

1. 一种大肠杆菌属的细菌,其中通过增强在细菌细胞中如下面(A)或(B)所定义的蛋白的活性而使所述细菌对 L-苏氨酸的耐性得到增强:

(A) 包括序列表中 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的蛋白质; 或

(B) 包括在序列表 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列中含有一个或多个氨基酸的缺失、替换、插入或添加的氨基酸序列的蛋白, 并且该蛋白有使所述细菌耐 L-苏氨酸的活性, 其中该蛋白质是由在严格条件下可与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 187-804 的核苷酸序列或由该核苷酸序列制备的探针杂交的 DNA 编码, 其中严格条件包括于 60°C 和 1 × SSC 和 0.1% SDS 的盐浓度下漂洗。

2. 权利要求 1 的细菌,其中通过增强在所述细菌细胞中如下面(C)或(D)所定义的蛋白的活性而使所述细菌对 L-高丝氨酸的耐性进一步得到增强:

(C) 包括序列表中 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白质; 或

(D) 包括在序列表 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中含有一个或多个氨基酸的缺失, 替换, 插入或添加的氨基酸序列的蛋白, 并且该蛋白有使所述细菌耐 L-高丝氨酸的活性, 其中该蛋白质是由在严格条件下可与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 557-1171 的核苷酸序列或由该核苷酸序列制备的探针杂交的 DNA 编码, 其中严格条件包括于 60°C 和 1 × SSC 和 0.1% SDS 的盐浓度下漂洗。

3. 权利要求 1 或 2 的细菌, 其中通过用编码(A)或(B)定义的蛋白的 DNA 转化所述细菌而使(A)或(B)中定义的蛋白的活性得到增强。

4. 权利要求 2 的细菌, 其中通过用编码(C)或(D)定义的蛋白的 DNA 转化所述细菌而使(C)或(D)中定义的蛋白的活性得到增强。

5. 一种生产氨基酸的方法, 包括如下步骤:

在培养基中培养如权利要求 1-4 任一项所述的能产生氨基酸的细菌以便于培养基中产生和积聚氨基酸, 以及从培养基中回收氨基酸。

6. 权利要求 5 的方法, 其中所述氨基酸选自 L-高丝氨酸, L-苏氨酸和分支氨基酸。

7. 权利要求 6 的方法, 其中分支氨基酸是 L-缬氨酸或 L-亮氨酸。

酸。

8. 一种编码如下面(A)或(B)定义的蛋白的DNA:

(A) 包括序列表中 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的蛋白质; 或

5 (B) 包括在序列表中 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列中的含有一个或多个氨基酸的缺失, 替换, 插入或添加的氨基酸序列的蛋白, 并且该蛋白有使所述细菌具有抗 L-苏氨酸的活性, 其中该蛋白质是由在严格条件下可与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 187-804 的核苷酸序列或由该核苷酸序列制备的探针杂交的 DNA 编码, 其中严格条件包括于 60℃ 和 1 × SSC 和 0.1% SDS 的盐浓度下漂洗。

10 9. 权利要求 8 的 DNA, 它是包括 SEQ ID NO: 3 中核苷酸序号之 187-804 的核苷酸序列的 DNA。

用于增强大肠杆菌属细菌对 L-苏氨酸耐性的蛋白质，
其编码基因及其用途

5

技术领域

本发明涉及生物技术，更具体地说涉及生产氨基酸的方法，特别是用大肠杆菌属细菌生产 L-高丝氨酸，L-苏氨酸或 L-亮氨酸的方法。

背景技术

10 本发明人得到了基于大肠杆菌 K-12 的突变体 thrR，该突变体对
在基本培养基中对高浓度的苏氨酸或高丝氨酸的耐性相关 (Astaurova,
O. B. 等 应用生物化学和微生物学., 21, 611 - 616 (1985))。该突变改
善了各自的大肠杆菌生成株 L-苏氨酸 (SU 专利号 974817)，高丝氨
酸和谷氨酸 (Astaurova, O. B. 等., 应用生物化学和微生物学, 27, 556
15 - 561, 1991) 的生产。

而且，本发明人发现 thrR 突变位于大肠杆菌的 18 分钟处并且该
突变发生在 pexB 和 ompX 基因之间的 ORF1。表达由该 ORF 所编码的蛋
白的表达单元被称为 rhtA 基因 (rht: 高丝氨酸和苏氨酸耐性)。rhtA
基因包括一 5'-非编码区，其中有 SD 序列，ORF1 和终止子。再者，
20 本发明人发现如果将野生型 rhtA 基因克隆为多拷贝状态，则其对耐受
苏氨酸和高丝氨酸起作用；而 thrR 突变是在 rhtA 基因中基于 ATG 起
始密码子在 -1 位用 A 替换 G (该突变被称为 "rhtA23") (第 17 届国
际生物化学和分子生物学会议暨美国生物化学和分子生物学联合会
1997 年会摘要, 加利福尼亚, 旧金山, 1997 年 8 月 24 - 29, 摘要号 457)。

25 已经发现，至少两个不同的基因在 rhtA 基因以多拷贝状态存在于
大肠杆菌中时赋予细菌对苏氨酸和高丝氨酸的耐性，而另一基因是赋
予对高丝氨酸耐性的 rhtB 基因 (俄罗斯专利申请号 98118425)。

发明内容

30 本发明的一个目的是提供以高产率生产氨基酸，特别是 L-高丝氨
酸，L-苏氨酸和分支氨基酸的方法。

本发明人发现当用多拷贝载体克隆大肠杆菌染色体上的 86 分钟区
域时，其赋予大肠杆菌细胞对 L-高丝氨酸的耐性。本发明人还发现在

其上游有一参与对苏氨酸耐性的基因 *rhtC*，象扩增 *rhtA* 基因一样当这些基因被扩增时，大肠杆菌的氨基酸产率得到提高。基于这些发现，从而完成了本发明。

从而，本发明提供：

5 (1) 一种大肠杆菌属细菌，其中通过增强在细菌细胞中如下面 (A) 或 (B) 所定义的蛋白的活性而使所述细菌对 L-苏氨酸的耐性得到增强：

(A) 包括序列表中 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的蛋白质；和

10 (B) 包括在序列表 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列中含有一个或多个氨基酸的缺失，替换，插入或添加的氨基酸序列的蛋白，并且该蛋白有使所述细菌耐 L-苏氨酸的活性；

(2) (1) 的细菌，其中通过增强在所述细菌细胞中如下面 (C) 或 (D) 所定义的蛋白的活性而使所述细菌对 L-高丝氨酸的耐性进一步得到增强；

15 (C) 包括序列表中 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白质；和

(D) 包括在序列表 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中含有一个或多个氨基酸的缺失，替换，插入或添加的氨基酸序列的蛋白，并且该蛋白有使所述细菌耐 L-高丝氨酸的活性；

20 (3) (1) 或 (2) 的细菌，其中通过用编码在 (A) 或 (B) 定义的蛋白的 DNA 转化所述细菌而使在 (A) 或 (B) 中定义的蛋白的活性得到增强；

(4) (2) 的细菌，其中通过用编码在 (C) 或 (D) 定义的蛋白的 DNA 转化所述细菌而使在 (C) 或 (D) 中定义的蛋白的活性得到增强；

(5) 一种生产氨基酸的方法，包括如下步骤：

25 在培养基中培养 (1) - (4) 任一项所述的能产生氨基酸的细菌以便于培养基中产生和积聚氨基酸，以及从培养基中回收氨基酸；

(6) (5) 的方法，其中所述氨基酸选自 L-高丝氨酸，L-苏氨酸和分支氨基酸；

(7) (6) 的方法，其中分支氨基酸是 L-缬氨酸或 L-亮氨酸；

(8) 一种编码如下面 (A) 或 (B) 定义的蛋白的 DNA：

30 (A) 包括序列表中 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的蛋白质；和

(B) 包括在序列表中 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列中含有一个或多个氨基酸的缺失，替换，插入或添加的氨基酸序列的蛋白，并且该

蛋白有使所述细菌抗 L-苏氨酸的活性;

(9) (8) 的 DNA, 它是如下述 (a) 或 (b) 所定义的 DNA:

(a) 包括 SEQ ID NO: 3 中核苷酸序号之 187-804 的核苷酸序列的 DNA;

5 (b) 在严格条件下能与 SEQ ID NO: 3 的 187-804 核苷酸序列杂交的 DNA 或从该核苷酸序列制备的探针, 并且该 DNA 编码一种所述细菌具有抗 L-苏氨酸活性的蛋白。

(10) (9) 的 DNA, 其中严格条件是指漂洗在 60℃, 盐浓度为 1 × SSC 和 0.1 SDS % 的条件下进行。

10 编码如上述 (A) 或 (B) 中定义的蛋白的 DNA 片段可以称为 “rhtC” 基因, rhtC 基因编码的蛋白称为 “RhtC 蛋白”, 编码如上述 (C) 或 (D) 中定义的蛋白的 DNA 片段可以称为 “rhtB” 基因, rhtB 基因编码的蛋白称为 “RhtB 蛋白”。RhtC 蛋白所起的赋予细菌对 L-苏氨酸耐性的活性 (即使细菌具有 RhtC 蛋白 L-苏氨酸耐性) 可以被称为 “Rt 活性”, RhtB 蛋白所起的赋予细菌对 L-高丝氨酸耐性的活性 (即使细菌具有 RhtB 蛋白 L-高丝氨酸耐性) 可以被称为 “Rh 活性”。编码 RhtB 蛋白或 RhtC 蛋白的结构基因可以被称为 “rthB 结构基因” 或 “rthC 结构基因”。术语 “增强 Rt 活性或 Rh 活性” 是指赋予细菌对苏氨酸或高丝氨酸的耐性或通过增加 RthC 蛋白或 RthB 蛋白的数目, 增加这些蛋白的比活性或使针对这些蛋白的表达或活性的负调节脱敏等方式而增强耐性。

20 术语 “编码蛋白的 DNA” 指该 DNA 是双链时其中一条链编码蛋白。L-苏氨酸耐性指细菌在含有使野生型菌株不能生长的苏氨酸浓度的基本培养基上生长的特性, 通常苏氨酸的浓度大于 30 mg/ml。L-高丝氨酸耐性指细菌在含有使野生型菌株不能生长的高丝氨酸浓度的基本培养基上生长的特性, 通常高丝氨酸的浓度大于 5 mg/ml。产生氨基酸的能力指细菌在培养基中比野生型菌株以更大量产生和积聚氨基酸的特性。

根据本发明, 可以赋予大肠杆菌属细菌对高浓度苏氨酸, 或高浓度苏氨酸和高丝氨酸的耐性。对苏氨酸, 或苏氨酸和高丝氨酸抗性增强的大肠杆菌属细菌可以在培养基中以高产率积聚氨基酸特别是 L-高丝氨酸, L-苏氨酸, 或分支氨基酸如 L-缬氨酸和 L-亮氨酸。

30 本发明将详述如下。

<1> 用于本发明的 DNA

用于本发明的第一个 DNA 编码一个有 Rt 活性的蛋白并且具有 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 (rhtC) 基因。具体地说, 该 DNA 可以举例为包括 SEQ ID NO: 3 核苷酸序号 187-804 的核苷酸序列的 DNA。

5 用于本发明的第二个 DNA 编码一个有 Rh 活性的蛋白并且具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列 (rhtB) 基因。具体地说, 该 DNA 可以举例为包括 SEQ ID NO: 1 核苷酸序号 557-1171 的核苷酸序列的 DNA。

含有 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的 rhtB 基因对应于一与 GenBank 登记号 M87049 序列互补的序列的一部分, 而且包含 f138 (M87049 的核苷酸号 61959-61543), 该 f138 是一个位于大肠杆菌染色体 86 分钟上的已知的但功能未知的 ORF (开读框) 及其 5'-和 3'-侧翼区。在 5'-侧翼区仅有 160 核苷酸的 f138 不能赋予对高丝氨酸的耐性。在 M87049 的 62160 和 61959 核苷酸之间 (ORFf138 的上游) 没有终止密码子。而且, 在该序列的一个 ATG 密码子之前是一个核糖体结合位点 (M87049 的 62171-62166)。因此, 编码区的长度为 201bp。更大的 ORF (M87049 的核苷酸序号 62160-61546) 被称为 rhtB 基因。

15 可以通过, 例如, 如下方法用大肠杆菌 K12 或 W3110 的溶原株裂解液感染大肠杆菌的 Mucls 溶原株而得到 rhtB 基因, 而在该方法中使用了 mini-Mu d5005 噬粒 (Groisman, E. A. 等细菌学杂志., 168, 357-364 (1986)) 并从生长在含卡那霉素 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 L-高丝氨酸 (10 mg/ml) 的基本培养基上分离噬粒 DNA。正如下文中实施例中所描述的, rhtB 基因被定位在大肠杆菌染色体的 86 分钟处。因此, 可以通过克隆杂交或 PCR (聚合酶链式反应, 参照 White, T. J. 等, 遗传学动态. 5, 185 (1989), 其中使用了含有对应于大肠杆菌染色体上 86 分钟附近区域序列的寡核苷酸。

25 可以替代地, 可以根据 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列设计寡核苷酸。用寡核苷酸对作 PCR 的引物, 可以扩增整个编码区, 其中寡核苷酸对的核苷酸序列对应于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序号 557 以上的上游区和核苷酸序号 1171 以下的下游区。

30 可以使用商业上可以购得的 DNA 合成仪 (例如, Applied Biosystems 生产的 380B 型 DNA 合成仪) 以常规方法如磷酸亚胺方法进行合成寡核苷酸。而且, 可以根据生产商提供的方法用 Taq DNA 合成酶 (Takara Shuzo

公司提供)以商业上可以买到的 PCR 设备(如, Takara Shuzo 公司的 PJ200 型热循环仪)继续扩增。

如下面实施方案中所描述的,在克隆 rhtB 时,偶尔可以在含有 rhtB 基因的 DNA 片段中得到 rhtC 基因。RhtC 基因对应于下文所述校正后的序列 0128 (GenBank 登记号 M87049 核苷酸序号 60860-61480), 0128 序列是一个已知的但功能未知的 ORF。可用根据 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列设计的寡核苷酸通过杂交或 PCR 而得到 rhtc 基因。用寡核苷酸对作 PCR 的引物,可以扩增整个编码区,其中寡核苷酸对的核苷酸序列对应于 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序号 187 以上的上游区和核苷酸序号 804 以下的下游区。

在本发明中,编码本发明的 RhtB 蛋白的 DNA 编码的 RhtB 蛋白可以在一个或多个位点有一个或几个氨基酸的缺失,替换,插入或添加,前提条件是所编码的 RhtB 蛋白的 Rh 活性没有被降低。类似地,编码本发明的 RhtC 蛋白的 DNA 编码的 RhtC 蛋白可以在一个或多个位点有一个或几个氨基酸的缺失,替换,插入或添加,前提条件是所编码的 RhtC 蛋白的 Rt 活性没有被降低。

例如,可以通过定点突变而使特定位点的一或几个碱基被缺失,替换,插入或添加从而对核苷酸序列进行修饰,这样即可以得到与如上所述的 RhtB 或 RhtC 蛋白基本相同的蛋白的 DNA。可以用常规的突变处理得到上述的 DNA 修饰。突变处理包括:体外用羟胺处理编码 RhtB 蛋白或 RhtC 蛋白的 DNA 的方法,用紫外线照射或使用常用的突变处理剂 N-甲基-N'-硝基-N-硝基胍和亚硝酸处理携带有编码 RhtB 蛋白的 DNA 的微生物如大肠杆菌属细菌的方法。

可以通过在合适的细胞中多拷贝表达上述经过突变处理 DNA 并评价其对高丝氨酸或苏氨酸的耐性和选择耐性增加的 DNA,从而得到编码与上述的 RhtB 或 RhtC 蛋白基本相同的蛋白的 DNA。

一般都知道,蛋白的氨基酸序列和其编码核苷酸序列可能在种类,菌株,突变体或变异体上有轻微的不同。

可以用如下方法获得编码与 RhtB 蛋白或 RhtC 蛋白基本相同的蛋白的 DNA:在合适的细胞中多拷贝表达经过体外突变处理的 DNA,评价其对高丝氨酸的耐性,并选择耐性增强的 DNA。

大家都知道,蛋白质的氨基酸序列与其编码核苷酸序列在物种,

菌株，突变体或变异体之间有少许不同。

因此，可以通过如下方法获得编码与 RhtC 蛋白质的基本相同的蛋白的 DNA：从经过突变处理的大肠杆菌属细菌或自发大肠杆菌属细菌的突变体或变异体分离 DNA，该 DNA 在严格条件下与含有 SEQ ID NO: 3 核苷酸序列 187-804 的核苷酸的 DNA 或与可以从该段核苷酸序列得到的探针杂交，并且其编码的蛋白具有 Rt 活性。

而且，可以通过如下方法获得编码与 RhtB 蛋白质的基本相同的蛋白的 DNA：从经过突变处理的大肠杆菌属细菌或自发大肠杆菌属细菌的突变体或变异体分离 DNA，该 DNA 在严格条件下与含有 SEQ ID NO: 1 核苷酸序列 557-1171 的核苷酸的 DNA 或与可以从该段核苷酸序列得到的探针杂交，并且其编码的蛋白具有 Rh 活性。

术语“严格条件”在本文的含义是在该条件下形成了所谓特异的杂交而没有形成非特异的杂交。很难用什么数字来清楚的表达该条件。但是，严格条件可以是，例如，相互之间的同源性不小于 70% 的 DNA 之间可以杂交而低于上述数值的 DNA 之间不能杂交。可以替代地，相对于 Southern 杂交中普通洗涤条件，可以例举出如下的条件，其盐浓度是例如，60℃，1×SSC，0.1% SDS，优选 0.1×SSC，0.1% SDS。

<2> 本发明的大肠杆菌属细菌

本发明的大肠杆菌属细菌是属于大肠杆菌属的 Rt 活性增强的细菌。本发明细菌的优选实施方案是 Rh 活性也得到增强的细菌。大肠杆菌属细菌的例子是大肠杆菌。可以按如下方法增强 Rt 活性，例如，扩增细胞中 rhtC 结构基因的拷贝数，或者用重组 DNA 转化大肠杆菌属细菌，其中在重组 DNA 中含有编码 RhtC 蛋白的 rhtC 结构基因的 DNA 片段被与可以在大肠杆菌属细菌中有效起作用的启动子序列相连接。也可以通过用可以在大肠属细菌中有效起作用的启动子序列替换 rhtC 基因染色体上的启动子序列而使 Rt 活性得到增强。

另外，可以按如下方法增强 Rh 活性，例如，扩增细胞中 rhtB 结构基因的拷贝数，或者用重组 DNA 转化大肠杆菌属细菌，其中在重组 DNA 中含有编码 RhtB 蛋白的 rhtB 结构基因的 DNA 片段被与可以在大肠杆菌属细菌中有效起作用的启动子序列相连接。也可以通过用可以在大肠杆菌属细菌中有效起作用的启动子序列替换 rhtB 基因染色体上的启动子序列而使 Rh 活性得到增强。

可以通过将携带有 *rhtC* 或 *rhtB* 结构基因的多拷贝载体导入至大肠杆菌属的细菌中而在细胞中扩增 *rhtC* 或 *rhtB* 结构基因的拷贝数。具体地说，可以通过将携带有 *rhtC* 或 *rhtB* 结构基因的质粒，噬菌体或转座子 (Berg, D.E., Berg, C.M., Bio/Techol., 1, 417 (1983)) 导入至大肠杆菌属的细菌中而增加拷贝数。

多拷贝载体的例子有质粒载体 pBR322, pMW118, pUC19 等，噬菌体载体 λ 1059, λ BF101, M13mp9 等。转座子有例如 Mu, Tn10, Tn5 等。

可以用例如, D. A. M. Morrison 等的方法(酶学方法, 68, 32(1979)) 将 DNA 导入到大肠杆菌属细菌, 或使用以氯化钙处理受体菌以增加对 DNA 的通透性的方法 (Mandel, M. 和 Higa, A., 分子生物学杂志, 53, 159, (1970))。

如上所述, 如果增强了产氨基酸的大肠杆菌属细菌中的 Rt 活性或 Rt 和 Rh 二者的活性, 则氨基酸的产量可以得到增加。由于增强了大肠杆菌属细菌中的 Rt 活性或 Rt 和 Rh 二者的活性, 则能够产生目的氨基酸的菌株得到了使用。另外, 可以将产生氨基酸的能力赋予其中的 Rt 活性或 Rt 和 Rh 二者的活性得到增强的细菌中。

以 *rhtC* DNA 片段的扩增为基础, 得到了比不含扩增的 *rhtC* DNA 片段能积聚更高量的氨基酸的新菌株产高丝氨酸的大肠杆菌 MG442/pRhtC; 产苏氨酸的大肠杆菌 MG442/pVIC40, pRhtC; 产高丝氨酸, 缬氨酸和亮氨酸的大肠杆菌 NZ10/pRhtBC; NZ10/pRhtB, pRhtC。

新菌株已经根据布达佩斯条约进行了国际保藏, 保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心(VKPM)。大肠杆菌 MG442/pRhtC 的登记号为 VKPM B-7700; 大肠杆菌 MG442/pVIC40, pRhtC 的登记号是 VKPM B-7680; 大肠杆菌 NZ10/pRhtB, pRhtC 的登记号是 VKPM B-7681; 大肠杆菌 NZ10/pRhtBC 的登记号是 VKPM B-7682。

菌株 MG442/pRhtC (VKPM B-7700) 表现出如下的培养形态学和生物化学特征。

细胞形态学

革兰氏阴性, 圆头的微弱能动的杆状。长度, 1.5-2.0 μm 。

培养特征

牛肉提取物琼脂:

37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 小时后, 产生直径 1-3 mm 的圆的苍白的半透明的克

隆，其特征在于表面光滑，边缘规则或稍微呈波纹状，中间稍微突起，结构均一，粥状粘稠，容易乳化。

Luria's 琼脂：

5 37℃培养 24 小时后，产生直径 1.5-2.5 mm 的苍白的半透明的克隆，其表面光滑，结构均一，粥状粘稠，容易乳化。

基本的琼脂粘稠培养基 M9：

37℃培养 40-48 小时后，产生直径 0.5-1.5 mm 克隆，其颜色是微灰白色，半透明的克隆，稍微突起，表面光泽。

培养在牛肉提取物肉汤中：

10 37℃培养 24 小时后，很混浊，气味特殊。

生理和生物化学特征

穿刺接种培养在牛肉提取物琼脂中：

在整个接种区生长良好。证明该微生物是兼性厌氧的。

不液化明胶。

15 在牛奶上生长很好，并使牛奶凝固。

不产生吡啶。

温度条件：在 20-42℃生长于牛肉提取物肉汤中，最适温度 33-37℃。

培养基的 pH 值：在液体培养基中 pH 6-8，最适值 7.2。

20 碳源：在葡萄糖，果糖，乳糖，甘露糖，半乳糖，木糖，甘油，甘露糖醇上生长良好，产生气和酸。

氮源：以氨盐，硝酸盐以及一些有机化合物来源的可同化氮。

对氨苄青霉素有抗性。

25 L-异亮氨酸被用作生长因子。但是，该菌株可以在没有亮氨酸的情况下缓慢生长。

所含的质粒：该细胞含有多拷贝的杂种质粒 pRhtC 以保证对氨苄青霉素（100mg/ml）的抗性，并带有 rhtC 基因以增加对苏氨酸（50 mg/ml）的耐性。

30 除了 pRhtC 之外，菌株大肠杆菌 MG442/pVIC40，pRhtC（VKPM B-7680）和菌株 VKPM B-7700 的培养形态和生物化学特征相同，其含有多拷贝的杂种质粒 pVIC40 以保证对链霉素（100mg/ml）的抗性并带有苏氨酸操纵子基因。

除了用 L-苏氨酸 (0.1-5 mg/ml) 代替 L-异亮氨酸作为生长因子外, 菌株大肠杆菌 NZ10/pRhtB, pRhtC (VKPM B-7681) 和菌株 VKPM B-7700 的培养形态和生物化学特征相同。此外, 其含有多拷贝的杂种质粒 pRhtB 以保证对卡那霉素 (50mg/ml) 的抗性并带有 rhtB 基因以赋予对高丝氨酸 (10 mg/ml) 的耐性。

除了含有多拷贝的杂种质粒 pRhtBC 以保证对氯苄青霉素 (100 mg/ml) 的抗性并带有 rhtC 和 pRhtC 基因以赋予对高丝氨酸 (10 mg/ml) 和 L-苏氨酸 (50 mg/ml) 的耐性外, 菌株大肠杆菌 NZ10/pRhtBC (VKPM B-7682) 和菌株 VKPM B-7681 的培养形态和生物化学特征相同。

10) <3> 产生氨基酸的方法

可以通过在培养基中培养一种细菌以在培养基中产生和积聚氨基酸并从培养基中回收氨基酸从而有效地产生氨基酸, 其中该种细菌由于拷贝了多个 rhtC 基因, 或 rhtC 和 rhtB 基因两者而使其 Rt 活性, 或 Rt 和 Rh 两者的活性都得到增强。氨基酸的例子优选是 L-苏氨酸, L-高丝氨酸和分支链氨基酸。分支链氨基酸的例子有 L-缬氨酸, L-亮氨酸和 L-异亮氨酸, 优选 L-缬氨酸和 L-亮氨酸。

在本发明的方法中, 大肠杆菌属细菌的培养, 从液体培养基收集和纯化氨基酸都可以用与传统细菌发酵生产氨基酸相似的方式进行。用于培养的培养基可以是合成的或天然的培养基, 只要其中含有碳源, 氮源和矿物质以及细菌生长时需要的合适的量的营养即可。根据细菌的同化能力, 碳源可以包含葡萄糖, 蔗糖和各种有机酸。氮源可以使用氨, 各种铵盐如硫酸铵, 其他含氮化合物如胺, 天然氮源如胨, 大豆水解产物和分解的发酵微生物。矿物质有, 磷酸二氢钾, 硫酸镁, 氯化钠, 硫酸亚铁, 硫酸锰和碳酸钙。

25 培养优选在有氧条件下如摇动, 通气和搅拌的情况下进行。培养温度通常是 20-40℃, 优选 30-38℃。培养的 pH 值通常是 5-9, 优选 6.5 和 7.2。培养物的 pH 可以用氨, 碳酸钙, 各种酸, 各种碱和缓冲液进行调整。通常 1-3 天的培养就可以在培养基中积聚起靶氨基酸。

30 可以按如下方法回收氨基酸: 通过在培养后离心或膜过滤去掉固体如细胞, 然后通过离子交换, 浓缩和结晶分离方法收集和纯化靶氨基酸。

附图简述

图 1 示 *rhtB* 基因和 *rhtC* 基因的克隆和鉴定。

图 2 示带有 *rhtB* 基因的质粒 pRhtB 的结构。

图 3 示带有 *rhtC* 基因的质粒 pRhtC 的结构。

图 4 示带有 *rhtB* 和 *rhtC* 基因的质粒 pRhtBC 的结构。

5

实施发明的最佳方式

下面将参照实施例对本发明进行具体解释。在下面的实施例中，除非特别指出，氨基酸是指 L-构型。

实施例 1: 获得 *rhtB* 和 *rhtC* DNA 片段

第一步: 将有高丝氨酸和苏氨酸耐性的基因克隆进 mini-Mu 噬粒

10 将有高丝氨酸和苏氨酸耐性的基因体内克隆进 mini-Mu d5005 噬粒 (Groisman, E. A., 等, 细菌学杂志., 168, 357-364(1986))。菌株 MG442 的 MUCts62 溶原体 (Guayatiner 等., Genetika (在俄罗斯), 14, 947-956(1978)) 被用作供体。用新鲜制备的裂解物去感染菌株 VKPM B-513 (hfr K10 metB) 的 MuCts 的溶原衍生物。将细胞种在含甲硫氨酸
15 (50 µg/ml), 卡那霉素 (40µg/ml) 和高丝氨酸 (10 µg/ml) 的 M9 基本培养基中。48 小时后挑取和分离菌落。分离质粒 DNA 并用标准技术转化菌株 VKPM B-513。在带有卡那霉素的 L-肉汤琼脂培养板上筛选菌落。从耐高丝氨酸的菌落中分离质粒 DNA, 并对插入片段进行限制性图谱分析。结果发现, 从供体克隆了两种类型的属于不同染色体区域
20 的插入子。因此, 在大肠杆菌中至少两种不同的基因以多拷贝形式赋予对高丝氨酸的耐性。两种插入子中的一个已经报道过的 *rhtA* 基因 [第 17 届国际生物化学和分子生物学会议暨美国生物化学和分子生物学联合会 1997 年年会, 旧金山, 加利福尼亚, 1997 年 8 月 24-29]。两种插入子中的另一个是赋予高丝氨酸的 0.8 kb 的 MluI-MluI 片段 (图
25 1)。

第二步: *rhtB* 和 *rhtC* 基因的鉴定

用 Sanger 的双脱氧链终止法测定插入子片段的序列。对 DNA 的两条链进行全长测序, 所有的接头都重叠。测序结果表明包括
30 f138 (GenBank 登记号 M87049 的核苷酸号 61543-61959), 该 f138 是一个已知的但功能未知的 ORF, 其位于大肠杆菌染色体的 86 分钟处及其上游 350bp 的区域 (M87049 的下游处)。在 5'-侧翼区仅有 160 核苷酸的 f138 不能赋予对高丝氨酸的耐性。在 f138 的上游 M87049 的核

苷酸的 62160 和 61950 之间没有终止子。而且,在该序列中,在一个 ATG 后接着一个核糖体结合位点。较大的 ORF (核苷酸号 62160 - 61546) 称为 rhtB 基因。从该基因推导出的 RhtB 蛋白含有高度亲水的区域并可能含有跨膜区。

5 如上所述,含有该基因的质粒仅仅赋予细胞对高浓度高丝氨酸的耐性。由于开始的 SacII - SacII DNA 片段含有第二个未经鉴定的 ORF, 0128, 故将该基因亚克隆以检测其赋予对高丝氨酸和苏氨酸耐性的稳定性。已经证明,含有 0128 的质粒 (ClaI-Eco47III 片段) 赋予对 50 mg/ml 的苏氨酸的耐性 (图 1)。将亚克隆片段测序后发现它在 M87049 的核苷酸 61213 和 61214 之间还另有一个核苷酸 G。序列中核苷酸的增加消除了移码并使 ORF 的 5-侧翼区到达 60860 核苷酸。该新基因称为 rhtC。发现 rhtB 和 rhtC 基因两者对参与谷氨酸棒杆菌 (*Cornebacterium glutamicum*) 的赖氨酸外运的转运蛋白一致。

15 实施例 2: rhtB 和 rhtC 基因扩增对高丝氨酸基因产生的影响

<1> 构建 L-高丝氨酸生产菌株大肠杆菌 NZ10/pAL4, pRhtB 和高丝氨酸的生产

将 rhtB 基因插入到 pUK21 (Vieira, J. 和 Messing, J., 基因, 100, 189-194 (1991)) 以得到 pRhtB (图 2)。

20 用质粒 pAL4 转化大肠杆菌菌株 NZ10 以得到菌株 NZ10/pAL4, 其中 pAL4 质粒是插入了编码天冬氨酸激酶 - 高丝氨酸脱氢酶的 thrA 基因的 pBR322 载体。菌株 NZ10 是从大肠杆菌 C600 (thrB, leuB) (Appleyard R. K., 遗传学, 39, 440 - 452, 1954) 得到的 leuB⁺ 恢复突变体 thrB⁻。

用 pUK21 或 pRhtB 转化菌株 NZ10/pAL4 以得到菌株 NZ10/pAL4, pUK21 和 NZ10/pAL4, pRhtB。

25 将得到的转化体分别培养在含 50 mg/ml 卡那霉素和 100 mg/ml 氨苄青霉素的营养肉汤中于 37°C 培养 18 小时, 将 0.3 ml 培养物接种到 20 × 200 mm 的试管的 3ml 的发酵培养基 (其组成如下) 中并且在发酵培养基中含有 50 mg/ml 卡那霉素和 100 mg/ml 氨苄青霉素, 于 37°C 在转台上培养 48 小时。培养后, 用已知方法测定培养基中积聚的高丝氨酸量和在 560 nm 处的吸收值。

发酵培养基组成 (g/L)

葡萄糖 80

	(NH ₄) ₂ SO ₄	22
	K ₂ HPO ₄	2
	NaCl	0.8
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.8
5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.02
	盐酸硫胺素	0.2
	酵母提取物	1.0
	CaCO ₃	30

10 (CaCO₃单独灭菌)

结果如表 1 所示。如表 1 所示，菌株 NZ10/pAL4, pRhtB 比 rhtB 基因没有增强的菌株 NZ10/pAL4, pUK21 积聚了更大量的高丝氨酸。

表 1.

菌株	OD560	积聚的高丝氨酸量 (g/L)
NZ10/pAL4, pUK21	14.3	3.3
NZ10/pAL4, pRhtB	15.6	6.4

15 <2> 高丝氨酸生产菌大肠杆菌 MG442/pRhtC 的构建和高丝氨酸的生产

将 rhtC 基因插入到 pUC21 (Vieira, J. 和 Messing, J., 基因, 100, 189-194(1991)) 以得到 pRhtC (图 3)。

20 已知大肠杆菌 MG442 产生苏氨酸的量小于 3 g/L (Gusyatiner, 等., 1978, Gentika (俄罗斯) 14: 947-956), 用质粒 pUC21 或 pRhtC 转化该菌株以得到菌株 MG442/pUC21 和 MG442/pRhtC。

25 将得到的转化体分别培养在含 100 mg/ml 氨苄青霉素的营养肉汤中于 37℃ 培养 18 小时, 将 0.3 ml 培养物接种到 20 × 200 mm 的试管的 3ml 的发酵培养基 (其组成如下) 中并且在发酵培养基中含有 50 mg/ml 卡那霉素和 100 mg/ml 氨苄青霉素, 于 37℃ 在转台上培养 48 小时。培养后, 用已知方法测定培养基中积聚的高丝氨酸量和在 560 nm 处的吸收值。结果如表 2 所示。

表 2.

菌株	OD ₅₆₀	积聚的高丝氨酸量 (g/L)
----	-------------------	----------------

MG442/pUC21	9.7	<0.1
MG442/pRhtC	15.2	9.5

实施例 3: rhtB 和 rhtC 基因扩增对苏氨酸基因产生的影响

<1> 构建苏氨酸生产菌株大肠杆菌 VG442/pVIC40, pRhtB (VKPM B-7660) 和苏氨酸的生产

5 用常规的转化方法, 将已知质粒 pVIC40 (美国专利号 5, 175, 107) 转化菌株 MG442。在含 0.1 mg/ml 的链霉素的 LB 琼脂平板上筛选转化体。由此得到新菌株 MG442/pVIC40。

用 pUK21 或 pRhtB 转化菌株 MG442/pVIC40 以得到菌株 MG442/pVIC40, pUK21 和 MG442/pVIC40, pRhtB。

10 将得到的转化体分别培养在含 50 mg/ml 卡那霉素和 100 mg/ml 氨苄青霉素的营养肉汤中于 37℃ 培养 18 小时, 将 0.3 ml 培养物接种到 20 × 200 mm 的试管的 3ml 的实施例 2 所述的发酵培养基中并且在发酵培养基中含有 50 mg/ml 卡那霉素和 100 mg/ml 氨苄青霉素, 于 37℃ 在转台上培养 68 小时。培养后, 用已知方法测定培养基中积聚的高丝氨酸量和在 560 nm 处的吸收值。

15 结果如表 3 所示。如表 3 所示, 菌株 MG442/pVIC40, pRhtB 比 rhtB 基因没有增强的菌株 MG442/pVIC40, pUK21 积聚了更大量的苏氨酸。

表 3.

菌株	OD ₅₆₀	积聚的高丝氨酸量 (g/L)
MG442/pVIC40, pUK21	16.3	12.9
MG442/pVIC40, pRhtB	15.2	16.3

20 <2> 苏氨酸生产菌大肠杆菌 MG442/pVIC40, pRhtC (VKPM B-7680) 的构建和苏氨酸的生产

用 pRhtC 和 pUC21 转化菌株 MG442/pVIC40。由此得到转化体 MG442/pVIC40, pRhtC 和 MG442/pVIC40, pUC21。

25 用上述同样的方法, 将得到的转化体分别培养在含 100 mg/ml 氨苄青霉素的营养肉汤中于 37℃ 培养 18 小时, 将 0.3 ml 培养物接种到 20 × 200 mm 的试管的 3ml 的上述发酵培养基中并且在发酵培养基中含有 50 mg/ml 卡那霉素和 100 mg/ml 氨苄青霉素, 于 37 度在转台上培

养 46 小时。培养后，用已知方法测定培养基中积聚的苏氨酸量和在 560 nm 处的吸收值。

结果如表 4 所示。

表 4.

菌株	OD ₅₆₀	积聚的苏氨酸量(g/L)
MG442/pVIC40, pUC21	17.4	4.9
MG442/pVIC40, pRhtC	15.1	10.2

5 实施例 4: rhtB 基因和 rhtC 基因在氨基酸生产中的协调作用
含有 rhtB 和 rhtC 基因的 SacII-SacII DNA 片段被插入到 pUC21 中。由此得到了携带有 rhtC 和 rhtB 基因的质粒 pRhtBC (图 4)。

然后用 pUC21, pRhtB, pRhtC 或 pRhtBC 转化菌株 NZ10, 从而得到转化体 NZ10/pUC21 (VKPM B-7685), NZ10/pRhtB (VKPM B-7683),
10 NZ10/pRhtC (VKPM B-7684), NZ10/pRhtB, pRhtC (VKPM B-7681) 和 NZ10/pRhtBC (VKPM B-7682)。其中 NZ10/pUC21 (VKPM B-7685), NZ10/pRhtB (VKPM B-7683), NZ10/pRhtC (VKPM B-7684), 根据布达佩斯条约进行国际保藏。保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心 (VKPM)。

15 用如上所述的方式培养得到的转化体, 并用已知的方法测定培养基中积聚的各种氨基酸的量以及在 540nm 处的吸收值。

结果如表 5 所示。从表 5 可知, pRhtB 和 pRhtC 在生产高丝氨酸, 缬氨酸和亮氨酸中的协调作用。这些结果表明, rhtB 基因和 rhtC 基因的产物可能在细胞内相互作用。

20

表 5.

菌株	OD ₅₆₀	高丝氨酸 (g/L)	缬氨酸 (g/L)	亮氨酸 (g/L)
NZ10/pUC21	18.7	0.6	0.22	0.16
NZ10/pRhtB	19.6	2.3	0.21	0.14
NZ10/pRhtC	20.1	0.7	0.2	0.15
NZ10/pRhtBC	21.8	4.2	0.34	0.44
NZ10/pRhtB, pRhtC	19.2	4.4	0.35	0.45

实施例 5: rhtB 基因和 rhtC 基因对氨基酸耐性的作用

如上所述，带有 *rhtB* 和 *rhtC* 基因的质粒在不同的菌株中对一些氨基酸在培养肉汤中的积聚有正影响。已经证明，积聚氨基酸的模式依赖于菌株的基因型。*RhtB* 和 *rhtC* 基因产物与谷氨酸棒杆菌赖氨酸转运蛋白 *LysE* 的一致性 (Vrljic, M., Sahm, H 和 Eggeling, L. (1996) 分子微生物学. 22, 815-826.) 表明这些蛋白的类似功能。

因此，测试了 *pRhtB* 和 *pRhtC* 质粒对菌株 N99 的敏感性，而 N99 菌株已知是已知对一些氨基酸和氨基酸类似物耐性的菌株 W3350 (VKPM B-1557) 的链霉素抗性 (*Str^R*) 突变体。将菌株 N99/*pUC21*, N99/*pUK21*, N99/*pRhtB* 和 N99/*pRhtC* 的过夜肉汤培养物 (10^9 cfu/ml) 以 1: 100 稀释在 M9 基本培养基中并在相同的培养基中培养 5 小时。然后将得到的对数期培养物稀释，并将约 10^4 存活细胞使用到干燥的测试板上，其中测试板上是含加倍量的氨基酸或类似物的 M9 琼脂 (2%)。因此，可以测试这些化合物的基本抑制浓度 (MIC)。

结果如表 6 所示。从表 6 可知，除了高丝氨酸外，多拷贝的 *rhtB* 赋予对 α -氨基- β -羟基缬氨酸 (AHVA) 和 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸 (AEC)，和 4-迭氨基-DL-亮氨酸的耐性；除了苏氨酸外，多拷贝的 *rhtC* 基因增加对缬氨酸，组氨酸和 AHVA 的耐性。这些结果表明，每个推定的转运蛋白 *RhtB* 和 *RhtC* 对几个底物 (氨基酸) 有特异性，或者由于扩增的原因而不表现出特异性的结果。

表 6.

底物	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	N99/ <i>pUC21</i> *	N99/ <i>pRhtB</i>	N99/ <i>pRhtC</i>
L-高丝氨酸	1000	20000	1000
L-苏氨酸	30000	40000	80000
L-缬氨酸	0.5	0.5	2.0
L-组氨酸	5000	5000	4000
AHVA	100	2000	15000
AEC	5	20	5
4-迭氨基-DL-亮氨酸	50	100	50
O-甲基-L-苏氨酸	20	20	20

*N99/*pUK21* 得到的数据相同。

序列表

<110> 味之素公司

<120> 新基因和生产L-氨基酸的方法

<130> OP851

<141> 1999-12-

<150> RU-98123511

<151> 1998-12-23

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1231

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<220>

<221> CDS

<222> (557)..(1171)

<400> 1

```

agaaataatg tggagatcgc accgccatc gaatgtgcc a gtatatagcg tttacgccac 60
ggaccgggct gaacctcctg ctgccagaat gccgccagat catcaacata atcattaaag 120
cgattaacat gcccgagatg cggatcggct aacagccgac cggaacgtcc ctgcccgga 180
tggtcgatga ttaagacatc aaaccccaaa tggaacaggt cataggccag ttccgcata 240
tttacgtagc tctcaatacg ccccgggcag atgactacca cccggtcatg gtgctgtgcg 300
cgaaaacgga caaagcgcac cggaatgtca tccacaccag taaactctgc ttcacacgc 360
tgacgccaga aatcagtcag cggtcctatg gtaaaagcag caaacgcgtt ttctcttgtt 420
tcccagtctt tttgctgctg aaacatcggg taatctgcct cttaaaccac gtaaaatcgt 480
tttttttagc gtgcctgaca caacgctgcg acagtagcgt attgtggcac aaaaatagac 540
acaccgggag ttcate atg acc tta gaa tgg tgg ttt gcc tac ctg ctg aca 592
          Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr
                1             5             10
tcg atc att tta acg ctg tcg cca ggc tct ggt gca atc aac act atg 640
Ser Ile Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met
          15             20             25
acc acc tcg etc aac cac ggt tat ccg gcc ggt ggc gtc tat tgc tgg 688
Thr Thr Ser Leu Asn His Gly Tyr Pro Ala Gly Gly Val Tyr Cys Trp
          30             35             40

```

gct tca gac cgg act ggc gat tca tat tgt gct ggt tgg cgt ggg gtt 736
 Ala Ser Asp Arg Thr Gly Asp Ser Tyr Cys Ala Gly Trp Arg Gly Val
 45 50 55 60
 ggg acg cta ttt tcc cgc tca gtg att gcg ttt gaa gtg ttg aag tgg 784
 Gly Thr Leu Phe Ser Arg Ser Val Ile Ala Phe Glu Val Leu Lys Trp
 65 70 75
 gca ggc gcg gct tac ttg att tgg ctg gga atc cag cag tgg cgc gcc 832
 Ala Gly Ala Ala Tyr Leu Ile Trp Leu Gly Ile Gln Gln Trp Arg Ala
 80 85 90
 gct ggt gca att gac ctt aaa tcg ctg gcc tct act caa tcg cgt cga 880
 Ala Gly Ala Ile Asp Leu Lys Ser Leu Ala Ser Thr Gln Ser Arg Arg
 95 100 105
 cat ttg ttc cag cgc gca gtt ttt gtg aat ctc acc aat ccc aaa agt 928
 His Leu Phe Gln Arg Ala Val Phe Val Asn Leu Thr Asn Pro Lys Ser
 110 115 120
 att gtg ttt ctg gcg gcg cta ttt ccg caa ttc atc atg ccg caa cag 976
 Ile Val Phe Leu Ala Ala Leu Phe Pro Gln Phe Ile Met Pro Gln Gln
 125 130 135 140
 ccg caa ctg atg cag tat atc gtg ctc ggc gtc acc act att gtg gtc 1024
 Pro Gln Leu Met Gln Tyr Ile Val Leu Gly Val Thr Thr Ile Val Val
 145 150 155
 gat att att gtg atg atc ggt tac gcc acc ctt gct caa cgg att gct 1072
 Asp Ile Ile Val Met Ile Gly Tyr Ala Thr Leu Ala Gln Arg Ile Ala
 160 165 170
 cta tgg att aaa gga cca aag cag atg aag gcg ctg aat aag att ttc 1120
 Leu Trp Ile Lys Gly Pro Lys Gln Met Lys Ala Leu Asn Lys Ile Phe
 175 180 185
 ggc tcg ttg ttt atg ctg gtg gga gcg ctg tta gca tcg gcg agg cat 1168
 Gly Ser Leu Phe Met Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg His
 190 195 200
 gcg tgaaaaataa tgcgatgc ggcgtaaacg cttatocga cttactctga 1221
 Ala
 205
 agacgcgtct 1231

<210> 2

<211> 205

<212> 蛋白质

<213> 大肠杆菌

<400> 2

Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr Ser Ile Ile Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met Thr Thr Ser Leu
 20 25 30
 Asn His Gly Tyr Pro Ala Gly Gly Val Tyr Cys Trp Ala Ser Asp Arg
 35 40 45


```

Ile Ile Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly
      65              70              75
ggc ctg tat ctc tgc tgg atg ggt tac cag atg cta cgt ggt gca ctg 468
Gly Leu Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu
      80              85              90
aaa aaa gag gcg gtt tct gca cct gcg cca cag gtc gag ctg gcg aaa 516
Lys Lys Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys
      95              100             105             110
agt ggg cgc agt ttc ctg aaa ggt tta ctg acc aat ctc gct aat ccg 564
Ser Gly Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro
      115             120             125
aaa gcg att atc tac ttt ggc tcg gtg ttc tca ttg ttt gtc ggt gat 612
Lys Ala Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp
      130             135             140
aac gtt ggc act acc gcg cgc tgg ggc att ttt gcg ctg atc att gtc 660
Asn Val Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val
      145             150             155
gaa acg ctg gcg tgg ttt acc gtc gtt gcc agc ctg ttt gcc ctg ccg 708
Glu Thr Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro
      160             165             170
caa atg cgc cgt ggt tat caa cgt ctg gcg aag tgg att gat ggt ttt 756
Gln Met Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe
      175             180             185             190
gcc ggg gcg tta ttt gcc gga ttt ggc att cat ttg att att tcg cgg 804
Ala Gly Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
      195             200             205
tgatgccaga cgcgtcttca gagtaagtcg gataag 840

```

<210> 4

<211> 206

<212> 蛋白质

<213> 大肠杆菌

<400> 4

```

Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
  1              5              10              15
Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
      20              25              30
Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
      35              40              45
Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu Ile Ile
      50              55              60
Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
      65              70              75              80
Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
      85              90              95
Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly

```

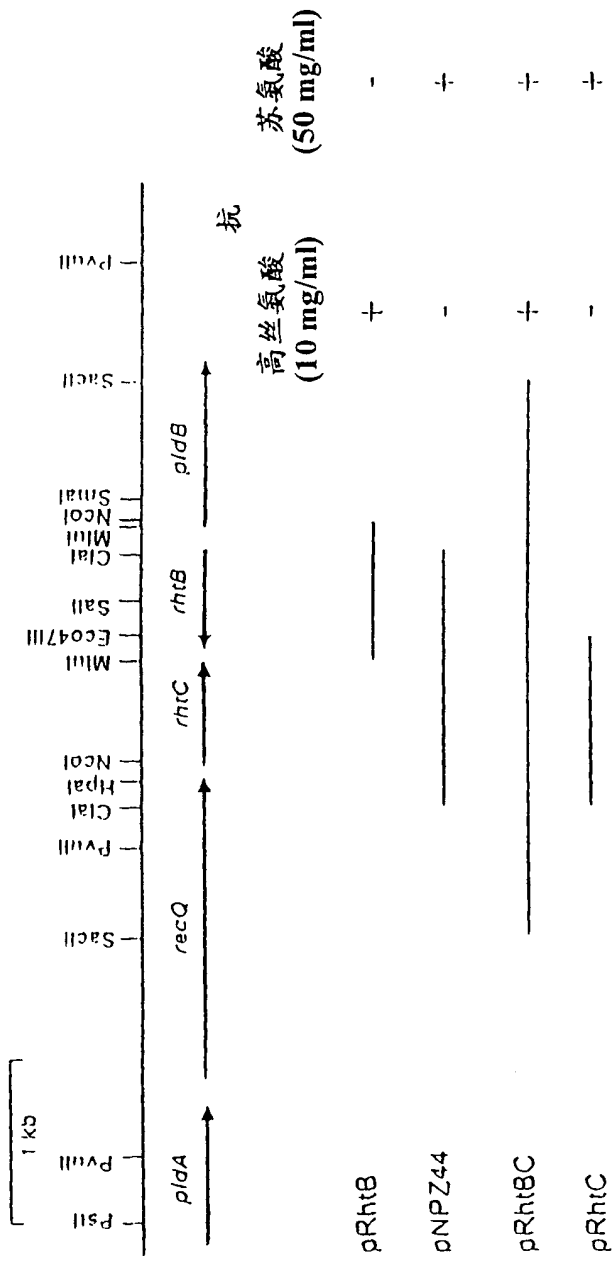



图1

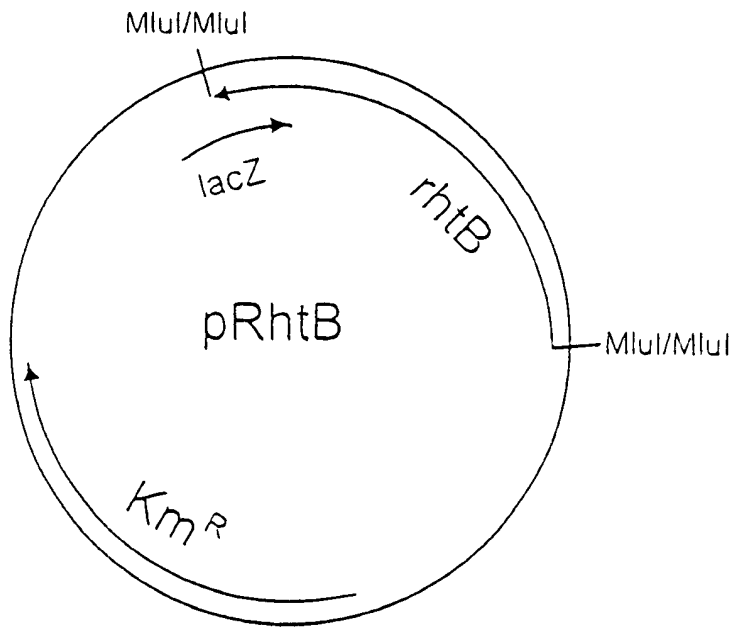


图 2

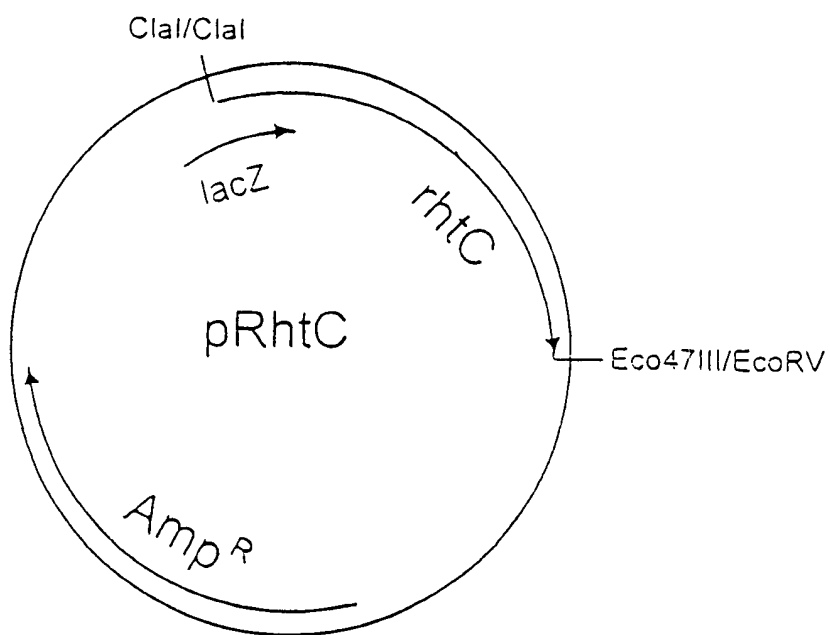


图 3

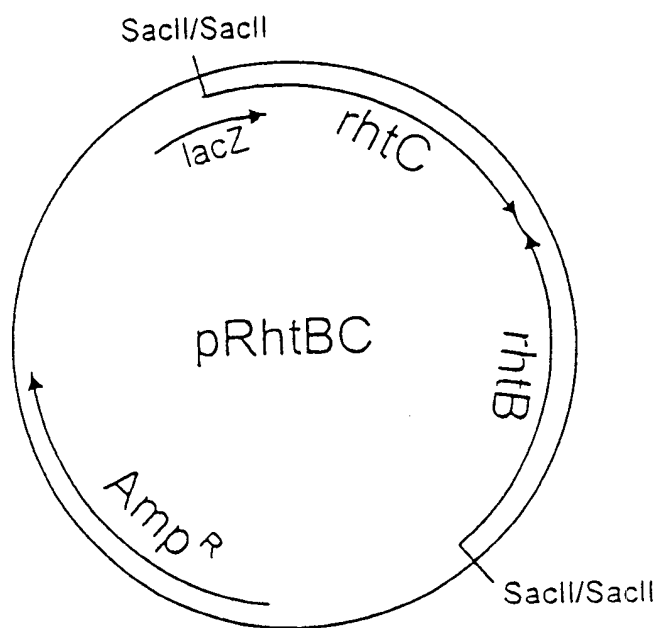


图 4