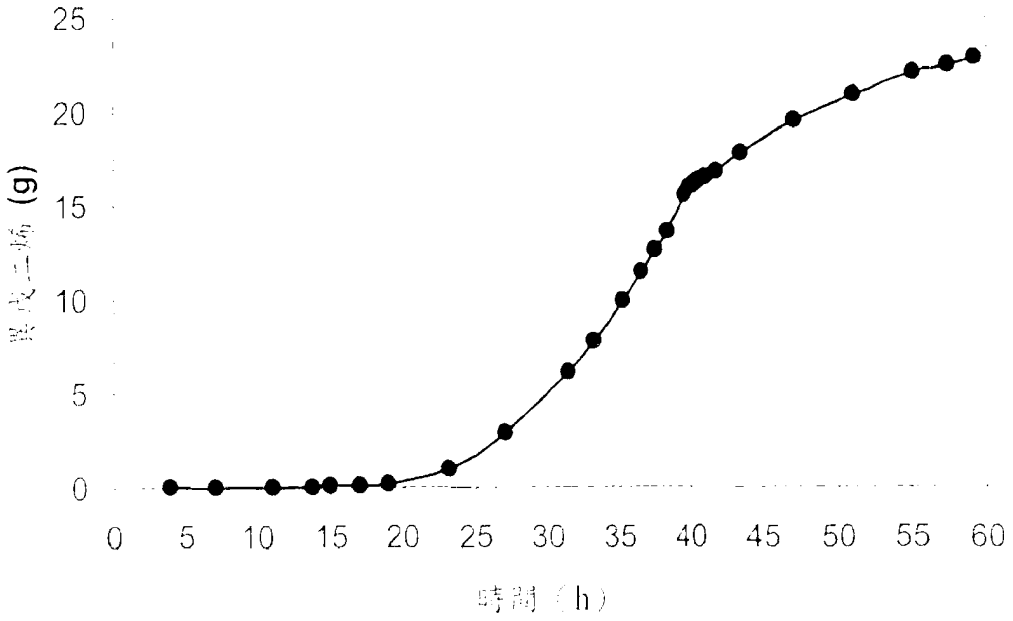


圖95

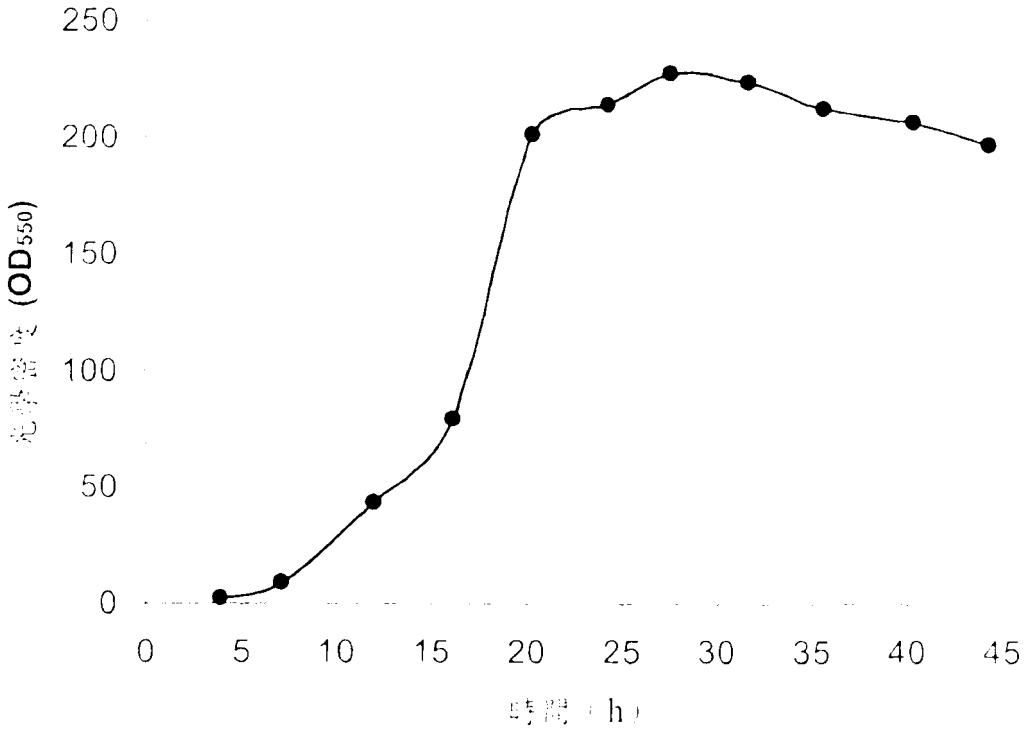


圖96

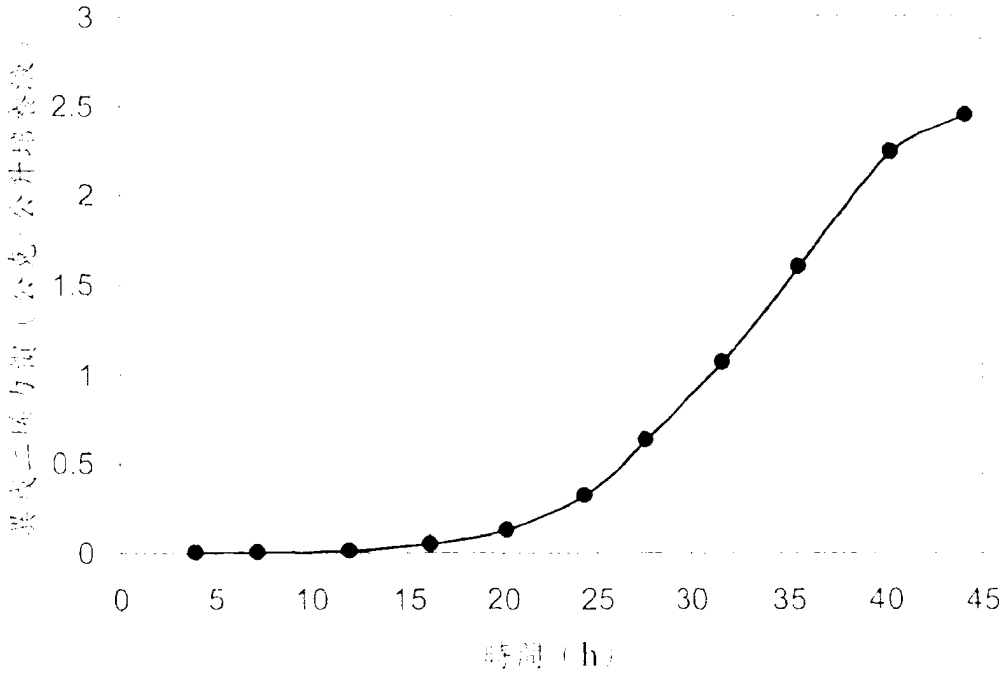


圖97

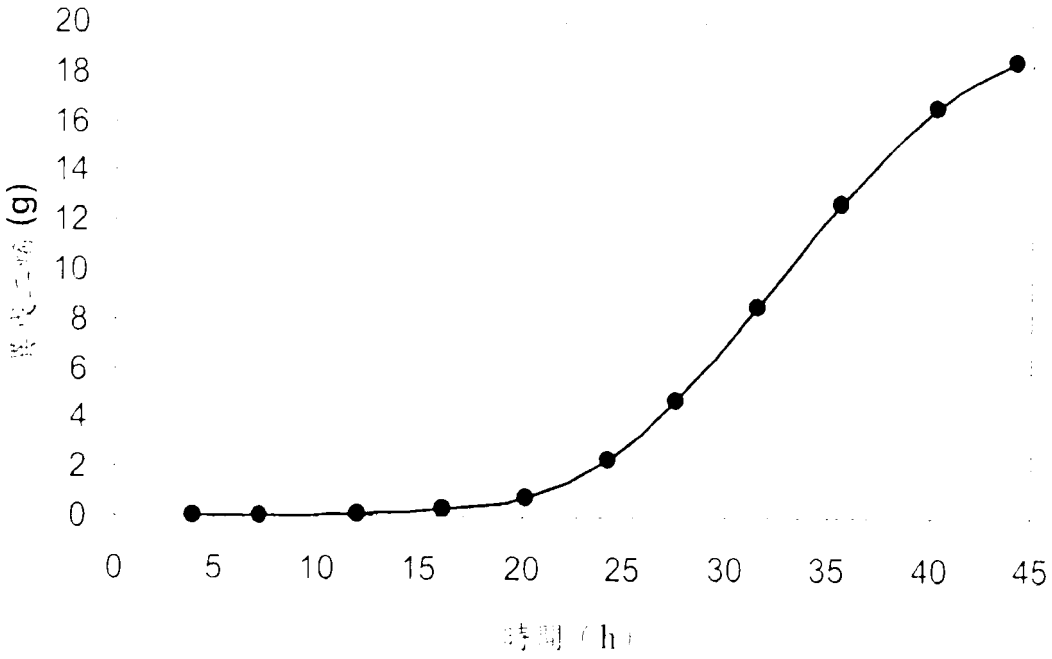


圖98

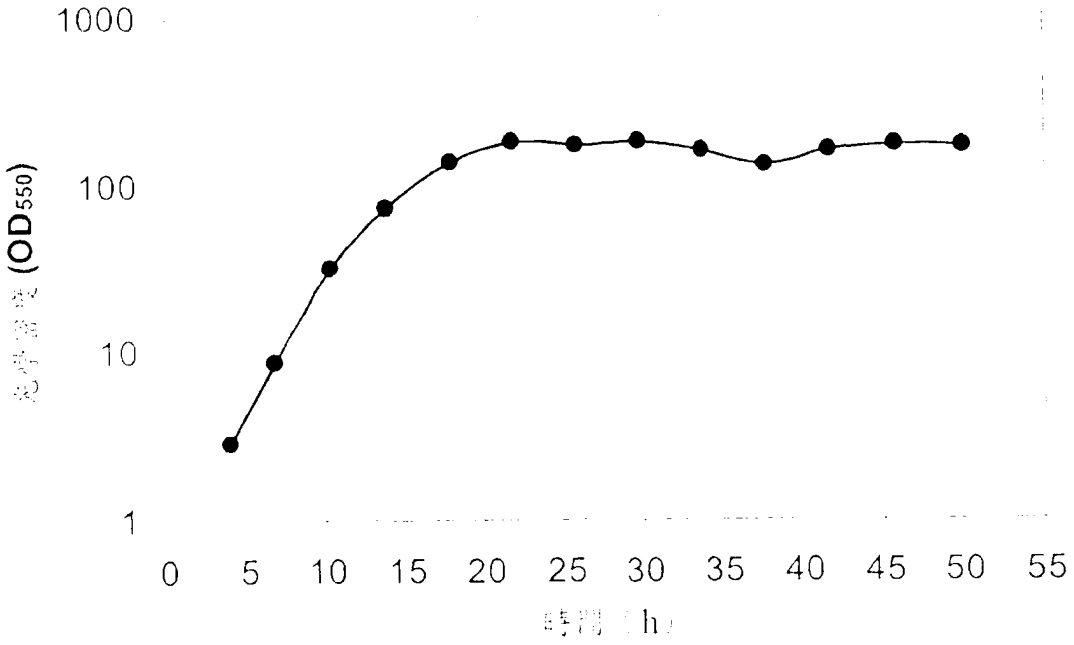


圖99

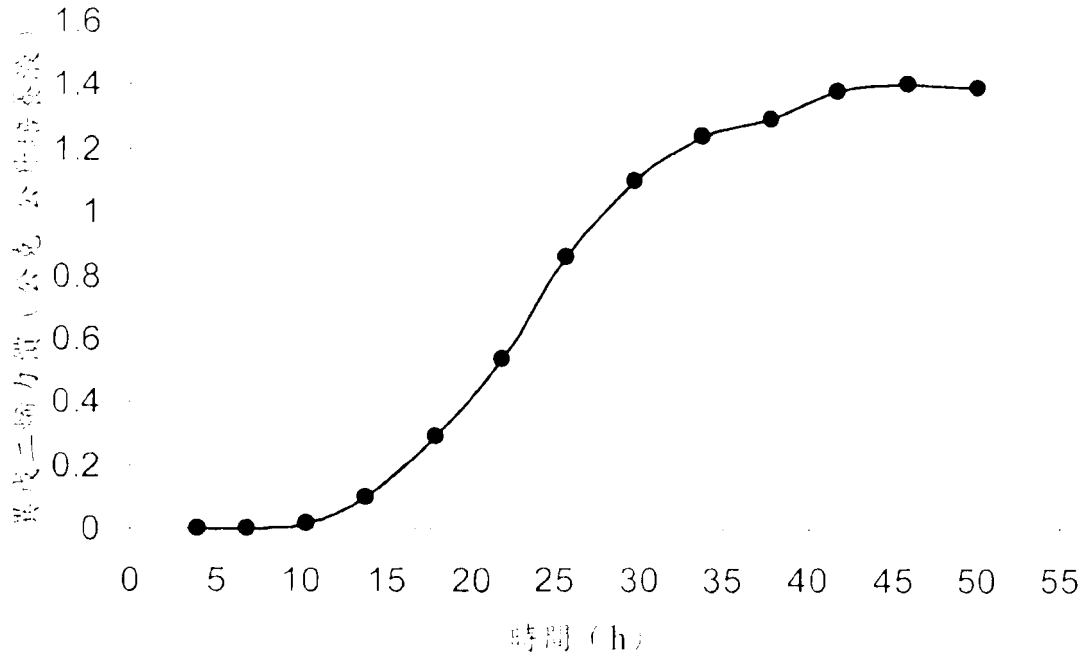


圖100

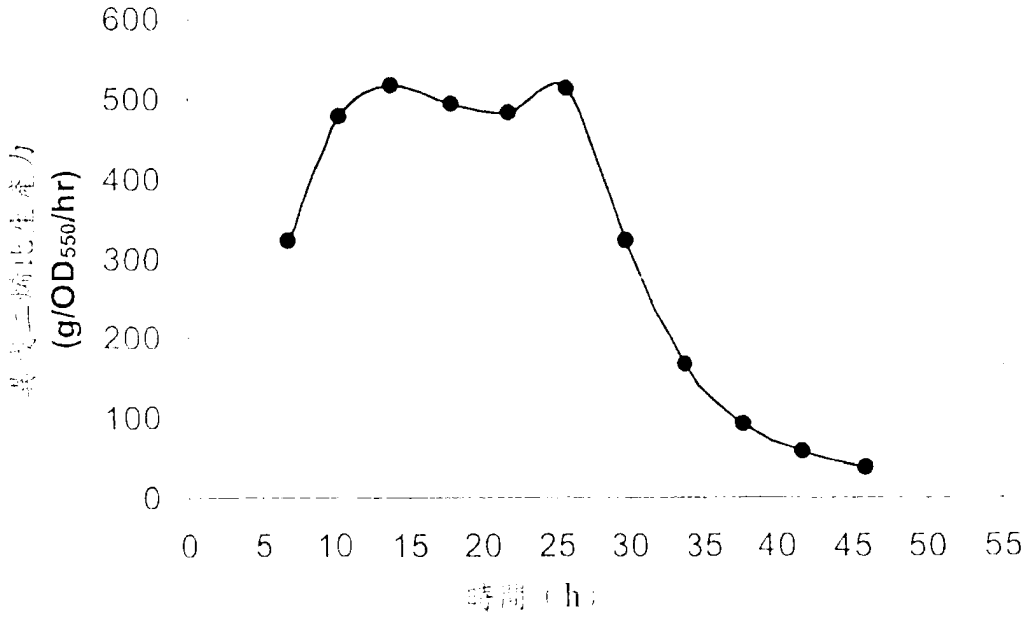

600
500
400
300
200
100
0
(g/OD550/hr)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
時間（h）

圖101

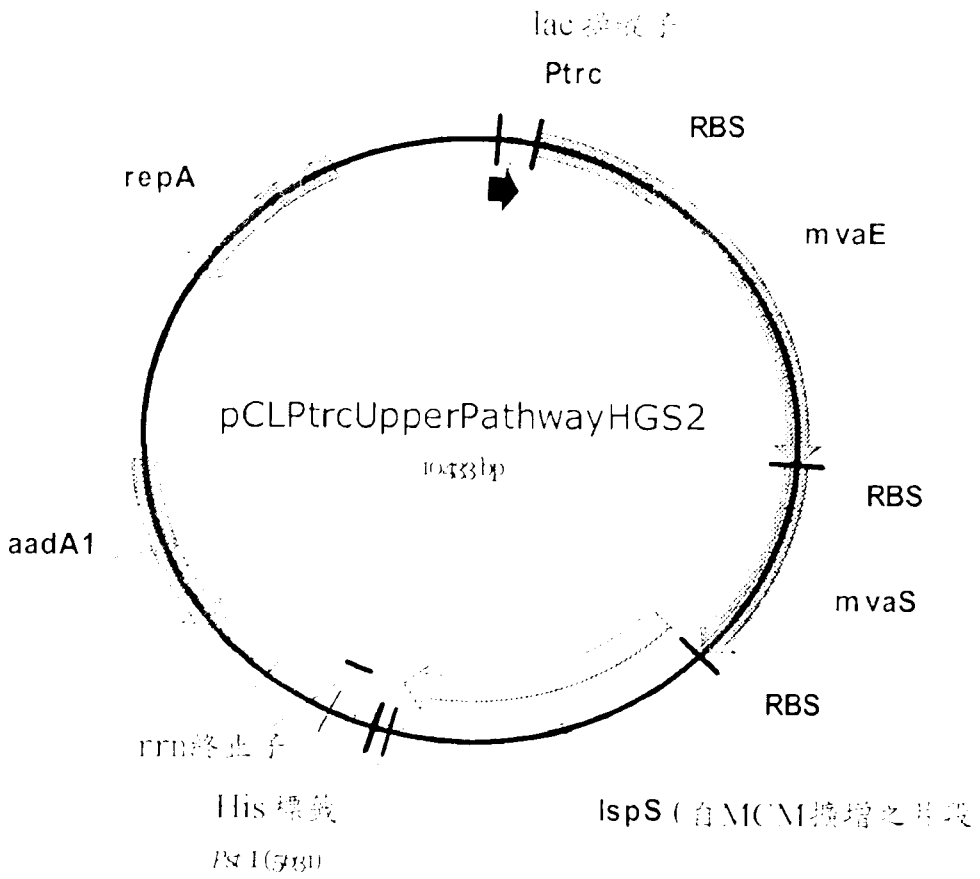

lac啟動子
Ptrc
RBS
repA
mvaE
pCLPtrcUpperPathwayHGS2
RBS
aadA1
mvaS
RBS
rrnB終止子
His標籤
IspS (自MCM擴增之基因

圖102

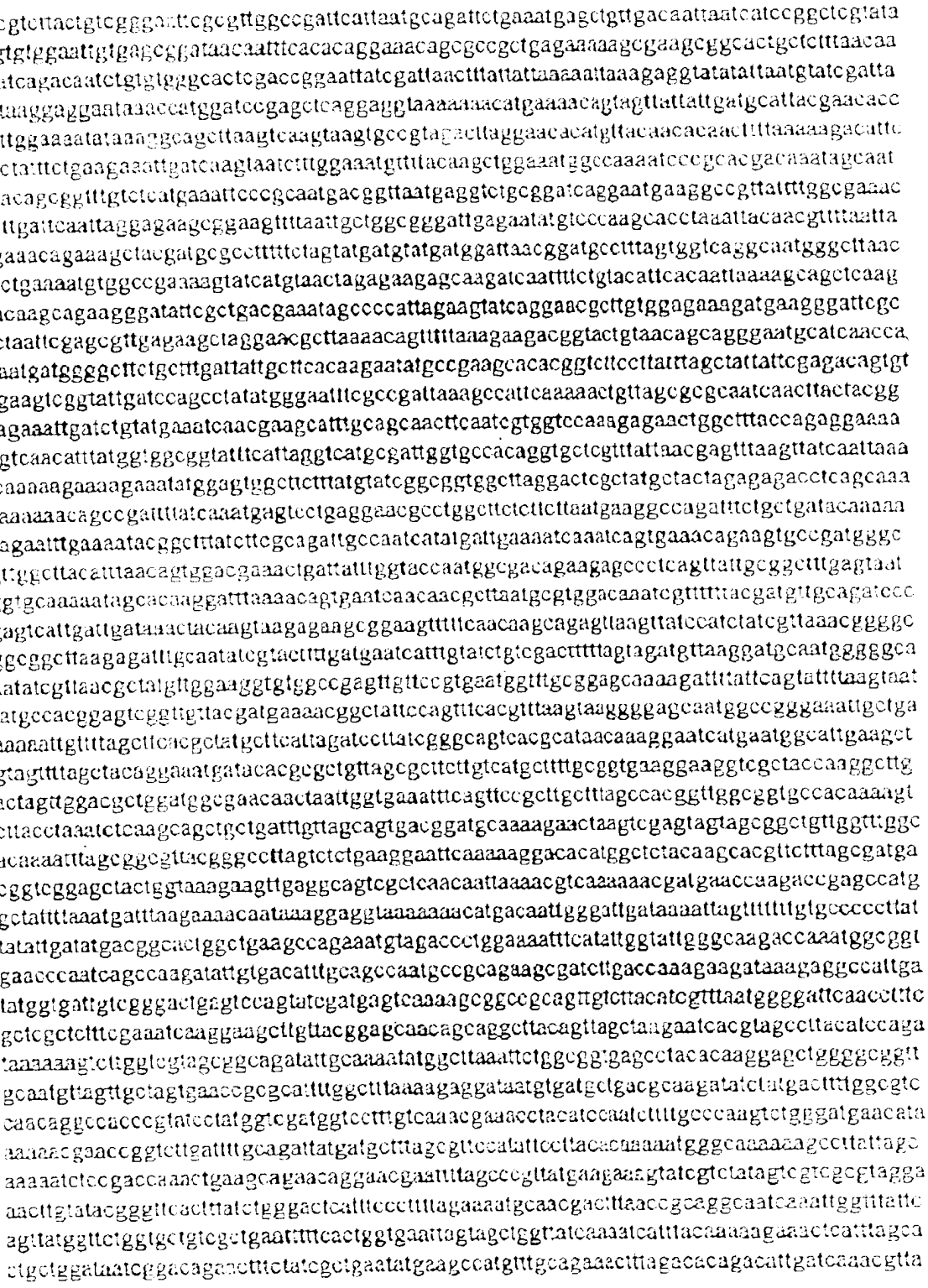


圖 103A

圖103B

gcccgaggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttc
ggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttc
gtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaa
cgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctg
ccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcct
cggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgg
gtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccga
gagcttggcacccagcctgcgcgagcagggggaattaatcccacgggttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtgttgctag
tttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacg
ggaggcgtcactggctcccgtgttgtcggcagctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttga
gctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcat
ctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccgtt
ttcatctgtgcatatggacagttttcccttttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagat
acaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatgagaac
gaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgt
agtgttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtattttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttc
ggttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcatat
tgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatggtagttatttttcaagcattaacatga
acttaaattcatcaaggctaatctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttctttttaataaccactcataaatcctcatagagtat
ttgtttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataaggcaatatctctttcactaaaaactaat
tctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctc
gtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaac
gataccgtccgttctttccttgtagggttttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgtt
aagtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcactat
accaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttccttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagaccttttgctggaa
aacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctagaccttttgtgtgttttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaa
gaaagaataaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactacttagtcagttccgcagtattacaaaaggat
gtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatc
gctgaatattccttttgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggca
gtgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacg
ggcttctcagggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtct
gaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta

SEQ ID NO:24

圖103C

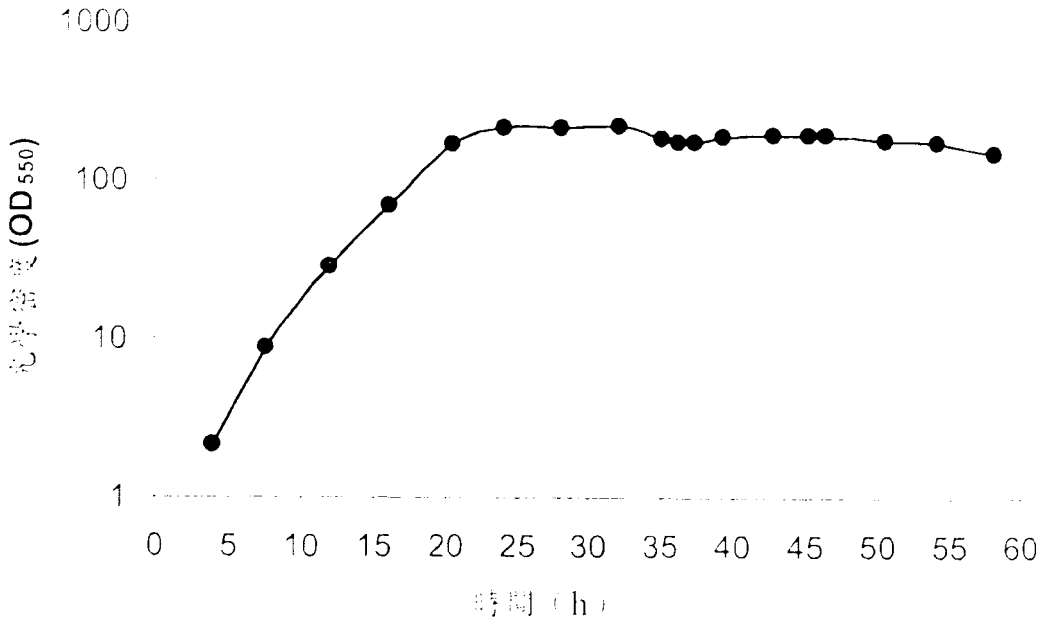


圖104

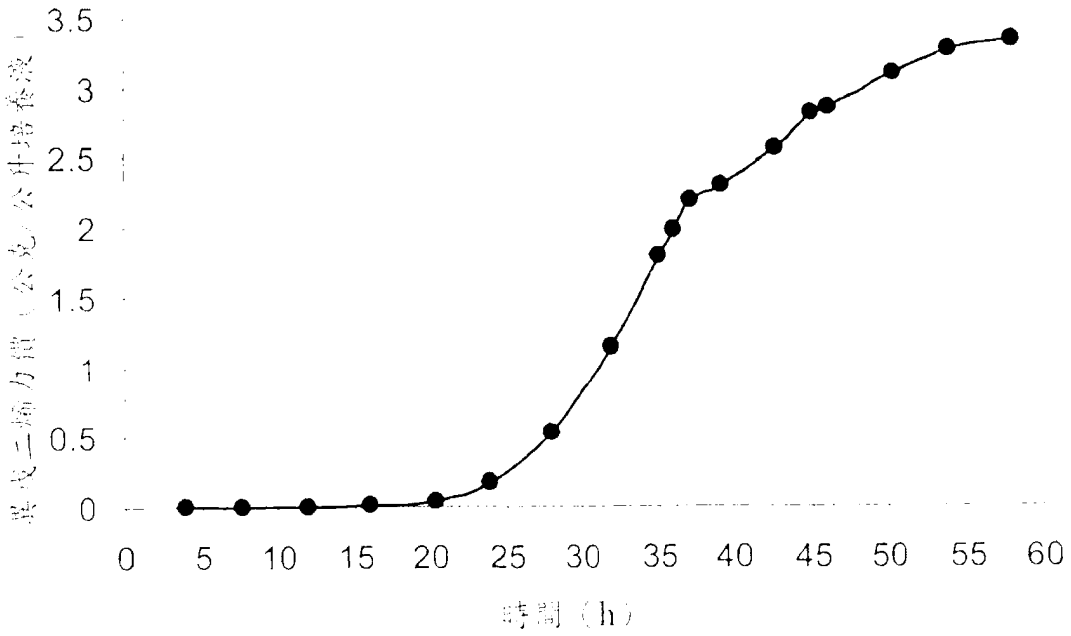


圖105

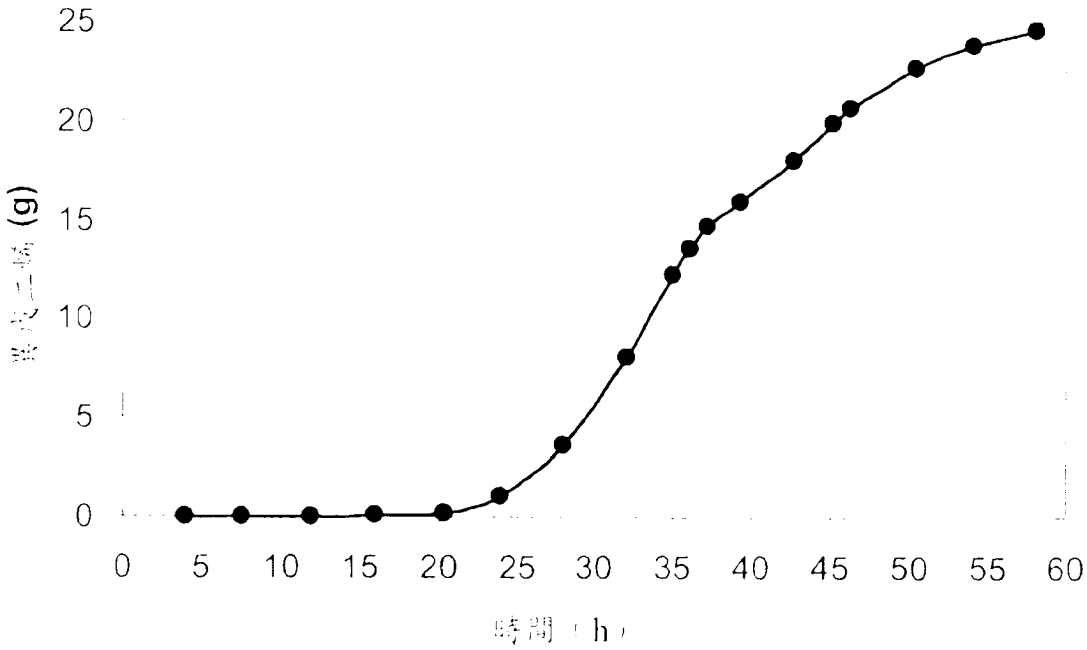
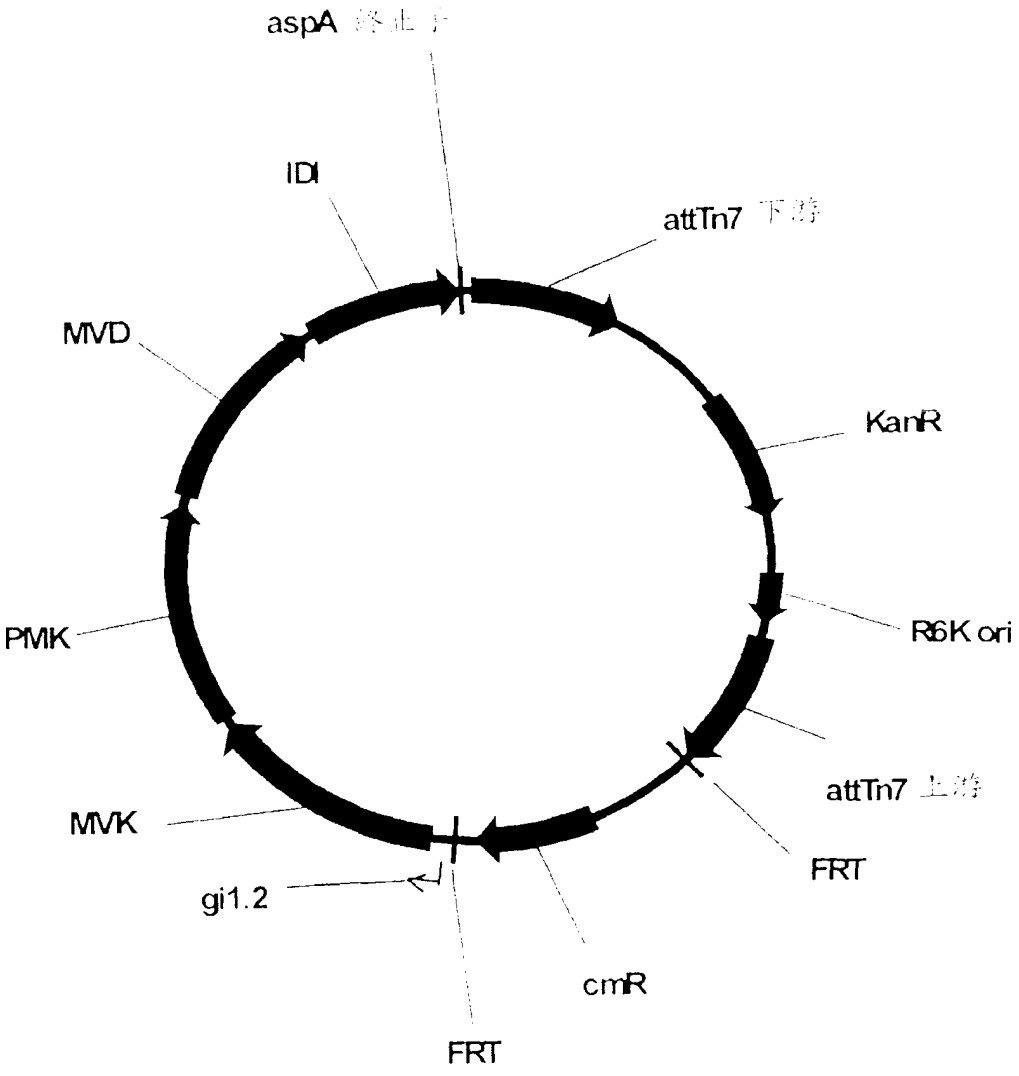


圖106



MCM330 - attTn7處之FRT-cm-FRT-gi1.2-KKDyI

16956 bp

圖107

1

圖108A

aagagatgacagaaaaaattttcattctgtgacagaggaaaagtagccgaagatgacggtttgtcacatggagttggcaggatgttt
gattaaaagcaatttaaccctcactaaagggcggccgcgaagttcctattctctagaaagtataggaacttcatttctaccgggtagg
ggaggcgcttttcccaaggcagtctggagcatgcgctttagcagccccgctgggcacttggcgctacacaagtggcctctggcc
tcgcacacattccacatccaccggtaggcgccaaccggctccgttctttggtggccccttcgcgccaccttccactcctccctag
tcaggaagttcccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaatggaagtagcacgtctcactagtctcgtgcag
atggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgctttctgggct
cagaggctgggaagggtgggtccgggggcgggctcaggggcgggctcaggggcgggggcgggcgccccgaaggtcctcc
ggaggcccggcattctgcacgcttcaaaagcgcacgtctgccgcgctgttctcctccttcctcatctccgggcctttcgacctgcag
cagcacgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatggagaaaaa
aatcactggatataccaccgttgatatatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctata
accagaccgttcagctggatattacggcctttttaaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattctt
gcccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtgagctggtgatatgggatagtgttcacccttgtta
caccgttttccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcg
caagatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgtttttcgtctcagccaatccctgggt
gagtttcaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgcccccgttttcaccatgggcaaatattatacgcaaggc
gacaaggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaattacaa
cagtactgcgatgagtggcagggcggggcgtaagcgggactctggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtctgagag
ctcctggcgaattcggtaccaataaaagagcttatttcatgatctgtgtgttggttttgtgtgcggcgcggaagttcctattctcta
gaaagtataggaacttcctcgagccctatagtgagtcgtattagccctgacgatgccacatcctgagcaaataatttcaaccaacta
attgtgagcggataacaaaggaggaaacagctatgtcattaccgttcttaacttctgcaccgggaaaggttattatttttggtgaac
actctgctgtgtacaacaagcctgccgtcgctgctagtgtgtctgcgttgagaacctacctgctaataagcgagtcatctgcacca
gatactattgaattggactttccggacattagctttaatcataagtggtccatcaatgatttcaatgccatcaccgaggatcaagtaa
actcccaaaaattggccaaggctcaacaagccaccgatggcttgtctcaggaactcgttagtcttttggatccgttgttagctcaac
tatccgaatccttccactaccatgcagcgttttgttcctgtatatgtttgtttgcctatgccccatgccaagaatattaagtttctttaa
agtctacttttacccatcggtgctgggttgggctcaagcgcctctatttctgtatcactggccttagctatggcctacttgggggggtt
aataggatctaatgacttggaaaagctgtcagaaaacgataagcatatagtgaatcaatgggccttcataggtgaaaagtgtattc
acggtacccccttcaggaatagataacgctgtggccacttatggtaatgcccgctatttgaaaaagactcacataatggaacaata
aacacaaacaaattttaagttcttagatgatttcccagccattccaatgatcctaacctatactagaatttccaaggtctacaaaagatctt
gttgctcgcgttcgtgtgttggtcaccgagaaaatttcctgaagttatgaagccaattctagatgccatgggtgaatgtgccctacaa
ggcttagagatcatgactaagttaagtaaatgtaaaggcaccgatgacgaggctgtagaaactaataatgaactgtatgaacaact
attggaattgataagaataaatcatggactgcttgtctcaatcggtgttctcatcctggattagaacttattaaaaatctgagcgatga
tttgagaattggctccacaaaacttaccggtgctggtggcggcggttgctcttgacttgttacgaagagacattactcaagagca
aattgacagcttcaaaaagaaattgcaagatgatttagttacgagacatttgaaacagacttgggtgggactggctgctgttgtta
agcgcaaaaaattgaataaagatcttaaaatcaaatccctagtattccaattatttgaaaataaaactaccacaaagcaacaaattg
acgatctattattgccaggaaacacgaatttaccatggacttcataagctaatttgcgatagggctgcaccttaaggaggaaaaa
aacatgtcagagttgagagccttcagtgccccagggaaagcgttactagctggtggatatttagttttagatacaaaatatgaagc
atttgtagtcggattatcggcaagaatgcatgctgtagcccatccttacggttcattgccaagggtctgataagtttgaagtgcgtgtg
aaaagtaaacaatttaaagatggggagtggctgtaccatataagtcctaaaagtggcttcattcctgtttcgataggcggatctaag
aacccttcattgaaaaagttatcgctaacgtatttagctactttaaacctaacatggacgactactgcaatagaaacttgttcgttatt
gatatttttctctgatgatgcctaccattctcaggaggatagcgttaccgaacatcgtggcaacagaagattgagtttcattcgcaca
gaattgaagaagttcccaaaacagggctgggctcctcggcaggtttagtcacagtttaactacagcttttggcctcctttttgtatc
ggacctggaaaataatgtagacaaatatagagaagttattcataatttagcacaagtttgctcattgtcaagctcagggtaaaattgg
aagcgggtttgatgtagcgggcggcagcatatggatctatcagatatagaagattcccaccgcattaatctctaatttgccagatat
tggaagtgctacttacggcagtaaactggcgcatttggttgatgaagaagactggaatattacgattaaaagtaaccatttaccttc

圖108B

gggattaactttatggatgggcgatatttaagaatggttcagaaacagtaaaactggtccagaaggtaaaaaattggtatgattcgc
atatgccagaaagcttgaaaatctatacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatcgcttaca
cgagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtctcttgaggaggaatgactgtacctgtcaaaagtatcctgaaatcacag
aagttagagatgcagttgccacaattagacgttcctttagaaaaataactaaagaatctggtgccgtatcgaaccttcgtacaa
actagcttatggatgattgccagaccttaaaaggagttcttacttgcttaatacctggtgctggtggttatgacgccattgcagtgat
tactaagcaagatgttgatcttagggctcaaacgctaatgacaaaagattttctaaggttcaatggctggatgtaactcaggctga
ctgggtgttaggaaagaaaaagatccggaaacttatcttgataaatcactaaggtagctgcatgcagaattcgcccttaaggag
gaaaaaaaaatgaccgtttacacagcatccgttacgcaccccgtcaacatcgcaaccccttaagtattgggggaaaagggacacg
aagtggaatctgcccaccaattcgtccatatcagtgacttatcgcaagatgacctcagaacgttgacctctgcggctactgcacct
gagttgaacgcgacactttgtggttaaatggagaaccacacagcatcgacaatgaaagaactcaaaattgtctgcgcgaccctac
gccaatttaagaaaggaaatggaatcgaaggacgcctcattgcccacattatctcaatggaaactccacattgtctccgaaaataa
ctttcctacagcagctggtttagcttcctccgctgctggcttgctgcattggtctctgcaattgctaagttataccaattaccacagtc
aacttcagaaatatctagaatagcaagaaaggggtctggttcagcttgtagatcgttgtttggcggatacgtggcctgggaaatgg
gaaaagctgaagatggtcatgattccatggcagtacaaatcgcagacagctctgactggcctcagatgaaagcttgtgtcctagtt
gtcagcgatattaaaaaggatgtgagttccactcagggtatgcaattgaccgtggcaacctccgaactatttaaagaaagaattga
acatgtcgtaccaaagagatttgaagtcatgcgtaaagccattgttgaaaaagatttcgccacctttgcaaaggacacaatgatgg
attccaactctttccatgccacatgtttggactctttcctccaatattctacatgaatgacacttccaagcgtatcatcagttggtgcc
acaccattaatcagttttacggagaaacaatcgttgcatacacgtttgatgcaggtccaaatgctgtgttgtactacttagctgaaaat
gagtcgaaactctttgcatttatctataaattgtttggctctgttcctggatgggacaagaaatttactactgagcagcttgaggctttc
aaccatcaatttgaatcatctaacttactgcacgtgaattggatcttgagttgcaaaaggatgttgccagagtgatttaactcaagt
cggttcaggccctcaagaaacaaacgaatctttgattgacgcaaagactggctaccaaagaataagatcaattcgctgcatcg
ccctaggaggtaaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacgccaaatttagtgcaaaa
ccaaacacctgaagacatttttggaagagtttcctgaaattatccattacaacaaagacctaatacccgatctagtggagcgtcaaa
tgacgaaagcggagaaacatgttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgtttgattgggac
gataatgctattggtgccggtaccaagaaagtttgtcatttaatggaaaatattgaaaagggtttactacatcgtgcatttccgtctt
atttcaatgaacctggtgaattacttttacaacaaagagccactgaaaaaataacttttcctgatctttggactaacacatgctgctc
tcatccactatgtattgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattactgcggcggtgaggaa
aactagatcatgaattaggtatttccagaagatgaaactaagacaagggggtaagtttcacttttaaacagaatccattacatggcac
caagcaatgaaccatgggggtgaacatgaaattgattacatcctatttttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaa
acgtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgccttg
gtttaagattatttgcggaggatttacttatcaactggtgtggagcaattagatgaccttctgaagtggaaaatgaccagcaaattcata
gaatgctataacaacgcgtctacaaatatttaaaaggcacgtcagatgacgtgccttttttcttgtggggcc

SEQ ID NO:25

圖108C

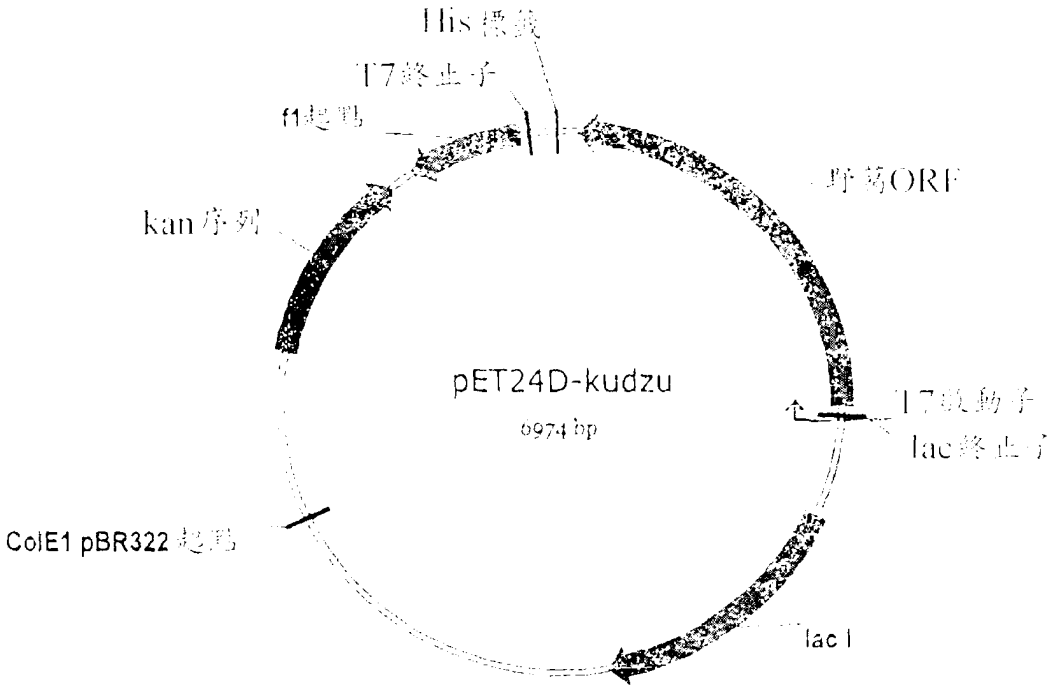

His標籤
T7終止子
f1起點
kan序列
pET24D-kudzu
6974 bp
T7啟動子
lac終止子
ColE1 pBR322起點
lac I

圖109

1-

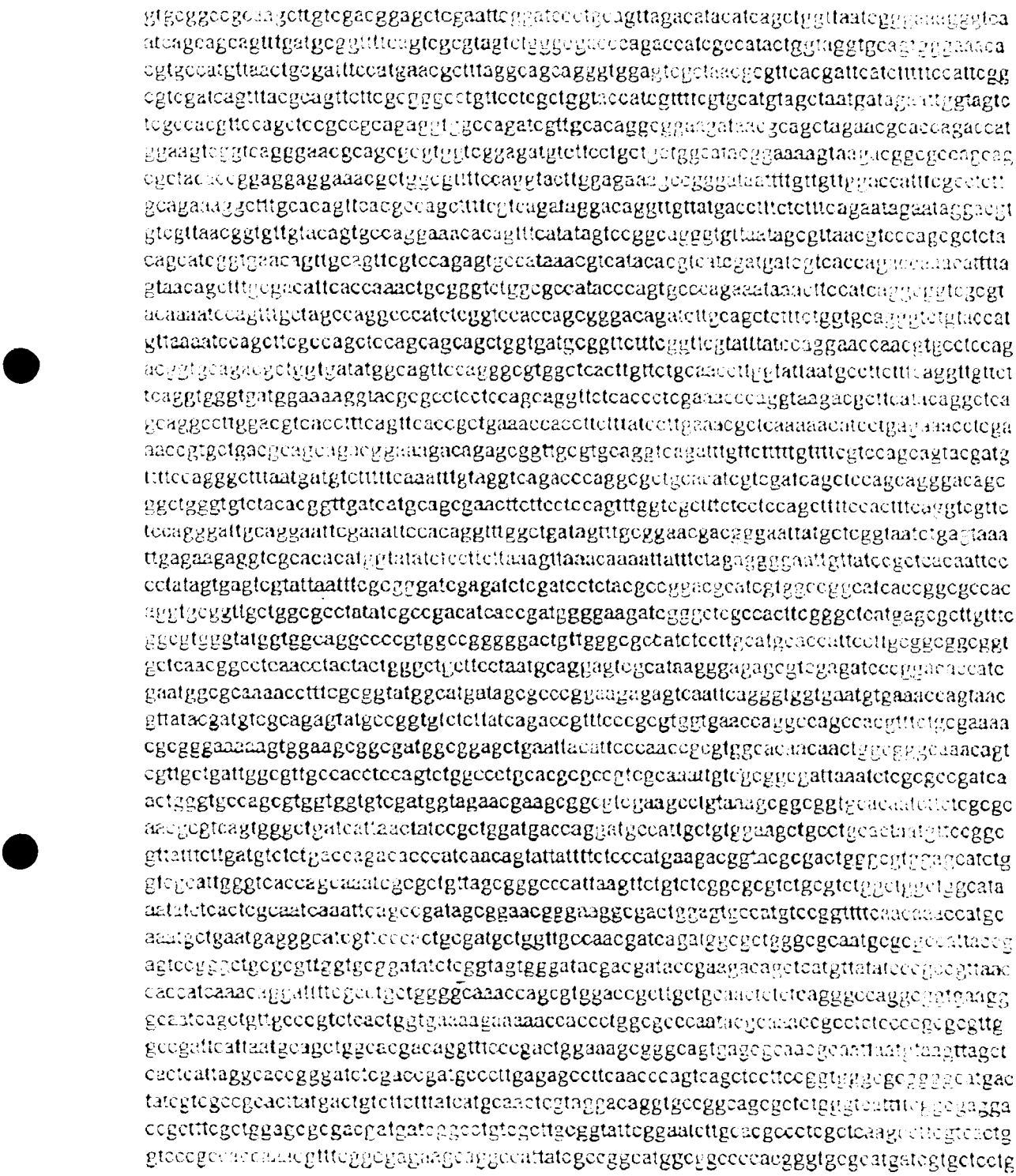


圖110A

tcgttgaggaccccggctaggctggcggggttgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcga
ctgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtctggaaacgcggaagt
cagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggctacccctgtggaacacctacatctgtattaacgaag
cgctggcattgaccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccataccgccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgg
gcatgttcatcatcagtaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattacccccatgaacagaaatcccccttaca
cggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggag
aaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctg
cctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgc
cgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcg
atagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatatgcggtgtgaaataccgc
acagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcg
gcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagca
aaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatca
caaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcg
tgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcac
gctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgc
cttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc
agagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatct
gcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttt
tttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtg
gaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagc
catattcaacgggaaacgtcttgctctaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgat
aatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggta
gcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcattttatcc
gtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccgggaaaacagcattccaggtattagaagaatatcctgattcaggt
gaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcgccggttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtatttc
gtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgcgagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaa
caagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttg
acgaggggaaattaataggttgtattgatgttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatggaactg
cctcggtgagttttctccttcattacagaaacggcttttcaaaaatatggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttga
tgctcgatgagtttttctaagaattaattcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggtttccgcgcac
atttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttaacca
ataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagt
ccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacc
ctaatcaagttttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaa
agccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtc
acgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcccattcgccaatccggatatagttcctc
cttcagcaaaaaacccctcaagacccgtttagaggccccaaggggttatgctagttattgctcagcggtggcagcagccaactc
agcttcctttcgggctttgttagcagccggatctcagtggtggtggtggtggtgctcga

SEQ ID NO:2b

圖110B

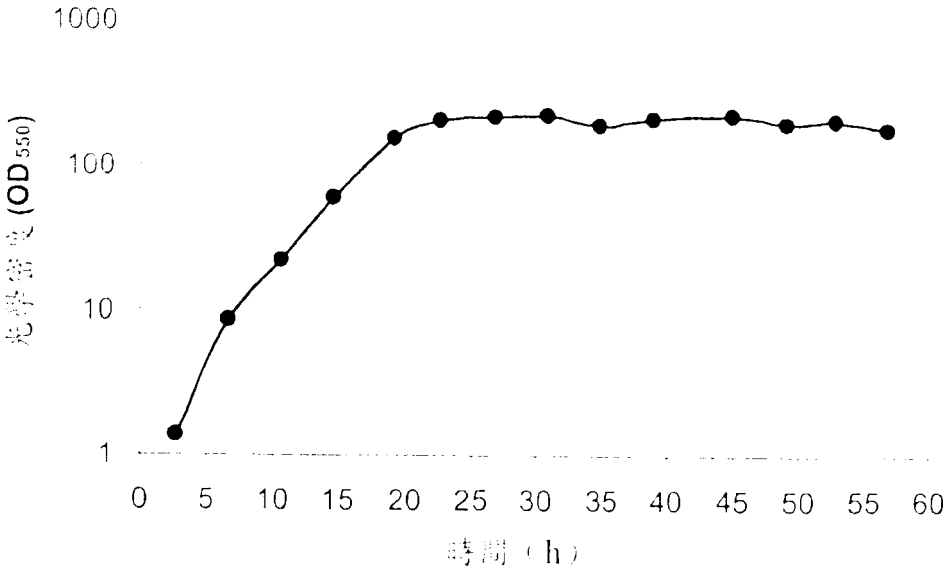


圖111A

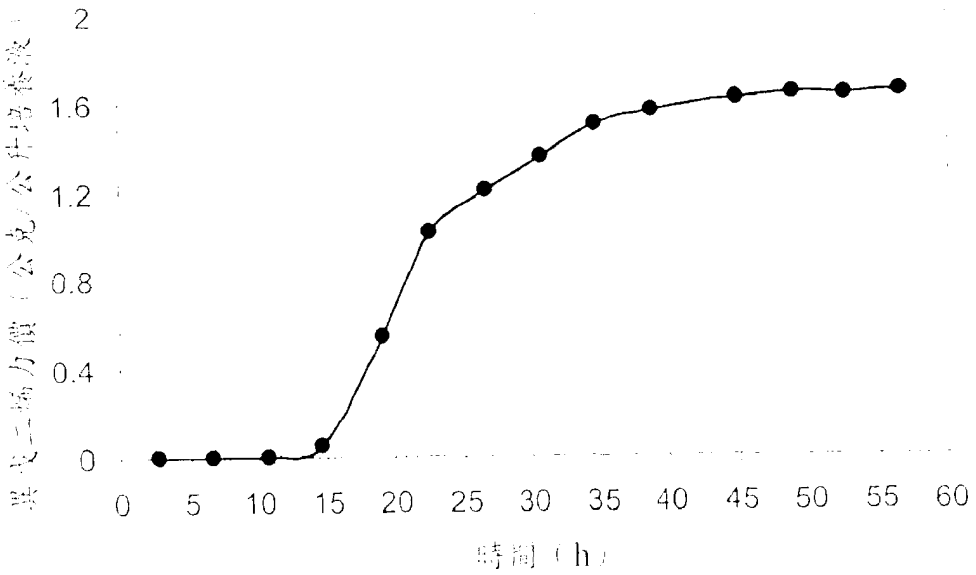


圖111B

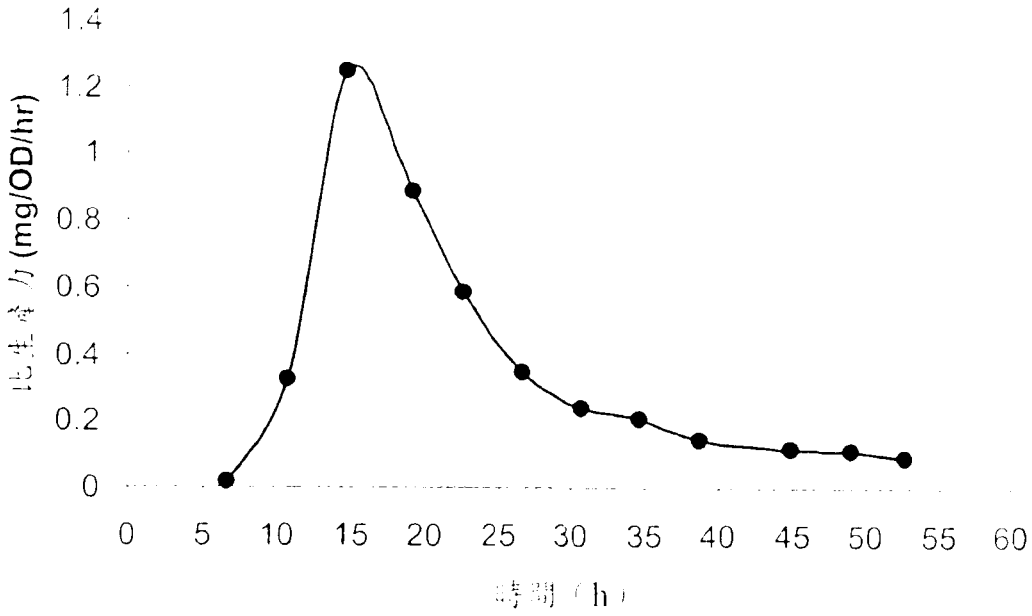

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
比生產力 (mg/OD/hr)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
時間（h）

圖111C

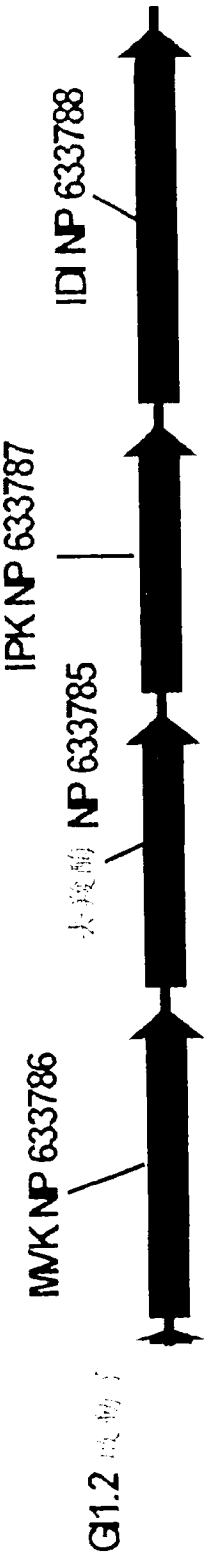


圖112A

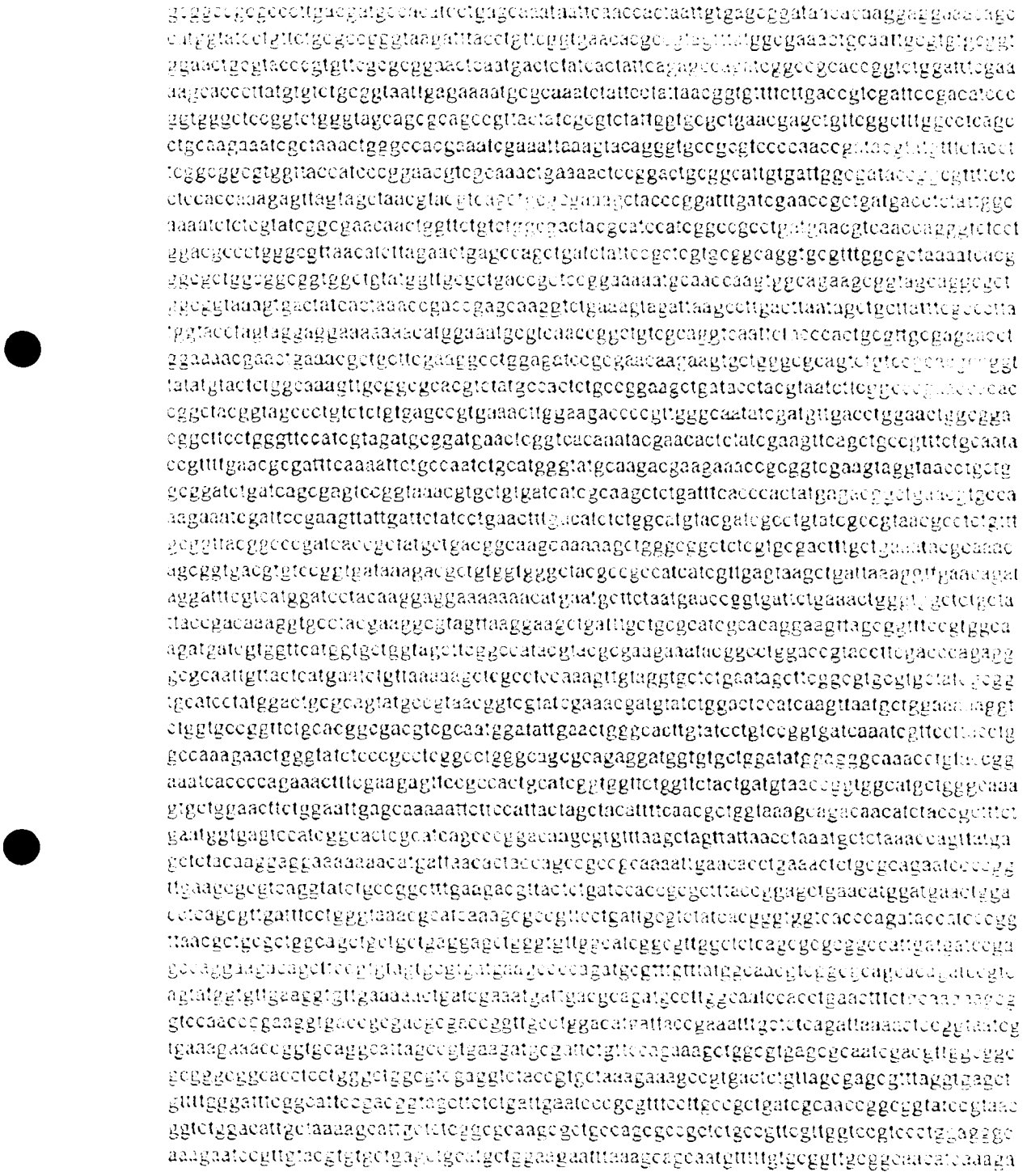
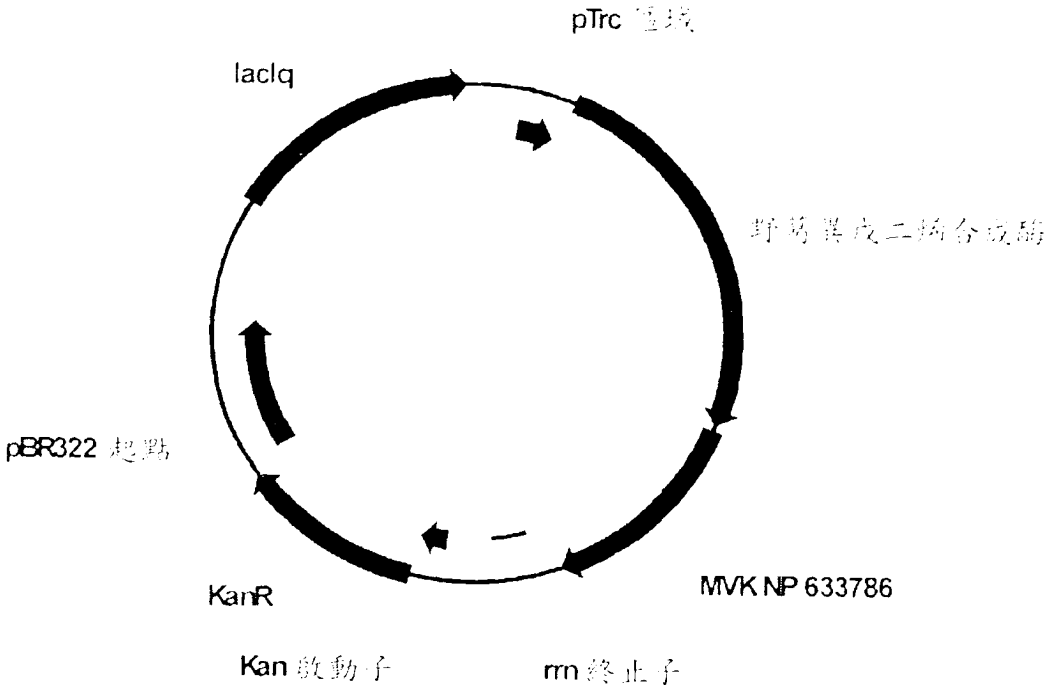


圖112B

cctgcacaactctccagtagtggtaactggttggacccgcgaatacctggagcagcgcggttttaacgttaaggacctctccctg
ccgggcaacgctctgtaagcttcaacgcgtctacaaataaaaaaggcacgtcagatgacgtgccttttttcttgtctaga

SEQ ID NO:27

圖112C



MCM382 - pTrcKudzuMVK（馬氏甲烷球菌）
6848bp

圖113A

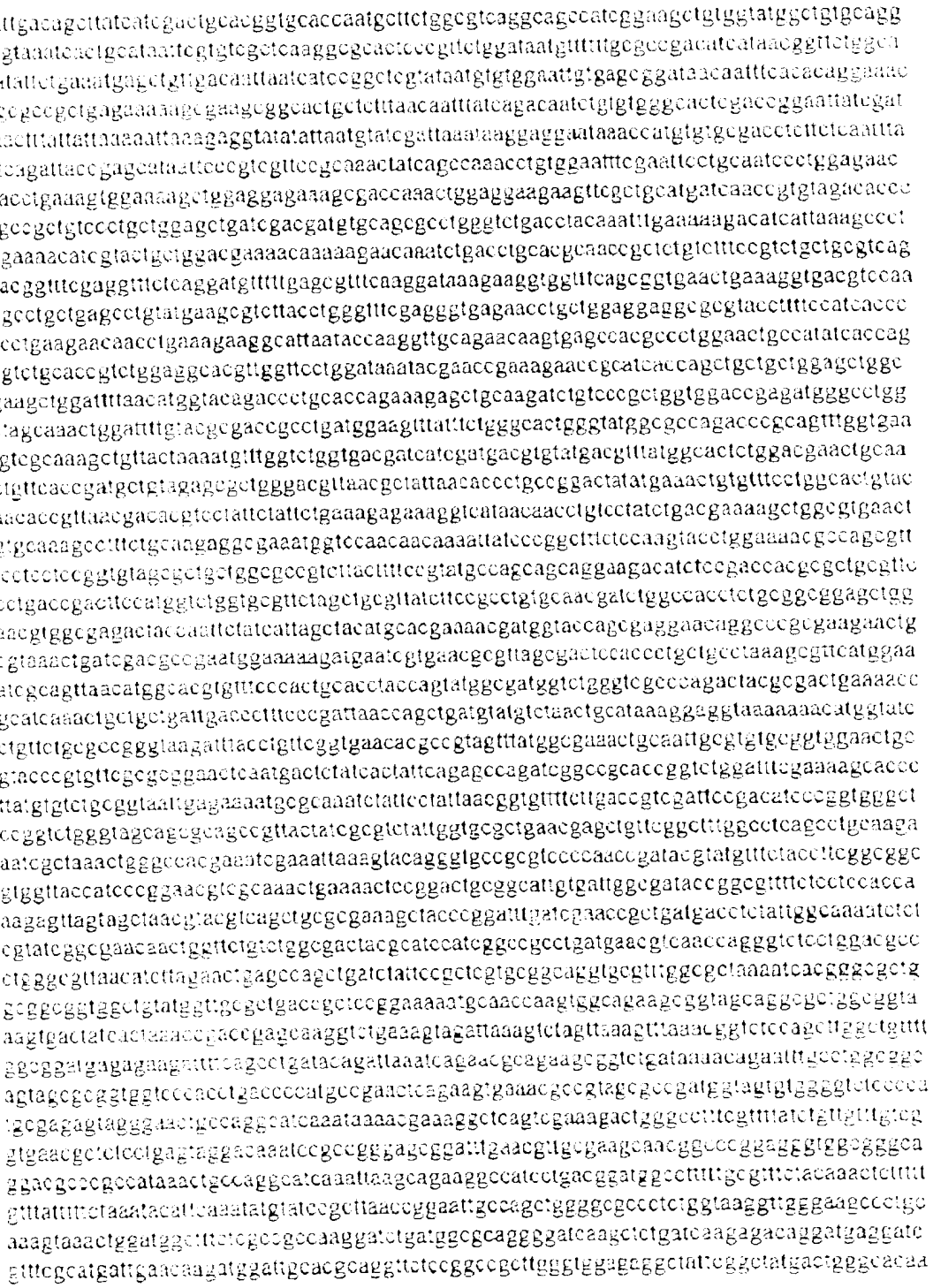
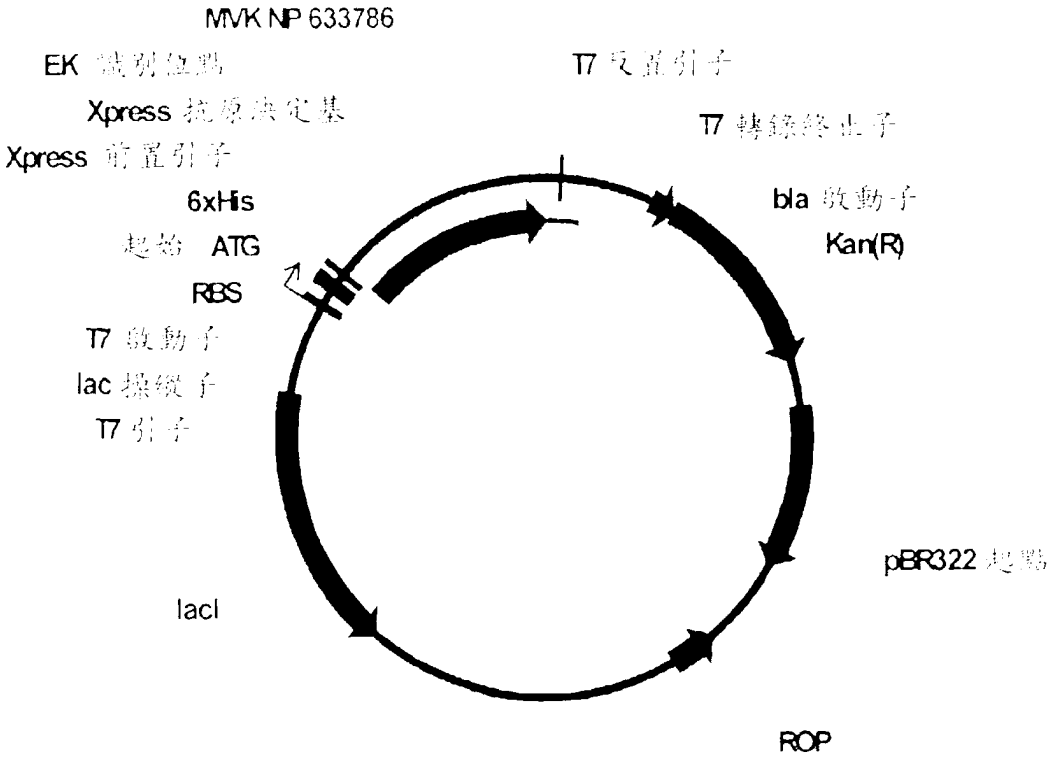


圖113B

cagacaatcggctgctctgatgccgccgttccggctgtcagcgcagggggcgcccggttcttttgtcaagaccgacctgtccg
gtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgac
gttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgcc
gagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaa
catcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcagggctcgc
gccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgctg
ccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatag
cgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgat
tcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgacgcatgacaaaaatccccttaacgtgagttttcgttccactgagc
gtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccacc
gctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaa
atactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgtt
accagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtc
gggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcta
tgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgca
cgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgat
gctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcac
atgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacga
ccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcac
accgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggt
catggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaa
gctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgatcaattcgcgc
gcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaa
gagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcc
cgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattc
ccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccg
tcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtc
gaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggat
gccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttctcc
catgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaag
ttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggc
gactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacg
atcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgac
gataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggac
cgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctg
gcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagc
gggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

SEQ ID NO:28

圖113C



MCM376-來自 pET200D 中馬氏甲烷球菌古生下游途徑之 MVK
6xHp

圖114A

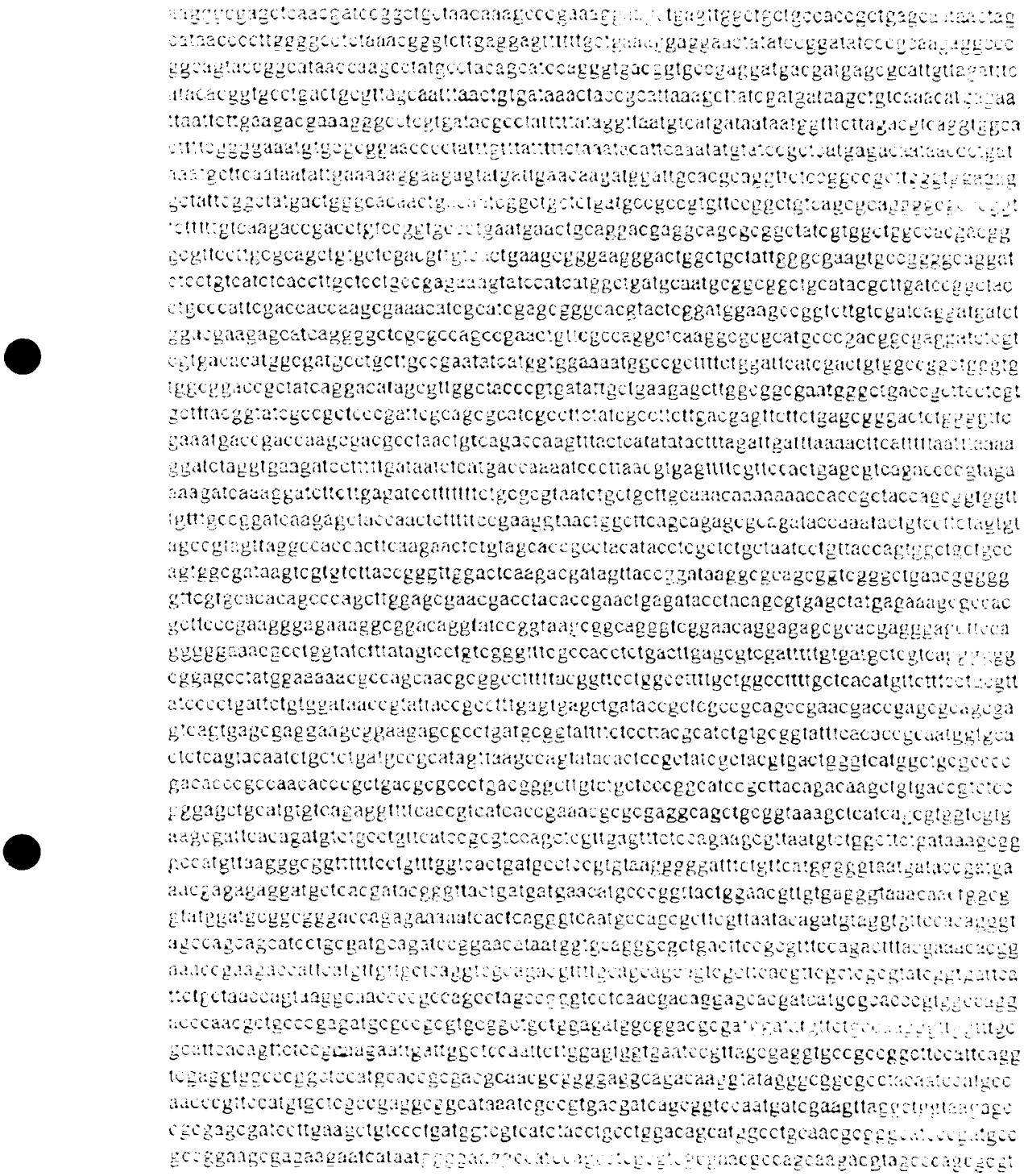


圖114B

cggccgccatgccggcgataatggcctgcttctcgccgaaacgtttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcgagggc
gtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctccagcgaaagcggtcctcgccgaaaatgacccag
agcgctgccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagtcatgccccgcgccca
ccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgagatcccggtgcctaatgagtgagctaacttacattaatt
gcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagagg
cggtttgcgtattgggcgccagggtggtttttcttttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgcctggccctga
gagagttgcagcaagcggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggatataacat
gagctgtcttcggtatcgtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcg
cccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccgg
acatggcactccagtcgccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcaga
cgcgccgagacagaacttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcg
cgtaccgtcttcatgggagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcag
gcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgc
accgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaa
tcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccag
ttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggc
ctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcacca
ccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctct
ccccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatg
caaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccga
agtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggc
cacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataac
aattcccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatatgcggggttctcatcatcatcatcatcatggtatggcta
gcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatcatccctcaccatggtatcctgttctgc
gccgggtaagatttacctgttcggtgaacacgccgtagtttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaactgcgtaccccgt
gttcgcgcggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcggccgcaccggtctggatttcgaaaagcaccctatgtgtc
tgcggtaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacggtgttttcttgaccgtcgattccgacatcccggtgggctccggtctg
ggtagcagcgcagccgttactatcgcgtctattggtgcgctgaacgagctgttcggctttggcctcagcctgcaagaaatcgcta
aactgggccacgaaatcgaaattaaagtacagggtgccgcgtcccccaaccgatacgtatgtttctaccttcggcggcgtggttac
catccccggaacgtcgcaaactgaaaactccggactgcggcattgtgattgcgataccggcgttttctcctccaccaaagagtta
gtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagctacccggatttgatcgaaccgctgatgaccctctattggcaaaatctctcgtatcggt
cgaacaactggttctgtctggcgactacgcatccatcggccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctgggcgt
taacatcttagaactgagccagctgatctatccgctcgtgcggcaggtcgcttggcgctaaaatcacgggcgctggcggcggt
ggctgtatggttgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactat
cactaaaccgaccgagcaaggtctgaaagtagattaa

SEQ ID NO:29

圖114C

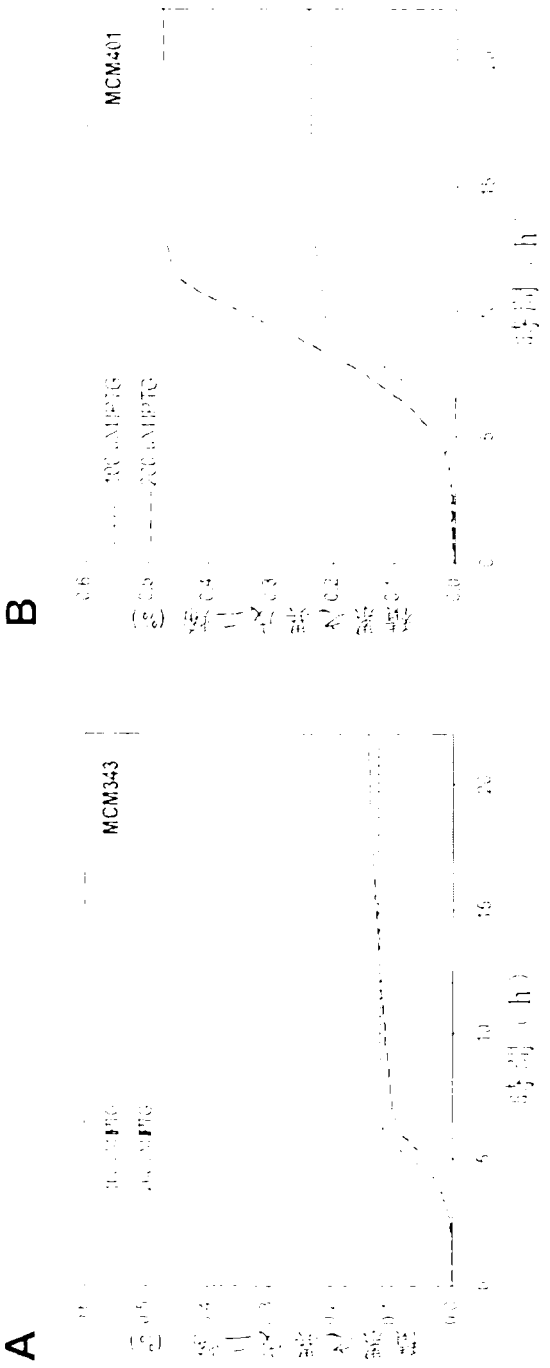


圖115A-B

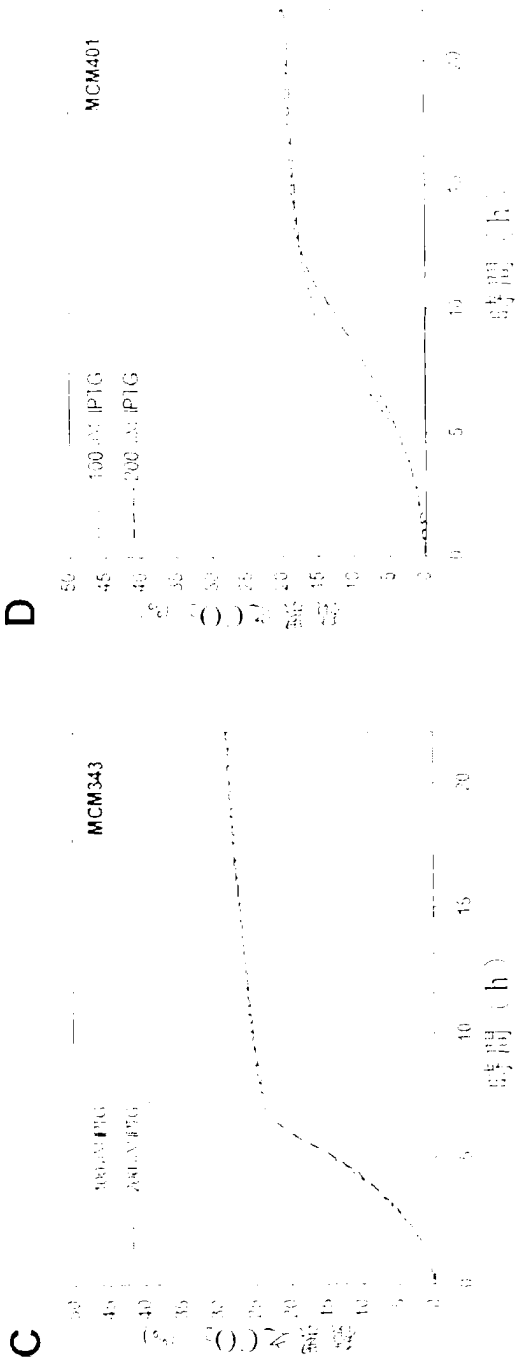


圖115C-D

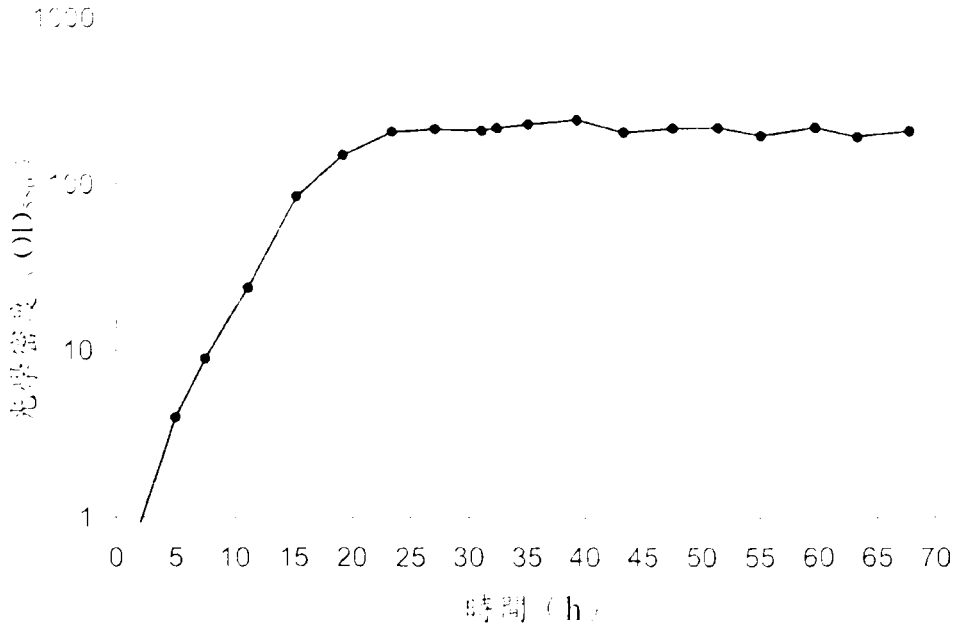


圖116

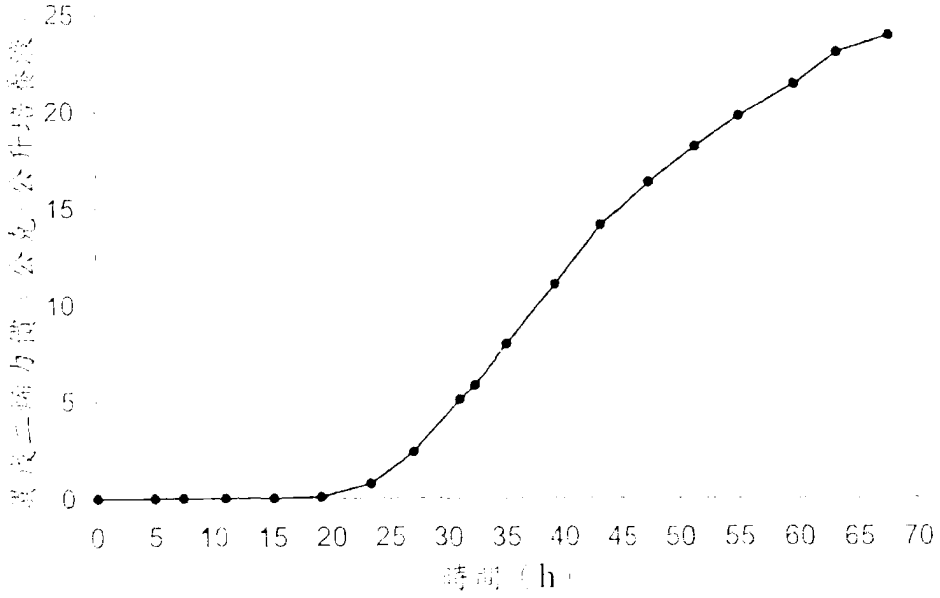


圖117

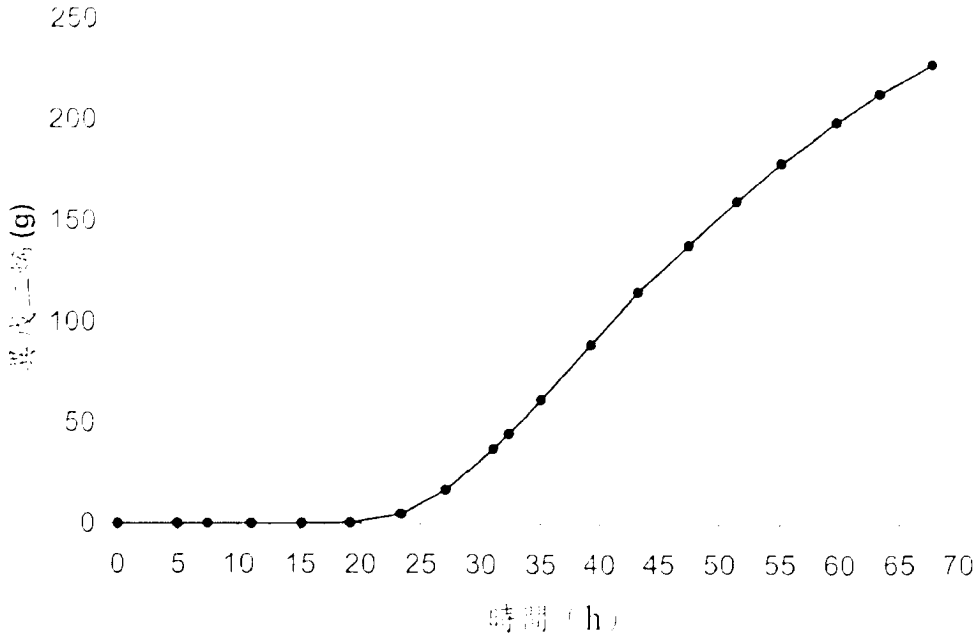


圖118

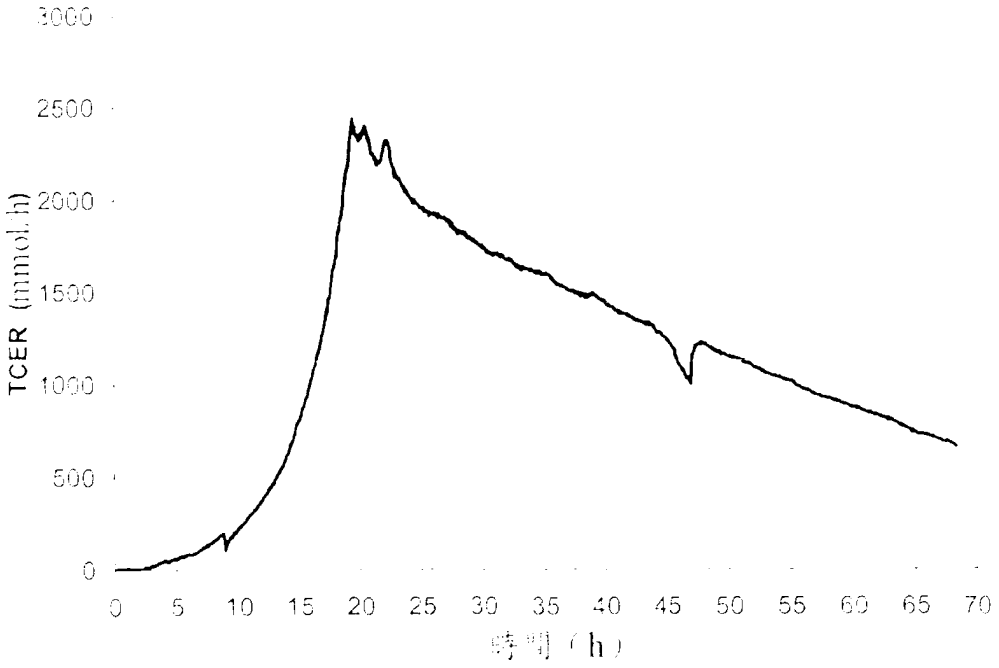

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
TCER (mmol/h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
時間（h）

圖119

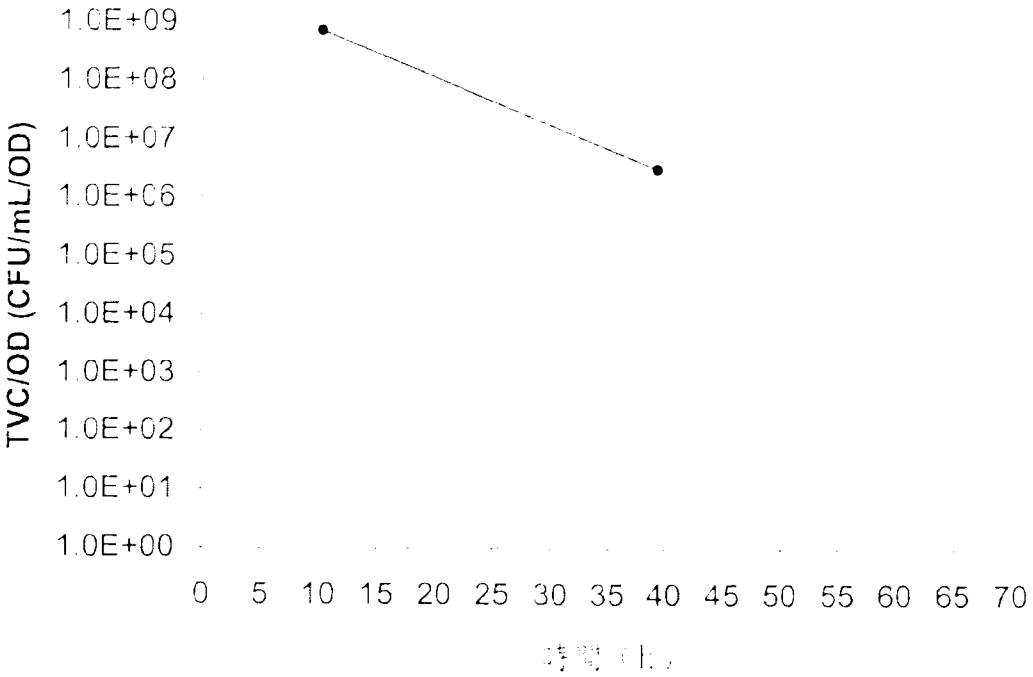

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70

圖120

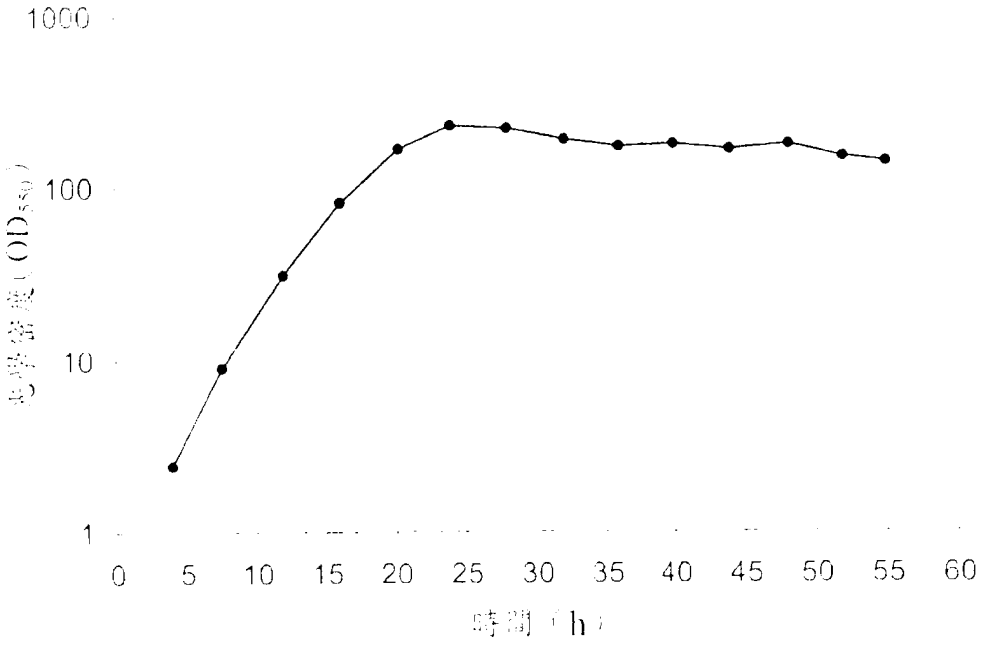


圖121

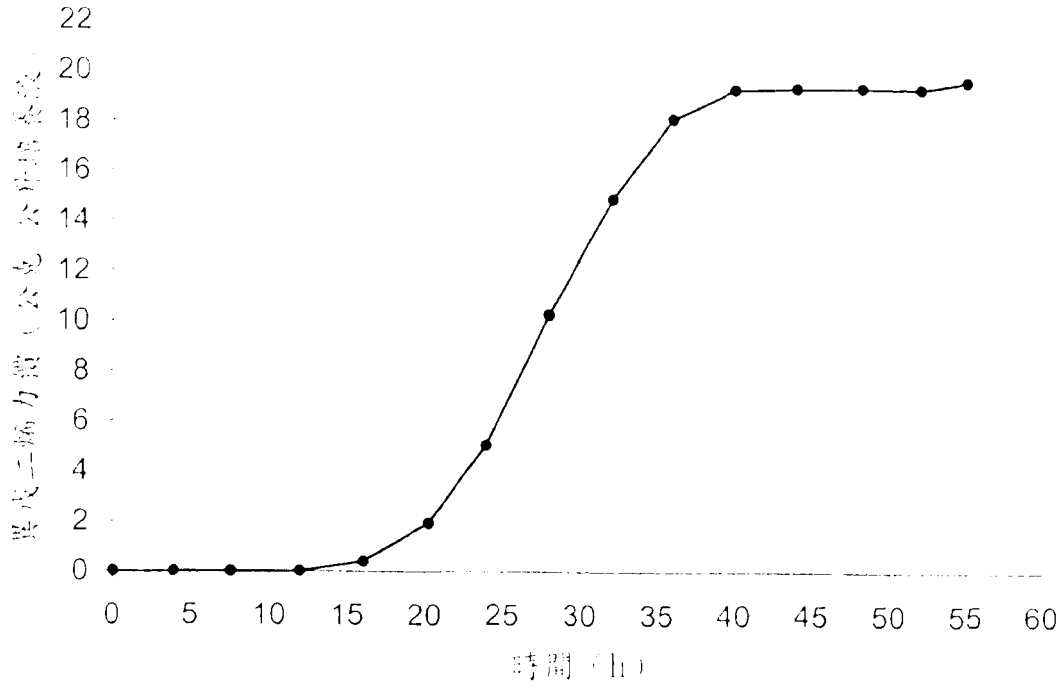


圖122

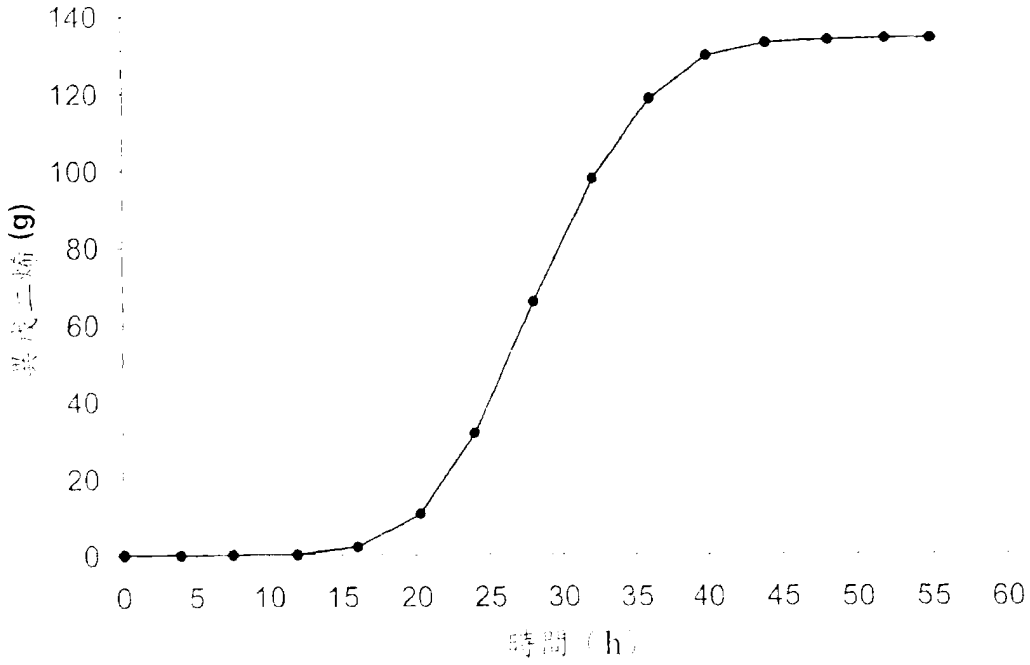


圖123

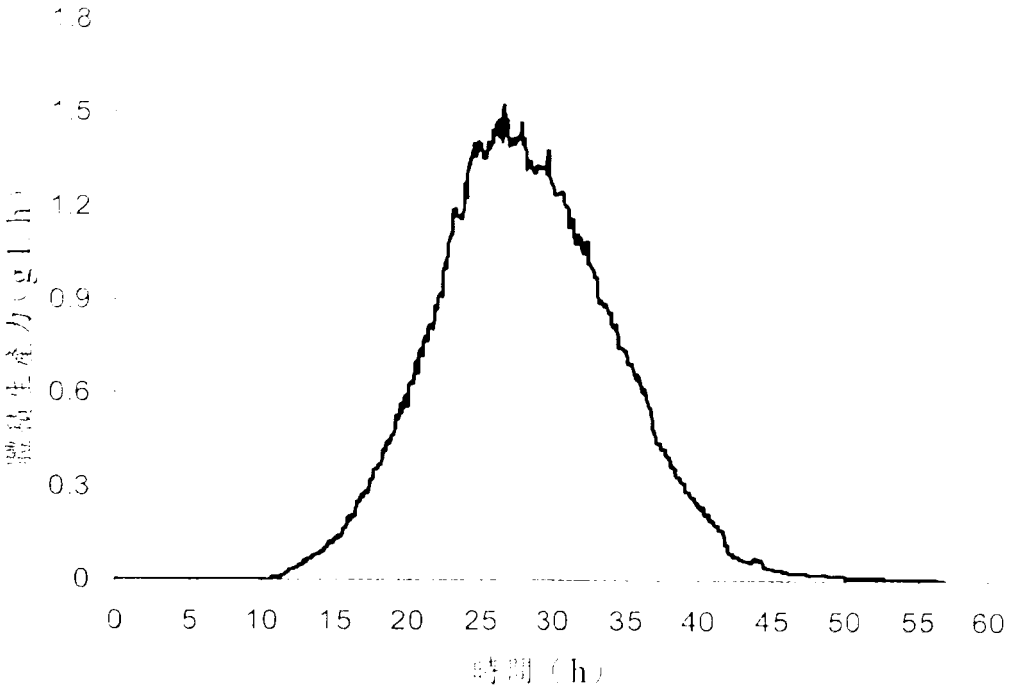


圖124

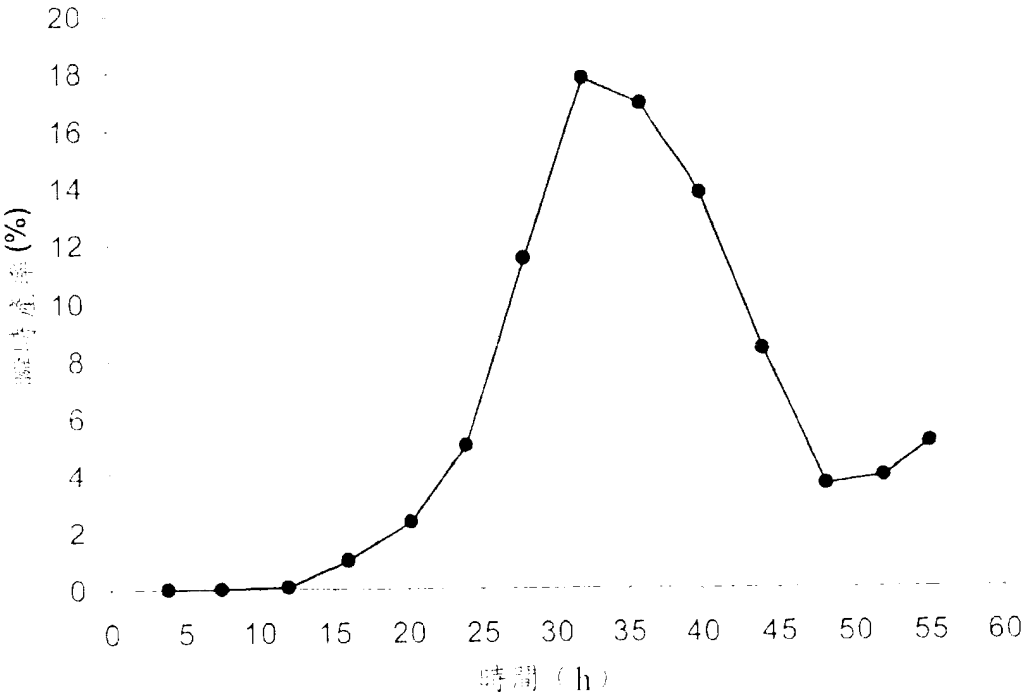


圖125

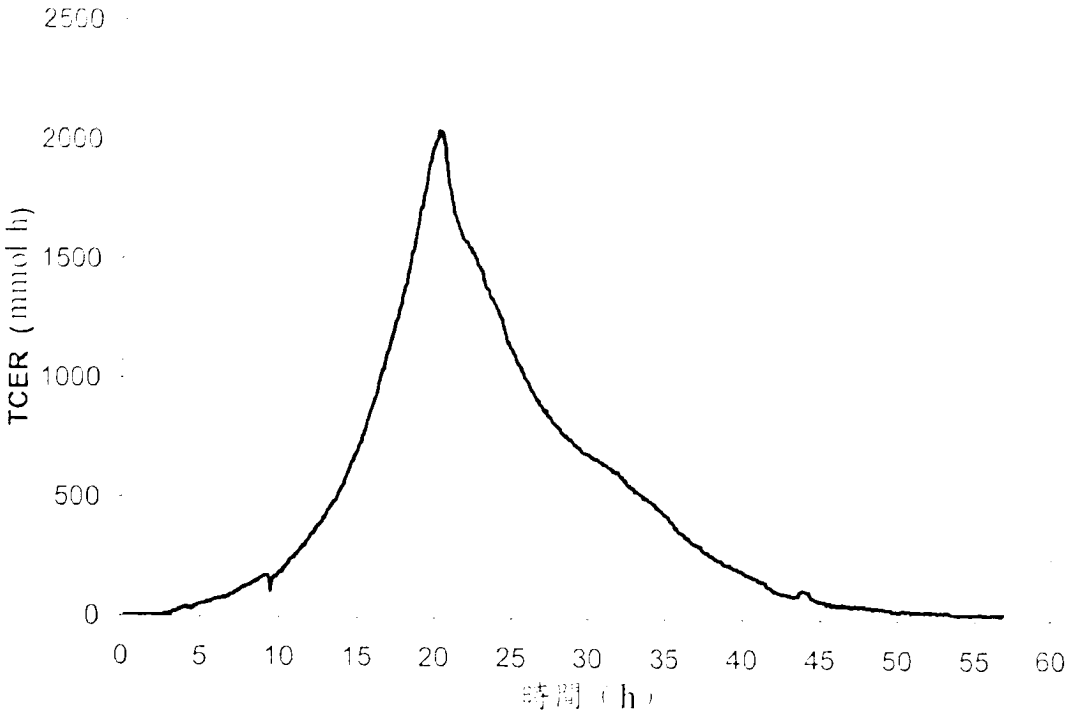

2500
2000
1500
1000
500
0
TCER (mmol/h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
時間（h）

圖126

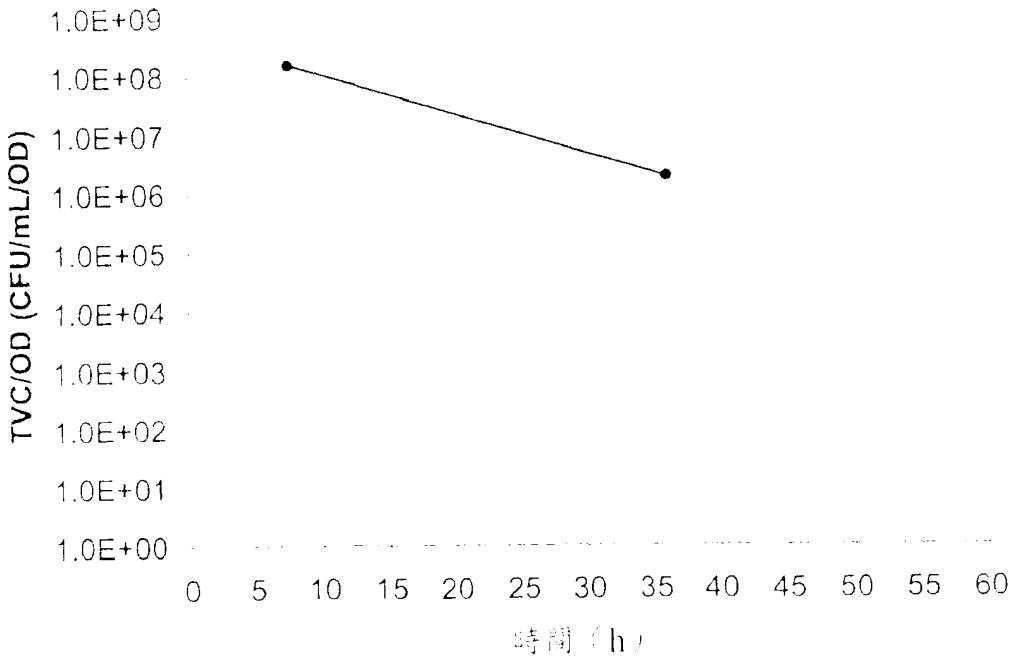

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
時間（h）

圖127

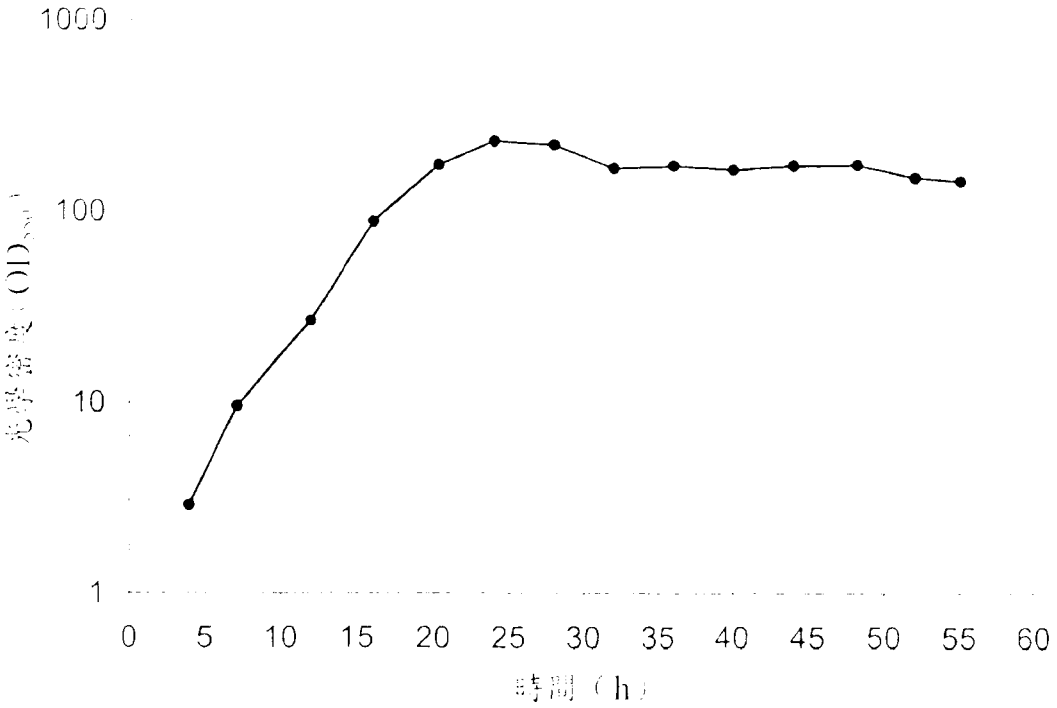


圖128

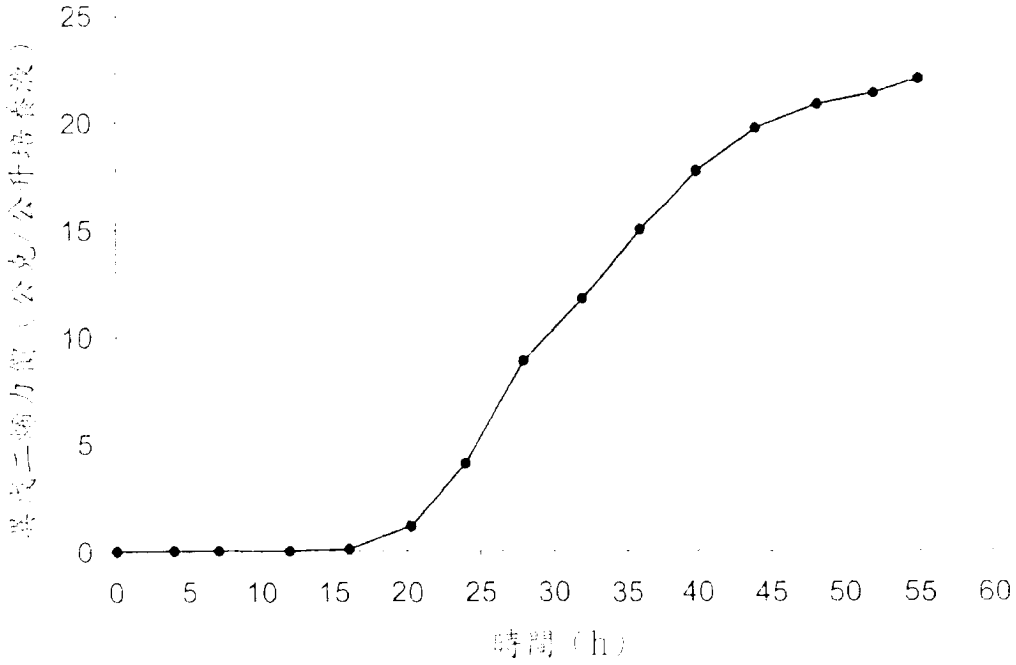


圖129

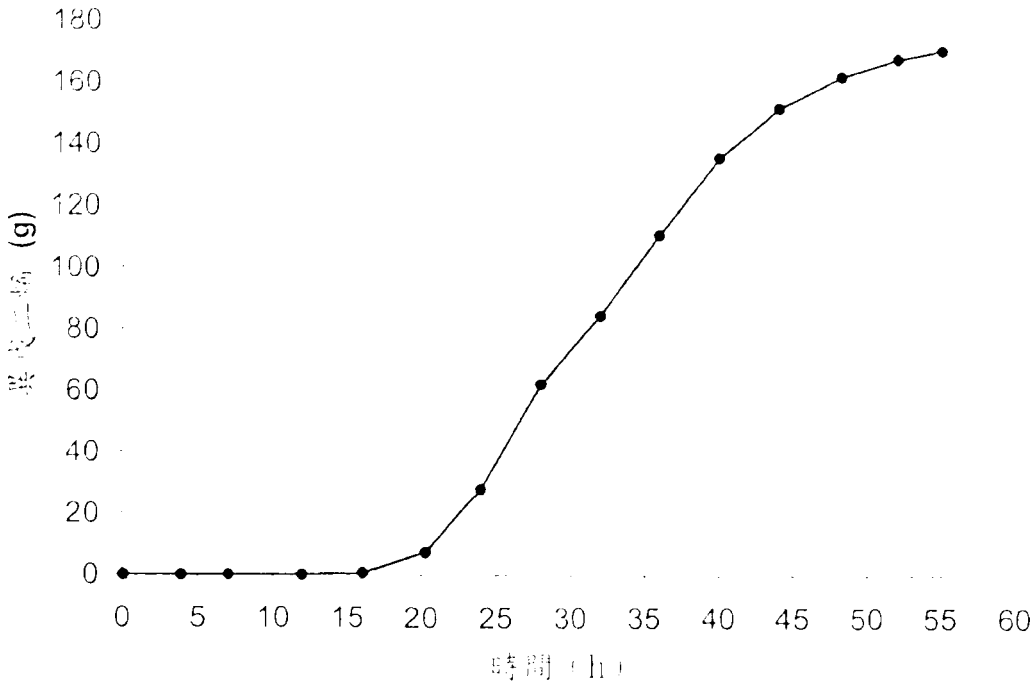

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
(g)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
時間（h）

圖130

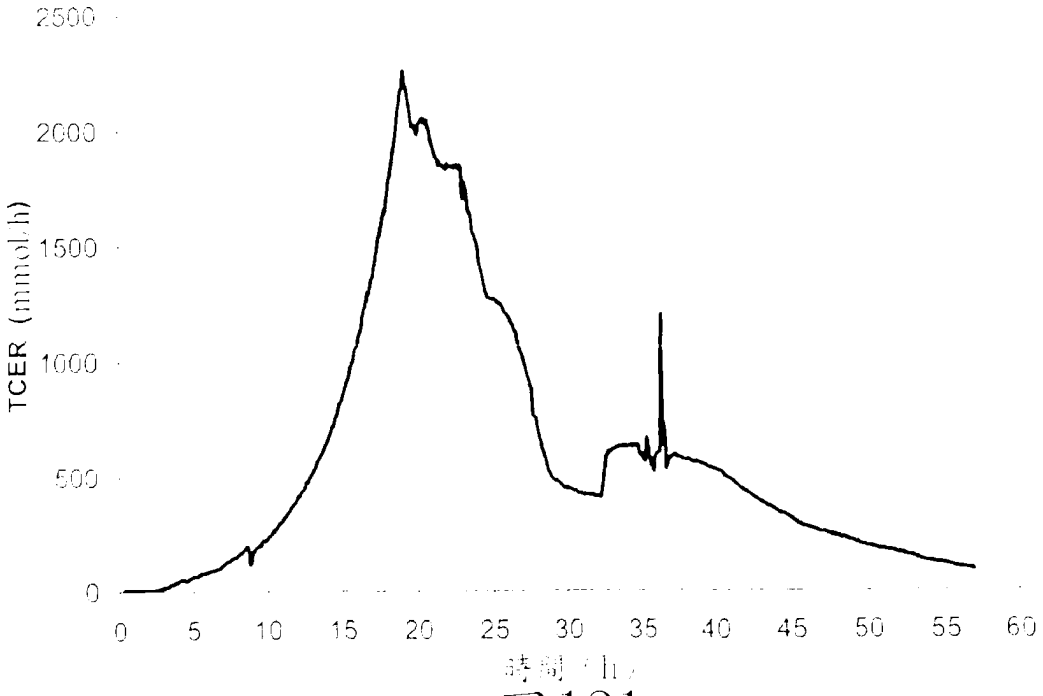

2500
2000
1500
1000
500
0
TCER (mmol/h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
時間 (h)

圖131

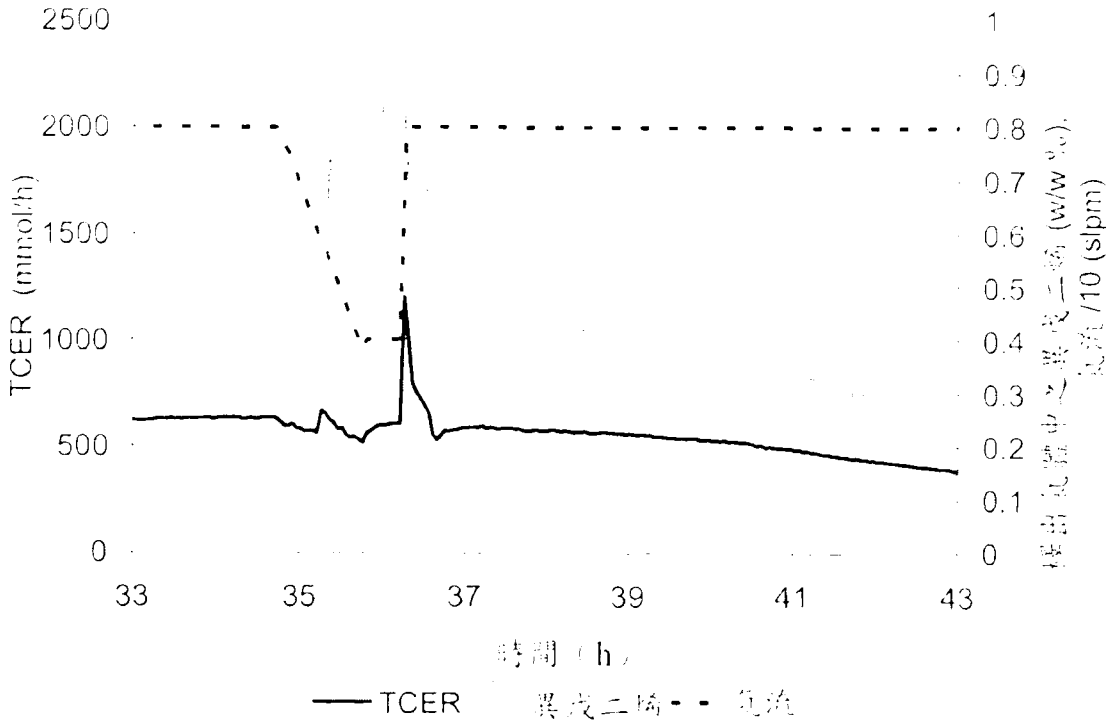

2500
2000
1500
1000
500
0
TCER (mmol/h)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
33
35
37
39
41
43
時間（h）
TCER

圖132

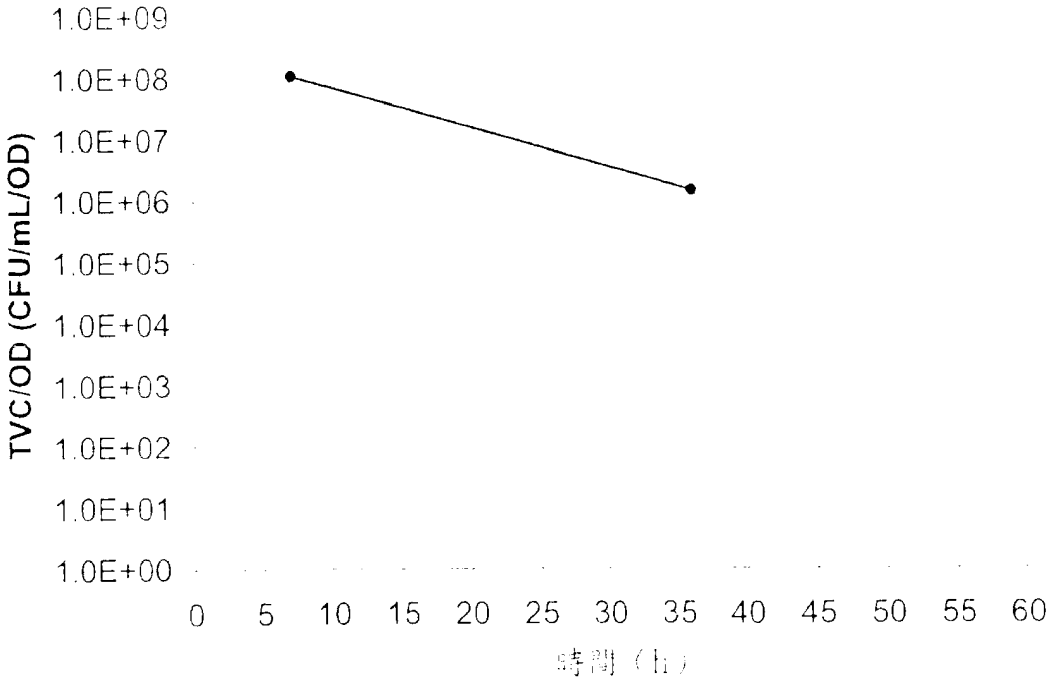

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
時間（h）

圖133

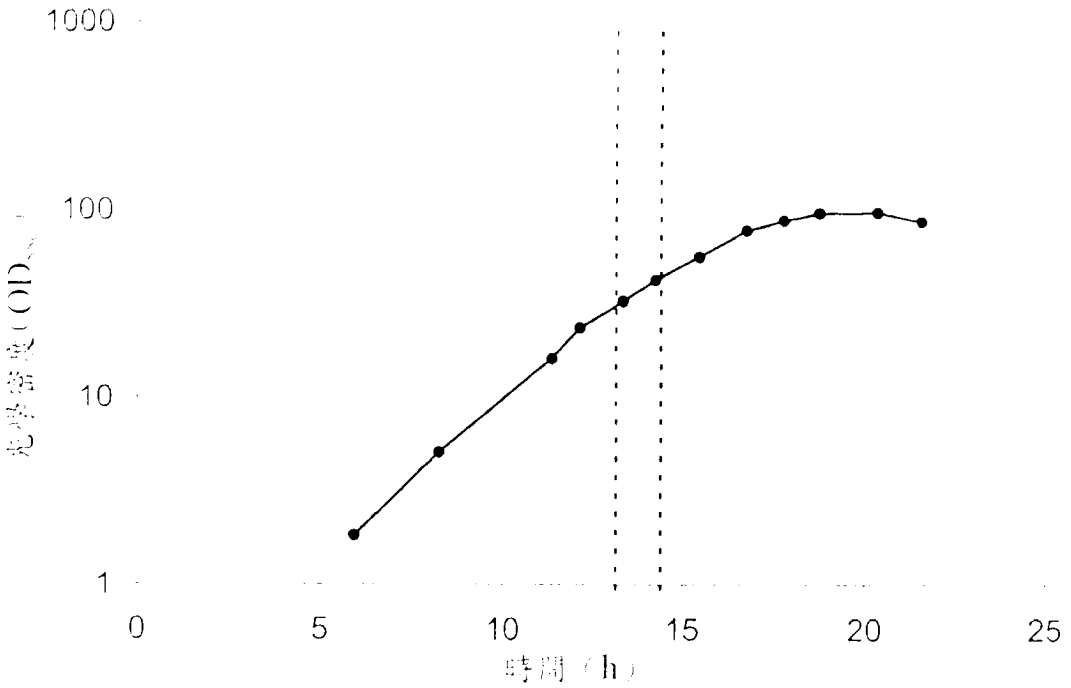


圖134

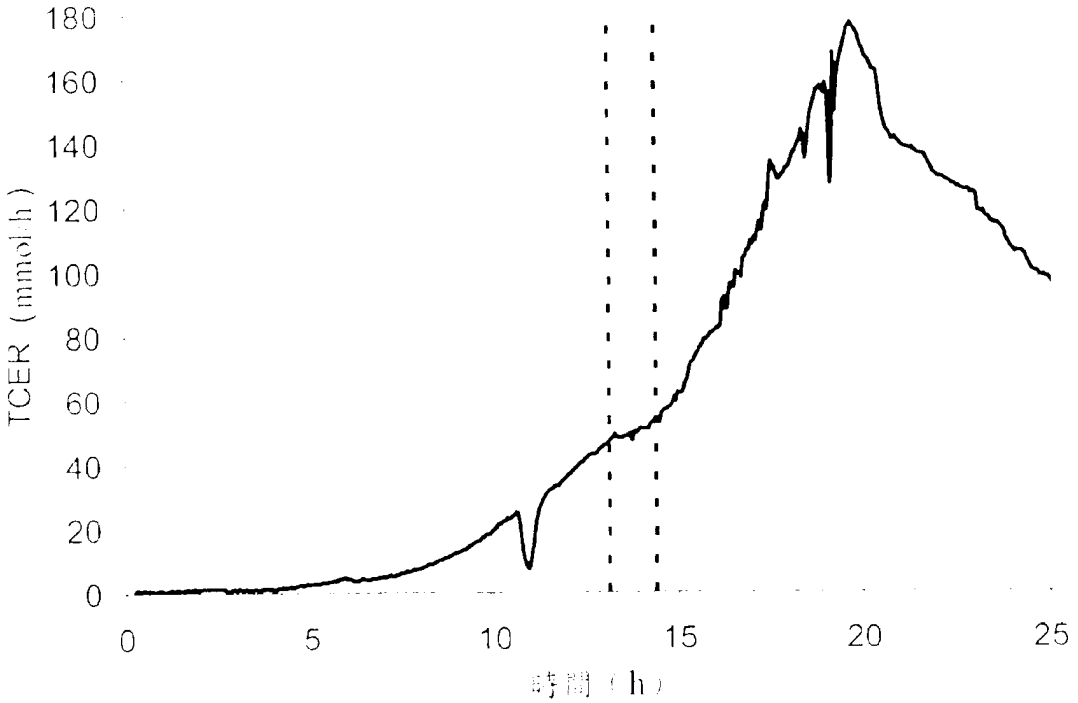


圖135

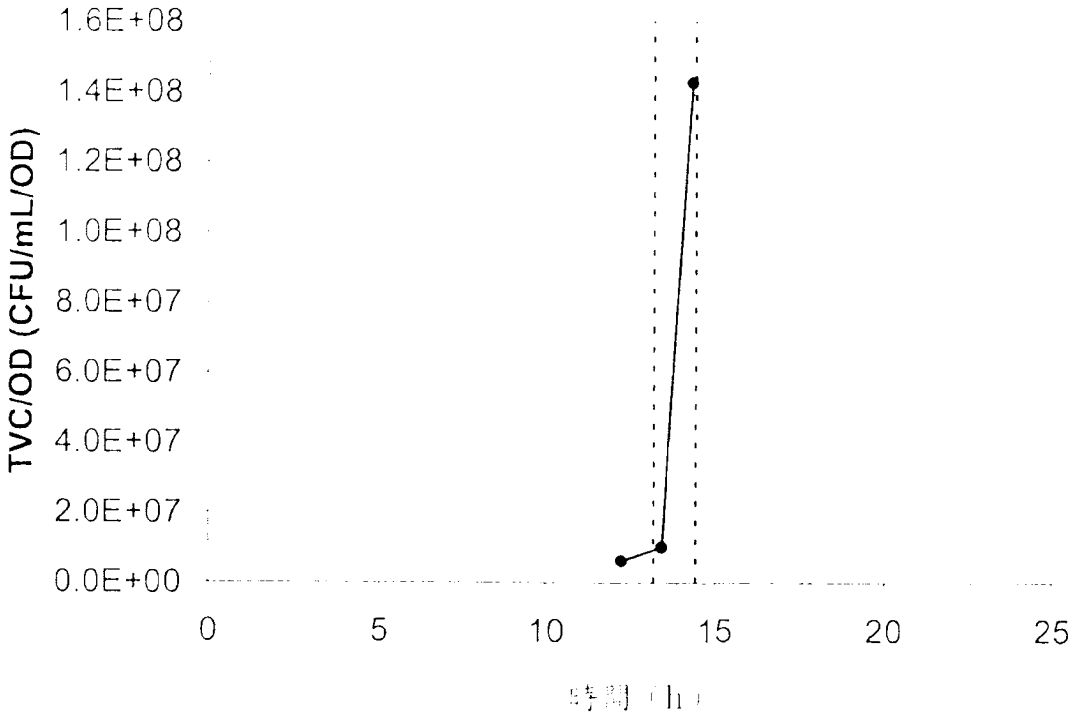

1.6E+08
1.4E+08
1.2E+08
1.0E+08
8.0E+07
6.0E+07
4.0E+07
2.0E+07
0.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0
5
10
15
20
25
時間 (h)

圖136

tggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcc
agcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggc
tccctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatcgcc
cctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtggactcttgttccaaactggaacaacactcaaccct
atctcggtctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcga
attttaacaaaatattaacgtttacaatttcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacat
tcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccg
tgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagat
cagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaa
tgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacact
attctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgc
cataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacat
gggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctg
cagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggagg
cggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggt
ctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatgg
atgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttag
attgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagtt
ttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaa
acaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcaga
gcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgct
ctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataag
gcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcg
tgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgca
cgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgat
gctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcac
atgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacg
accgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacac
cgcatatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggt
catggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctg
tgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcg
tggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctg
ataaagcgggccatgttaagggcggttttttcctgtttggtcactgatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaatg
ataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttactggaacgttgtgagggtaaacaa
ctggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgcttcgttaatacagatgtaggtgttccacag
ggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgctgacttccgcgtttccagactttacgaaacacgg
aaaccgaagaccattcatgttgttgctcaggtcgcagacgttttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcggtgattca
ttctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggggccgccatg
ccggcgataatggcctgcttctcgccgaaacgtttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcgagggcgtgcaagattccgaa
taccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctccagcgaaagcggtcctcgccgaaaatgacccagagcgctgccggcgac
ctgctcacgagttgcatgtaaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactg
ctgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgagatcccggtgcctaatgagtgagctaacttacattaattgcgttgcgctcactg
cccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggg
cgccagggtggtttttcttttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgcctggccctgagagagttgcagcaag
cggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggatataacatgagctgtcttcggtatc

圖137A

gtcgtttccccctaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgat
cgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtc
gccttccccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacaga
acttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatgg
gagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttccacagca
atggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacagg
cttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttg
cgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcgg
ttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgg
gaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactgggttcacattcaccaccctgaattgactctct
ccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctg
cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcc
caacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatc
ttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgt
agaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaata
attttgtttaacttaagaaggagatatacatatgcgttgtagcgtgtccaccgaaaatgtgtctttcaccgaaactgaaaccga
agctcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtccatcg
aagtatacaaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctg
accctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggcctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtggtgcgctggat
cgcttcgtttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagacttccctgcacggtacggcactgtctttccgtctgctgcgtc
aacacggttttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaacttcctggagaaacctgaagga
agatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaa
ggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagctggcagaacaggtgaaccatgca
ctggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacg
cgaatcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgt
cccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccg
tgggtgtagcattcgaacgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcaaaaatgttttctttcgtaaccatttatcgacga
tatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatca
acgacctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataacactattaacgaaatcgcctacgacaacctgaaag
ataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgaccgtgcaacgctttcctgcaagaagccaagtg
gctgtacaacaaatctactccgaccttgacgactacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggcccgctgcaactggt
gttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaatacccatgacaccatctctc
gtccttcccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcg
tttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctgg
aaaaagatgaacaaggaaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaaacctggcacgt
caatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatc
actgaaccgattctgccgtttgaacgctaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccac
caccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagc
ataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

SEQ ID NO:30

圖137B

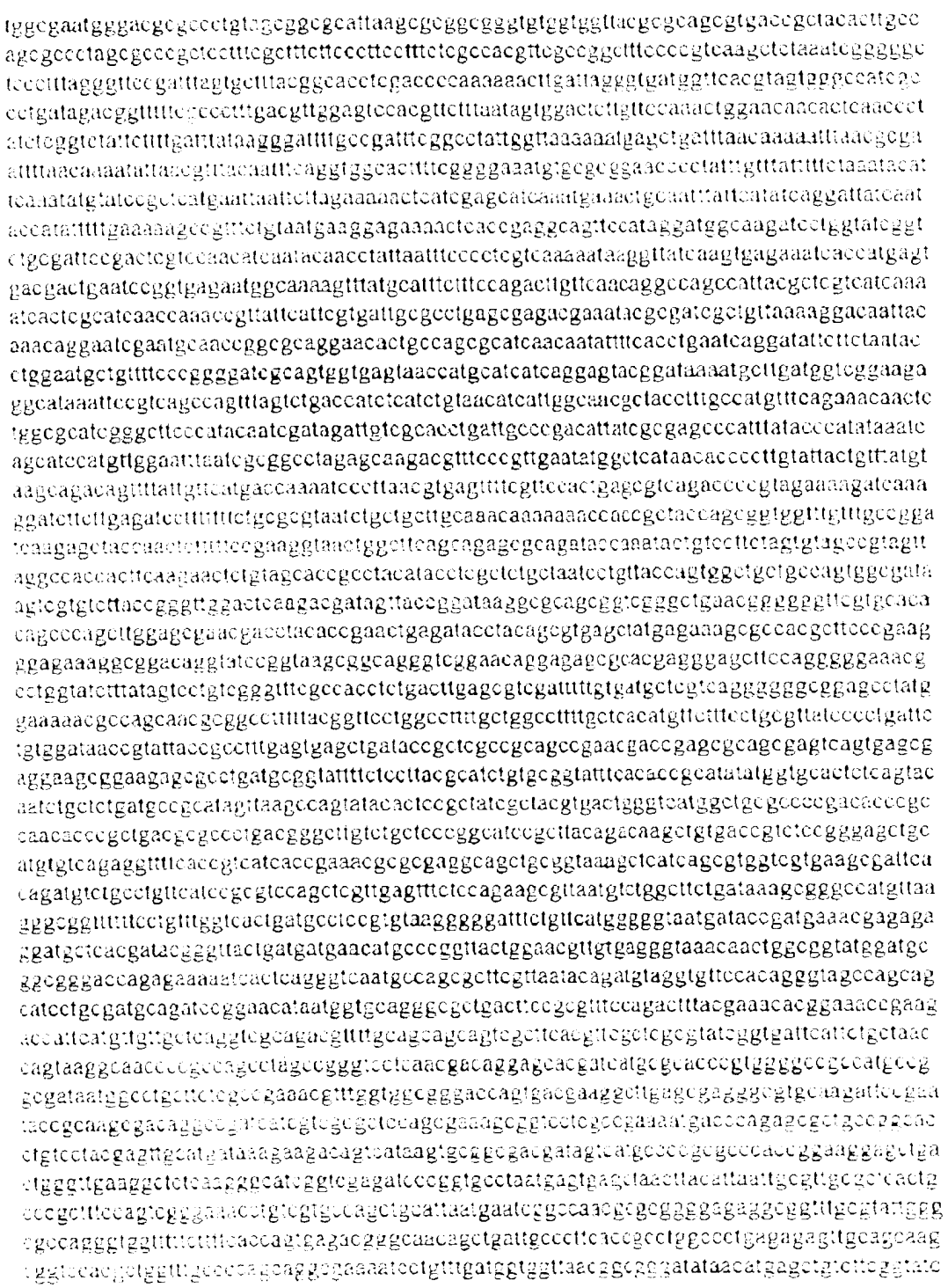


圖137C

gtcgtatccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgat
cgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtc
gccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacaga
acttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatgg
gagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttccacagca
atggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacagg
cttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttg
cgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcgg
ttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgg
gaaacggtctgataagagcacccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctctt
ccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctg
cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcc
caacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatc
ttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggatgatgcgtccggcgt
agaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaata
attttgtttaactttaagaaggagatatacatatgcgttgtagcgtgtccaccgaaaatgtgtcttttcaccgaaactgaaaccga
aacgcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtccatcg
aagtatacaaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctg
accctgccggaactgattgacaacgtccagcgcctgggcctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtcgtgcgctggat
cgcttcgtttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagacttccctgcacgcgacggcaactgtctttccgtctgctgcgtc
aacacggttttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaacttcctgaaaaacctgaagga
agatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaa
ggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagatctggcagaacaggtgaaccatgca
ctggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacg
cggatcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgt
cccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccg
tgggtgtagcattcgaacgcaatactccgactgccgtaactccgtgccaaaaatgtttctttcgtaaccattatcgacga
tatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgacgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcg
acgatctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataacactattaacgaaatcgcctacgacaacctgaaag
ataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgaccgtgcaacgctttcctgcaagaagccaagtg
gctgtacaacaaatctactccgaccttgacgaatacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggcccgctgcaactggt
gttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgataacctgcaaaaatacccatgacatcatctctc
gtccttcccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcg
tttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctgg
aaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgt
caatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatc
actgaaccgattctgccgtttgaacgctaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccac
caccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagc
ataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

SEQ ID NO:31

圖137D

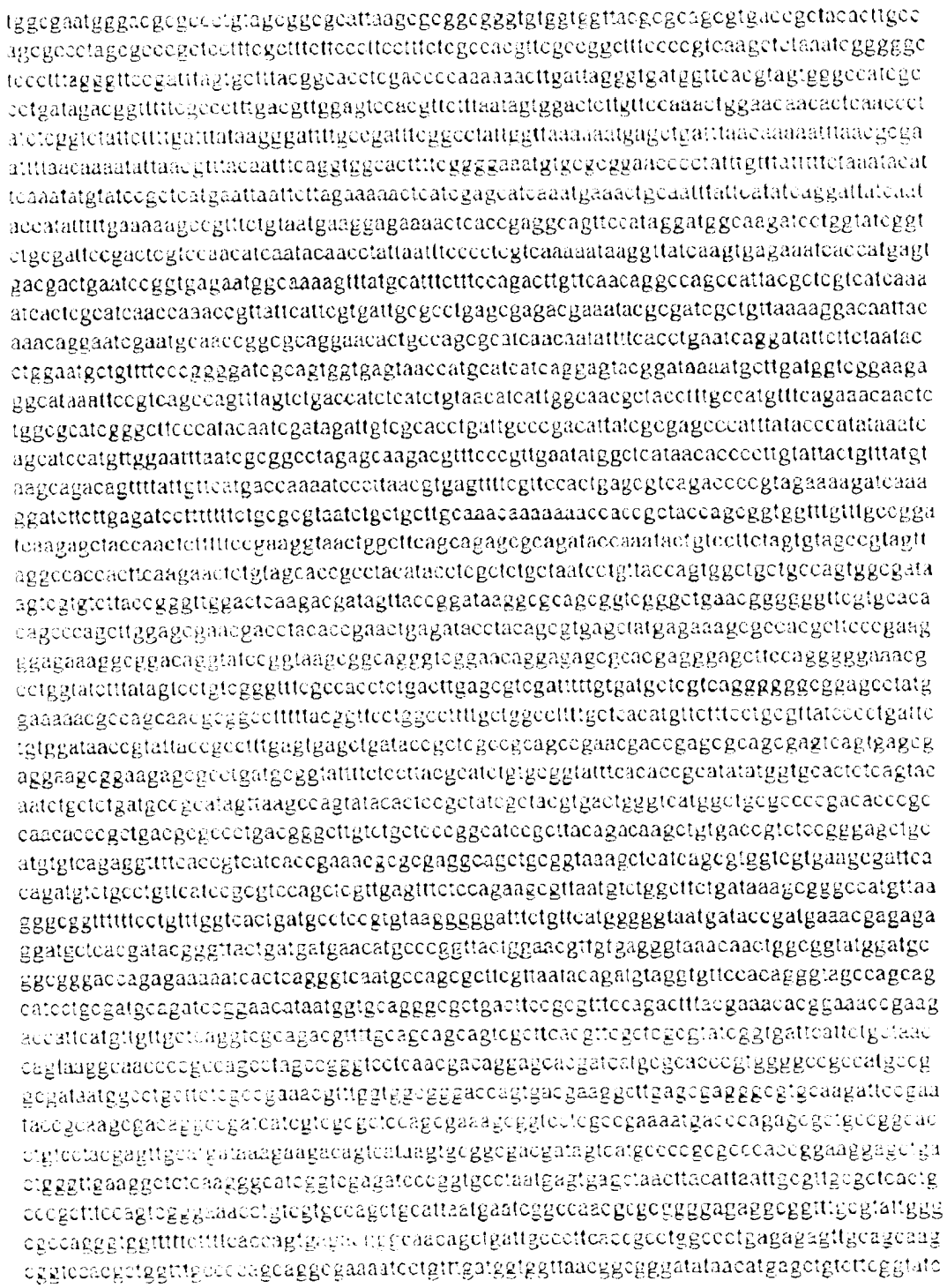


圖137E

gtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgat
cgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtc
gccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacaga
acttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatgg
gagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttccacagca
atggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacagg
cttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttg
cgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcgg
ttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgg
gaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctctt
ccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctg
cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcc
caacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatc
ttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgt
agaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggcgaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaata
attttgtttaacttaagaaggagatatacatatgcgttgtagcgtgtccaccgaaaatgtgtctttctctgaaactgaaaccgaaacg
cgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtccatcgaagtacaca
aagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgaccctgctggaactg
attgacaacgtccagcgcctgggcctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtcgtgcgctggatcgcttcgtttcctccggcgg
cttcgatggcgtaaccaagacttccctgcacggtacggcactgtctttccgtctgctgcgtcaacacggttttgaggtttctcagga
agcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaacttcctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacga
ggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaaggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaa
gaaaagatcggtaaagagctggcagaacaggtgtcccatgcactggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagc
agtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaaccaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatc
cagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcacttgctcgtga
ccgcctgattgagagcttctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtgcaaaaatg
tttcttttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttg
ggacgtaaacgccatcaacgacctgccggatttcatgaaactgtgcttctggctctgtataacactattaacgaaatcgcctacg
acaacctgaaagataaaggttgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgacctgtgcaacgctttcctgcaagaag
ccaagtggctgtacaacaaatctactccgaccttttgacgactacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggcccgctgcaactg
atcttcgctttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaatatccatgacatcatctctgtcct
tccccatatctttccgtctgtgccaatgacctggctagcgcgctctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaaatagcgttcttgttac
attgcgcactaaaggtatctccgaagaacttgctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaacaag
gaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcata
acggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaaccgattctgccgttgaacg
ctaaggatccgattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgct
aacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccccttgggggcctctaaacgggt
cttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

SEQ ID NO:32

圖137F

MRCSVSTENVSFSETETETRRSANYEPNSWDYDYLLSSDTDESIEVHKDKAKKLE
AEVRREINNEKAEFLTLLELIDNVQRLGLGYRFESDIRRALDRFVSSGGFDGVTKT
SLHGTALSFRLLRQHGFEVSQEAFSGFKDQNGNFLENLKEDIKAILSLYEASFLAL
EGENILDEAKVFAISHLKELSEEKIGKELAEQVSHALELPLHRRTQRLEAVWSIEA
YRKKEDANQVLLELAILDYNMIQSVYQRDLRETSRWWRRVGLATKLHFARDRL
IESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDIYDVYGTLDELELFTDAVER
WDVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKAWADLCNAF
LQEAKWLYNKSTPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLIFAYFAVVQNIKKEEIENLQKY
HDIISRPSHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRTKGISEELATESVMNLIDE
TWKKMNKEKLGGSLFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLS
VITEPILPFER

SEQ ID NO:33

圖137G

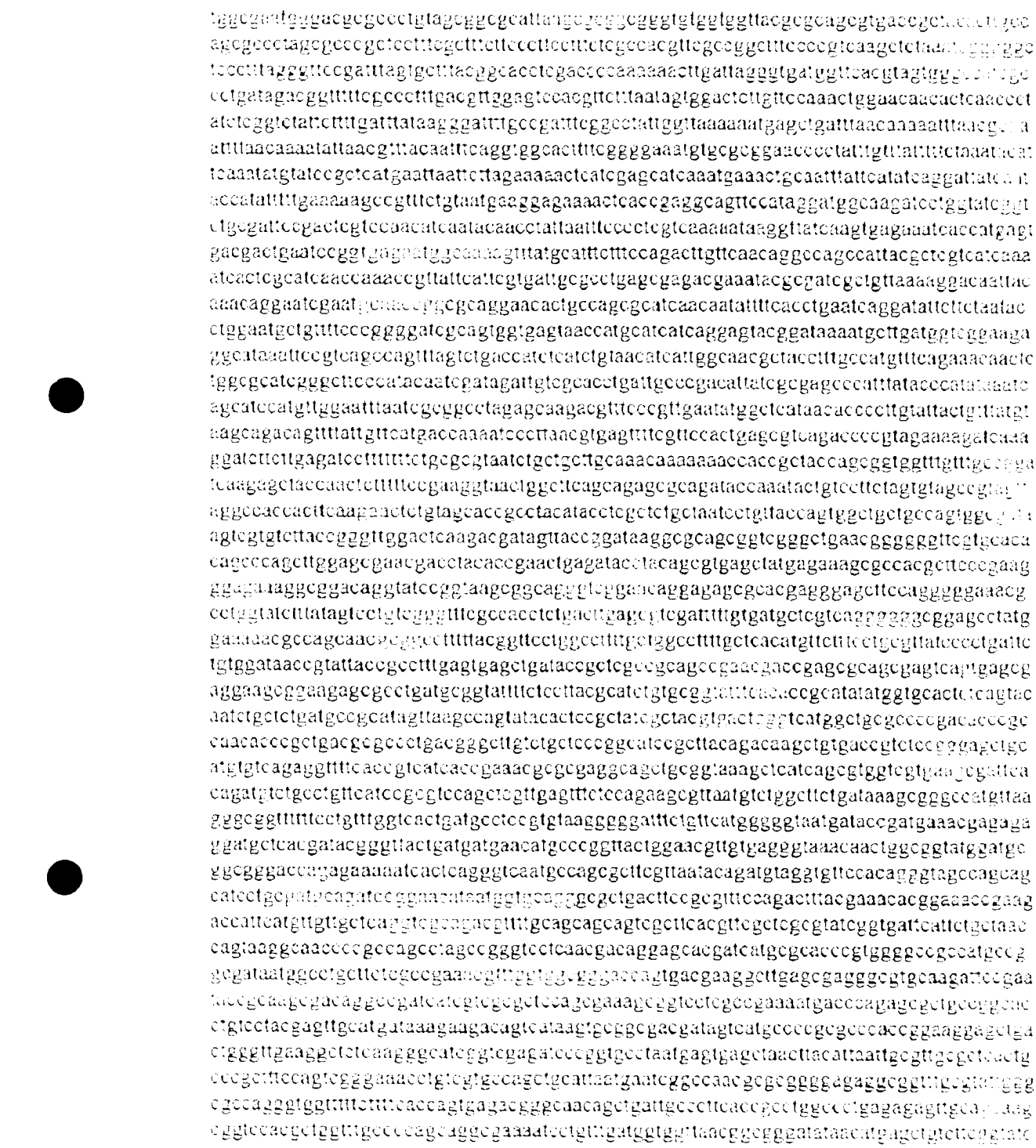


圖137II

gtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgat
cgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtc
gccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacaga
acttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatgg
gagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttccacagca
atggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacagg
cttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatgccgcgacaatttg
cgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcgg
ttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgg
gaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctct
tccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctg
cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcc
caacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatc
ttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgt
agaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaata
attttgtttaactttaagaaggagatatacatatgcatatgcgttgtagcgtgtccacgaaaatgtgtctttcaccgaaactgaa
acgaaacgcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtc
catcgaagtatacaaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaat
ttctgaccctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggcctgggttacccgtttcgagtctgatatccgtcgtgcgct
ggatcgcttcgtttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagacttccctgcacgcgacggcactgtctttccgtctgctg
cgtcaacacggttttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaaacttcctggagaaacctga
aggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaaacatcctggacgagg
cgaaggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagatctggcagaacaggtgaacca
tgcactggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtactgtctatcgaggcctacgtaaaaaggag
gacgcggatcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaa
acgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgg
gccgtgggtgtagcattcgaacgcaatactccgactgccgtaactccgtgccaaaaatgttttctttcgtaaccattatcg
acgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactaacgcagttgagcgttgggacgtaaacgcc
atcgacgatctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataaacactattaacgaaatcgcctacgacaacctg
aaagaaaaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgaccgtgcaacgctttcctgcaagaagcca
agtggctgtacaacaaatctactccgaccttgacgaatacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggcccgctgcaac
tggtgttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaatatccatgacatcatc
tctcgtcctcccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaata
gcgtttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacct
ggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggca
cgtcaatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgta
atcactgaaccgattctgccgtttgaacgctaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcac
caccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataact
agcataaccccttgggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

SEQ ID NO 34

圖137I

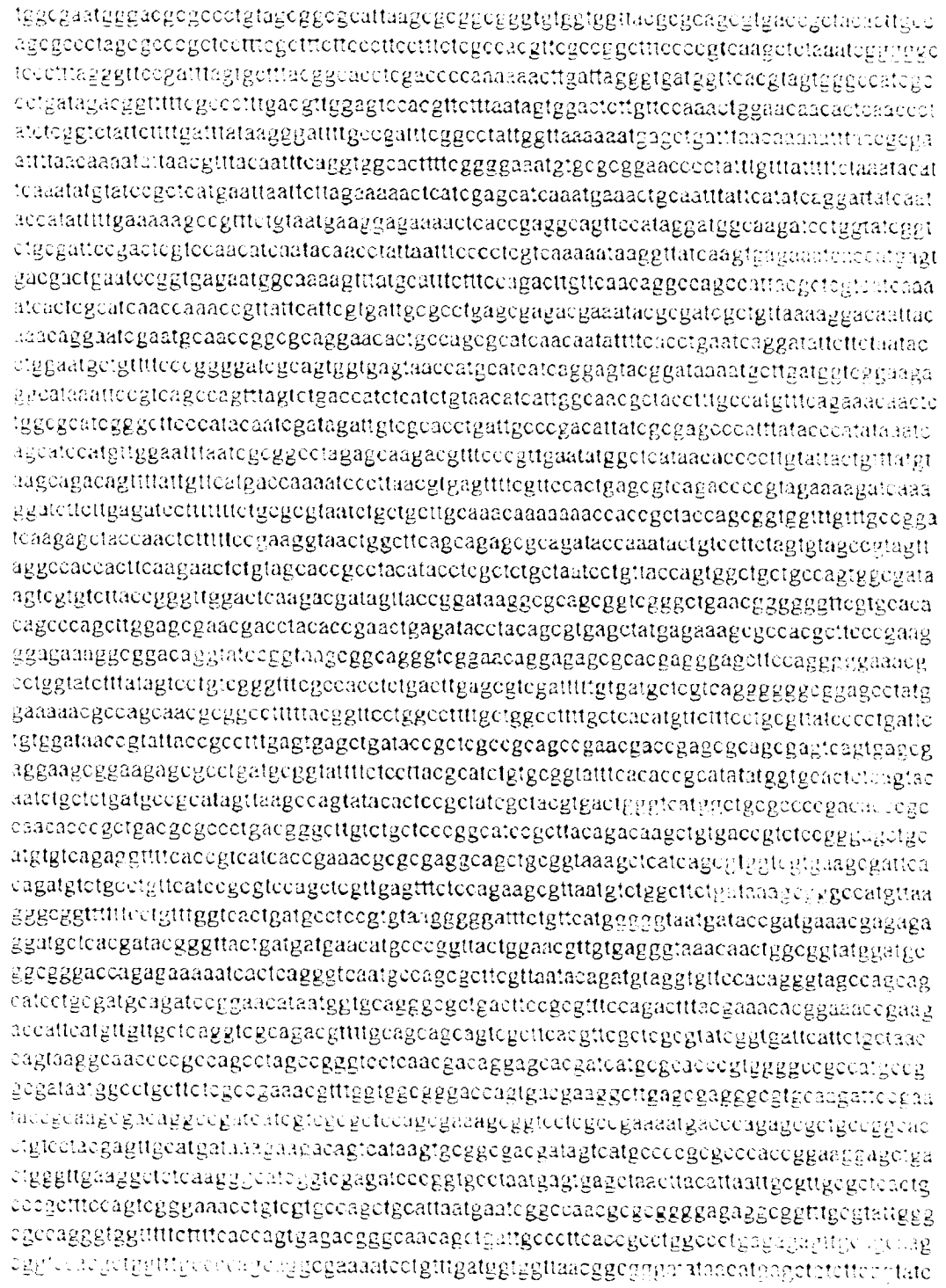


圖137J

gtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgat
cgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtc
gccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacaga
acttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatgg
gagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttccacagca
atggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacagg
cttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttg
cgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcgg
ttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgg
gaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctctt
ccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctg
cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcc
caacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatc
ttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgt
agaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaata
attttgtttaactttaagaaggagatatacatatgtgctctgtttctaccgagaacgtttccttcactgagacggaaaccgaggc
acgtcgtagcgcgaactacgagccgaatagctgggactacgatttcctgctgtcttccgatactgacgaatctattgaggt
gtacaaagacaaagcaaagaaactggaggctgaagtgcgccgcgaaattaacaacgagaaagctgaattcctgactc
tgctggagctgatcgataacgtacagcgccctgggtctgggttaccgcttcgaatctgatatccgtcgcgcactggatcgttt
cgtaagcagcggcggtttcgatggcgtgaccaaaacgagccctgcacgctaccgcgctgtccttccgtctgctgcgtcagc
acggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggtttcaaagatcaaaacggtaacttcctggaaaaccctgaaagaagac
actaaggcgatcctgagcctgtatgaggcaagctttctggccctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgcgtatt
ctccatctcccatctgaaagagctgtctgaagagaaaatcggtaaggaactggcagagcaggttaatcacgcactggaa
ctgccgctgcatcgtcgtaccccagcgtctggaggcggtttggtccatcgaagcgtaccgcaaaaaggaggatgctaacc
aggttctgctggaactggccatcctggactacaacatgatccagtccgtttaccagcgtgatctgcgtgaaacctcccgtt
ggtggcgccgtgtgggcctggcgaccaaactgcacttcgctaaggaccgcctgattgagtcttttactgggcagtcggc
gttgcgttcgaacctcagtattctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactattatcgacgacatct
acgacgtttacggtactctggacgagctggaactgtttaccgaacgctgtcgaacgttgggatgttaacgccatcaacgat
ctgcctgactacatgaaactgtgcttcctggcactgtataacacgatcaacgaaattgcatacgacaacctgaaagacaa
aggtgaaaacatcctgccgtacctgactaaagcgtgggcggatctgtgtaacgcttttctgcaagaagcgaaatggctgt
ataacaaatccactccgaccttgacgattatttcggcaatgcctggaaatccagctctggcccgctgcaactgatcttcg
cttattttgcggttgtccaaaacatcaaaaaggaggaaattgaaaacctgcaaaaatacccacgatatcattagccgtcct
tctcatatctttcgcctgtgcaacgacctggcaagcgcgtccgcagagatcgcacgtggcgaaaccgctaactctgtttcc
tgctacatgcgcaccaagggcatttccgaagagctggcaaccgagagcgtaatgaatctgatcgacgaaacctgtaag
aaaatgaacaaagaaaaactgggtggctccctgttcgctaaaccgttcgtagagactgctattaacctggcacgtcaga
gccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagcccggatgaactgactcgtaaacgtgtactgtctgttatcacc
gaaccgattctgccgttcgaacgttaactgcagctggtaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcg
agcaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagca
ataactagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

SEQ ID NO:35

圖137K

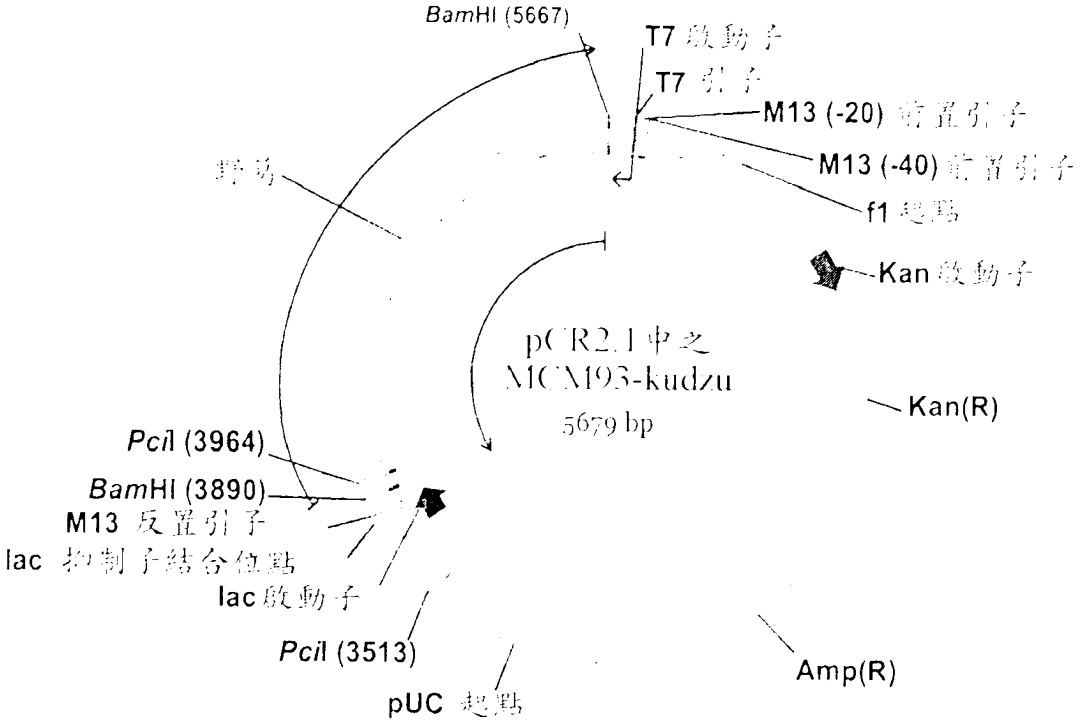

BamHI (5667)
T7 啟動子
T7 引子
M13 (-20) 前置引子
M13 (-40) 前置引子
f1 起點
Kan 啟動子
pCR2.1中之
MCM93-kudzu
5679 bp
Kan(R)
PciI (3964)
BamHI (3890)
M13 反置引子
lac 抑制子結合位點
lac 啟動子
PciI (3513)
pUC 起點
Amp(R)

圖137L

質體 MCM93 - pCR2.1 - kudzu

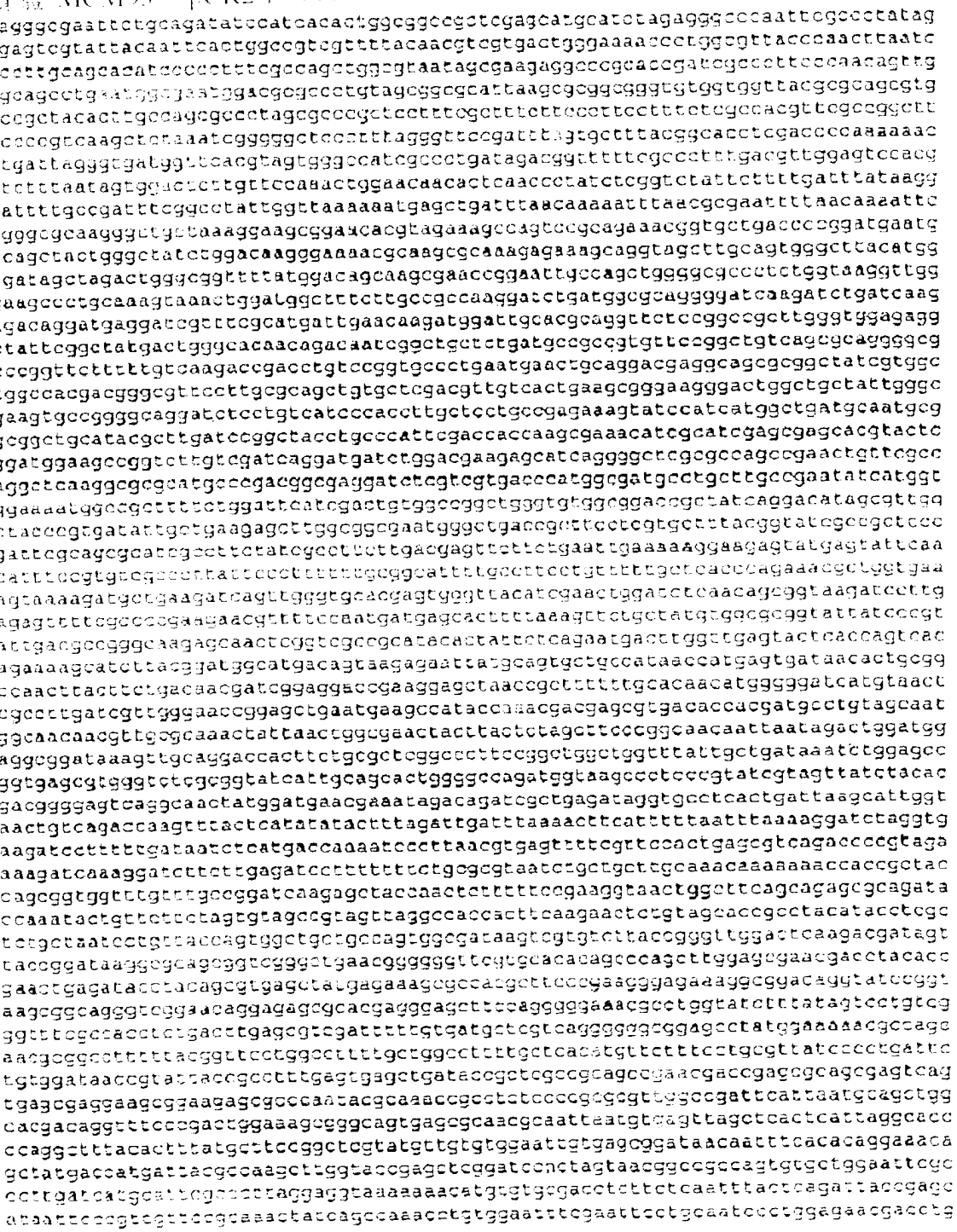


圖137M

aaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccca
gccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcatta
aagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttc
cgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgttccaaggataaagaaggtggttttcag
cggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaaagcgtcttacctgggtttcgaggtgagaacc
tgctggaggaggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagagggcattccattcaaaggttgca
gaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataa
atacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagcgggatttttaacatcgtacagaccctgc
accagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggatttttgtacgcgac
cgccgatggaagtttatttctgggcactgggtatgggcgccagaccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttac
taaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcacttcgggacgaactgcaactgttca
ccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactg
tacaacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaag
ctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagt
acctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcag
gaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccg
cctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgaggctaccaattctatgattgctacatgc
acgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatg
aatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttc
ccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctga
ttgaccctttcccgattaccagctgatgtatgtctaactgcagggatccgtcgaccg

SEQ ID NO:36

圖137N

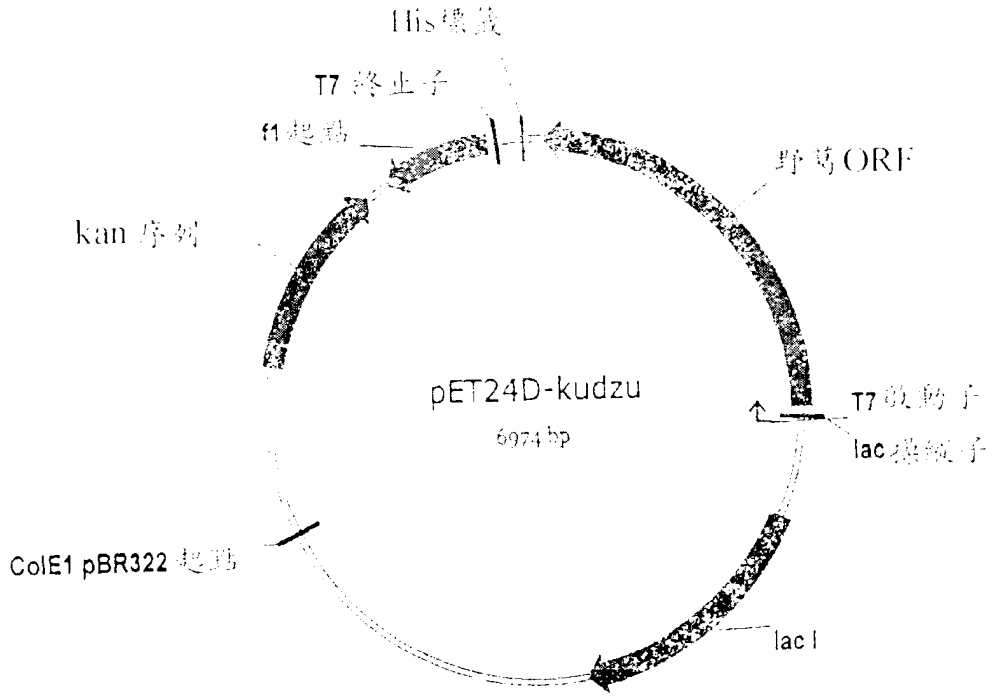

His標籤
T7 終止子
f1 起點
野葛ORF
kan 序列
pET24D-kudzu
6074 bp
T7 啟動子
lac 操縱子
ColE1 pBR322 起點
lac I

圖137O

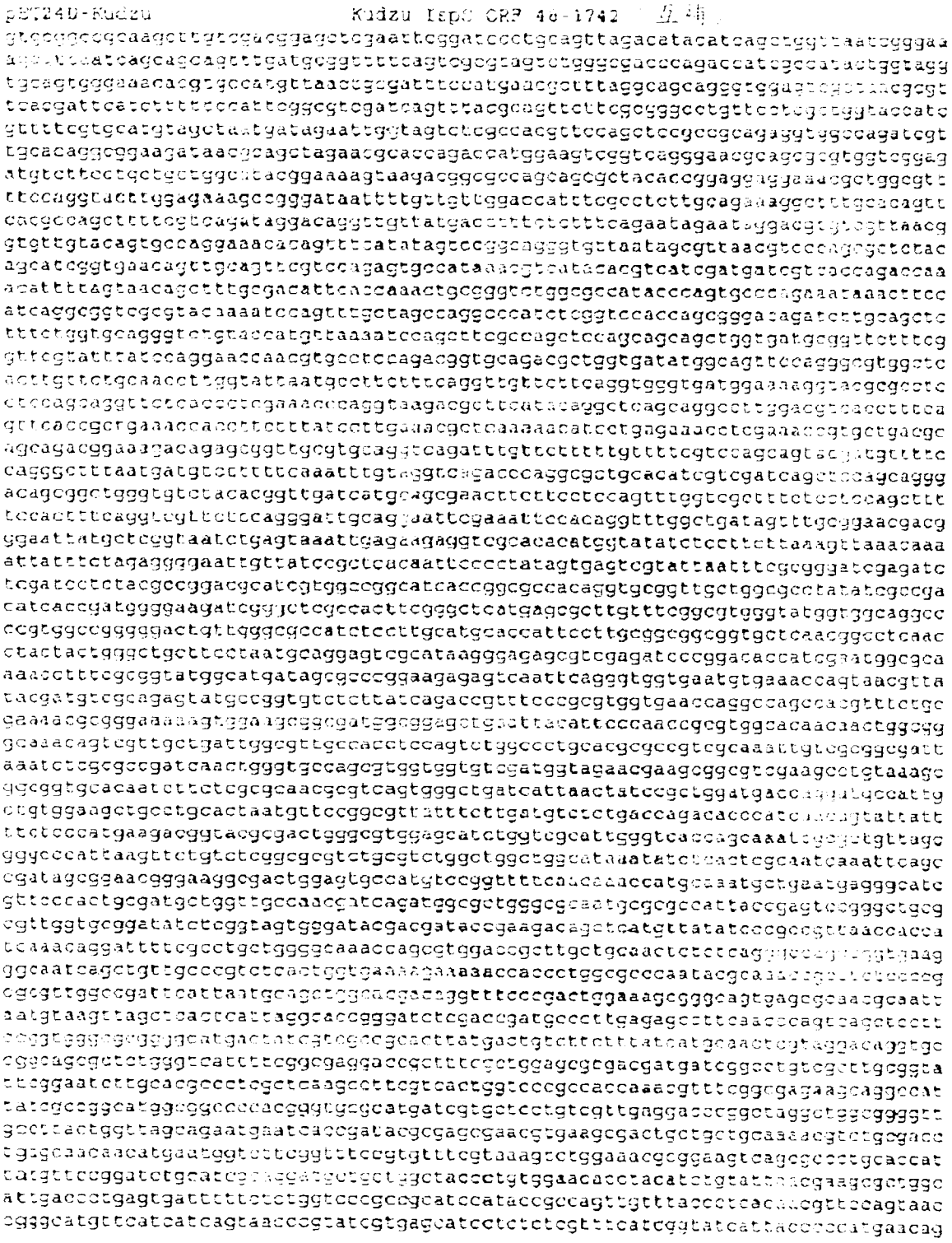


圖137P

aaatccccctttaccgggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagcc
agaccattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatccgtgaatcgcttcacgac
caccgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctccc
ggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcg
ggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagc
agattgtactgagagtgcaccatatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggc
gctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaag
gcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccag
gaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgct
caagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctct
cctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctc
acgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccg
accgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagcc
actggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagtttcttgaagtggtggcctaactacggcta
cactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgat
ccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatct
caagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcat
gaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcttgc
tctaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatc
aggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttg
ccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcatttt
atccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccgggaaaacagcattccaggtattagaagaata
tcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcgccggttgcattcgattcctgtttgtaatt
gtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgcgagt
gattttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcacc
ggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgtattg
atgttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagttttctcct
tcattacagaaacggctttttcaaaatatggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgct
cgatgagtttttctaatgaattaattcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggggtt
ccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacgttaatatttttgttaaaattcgcgttaaatttttg
ttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatag
ggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaacc
gtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacccaaatcaagttttttggggtcgaggtgccgtaaagcact
aaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaaggga
agaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcg
cttaatgcgccgctacagggcgcgtcccattcgccaatccggatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaag
acccgtttagaggccccaaggggttatgctagttattgctcagcggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggc
tttgttagcagccggatctcagtggtggtggtggtggtgctcga

SEQ ID NO:37

圖137Q

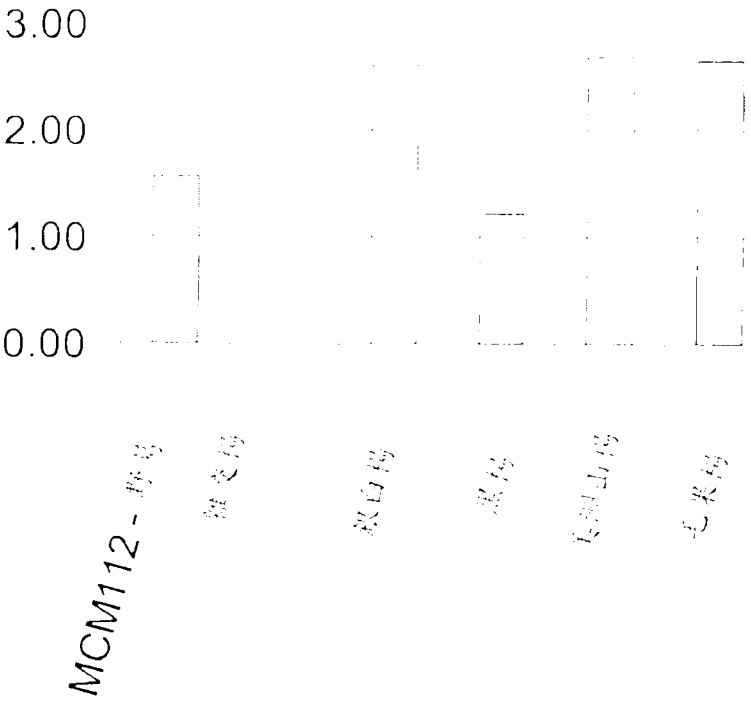


圖138

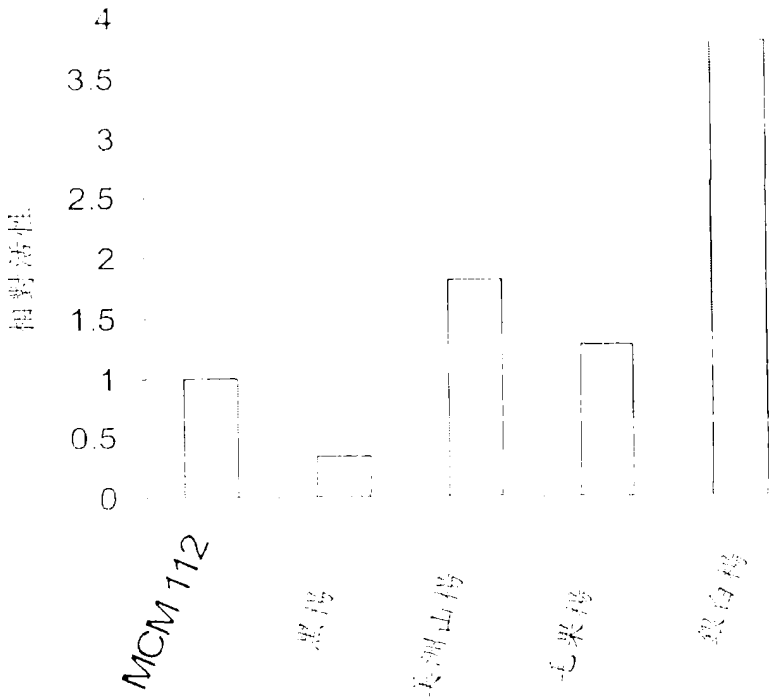
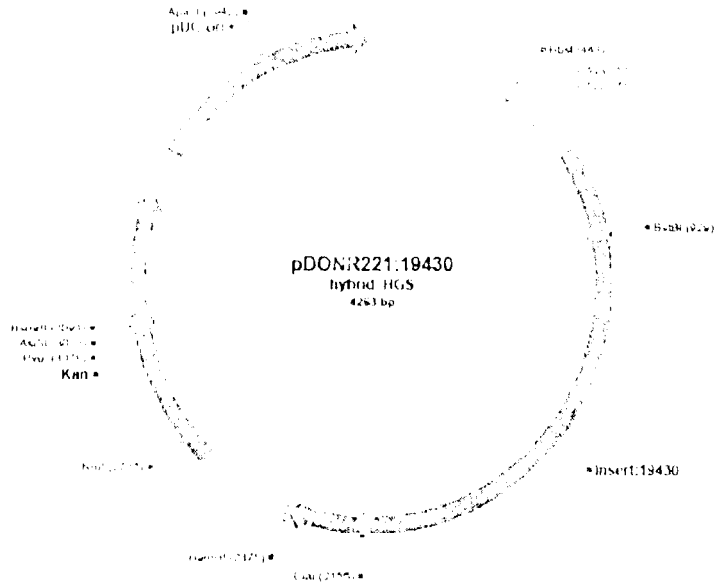


圖139

DNA 2.0

pDONR221:19430 - hybrid_HGS

pDONR221 Gateway



Original Author

Feature Map

- Fused
- KanR
- pUC ori

Restriction Map

AclI	AACGTT	384,3805
AfeI	AGCGCT	567
AgeI	ACCGGT	3443
AseI	ATTAAT	3852
AvaI	CYCGRG	980
BamHI	GGATCC	2787
BbsI	GAAGAC	4172
BsaBI	GATNNNNATC	3896
BsiWI	CGTACG	622,3230,4450,1256
BspEI	TCCGGA	951
BstAPI	GCANNNNNTGC	294,1357
BtgI	CCRYAG	214,3041,3463
ClaI	ATCGAT	2958
EcoRI	GAATTC	669,2402
EcoRV	GATATC	1955,2550
HpaI	GTTAAC	901,2240
MluI	ACGCGT	230,2561
NheI	GCTAGC	2306
NruI	TCGCGA	2236
PvuI	CGATCG	866
PvuII	CAGCTG	174,2849
XbaI	TCTAGA	225,971

No Cuts: AccI, AgeI, ApaI, AscI, AvrII, BglII, BsaI, BsiWI, BtgI, EagI, HindIII, KasI, KpnI, MfeI, NaeI, NdeI, NotI, PacI, PmeI, SacI, SacII, SanDI, SbfI, SmaI, SpeI, SphI, XhoI, XmaI

図140

gaattcaaaatgtgtgcaacttcatcccaattcactcaaatcacagagcataatttagacgttcagctaactaccaaccaaatctgt
ggaattttgaatttcttcaatcccttgaaaatgatttgaaagtggaaaagttggaggaaaaagccacaaaactagaggaagaagtt
agatgtatgataaacagagtagatacacaacctctgtcactactagaattgattgacgatgtccagaggctgggtttaacatataag
ttcgaaaaggatataatcaaagccttagaaaacatagtccttctagatgaaaacaagaagaataagtctgacttgcacgcaaccg
ctctgagttttagattgctgagacaacatggttttgaagtaagtcaagatgtgtttgaaaggttcaaagacaaagagggaggattct
caggagaattaaagggagatgtgcagggtctgttgtcattgtacgaggccagttatttggggtttgaaggggaaaatctactaga
ggaggccagaaccttctctataacccatctgaagaataacttgaaagaaggcatcaatacaaaagtggctgaacaagtttcacat
gcattggaattgccctaccaccaaagacttcatagacttgaagccagatggttttggacaagtatgaaccaaaggagcctcacc
atcaacttttattggaattagcaaaactggattttaacatggttcagacattacaccagaaagaattgcaggacctatcaagatggtg
gacggagatgggtttagccagcaagttagatttcgttagagatagattgatggaagtttacttttgggcactgggaatggcaccag
atcctcaatttggtgaatgtagaaaggcagttacaaagatgtttggtctagtaacaatcattgatgatgtttatgatgtgtacggaactt
tggatgaattacaactatcaccgacgcagttgaacgttgggatgtaaacgcaataaacacgttgcctgattatatgaagctgtgttt
tctggcattgtacaacacagtcaatgacacttcttactccatttaaaggagaaagggcataacaatctatcctatttgacaaaatcat
ggagggagttatgcaaagcattccttcaagaagctaagtggtctaacaataagataatcccagcattctccaagtatcttgaaaac
gcttccgtatcctcctccggtgtggccctactagcaccatcatatttttccgtctgccagcagcaggaagatatctctgatcatgcttt
gagatccttaacagattttcatggtctagtcagatcctcttgcgtgattttcagattgtgcaatgatttggctacttcagccgcagagtt
agagaggggtgaaaccacgaactcaattattagttatatgcacgagaatgatggaacatccgaagaacaagcccgtgaagaatt
aagaaaaactgatcgatgctgaatggaagaagatgaatagagaaagagtttccgacagcactttgctgcctaaggcattcatgga
gatagctgttaacatggctagggtttcacactgtacataccaatacgggacggtcttggaaggcccgactacgcctactgaaaat
agaattaaaactgctactgattgatccttttccccattaaccagttaatgtacgtgtaatagggatccgaattc

SEQ ID NO:38

圖141

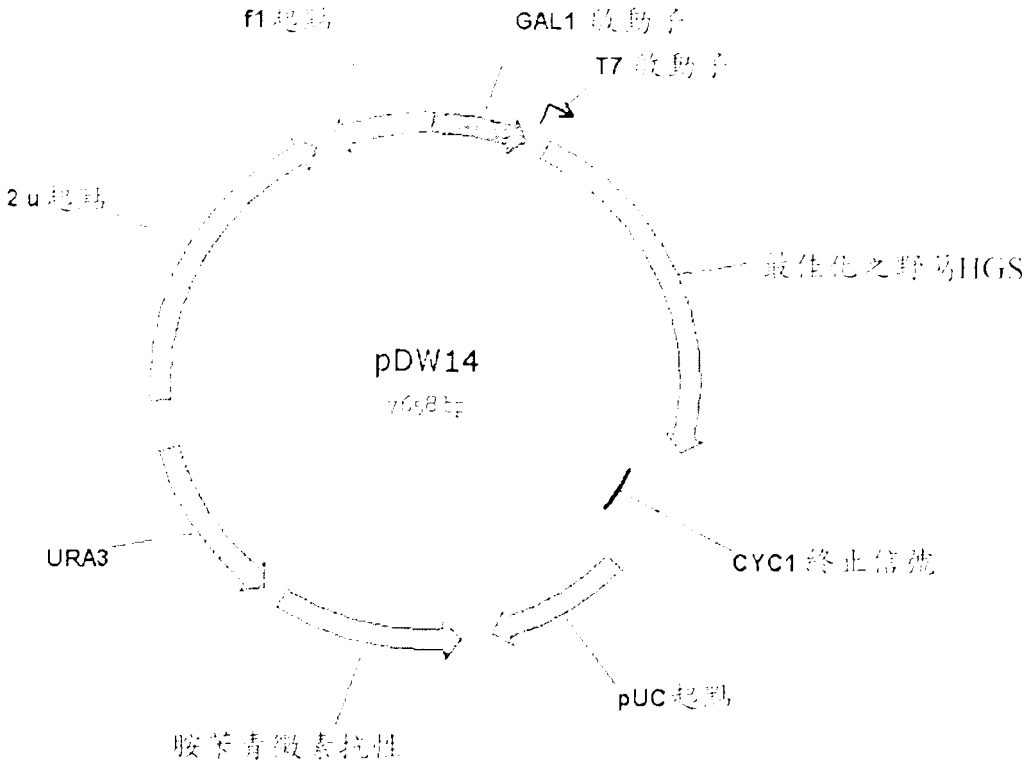

f1起點
GAL1啟動子
T7啟動子
2 u起點
最佳化之野馬HGS
pDW14
CYC1終止信號
URA3
pUC起點
胺苄青黴素抗性

圖142A

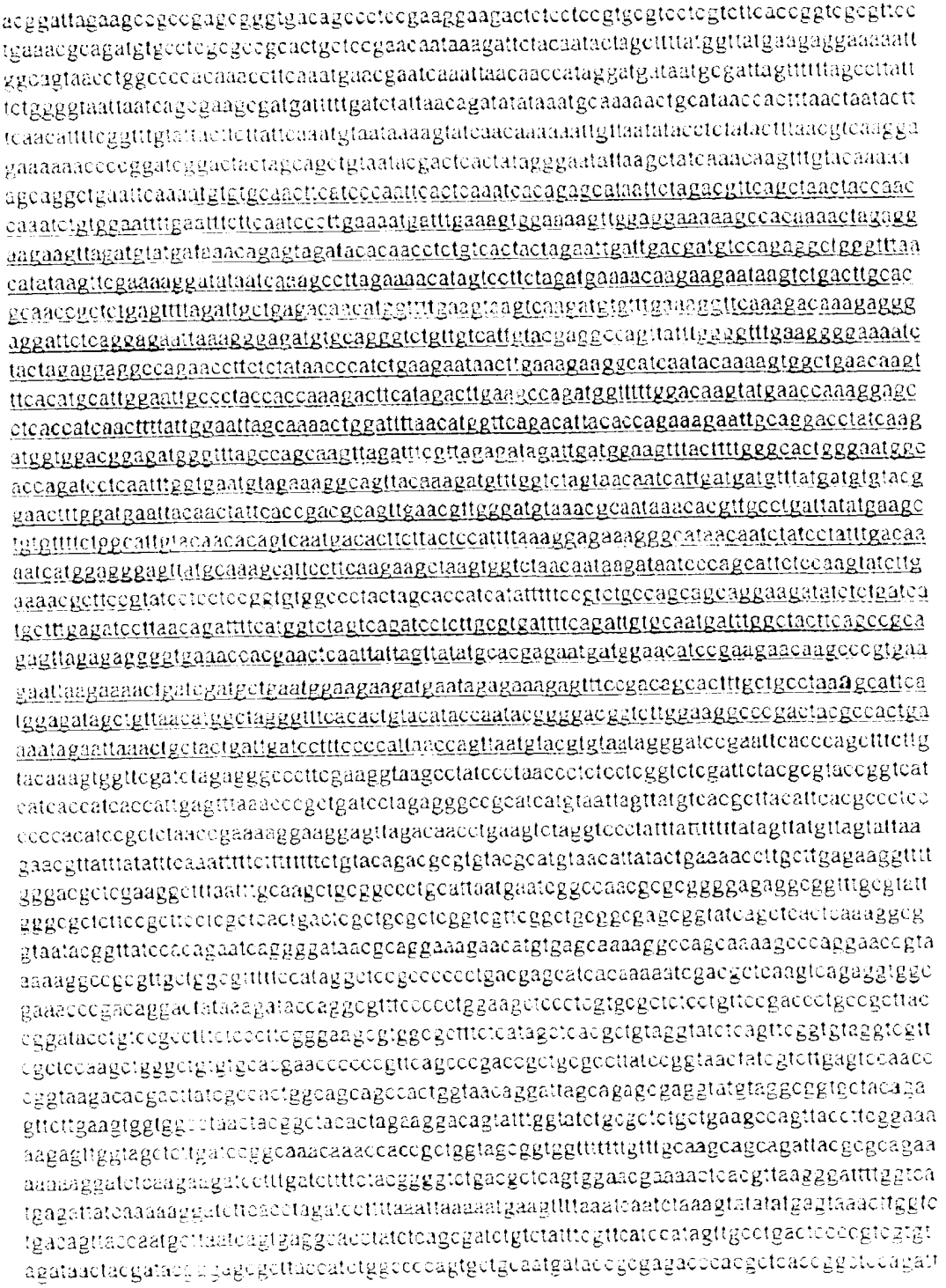


圖142B

圖142C

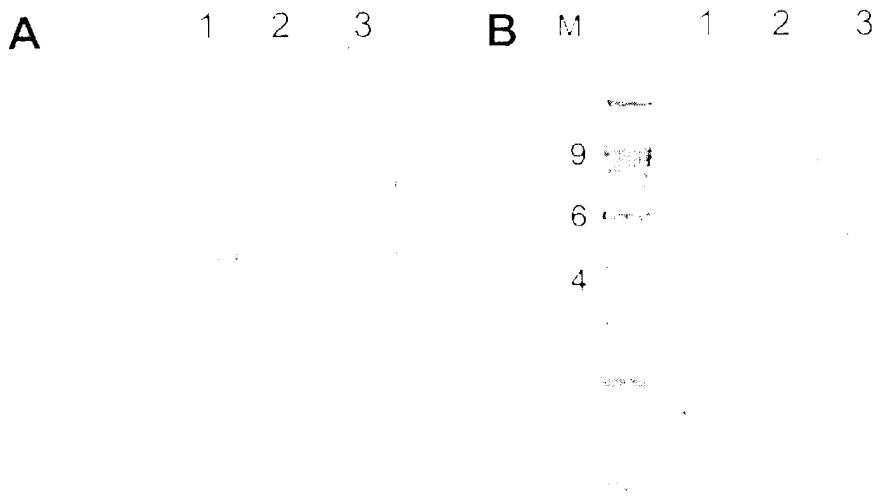


圖143

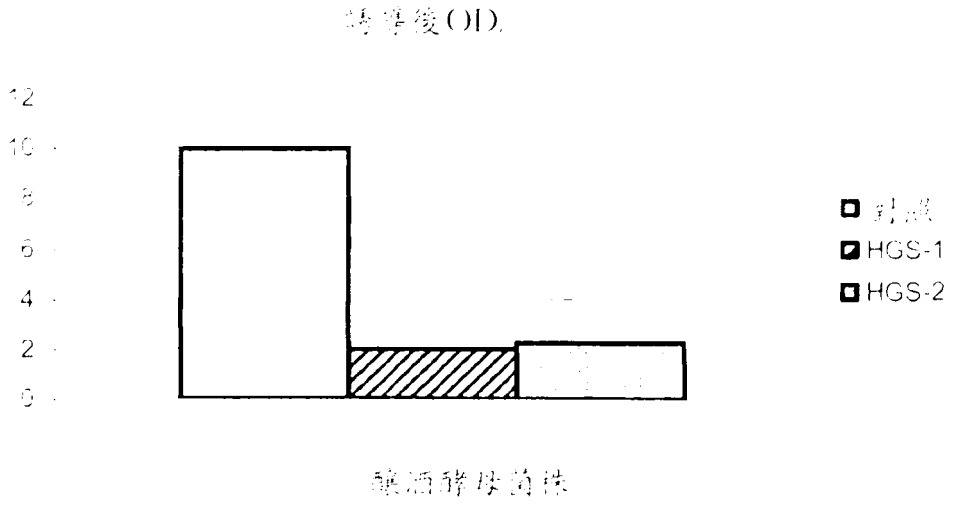


圖144A

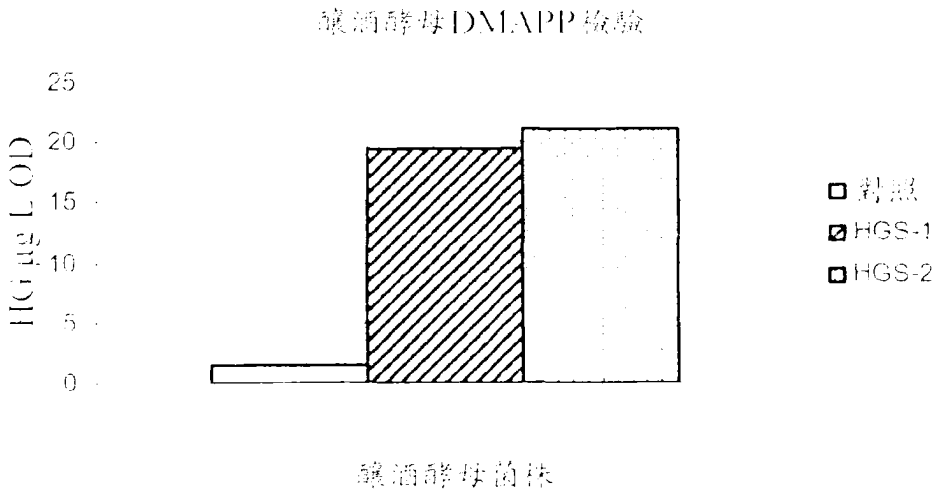


圖144B

具有修飾基因之HGS opt Pseudo flue2-2
1530 bp

圖145A

catcttaagcttgtttaacttaagaaggagatatacatatgtgcgccaccagcagccagttcaccccagatcaccgagcataatag
ccgtcggtccgcgaactaccagcccaacctgtggaacttcgagttcctgcagagcctggaaaacgacctgaagggtggagaag
ctcgaagagaaggccaccaagctggaggaggaggtgcgttgcatgatcaaccgggtggacacccagccccctgagcctgctg
gagctcatcgacgacgtgcagcgcctgggcctgacctacaagtttgagaaagatatcatcaaggcgctggagaacatcgtcctg
ctggacgagaataagaagaacaaaagcgatctgcacgcgaccgccctgagcttccgcctgctgcggcagcatggctttgaggt
gagccaggacgtgttcgagcgcttcaaggacaaagaaggggcttctccggggaactgaagggtgacgtgcagggcctgct
gagcctgtacgaggccagctatctcggtttcgaaggcgaaaatctgctggaggaggccccgtaccttcagcatcaccccatctgaa
gaacaacctcaaggaggggatcaacacgaagggtggccgagcaggtgtcccacgcgctggagctgccgtatcatcaacgcct
gcaccgcctggaggcgcggtggtttctggacaagtacgaacccaaggagccgcatcaccagctgctgctggaactggccaaa
ctcgatttcaacatggtccagaccctgcaccaaaaagagctgcaggacctgagccggtggtggaccgagatgggcctcgcca
gcaagctggatttcgtgcgggaccgcctgatggaagtgtacttctgggcgctgggcatggcgccggaccccgcagttcggcgaa
tgccgcaaggccgtcaccaagatgttcggtctggtcaccattatcgatgacgtctatgacgtgtacggtaccctggacgaactgc
agctcttcaccgacgcggtggaacgctgggacgtgaacgccatcaacacgctgccgactatatgaagctgtgcttcctggccc
tgtacaacaccgtgaacgacacgtcctactccatcctgaaggagaagggccacaataacctgagctatctgaccaaaagctggc
gcgaactgtgcaaggccttcctgcaagaagccaagtggagcaataacaagatcatccccgccttcagcaagtacctggagaac
gccagcgtgtcctccagcggggtcgcgctgctggcgccgagctacttctcggtctgccagcagcaggaagatatctcggacca
cgccctccgctccctgaccgacttccacggcctggtgcgctcgtcctgcgtgatcttcggctgtgcaacgatctggcgacctcg
gcggcggaactcgaacgcggcgaaaccaccaacagcatcatcagctacatgcacgagaacgacggcacgagcgaggaaca
ggcccgcgaagagctgcgcaagctgatcgacgccgagtggaagaaaatgaaccgcgagcgcgtgtcggacagcaccctgc
tgccgaaggcgttcatggagatcgccgtgaacatggcccgcgtgagccactgcacctaccaatatgggcacgggctgggccg
cccggattacgccaccgagaaccgcatcaagctgctgctcatcgacccgttccccatcaaccagctgatgtacgtgtgaggatc
ccgtaac

SEQ ID NO:40

圖145B

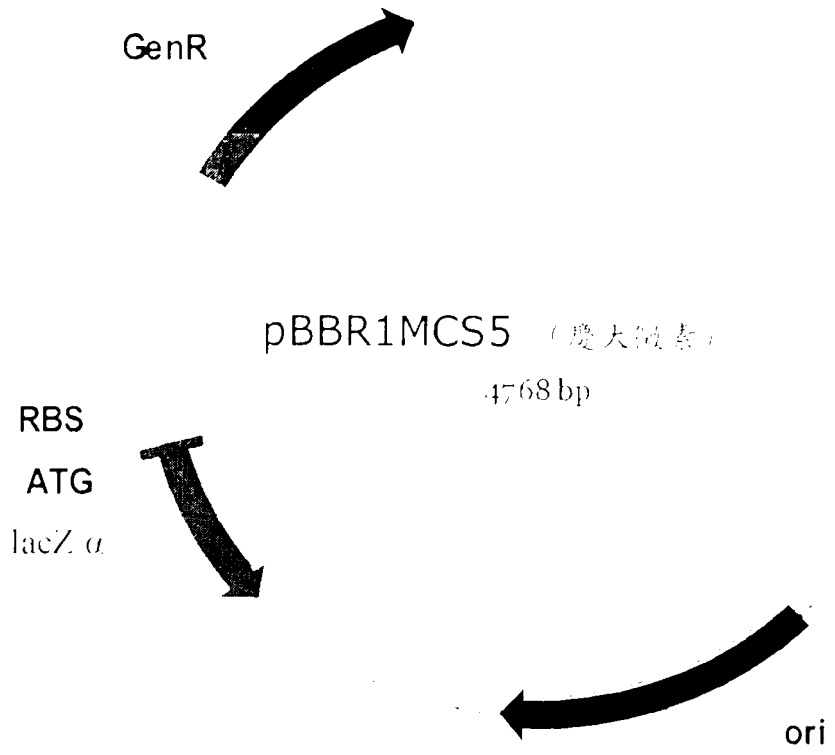


圖146A

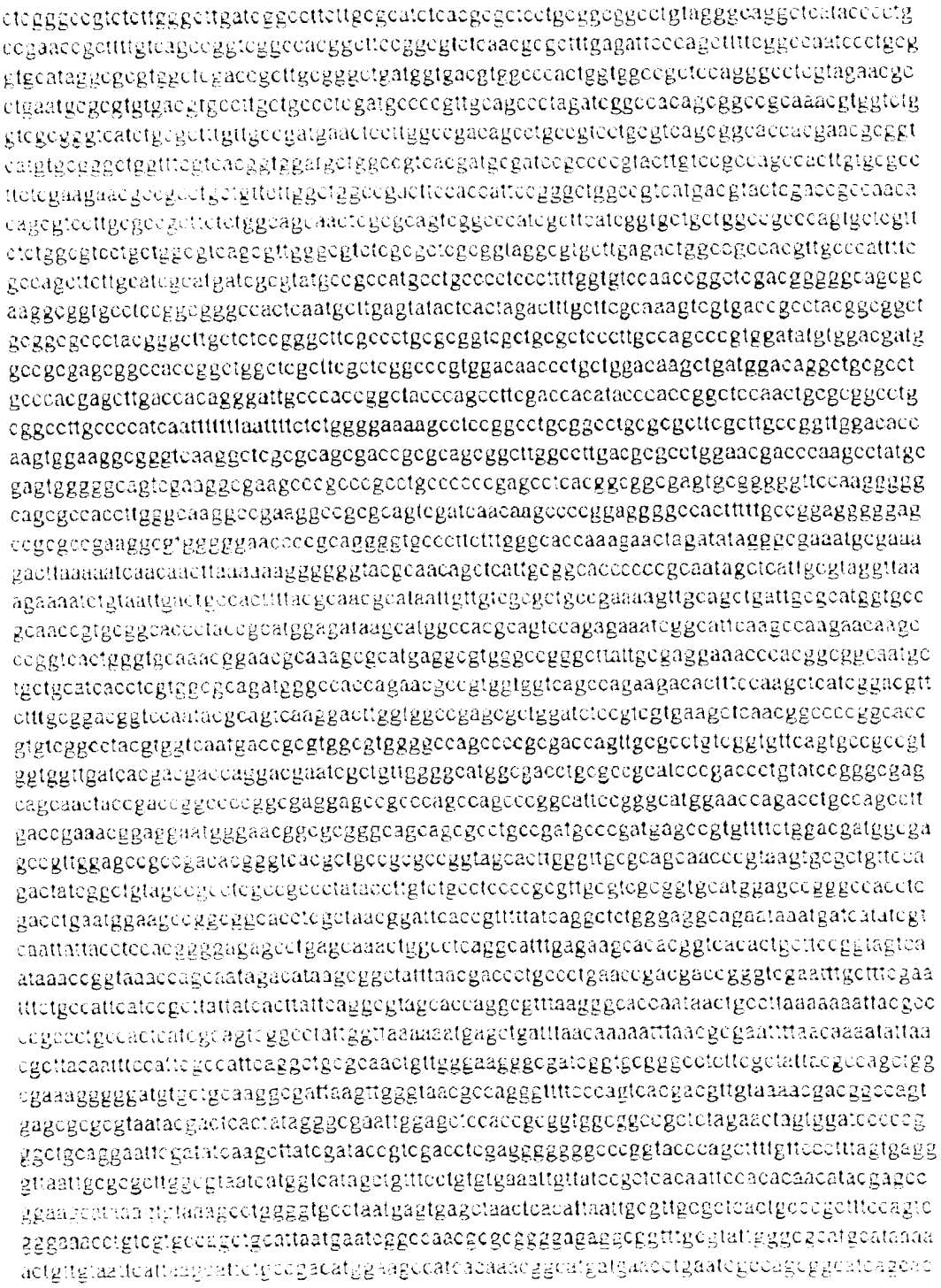


圖146B

cttgtcgccttgcgtataatatttgcccatggacgcacaccgtggaaacggatgaaggcacgaacccagttgacataagcctgtt
cggttcgtaaactgtaatgcaagtagcgtatgcgctcacgcaactggtccagaaccttgaccgaacgcagcggtggtaacggc
gcagtggcggttttcatggcttgttatgactgttttttgtacagtctatgcctcgggcatccaagcagcaagcgcgttacgccgtgg
gtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcagcaacgatgttacgcagcagggcagtcgccctaaaacaaag
ttaggtggctcaagtatgggcatcattcgcacatgtaggctcggccctgaccaagtcaaatccatgcgggctgctcttgatctttc
ggtcgtgagttcggagacgtagccacctactcccaacatcagccggactccgattacctcgggaacttgctccgtagtaagacat
tcatcgcgcttgctgccttcgaccaagaagcggttgttggcgctctcgcggcttacgttctgcccaggtttgagcagccgcgtagt
gagatctatatctatgatctcgcaatcgccggcgagcaccggaggcagggcattgccacccgcgctcatcaatctcctcaagcatg
aggccaacgcgcttggtgcttatgtgatctacgtgcaagcagattacggtgacgatccccgcagtggctctctttacaaagttggg
catacgggaagaagtgatgcacttttgatatcgacccaagtaccgccacctaacaattcgttcaagccgagatcggcttcccggcc
gcggagttgttcggtaaattgtcacaacgccgccaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcgcccgcgttcctgctggcgctg
ggcctgtttctggcgctggacttcccgctgttccgtcagcagctttgcccacggccttgatgatcgcggcggccttggcctgca
tatcccgattcaacggcccccagggcgtccagaacgggcttcaggcgctcccgaaggt

SEQ ID NO:41

圖146C

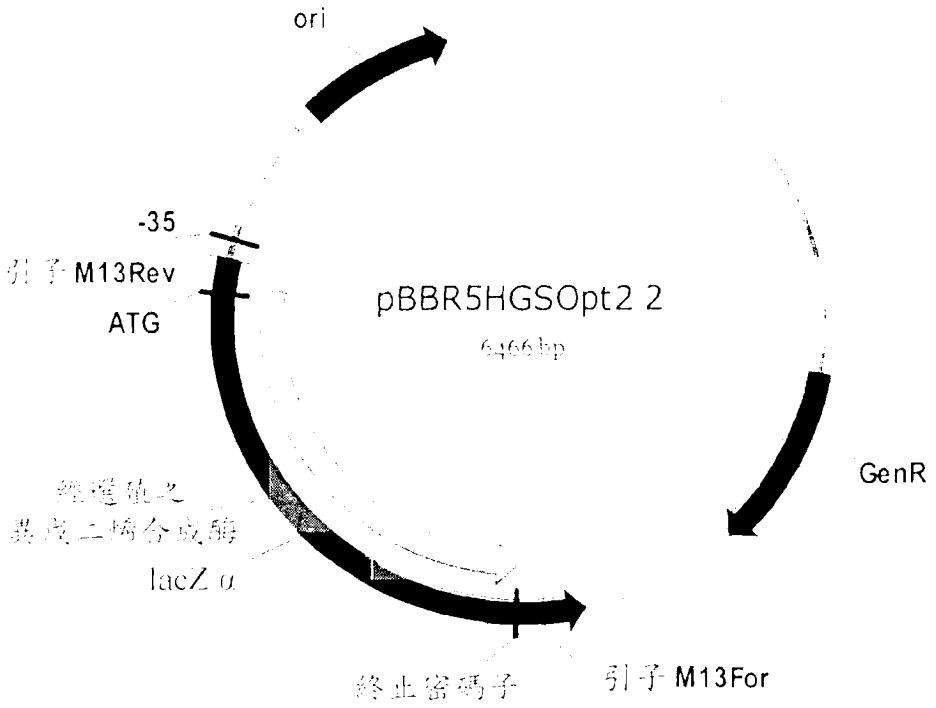

ori
-35
引子 M13Rev
ATG
pBBR5HGSOpt2 2
6466 bp
GenR
lacZ α
引子 M13For

圖147A

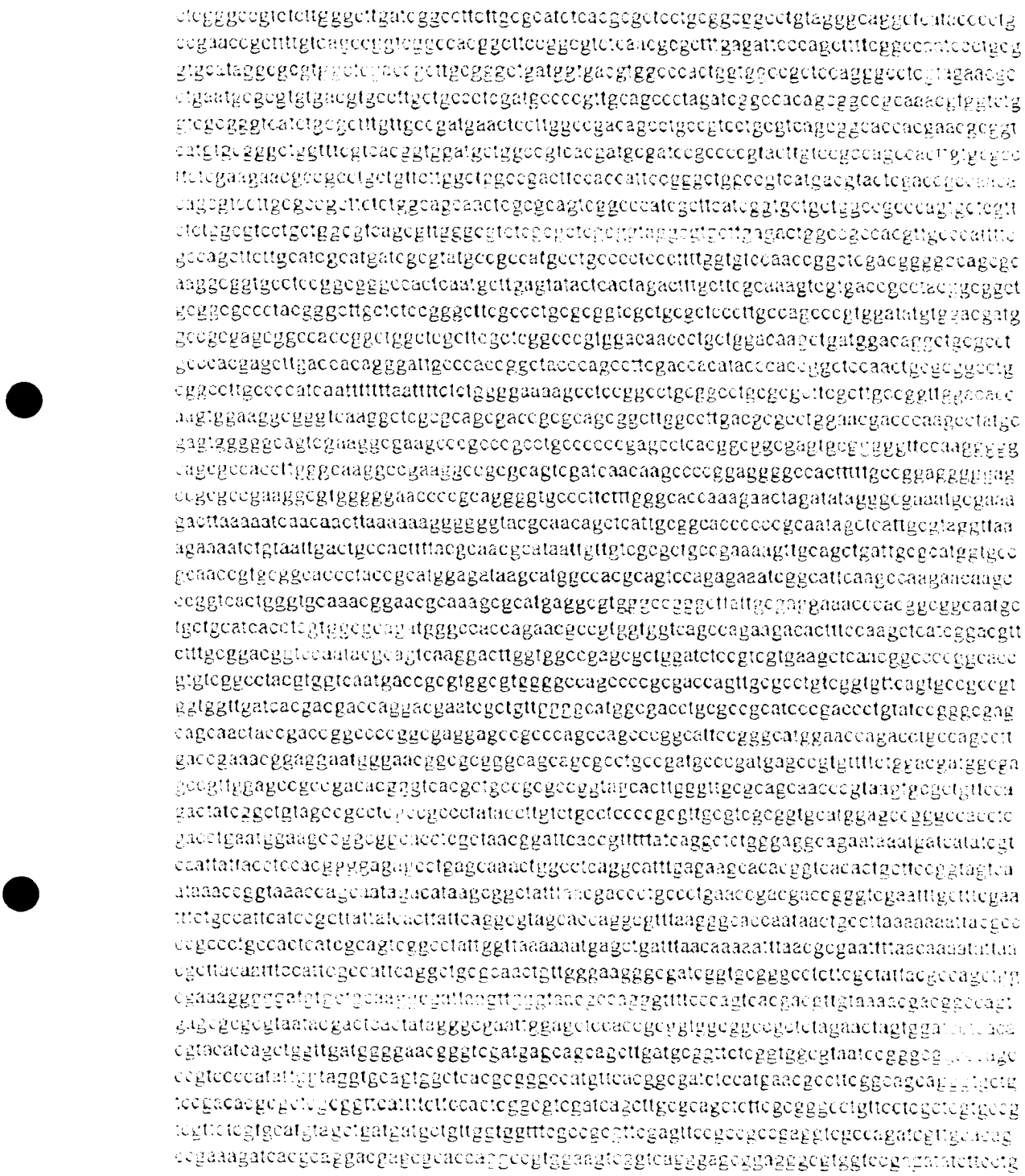


圖147B

ctgctggcagaccgagaagtagctcggcgccagcagcgcgaccccgctggaggacacgctggcgttctccaggtacttgctg
aaggcgggggatgatcttgttattgctccactggcttcttgcaggaaggccttgcacagttcgcgccagctttggtcagatagctc
aggttattgtggccccttctccttcaggatggagtaggacgtgtcgttcacggtgttgtacagggccaggaagcacagcttcatata
gtcgggcagcgtgttgatggcgttcacgtcccagcgttccaccgcgtcggtgaagagctgcagttcgtccagggtaccgtacac
gtcatagacgtcatcgataatggtgaccagaccgaacatcttggtgacggccttgcggcattcgccgaactgcgggtccggcgc
catgcccagcgcccagaagtacacttccatcaggcggtcccgcacgaaatccagcttgctggcgaggcccatctcggtccacc
accggctcaggtcctgcagctcttttggtgcagggtctggaccatgttgaaatcgagtttggccagttccagcagcagctggtga
tgcggctccttgggttcgtacttgtccagaaaccaccgcgcctccaggcggtgcaggcgttgatgataccggcagctccagcgcg
tgggacacctgctcggccaccttcgtgttgatcccctccttgaggttgttcttcagatgggtgatgctgaaggtacgggcctcctcc
agcagatttcgccttcgaaaccgagatagctggcctcgtacaggctcagcaggccctgcacgtcaccctcagttccccggag
aagccccctcttgtccttgaagcgctcgaacacgtcctggctcacctcaaagccatgtgccgcagcaggcggaagctcagg
gcggtcgcgtgcagatcgcttttgttcttcttattctcgtccagcaggacgatgttctccagcgccttgatgatatcttctcaaacttg
taggtcaggcccaggcgctgcacgtcgtcgatgagctccagcaggctcaggggctgggtgtccacccggttgatcatgcaacg
cacctcctcctccagcttggtggccttctcttcgagcttctccaccttcaggtcgtttccaggctctgcaggaactcgaagttccac
aggttgggctggtagttcgcggaccgacggctattatgctcggtgatctgggtgaactggctgctggtggcgcacatatgtatatc
tccttcttaaagttaaacaaagcttatcgataccgtcgacctcgaggggggggcccggtacccagcttttgttccctttagtgagggtta
attgcgcgcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaa
gcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaa
acctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctca
ctgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcagg
ggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttcca
taggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccag
gcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcggg
aagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaa
ccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggc
agcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctac
actagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaac
aaaccaccgctggtagcggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctt
ttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagat
ccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgag
gcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggctta
ccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaa
gggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcg
ccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctcc
ggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtca
gaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttt
tctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacggg
ataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaagaactccagaagcctcgc
cgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg

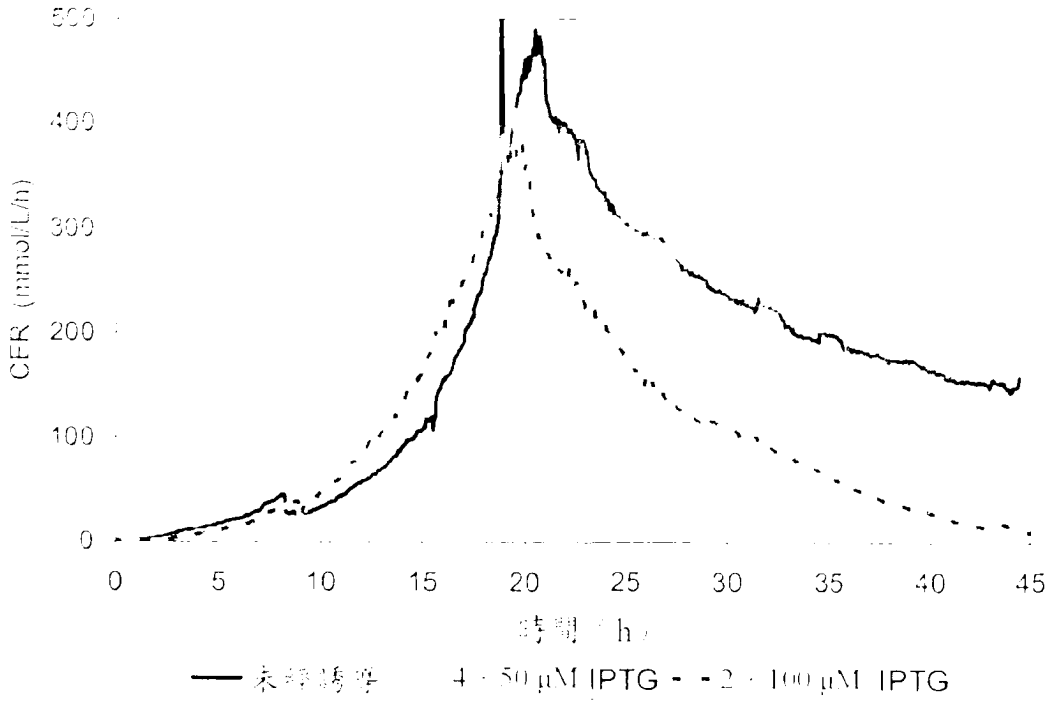

500
400
300
200
100
0
CER (mmol/L/h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
時間（h）
4：50 μM IPTG
2：100 μM IPTG

圖148

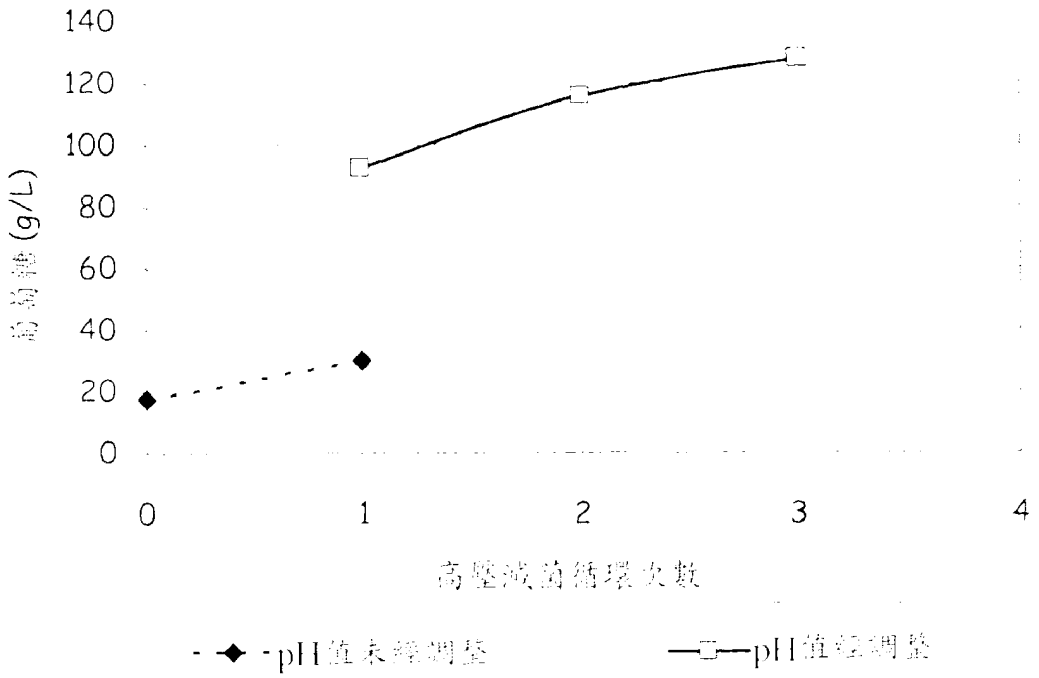


圖149

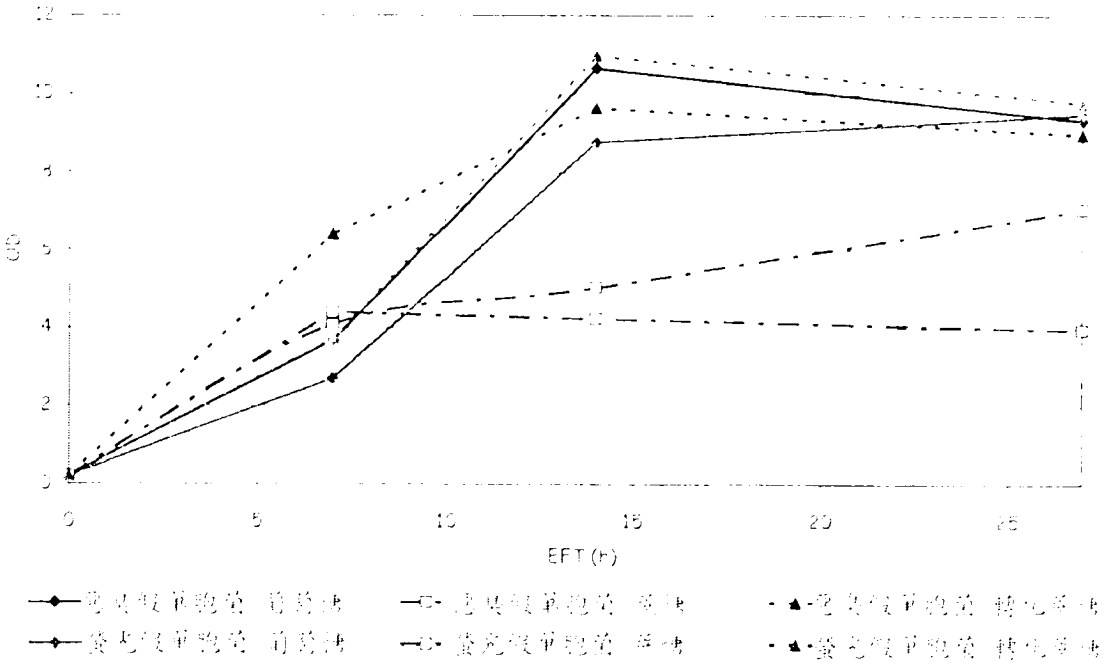


圖150

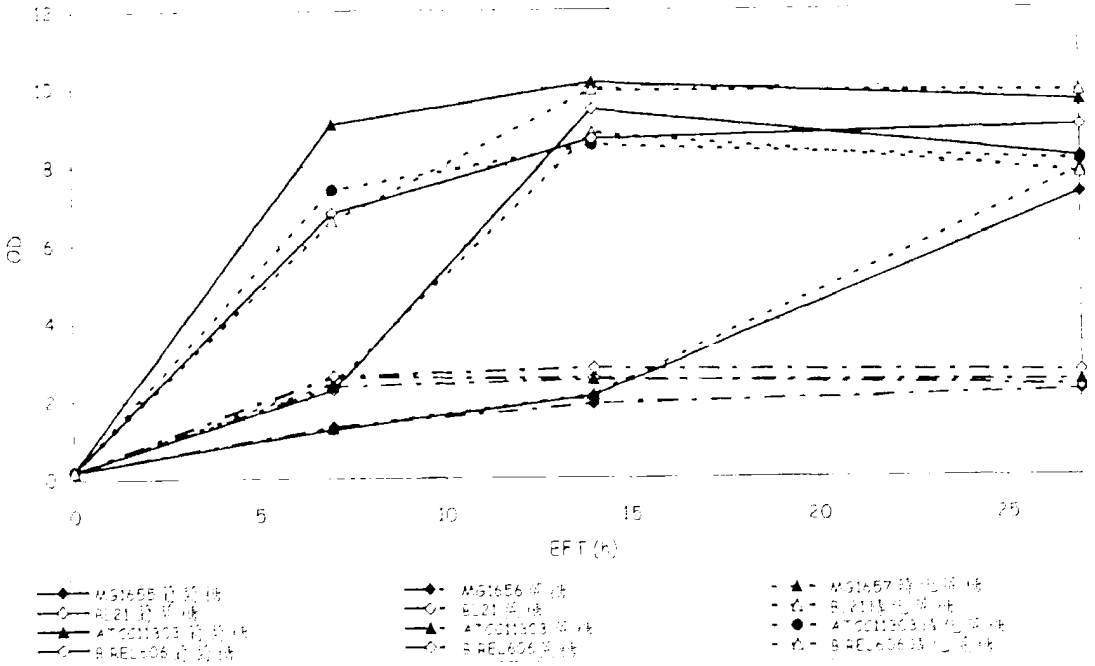


圖151

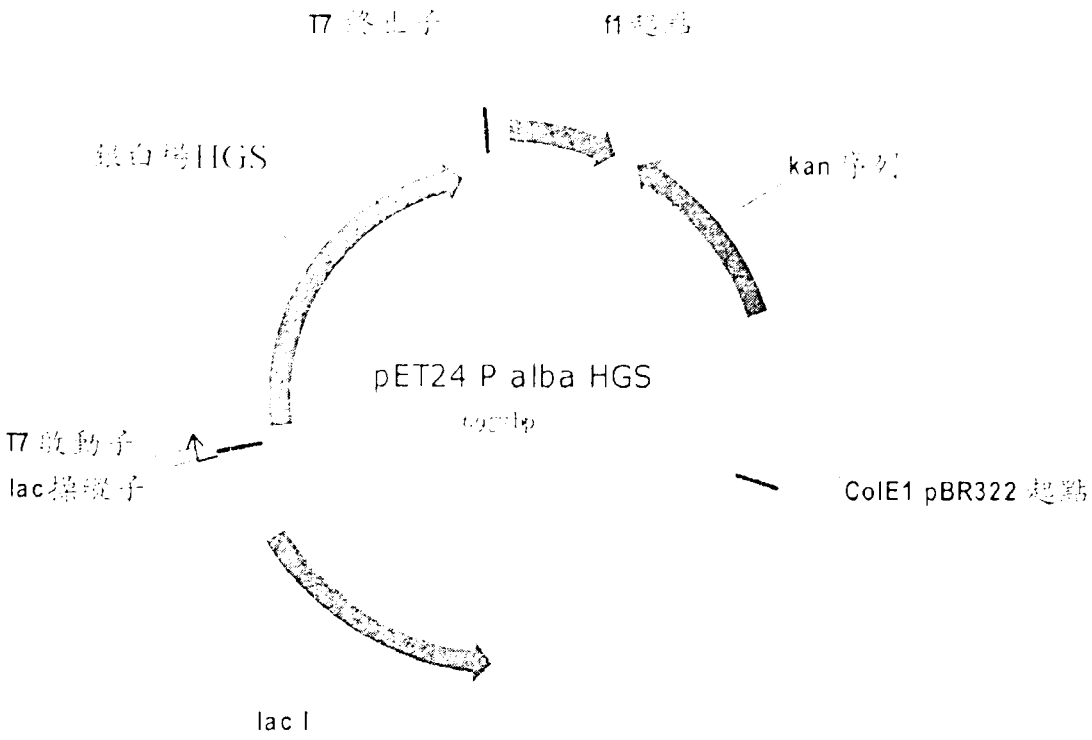

T7 終止子
f1 起點
kan 抗性
pET24 P alba HGS
T7 啟動子
lac操縱子
ColE1 pBR322 起點
lac I

圖152

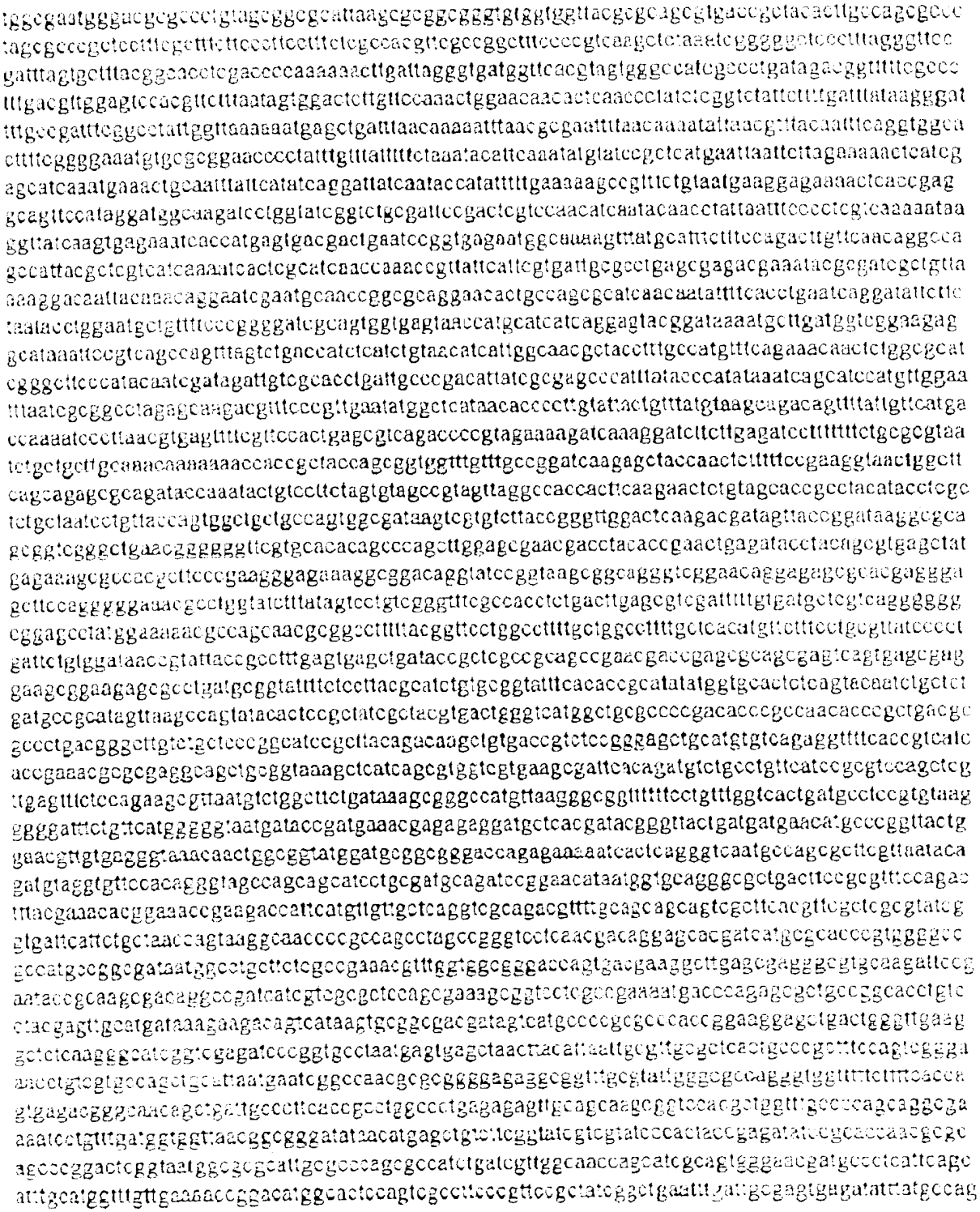


圖153A

ccagccagacgcagacgcgccgagacagaacttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgacccagatgctccac
gcccagtcgcgtaccgtcttcatgggagaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgc
aggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgc
cgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaa
tttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcggttgg
gaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggtct
gataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgc
cataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagta
ggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgcca
ccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagca
accgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcacta
tagggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatatgcgttgtagcgtgtccaccg
aaaatgtgtctttcaccgaaactgaaaccgaagctcgttcttgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccga
cacggacgagtccatcgaagtatacaaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtgcgcgagattaataacgaaaaagcagaat
ttctgaccctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggcctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtggtgcgctggatcgcttcgt
ttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagactccctgcacggtacggcactgtctttccgtctgctgcgtcaacacggttttgaggtttctc
aggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaacttcctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacgagg
ccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaaggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatc
ggtaaagagctggcagaacaggtgaaccatgcactggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgag
gcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatct
gcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcacttttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccg
tgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcaaaaatgttttcttttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtat
acggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggattacatgaaact
gtgctttctggctctgtataacactattaacgaaatcgcctacgacaacctgaaagataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagc
ctgggctgacctgtgcaacgctttcctgcaagaagccaagtggctgtacaacaaatctactccgaccttttgacgactacttcggcaacgcatg
gaaatcctcttctggcccgctgcaactggtgttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaata
ccatgacaccatctctgtccttcccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaat
agcgtttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatg
aacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataa
cggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaaccgattctgccgtttgaagctaaggat
ccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaa
ggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaag
gaggaactatatccggat (SEQ ID NO:43)

圖153B

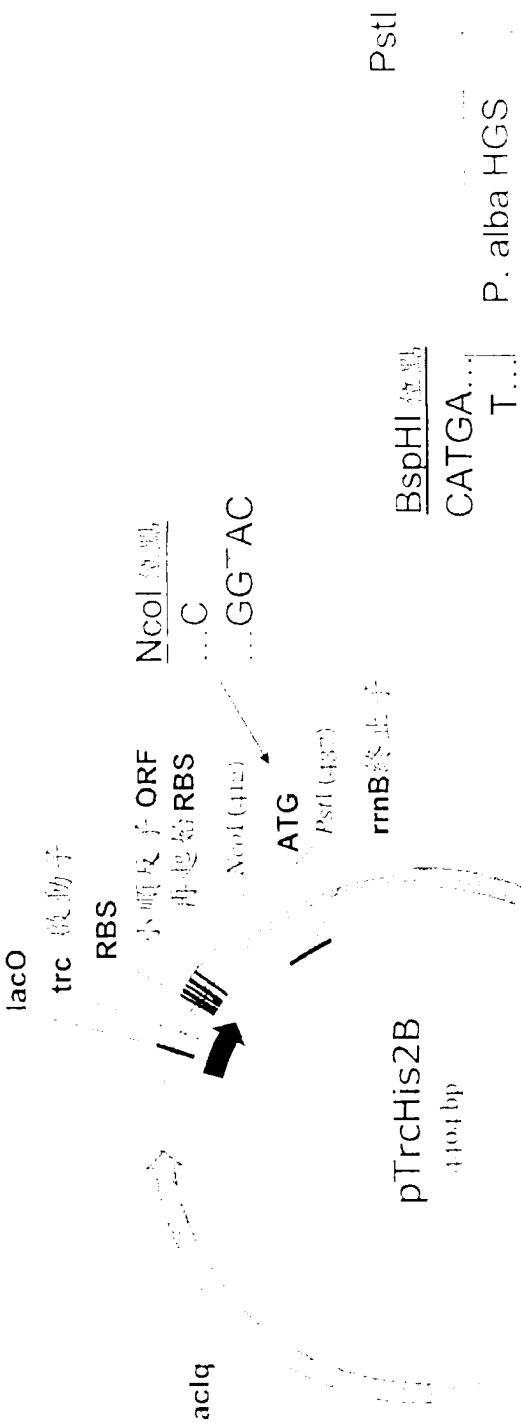

PstI
P. alba HGS
BspHI
CATGA...
T...
NcoI
...C
...GG TAC
ATG
rrnB
lacO
trc
RBS
pTrcHis2B
4104 bp
lacIq
pBR322 ori

圖154

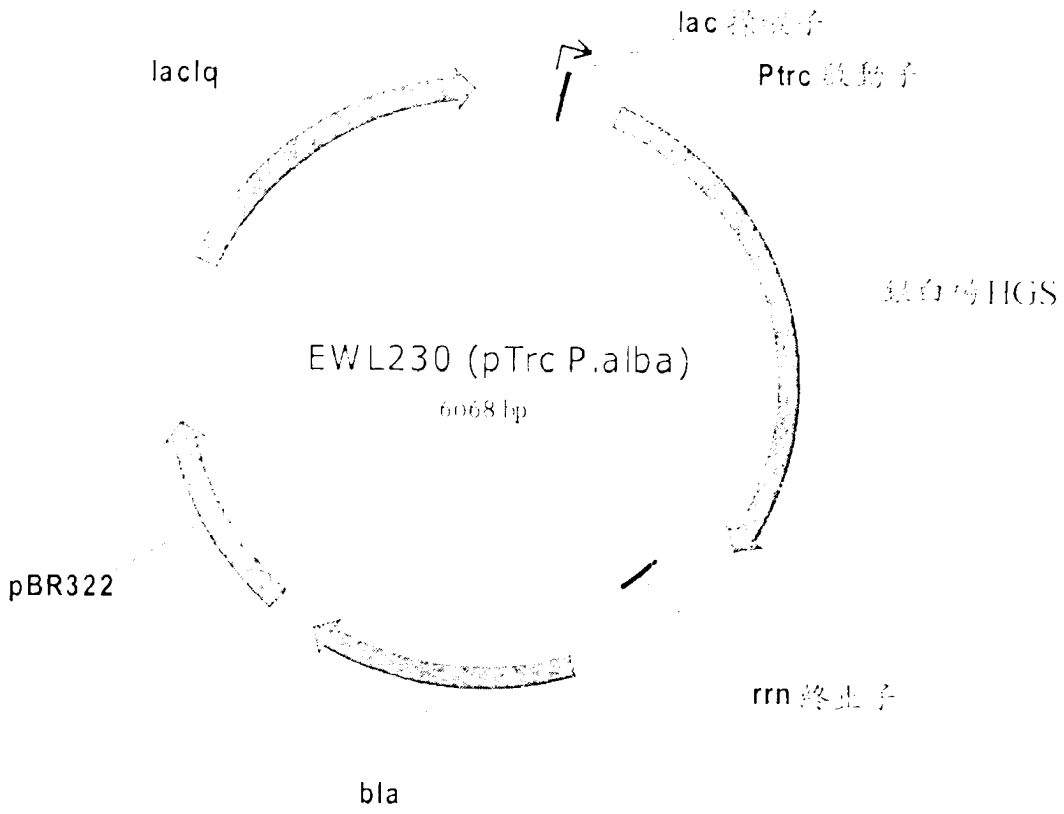


圖155

1-

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaat
cactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgag
ctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcg
aagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttatttaaaaaattaaagaggtatat
attaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgagatgttagcgtgtccacgaaaatgtgtcttcaccgtaaactgaaaccgaagctcg
tcgttctgcgaactacgaaactaacagctgggactatgattacctgctgcctccgacacggacgagtccatcgaagtatcaaagacaaag
cgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgaccctgctggaactgattgacaacgtccagcg
cctgggcctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtggtgcgctggatcgcttcgtttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagacttcc
ctgcacggtacggcactgtctttccgtctgctgcgtcaacacggtttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggc
aacttcctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctgg
acgaggcgaaggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagctggcagaacaggtgaaccatgcact
ggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctg
ctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctg
gcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccg
taactccgtcgcaaaaatgttttcttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgc
agttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataacactattaacgaaatcgcc
tacgacaacctgaaagataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgacctgtgcaacgctttcctgcaagaagcca
agtggctgtacaacgaaatctactccgaccttgacgactacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggcccgctgcaactggtgttcgctta
cttcgctgtcgtgcaggaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaatacccatgacaccatctctcgtccttcccatatcttccgtctg
tgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaacccgcaaatagcgttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaa
gaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaa
ccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccc
gcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaaccgattctgccgtttgaacgctaactgcagctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaac
aaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcgg
gatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggt
ggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaact
gccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaa
atccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaat
taagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaga
caataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcatttg
ccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctc
aacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccg
tgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttac
ggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggga
ccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaa
cgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaac
aattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggag
ccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtca
ggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatata
ctttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgtt
ccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccca
ccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatact
gtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgc

圖156A

tgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttc
gtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaag
ggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtat
ctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagca
acgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcct
ttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggt
attttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacact
ccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggca
tccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatca
attcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaa
gagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtg
gtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggc
acaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgatt
aaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaa
tcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccg
gcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgc
attgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcg
caatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatc
gttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggat
atctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggca
aaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaac
caccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagc
gggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg (SEQ ID NO:44)

圖156B

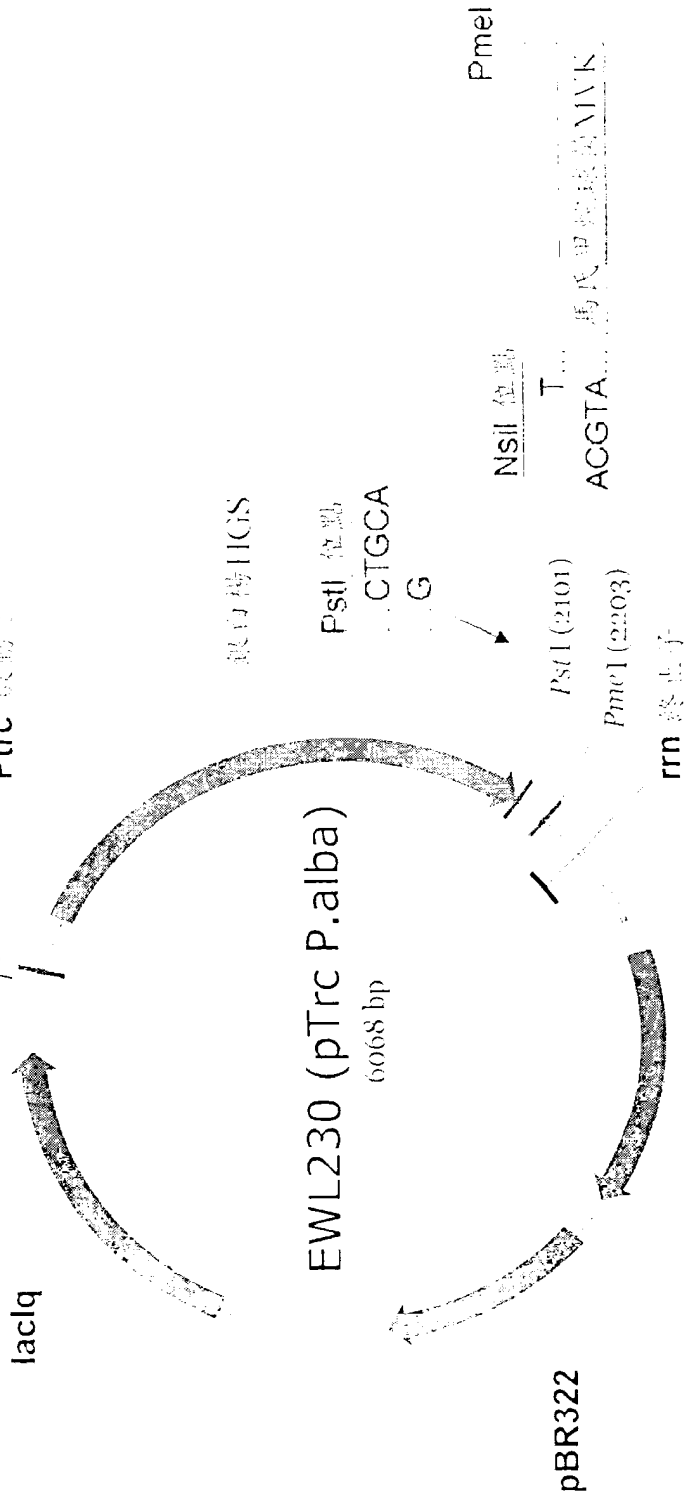

EWL230 (pTrc P.alba)
6068 bp
lac
Ptrc
RBS
PstI
CTGCA
G
NsiI
T...
ACGTA...
PmeI
PstI (2101)
PmeI (2203)
rrn
bla
pBR322
laclq

圖157

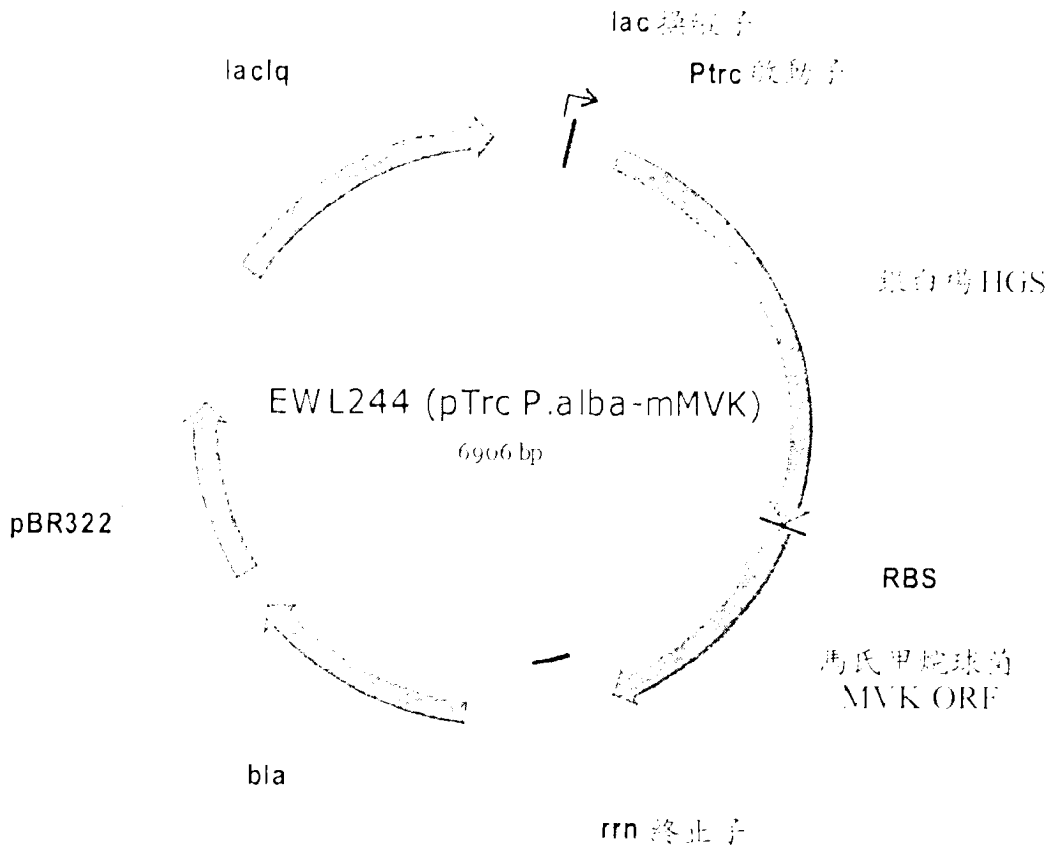

lac 啟動子
laclq
Ptrc 啟動子
EWL244 (pTrc P.alba-mMVK)
6966 bp
RBS
MVK ORF
pBR322
bla
rrn 終止子

圖158

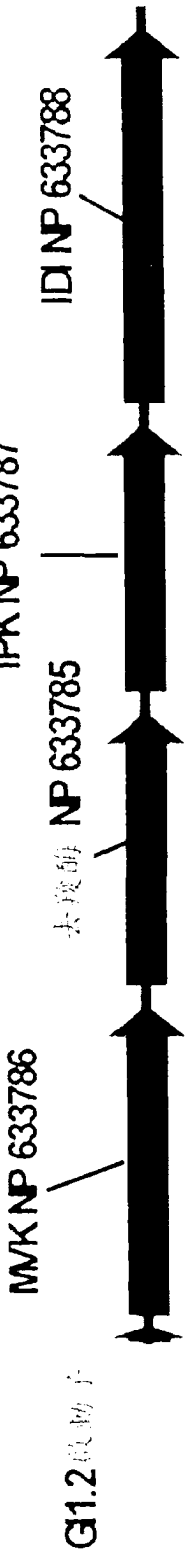
1.

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaat
cactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgag
ctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcg
aagcggcactgcttttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttatttattaaaaattaaagaggtatat
attaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgagatgtagcgtgtccaccgaaaatgtgtcttttcaccgaaactgaaaccgaagctcg
tcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtccatcgaagtatacaaagacaaag
cgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgaccctgctggaactgattgacaacgtccagcg
cctgggcctgggttaccgttttgagtctgatatccgtggtgcgctggatcgcttcgtttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagacttcc
ctgcacggtacggcactgtctttccgtctgctgcgtcaacacggttttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggc
aacttcctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctgg
acgaggcgaaggtttttcgcaatctctatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagctggcagaacaggtgaaccatgcact
ggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctg
ctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctg
gcgaccaaactgcacttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccgtgggtgtagcattcgaacgcaatactccgactgccg
taactccgtcgcaaaaatgttttctttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagcgtttactgatgc
agttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataacactattaacgaaatcgcc
tacgacaacctgaaagataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgaccgtgcaacgctttcctgcaagaagccaa
agtggctgtacaacaaatctactccgaccttgacgactacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggcccgctgcaactggtgttcgctta
cttcgctgtcgtgcaggaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaatacccatgacaccatctctcgtccttcccatatcttccgtctg
tgcaatgaccgtggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcgttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaa
gaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaagcaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaa
ccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccc
gcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaaccgattctgccgtttgaacgctaactgcataaaggaggtaaaaaaacatggtatcctgttctgcg
ccgggtaagatttacctgttcggtgaacacgccgtagtttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaactgcgtaccccgtgttcgcgcg
gaactcaatgactctatcactattcagagccagatcggccgcaccggtctggatttcgaaaagcaccctatgtgtctgcggtaattgagaaa
atgcgcaaatctatttctattaacggtgtttttcttgaccgtcgatttccgacatcccggtgggctccggtctgggtagcagcgcagccgttactat
cgcgtctattggtgcgctgaacgagctgttcggctttggcctcagcctgcaagaaatcgctaaactgggccacgaaatcgaaattttaagtac
agggtgccgcgtcccccaaccgatacgtatgtttctaccttcgggcgcgtggttaccatcccggaacgtcgcaaactgaaaactccggactg
cggcattgtgattggcgataccggcgttttctcctccaccaaagagttagtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccccggatttgat
cgaaccgctgatgacctctattggcaaaatctctcgtatcggcgaacaactggttctgtctggcgactacgcatccatcggccgcctgatgaa
cgtcaaccagggtctcctggacgccctgggcgttaacatcttagaactgagccagctgatctatttccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcg
ctaaaatcacgggcgctggcggcggtggctgtatggttgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggc
gctggcggtaaagtgactatcactaaaccgaccgagcaaggtctgaaagtagattaaagtctagttaaagtttaaacggtctccagcttggct
gttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagt
agcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagt
agggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttttgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgag
taggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccagg
catcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccg
ctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttg
cggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcga
actggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcg
gtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaa
aagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacg

圖159A

atcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaag
ccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagct
tcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgat
aaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgac
ggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttt
actcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgt
gagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaaaca
aaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagat
accaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttac
cagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaa
cggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccac
gcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaa
acgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaa
aacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataacc
gtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcg
cctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaag
ccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgt
ctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcga
ggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcgggtatggcatga
tagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagac
cgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcc
caaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaatt
gtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcg
gcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctg
cactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtgg
agcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcata
aatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctg
aatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgc
gttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggatttcgc
ctgctgggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtg
aaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccc
gactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg SEQ ID NO:44

圖159B



3913bp

圖160A

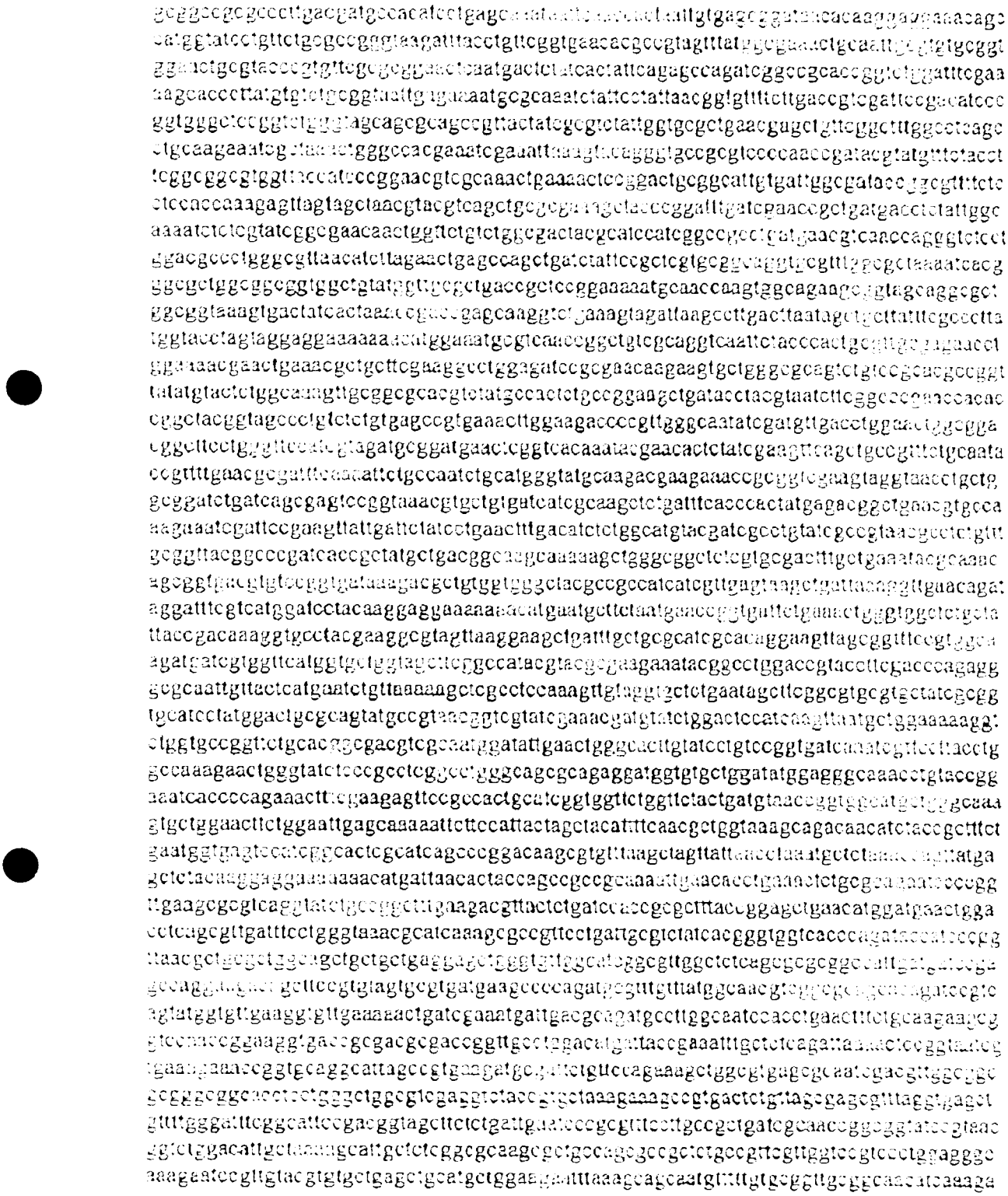
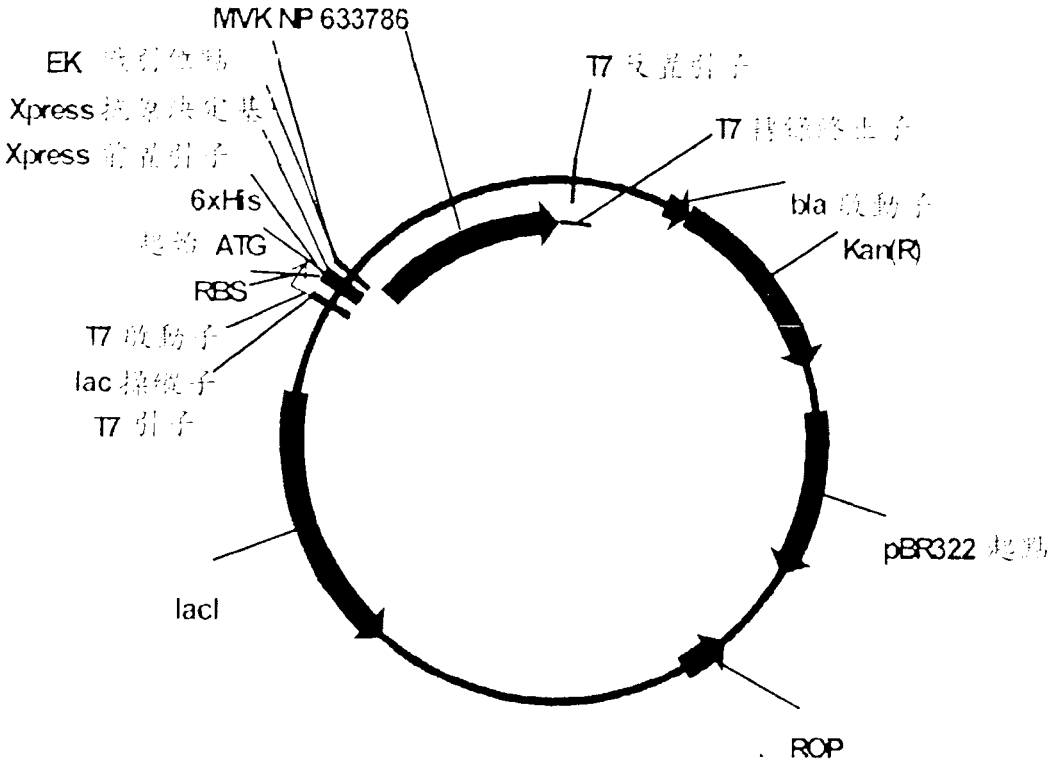


圖160B

cctgcacaactctccagtagtggtaactggttggacccgcgaataccttggagcagcgcggttttaacgttaaggacctctcccctg
ccgggcaacgctctgtaagcttcaacgcgtctacaaataaaaaaggcacgtcagatgacgtgccttttttcttgtctaga
(SEQ ID NO:46)

圖160C



MCM376-來自pET200D中
馬氏甲烷球菌甘生下游途徑之MVK
(6xHis)

圖161A

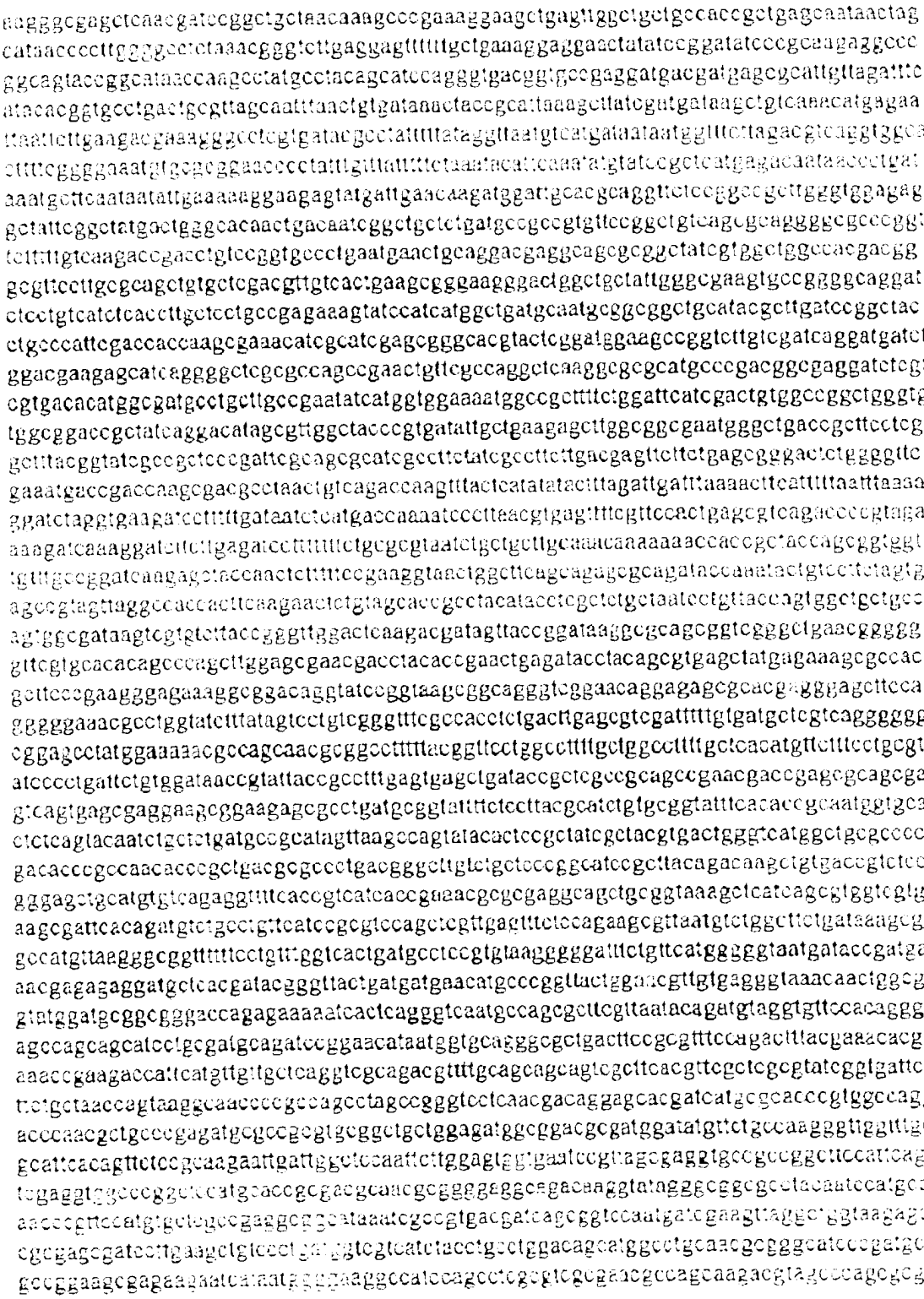
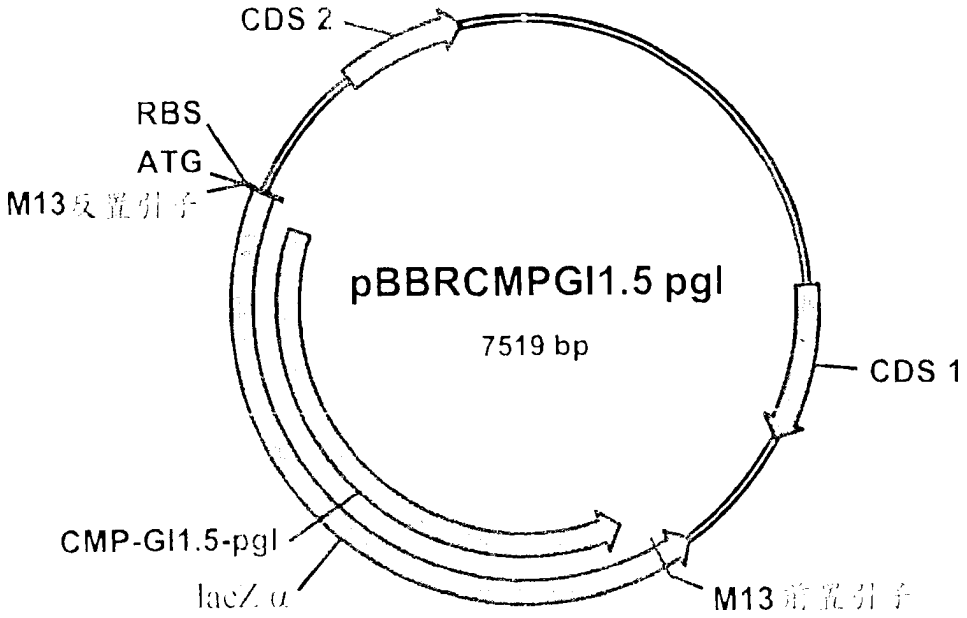


圖161B

cggccgccatgccggcgataatggcctgcttctcgccgaaacgtttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcgagggc
gtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctccagcgaaagcggtcctcgccgaaaatgacccag
agcgctgccggcaccttgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagtcatgccccgcgccca
ccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgagatcccggtgcctaatgagtgagctaacttacattaatt
gcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggc
ggtttgcgtattgggcgccagggtggtttttctttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgcctggccctga
gagagttgcagcaagcggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggatataacat
gagctgtcttcggtatcgtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcg
cccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccgg
acatggcactccagtcgccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcaga
cgcgccgagacagaacttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcg
cgtaccgtcttcatgggagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcag
gcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgc
accgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaa
tcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccag
ttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggc
ctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcacca
ccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctct
ccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatg
caaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccga
agtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggc
cacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataac
aatttcccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatatgcggggttctcatcatcatcatcatggtatggcta
gcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatcatcctttcaccatggtatcctgttctgc
gccgggtaagatttacctgttcggtgaacacgccgtagtttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaactgcgtacccgt
gttcgcgcggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcggccgcaccggtctggatttcgaaaagcaccctatgtgtc
tgcggtaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacggtgttttcttgaccgtcgattccgacatcccggtgggctccggtctg
ggtagcagcgcagccgttactatcgcgtctattggtgcgctgaacgagctgttcggcttggcctcagcctgcaagaaatcgcta
aactgggccacgaaatcgaaattaaagtacagggtgccgcgtcccaaccgatacgtatgtttctaccttcggcggcgtggttac
catcccggaacgtcgcaaactgaaaactccggactgcggcattgtgattggcgataccggcgttttctcctccaccaaagagtta
gtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagctacccggatttgatcgaaccgctgatgaccctctattggcaaaatctctcgtatcgg
cgaacaactggttctgtctggcgactacgcatccatcggccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctgggcgt
taacatcttagaactgagccagctgatctatccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacgggcgctggcggcggt
ggctgtatggttgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactat
cactaaaccgaccgagcaaggtctgaaagtagattaa

圖161C



CDS 2: 壯大黴素抗性基因;　　CDS: 1 大腸桿菌複製蛋白

圖162

圖163A

ccggtgagatattggcggaatggcaaccgtccagccccctcgaccacatcgacgacgcccactggcaggccatcttccagacgcgttacgc
tcacgttacccgcattgtaagaacctacaaagacaaaactgccccctggtgatcggtggaaatatgcgtcggactacccggcagcgcagactc
tgcggcaaaggtcagtgcgccatcgtccgggggcgatacgatacgccaggacgcgaaactcagggcgaacaccaacatagagataacgt
ttgtccgggctgaccaccatcggctgcacctgccccggcacatcgacaacctgtgtcagcgtcagtgcgccttcatgattcagattccagac
gtgaatttgctggctctcagggctggcgatataaactgtttgcttcatgaatgctccttgggttacctccgggaaacgcggttgatttgtttagtg
gttgaattatttgctcaggatgtggcatagtcaagggcgtgacggctcgctaatacaactcactatagggctcgaggaagttcctatactttcta
gagaataggaacttccgcgccgcacacaaaaaccaacacacagatcatgaaaataaagctcttttattggtaccgaattcgccagggagct
ctcagacgtcgcttggtcggtctttattcgaaccccagagtcccgcttacgccccgccctgccactcatcgcagtactgttgtaattcattaagc
attctgccgacatggaagccatcacaaacggcatgatgaacctgaatcgccagcggcatcagcaccttgtcgccttgcgtataatatttgccc
atggtgaaaacgggggcgaagaagttgtccatattggccacgtttaaatcaaaactggtgaaactcacccagggattggctgagacgaaaa
acatattctcaataaaccctttagggaaataggccaggttttcaccgtaacacgccacatcttgcgaatatatgtgtagaaactgccggaaatc
gtcgtggtattcactccagagcgatgaaaacgtttcagtttgctcatggaaaacggtgtaacaagggtgaacactatcccatatcaccagctc
accgtctttcattgccatacggaattccggatgagcattcatcaggcgggcaagaatgtgaataaaggccggataaaacttgtgcttatttttct
ttacggtctttaaaaaggccgtaatatccagctgaacggtctggttataggtacattgagcaactgactgaaatgcctcaaaatgttctttacgat
gccattgggatatatcaacggtggtatatccagtgatttttttctccatggtttagttcctcaccttgtcgtattatactatgccgatatactatgccg
atgattaattgtcaacacgtgctgctgcaggtcgaaaggcccggagatgaggaagaggagaacagcgcggcagacgtgcgctttgaag
cgtgcagaatgccgggcctccggaggaccttcgggcgcccgccccgcccctgagcccgcccctgagcccgcccccggaccccacccctt
cccagcctctgagcccagaaagcgaaggagcaaagctgctattggccgctgccccaaaggcctacccgcttccattgctcagcggtgctg
tccatctgcacgagactagtgagacgtgctacttccattgttcacgtcctgcacgacgcggagctgcgggggcgggggggaacttcctgacta
ggggaggagtggaaggtggcgcgaaggggccaccaaagaacggagccggttggcgcctacccggtggatgtggaatgtgtgcgaggcc
agaggccacttgtgtagcgccaagtgcccagcgggggctgctaaagcgcatgctccagactgccttgggaaaagcgcctcccctacccg
gtagaatgaagttcctatactttctagagaataggaacttcgcggccgcccttagtgagggttaattcaactgactgtaacagctaaaattagt
cgctttggcggtaagggcgaattccagcacactggcggccgttactagtggatccgagctcggtaccaagcttgatgcaggaattcgatat
caagcttatcgataccgtcgacctcgagggggggcccggtacccagcttttgttcccttagtgagggttaattgcgcgcttggcgtaatcatg
gtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaa
tgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaac
gcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatca
gctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagg
aaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcg
aaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacc
tgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgg
gctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcg
ccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggct
acactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaacc
accgctggtagcggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtc
tgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaa
gttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatt
tcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgc
gagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccg
cctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggca
tcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaa
aagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctct
tactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctc
ttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactct
caaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctg
ggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaata
ttattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttc
cccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcg
cgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaag
cccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatat
gcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctacgctcggtc
gttcgactgcggcgagcggaaatggcttacgaacggggcggagatttcctggaagatgccaggaagatacttaacagggaagtgagaggc
cacgcgaggcccttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgta
agcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagca
gattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcagg
ctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagt
tgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccc
cgggtaccgagctcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcac
atccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcc
tgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaa
gccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtct
ccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcg
attcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataaagcgggccatgtaa
gcccactgcaagctacctgctttctctttgcgcttgcgttttcccttgtccagatagcccagtagctgacattcatccggggtcagcaccgt
ttctgcggactggctttctacgtgttccgcttcctttagcagcccttgcgccctgagtgcttgcggcagcgtgaagctagcttcgtgaggct
ccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggggggaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaa
agggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagg
gcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcgcgccattcgcca
ttcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgat
taagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagagga
tccccgaaaggt (SEQ ID NO:48)

圖163B

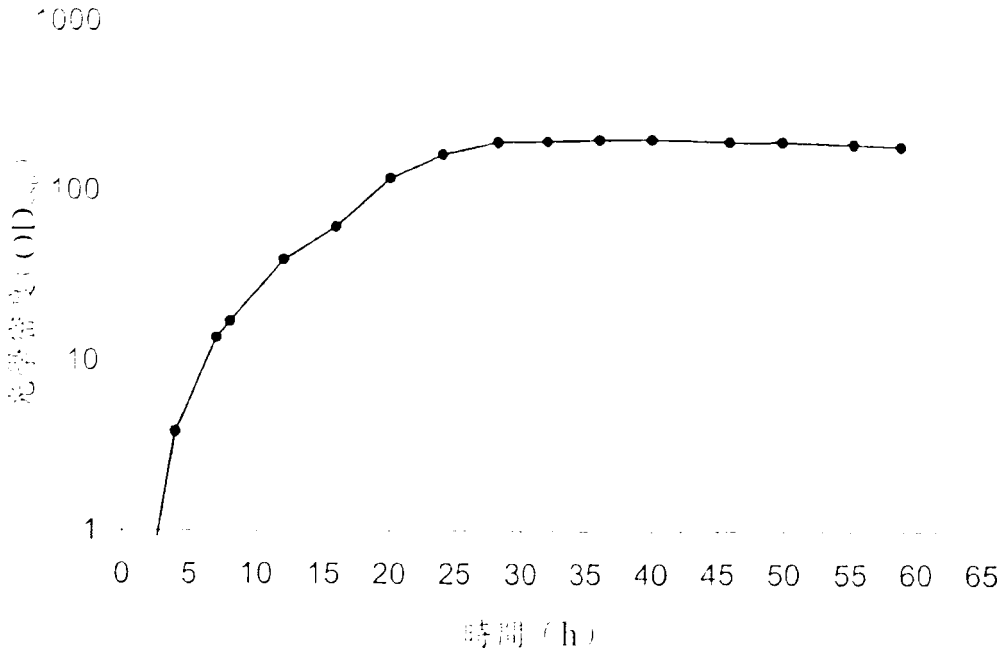


圖164A

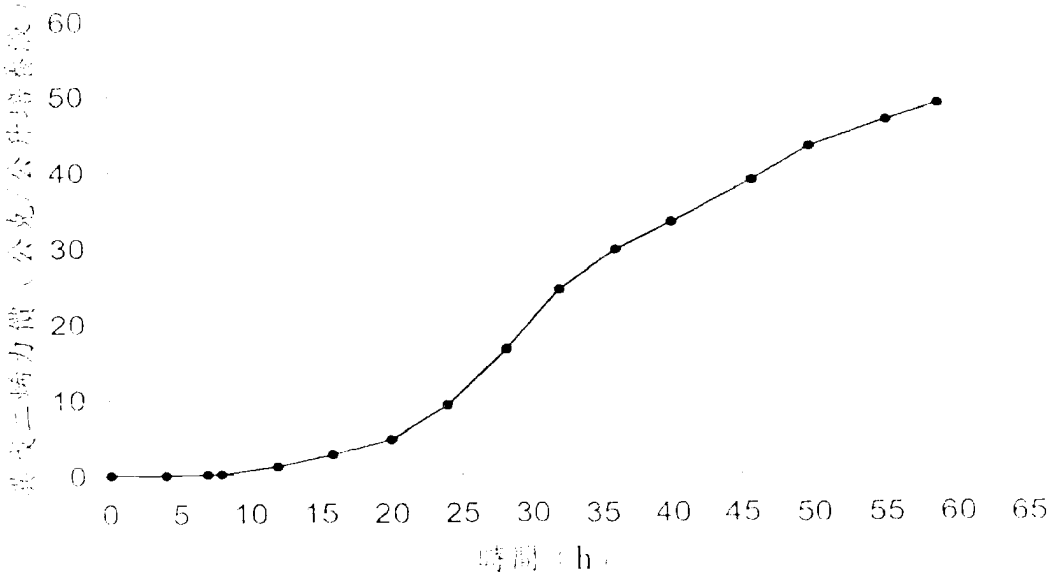


圖164B

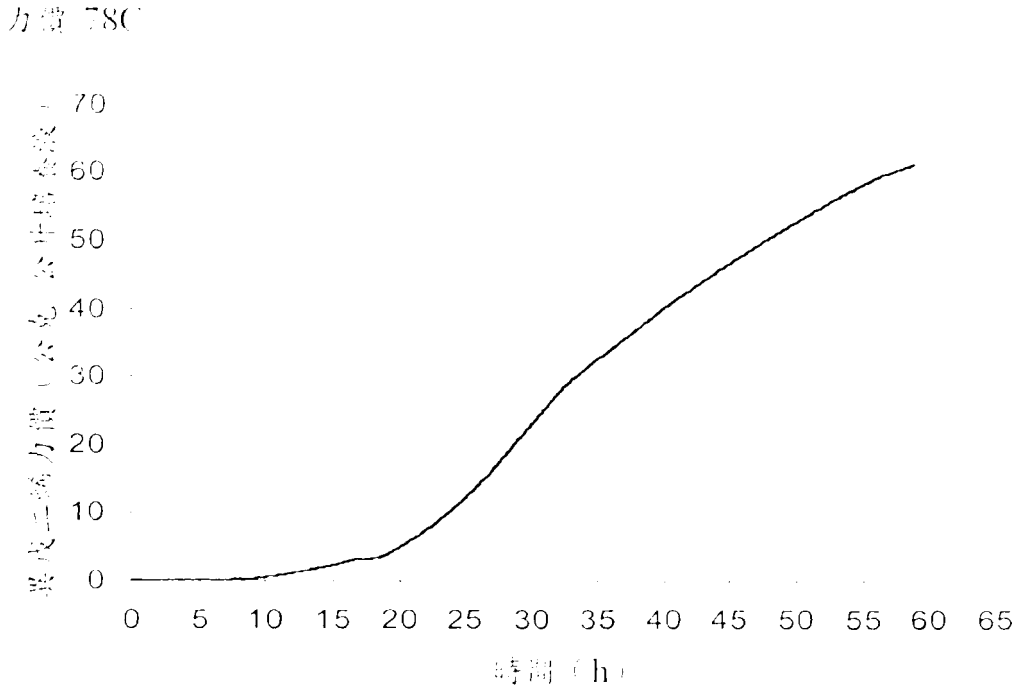


圖164C

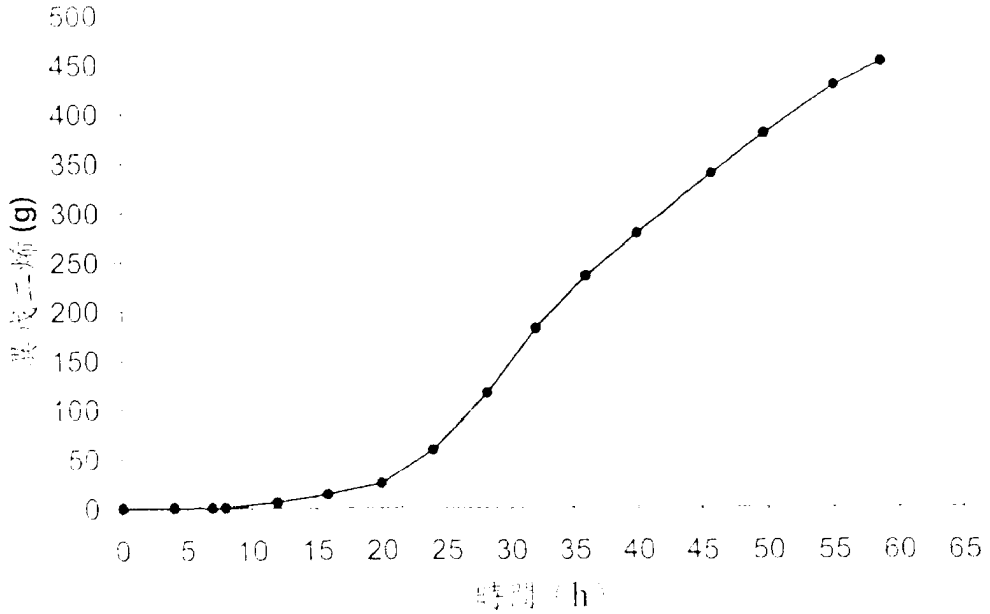

500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
(g)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
時間 (h)

圖164D

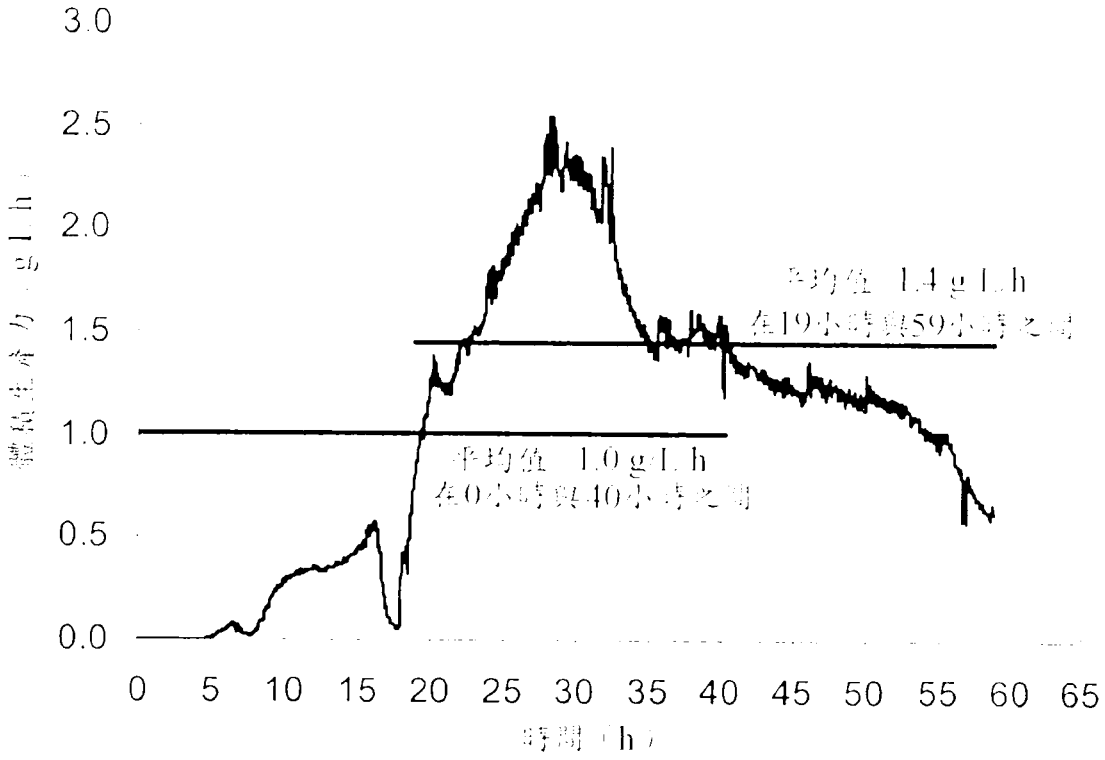

3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
平均值 1.4 g/L/h
在19小時與59小時之間
平均值 1.0 g/L/h
在0小時與40小時之間

圖164E

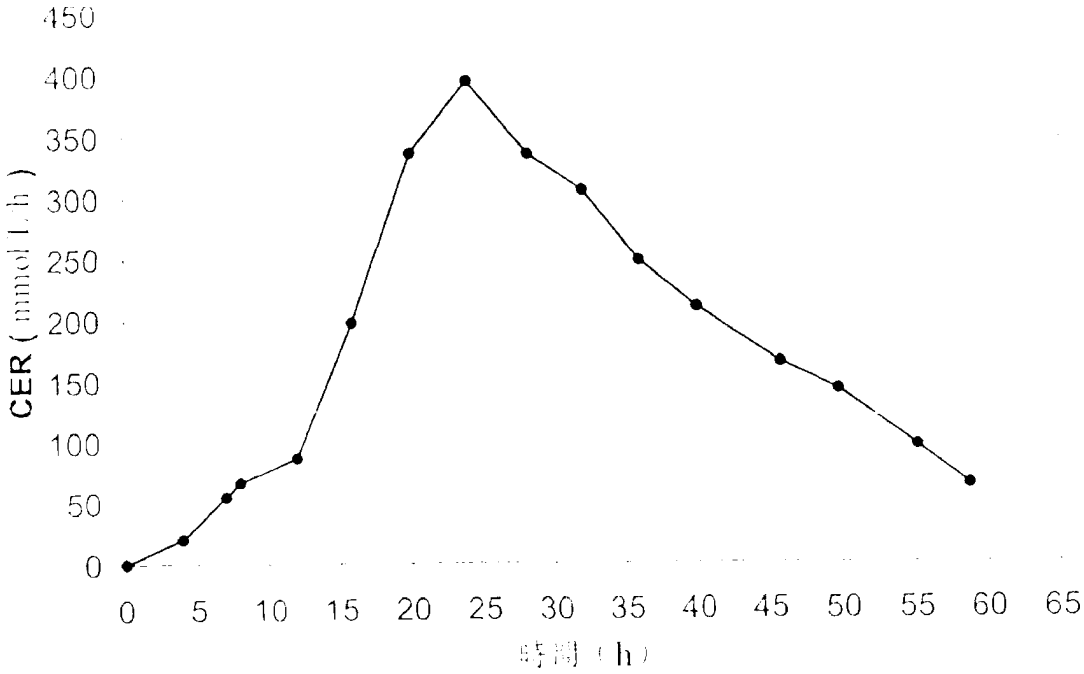

450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
CER (mmol / L / h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
時間（h）

圖164F

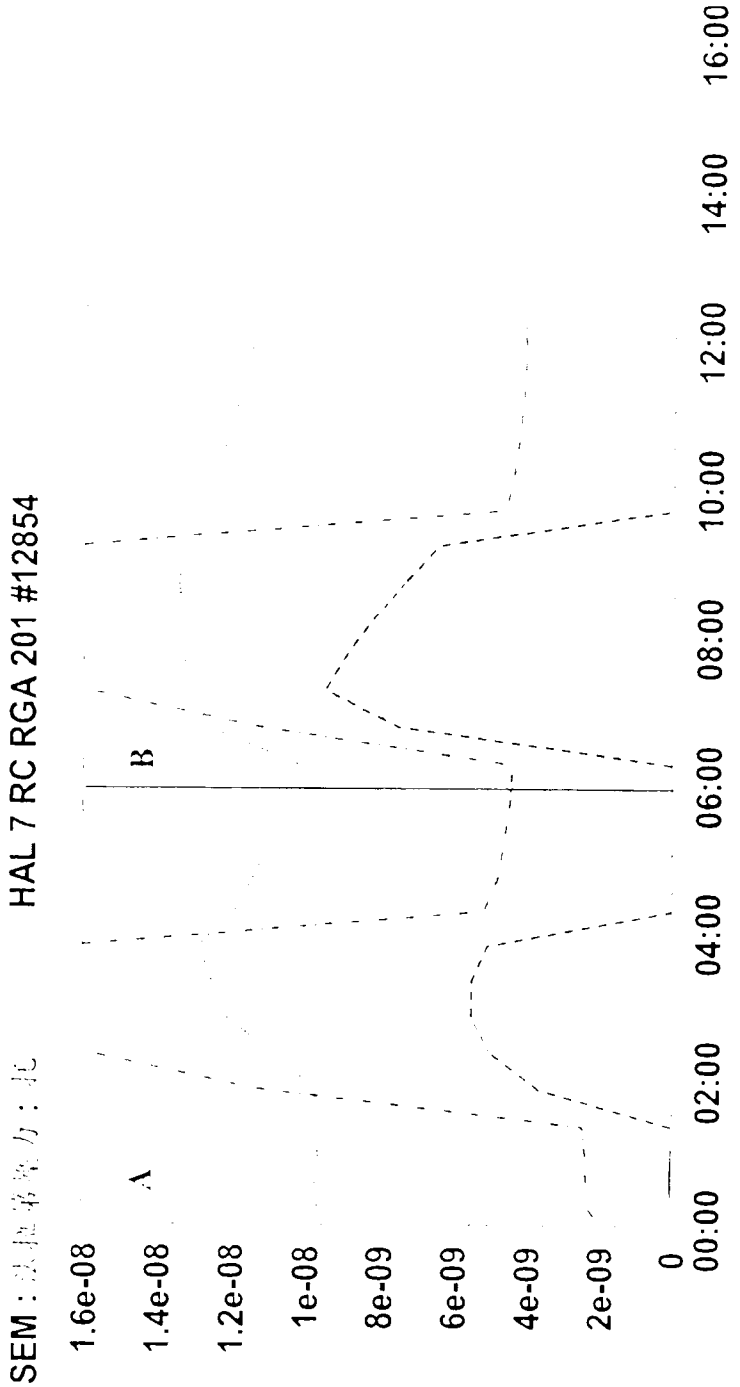

SEM：法拉第筒力：北
HAL 7 RC RGA 201 #12854
1.6e-08
1.4e-08
1.2e-08
1e-08
8e-09
6e-09
4e-09
2e-09
0
A
B
00:00
02:00
04:00
06:00
08:00
10:00
12:00
14:00
16:00
時間 mm:ss
CO2

圖165A-B

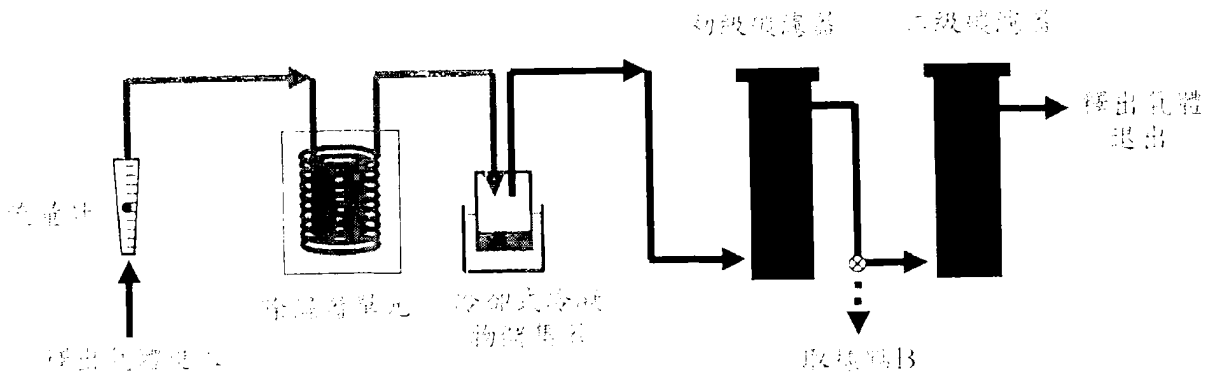


圖166A

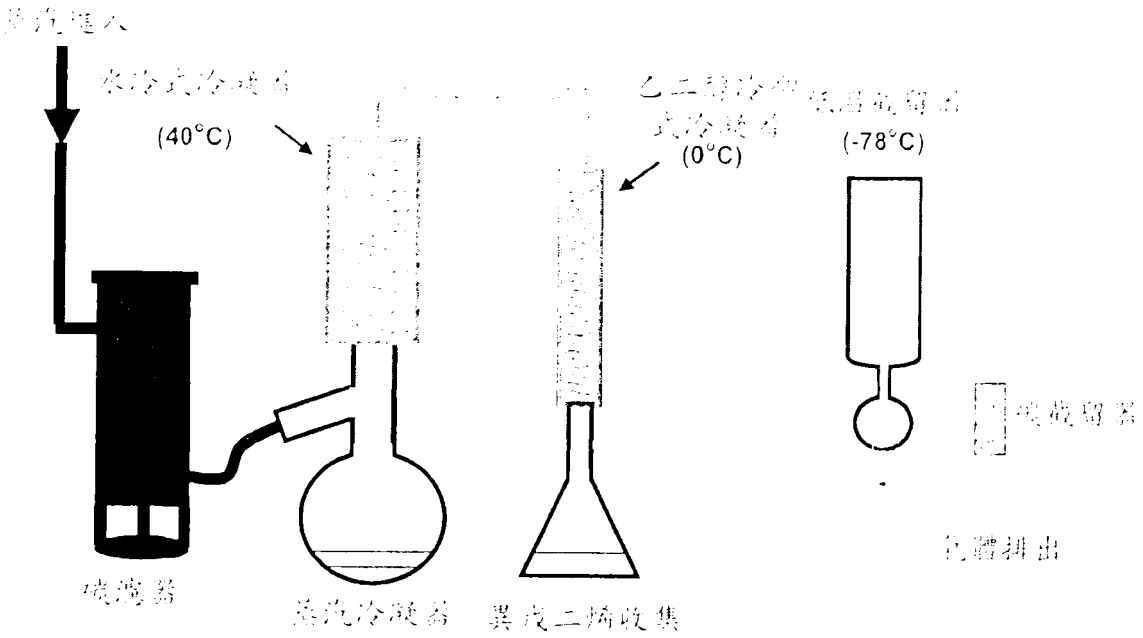


圖166B

圖167

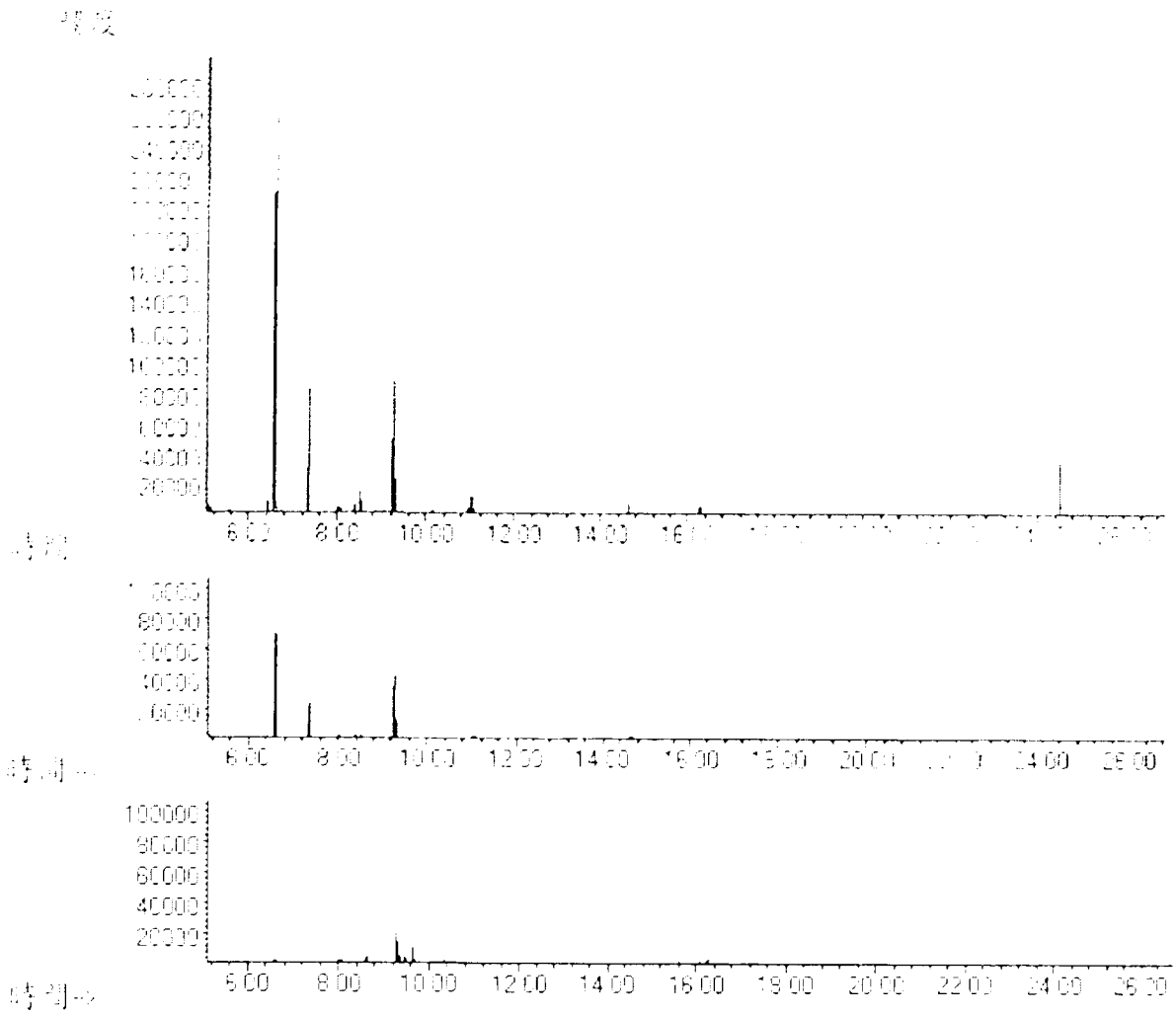


圖168A-C

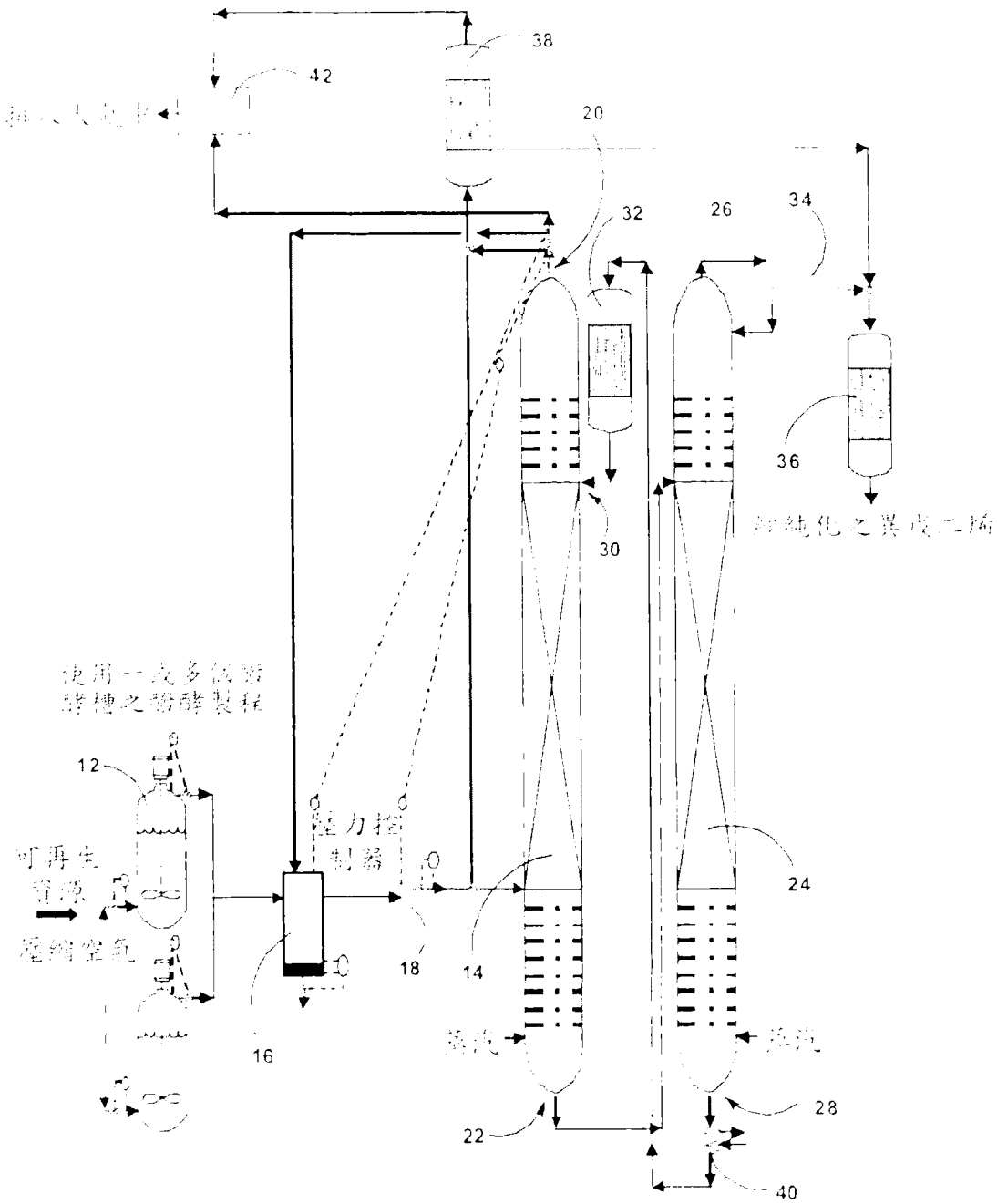


圖169

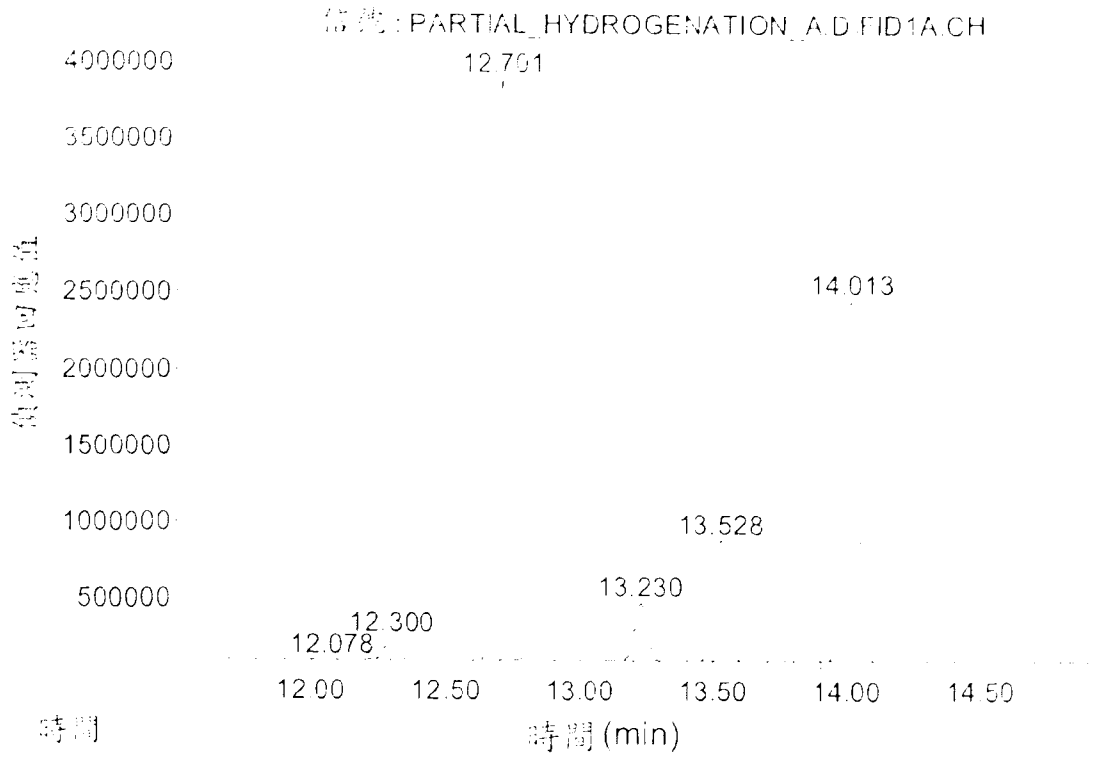

檔案 : PARTIAL_HYDROGENATION_A D FID1A.CH
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
偵測器回應值
12.701
14.013
13.528
13.230
12.300
12.078
12.00
12.50
13.00
13.50
14.00
14.50
時間
時間 (min)

圖170

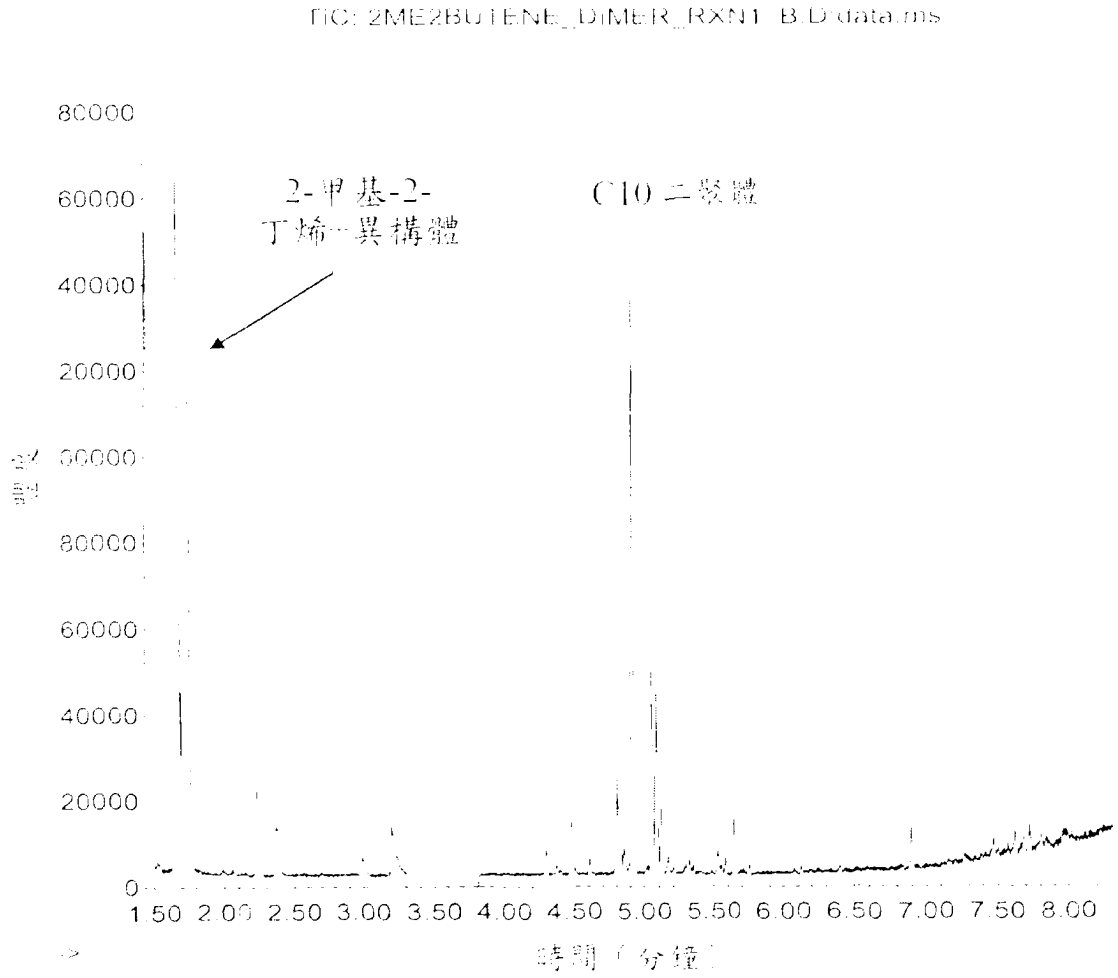

TIC: 2ME2BUTENE_DIMER_RXN1_B.D\data.ms
80000
60000
40000
20000
80000
60000
40000
20000
0
2-甲基-2-
丁烯一異構體
C10二聚體
1.50 2.00 2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00
時間（分鐘）

圖171

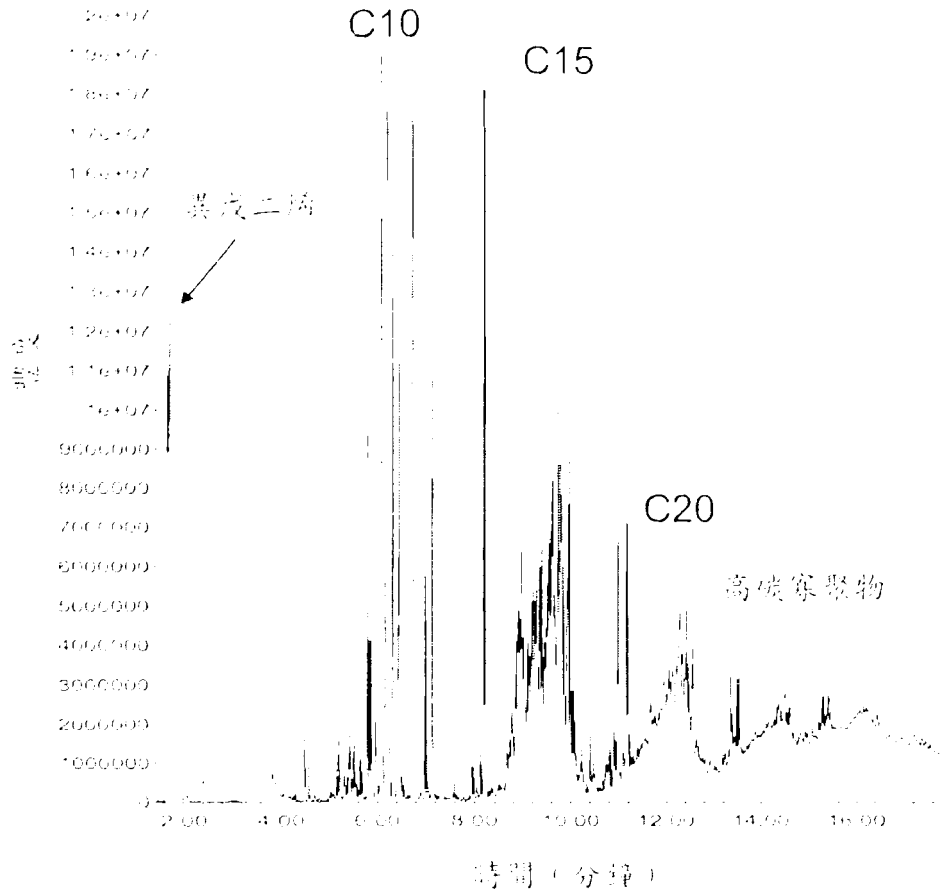


圖172

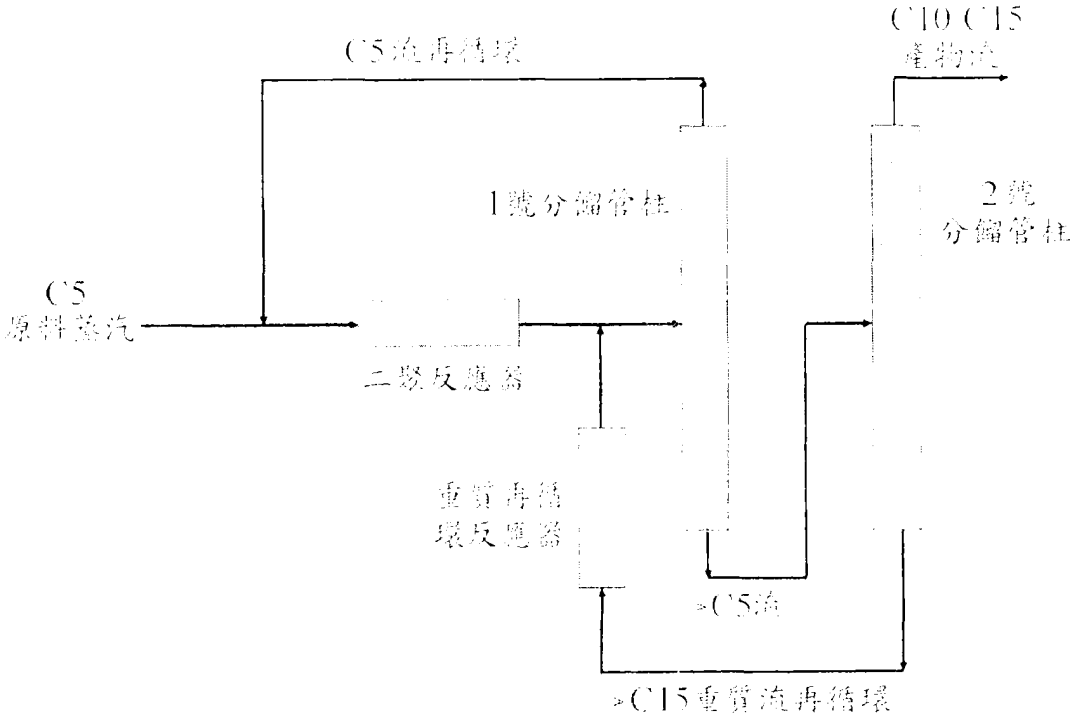

C10 C15
產物流
C5流再循環
1號分餾管柱
2號
分餾管柱
C5
原料蒸汽
二聚反應器
重質再循
環反應器
>C5流
>C15重質流再循環

圖173

P1-2

102年12月10日修正替換頁

發明專利說明書

公告本

中文說明書替換頁(102年12月)

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：099119620

※ 申請日：99.06.15　　※IPC 分類：C10G 50/00 (2006.01)
C07C 2/46 (2006.01)
C07C 11/18 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

從生物異戊二烯組合物製造燃料成分之方法及系統

METHODS AND SYSTENS FOR PRODUCING FUEL CONSTITUENTS FROM BIOISOPRENE COMPOSITIONS

二、中文發明摘要：

本發明提供使用源自可再生碳之生物異戊二烯製造多種烴燃料及燃料添加劑之方法、組合物及系統。

三、英文發明摘要：

The invention provides for methods, compositions and systems using bioisoprene derived from renewable carbon for production of a variety of hydrocarbon fuels and fuel additives.

七、申請專利範圍：

1. 一種自生物異戊二烯組合物製造燃料成分之方法，其包括使該生物異戊二烯組合物中異戊二烯化學轉化成非異戊二烯化合物，此係如下：

(a)使該生物異戊二烯組合物接受適於異戊二烯二聚化之熱或催化條件，以製造異戊二烯二聚體，且接著催化性氫化該異戊二烯二聚體，以形成飽和C10燃料成分；或

(b)(i)部分地氫化該生物異戊二烯組合物，以製造異戊烯，(ii)使該異戊烯與選自由異戊烯、丙烯及異丁烯組成之群的單烯烴二聚化，形成二聚烯(dimate)，及(iii)完全氫化該二聚烯，製造燃料成分；

其中該生物異戊二烯組合物係以生物方法製造。

2. 如請求項1之方法，其中該生物異戊二烯組合物中至少約95%之異戊二烯轉化成非異戊二烯化合物。

3. 如請求項1之方法，其中將該生物異戊二烯組合物加熱至約150℃至約250℃，製造不飽和環狀異戊二烯二聚體且催化性氫化該不飽和環狀異戊二烯二聚體，製造飽和環狀異戊二烯二聚體燃料成分。

4. 如請求項1之方法，其中該方法包括：(i)使該生物異戊二烯組合物與催化異戊二烯環二聚化之催化劑接觸，製造不飽和環狀異戊二烯二聚體且催化性氫化該不飽和環狀異戊二烯二聚體，製造飽和環狀異戊二烯二聚體燃料成分。

5. 如請求項4之方法，其中該催化異戊二烯環二聚化之催化劑包含選自由鎳催化劑、鐵催化劑及鉻催化劑組成之群的催化劑。

6. 如請求項1之方法，其中該部分地氫化該生物異戊二烯組合物之步驟包括使該生物異戊二烯組合物與氫氣及催化異戊二烯部分氫化之催化劑接觸。

7. 如請求項6之方法，其中該催化異戊二烯部分氫化之催化劑包含鈀催化劑。

8. 如請求項1之方法，其中該使該異戊烯與單烯烴二聚化之步驟包括在催化單烯烴二聚化之催化劑存在下，使該異戊烯與該單烯烴接觸。

9. 如請求項9之方法，其中該催化單烯烴二聚化之催化劑包含酸催化劑。

10. 如請求項1之方法，其進一步包括在使該生物異戊二烯組合物化學轉化成燃料成分之前，自該生物異戊二烯組合物中純化該異戊二烯。

11. 如請求項1之方法，其中該生物異戊二烯組合物中至少80%之異戊二烯係轉化成非異戊二烯化合物。

12. 如請求項1之方法，其中該生物異戊二烯組合物包含一或多種選自以下所組成之群之化合物：乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物。

13. 如請求項1之方法，其中該生物異戊二烯組合物包含一或多種選自以下所組成之群之化合物：乙醇、丙酮、甲

醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-及反-3-甲基-1,3-戊二烯及C5異戊二烯醇。

14. 如請求項1之方法，其中該生物異戊二烯組合物包含一或多種選自以下所組成之群之化合物：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛(citronellal)、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯(limonene)、香葉醇(geraniol；反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(citronellol；3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。

15. 如請求項1之方法，其中該生物異戊二烯組合物中之異戊二烯係經連續化學轉化成非異戊二烯化合物。

16. 一種自生物異戊二烯組合物製造燃料成分之系統，其中該生物異戊二烯組合物中之異戊二烯係化學轉化成非異戊二烯化合物，該系統包含生物異戊二烯組合物及以下：

(a)(i)一或多種能夠使該生物異戊二烯組合物中之異戊二烯二聚化之化學品，或能夠使該生物異戊二烯組合物

中之異戊二烯二聚化之熱源，及(ii)能夠氫化異戊二烯二聚體以形成飽和C10燃料成分之催化劑；或

(b)(i)能夠部分地氫化該生物異戊二烯組合物中之異戊二烯以製造異戊烯之化學品，(ii)能夠使該異戊烯與選自由異戊烯、丙烯及異丁烯組成之群的單烯烴二聚化以形成二聚烯之化學品，及(iii)能夠完全氫化該二聚烯以製造燃料成分之化學品；

其中該生物異戊二烯組合物係以生物方法製造。

17. 如請求項16之系統，其中該生物異戊二烯組合物包含大於約2 mg之異戊二烯，且以該組合物中所有C5烴之總重量計，包含大於或約99.94重量%之異戊二烯。

18. 如請求項16之系統，其中該一或多種能夠使異戊二烯二聚化之化學品包含催化異戊二烯環二聚化之催化劑，其包含選自由釩催化劑、鎳催化劑、鐵催化劑及鉻催化劑組成之群的催化劑。

19. 如請求項16之系統，其中該氫化不飽和異戊二烯二聚體之催化劑包含選自由鈀催化劑、鎳催化劑、釩催化劑及銠催化劑組成之群的催化劑。

20. 如請求項16之系統，其中該能夠部分地氫化異戊二烯之化學品包含鈀催化劑。

21. 如請求項16之系統，其中該能夠使該異戊烯與單烯烴二聚化之化學品包含酸催化劑。

22. 如請求項16之系統，其中該生物異戊二烯組合物中至少80%之異戊二烯係化學轉化成非異戊二烯化合物。

23. 如請求項16之系統，其中該生物異戊二烯組合物包含一或多種選自以下所組成之群之化合物：乙醇、丙酮、C5異戊二烯醇及具有10個或10個以上碳原子之類異戊二烯化合物。

24. 如請求項16之系統，其中該生物異戊二烯組合物包含一或多種選自以下所組成之群之化合物：乙醇、丙酮、甲醇、乙醛、甲基丙烯醛、甲基乙烯基酮、2-甲基-2-乙烯基環氧乙烷、順-及反-3-甲基-1,3-戊二烯及C5異戊二烯醇。

25. 如請求項16之系統，其中該生物異戊二烯組合物包含一或多種選自以下所組成之群之化合物：2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2,4,5-三甲基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、香茅醛(citronellal)、乙醛、甲硫醇、乙酸甲酯、1-丙醇、雙乙醯、2-丁酮、2-甲基-3-丁烯-2-醇、乙酸乙酯、2-甲基-1-丙醇、3-甲基-1-丁醛、3-甲基-2-丁酮、1-丁醇、2-戊酮、3-甲基-1-丁醇、異丁酸乙酯、3-甲基-2-丁烯醛、乙酸丁酯、乙酸3-甲基丁酯、乙酸3-甲基-3-丁烯-1-基酯、乙酸3-甲基-2-丁烯-1-基酯、3-己烯-1-醇、乙酸3-己烯-1-基酯、檸檬烯(limonene)、香葉醇(geraniol)(反-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)、香茅醇(citronellol)(3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇)、(E)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯、(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-辛三烯及2,3-環庚烯醇吡啶。

26. 一種燃料組合物，其包含由如請求項1之方法製造之燃料成分，其中該燃料組合物具有大於-22‰或在-32‰至-

24‰之範圍內之$\delta^{13}C$值。

27. 如請求項26之燃料組合物，其中該燃料組合物實質上不含異戊二烯。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 14 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)