

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 1/16
C12N 9/00 C12N 9/12
C12N 15/00 C12P 7/08



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94194767. X

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 26 日 [11] 授权公告号 CN 1128873C

[22] 申请日 1994. 11. 8 [21] 申请号 94194767. X
[30] 优先权
[32] 1993. 11. 8 [33] US [31] 08/148,581
[86] 国际申请 PCT/US94/12861 1994. 11. 8
[87] 国际公布 WO95/13362 英 1995. 5. 18
[85] 进入国家阶段日期 1996. 7. 3
[71] 专利权人 普渡研究基金会
地址 美国印第安纳州
[72] 发明人 N. W. Y. 何 G. T. 曹
审查员 唐 慧

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 魏金玺 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 18 页

[54] 发明名称 能有效发酵葡萄糖与木糖的重组酵母

[57] 摘要

本发明描述的是含有编码木糖还原酶，木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶基因的重组酵母，DNA 分子，载体及生产此类酵母的方法。 此类重组酵母能有效地将木糖发酵为乙醇，优选的酵母能同时将葡萄糖和木糖发酵为二醇，使得存在于农作物中的这两种糖源能得以充分利用。

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

- 1.一种重组酵母，它含有引入的能编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶及木酮糖激酶的基因，和该酵母能有效地将木糖发酵为乙醇。
- 5 2.权利要求1的重组酵母，其中该酵母也能有效地将葡萄糖发酵为乙醇。
- 3.权利要求2的重组酵母，其中该酵母是酵母属（*Saccharomyces*）的。
- 4.权利要求3的重组酵母，其中所述各基因与不被葡萄糖抑制的启动子融合，和该酵母能同时有效地将葡萄糖和木糖发酵为乙醇。
- 5.重组DNA分子，它含有编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶的基
10 因。
- 6.权利要求5的重组DNA分子，其中所述各基因与不被葡萄糖抑制的启动子融合。
- 7.一种载体，它能有效转化酵母并含有能编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶的基因。
- 15 8.权利要求7的载体，其中所述各基因与不被葡萄糖抑制的启动子融合。
- 9.得到能有效地将木糖发酵为乙醇的重组酵母的方法，包括将DNA引入到酵母中，使得该酵母具有引入的编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶及木酮糖激酶的基因。
- 10.权利要求9的方法，其中该引入的DNA包含编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶及木酮糖激酶的基因。
- 20 11.权利要求9的方法，其中所述的酵母是酵母属（*Saccharomyces*）的。
- 12.一种将木糖发酵为乙醇的方法，包括用一含引入的能编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶基因的重组酵母发酵含木糖的培养基，并有效地将木糖发酵为乙醇。
- 25 13.权利要求12的方法，其中所述培养基也含有葡萄糖，酵母也能有效地将该葡萄糖发酵为乙醇。
- 14.权利要求13的方法，其中所述酵母是酵母属（*Saccharomyces*）的。
- 15.权利要求14的方法，其中所述基因与不被葡萄糖抑制的启动子融合，该酵母能同时有效地将葡萄糖和木糖发酵为乙醇。
- 30 16.一种将葡萄糖发酵为乙醇的方法，包括用一含引入的编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶及木酮糖激酶基因的重组酵母发酵一含有葡萄糖的培养基，并有效地将木糖和葡萄糖发酵为乙醇。
- 17.权利要求16的方法，其中所述培养基也含有木糖。
- 18.权利要求17的方法，其中所述酵母是酵母属（*Saccharomyces*）的。
- 35 19.一种重组酵母，它含有编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶及木酮糖激酶的基

因，其中，所述各基因与不被葡萄糖抑制的启动子融合，所述酵母能有效地将木糖发酵为乙醇。

20.权利要求 19 的重组酵母，其中该酵母也能有效地将葡萄糖发酵为乙醇。

能有效发酵葡萄糖与木糖的重组酵母

5

发明背景

本发明一般是涉及能同时将纤维质物质中的两种主要糖份，葡萄糖与木糖，发酵为乙醇的基因工程酵母。更具体地，本发明是涉及这类酵母可通过在能发酵葡萄糖为乙醇的酵母中克隆一个木糖还原酶基因，一个木糖醇脱氢酶基因，一个木酮糖激酶基因而构建成。

10

最新的研究表明，乙醇是汽车的理想的液体燃料。它可直接用做纯燃料（100 % 乙醇）或以不同浓度与汽油混合使用。

15

用乙醇来补充或替代汽油可减轻许多国家对进口石油的依赖，同时也为运输工业提供一种可再生的燃料。进一步，已证明乙醇是一种较常规汽油更清洁的燃料，因为它释放到环境中的污染物较后者要少得多。例如，已经证明，将氧化物掺入到汽油中，可减少有害物一氧化碳排放到空气中。在几种通常用于提高汽油氧含量的氧化物中，乙醇的氧含量最高。美国环保局（EPA）的资料表明，汽油里掺入10 % 的乙醇可减少一氧化碳排放量约25 % ~ 30 %。

20

到目前为止，用于发酵生产工业用乙醇的原料仍是来源于甘蔗或甜菜的糖类及来源于玉米或其它农作物的淀粉。然而，用这些农作物作原料来大规模生产乙醇燃料是太浪费了。

25

植物，由于其可再生，价格便宜且数量巨大，因而成为发酵生产乙醇燃料的一种有吸收力的原料。早在二十年前人们就知道可以对农作物里的糖进行微生物发酵，并对产生的乙醇加以利用。来源于纤维素质的主要可发酵糖类是葡萄糖与木糖（葡萄糖与木糖的比例大约为2或3到1）。当然，对纤维素质最有价值的发酵过程是将葡萄糖和木糖完全转化为乙醇。不幸的是，至今还没有发现一种天然存在的微生物能够同时有效地既发酵葡萄糖又发酵木糖。

30

酵母，特别是酵母属（Saccharomyces）的，习惯上用于将富含葡萄糖的原料发酵为乙醇，如今仍然是将葡萄糖转化为乙醇的最佳微生物。然而，这些发酵葡萄糖的酵母却不能发酵木糖，也不能利用其进行生长；但他们能利用木酮糖进行生长，并将其发酵（图1），虽然各种酵母的有效率不同。例如，酿造酵母（S.cerevisiae）仅能很微弱地发酵木酮糖，而裂殖酵母属（Schizosaccharomyces）的菌株，则能进行十分有效地发酵（Chiang等，1981；Lastick等，1989）。

35

虽然发酵葡萄糖的酵母不能利用木糖进行生长与发酵，但是，有许多天然酵母在有氧条件下能利用木糖进行生长，但却不能将木糖发酵为乙醇。这些能

利用但不能发酵木糖的酵母依赖两种酶—木糖还原酶和木糖醇脱氢酶一来将木糖直接转化为木酮糖（图 1）。酵母木糖还原酶和木糖醇脱氢酶作用时均需要辅助因子；木糖还原酶需 NADPH 做辅酶，木糖醇脱氢酶需 NAD 做辅酶。相反，细菌木糖异构酶不需要辅助因子，而直接将木糖转化为木酮糖（图 1）。

二十年前，人们做了很多的努力企图发现能有效地将葡萄糖和木糖转化为乙醇的新酵母，虽然这种理想的酵母没有找到，但这些努力确实也没有白费。例如，发现少数酵母不仅能在有氧条件下利用木糖进行生长，也能将木糖发酵为乙醇（Toivola 等，1984；Dupreez 和 Vander Walt, 1983），虽然这些发酵木糖的酵母中没有一种能够完全有效地将木糖转化为乙醇（Jeffries, 1985）。另外，这些酵母均不能有效地发酵葡萄糖。

在这些发酵木糖酵母中，对三种菌，管囊酵母（*Pachysolen tannophilus*）（Toivola 等，1984），石氏假丝酵母（*Candida shehatae*）（Dupreez 和 Vander Walt, 1983），和树干毕赤酵母（*Pichia stipitis*）（Grootjen 等，1990）的特性进行了深入的研究。树干毕赤酵母和石氏假丝酵母发酵木糖时比其它发酵木糖的酵母更有效（Grootjen 等，1990）。然而，即使是最好的发酵木糖的酵母在发酵木糖时效率也不高，并且不能发酵葡萄糖（Jeffries, 1985）。

在过去的十年里，人们致力利用重组 DNA 技术对传统地发酵葡萄糖的酵母，特别是酿造酵母，进行基因改造。最初的努力集中在将木糖异构酶基因克隆到酵母中去，使其能不依靠辅酶直接将木糖转化为木酮糖。然而，这些努力没有成功，因为编码各种细菌木糖异构酶的基因在酿造酵母中不能指导合成出有活性的酶（Rosenfeld 等，1984；Ho 等，1983；Sarthy 等，1987；Wilhelm 和 Hollenberg, 1984；Amore 等，1989 年）。

前几年，人们的研究目标是得到能发酵木糖的基因工程酵母，特别是酿造酵母，重点放在对编码木糖还原酶（Takama 等，1991；Hallborn 等，1991；Strasser 等，1990），木糖醇脱氢酶（Köetter 等，1990；Hallborn 等，1990），和木酮糖激酶（stavis 等，1987；Chang 和 Ho, 1988；Ho 和 Chang, 1989；Deng 和 Ho, 1990）的基因进行克隆。酿造酵母和其它发酵葡萄糖的酵母均不含有任何可检测出的木糖还原酶或木糖醇脱氢酶活性，但似乎都含有木酮糖激酶活性。因此，发酵葡萄糖的酵母都能发酵木酮糖，只是各自的效率不同（Deng 和 Ho, 为 1990）。

最近，Köetter 等（1990），Strasser 等（1990），和 Hallborn 等（1990；1991），已将木糖还原酶基因和木糖醇脱氢酶基因克隆到了酿造酵母中。但是，这些基因工程酵母仍然不能有效地发酵木糖。例如，这些酵母只能发酵不到 2 % 的木糖。此外，它们从木糖产生大量的木糖醇，使得宝贵的木糖底物从希望的产生乙醇的发酵途径转向了产木糖醇的途径。

以上详细的背景介绍表明，虽然众多的研究者经过了一致不懈的努力，但能有效地发酵葡萄糖和木糖为乙醇的酵母仍没有得到，因此，仍然需要找到这类酵母以及其制备和使用方法。鉴于此，递交上本发明。

发明概述

5 本发明的特征在于如下发现：可通过重组 DNA 技术和基因克隆技术得到能有效地单独发酵木糖或同时也发酵葡萄糖的新酵母菌株。具体地说，这些技术被用于产生新的含有克隆的木糖还原酶（XR）基因，木糖醇脱氢酶（XD）基因，和木酮糖激酶（XK）基因的重组酵母。这些基因与不被存在葡萄糖抑制的启动子融合（fused）在一起。

10 据此，本发明的一个优选的实施方案是提供一种重组酵母菌株，该菌株含有导入的编码木糖还原酶，木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶基因，能将木糖发酵为乙醇。这株重组酵母菌优选地也能将葡萄糖发酵为乙醇和这种更为优选的能有效地同时发酵这两种糖为乙醇的酵母菌已经得到，在这些菌株中，XR、XD 和 XK 基因与不被存在的葡萄糖抑制也不需木糖诱导的启动子融合在一起。

15 本发明的另一种优选的实施方案是提供一种含有编码木糖还原酶，木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶基因的重组酵母菌株。其中，所述基因与不被葡萄糖抑制的启动子融合在一起，和其中该重组酵母能将木糖发酵为乙醇。这个重组酵母菌株优选地也能将葡萄糖发酵为乙醇。

20 本发明的第三种优选的实施方案涉及用于产生本发明的重组酵母的各种试剂。因此，本发明也提供了一个包含编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶、木酮糖激酶的各种基因的重组 DNA 分子。本发明还提供了一个包含编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶的各种基因的载体。在这些试剂中，各基因优选地与不被葡萄糖抑制也不需木糖诱导的启动子融合，使得能方便地产生能同时将葡萄糖和木糖发酵为乙醇的重组酵母。

25 本发明的第四种优选的实施方案是提供一种获得能将木糖发酵为乙醇的重组酵母的方法。这种方法包括将 DNA 引入到酵母中的步骤，使得酵母具有引入的编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶的基因。优选地是这些基因能被融合到不被葡萄糖抑制的启动子上，使得能同时将葡萄糖和木糖发酵为乙醇。更为有利的是，例如，利用上面讨论的本发明的各种试剂，可同时将这三种基因引入到酵母中。

30 本发明的第五种优选的实施方案是提供将木糖或葡萄糖发酵为乙醇的方法。该方法包括用一株含引入的编码木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶基因的重组酵母菌发酵含木糖或含葡萄糖的培养基的步骤。理想的状况是将三种引入的基因与不被葡萄糖抑制的启动子相融合，并且培养基中既含葡萄糖也含木糖，以便能同时将木糖和葡萄糖发酵为乙醇。

35 本发明其它的优选实施方案、特征及优点，在随后的说明书中，会给以更

加清楚的描述。

附图的简要说明

图 1 为细菌和酵母中与木糖代谢早期阶段相关的各种酶类的图解。

图 2 表示包括 5' 和 3' - 侧翼序列在内的酵母木酮糖激酶基因的核苷酸序列及衍生的氨基酸序列。起始密码和终止密码下面均已画线，位于 5' - 和 3' - 端非编码区域的可能的调控序列由箭头标出。

图 3 表示克隆在质粒 pLSK 15 上的基因及该质粒的限制性酶切图谱。

图 4 表示克隆在质粒 pUCKm10 上的基因及该质粒的限制性酶切图谱。

图 5 表示克隆在质粒 pLNH21 上的基因及该质粒的限制性酶切图谱。

图 6A 表示用重组酵母 SC (pLNH21) (含有引入的 XR、XD 和 XK 基因的酿造酵母) 发酵木糖 (I) 2 天；和 (II) 4 天，所得发酵液的 HPLC 层析图谱。

图 6B 表示用重组酵母 SC (pLNH 13 - 32) (含引入的 XR 和 XD 基因，不含 XK 基因的酿造酵母) 发酵木糖 (I) 2 天，和 (II) 6 天，所得发酵液的 HPLC 层析图谱。

图 6C 表示用非基因工程菌酿造酵母 (不含引入的 XR、XD 或 XK 基因) 发酵木糖 (I) 2 天，和 (II) 7 天，所得发酵液的 HPLC 层析图谱，详细描述见例 6。

图 7 表示克隆在质粒 pLNH33 上的基因及该质粒的限制性酶切图谱。

图 8A 表示用非基因工程酵母菌 1400 (不含引入的 XR、XD 或 XK 基因) 发酵含葡萄糖和木糖 (相应为 10 % 和 5 %) 的培养基 (I) 0 天；(II) 2 天，所得发酵液的 HPLC 层析图谱，详细描述见例 8。

图 8B 表示用重组酵母 1400 (pLNH 33) (含引入的 XR、XD 和 XK 基因的酵母 1400) 发酵含葡萄糖和木糖 (分别为 10 % 和 5 %) 的培养基 (I) 0 天；(II) 2 天，所得发酵液的 HPLC 层析图谱，详细描述见例 8。

图 9 为含有克隆的 XR、XD 和 XK 基因的质粒 pBluescript II KS (-) 的构建图解：已建成 4 种这类质粒：pKS (-) - KK - A*R - KD - 1；pKS (-) - KK - A*R - KD - 2；pKS (-) - KK - AR - KD - 3；和 pKS (-) - KK - AR - KD - 4，详细描述见例 4。

图 10 表示用聚合酶链式反应 (PCR) 技术对从树干毕赤酵母染色体 DNA 得来的完整的木糖醇脱氢酶基因和不含启动子的 XD 进行直接扩增；从左至右，第一列：分子标准，BamHI - EcoKI 降解入 DNA；第二列：毕赤氏酵母木糖醇脱氢酶基因 (完整的)；第三列：毕赤氏酵母木糖醇脱氢酶基因 (不含启动子的)；第四列：分子标准，Hae III 降解 ϕ x DNA。

图 11 为测定酵母木酮糖激酶基因序列的设计方案图。

图 12 为质粒 pLNH 21 的构建图解。

图 13 表示用酿造酵母 SC (pLNH 13 - 32) (仅含 XR 和 XD 基因) 发酵葡萄糖 (10 %) 和木糖 (5 %) 混合物 (I) 0 天; (II) 2 天; (III) 5 天, 所得发酵液的 HPLC 层析图谱。

图 14 表示用非基因工程树干毕赤酵母发酵葡萄糖 (10 %) 和木糖 (5 %) 混合物 (I) 0 天; (II) 3 天; (III) 5 天, 所得发酵液的 HPLC 层析图谱。

发明详述

为了增进对本发明原理的理解, 对某些实施方案给出参考文献, 并用专业语言加以叙述。然而, 应当理解, 本发明的范围是不受限制的, 正如本文作为精选的例示所表明对本发明原理的改变, 进一步的修正及应用, 通常是该发明所属领域的普通技术人员可以作出的。

本发明提供了重组酵母, DNA 分子和包含 XR、XD 和 XK 基因的载体。众所周知, 这些基因广泛存在于各种微生物中, 事实上, 正如前面所讨论的, 大量的 XR、XD 和 XK 基因已被确定并分离出来。这些基因各自的来源对于本发明的各个方面并不是关键的。进一步说, 任何编码具有木糖还原酶活性 (即在 NADPH 或 NADH 作辅酶时, 能将 D - 木糖转化为木糖醇), 木糖醇脱氢酶活性 (NAD⁺ 作辅酶时, 能将木糖醇转化为 D - 木酮糖), 或木酮糖激酶活性 (能将 D - 木酮糖转化为 5 - 磷酸 - D - 木酮糖) 的蛋白质 (酶) 的 DNA, 都是适合的。这些基因可以天然存在的形式被得到, 或以修饰的形式被得到, 例如, 通过碱基的增加, 取代或缺失使得天然存在的基因被修饰, 只要被编码的蛋白质仍具有 XR、XD 或 XK 活性。同样, 这些基因或基因组分可由现成的技术合成出来, 只要生成的基因编码的蛋白质具有所需的 XR、XD 或 XK 活性。

作为例子, 合适的 XR 和 XD 基因来源包括能利用木糖的酵母如石氏假丝酵母、树干毕赤酵母; 合适的 XK 基因来源包括上述的能利用木糖的酵母, 以及不能利用木糖的酵母如那些来自酵母属的, 如酿造酵母, 裂殖酵母属的, 如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*), 和细菌如大肠杆菌, 芽胞杆菌属的菌种及链霉菌属的菌种等。利用一些常规方法可从这些来源获得感兴趣的基因。例如, 杂交、互补或 PCR 技术都可用于此种目的。

申请人所用的特定的 XR 基因是通过聚合酶链式反应 (PCR) 从树干毕赤酵母中克隆出的 (Chen 和 Ho, 1993)。用 PCR 对从染色体 DNA 得到的 XR 基因进行扩增, 所需的寡核苷酸链根据已报道的树干毕赤酵母 XR 基因的序列进行合成 (Takama 等, 1991)。扩增出的 XR 基因首先被克隆并贮存在 pUC19 中, 然后, 将克隆的 XR 基因融合到不同的启动子上, 这些启动子包括酵母 TRP5 基因的启动子 (zalkin 和 Yanofsky, 1982) 和酵母乙醇脱氢酶 I 基因 (ADC1) 的启动子 (Ammerer, 1983; Bennetzen 和 Hall, 1982)。

申请人研究所用的 XD 基因也通过 PCR 从树干毕赤酵母中克隆出。由毕赤

酵母染色体 DNA 得来的 XD 基因的扩增所需的寡核苷酸链, 根据已报道的毕赤酵母 XD 基因的序列加以合成 (koetter 等, 1990)。同样, 扩增的基因先克隆并贮存在 PUC 19 中。随后, 这个基因被融合到酵母丙酮酸激酶基因 (PYK) (Burke 等, 1983) 和酵母 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (GPD) (Holland 和 Holland, 1979) 的糖酵解启动子上。

5 申请人已克隆三种不同的 XK 基因, 它们来自酿造酵母 (Ho 和 Chang, 1989)、管囊酵母 (stavis 等, 1987) 和大肠杆菌并且发现在融合于高效酵母启动子之后这三种基因都能有效地在酿造酵母中表达。在此, 用克隆的酿造酵母木酮糖激酶基因做说明性的工作。为了帮助正确地将酵母 XK 基因融合到合适的启动子上, 对包括 5' -、3' - 端非编码在内的酿造酵母 XK 基因的全部核苷酸序列进行了分析, 见图 2。

各种不同的启动子都适合于本发明。广义的讲, 与酵母相容的能控制 XR、XD 或 XK 基因转录的启动子都适用。这类启动子可从大量的来源得到, 包括酵母、细菌及其它细胞来源。用于本发明的启动子优选是高效的, 不被葡萄糖抑制, 不需木糖诱导的。关于这一点, 其中所述“高效”的启动子指的是能高水
15 平地转录所融合的基因。具有这些特性的启动子也很容易得到。这类启动子在本发明中的应用, 本文给出了指导, 但启动子与 XR、XD、XK 基因的融合, 启动子/基因融合物克隆到适合的载体中, 载体对酵母菌的转化, 本领域普通的技术人员都可以完成。所有的这些操作步骤用本领域和文献中常见的常规基因工程
20 工程技术即可完成。

下面, 对申请人的例示性工作给予更具体的叙述。将酵母木酮糖激酶基因 XK 融合到酵母乙醇脱氢酶基因 (ADC1), 酵母丙酮酸激酶基因 (PYK), 酵母 TRP-5 基因等的启动子上。融合到 TRP-5 启动子上的 XK 基因用于构建 pLNH21 (图 5), 融合到 PYK 启动子上的 XK 基因用于构建 pLNH33 (图
25 7)。

XR、XD 和 XK 基因与 ADC1、PYK、GPD 等的完整启动子的融合。通过克隆含有特定启动子的片段和 XR、XD 或 XK 的结构基因到一个 Bluescript KS 质粒上 (stratagene, La Jolla, CA) 而得以完成, 然后通过专一位总诱变除去多余的不需要的核苷酸 (Kunkel 等, 1987)。本发明还提供了几种 pBluescript II KS
30 (一) (以后简称 pKS (一) 衍生物, 它们都含有克隆的 XD (与丙酮酸脱氢酶启动子融合), XR (与 ADC1 启动子融合), XK (与丙酮酸激酶启动子融合) 基因。这些重组质粒被叫做 pKS (一) KD-AR (或 A*R) -KK。4 种这样的质粒已经建成, 详见图 9。这些质粒具有相似但不相同的结构。克隆到这些质粒上的 XR、XD 和 XK (或 KD-AR (或 A*R) -KK) 基因通过一个单位点 xho I
35 的限制性降解, 可同亲代质粒 pKS (一) 分开。

然后, 将融合到适当启动子上的 XR、XD 和 XK 基因克隆到 pLSK 15 (图

3) 或 pUCKm10 (图 4) 上. pLSK 15, 由 pLX10 - 14 衍生而来 (Stavis 和 Ho, 1985), 为一低拷贝数质粒, 在酵母 (酿造酵母) 中的拷贝数约为 10. 它含有酵母的 2 μ 的复制子, 使质粒在酿造酵母及相近的其它种中能自动复制. pLSK 15 还含有遗传霉素 (卡那霉素) 抗性基因 (Km^R) 和氨苄青霉素抗性基因 (Ap^R 也可 amp^r), 它们在酿造酵母和其它酵母中充当选择性标记. pSK 15 还含有与酵母 TRP - 5 启动子融合的 XK 基因. 因而, 与含有适合启动子的适当的 5' - 非端码序列相融合的 XR、XD 基因, 被插入到 pLSK 15 上以证明这个生成的质粒对酵母木糖发酵的影响. 为此比较不同基因的存在对酵母木糖发酵的影响, 用一种只含 XR 和 XD 基因的质粒去转化酿造酵母, 转化后的酵母再用于比较发酵. 用非基因工程酿造酵母, 含有克隆的 XR、XD 和 XK (SC (pLNH 21)) 基因的酵母及含有克隆的 XR、XD, 但不含 XK (SC (pLNH 21)) 基因的酵母分别对木糖进行发酵, 结果见图 6A、6B 和 6C.

pUCKm10 (图 4) 是一种高拷贝数质粒 (即质粒的拷贝数约为 50 或更多), 在酿造酵母中的拷贝数接近 100. pUCKm10 由 PUC 19 衍生而来, 含有与 pLSK 15 相同的 2 μ 的复制子, Km^R 及 Ap^R 基因. 这些特定的片段充当复制子, 选择标记, 使得质粒在酿造酵母 (及相关酵母) 中能自动复制. 同样, 使得含此质粒的酵母转化子能同未转化的寄主细胞区分开来.

申请人在重组质粒的基础上构建了 pUCKm10, 这些重组质粒含有相同的 XR、XD 和 XK 基因, 这些基因与包含适合启动子的 5' - 端适当的非编码序列融合. 设计的这些载体对转化所有的酿造酵母菌株及相关酵母的菌株都适用. 不需要特定的突变体充当受体菌株. 象 pLNH 33 (图 7) 及 pLNH 21 (图 5) 这样的质粒可用于转化工业酿造酵母及其它酵母菌.

用 pLSK 15 或 pUCKm10 的衍生质粒对酵母的转化作用, 通常采用 Becker 和 Guarente (1991) 的方法得以完成. 含有 pLSK 15 或 pUCKm10 衍生质粒的真正的酵母转化子, 由下述方法可被分离. 质粒中的 Km^R 充当初始选择标记, 它使任何含有一个这类质粒的寄主细胞对培养基中存在的更高浓度的遗传霉素产生抗性. 然而, 一些酵母细胞可被诱导变为抗与含质粒的转化子具有相同水平的遗传霉素. 因此, 并非每一个抗遗传霉素的克隆都是真正的转化子. 已有报道表明, Ap^R 能在酿造酵母中表达, 但后者在无 Ap^R 存在时, 对氨苄青霉素具有抗性, 这样, 对于质粒介导的酵母的转化, Ap^R 不能充当选择性标记. 然而, 含有高表达 Ap^R 的酵母将产生足够的青霉素酶, 使得通过青霉素酶实验 (chevallier 和 Aigle, 1979) 能够分辨出长在特定固体平板上的含有这种酵母的克隆. 后一种实验提供了一种可以遗传霉素抗性克隆中分辨出酿造酵母和其它酵母的真正转化子的技术.

在厌氧条件下, 用本发明的重组酵母, 可以完成酵母的木糖 (或葡萄糖和木糖) 发酵, 详述见例 6 到例 9. 发酵过程中, 糖 (木糖和葡萄糖) 的消耗量,

乙醇及其它产物如木糖醇的生成量，可通过取样，并用 HPLC 进行分析而测得，进一步的说明见例 6。

例如，用 pLNH 21（图 5）转化酿造酵母，生成的含 pLNH 21 的转化子叫做 SC（pLNH21）。该转化子在 2 - 4 天时间里可将 5 % 的木糖几乎全部转化为乙醇，如图 6A 所证明。

作为另外的例子，用 pLNH33（图 7）转化酵母菌株 1400，该菌株与酿造酵母密切相关，对乙醇和温度有很高的耐受力（D' Amore 等，1989；D' Amore,1990）。这个生成的基因工程酵母，被叫做 1400（pLNH33）。该酵母在 2 - 4 天内，能将 10 % 的葡萄糖和 5 % 的木糖全部发酵为乙醇，而不需要很高的细胞密度，如图 8A 和 8B 所示。

在对木糖发酵时，pLNH33 质粒比 pLNH21 质粒更为有效，因为前者的拷贝数更高些。再者，pLNH33 中 XK 融合的启动子比 pLNH21 中 XK 融合的启动子更为有效，也可用 pLNH33 转化酿造酵母，生成的转化子叫做 SC（pLNH33）。虽然在发酵木糖或木糖与葡萄糖混合物时，SC（pLNH33）比 SC（pLNH21）更有效，但也发现，在发酵木糖与葡萄糖混合物时，1400（pLNH33）比 SC（pLNH33）更有效。因此，菌株本身也会对发酵的效率产生影响。与酿造酵母类似，非基因工程菌 1400 也不能利用或发酵木糖（单独存在或与葡萄糖混合存在），如图 8B 所示。

一般而言这些发酵实验的结果表明，酵母具有三种引入的基因 XR、XD 和 XK 是必需的，它们恰当地与合适的启动子融合在一起（最好是有效的糖酵解或别的启动子，不被葡萄糖抑制，也不需木糖诱导），协调地表达这些基因，使得酵母只将木糖发酵为乙醇，而不生成别的副产物如木糖醇等。

这些结果进一步表明，除去克隆 XR 和 XD 基因外，还克隆一个木酮糖激酶基因（XK），其重要性在于使酵母能有效地发酵木糖，特别是当葡萄糖和木糖同存于一个培养基中时，如纤维素类物质的水解液中，能同时发酵这两种糖。与 XR 和 XD 基因类似，这个克隆的 XK 基因最好与一个适合的有效的糖酵解或别的启动子融合，这个启动子不被葡萄糖抑制，也不被木糖诱导。

申请人还发现，仅含克隆的 XR 和 XD 基因的酵母，当葡萄糖和木糖同时存在于培养基中时，只能将葡萄糖发酵为乙醇，而不能将木糖发酵为乙醇（见图 13）。申请人的结果还表明，对于任何酵母来说，包括发酵木糖的酵母如酿造酵母、石氏假丝酵母，要想在葡萄糖和木糖同时存在于发酵培养基时，能同时将这两种糖发酵为乙醇，必需具有 XR、XD 和 XK 基因，并且这些基因均与不被葡萄糖抑制，也不需木糖诱导的启动子融合。图 13 表明，酿造酵母及相关酵母，若仅含有与适当的启动子融合的克隆的 XR 和 XK 基因，则当葡萄糖与木糖同时存在于发酵培养基中时，仅能将葡萄糖，而不能将木糖发酵为乙醇。同样，图 14 表明，含有原始 XR、XD 和 XK 基因的非基因工程树干毕赤酵母，

在葡萄糖与木糖作为碳源存在于同一培养基中时，不能发酵木糖；而仅木糖为培养基中唯一碳源时，则能发酵木糖（结果未写出）。

应当知道，对于那些木酮糖激酶活力很低的酵母，引入 XK 基因有两个目的。一是提高该酶的活力水平，高 XK 活力更有利于酵母将木糖发酵为乙醇而不是木糖醇；二是为了使基因处于不被葡萄糖抑制的有效的启动子控制之下。众所周知，包括酵母在内的天然野生型微生物，当葡萄糖存在于发酵培养基中时，便不能利用其它糖进行生长与发酵，葡萄糖将抑制代谢其它糖分子所需的酶类的合成（称为葡萄糖效应）。因此，不能选择由指导糖分子，包括葡萄糖、代谢酶类合成的基因得来的启动子，因为这类启动子对两种来源丰富的糖不能提供同步发酵。此外，申请人的工作表明，细胞生长是诱导的先决条件。因此，在 XR、XD 或 XK 基因表达时，不选择需要木糖诱导的启动子。

为了进一步增进对本发明及其优点的理解，下面给出了许多实例。应当明白，实际上这些例子仅是说明性的，而非限定性的。

实例 1

15 用 PCR 技术合成 XR 和 XD 基因

用 PCR 技术合成完整的或不含启动子的 XR 基因已有报道（chen 和 Ho，1993）。在用 PCR 技术合成 XD 之前，需根据 XD 的核苷酸序列（kötter 等，1990）合成出三条寡核苷酸链，如下所示：

寡核苷酸链 I：pTCTAGACCACCCTAAGTCG

20 寡核苷酸链 II：pCACACAATTAAAATGA

寡核苷酸链 III：pGGATCCACTATAGTCGAAG

寡核苷酸链 I 和 II 用于合成完整的 XD 基因，寡核苷酸链 II 和 III 用于合成不含启动子的 XD 基因，如图 10 所示，完整的 XD 和不含启动子的 XD 基因首先被克隆到 pKS（-）质粒中。然后，将完整的 XR 基因亚克隆到质粒 pUCKm10（图 4）中，生成的质粒 pUCKm10 - XD 采用例 5 中描述的电穿孔法去转化酿造酵母。检测酵母转化子的木糖醇脱氢酶活性以证明克隆的基因是完整的，并能在酿造酵母中表达。

实例 2

不含启动子的 XD 基因融合到酵母

30 丙酮酸激酶基因的启动子上

选择 XD 基因与 P_{PK} 的融合（fusion）来阐明用定点诱变技术将代谢木糖的基因准确地融合到完整的启动子上。这些启动子可以是糖酵解启动子，也可以是那些被培养基中存在的葡萄糖抑制，也不需木糖来诱导的启动子。

如同例 1 中合成 XD 基因一样，用 PCK 技术合成了从 - 910 到 + 23 的酵母丙酮酸激酶的启动子片段（Burke 等，1983）。 P_{PK} 片段和不含启动子的 XD 都被亚克隆到质粒 PKS（-）中，介于 P_{PK} 和完整的 XD 结构基因间的不必要

的核苷酸采用位点专一诱变将其去掉, 详见 Kunkel 的方法 (Kunkel, 1987), 得到的融合基因含有丙酮酸激酶基因的 - 910 到 - 1 的启动子片段, 毕赤氏酵母 XD 基因的 + 1 到 + 1963 核苷酸片段, 生成的含 $P_{PK} - XD$ (或 XD) 的质粒 $PKS (-)$ 被叫做 $PKS (-) KD$ 或 $pKD2$.

5

实例 3

酵母丙酮酸激酶基因核苷酸序列的分析

关于含有酵母丙酮酸激酶基因的一个 7.0Kb 酵母(酿造酵母) DNA 片段的克隆已有报道 (Ho 和 Chang, 1989). 通过亚克隆使得 XK 基因位于一个 2.4kb 的片段上, 这个 2.4kb 片段的核苷酸序列已经分析出来, 5' - 端非编码区域含有 345 个核苷酸, 翻译区域含有 2118 个核苷酸, 由 XK 编码的丙酮酸激酶基因含有 591 个氨基酸, 如图 2 所示, 测定 XK 基因序列的方案见图 11 .

10

实例 4

完整的 ADC1 启动子的构建

PMA 56 质粒 (Ammerer, 1983) 含有酵母乙醇脱氢酶 I 启动子 (P_{ADC1}). 申请人在其工作中利用这个启动子来修饰某些基因. 例如, P_{ADC1} 与 XR 融合在一起, 生成的基因叫做 $P_{ADC1} - XR$ 或 AR . 但是, 这个 P_{ADC1} 是不完整的, 缺少完整启动子 ADC1 的 - 1 到 - 14 核苷酸片段 (Bennetzen 和 Hall, 1982). 一个基因的 - 1 到 - 14 区域通常在控制蛋白质合成方面有重要意义. 任何与这种启动子融合的基因在控制基蛋白质产物合成时必须依赖其原有的基因信号.

20

为了更好地控制与启动子 ADC1 融合的基因的表达, 申请人采用位点专一诱变将缺失的核苷酸序列(- 1 到 - 14)增加到克隆在 PMA56 上的启动子 ADC1 上. 这个新的完整的启动子 ADC1 叫做 P^*_{ADC1} . 这个启动子与 XR 连接, 生成的基因叫做 $P^*_{ADC1} - XR$ 或 A^*R .

25

实例 5

PLNH 21 质粒的构建 (也叫 pLSK 15 - KD - AR)

以及用 pLNH21 转化酿造酵母与 1400

pLNH21 的构建如图 12 所示. 在下述条件下采用电穿孔法用 pLNH21 转化酿造酵母和菌株 1400 . 取 50ml 生长到早对数期 (克莱特单位 (kleH Unit) (KU) 130) 的酵母细胞, 离心除去培养基, 用冷水洗两遍, 其中一次含有 1M 冷山梨醇, 再重新悬浮于 200 μ l 1M 山梨醇中. 将 60 μ l 上述细胞转移到一个预先灭菌的 4 μ l 塑料管 (带盖) 中, 加入 0.1 - 1 μ g 质粒 DNA . 用吸管吸取 50 μ l 生成的细胞和质粒混合物, 加入到一预先冷却的电极宽度为 0.2cm 的基因电击杯中, 杯中的混合物受到由基因电击仪的电击控制器 (BioRad) 控制的 2.0KV, 25 μ F, 200 ohms 的电击.

35

立即将 0.5ml YEPD (1 % 酵母提取液, 2 % 蛋白胨, 及 2 % 葡萄糖) 加入

到电击杯中，然后将杯中的细胞溶液转移到一个新的已灭菌的 4ml 塑料管中，30℃保温 1 小时。取 100 μ l 细胞涂到含 YEPD 和 50 μ g/ml G418（遗传菌素）的琼脂平板上。将迅速生长的菌落选出，重新涂在另一含相同培养基的平板上。这些选出的菌落用氨苄青霉素试验（Chevallier 和 Aigle, 1979）检测，直到一个阳性菌落被检测出来。以上叙述的电穿孔步骤是基于 Beeker 和 Guarente（1971）的报道。我们所用的抗 G418 转化子的选择方法是十分有效的，大多数选出的菌落在含 YEPD 和 50 μ g/ml G418 的平板上复制，用青霉素酶试验检测都是阳性的。

pLNH21 或其它质粒对菌株 1400 的转化，其步骤与上述步骤类似。除了细胞生长到 140 - 190KD 而不是 130KU，用于电穿孔后转化子最初选择的 YEPD 平板含有 40 μ g/ml 遗传菌素 G418 而不是 50 μ g/ml。通过上述步骤对菌株 1400 的转化不象酿造酵母的转化那样有效。

实例 6

用基因工程 SC（pLNH21），SC（pLNH 13-32）

及非基因工程亲代酿造酵母

对木糖的发酵

这三种酵母在同等条件下于丰富培养基 YEPD 中需氧培养（SC（pLNH 13 - 32）通过一个叫做 pLNH 13 - 32 的质粒对酿造酵母转化而建成，该质粒仅含与启动子融合的 XR 和 XD 基因）。然后，同样在同等条件下，在 YEP（1% 酵母提取液，2% 蛋白胨）培养基中，这些酵母细胞被用于厌氧发酵 5% 的木糖。在发酵过程中，于适当的时间间隔取样，在下述条件下用 HPLC 分析样品，以确定木糖的消耗量及乙醇和木糖醇的生成量。

从培养基中取出含培养液（0.6ml~1.0ml）的样品放入 1.5ml 的 Eppendorf 管中，离心除去细胞及其它残渣，然后，上清液用无菌的 aerodisc（Gelman Sciences），0.2~0.45mm 的针筒式滤器进一步过滤。用高压液相色谱（HPLC）分析每一种样品滤液的乙醇、葡萄糖、木糖及木糖醇含量。测定时根据下列条件采用 Hitachi 系统。

- ° 柱子：Aminex HPX - 87C，300X 7.8mm
- ° 流动相：水
- ° 流速：0.8ml/min
- ° 检测：Hitachi L - 3350 RI 检测仪
- ° 温度：80℃
- ° 加样体积：20 μ l

图 6A、6B 及 6C 的结果表明（由于仪器灵敏度，在这些图及其它图中的乙醇峰实际上比他们应该有的小 2 1/2 倍），只有含克隆的 XR、XD 和 XK 的基因工程 SC（pLNH21）能将高浓度的木糖（5%）发酵为乙醇，而非基因工

程亲代酿造酵母，以及仅含有克隆的 XD、XR 而不含 XK 的基因工程 SC (pLNH 13 - 32) 则不能。SC (pLNH 13 - 32) 将大多数木糖发酵为木糖醇。

实例 8

5 1400 (pLNH 33) 有效地将高浓度
的葡萄糖和木糖发酵为乙醇

在相同的条件下，用菌株 1400 与 1400 (pLNH33) 发酵葡萄糖和木糖的混合物 (大约 10 % 的葡萄糖和 5 % 的木糖)。这些酵母保留在含有适当培养基的琼脂平板上，分别将其直接从平板上接种到装有 50ml YEPD 培养液 (1 % 酵母提取液，2 % 蛋白胨及 2 % 葡萄糖) 的 250ml 的 Erlenmeyer 烧瓶中，此烧瓶
10 装有侧臂，使得用 klett 比色计能直接监测酵母培养液的生长情况。培养液在 30 °C、200rpm 的摇床上需氧培养。

当细胞密度达到对数生长中期 (400klett 单位)，在每一个烧瓶中加入 12.5ml (40 %) 葡萄糖，6.25ml (40 %) 木糖，混匀后，取出 1ml 培养液
15 混合物作为对照。然后，用 saran 包装膜将烧瓶封住，使得发酵在厌氧条件下进行。每隔一定的时间 (每 24hr)，取出 1ml 发酵液 (含细胞) 作样品，用于检测发酵过程中培养液的糖含量与乙醇含量。样品中乙醇、葡萄糖、木糖及木糖醇的含量用 HPLC 来测定，详细方法见例 6。图 8A 与 8B 的结果表明，基因工程酵母 1400 (pLNH33) 在 2 - 4 天时间内，并且不需要高密度的细
20 胞，就可同时将 10 % 葡萄糖与 5 % 木糖发酵为乙醇。另一方面，亲代酵母菌 1400 仅能将葡萄糖发酵为乙醇，不能将木糖发酵为乙醇。该发酵过程在常规条件下进行，不需要特殊的培养基及 pH，也不需要酵母细胞生长到高细胞密度。因此，含有 XR、XD 及 XK 基因的基因工程酵母 1400 (pLNH33)，其中各基因与糖酵解启动子相融合，并克隆到高拷贝质粒 pUCKm10 上，在 2
25 - 4 天时间内，可同时将高浓度的葡萄糖与木糖发酵为乙醇，并且只有极少的副产物木糖醇生成。

实例 9

尝试用基因工程 SC (pLNH13 - 32)

对木糖/葡萄糖进行发酵

30 重复例 8 的发酵过程，只是用酿造酵母 SC (pLNH13-32) (只含 XR 和 XD 基因) 做为发酵微生物。图 13 的结果表明，这种只含 XR 和 XD 基因的非基因工程酵母，当葡萄糖与木糖同时存在于发酵培养基中时，只能发酵葡萄糖而不能发酵木糖。

实例 10

35 尝试用非基因工程树干毕赤
酵母发酵木糖/葡萄糖

重复例 8 的发酵过程，除了用非基因工程树干毕赤酵母做发酵微生物，用 HPLC 检测发酵了（I）0 天；（II）3 天；及（III）5 天的发酵液样品，结果见图 14。结果表明，当葡萄糖与木糖同时存在于培养基中时，树干毕赤酵母只能发酵葡萄糖而不能发酵木糖。

- 5 虽然已用附图及前述的说明对本发明进行了详细的叙述，但均为说明性的而非限定性的。应当明白，前面列出并加以说明的仅是优选的实施方案，所有的在本发明构思范围内的变化与修饰都要求受到保护。

参考文献

下列文献, 均为提供示范性步骤或对此发明中提出的步骤给予
细节补充, 在此专门引入作为参考.

5

Ammerer, G., "Expression of genes in yeast using the ADC1 promoter," *Methods in Enzymol.* 101, 192-201 (1983).

Amore, R., M. Wilhelm, and C. P. Hollenberg, "The fermentation of xylose: An analysis of the expression of
10 *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30(4), 351-357 (1989).

Becker, D., and L. Guarente, "High efficiency transformation of yeast by electroporation," *Methods in*
15 *Enzymol.* 194, 182-186 (1991).

Bennetzen, J. L. and B. D. Hall, "The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I," *J. Biol. Chem.*, 257(6), 3018-3025 (1982).

Burke, R. L., P. Tekamp-Olson, and R. Najarian, "The
20 isolation, characterization, and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.* 258(4) 2193-2201 (1983).

Chang, S.F. and N.W.Y. Ho, "Cloning the yeast xylulokinase gene for the improvement of xylose fermentation." *Appl. Biochem Biotechnol.* 17, 313-318 (1988).
25

Chen, Zhengdao, and N.W.Y. Ho, "Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in

- Saccharomyces cerevisiae," Appl. Biochem. Biotechnol., 39-40, 135-147 (1993).
- Chevallier, M. R. and M. Aigle, "Qualitative detection of penicillinase produced by yeast strains carrying chimeric
5 yeast-coli plasmids," FEBS Letters, 108(1) 179-184 (1979).
- Chiang, L-C, H-Y. Hsiao, P. P. Ueng, L-F. Chen, and G. T. Tsao. "Ethanol production from xylose by enzymic isomerization and yeast fermentation," Biotechnol. Bioeng., 11, 263-274 (1981).
- 10 D'Amore, C. G., I. Russell, and G. G. Stewart, "Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C," Enz. Microbiol. Technol., 11, 411 (1989).
D'Amore, T., C. J. Panchal, I. Russell, and G.G. Stewart, "A study of ethanol tolerance in yeast: Critical
15 Reviews," Biotechnol., 9, 287 (1990).
- Deng, X. X. and N.W.Y. Ho, "Xylulokinase activity in various yeasts including Saccharomyces cerevisiae containing the cloned xylulokinase gene," Appl. Biochem. Biotechnol., 24-25, 193 (1990).
- 20 DuPreez, J. C. and J. P. van der Walt, "Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain by Candida shehatae," Biotechnol. Lett., 5, 357-362 (1983).
- Grootjen, D.R.J., R.G.J.M. van der lans, and K. Ch.A.M. Luyben, "Effects of the aeration rate on the fermentation
25 of glucose and xylose by Pichia stipitis CBS 5773, Enzyme Microb. Technol., 12, 20-23 (1990).
- Hallborn, J., M. Walfridsson, U. Airaksinen, H. Ojamo, B. Hahn-Hagerdal, M. Penttila, and S. Keranen, "Xylitol

- production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*,
Bio./Technol., 9, 1090 (1991).
- Ho, N.W.Y., and S-F. Chang, "Cloning of yeast xylulokinase
gene by complementation of E. coli and yeast mutations,"
5 Enzyme Microb. Technol., 11, 417 (1989).
- Ho, N.W.Y., P. Stevis, S. Rosenfeld, J. J. Huang, and G.
T. Tsao, "Expression of E. coli xylose isomerase gene by a
yeast promoter," Biotechnology and Bioengineering
Symposium, No. 13, 245-250 (1983).
- 10 Holland, J. P. and M. J. Holland, "The primary structure
of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from
Saccharomyces cerevisiae," J. Biol. Chem. 253(19)
9839-9845 (1979).
- Jeffries, T. W., "Emerging technology for fermenting
15 D-xylose: Trends in biotechnology 3(8), 208-212 (1985).
- Jeffries, T. W., "Utilization of xylose by bacteria,
yeasts, and fungi," Adv. in Biochem. Engr. Biotechnol. 27,
1-32 (1983).
- Köetter, P., R. Amore, C. P. Hollenberg, and M. Ciriacy,
20 "Isolation and characterization of the Pichia stipitis
xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a
xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant,"
Curr. Genet., 18, 493-500 (1990).
- Kötter, P. and M. Ciriacy, "Xylose fermentation by
25 *Saccharomyces cerevisiae*," Appl. Microbiol. Biotechnol.,
38, 776-783 (1993).
- Kunkel, T. A., J. P. Roberts, and R. a. Zakour, "Rapid and

'efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection," Methods Enzymol., 154, 367-382 (1987).

Lastick, S., M. Y. Tucker, J. R. Beyett, G. R. Noll, and K. Grohmann. "Simultaneous fermentation and isomerization of 5 xylose to ethanol," Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 574-579 (1989).

Rosenfeld, S., P. Stevis, and N.W.Y. Ho, "Cloning and characterization of the xyl genes from E. coli," Mol. Gen. Genetics, 194, 410-415 (1984).

10 Sarthy, A. V., et al., "Expression of the E. coli xylose isomerase gene in S. cerevisiae, Appl. Environ. Microb., 53, 1996-2000 (1987).

Stevis, P. A., J. J. Huang, N.W.Y. Ho, "Cloning of the pachysolen tannophilus xylulokinase gene by 15 complementation in Escherichia coli." Appl Environ. Micro.(53) 1, 2975-2977 (1987).

Stevis, P. A. and N.W.Y. Ho, "Overproduction of D-xylose isomerase in E. coli by Cloning the D-xylose Isomerase gene", Enzyme Microb. Technol., Vol. 7, pp. 592-596 20 (1985).

Strasser, A.W.M., C. P. Hollenberg, M. Ciriacy, P. Köetter, R. Amore, M. Piontek, and J. Hagedorn, "Cloning of yeast xylose reductase and xylitol dehydrogenase genes and their use," German patent application (1990).

25 Takuma, S., N. Nakashima, M. Tantirungkij, S. Kinoshita, H. Okada, T. Seki, and T. Yoshida, "Isolation of xylose reductase gene of Pichia stipitis and its expression in Saccharomyces cerevisiae, "Appl. Biochem. Biotechnol.,

27-28, 327 (1991).

Toivola, A., D. Yarrow, E. van den Bosch, J. P. van
Dijken, and W. A. Scheffers. "Alcoholic fermentation of
D-xylose by yeasts," Appl. Environ. Microbiol., 47(6),
5 1221-1223 (1984).

Wilhelm, M., and C. P. Hollenberg, "Selective cloning of
Bacillus subtilis xylose isomerase and xylulokinase in E.
coli genes by IS5-mediated expression," the EMBO Journal,
3, 2555-2560 (1984).

10 Zalkin, H. and C. Yanofsky, J. Biol. Chem. 257, 1491-1500
(1982).

(1) 一般资料:

(i) 申请人: Nancy Ho 和 George T. Tsao

(ii) 发明题目: 能有效发酵葡萄糖与木糖的重组酵母

5 (iii) 序列号: 1

(iv) 相应地址:

(A) 户主: Thomas Q. Henry

(B) 街道: Bank One Tower, Suite 3700, 111 Monument Circle

(C) 城市: Indianapolis

10 (D) 州: Indiana

(E) 国家: USA

(F) 邮编: 46204

(v) 计算机可读形式:

15 (A) 中介类型: 软盘, 3.50 inch,
1.4 Mb 内存

(B) 计算机: COMPAQ

(C) 操作系统: MSDOS

(D) 软件: ASCII

(vi) 现在的申请日期:

20 (A) 申请号: 08/148,581

(B) 申请日期: 1993, 11, 8

(C) 分类:

(vii) 在先的申请日期: 无

(viii) 代理人资料:

25 (A) 姓名: Thomas Q. Henry

(B) 注册号: 28, 309

(C) 参考/摘要号: PUR 17/18

(ix) 电信资料:

30 (A) 电话: (317) 634 - 3456

(B) 电传: (317) 637 - 7561

(2) 1 号序列 ID 资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 2467 碱基对

(B) 类型: 核苷酸氨基酸

35 (C) 链型: 双链

(D) 拓扑结构: 线型分子

(ii) 分子类型: 基因组 DNA

(xi) 序列图: 序列 ID 1 号:

```

      GGATCCAAGA CCATTATTCC ATCAGAATGG AAAAAAGTTT AAAAGATCAC      50
      GGAGATTTTG TTCTTCTGAG CTTCTGCTGT CCTTGAAAAC AAATTATTCC      100
5  GCTGGCCGCC CCAAACAAAA ACAACCCCGA TTTAATAACA TTGTCACAGT      150
      ATTAGAAATT TTCTTTTAC AAATTACCAT TTCCAGCTTA CTACTTCCTA      200
      TAATCCTCAA TCTTCAGCAA GCGACGCAGG GAATAGCCGC TGAGGTGCAT      250
      AACTGTCAC TTTCAATTCTGCCAATGCAA TCTCAGGCGG ACGAATAAGG      300
      GGGCCCTCTC GAGAAAAACA AAAGGAGGAT GAGATTAGTA CTTTA ATG TTG      351
                                     Met Leu
                                     1

```

TGT	TCA	GTA	ATT	CAG	AGA	CAG	ACA	AGA	GAG	GTT	TCC	AAC	ACA	393
Cys	Ser	Val	Ile	Gln	Arg	Gln	Thr	Arg	Glu	Val	Ser	Asn	Thr	
		5					10					15		
ATG	TCT	TTA	GAC	TCA	TAC	TAT	CTT	GGG	TTT	GAT	CTT	TCG	ACC	435
Met	Ser	Leu	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Phe	Asp	Leu	Ser	Thr	
			20					25					30	
CAA	CAA	CTG	AAA	TGT	CTC	GCC	ATT	AAC	CAG	GAC	CTA	AAA	ATT	477
Gln	Gln	Leu	Lys	Cys	Leu	Ala	Ile	Asn	Gln	Asp	Leu	Lys	Ile	
				35					40					
GTC	CAT	TCA	GAA	ACA	GTG	GAA	TTT	GAA	AAG	GAT	CTT	CCG	CAT	519
Val	His	Ser	Glu	Thr	Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Asp	Leu	Pro	His	
45					50					55				
TAT	CAC	ACA	AAG	AAG	GGT	GTC	TAT	ATA	CAC	GGC	GAC	ACT	ATC	561
Tyr	His	Thr	Lys	Lys	Gly	Val	Tyr	Ile	His	Gly	Asp	Thr	Ile	
	60					65					70			
GAA	TGT	CCC	GTA	GCC	ATG	TGG	TTA	GGG	GCT	CTA	GAT	CTG	GTT	603
Glu	Cys	Pro	Val	Ala	Met	Trp	Leu	Gly	Ala	Leu	Asp	Leu	Val	
		75					80					85		
CTC	TCG	AAA	TAT	CGC	GAG	GCT	AAA	TTT	CCA	TTG	AAC	AAA	GTT	645
Leu	Ser	Lys	Tyr	Arg	Glu	Ala	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Lys	Val	
			90					95					100	
ATG	GCC	GTC	TCA	GGG	TCC	TGC	CAG	CAG	CAC	GGG	TCT	GTC	TAC	687
Met	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Cys	Gln	Gln	His	Gly	Ser	Val	Tyr	
				105					110					
TGG	TCC	TCC	CAA	GCC	GAA	TCT	CTG	TTA	GAG	CAA	TTG	AAT	AAG	729
Trp	Ser	Ser	Gln	Ala	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Asn	Lys	
115					120					125				
AAA	CCG	GAA	AAA	GAT	TTA	TTG	CAC	TAC	GTG	AGC	TCT	GTA	GCA	771
Lys	Pro	Glu	Lys	Asp	Leu	Leu	His	Tyr	Val	Ser	Ser	Val	Ala	
	130					135					140			
TTT	GCA	AGG	CAA	ACC	GCC	CCC	AAT	TGG	CAA	GAC	CAC	AGT	ACT	813
Phe	Ala	Arg	Gln	Thr	Ala	Pro	Asn	Trp	Gln	Asp	His	Ser	Thr	
		145					150					155		
GCA	AAG	CAA	TGT	CAA	GAG	TTT	GAA	GAG	TGC	ATA	GGT	GGG	CCT	855
Ala	Lys	Gln	Cys	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Cys	Ile	Gly	Gly	Pro	
			160					165					170	
GAA	AAA	ATG	GCT	CAA	TTA	ACA	GGG	TCC	AGA	GCC	CAT	TTT	AGA	897
Glu	Lys	Met	Ala	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser	Arg	Ala	His	Phe	Arg	
				175					180					

TTT Phe 185	ACT Thr	GGT Gly	CCT Pro	CAA Gln	ATT Ile 190	CTG Leu	AAA Lys	ATT Ile	GCA Ala	CAA Gln 200	TTA Leu	GAA Glu	CCA Pro	939
GAA Glu 205	GCT Ala	TAC Tyr	GAA Glu	AAA Lys	ACA Thr	AAG Lys 210	ACC Thr	ATT Ile	TCT Ser	TTA Leu	GTG Val 215	TCT Ser	AAT Asn	981
TTT Phe 220	TTG Leu	ACT Thr	TCT Ser	ATC Ile	TTA Leu	GTG Val	GGC Gly 225	CAT His	CTT Leu	GTT Val	GAA Glu 230	TTA Leu	GAG Glu	1023
GAG Glu 235	GCA Ala	GAT Asp	GCC Ala	TGT Cys	GGT Gly	ATG Met	AAC Asn 240	CTT Leu	TAT Tyr	GAT Asp	ATA Ile	CGT Arg	GAA Glu 245	1065
AGA Arg 250	AAA Lys	TTC Phe	ATG Met	TAT Tyr	GAG Glu	CTA Leu	CTA Leu	CAT His	CTA Leu	ATT Ile	GAT Asp	AGT Ser	TCT Ser	1107
TCT Ser 260	AAG Lys	GAT Asp	AAA Lys	ACT Thr	ATC Ile 265	AGA Arg	CAA Gln	AAA Lys	TTA Leu	ATG Met 270	AGA Arg	GCA Ala	CCC Pro	1149
ATG Met 275	AAA Lys	AAT Asn	TTG Leu	ATA Ile	GCG Ala	GGT Gly 280	ACCA Thr	TCT Ile	GTA Cys	AA Lys	TAT Tyr 285	TTT Phe	ATT Ile	1191
GAG Glu 290	AAG Lys	TAC Tyr	GGT Gly	TTC Phe	AAT Asn	ACA Thr	AAC Asn 300	TGC Cys	AAG Lys	GTC Val	TCT Ser	CCC Pro 305	ATG Met	1233
ACT Thr 310	GGG Gly	GAT Asp	ATT Asn	TTA Leu	GCC Ala	ACT Thr	ATA Ile	TGT Cys 320	TCT Ser	TTA Leu	CCC Pro	CTG Leu 325	CGG Arg	1275
AAG Lys 330	AAT Asn	GAC Asp	GTT Val	CTC Leu	GTT Val	TCC Ser	CTA Leu	GGA Gly	ACA Thr	AGT Ser	ACT Thr	ACA Thr	GTT Val	1317
CTT Leu 340	CTG Leu	GTC Val	ACC Thr	GAT Asp	AAG Lys 345	TAT Tyr	CAC His	CCC Pro	TCT Ser	CCG Pro 350	AAC Asn	TAT Tyr	CAT His	1359
CTT Leu 355	TTC Phe	ATT Ile	CAT His	CCA Pro	ACT Thr	CTG Leu 360	CCA Pro	AAC Asn	CAT His	TAT Tyr	ATG Met 365	GGT Gly	ATG Met	1401
ATT Ile 370	TGT Cys	TAT Tyr	TGT Cys	AAT Asn	GGT Gly	TCT Ser	TTG Leu 375	GCA Ala	AGG Arg	GAG Glu	AGG Arg	ATA Ile 380	AGA Arg	1443

GAC Asp	GAG Glu	TTA Leu	AAC Asn 385	AAA Lys	GAA Glu	CGG Arg	GAA Glu	AAT Asn 390	AAT Asn	TAT Tyr	GAG Glu	AAG Lys	ACT Thr 400	1485
AAC Asn	GAT Asp	TGG Trp	ACT Thr 405	CTT Leu	TTT Phe	AAT Asn	CAA Gln	GCT Ala	GTG Val 410	CTA Leu	GAT Asp	GAC Asp	TCA Ser	1527
GAA Glu 415	AGT Ser	AGT Ser	GAA Glu	AAT Asn	GAA Glu 420	TTA Leu	GGT Gly	GTA Val	TAT Tyr	TTT Phe 425	CCT Pro	CTG Leu	GGG Gly	1569
GAG Glu 430	ATC Ile	GTT Val	CCT Pro	AGC Ser	GTA Val	AAA Lys 435	GCC Ala	ATA Ile	AAC Asn	AAA Lys	AGG Arg 440	GTT Val	ATC Ile	1611
TTC Phe	AAT Asn	CCA Pro 445	AAA Lys	ACG Thr	GGT Gly	ATG Met	ATT Ile 450	GAA Glu	AGA Arg	GAG Glu	GTG Val	GCC Ala 455	AAG Lys	1653
TTC Phe	AAA Lys	GAC Asp	AAG Lys 460	AGG Arg	CAC His	GAT Asp	GCC Ala	AAA Lys 465	AAT Asn	ATT Ile	GTA Val	GAA Glu	TCA Ser 470	1695
CAG Gln	GCT Ala	TTA Leu	AGT Ser	TGC Cys 475	AGG Arg	GTA Val	AGA Arg	ATA Ile 480	TCT Ser	CCC Pro	CTG Leu	CTT Leu	TCG Ser	1737
GAT Asp 485	TCA Ser	AAC Asn	GCA Ala	AGC Ser	TCA Ser 490	CAA Gln	CAG Gln	AGA Arg	CTG Leu	AAC Asn 495	GAA Glu	GAT Asp	ACA Thr	1779
ATC Ile 500	GTG Val	AAG Lys	TTT Phe	GAT Asp	TAC Tyr	GAT Asp 505	GAA Glu	TCT Ser	CCG Pro	CTG Leu	CGG Arg 510	GAC Asp	TAC Tyr	1821
CTA Leu	AAT Asn	AAA Lys 515	AGG Arg	CCA Pro	GAA Glu	AGG Arg	ACT Thr 520	TTT Phe	TTT Phe	GTA Val	GGT Gly	GGG Gly 525	GCT Ala	1863
TCT Ser	AAA Lys	AAC Asn	GAT Asp 530	GCT Ala	ATT Ile	GTG Val	AAG Lys	AAG Lys 535	TTT Phe	GCT Ala	CAA Gln	GTC Val	ATT Ile 540	1905
GGT Gly	GCT Ala	ACA Thr	AAG Lys	GGT Gly 545	AAT Asn	TTT Phe	AGG Arg	CTA Leu	GAA Glu 550	ACA Thr	CCA Pro	AAC Asn	TCA Ser	1947
TGT Cys 555	GCC Ala	CTT Leu	GGT Gly	GGT Gly 560	TGT Cys	TAT Tyr	AAG Lys	GCC Ala	ATG Met	TGG Trp 565	TCA Ser	TTG Leu	TTA Leu	1989

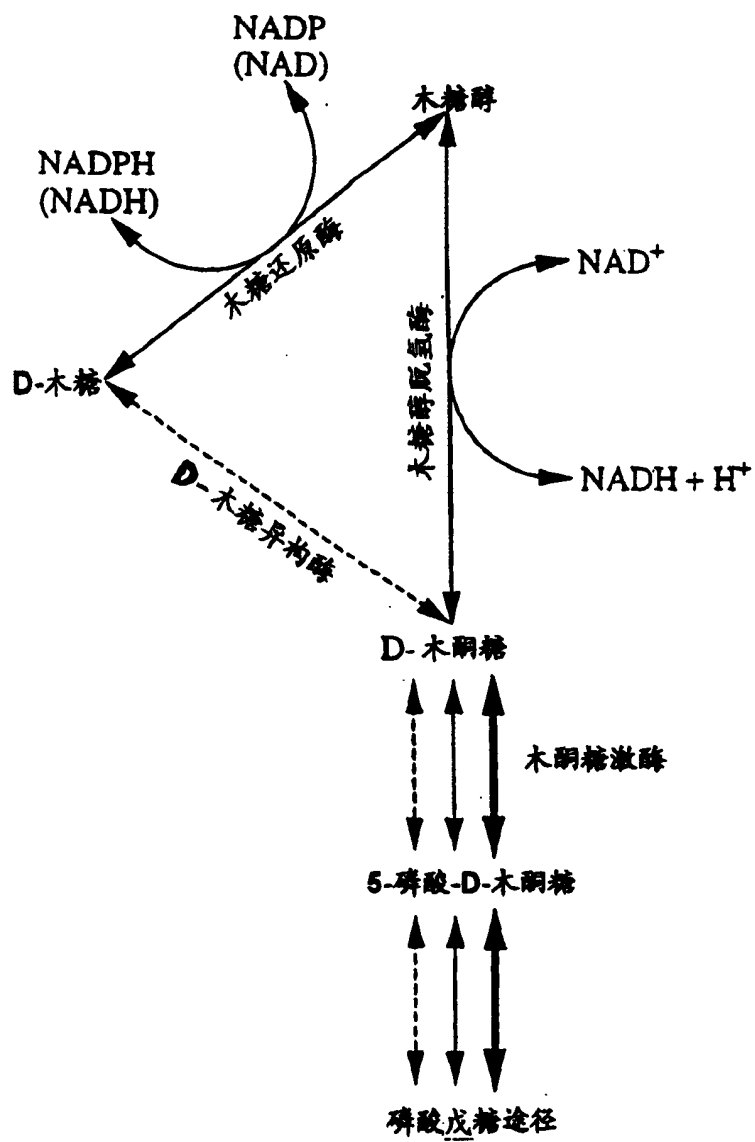
TAT	GAC	TCT	AAT	AAA	ATT	GCA	GTT	CCT	TTT	GAT	AAA	TTT	CTG	2031
Tyr	Asp	Ser	Asn	Lys	Ile	Ala	Val	Pro	Phe	Asp	Lys	Phe	Leu	
	570					575					580			

AAT	GAC	AAT	TTT	CCA	TGG	CAT	GTA	ATG	GAA	AGC	ATA	TCC	GAT	2073
Asn	Asp	Asn	Phe	Pro	Trp	His	Val	Met	Glu	Ser	Ile	Ser	Asp	
	585					590						595		

GTG	GAT	AAT	GAA	AAT	TGG	ATC	GCT	ATA	ATT	CCA	AGA	TTG	TCC	2115
Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Trp	Ile	Ala	Ile	Ile	Pro	Arg	Leu	Ser	
		600					605						610	

CCT	TAAGCGAACT	GGAAAAGACT	CTCATCTAAA	ATATGTTTGA	ATAATTATATC	2168
Pro						

ATGCCCTGAC	AAGTACACAC	AAACACAGAC	ACATAATATA	CATACATATA	2218
TATATATCAC	CGTTATTATG	CGTGACATG	ACAATGCCCT	TGTATGTTTC	2268
GTATACTGTA	GCAAGTAGTC	ATCATTTTGT	TCCCCGTTTCG	GAAAATGACA	2318
AAAAGTAAAA	TCAATAAATG	AAGAGTAAAA	AACAATTTAT	GAAAGGGTGA	2368
GCGACCAGCA	ACGAGAGAGA	CAAATCAAAT	TAGCGCTTTC	CAGTGAGAAT	2418
ATAAGAGAGC	ATTGAAAGAG	CTAGGTTATT	GTAAATCAT	CTCGAGCTC	2467



微生物中的木糖代谢途径

- 不能利用木糖的酵母
(酿酒酵母, 粟酒裂殖酵母, 等)
- 能利用木糖的酵母(石氏假丝酵母,
树干毕赤酵母, 管囊酵母, 等)
- 细菌(大肠杆菌, 芽孢杆菌属的菌株,
链霉菌属的菌株, 等)

图1

```

1   GGATCCAAGACCATTATTCCATCAGAATGGAAAAAGTTTAAAAGATCACGGAGATTTTG
61  TTCTTCTGAGCTTCTGCTGTCCTTGAAAACAAATTATTCCGCTGGCCGCCCCAAACAAA
121 ACAACCCCGATTTAATAACATTGTCACAGTATTAGAAATTTTCTTTTACAAATTACCAT
    →
181 TTCCAGCTTACTACTTCCTATAATCCTCAATCTTCAGCAAGCGACGCAGGGAATAGCCGC
    →
241 TGAGGTGCATAACTGTCACTTTTCAATTTCGGCCAATGCAATCTCAGGCGGACGAATAAGG
301 GGGCCCTCTCGAGAAAAACAAAAGGAGGATGAGATTAGTACTTTAATGTTGTGTTCAGTA
    M L C S V
361 ATTCAGAGACAGACAAGAGAGGTTTCCAACACAATGTCTTTAGACTCATACTATCTTGGG
    I Q R Q T R E V S N T M S L D S Y Y L G
421 TTTGATCTTTTCGACCCAACAAGTAAATGTCTCGCCATTAAACCAGGACCTAAAAATTGTC
    F D L S T Q Q L K C L A I N Q D L K I V
481 CATTAGAAACAGTGAATTTGAAAAGGATCTTCCGCATTATCACACAAAGAAGGGTGTC
    H S E T V E F E K D L P H Y H T K K G V
541 TATATACACGGCGACACTATCGAATGTCCCGTAGCCATGTGGTTAGGGGCTCTAGATCTG
    Y I H G D T I E C P V A M W L G A L D L
601 GTTCTCTCGAAATATCGCGAGGCTAAATTTCCATTGAACAAAGTTATGGCCGTCTCAGGG
    V L S K Y R E A K F P L N K V M A V S G
661 TCCTGCCAGCAGCACGGGTCTGTCTACTGGTCCCTCCCAAGCCGAATCTCTGTTAGAGCAA
    S C Q Q H G S V Y W S S Q A E S L L E Q
721 TTGAATAAGAAACCGGAAAAAGATTTATTGCACTACGTGAGCTCTGTAGCATTTGCAAGG
    L N K K P E K D L L H Y V S S V A F A R
781 CAAACCGCCCCCAATTGGCAAGACCACAGTACTGCAAAGCAATGTCAAGAGTTTGAAGAG
    Q T A P N W Q D H S T A K Q C Q E F E E
841 TGCATAGGTGGGCCTGAAAAAATGGCTCAATTAACAGGGTCCAGAGCCCATTTTAGATTT
    C I G G P E K M A Q L T G S R A H F R F
901 ACTGGTCCTCAAATTCTGAAAATTGCACAATTAGAACCAGAAGCTTACGAAAAACAAAG
    T G P Q I L K I A Q L E P E A Y E K T K
961 ACCATTTCTTTAGTGTCTAATTTTTTTGACTTCTATCTTAGTGGGCCATCTTGTGTAATTA
    T I S L V S N F L T S I L V G H L V E L
1021 GAGGAGGCAGATGCCTGTGGTATGAACCTTTATGATATACGTGAAAGAAAATTCATGTAT
    E E A D A C G M N L Y D I R E R K F M Y
1081 GAGCTACTACATCTAATTGATAGTTCTTCTAAGGATAAACTATCAGACAAAATTAATG
    E L L H L I D S S S K D K T I R Q K L M
1141 AGAGCACCCATGAAAAATTTGATAGCGGGTACCATCTGTAAATATTTTATTGAGAAGTAC
    R A P M K N L I A G T I C K Y F I E K Y
1201 GGTTTCAATACAACTGCAAGGTCTCTCCCATGACTGGGGATAATTTAGCCACTATATGT
    G F N T N C K V S P M T G D N L A T I C
1261 TCTTTACCCCTGCGGAAGAATGACGTTCTCGTTTCCCTAGGAACAAGTACTACAGTTCTT
    S L P L R K N D V L V S L G T S T T V L
1321 CTGGTCACCGATAAGTATCACCCCTCTCCGAAGTATCATCTTTTCATTCATCCAAGTCTG
    L V T D K Y H P S P N Y H L F I H P T L
1381 CCAACCATTATATGGGTATGATTTGTTATTGTAATGGTTCTTTGGCAAGGGAGAGGATA
    P N H Y M G M I C Y C N G S L A R E R I

```

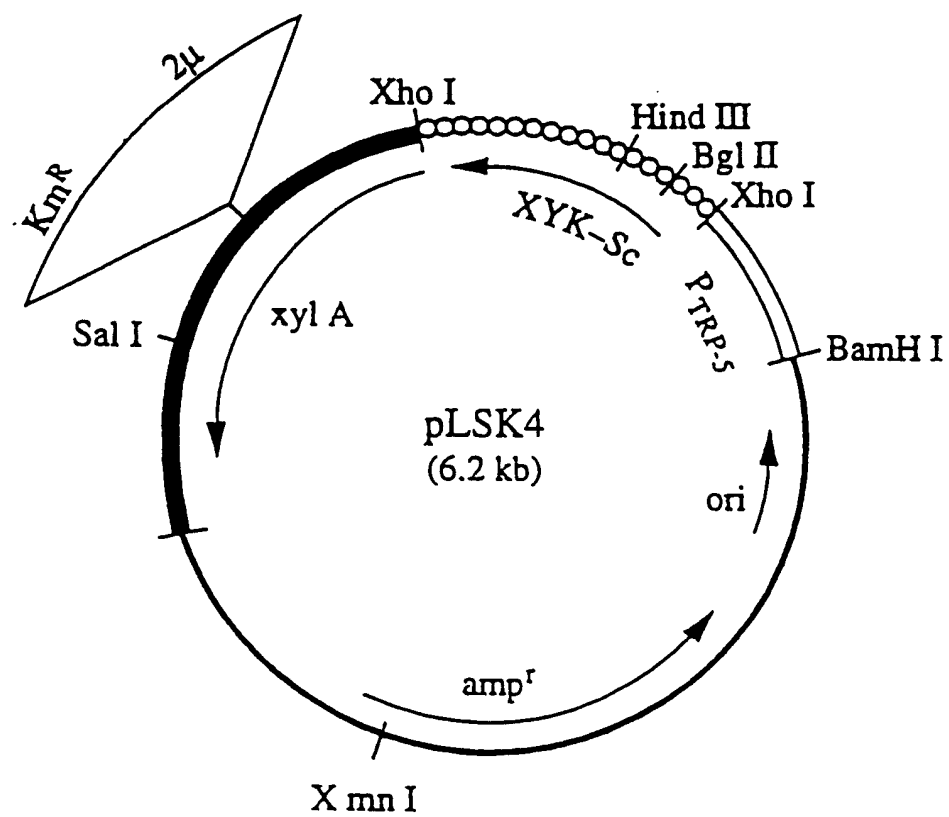
图2 (1/2)

```

1441 AGAGACGAGTTAAACAAAGAACGGGAAAATAATTATGAGAAGACTAACGATTGGACTCTT
    R D E L N K E R E N N Y E K T N D W T L
1501 TTTAATCAAGCTGTGCTAGATGACTCAGAAAGTAGTGAAAATGAATTAGGTGTATATTTT
    F N Q A V L D D S E S S E N E L G V Y F
1561 CCTCTGGGGGAGATCGTTCCTAGCGTAAAAGCCATAAACAAAAGGGTTATCTTCAATCCA
    P L G E I V P S V K A I N K R V I F N P
1621 AAAACGGGTATGATTGAAAGAGAGGTGGCCAAGTTCAAAGACAAGAGGCACGATGCCAAA
    K T G M I E R E V A K F K D K R H D A K
1681 AATATTGTAGAATCACAGGCTTTAAGTTGCAGGGTAAGAATATCTCCCCTGCTTTCGGAT
    N I V E S Q A L S C R V R I S P L L S D
1741 TCAAACGCAAGCTCACAACAGAGACTGAACGAAGATACAATCGTGAAGTTTGATTACGAT
    S N A S S Q Q R L N E D T I V K F D Y D
1801 GAATCTCCGCTGCGGGACTACCTAAATAAAAGGCCAGAAAGGACTTTTTTTGTAGGTGGG
    E S P L R D Y L N K R P E R T F F V G G
1861 GCTTCTAAAAACGATGCTATTGTGAAGAAGTTTGCTCAAGTCATTGGTGCTACAAAGGGT
    A S K N D A I V K K F A Q V I G A T K G
1921 AATTTTAGGCTAGAAACACCAAACCTCATGTGCCCTTGGTGGTTGTTATAAGGCCATGTGG
    N F R L E T P N S C A L G G C Y K A M W
1981 TCATTGTTATATGACTCTAATAAAATTGCAGTTCCTTTTGATAAATTTCTGAATGACAAT
    S L L Y D S N K I A V P F D K F L N D N
2041 TTTCCATGGCATGTAATGGAAAGCATATCCGATGTGGATAATGAAAATTGGATCGCTATA
    F P W H V M E S I S D V D N E N W I A I
2101 ATTCCAAGATTGTCCCCTTAAGCGAACTGGAAAAGACTCTCATCTAAAATATGTTTGAAT
    I P R L S P
2161 AATTTATCATGCCCTGACAAGTACACACAAACACAGACACATAATATACATACATATATA
    →
2221 TATATCACCGTTATTATGCGTGCACATGACAATGCCCTTGTATGTTTCGTATACTGTAGC
    →
1281 AAGTAGTCATCATTTTTGTTCCCCGTTTCGGAAAATGACAAAAGTAAAATCAATAAATGAA
    →
2341 GAGTAAAAAACAATTTTATGAAAGGGTGAGCGACCAGCAACGAGAGAGACAAATCAAATTA
2401 GCGCTTTCAGTGAGAATATAAGAGAGCATTGAAAGAGCTAGGTTATTGTTAAATCATCT
2461 CGAGCTC

```

图2 (2/2)



pLSK15

图3

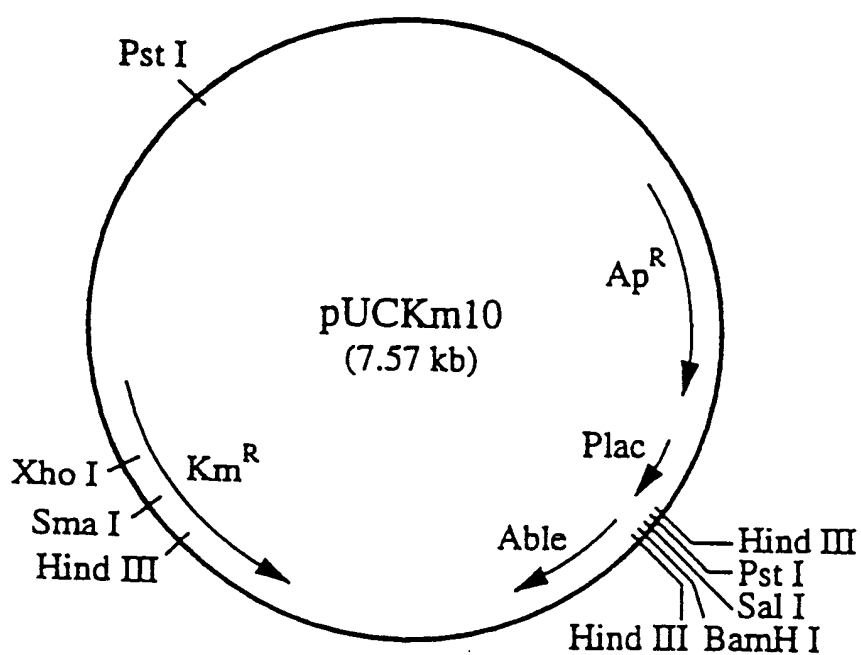
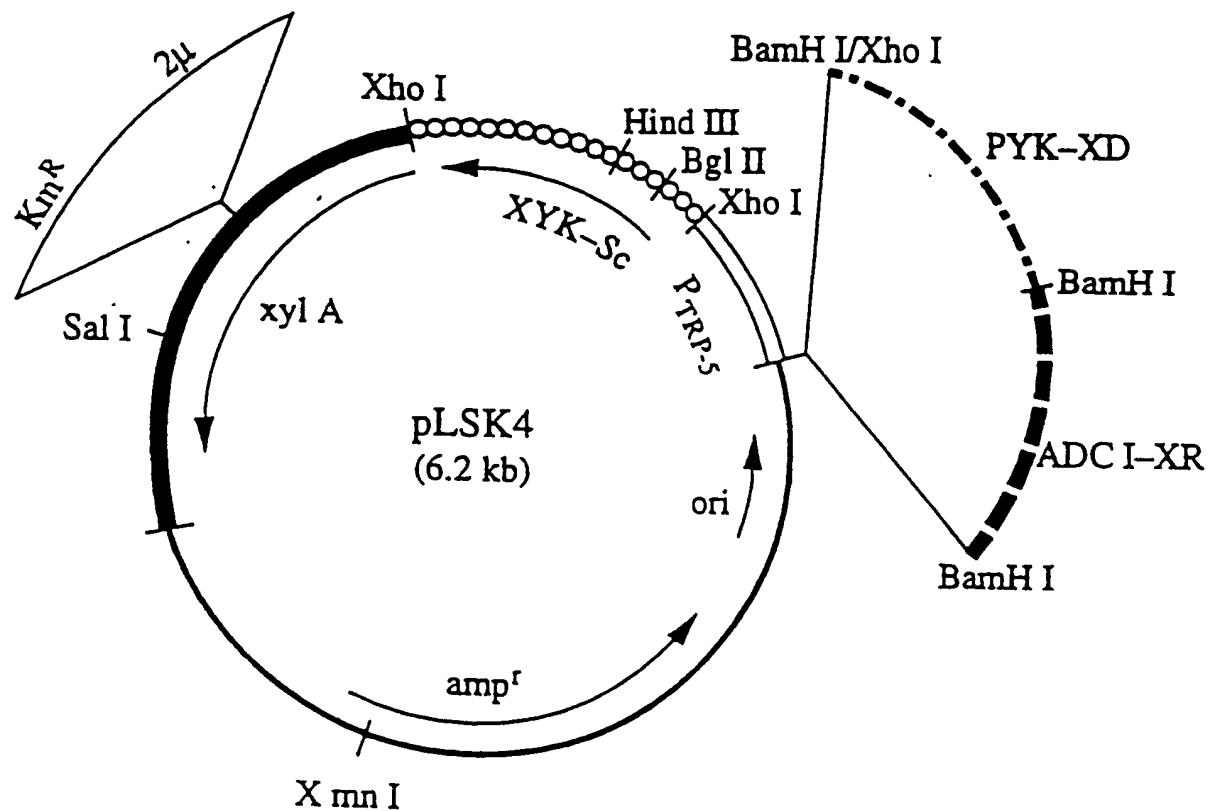


图4



pLNH21

图5

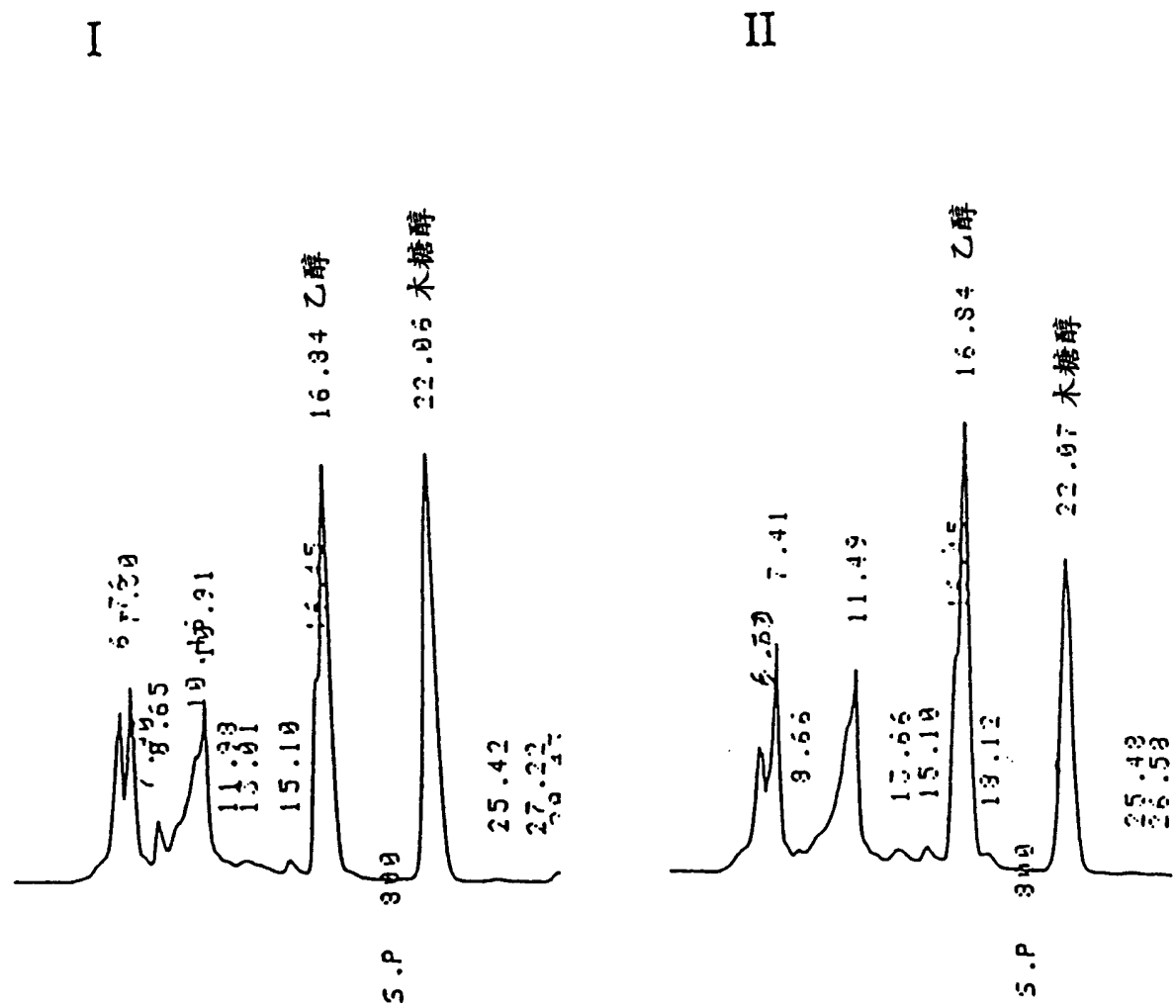


图6A

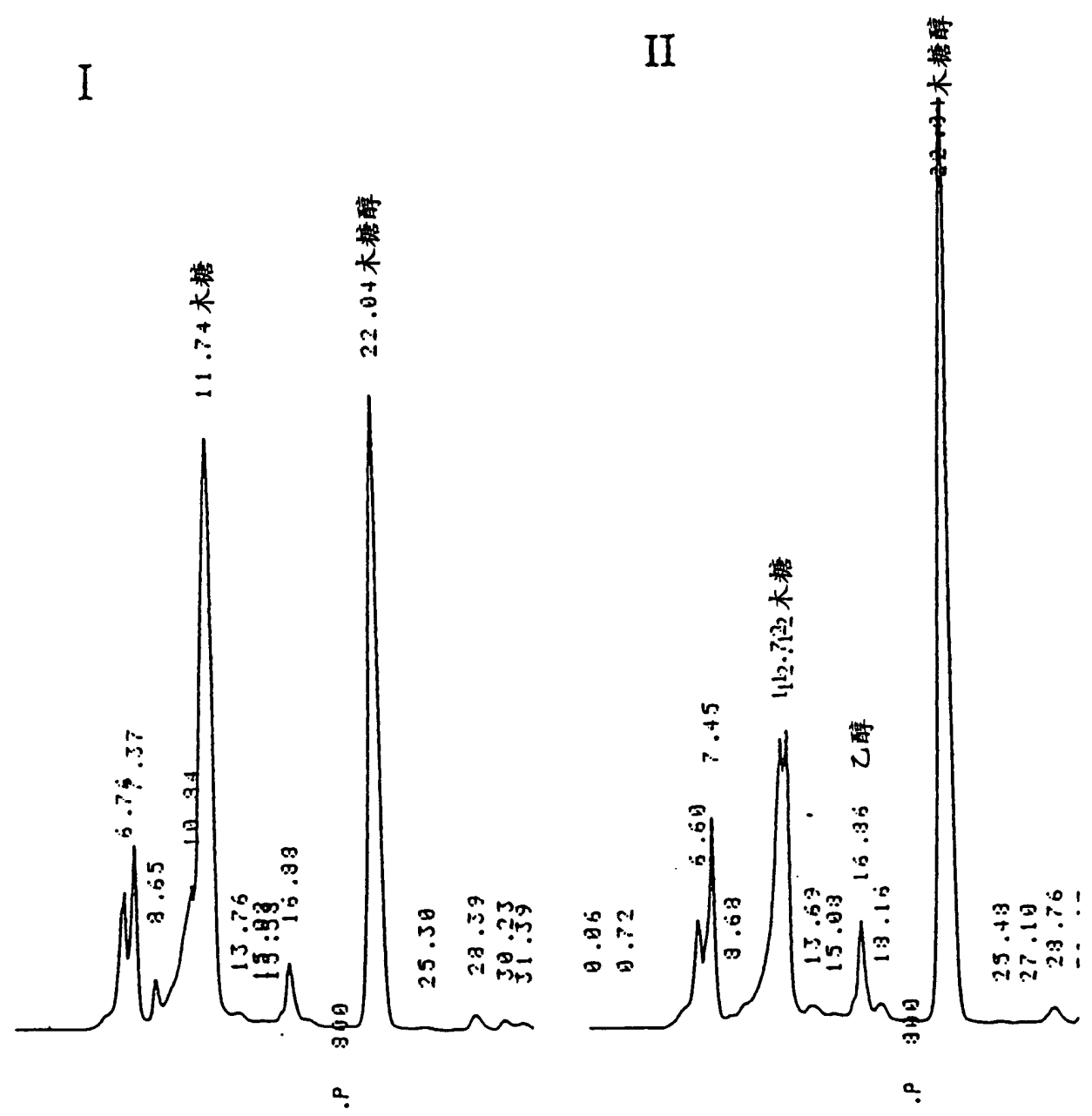


图6B

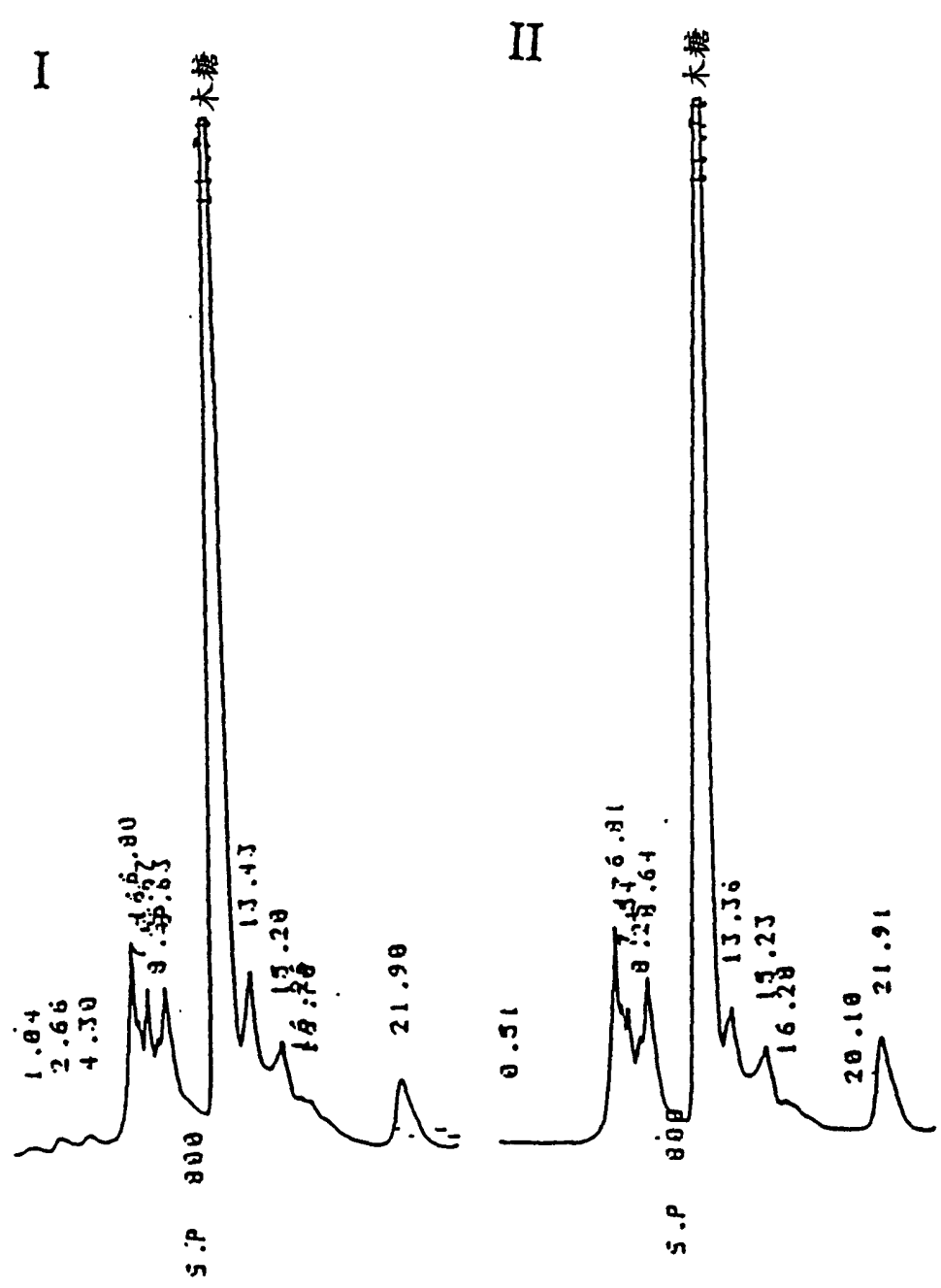


图6C

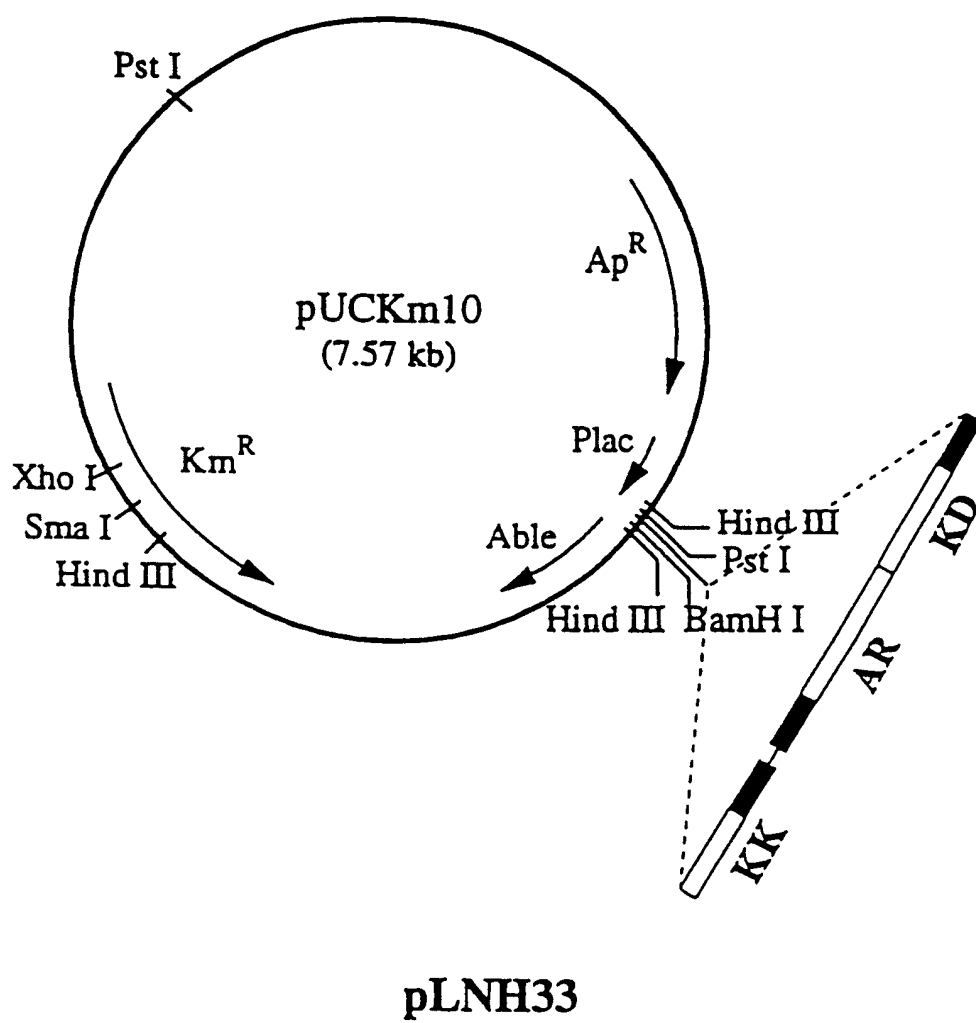


图7

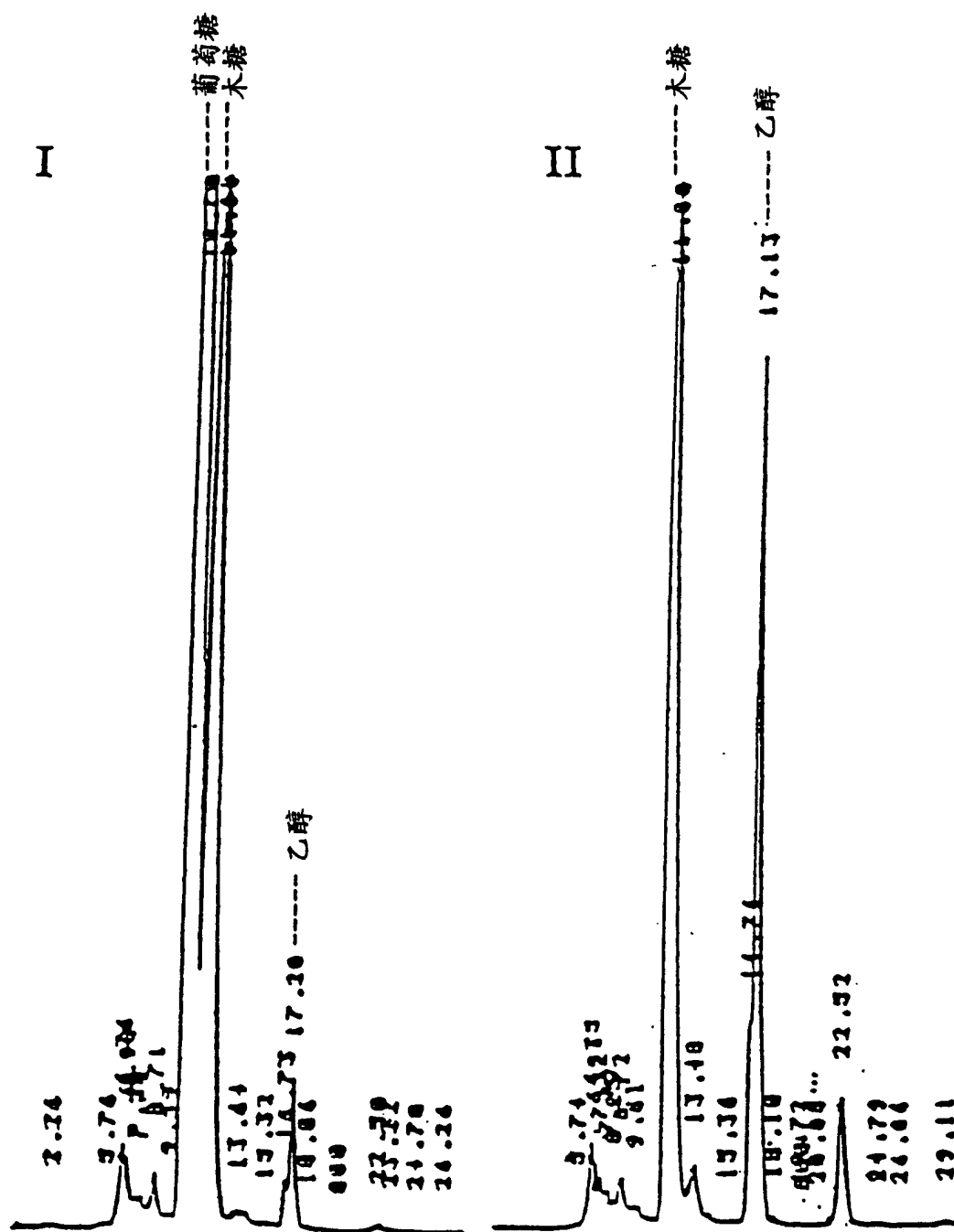


图8A

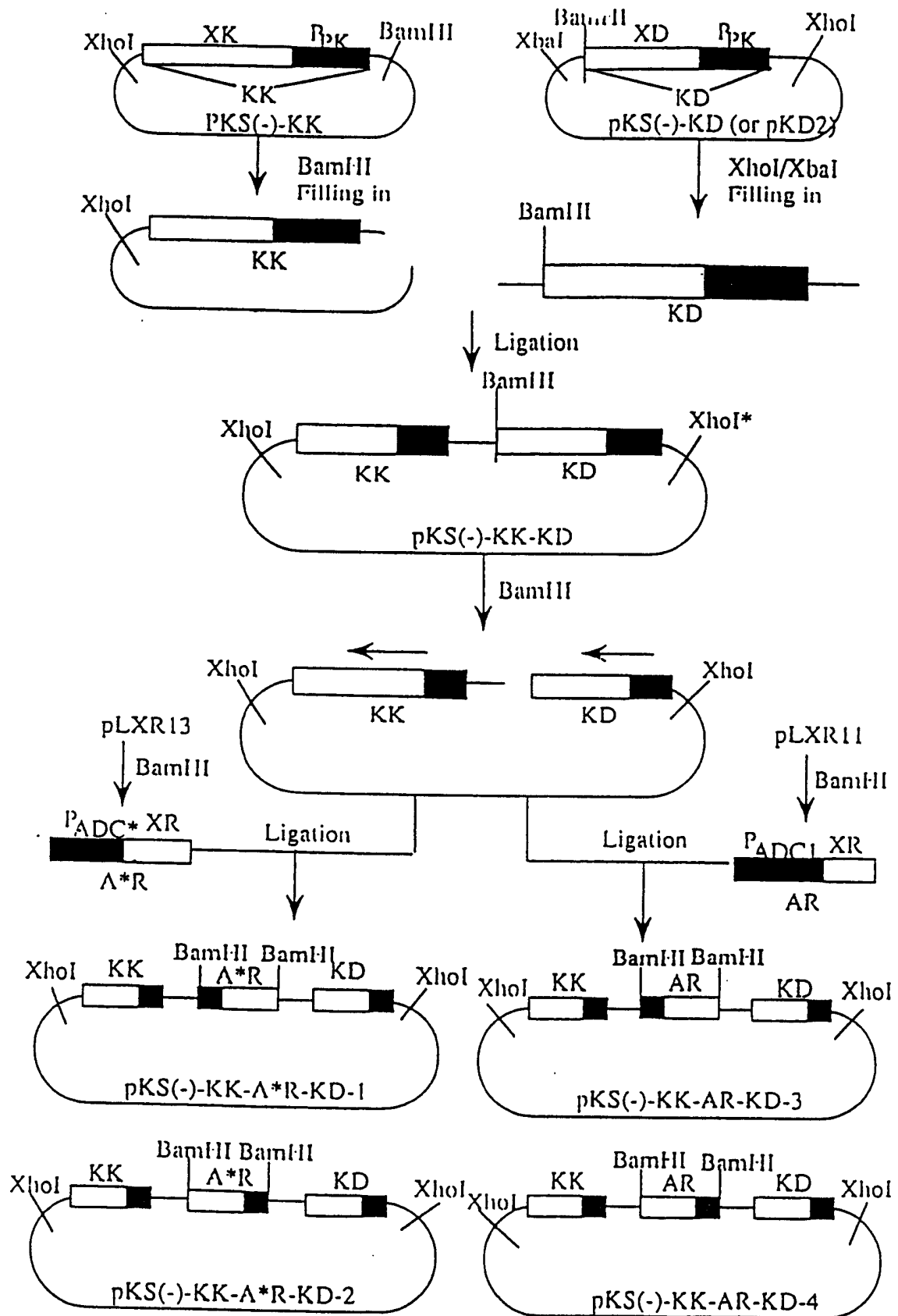


图9 pKS(-)-KK-AR-KD质粒的建成
*连接后XhoI位总重新形式

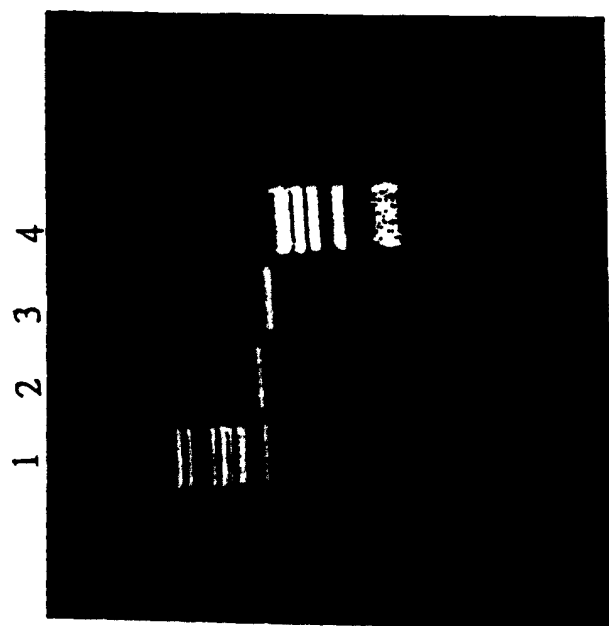


图10 用聚合酶链式反应(PCR)技术直接扩增从树干毕赤酵母染色体DNA得到的完整的木糖醇脱氢酶基因(XD)与不含启动子的XD

1. 分子标准,BamHI-EcoRI 降解入DNA.
2. 毕赤氏酵母木糖醇脱氢酶基因(完整的)
3. 毕赤氏酵母木糖醇脱氢酶基因(不含启动子)
4. 分子标准,Hae III 降解 ϕ X DNA.

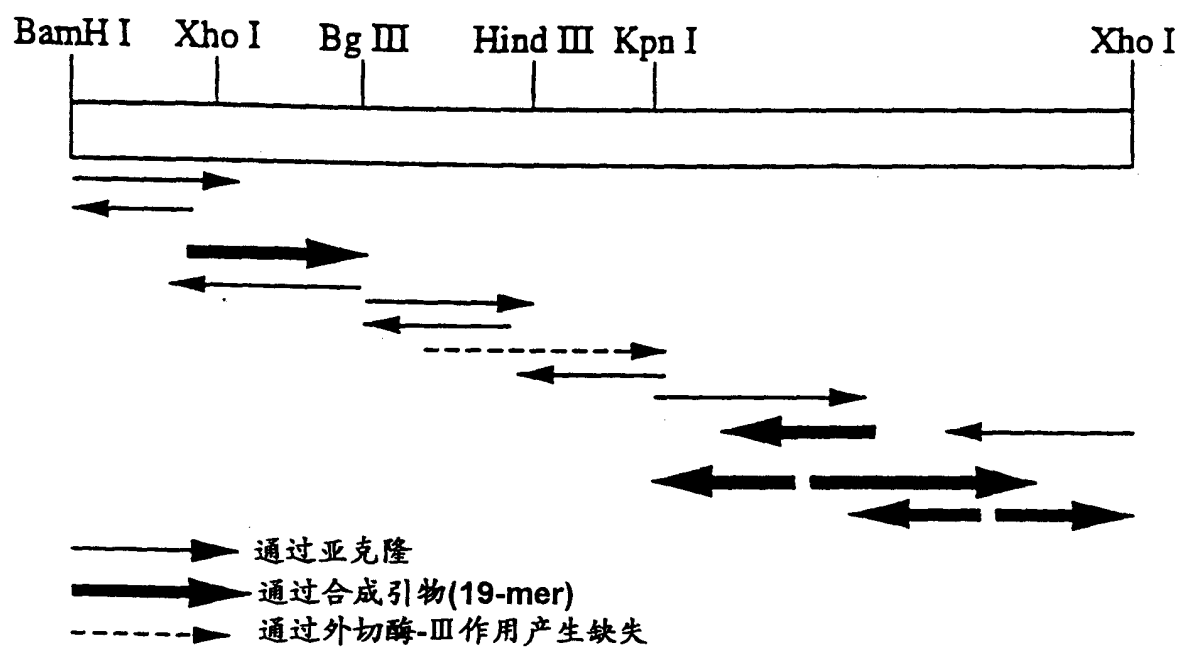


图11

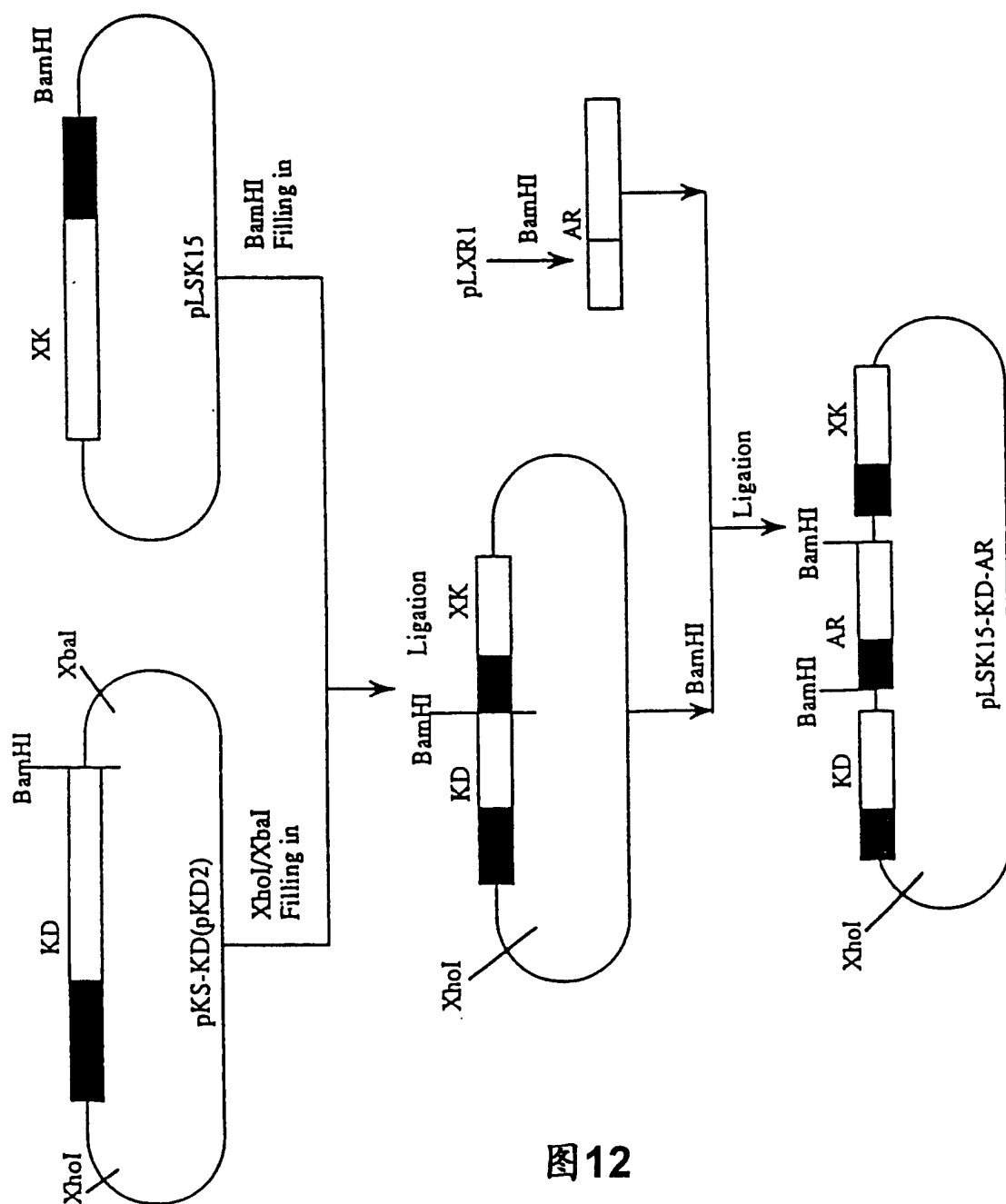


图12

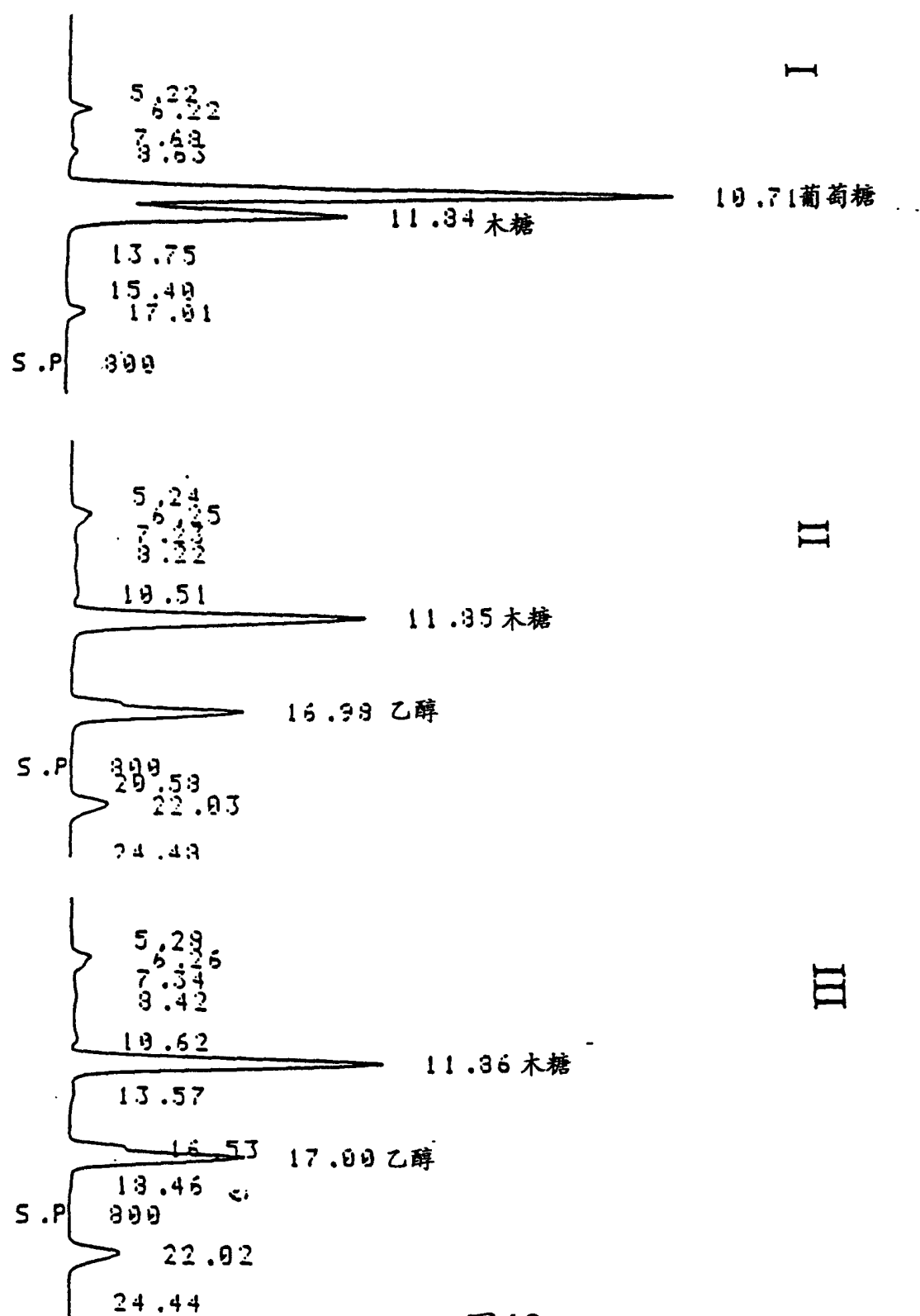


图13

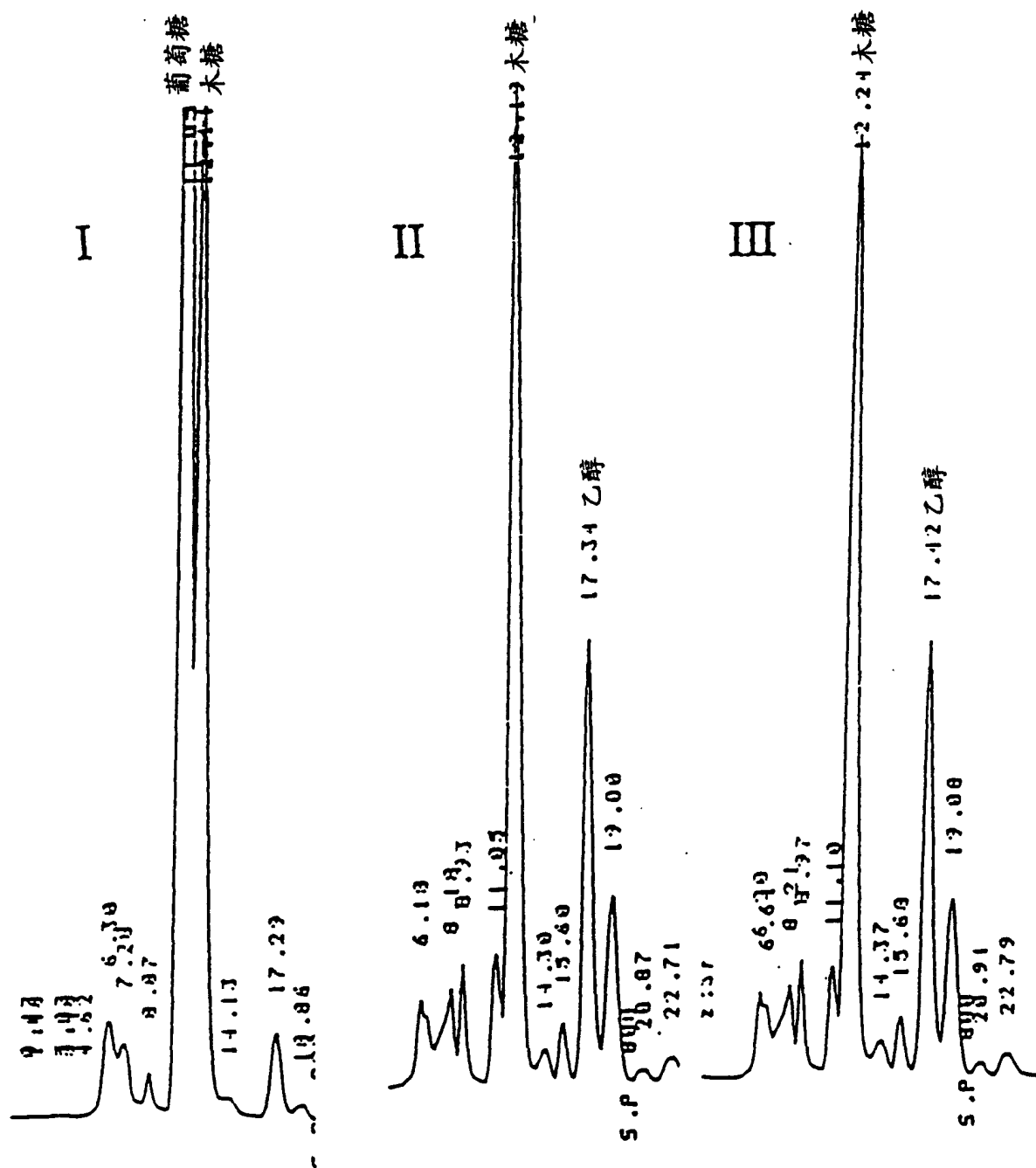


图14