



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115038792 A

(43) 申请公布日 2022. 09. 09

(21) 申请号 202080091776.2

(22) 申请日 2020.12.03

(30) 优先权数据

1917651.0 2019.12.03 GB

2016372.1 2020.10.15 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.07.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/084505 2020.12.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/110856 EN 2021.06.10

(71) 申请人 克罗生物科技有限公司

地址 英国柴郡

(72) 发明人 罗斯·马尔霍尔

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 刘振佳

(51) Int.Cl.

C12P 19/04 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A01H 3/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书39页

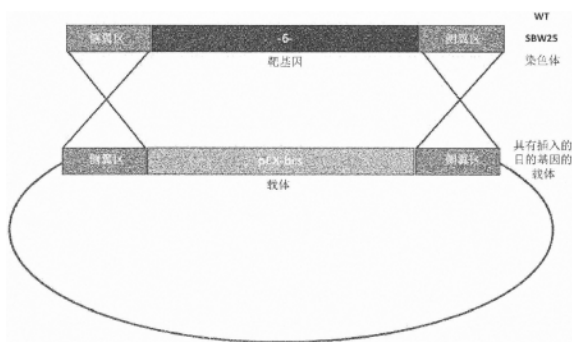
序列表32页 附图5页

(54) 发明名称

经遗传改造微生物

(57) 摘要

本发明涉及被修饰以提高纤维素产生的经遗传改造微生物,例如细菌,以及产生所述经遗传改造微生物的方法。本发明还涉及这些经遗传改造微生物在农业中的用途。



1. 用于产生纤维素的经遗传改造微生物,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,其中所述微生物是用包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因和ccpAx基因的外源基因进行修饰的。

2. 权利要求1所述的经遗传改造微生物,其中所述微生物是还用外源cmcAx基因和/或外源bglAx基因进行修饰的。

3. 权利要求1所述的经遗传改造微生物,其中所述微生物是用包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因和至少ccpAx基因的外源核酸进行修饰的。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述基因是异源的。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述基因各自分离自木驹形氏杆菌(*K. xylinus*)。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述经遗传改造微生物是根相关细菌。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述经遗传改造微生物是促进植物生长的根际细菌。

8. 根据权利要求6或7所述的经遗传改造微生物,其中所述微生物是假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述基因的表达由细胞密度群体感应系统调节。

10. 在微生物中与参照微生物相比提高纤维素产生的方法,其中所述方法包括修饰所述微生物以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的步骤,其中所述微生物是用包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因和ccpAx基因的外源基因进行修饰的。

11. 根据权利要求10所述的提高纤维素产生的方法,其中所述微生物是还用外源cmcAx基因和/或外源bglAx基因进行修饰的。

12. 根据权利要求10或11所述的提高纤维素产生的方法,其中所述微生物是根相关细菌。

13. 根据权利要求10或11所述的提高纤维素产生的方法,其中所述微生物是促进植物生长的根际细菌。

14. 载体,其包含含有以下的外源核酸:bcs操纵子,以及cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因中的至少一种,任选地其中所述bcs操纵子包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因。

15. 产生用于产生纤维素的经遗传改造微生物的方法,其中所述方法包括修饰所述微生物以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的步骤,其包括:

a) 分离微生物;以及

b) 将包含外源核酸的载体引入到所述微生物中,所述外源核酸包含选自包含以下的组的基因中的至少一种:bcsA基因;bcsB基因;bcsC基因;bcsD基因;cmcAx基因;ccpAx基因;bglAx基因;pgm基因;galU基因;cdg操纵子;和dgc基因。

16. 经遗传改造微生物,其可通过权利要求15所述的方法获得。

17. 分离的经遗传改造微生物,其是根据权利要求1至9或权利要求16中任一项所述的。

18. 包含根据权利要求1至9或权利要求16中任一项所述的经遗传改造微生物的群体。

19. 包含经遗传改造群体的组合物,所述经遗传改造群体是权利要求18所述的。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述组合物还包含肥料和/或生物肥料。

21. 提高植物根周围保水性的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

22. 在农业中降低耗水量的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

23. 捕获碳的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被所述微生物转化成纤维素。

24. 根据权利要求21、22或23所述的方法,其中所述微生物是用外源bcs操纵子进行遗传修饰的,其中所述bcs操纵子包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因。

25. 经遗传修饰的微生物在农业中的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

26. 经遗传修饰的微生物用于提高植物根周围保水性的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

27. 经遗传修饰的微生物在碳捕获中的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被所述微生物转化成纤维素。

## 经遗传改造微生物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及被修饰以提高纤维素产生的经遗传改造微生物,例如细菌,以及产生所述经遗传改造微生物的方法。

### 背景技术

[0002] 干旱和极热对于全球农业生产是最大的气候相关威胁。气候恶化意味着更极端、不可预测的天气事件,其范围可从急剧的大量降雨至长时间的干旱。这些事件对作物产量有直接影响。当降雨发生时,土壤的吸收能力最大,并且作物的摄取保留能力最大。在剧烈的天气事件中可能是大量的所剩余的水未被利用并且通常从土地上流失,这导致局部洪水(flooding)。水短缺是重大的全球性问题。全球70%的耗水量来自农业需求,并且预期其到2050年提高19%。耗水量对于全球作物生产是主要障碍。在干旱盛行的环境中,存在作物产量低。通过提高作物对环境干旱的耐受性,可提高全球作物供应的可持续性。由于较热气候下的降雨更散发,农民被迫不断灌溉他们的土地。这需要极大量的水,这些水最终不会被植物利用并且将蒸发。作物在易干旱气候下所遭受的非生物胁迫导致产量降低和水管理效率低。随着人口增长和气候条件不断恶化,提出了许多缓解水需求的策略,然而到目前为止,尚未使用生物活性保水解决方案来进行作物水管理。先前的策略集中在直接对作物进行遗传修饰以使作物更具抗性,或通过向土壤中添加添加剂。然而,这些方法均未为全球作物生产中的水短缺问题提供有效的解决方案。作物的可持续性对于人口增长和数十亿人的食物来源至关重要。作物不仅为人群提供食物,其还作为食物供应支持畜牧业。因此,现在比以往任何时候都更需要巨大的变化以支持发展的世界,但这种解决方案必须是环境友好且高效的。

### [0003] 纤维素

[0004] 纤维素是由数百至数千个 $\beta(1\rightarrow4)$ 连接的D-葡萄糖单元的直链组成的多糖。纤维素是绿色植物、多种形式的藻类和卵菌的初生细胞壁(primary cell wall)的重要结构组分。另外,一些细菌种类,主要是醋杆菌(*Acetobacter*)属、胃八叠球菌(*Sarcina ventriculi*)属和农杆菌(*Agrobacterium*)属,分泌纤维素以坚固生物膜。细菌纤维素目前被生产用于多种商业应用,包括纺织品、化妆品和食品,以及医学应用。本领域中已描述了细菌纤维素在细菌中的表达。例如,中国专利申请CN108060112描述了产生细菌纤维素的菌株,特别地,BcsB亚基在木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)中过表达。另外,Buldum et al. (2018)描述了在经遗传修饰的大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行细菌纤维素的重组生物合成。同时,Florea et al. (2016)描述了使用遗传工具包(toolkit)对*Komagataeibacter rhaeticus*中细菌纤维素的产生进行工程控制。

### [0005] 碳捕获

[0006] 农业土地上的碳吸集(sequestration)是减少来自农业的碳排放和缓解气候变化的一种方式。二氧化碳的大气浓度可通过减少排放或通过将其从大气中带出并将其储存在土壤中来降低。草原和林地向农田(和牧场)的长期转换导致全世界土壤碳的历史性

损失,但存在通过恢复退化土壤和广泛采用土壤保持实践来提高土壤碳的重大潜力。化肥的使用也加剧了土壤品质的下降。

[0007] 历史上,土地使用转换和土壤耕作一直是大气中温室气体(greenhouse gas,GHG)的主要来源。据估计,它们仍占GHG排放的约三分之一。然而,改善的农业实践可通过降低来自农业和其他来源的排放以及通过在土壤中储存碳来帮助缓解气候变化。

[0008] 在过去的数个世纪,并且特别是在过去的数十年期间,农业的发展已造成大量土壤碳储量的耗竭。农业土壤是地球上最大的碳储库之一,并且具有扩大碳吸集(carbon sequestration,CS)的潜力,并因此为缓解CO<sub>2</sub>大气浓度的提高提供了有前景的方法。一般认为,在土壤中吸集碳的技术潜力是显著的,并且对这种潜力的大小的一些看法一致。全世界的农田可吸集0.90至1.85Pg C/yr,即“4p1000 Initiative:Soils for Food Security and Climate”目标的26至53%。

[0009] 同时,该过程为土壤、作物和环境品质、防止侵蚀和荒漠化以及增强生物多样性提供了其他重要益处。土地退化不仅降低作物产量,而且通常降低农业生态系统(agroecosystem)的碳含量,并且可降低生物多样性。

[0010] 由于大气中GHG的量迅速提高,地球气候正在经历前所未有的变化。需要设计多种策略来抵消当前释放到大气中的GHG。在大气中的所有GHG中,CO<sub>2</sub>在全球变暖中具有突出的份额。土壤碳吸集是抵消大气中提高量的CO<sub>2</sub>的有前景的方法。部分退化的土壤和农业土壤二者均具有相当大的潜力使大气中升高的CO<sub>2</sub>水平最小化。在全球范围内,土壤可保留的碳是大气中存在的碳或植被中捕获的碳的两倍更多。温度、土壤水分和升高的CO<sub>2</sub>水平是影响土壤碳吸集的主要气候因素。土壤碳吸集也受到多种土壤因素,即土壤质地、土壤结构、土壤孔隙度、土壤压实、土壤矿物学和土壤微生物群落组成等的强烈影响。另外,农业实践如土地使用变化、植物残留物管理、农业化学物质等直接(例如通过改变添加到土壤中的碳的量)或间接(例如通过影响土壤聚集并从而加速微生物分解过程)影响土壤有机碳(soil organic carbon,SOC)储量。除了抵消快速提高的大气GHG之外,土壤碳吸集还可潜在地改善土壤品质并促进食品安全。其可在可持续农业中发挥关键作用,因为它是高度可持续且环境友好的方法。其可通过改善土壤健康参数(即土壤的保水能力)来增强土壤品质,随后在可持续的基础上改善作物的产生。

[0011] 根据上述考虑设计了本发明。

## 发明内容

[0012] 本发明基于微生物例如根相关细菌(root-associated bacteria)中负责纤维素合成和分泌的蛋白质组分的过表达以实现植物根周围保水性的提高。这种植物根周围保水性的提高被认为降低了所需的水灌溉量,并且因此提高了作物对环境干旱的耐受性。

[0013] 因此,本发明最广泛地提供了经遗传改造微生物,其被修饰以相对于参照微生物过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,任选地其中所述纤维素是细菌纤维素。优选地,微生物(和参照微生物)是细菌,例如根相关细菌。

[0014] 在本发明的一个方面中,提供了用于产生纤维素的经遗传改造微生物,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,其中所述微生物是用包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因和ccpAx基因的外源基因进行修饰的。

在一些实施方案中,微生物是还用外源cmcAx基因和/或外源bglAx基因进行修饰的。在一些实施方案中,微生物是用包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因和至少ccpAx基因的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中,基因是异源的。在一些实施方案中,基因各自分离自木驹形氏杆菌(*K.xylinus*)。

[0015] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌,任选地是根相关细菌。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是促进植物生长的根际细菌(*plant growth-promoting rhizobacterium*)。在一些实施方案中,微生物是假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌。在一些实施方案中,根际细菌不是木驹形氏杆菌(*Komagataeibacter xylinus*) (也称为木醋杆菌和木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*))。在一些实施方案中,基因的表达由细胞密度群体感应系统调节。在一些实施方案中,群体感应操纵子被插入到宿主细胞中。在一些实施方案中,群体感应系统包含编码传感器激酶的基因和编码响应调节剂的基因。在另一些实施方案中,群体感应系统还包含群体感应调节启动子。在一些替代实施方案中,群体感应系统包含编码信号传导分子(自诱导剂)的基因和编码转录/响应调节剂的基因。在另一些实施方案中,群体感应系统还包含群体感应调节启动子。

[0016] 在一些方面中,提供了在微生物中与参照微生物相比提高纤维素产生的方法,其中所述方法包括修饰微生物以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的步骤,其中所述微生物是用包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因和ccp基因的外源基因进行修饰的。在一些实施方案中,微生物是还用外源cmc基因和/或外源bgl基因进行修饰的。在一些实施方案中,微生物是细菌,任选地是促进植物生长的根际细菌。

[0017] 本发明提供了用于产生纤维素的经遗传改造微生物,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,由经遗传改造微生物产生的纤维素是细菌纤维素。在一些实施方案中,微生物被遗传修饰以过表达至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。在一些实施方案中,微生物被修饰以过表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。在一些实施方案中,纤维素合酶复合物是细菌纤维素合酶复合物。在一些实施方案中,与参照微生物相比在经遗传修饰的微生物中纤维素的产生提高。在一些实施方案中,参照微生物与经修饰的微生物属于相同物种。参照微生物可与经修饰的微生物是相同菌株。在一些实施方案中,微生物是野生型微生物。在一些实施方案中,相同物种或相同菌株的参照微生物是相同物种或相同菌株的野生型微生物。在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0018] 在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物被修饰以过表达纤维素合酶复合物。在一些实施方案中,经遗传修饰的微生物是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在另一些实施方案中,至少一种纤维素合酶复合物的蛋白质的过表达是通过提高至少一种内源性纤维素合酶复合物的蛋白质的转录和/或翻译来实现的。

[0019] 在一些实施方案中,经遗传修饰的微生物是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中,微生物是用编码至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在一些

实施方案中,经遗传改造微生物是用以下bcs操纵子基因中的至少一种进行修饰的:bcsA;bcsB;bcsC;和/或bcsD。在另一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子。在另一个实施方案中,bcs操纵子编码四种蛋白质亚基BcsA、BcsB、BcsC和BcsD。在一些实施方案中,外源核酸还包含以下基因或操纵子中的至少一种:cmcAx基因;ccpAx基因;bglAx基因;pgm基因;galU基因;cdg操纵子;和/或dgc基因。在一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。在一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子、cmc基因、ccp基因、bgl基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因。在一些实施方案中,外源核酸由bcs操纵子、cmc基因、ccp基因、bgl基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因组成。在一些实施方案中,bcs操纵子、cmc基因、ccp基因、bgl基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和/或dgc基因各自分离自木驹形氏杆菌。

[0020] 在一些实施方案中,微生物选自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。在另一个实施方案中,微生物是荧光假单胞菌。在另一个实施方案中,微生物是荧光假单胞菌SBW25。在另一个实施方案中,微生物是荧光假单胞菌F113。在另一个实施方案中,微生物是荧光假单胞菌CHAO。在另一个实施方案中,微生物是荧光假单胞菌Pf-5。在另一个实施方案中,微生物是荧光假单胞菌FW300 N2E2。

[0021] 在一些实施方案中,由本发明的经遗传改造微生物产生的纤维素被分泌到细胞外。在另一个实施方案中,分泌的纤维素在细胞外形成网络。在一些实施方案中,分泌的网络在植物根周围形成。在一些实施方案中,分泌的纤维素网络提高植物根周围的保水性。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0022] 在本发明的第二方面中,在微生物中与参照微生物相比提高纤维素产生的方法,其中所述方法包括修饰所述微生物以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的步骤。在一些实施方案中,微生物被修饰以过表达至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。在一些实施方案中,参照微生物与经修饰的微生物属于相同物种。在一些实施方案中,参照微生物是野生型微生物。在一些实施方案中,相同物种的参照微生物是相同物种的野生型微生物。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中,编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸被整合到微生物的基因组中。在一些实施方案中,纤维素是细菌纤维素。在一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子。在另一些实施方案中,载体的外源核酸还包含cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因中的至少一种。在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0023] 在本发明的第三方面中,提供了包含编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸的载体。在一些实施方案中,载体的外源核酸包含bcs操纵子。在另一些实施方案中,载体的外源核酸还包含cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因中的至少一种。在一些实施方案中,载体的外源核酸包含bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。在一些实施方案中,载体的外源核酸包含bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因。在一些实施方案中,载体的外源核酸由bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基

因、cdg操纵子和dgc基因组成。在一些实施方案中，bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和/或dgc基因各自分离自木驹形氏杆菌。在一些实施方案中，载体是分离的载体。在一些实施方案中，基因是异源的。

[0024] 在第四方面中，本发明提供了产生用于产生纤维素的经遗传改造微生物的方法，其中所述方法包括用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸修饰微生物的步骤，其包括：

[0025] a) 分离微生物；以及

[0026] b) 将本发明的载体引入到微生物中。

[0027] 在一些实施方案中，微生物是用编码至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中，经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中，经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中，经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0028] 在一些实施方案中，本发明的载体通过电穿孔被引入到微生物中。在一些实施方案中，本发明的载体通过转染被引入到微生物中。在一些实施方案中，编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸被整合到微生物的基因组中。在一些实施方案中，至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质被整合到微生物的基因组中。在一些实施方案中，本发明的载体被引入到微生物中，使得两个拷贝、三个拷贝或四个拷贝等被整合到微生物的基因组中以提高一种或更多种基因的拷贝数。在一些实施方案中，与参照微生物相比，在经遗传修饰的微生物中纤维素的产生提高。在一些实施方案中，参照微生物属于相同物种或菌株。在一些实施方案中，参照微生物是野生型微生物。在一些实施方案中，参照微生物是相同物种或菌株的野生型微生物。在一些实施方案中，纤维素是细菌纤维素。在一些实施方案中，纤维素合酶复合物是细菌纤维素合酶复合物。

[0029] 在第五方面中，提供了经遗传改造微生物，其可通过产生用于产生纤维素的经遗传改造微生物的方法获得。在另一个方面中，本发明提供了分离的本发明的经遗传改造微生物。在本发明的一个替代方面中，提供了包含本发明的经遗传改造微生物的群体。在一些实施方案中，经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中，经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中，经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0030] 在另一个方面中，本发明提供了组合物，其包含本发明的经遗传改造微生物的群体。在一些实施方案中，组合物以液体制剂形式施加至植物。在一些替代实施方案中，组合物作为接种物施加至植物。在一些实施方案中，接种物是基于泥炭的制剂。在另一些实施方案中，制剂用于包被种子或丸粒 (pellet) 以用于在沟 (furrow) 中播种。在一些实施方案中，本发明的经遗传修饰的微生物以微珠形式递送至植物。在另一些实施方案中，微珠是藻酸盐微珠。在一些实施方案中，组合物还包含肥料和/或生物肥料。在一些实施方案中，在植物种植之后但在收获之前将组合物施加至所述植物。在一些实施方案中，在种植植物之前将组合物施加至土壤。在一些实施方案中，植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。在一些实施方案中，经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中，经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中，经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0031] 在另一个方面中，本发明提供了提高植物根周围保水性的方法，其包括将经遗传

改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,微生物选自本发明的经遗传改造微生物、本发明的分离的经遗传改造微生物、本发明的经遗传改造微生物的群体、或本发明的组合物。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0032] 在另一个方面中,本发明提供了在农业中降低耗水量的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,微生物选自本发明的经遗传改造微生物、本发明的分离的经遗传改造微生物、本发明的经遗传改造微生物的群体、或本发明的组合物。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0033] 在另一个方面中,本发明提供了植物,其包含本发明的经遗传改造微生物、本发明的分离的经遗传改造微生物、本发明的经遗传改造微生物的群体、或本发明的组合物,其中经遗传改造微生物、分离的经遗传改造微生物、或经遗传改造微生物的群体与植物根相关。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0034] 在另一个方面中,本发明提供了捕获碳的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被所述微生物转化成纤维素。

[0035] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物是本发明的微生物、本发明的分离的经遗传改造微生物、本发明的经遗传改造微生物的群体、或本发明的组合物。在一些实施方案中,碳被吸收为从植物分泌的碳水化合物并且碳水化合物被微生物转化成纤维素。在一些实施方案中,纤维素的产生使得植物根周围的保水性提高。在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。在一些实施方案中,微生物是菌根真菌(mycorrhizal fungi)(例如丛枝(arbuscular)菌根真菌、外生菌根(ectomycorrhizal)菌根真菌、杜鹃花类(ericoid)菌根真菌和/或兰科(orchid)菌根真菌)。

[0036] 本发明的另一个方面提供了经遗传修饰的微生物在农业中的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在本发明的另一个方面中,提供了经遗传修饰的微生物用于提高植物根周围保水性的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。本发明的另一个方面提供了经遗传修饰的微生物在碳捕获中的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被所述微生物转化成纤维素。在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。在

一些实施方案中,本文中所述的方法和用途实现了植物生存力的提高。

[0037] 在一些实施方案中,提供了包含一种或更多种异源基因的经遗传修饰的微生物,其中所述基因包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因、cmcAx基因、ccpAx基因,和/或bglAx基因。在一些实施方案中,微生物是细菌。在另一些实施方案中,微生物是促进植物生长的根际细菌。

[0038] 在一些方面中,本发明提供了用于产生纤维素的经遗传改造的根相关细菌,其中所述细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,由经遗传改造的根相关细菌产生的纤维素是细菌纤维素。在一些实施方案中,细菌被遗传修饰以过表达至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。在一些实施方案中,细菌被修饰以过表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。在一些实施方案中,纤维素合酶复合物是细菌纤维素合酶复合物。在一些实施方案中,与参照细菌相比,在经遗传修饰的细菌中纤维素的产生提高。在一些实施方案中,参照细菌与经修饰细菌属于相同物种。参照细菌可与经修饰细菌是相同菌株。在一些实施方案中,细菌是野生型细菌。在一些实施方案中,相同物种或相同菌株的参照细菌是相同物种或相同菌株的野生型细菌。

[0039] 在一些实施方案中,本发明的经遗传改造的根相关细菌被修饰以过表达纤维素合酶复合物。在一些实施方案中,经遗传修饰的细菌是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在另一些实施方案中,至少一种纤维素合酶复合物的蛋白质的过表达是通过提高至少一种内源性纤维素合酶复合物的蛋白质的转录和/或翻译来实现的。

[0040] 在一些实施方案中,经遗传修饰的根相关细菌是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中,细菌是用编码至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中,经遗传改造细菌是用以下bcs操纵子基因中的至少一种进行修饰的:bcsA;bcsB;bcsC;和/或bcsD。在另一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子。在另一个实施方案中,bcs操纵子编码四种蛋白质亚基BcsA、BcsB、BcsC和BcsD。在一些实施方案中,外源核酸还包含以下基因或操纵子中的至少一种:cmcAx基因;ccpAx基因;bglAx基因;pgm基因;galU基因;cdg操纵子;和/或dgc基因。在一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。在一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因。在一些实施方案中,外源核酸由bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因组成。在一些实施方案中,bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和/或dgc基因各自分离自木驹形氏杆菌。

[0041] 在一些实施方案中,根相关细菌选自荧光假单胞菌和巨大芽孢杆菌。在另一个实施方案中,根相关细菌是荧光假单胞菌。在另一个实施方案中,根相关细菌是荧光假单胞菌SBW25。在另一个实施方案中,根相关细菌是荧光假单胞菌F113。在另一个实施方案中,根相关细菌是荧光假单胞菌CHA0。在另一个实施方案中,根相关细菌是荧光假单胞菌Pf-5。在另一个实施方案中,根相关细菌是荧光假单胞菌FW300 N2E2。

[0042] 在一些实施方案中,由本发明的经遗传改造的根相关细菌产生的纤维素被分泌到

细胞外。在另一个实施方案中,分泌的纤维素在细胞外形成网络。在一些实施方案中,分泌的网络在植物根周围形成。在一些实施方案中,分泌的纤维素网络提高植物根周围的保水性。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0043] 在本发明的第二方面中,在根相关细菌中与参照根相关细菌相比提高纤维素产生的方法,其中所述方法包括修饰所述细菌以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的步骤。在一些实施方案中,细菌被修饰以过表达至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。在一些实施方案中,参照细菌与经修饰细菌属于相同物种。在一些实施方案中,参照细菌是野生型细菌。在一些实施方案中,相同物种的参照细菌是相同物种的野生型细菌。在一些实施方案中,经遗传改造的根相关细菌是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中,编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸被整合到根相关细菌的基因组中。在一些实施方案中,纤维素是细菌纤维素。在一些实施方案中,外源核酸包含bcs操纵子。在另一些实施方案中,载体的外源核酸还包含cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因中的至少一种。

[0044] 在本发明的第三方面中,提供了包含编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸的载体。在一些实施方案中,载体的外源核酸包含bcs操纵子。在另一些实施方案中,载体的外源核酸还包含cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因中的至少一种。在一些实施方案中,载体的外源核酸包含bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。在一些实施方案中,载体的外源核酸包含bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因。在一些实施方案中,载体的外源核酸由bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因组成。在一些实施方案中,bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和/或dgc基因各自分离自木驹形氏杆菌。在一些实施方案中,载体是分离的载体。

[0045] 在第四方面中,本发明提供了产生用于产生纤维素的经遗传改造的根相关细菌的方法,其中所述方法包括用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸修饰细菌的步骤,其包括:

[0046] a) 分离根相关细菌;以及

[0047] b) 将本发明的载体引入到根相关细菌中。

[0048] 在一些实施方案中,细菌是用编码至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。

[0049] 在一些实施方案中,本发明的载体通过电穿孔被引入到根相关细菌中。在一些实施方案中,本发明的载体通过转染被引入到根相关细菌中。在一些实施方案中,编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸被整合到根相关细菌的基因组中。在一些实施方案中,至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质被整合到根相关细菌的基因组中。在一些实施方案中,本发明的载体被引入到细菌中,使得两个拷贝、三个拷贝或四个拷贝等被整合到细菌的基因组中以提高一种或更多种基因的拷贝数。在一些实施方案中,与参照细菌相比,在经遗传修饰的细菌中纤维素的产生提高。在一些实施方案中,参照细菌属于相同物种或菌株。在一些实施方案中,参照细菌是野生型细

菌。在一些实施方案中,参照细菌是相同物种或菌株的野生型细菌。在一些实施方案中,纤维素是细菌纤维素。在一些实施方案中,纤维素合酶复合物是细菌纤维素合酶复合物。

[0050] 在第五方面中,提供了经遗传改造的根相关细菌,其可通过产生用于产生纤维素的经遗传改造的根相关细菌的方法获得。在另一个方面中,本发明提供了分离的本发明的经遗传改造的根相关细菌。在本发明的一个替代方面中,提供了包含本发明的经遗传改造的根相关细菌的细菌群体。

[0051] 在另一个方面中,本发明提供了细菌组合物,其包含本发明的经遗传改造的根相关细菌群体。在一些实施方案中,组合物以液体制剂形式施加至植物。在一些替代实施方案中,组合物作为细菌接种物施加至植物。在一些实施方案中,细菌接种物是基于泥炭的制剂。在另一些实施方案中,制剂用于包被种子或丸粒以用于在沟中播种。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的细菌以微珠形式递送至植物。在另一些实施方案中,微珠是藻酸盐微珠。在一些实施方案中,细菌组合物还包含肥料和/或生物肥料。在一些实施方案中,在植物种植之后但在收获之前将细菌组合物施加至所述植物。在一些实施方案中,在种植植物之前将细菌组合物施加至土壤。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0052] 在另一个方面中,本发明提供了提高植物根周围保水性的方法,其包括将以下施加至植物周围的土壤:本发明的经遗传改造的根相关细菌、本发明的分离的经遗传改造的根相关细菌、本发明的经遗传改造的根相关细菌的群体、或本发明的细菌组合物。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0053] 在另一个方面中,本发明提供了在农业中降低耗水量的方法,其包括将以下施加至植物周围的土壤:本发明的经遗传改造的根相关细菌、本发明的分离的经遗传改造的根相关细菌、本发明的经遗传改造的根相关细菌的群体、或本发明的细菌组合物。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0054] 在另一个方面中,本发明提供了植物,其包含本发明的经遗传改造的根相关细菌、本发明的分离的经遗传改造的根相关细菌、本发明的经遗传改造的根相关细菌的群体、或本发明的细菌组合物,其中经遗传改造的根相关细菌、分离的经遗传改造的根相关细菌、或经遗传改造的根相关细菌的群体与植物根相关。在一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0055] 在另一个方面中,本发明提供了捕获碳的方法,其包括将经遗传改造的根相关细菌施加至植物根周围的土壤,其中所述细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被所述细菌转化成纤维素。

[0056] 在一些实施方案中,经遗传改造的根相关细菌是本发明的根相关细菌、本发明的分离的经遗传改造的根相关细菌、本发明的经遗传改造的根相关细菌的群体、或本发明的细菌组合物。在一些实施方案中,碳被吸收为从植物分泌的碳水化合物并且碳水化合物被细菌转化成纤维素。在一些实施方案中,纤维素的产生使得植物根周围的保水性提高。

[0057] 本发明的另一个方面提供了经遗传修饰的根相关细菌在农业中的用途,其中所述细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在本发明的另一个方面中,提供了经遗传修饰的根相关细菌用于提高植物根周围保水性的用途,其中所述细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。本发明的另一个

方面提供了经遗传修饰的根相关细菌在碳捕获中的用途,其中所述细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被所述细菌转化成纤维素。在一些实施方案中,本文中所述的方法和用途实现了植物生存力的提高。

[0058] 在一些实施方案中,本文中所述的方法实现了植物生存力的提高。

[0059] 在本发明的一些实施方案中,根相关细菌是用包含一种或更多种异源基因的外源核酸进行遗传修饰的,其中所述基因选自: bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。

[0060] 在一些方面中,本发明提供了用于产生纤维素的经遗传修饰的细菌,其中所述细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中经遗传修饰的细菌是用外源bcs操纵子进行修饰的,其中bcs操纵子包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因。在一些实施方案中,提供了经遗传改造细菌,其中所述细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中经遗传修饰的细菌是用一种或更多种异源基因进行修饰的,其中所述基因包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因以及任选地cmcAx基因、ccpAx基因和/或bglAx基因。在一些实施方案中,细菌不是木驹形氏杆菌(也称为木醋杆菌和木葡糖酸醋杆菌)。

[0061] 在本发明的一些实施方案中,细菌是用包含一种或更多种异源基因的外源核酸进行遗传修饰的,其中所述基因选自: bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。

[0062] 在一些方面中,本发明提供了用于产生纤维素的经遗传改造的促进植物生长的根际细菌,其中所述根际细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,根际细菌是用包含bcs操纵子的外源核酸进行修饰的,其中bcs操纵子包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因。在一些实施方案中,外源核酸还包含至少ccpAx基因。在一些实施方案中,外源核酸还包含cmcAx基因、ccpAx基因和/或bglAx基因。在一些实施方案中,基因是异源的。在本发明的一些实施方案中,根际细菌是用包含一种或更多种异源基因的外源核酸进行遗传修饰的,其中所述基因选自: bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。

[0063] 在一些实施方案中,提供了用于产生纤维素的经遗传改造的促进植物生长的根际细菌,其中所述根际细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中经遗传修饰的根际细菌是用一种或更多种异源基因进行修饰的,其中所述基因包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因以及任选地cmcAx基因、ccpAx基因和/或bglAx基因。在一些实施方案中,根际细菌不是木驹形氏杆菌(也称为木醋杆菌和木葡糖酸醋杆菌)。

[0064] 本发明包括所描述的方面与优选特征的组合,除了明显不允许或明确避免这样的组合的情况之外。

## 附图说明

[0065] 现在将参考附图讨论本发明的举例说明原理的实施方案和实验,其中:

[0066] 图1. 从包含目的细菌纤维素基因的穿梭载体(pEX18Ap)到荧光假单胞菌(例如荧光假单胞菌SBW25)染色体基因座-6-处的遗传交叉的描述。

[0067] 图2.从包含目的细菌纤维素基因的微型CTX1载体到荧光假单胞菌染色体attb位点(attB-5' TGAGTTCGAATCTCACCGCCTCCGCCATAT 3')处的遗传交叉的描述。

[0068] 图3.包含纤维素合成基因cmcAx、ccpAx、BcsA、BcsB、BcsC、BcsD和BglAx以及作为报道基因的GFP的构建体的描述。在该具体实例中,构建体还包含pBAD启动子和pBAD终止子。

[0069] 图4.a)包含产黄假单胞菌(*Pseudomonas synxantha*)菌株2-79染色体-phz1/R操纵子的构建体的描述。b)包含用于插入宿主微生物例如荧光假单胞菌的构建体的描述。

[0070] 图5.a)包含恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)菌株KT2440染色体rox群体感应系统的构建体的描述。b)使用图5c中示出的roxS/roxR调节基因的上游区域的包含用于在假单胞菌中产生重组蛋白的KT2440QS系统的构建体的描述。c)用于插入到宿主微生物(例如荧光假单胞菌)中的构建体的描述。

### 具体实施方式

[0071] 现在将参考附图讨论本发明的一些方面和实施方案。对于本领域技术人员而言,其他方面和实施方案将是明显的。在该文本中提及的所有文件均通过引用并入本文。

[0072] 本发明提供了用于产生纤维素的经遗传改造微生物例如根相关细菌,其中经遗传改造的根相关细菌被遗传修饰以相对于通常是相同物种的参照细菌提高纤维素的产生。通常,经遗传改造的根相关细菌被修饰以过表达纤维素的合成和/或分泌所需的蛋白质,优选纤维素合酶复合物。

[0073] 本文中使用的“根相关”细菌是指生活在植物根上或植物根周围的细菌。在一些实施方案中,微生物是“根相关的”,是指生活在植物根上或植物根周围的微生物。在另一些实施方案中,根相关细菌是根际细菌。根相关细菌可与植物形成共生关系,促进植物生长。(这样的促进植物生长的根际细菌被称为PGPR)。不受理论的束缚,预期一旦根相关细菌从根脱离,则该细菌将无法维持生存力,并因此不太可能在更广泛的环境中存活,从而防止经遗传修饰的细菌在环境中传播。

[0074] 根相关细菌的实例包括但不限于:放射性农杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)、酸热芽孢杆菌(*Bacillus acidocaldarius*)、酸土芽孢杆菌(*Bacillus acidoterresstris*)、土壤芽孢杆菌(*Bacillus agri*)、鮎泽芽孢杆菌(*Bacillus aizawai*)、白色乳杆菌(*Bacillus albolactis*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)、蜂房芽孢杆菌(*Bacillus alvei*)、*Bacillus aminoglucosidicus*、嗜胺芽孢杆菌(*Bacillus aminovorans*)、溶淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amylolyticus*) (也称为溶淀粉类芽孢杆菌(*Paenibacillus amylolyticus*))、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、*Bacillus aneirinolyticus*、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atropkaeus*)、产氮芽孢杆菌(*Bacillus azotoformans*)、栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) (同义词:*Bacillus endorhythmos*、水母芽孢杆菌(*Bacillus medusa*))、*Bacillus chiiosporus*、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、*Bacillus endoparasiticus*、苛求芽孢杆菌(*Bacillus fastidiosus*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、*Bacillus kurstaki*、乳酸芽孢杆菌(*Bacillus lacticola*)、乳病杆菌(*Bacillus laclimorbus*)、乳杆菌(*Bacillus laciis*)、侧孢芽孢杆菌(*Bacillus*

laierospoms) (也称为侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*))、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、缓病芽孢杆菌 (*Bacillus leniimorbus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lenius*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、摩洛哥芽孢杆菌 (*Bacillus maroccanus*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、*Bacillus meiens*、蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*)、纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto*)、杀线虫芽孢杆菌 (*Bacillus nematocida*)、*Bacillus nigrificans*、*Bacillus nigrum*、泛酸芽孢杆菌 (*Bacillus pantothenicus*)、日本甲虫芽孢杆菌 (*Bacillus papillae*)、冷解糖芽孢杆菌 (*Bacillus psychrosaccharolyticus*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、暹罗芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis*)、史氏芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*)、球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、*Bacillus tmiflagellatus*、大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)、短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*)、侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) (以前是侧孢芽孢杆菌 (*Bacillus laterosporus*))、*Chromobacterium suhisugae*、食酸戴尔福特菌 (*Delflia acidovorans*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、抗生素溶杆菌 (*Lysobacter antibioticus*)、产酶溶杆菌 (*Lysobacter enzymogenes*)、蜂房类芽孢杆菌 (*Paenibacillus alvei*)、多黏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)、日本丽金龟类芽孢杆菌 (*Paenibacillus popilliae*) (以前是日本丽金龟芽孢杆菌 (*Bacillus popilliae*))、成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*)、穿刺巴斯德氏芽菌 (*Pasteuria penetrans*) (以前是穿刺芽孢杆菌 (*Bacillus penetrans*))、*Pasteuria usgae*、胡萝卜果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum*) (以前是胡萝卜欧文氏菌 (*Erwinia carotovord*))、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金色假单胞菌 (*Pseudomonas aureofaciens*)、洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*) (以前称为洋葱伯克氏菌 (*Burkholderia cepacia*))、绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*)、荧光假单胞菌、*Pseudomonas proradix*、恶臭假单胞菌、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、*Serratia entomophila*、黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、哥伦比亚链霉菌 (*Streptomyces colombiensis*)、鲜黄链霉菌 (*Streptomyces galbus*)、戈壁发链霉菌 (*Streptomyces goshikiensis*)、灰绿链霉菌 (*Streptomyces griseoviridis*)、淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*)、*Streptomyces prasinus*、*Streptomyces saraceticus*、委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*)、野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*)、异发光杆菌 (*Xenorhabdus luminescens*)、嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophila*)、*Rhodococcus globerulus* AQ719 (NRRL登录号B-21663)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) AQ175 (ATCC登录号55608)、芽孢杆菌属AQ 177 (ATCC登录号55609)、芽孢杆菌属AQ178 (ATCC登录号53522) 和链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 菌株NRRL登录号B-30145。

[0075] 在一些实施方案中,细菌是荧光假单胞菌或巨大芽孢杆菌。在另一个实施方案中,细菌是荧光假单胞菌。在一些优选实施方案中,细菌是荧光假单胞菌SWB25。在另一个实施方案中,细菌是荧光假单胞菌F113。在另一个实施方案中,细菌是荧光假单胞菌CHA0。在另一个实施方案中,细菌是荧光假单胞菌Pf-5。在另一个实施方案中,细菌是荧光假单胞菌FW300 N2E2。

[0076] 根际细菌在宿主植物的根表面或表面细胞间间隙中定殖,通常形成根瘤。在一些

实施方案中,根相关细菌是促进植物生长的根际细菌(PGPR)。表现出促进植物生长活性的PGPR属的一些常见实例是:假单胞菌属、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、芽孢杆菌属等。另一些已知的PGPR包括鹰嘴豆中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium ciceri*)、双向伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia ambifaria*)、草分枝杆菌(*Mycobacterium phlei*)和嗜重氮葡萄糖酸醋杆菌(*G.diazotrophicus*)。技术人员已知PGPR描述了定植于植物的根并促进植物生长的土壤细菌。PGPR并非旨在涵盖对植物具有致病作用的细菌,例如有害根际细菌(*deleterious rhizobacteria*, DRB)。六种根际细菌菌株已被鉴定为DRB,这些包括:肠杆菌(*Enterobacter*)属、克雷伯菌(*Klebsiella*)属、柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)属、黄杆菌(*Flavobacterium*)属、无色杆菌(*Achromobacter*)属和节杆菌(*Arthrobacter*)属。

[0077] 在一些实施方案中,细菌是革兰氏阴性细菌。在一些实施方案中,细菌是假单胞菌属细菌。在一些实施方案中,细菌不是木驹形氏杆菌(也称为木醋杆菌和木葡萄糖酸醋杆菌)。

[0078] 在一些实施方案中,细菌选自以下荧光假单胞菌菌株:荧光假单胞菌CHA0(CP043179.1);荧光假单胞菌F113(CP003150.1);荧光假单胞菌FW300 N2E2(CP015225.1);荧光假单胞菌Pf-275(CP031648.1);荧光假单胞菌Pf-5(CP000076.1);荧光假单胞菌Pf0-1(CP000094.2);荧光假单胞菌FR1(CP025738.1);荧光假单胞菌DR133(CP048607.1);和荧光假单胞菌2P24(CP025542.1)。菌株CHA0和Pf-5目前被认为属于新的细菌物种防御假单胞菌(*Pseudomonas protegens*),其为广泛存在的革兰氏阴性植物保护细菌。然而,在本领域中,这些特定菌株(CHA0和Pf-5)也称为荧光假单胞菌菌株。因此,在一些情况下,细菌是防御假单胞菌,特别是关于菌株CHA0和Pf-5。在另一个实施方案中,细菌是荧光假单胞菌F113。

#### [0079] 纤维素

[0080] 在一些实施方案中,纤维素是细菌纤维素。在一些实施方案中,由经遗传修饰的微生物或细菌产生的纤维素被分泌到细胞外。不受理论束缚,认为细菌纤维素具有与植物纤维素不同的性质,并且其特征在于高纯度、强度、可模塑性和提高的保水能力。已经证明植物纤维素的保水值为纤维素样品重量的约60%,而细菌纤维素的保水值为纤维素样品重量的1000%(Klemm, et al. 2001)。在一些实施方案中,分泌的细菌纤维素在植物根周围形成网络。在一些实施方案中,细菌纤维素网络形成海绵状网络。在一些实施方案中,纤维素网络在植物根周围产生。

[0081] 预期由本发明的经遗传修饰的微生物或细菌产生的细菌纤维素网络将有助于水管理。通常,当根需要水时,细菌纤维素网络保留水并提供渗透作用。此外,细菌纤维素网络可创造提高土壤微生物组的环境,提供较健康的土壤和作物。此外,细菌纤维素网络可具有防止来自剧烈天气事件的局部洪水的潜力。还预期,细菌纤维素网络能够充当生物支架以保留根周围来自生物肥料的较大量的营养物,并防止肥料流失。

[0082] 在一些实施方案中,细菌纤维素保留水。预期保水性的提高使得作物生存力和产量提高。在另一些实施方案中,细菌纤维素有助于水蒸发的降低。水蒸发的降低将降低水的低效使用。因此,预期本发明的经遗传修饰的微生物或细菌将提高保留在植物根系周围的水的量并因此在降雨减少和/或干旱的气候中提高作物的生存力和产量。在一些实施方案中,在植物种植之后但在收获之前将经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌施加至所述植物。在一些实施方案中,在种植植物之前将经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌施加至土壤。在一些实施方案中,在种植之前将经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌施加至植物的

种子。

[0083] 术语“提高的纤维素产生”和“提高纤维素产生”在本文中用于描述分别与(任选地相同菌株或物种的)参照微生物或细菌相比,在经遗传改造微生物或细菌中产生更大量的纤维素。在一些实施方案中,参照微生物是相同菌株或物种的野生型微生物。在一些实施方案中,参照细菌是相同菌株或物种的野生型细菌。与参照微生物或细菌相比,纤维素产生的提高可以是2倍、3倍、4倍、5倍、6倍等。由经遗传改造微生物或细菌产生的纤维素的量可通过确定干和/或湿纤维素生物质的重量的技术来量化。预期分别与参照微生物或细菌相比,本发明的经遗传改造微生物或细菌将产生提高的纤维素生物质的干重和/或湿重。细菌纤维素可如由Jozala A.F., et al. 2014(其通过引用并入)所述的进行量化。例如,可以收集细菌纤维素,在蒸馏水中清洗,并且在60°C下浸没在NaOH 1N中90分钟以除去附着的细胞。随后可将细菌纤维素在蒸馏水中洗涤并在50°C下干燥24小时,以评价以 $\text{mg mL}^{-1}$ (BC的质量(mg)/培养基的体积(mL))计的细菌纤维素产生浓度。

[0084] 纤维素的合成和分泌

[0085] 细菌纤维素的合成是涉及以下两个主要机制的多步骤过程:合成尿苷二磷酸(UDP-葡萄糖),随后通过纤维素合酶将葡萄糖聚合成且未支化的链。

[0086] 本文中所述的蛋白质是参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,微生物或细菌被修饰以过表达至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十一种或至少十二种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0087] 编码用于纤维素生物合成和分泌的纤维素合酶复合物的细菌纤维素生物合成(bcs)操纵子最初是在木驹形氏杆菌(也称为木醋杆菌和木葡糖酸醋杆菌)中鉴定出来的。在一些实施方案中,微生物或细菌被遗传修饰以过表达至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。在一些实施方案中,微生物或细菌被修饰以过表达至少一种、至少两种、至少三种或至少四种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。

[0088] 木驹形氏杆菌已被鉴定为纤维素产生者物种中最高效的细菌纤维素产生者。特别地,由驹形氏杆菌(Komagataeibacter)物种产生的细菌纤维素显示出独特的性能,包括高机械强度、高吸水能力、高结晶度以及超细和高纯的纤维网络结构(Vandamme, et al. 1998)。不受理论的束缚,预期用木驹形氏杆菌的纤维素合成蛋白对微生物、细菌或根相关细菌进行遗传修饰将使得纤维素的产生提高且更高效。

[0089] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌是用编码至少一种来自细菌纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行遗传修饰的。在一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌是用至少一种来自木驹形氏杆菌的纤维素合酶复合物的蛋白质进行修饰的。出于本发明的目的,本文中描述了纤维素合酶复合物的组分。

[0090] 出于本发明的目的,“bcs操纵子”编码形成纤维素合酶复合物的四种蛋白质亚基BcsA、BcsB、BcsC和BcsD。位于内膜的胞质表面的BcsA亚基具有催化 $\beta$ -1,4-糖基转移酶结构域,其负责将尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-葡萄糖)单体聚合成纤维素的 $\beta$ -1,4-葡聚糖链。催化结构域的活性受细菌纤维素合成的别构活化剂双-(3'→5')-环二鸟苷酸的调节。BcsB通过单个C端跨膜螺旋与周质中的BcsA结合,在那里使用两个碳水化合物结合结构域稳定BcsA并引导葡聚糖链通过周质空间。认为通过BcsC的作用促进细菌纤维素从周质分泌至胞外环

境,根据其结构预测其在木驹形氏杆菌的外膜中形成孔。与BcsC是外膜孔蛋白的观点一致,观察到BcsC对于体内而非体外细菌纤维素合成是必需的。最后,细菌纤维素的结晶是通过BcsD的作用实现的,BcsD是在通过BcsC输出期间促进四个葡聚糖链的氢键合的包含四个螺旋通道的圆柱形八聚体周质蛋白。此外,已经在木驹形氏杆菌中证明,BcsC突变体不能产生纤维素原纤维,而BcsD突变体比野生型产生少约40%的纤维素(Wong et al.1990)。细菌纤维素与其植物等同物的区别在于高结晶度指数。特别地,木驹形氏杆菌产生两种细菌纤维素结晶同质异晶,称为纤维素I和纤维素II,其需要与纤维素合酶相关的BcsD亚基。该亚基已被表征为偶联纤维素聚合和结晶。

[0091] 在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达基因**bcsA**、**bcsB**、**bcsC**和**bcsD**中的至少一种。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达**bcsA**基因和**bcsB**基因。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达**bcsA**基因和**bcsB**基因,以及**bcsC**基因和**bcsD**基因中的至少一种。在另一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达至少**bcsA**、**bcsB**和**bcsD**。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达**bcs**操纵子。在另一些实施方案中,**bcsA**、**bcsB**、**bcsC**、**bcsD**和**bcs**操纵子各自分离自木驹形氏杆菌。

[0092] **cmcAx** (也称为**bcsZ**) 位于**bcs**操纵子的上游,并且编码具有纤维素水解能力的内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶。已经表明,少量外源**CmcAx**增强木驹形氏杆菌的细菌纤维素产生,而内源性过表达**cmcAx**提高细菌纤维素产量。不受理论束缚,预期**CmcAx**的纤维素水解活性可对细菌纤维素生物合成发挥调节作用。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达**cmcAx**基因。在一些实施方案中,微生物是用**cmc**基因进行修饰的。在另一些实施方案中,**cmcAx**基因分离自木驹形氏杆菌。

[0093] **ccpAx** (也称为**bcsH**) 位于与**cmcAx**相同的上游操纵子中,其编码体内细菌纤维素生物合成所需的纤维素互补蛋白(**ccpAx**)。**CcpAx**已被证明与周质中的**BcsD**相互作用。认为,这种独特的组织可能是木驹形氏杆菌活性极高的原因。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达**ccpAx**基因。在一些实施方案中,微生物是用**ccp**基因进行修饰的。在另一些实施方案中,**ccpAx**基因分离自木驹形氏杆菌。

[0094] **BC**合成操纵子的下游是编码 $\beta$ -葡糖苷酶的**bg1Ax** (也称为**bg1xA**),其被分泌并且具有水解多于三个 $\beta$ -1,4-葡萄糖单元(纤维三糖)的能力。已经表明,虽然这种酶对于细菌纤维素产生不是必需的,但**bg1Ax**基因的破坏导致细菌纤维素的产生降低(Tajima et al., 2001;Kawano et al.,2002)。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达**bg1Ax**基因。在一些实施方案中,微生物是用**bg1**基因进行修饰的。在另一些实施方案中,**bg1Ax**基因分离自木驹形氏杆菌。

[0095] 磷酸葡糖变位酶,也称为**celB**,其负责催化葡萄糖-1-磷酸(G-1-P)与葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)之间的相互转化。不受理论束缚,认为G-6-P向G-1-P的转化促进了纤维素的产生。已表明磷酸葡糖变位酶在胞外纤维素的形成中是必不可少的,因为**pgm**突变体不能产生纤维素。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达**pgm**基因。在另一些实施方案中,**pgm**基因分离自木驹形氏杆菌。

[0096] UTP-葡萄糖-1-磷酸是参与碳水化合物代谢的酶,并且从葡萄糖-1-磷酸(G-1-P)

和UTP合成UDP-葡萄糖。UDP-葡萄糖是纤维素产生中的关键组分。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达galU基因。在另一些实施方案中,galU基因分离自木驹形氏杆菌。

[0097] 二鸟苷酸环化酶是将2GTP催化成2二磷酸和环GMP的酶。这可作为基因dgc或作为cdg操纵子引入到细菌细胞中。cdg操纵子包含环二-GMP磷酸二酯酶(pdeA)和二鸟苷酸环化酶(dcg)。二鸟苷酸环化酶催化环二-GMP的形成,并且磷酸二酯酶A催化降解。不受理论束缚,认为环二-GMP是细菌纤维素合成的别构活化剂。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达dgc基因和/或cdg操纵子。在另一些实施方案中,dgc基因和cdg操纵子各自分离自木驹形氏杆菌。

[0098] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达选自包含以下的组的至少一种或更多种基因:bcsA基因;bcsB基因;bcsC基因;bcsD基因;cmcAx基因;ccpAx基因;bglAx基因;pgm基因;galU基因;cdg操纵子;和dgc基因。

[0099] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达bcs操纵子,以及以下基因或操纵子中的至少一种:

[0100] a) cmcAx基因;

[0101] b) ccpAx基因;

[0102] c) bglAx基因;

[0103] d) pgm基因;

[0104] e) galU基因;

[0105] f) cdg操纵子;和/或

[0106] g) dgc基因。

[0107] 在另一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌还包含如由a)至g)所述的基因或操纵子中的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或至少六种。在一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌还包含a)至g)的基因和操纵子。在一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌还由a)至g)的基因和操纵子组成。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物、细菌或根相关细菌包含bcs操纵子以及至少cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物、细菌或根相关细菌包含bcs操纵子以及至少cmc基因、ccp基因和bgl基因。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物、细菌或根相关细菌由bcs操纵子以及至少cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因组成。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物、细菌或根相关细菌由bcs操纵子以及至少cmc基因、ccp基因和bgl基因组成。在一些实施方案中,基因是异源的。

[0108] 在一些实施方案中,包含不含有所有BcsA、BcsB、BcsC和BcsD的内源性bcs操纵子的微生物、细菌或根相关细菌可用bcs操纵子的基因(bcsA、bcsB、bcsC、bcsD)中的至少一种进行修饰。通常,细菌是用通常不表达的bcs基因进行修饰的。例如,荧光假单胞菌SBW25仅表达bcs操纵子的BcsA、BcsB和BcsC,并且因此根据本发明被修饰以表达BcsD。在一些实施方案中,根相关细菌荧光假单胞菌SBW25是用包含bcsD的外源核酸进行修饰的。

[0109] 不受理论束缚,预期bcs操纵子,以及cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、dgc基因和/或cdg操纵子的任意组合将在宿主细菌中促进纤维素的合成和分泌。

在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌可包含本文中所述的任意基因或操纵子的多个拷贝。

[0110] 在一些方面中,本发明涉及将纤维素合成基因(优选cmcAX、ccpAX、bcsA、bcsB、bcsC、bcsD和/或bglxA)并入到土壤中存在的外来宿主中。在一些方面中,本发明提供了经遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的微生物,其中经遗传修饰的细菌是用一种或更多种异源基因进行修饰的,其中基因包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和/或bcsD基因。在一些实施方案中,基因包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因。在一些实施方案中,基因还包含cmcAx基因、ccpAx基因和/或bglAx基因。

[0111] 在一些实施方案中,经遗传修饰的细菌是用包含bcs操纵子的外源核酸进行遗传修饰的,其中bcs操纵子包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因。在一些实施方案中,经遗传修饰的细菌是还用包含cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因中的至少一种的外源核酸进行修饰的。

[0112] 在一些方面中,本发明提供了用于产生纤维素的经遗传改造微生物,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,其中经遗传修饰的细菌被修饰以过表达至少一种或更多种外源基因,其中外源基因选自包含以下的组:bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因和任选地ccpAx基因。在一些实施方案中,微生物是细菌,任选地是根相关细菌。在一些方面中,提供了经遗传改造微生物,其包含编码用于产生纤维素的一种或更多种异源基因,其中基因是bcsA、bcsB、bcsC和/或bcsD。在一些实施方案中,基因是bcsA、bcsB、bcsC和bcsD。在一些实施方案中,基因还包含cmcAx基因、ccpAx基因和/或bglAx基因。在一些实施方案中,微生物是细菌。在另一些实施方案中,微生物是根相关细菌。在一些实施方案中,基因各自分离自木驹形氏杆菌。

[0113] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物还包含编码绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的基因。不受理论束缚,认为提供表达GFP的宿主细胞有助于追踪环境中的经遗传修饰的微生物(例如细菌)。因此,在一些实施方案中,经遗传改造微生物包含编码用于产生纤维素的一种或更多种异源基因,其中基因是bcsA、bcsB、bcsC和/或bcsD,并且还包含编码GFP的基因。

#### [0114] 过表达

[0115] 本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。在一些实施方案中,本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌被修饰以过表达至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质。

[0116] 本文中使用的术语“过表达”是指目的蛋白质在微生物或细菌中以比其分别在参照微生物或参照细菌中表达的水平更高的水平表达,该参照微生物或参照细菌任选地分别是通常属于相同菌株或物种的可比较的野生型微生物或细菌。过表达可包括但不限于组成型或诱导型表达。在一些实施方案中,微生物或细菌不内源地表达目的蛋白质,出于本发明的目的,该微生物或细菌细胞中该蛋白质的任何水平的表达均被认为是该蛋白质的“过表达”。在本发明中,术语“至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的过表达”或“过表达至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质”意指至少一种参与纤维素合成的蛋白质在微生物或细菌中以比其分别在可比较的参照微生物或细菌中表达的水平更高的水平表达。在一些实施方案中,参照微生物是野生型微生物。在一些实施方案中,参照微生物与经修饰的

微生物属于相同物种。参照微生物可与经修饰的微生物属于相同菌株。在一些实施方案中，参照微生物是与经修饰的微生物属于相同菌株或物种的野生型细菌。在一些实施方案中，参照细菌是野生型细菌。在一些实施方案中，参照细菌与经修饰的细菌属于相同物种。参照细菌可与经修饰的细菌属于相同菌株。在一些实施方案中，参照细菌是与经修饰的细菌属于相同菌株或物种的野生型细菌。

[0117] 过表达可以以本领域技术人员已知的任何方式来实现。一般而言，其可通过提高基因的转录/翻译来实现，例如通过提高基因的拷贝数或者改变或修饰与基因表达相关的调节序列或位点来实现。例如，过表达可通过引入编码与调节序列（例如启动子）可操作地连接的目的基因的多核苷酸的一个或多个拷贝来实现。该基因可与强组成型启动子和/或强遍在启动子（ubiquitous promoter）可操作地连接以达到高表达水平。这样的启动子可以是内源启动子或重组启动子。或者，可除去调节序列使得表达成为组成型。可用提高基因表达或导致基因组成型表达的异源启动子替换给定基因的天然启动子。通常，可根据本发明使用基因组编辑方法例如CRISPR、TALEN和锌指核酸酶以实现纤维素合成和/或分泌蛋白的过表达。例如，CRISPR基因组编辑可用于除去调节序列，导致目的基因的组成型表达。当在相同条件下培养时，与改造之前的宿主细胞相比，宿主细胞可过表达纤维素合成和/或分泌蛋白（例如纤维素合酶复合物的蛋白质及其相关蛋白质）多于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%或多于300%。

[0118] 在一个实施方案中，纤维素合成和分泌基因的过表达是通过改变或修饰与基因表达相关的调节位点来实现的。在另一个实施方案中，纤维素合成和分泌基因的过表达是通过提高纤维素合成和分泌基因的拷贝数来实现的。在另一个实施方案中，微生物、细菌或根相关细菌是用包含一种或更多种纤维素合成和分泌基因的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中，微生物或细菌是用包含一种或更多种纤维素合成和分泌基因的一种或更多种单独的外源核酸进行修饰的。在一些实施方案中，将外源核酸并入到微生物或细菌内的自我复制质粒中。在另一个实施方案中，将外源核酸并入到微生物或细菌的基因组中。在一些实施方案中，目的基因的表达是瞬时的。在一些实施方案中，目的基因的表达是稳定的。

[0119] 过表达的检测可以以本领域技术人员已知的任何方式来实现。一些实例包括但不限于通过技术例如Western印迹、qRT-PCT和流式细胞术来检测用于合成纤维素的蛋白质（机器（machinery）），例如纤维素合酶复合物，或者通过例如确定干和/或湿纤维素生物质的重量的技术来检测由经遗传改造细菌产生的纤维素的量。

[0120] 在一些实施方案中，将外源核酸引入到微生物、细菌或根相关细菌中。在本说明书中，核酸可以是具有这样的核苷酸序列的任何核酸（DNA或RNA），所述核苷酸序列与以下具有特定程度的序列同一性：分离自木驹形氏杆菌的bcs操纵子的基因，cmcAx基因、ccpAx基因、bglxA基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和/或dgc基因；以及这些序列中任一种的RNA转录物；前述序列中任一种的片段；或者这些序列或片段中任一种的互补序列。特定程度的序列同一性可以是至少60%至100%的序列同一性。更优选地，特定程度的序列同一性可以是至少65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性之一。在本说明书中，“外源核酸”是指对其宿主细胞来说是外来的，例如不是内源性的核苷酸序列。

[0121] 关于多核苷酸或蛋白质的术语“内源/内源性”是指宿主细胞中天然存在的多核苷

酸或蛋白质。

[0122] 关于多核苷酸或蛋白质的术语“异源/异源性”是指不天然存在于宿主细胞中的多核苷酸或蛋白质。在一些优选实施方案中，外源核酸是异源核酸。

[0123] 当与对象细胞、核酸、蛋白质或载体相关使用时，术语“重组”表示对象已从其天然状态被修饰。因此，例如，重组细胞表达在细胞的天然（非重组）形式中未发现的基因，或者在与自然界中发现的不同水平或不同条件下表达天然基因。重组核酸与天然序列的区别在于一种或更多种核苷酸和/或与异源序列（例如表达载体中的异源启动子）可操作地连接。重组蛋白与天然序列的区别可在于一种或更多种氨基酸和/或与异源序列融合。经改造的微生物或细菌可被认为是重组微生物或细菌。在一个实施方案中，微生物或细菌细胞是通过将表达盒或载体引入到所述细胞中进行遗传改造的，所述表达盒或载体包含编码用于纤维素合成和分泌的机器（例如纤维素合酶复合物）的外源核酸序列。核酸序列可与在微生物或细菌细胞中指导所述核酸表达的一种或更多种控制序列可操作地连接。控制序列可包含被微生物或细菌细胞识别的启动子。启动子包含介导用于纤维素合成的机器的表达的转录控制序列。启动子可以是在微生物或细菌细胞中显示出转录活性的任何多核苷酸，包括突变启动子、截短启动子和杂合启动子。启动子可以是组成型或诱导型启动子，优选组成型启动子。控制序列还可包含适当的转录起始、终止和增强子序列。在一些实施方案中，表达盒包含以下或由以下组成：与转录启动子和转录终止子可操作地连接的编码用于纤维素合成和分泌的机器的核酸序列。

[0124] 本文中使用的“载体”是用作载剂将外来遗传物质转移到细胞中的寡核苷酸分子（DNA或RNA）。载体可以是用于在细胞中表达外来遗传物质的表达载体。这样的载体可包含与编码待表达的基因序列的核苷酸序列可操作地连接的启动子序列。载体还可包含终止密码子和表达增强子。本领域已知的任何合适的载体、启动子、增强子和终止密码子均可以是根据本发明的。合适的载体包括质粒、双元载体、病毒载体和人工染色体（例如酵母人工染色体）。在一些实施方案中，本发明的载体是分离的载体。本文中使用的“表达盒”是载体DNA的不同组分，其由待在宿主细胞中表达的基因和调节序列组成。表达盒通常包含一种或更多种基因和控制它们表达的序列。

[0125] 本文中使用的“组成型启动子”是在大多数条件下和/或在大多数发育阶段期间有活性的启动子。在用于生物技术的表达载体中使用组成型启动子有数个优点，例如：高水平产生用于选择转基因细胞或生物体的蛋白质；高水平表达报道蛋白或可评分标志物，以允许容易地检测和量化；高水平产生为调节转录系统一部分的转录因子；产生需要在生物体中普遍存在活性的化合物；以及产生在所有发育阶段期间所需的化合物。或者，可使用非组成型启动子。本文中使用的“非组成型启动子”是在某些条件下有活性的启动子。在一些实施方案中，启动子是诱导型启动子。在一些实施方案中，诱导型启动子是糖诱导型启动子。在一些实施方案中，启动子是阿拉伯糖诱导型启动子。

[0126] 在一些优选实施方案中，载体是当被引入到微生物或细菌细胞中时被整合到基因组中并与该载体已整合到其中的染色体一起复制的载体。在一些实施方案中，编码用于纤维素合成的机器的基因的整合将整合到染色体的非必需基因座中。染色体的非必需基因座的一个非限制性实例是SBW25的6.6Mbp染色体上的基因座-6- (Rainey and Bailey, 1996)，其使用由BAILEY et al., 1995 (其通过引用并入) 所示的方法。通常，目的基因的插入由定

点同源重组介导。在一些实施方案中，目的基因的插入由CRISPR基因组编辑介导。通常，CRISPR敲入由同源定向修复 (homologous directed repair, HDR) 介导。不受理论束缚，预期来自表达新基因序列和环境变化的额外代谢活动是防止环境中不受控制的经遗传修饰的细菌繁殖的保障措施。例如，产生提高量的纤维素的微生物或细菌仅可在支持其繁殖的环境中存活，例如在植物根中及植物根周围生长。如果经遗传修饰的微生物或细菌在不利的环境中生长，则产生提高量的纤维素的额外代谢负担将导致经遗传修饰的微生物或细菌在较广泛环境中的生存力降低，从而提高经遗传修饰的微生物或细菌的安全性。

[0127] 可在表达系统中使用反向选择标记 (counter selectable marker)。选择标记的一个实例包括其中载体编码 sacB 的蔗糖敏感性系统。合适载体的一些实例包括但不限于重组整合或非整合载体。载体的一些实例包括 pGEX 系列载体、pET 系列载体和 pEX 系列载体。在一些实施方案中，使用 pEX18Ap 载体。在一些实施方案中，使用微型 CTX1 载体。在一些实施方案中，使用 pFLP2 载体。pFLP2 是可用于除去不需要的序列的切除载体。在一些实施方案中，宿主微生物中的插入位点是由 SEQ ID NO:1: TGAGTTCGAATCTCACCGCTCCGCCATAT 限定的 attb。

[0128] 在本说明书中，术语“可操作地连接”可包括这样的情况：其中所选择的核苷酸序列与调节核苷酸序列以使得核苷酸编码序列的表达被置于调节序列的影响或控制之下这样的方式共价连接。因此，如果调节序列能够影响形成部分或全部所选择的核苷酸序列的核苷酸编码序列的转录，则该调节序列与所选择的核苷酸序列可操作地连接。然后在适当的情况下，可将所得转录物翻译成所期望的蛋白质或多肽。

[0129] 在一些实施方案中，根据本发明的微生物是用 cmcAx 基因进行修饰的，所述 cmcAx 基因具有如由 SEQ ID NO:2 限定的核酸序列。

[0130] 在一些实施方案中，微生物是用 cmcAx 基因进行修饰的，所述 cmcAx 基因与 SEQ ID NO:2 具有至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的核酸序列同一性。

[0131] 在一些实施方案中，根据本发明的微生物是用 ccpAx 基因进行修饰的，所述 ccpAx 基因具有如由 SEQ ID NO:3 限定的核酸序列。

[0132] 在一些实施方案中，微生物是用 ccpAx 基因进行修饰的，所述 ccpAx 基因与 SEQ ID NO:3 具有至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的核酸序列同一性。

[0133] 在一些实施方案中，根据本发明的微生物是用包含 bcsA 基因、bcsB 基因、bcsC 基因和 bcsD 基因的 bcs 操纵子进行修饰的，所述 bcs 操纵子具有如由 SEQ ID NO:4 限定的核酸序列。

[0134] 在一些实施方案中，微生物是用 bcs 操纵子进行修饰的，所述 bcs 操纵子与 SEQ ID NO:4 具有至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的核酸序列同一性。

[0135] 在一些实施方案中，根据本发明的微生物是用 gfp 基因进行修饰的，所述 gfp 基因

具有如由SEQ ID NO:5限定的核酸序列。

[0136] 在一些实施方案中,微生物是用gfp基因进行修饰的,所述gfp基因与SEQ ID NO:5具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0137] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用bglAx基因进行修饰的,所述bglAx基因具有如由SEQ ID NO:6限定的核酸序列。

[0138] 在一些实施方案中,微生物是用bglAx基因进行修饰的,所述bglAx基因与SEQ ID NO:6具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0139] 在一些实施方案中,微生物是用与SEQ ID NO:2具有至少65%核酸序列同一性的cmcAx基因、与SEQ ID NO:3具有至少65%核酸序列同一性的ccpAx基因、与SEQ ID NO:4具有至少65%核酸序列同一性的bcs操纵子、与SEQ ID NO:5具有至少65%核酸序列同一性的gfp基因、和/或与SEQ ID NO:6具有至少65%核酸序列同一性的bglAx基因进行修饰的。

[0140] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用Ph1Z群体感应启动子进行修饰的,所述Ph1Z群体感应启动子具有如由SEQ ID NO:7限定的核酸序列。

[0141] 在一些实施方案中,微生物是用Ph1Z群体感应启动子进行修饰的,所述Ph1Z群体感应启动子与SEQ ID NO:7具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0142] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用Rox群体感应启动子进行修饰的,所述Rox群体感应启动子具有如由SEQ ID NO:8限定的核酸序列。

[0143] 在一些实施方案中,微生物是用Rox群体感应启动子进行修饰的,所述Rox群体感应启动子与SEQ ID NO:8具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0144] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用AfmR群体感应启动子进行修饰的,所述AfmR群体感应启动子具有如由SEQ ID NO:9限定的核酸序列。

[0145] 在一些实施方案中,微生物是用AfmR群体感应启动子进行修饰的,所述AfmR群体感应启动子与SEQ ID NO:9具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0146] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用cmcAx基因进行修饰的,所述cmcAx基因具有如由SEQ ID NO:10限定的核酸序列。

[0147] 在一些实施方案中,微生物是用cmcAx基因进行修饰的,所述cmcAx基因与SEQ ID NO:10具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0148] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用ccpAx基因进行修饰的,所述ccpAx基因具有如由SEQ ID NO:11限定的核酸序列。

[0149] 在一些实施方案中,微生物是用ccpAx基因进行修饰的,所述ccpAx基因与SEQ ID NO:11具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0150] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用bcsA基因进行修饰的,所述bcsA基因具有如由SEQ ID NO:12限定的核酸序列。

[0151] 在一些实施方案中,微生物是用bcsA基因进行修饰的,所述bcsA基因与SEQ ID NO:12具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0152] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用bcsB基因进行修饰的,所述bcsB基因具有如由SEQ ID NO:13限定的核酸序列。

[0153] 在一些实施方案中,微生物是用bcsB基因进行修饰的,所述bcsB基因与SEQ ID NO:13具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0154] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用bcsC基因进行修饰的,所述bcsC基因具有如由SEQ ID NO:14限定的核酸序列。

[0155] 在一些实施方案中,微生物是用bcsC基因进行修饰的,所述bcsC基因与SEQ ID NO:14具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0156] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用bcsD基因进行修饰的,所述bcsD基因具有如由SEQ ID NO:15限定的核酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,微生物是用bcsD基因进行修饰的,所述bcsD基因与SEQ ID NO:15具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0158] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用gfp基因进行修饰的,所述gfp基因具有如由SEQ ID NO:16限定的核酸序列。

[0159] 在一些实施方案中,微生物是用gfp基因进行修饰的,所述gfp基因与SEQ ID NO:16具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0160] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物是用bglAx基因进行修饰的,所述bglAx基因具有如由SEQ ID NO:17限定的核酸序列。

[0161] 在一些实施方案中,微生物是用bglAx基因进行修饰的,所述bglAx基因与SEQ ID

N0:17具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0162] 在一些实施方案中,微生物是用以下进行修饰的:与SEQ ID N0:10具有至少65%核酸序列同一性的cmcAx基因、与SEQ ID N0:11具有至少65%核酸序列同一性的ccpAx基因、与SEQ ID N0:12具有至少65%核酸序列同一性的bcsA基因、与SEQ ID N0:13具有至少65%核酸序列同一性的bcsB基因、与SEQ ID N0:14具有至少65%核酸序列同一性的bcsC基因、与SEQ ID N0:15具有至少65%核酸序列同一性的bcsD基因、与SEQ ID N0:16具有至少65%核酸序列同一性的gfp基因、和/或与SEQ ID N0:17具有至少65%核酸序列同一性的bglAx基因。在另一些实施方案中,与SEQ ID N0:7、SEQ ID N0:8或SEQ ID N0:9具有至少65%核酸序列同一性的启动子与以下可操作地连接:与SEQ ID N0:10具有至少65%核酸序列同一性的cmcAx基因、与SEQ ID N0:11具有至少65%核酸序列同一性的ccpAx基因、与SEQ ID N0:12具有至少65%核酸序列同一性的bcsA基因、与SEQ ID N0:13具有至少65%核酸序列同一性的bcsB基因、与SEQ ID N0:14具有至少65%核酸序列同一性的bcsC基因、与SEQ ID N0:15具有至少65%核酸序列同一性的bcsD基因、与SEQ ID N0:16具有至少65%核酸序列同一性的gfp基因、和/或与SEQ ID N0:17具有至少65%核酸序列同一性的bglAx基因。

[0163] 在一些实施方案中,根据本发明的微生物被SEQ ID N0:18修饰。

[0164] 在一些实施方案中,微生物是用核酸进行修饰的,所述核酸与SEQ ID N0:18具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核酸序列同一性。

[0165] 可以以任何顺序组合和使用上述序列。

[0166] 群体感应系统

[0167] 在一些实施方案中,纤维素合成基因的表达由细胞密度群体感应启动子调节。在另一些实施方案中,纤维素合成基因的表达由细胞密度群体感应系统调节。在另一些实施方案中,群体感应系统在组成型启动子的控制下。在另一些实施方案中,群体感应系统调节控制本文中所公开的基因的表达的启动子。不受理论的束缚,预期使用群体感应系统控制纤维素合成基因的表达,使得一旦细菌在根际定殖至浓度阈值,则启动子被开启并且纤维素合成将开始。

[0168] 群体感应(quorum sensing, QS)定义为通过基因调节来检测细胞群密度并对该细胞群密度做出响应的能力。作为一个实例,细菌可使用群体感应来调节表型表达,例如生物膜形成、毒力因子表达、运动性、生物发光、固氮作用、孢子形成等,这协调了它们的行为。该功能基于直接环境中细菌群体的局部密度。在一些实施方案中,将群体感应操纵子插入到宿主细胞中。

[0169] 在一些实例中,革兰氏阳性细菌使用自诱导肽(autoinducing peptide, AIP)作为充当信号传导分子的自诱导剂。当在局部环境中检测到高浓度的AIP时,AIP与受体结合以激活激酶。随后激酶使转录因子磷酸化,转录因子随后调节基因的转录。这被称为双组分系统。因此,在一些实施方案中,使用双组分系统。在一些实施方案中,双组分系统包含传感器激酶(其检测信号传导分子)和响应调节剂(其调节基因表达)。

[0170] 在另一个实例中,革兰氏阴性细菌产生N-酰基高丝氨酸内酯(acyl homoserine lactone,AHL)作为信号传导分子。通常,这些AHL直接与转录因子结合以调节基因表达。在一些实施方案中,使用一步法。已知一些革兰氏阴性细菌也利用双组分系统。

[0171] 在一些实施方案中,本文中公开的基因由细胞密度依赖性自诱导启动子调节。在一些实施方案中,本文中公开的纤维素合成和/或分泌基因在细胞密度群体感应启动子的控制下。预期当细菌在根际定殖并达到阈值密度时,纤维素合成基因被开启。

[0172] 在一些实施方案中,群体感应系统包含编码传感器激酶的基因和编码响应调节剂的基因。在另一些实施方案中,群体感应系统还包含群体感应调节启动子。在一些实施方案中,包含编码传感器激酶的基因和编码响应调节剂的基因的核酸与组成型启动子可操作地连接。在另一些实施方案中,使用了RoxS/RoxR群体感应系统。在一些实施方案中,将RoxS/RoxR操纵子插入到宿主细胞中。在一些替代实施方案中,群体感应系统包含编码信号传导分子(自诱导剂)的基因和编码转录/响应调节剂的基因。在另一些实施方案中,群体感应系统还包含群体感应调节启动子。在一些实施方案中,包含编码信号传导分子的基因和编码转录/响应调节剂的基因的核酸与组成型启动子可操作地连接。在另一些实施方案中,使用PhzR/PhzI群体感应系统。在一些实施方案中,将PhzR/PhzI操纵子插入到宿主细胞中。

[0173] 在一些实施方案中,群体感应系统激活靶基因启动子。在另一些实施方案中,响应调节剂与靶基因启动子结合。

[0174] Meyers A, et al. 2019中描述了基于QS的自诱导启动子系统,特别是细菌的RoxS/RoxR群体感应(QS)系统。RoxS/RoxR群体感应系统是由传感器组氨酸激酶(RoxS)和响应调节剂(RoxR)形成的双组分系统。预期RoxS将导致RoxR的磷酸化,随后该磷酸化的RoxR将通过与推定的RoxR识别元件结合来调节本文中公开的纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用RoxS/RoxR群体感应系统来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用群体感应依赖性RoxS/RoxR启动子来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用rox群体感应调节启动子来控制本文中所述基因的表达。在一些实施方案中,群体感应依赖性RoxS/RoxR启动子与编码本文中公开的基因的核酸可操作地连接。在一些实施方案中,启动子包含RoxR识别元件。

[0175] 还描述了PhzR/PhzI群体感应系统。该系统包含转录调节剂PhzR和AHL合酶PhzI。在一些实施方案中,使用PhzR/PhzI群体感应系统来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用群体感应依赖性PhzR/PhzI启动子来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用phz群体感应调节启动子来控制本文中所述基因的表达。在一些实施方案中,群体感应依赖性PhzR/PhzI启动子与编码本文中公开的基因的核酸可操作地连接。

[0176] 在另一些实施方案中,群体感应系统在组成型启动子的控制下。这可在图4和5中看到。

[0177] 在一些实施方案中,使用Rh1R/Rh1I群体感应系统来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,将Rh1R/Rh1I操纵子插入到宿主细胞中。在Rh1I/R系统中,rh1I指导N-(丁酰基)-高丝氨酸内酯(C4-HSL)的合成,随后N-(丁酰基)-高丝氨酸内酯与同源Rh1R相互作用,影响靶基因的转录。在一些实施方案中,使用群体感应依赖性Rh1R/Rh1I启动子来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用rh1群体感应调节启动

子来控制本文中所述基因的表达。在一些实施方案中,群体感应依赖性Rh1R/Rh1I启动子与编码本文中公开的基因的核酸可操作地连接。

[0178] 在一些实施方案中,使用LuxI/LuxR群体感应系统来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,将LuxI/LuxR操纵子插入到宿主细胞中。在一些实施方案中,使用Lux/LuxR群体感应系统来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用群体感应依赖性LuxI/LuxR启动子来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用lux群体感应调节启动子来控制本文中所述基因的表达。在一些实施方案中,群体感应依赖性LuxI/LuxR启动子与编码本文中公开的基因的核酸可操作地连接。

[0179] 在一些实施方案中,使用AfmI/AfmR群体感应系统来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,将AfmI/AfmR操纵子插入到宿主细胞中。在一些实施方案中,使用AfmI/AfmR群体感应系统来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用群体感应依赖性AfmI/AfmR启动子来控制纤维素合成和分泌基因的表达。在一些实施方案中,使用afm群体感应调节启动子来控制本文中所述基因的表达。在一些实施方案中,群体感应依赖性AfmI/AfmR启动子与编码本文中公开的基因的核酸可操作地连接。

[0180] 不希望受理论束缚,群体感应系统充当生物安全元件。预期本发明的经遗传改造微生物在目的植物的根际环境中定殖,因为植物与细菌生活在有益的共生关系中。在该生物安全系统中,仅当细菌浓度高时可实现纤维素的表达。因此,当本发明的经遗传改造微生物不存在于它们的最佳根际环境中时,纤维素基因将不表达,并且经遗传改造微生物将充当野生型菌株。

[0181] 在一些实施方案中,异源纤维素合成和/或分泌基因由群体感应系统调节。在一些实施方案中,异源纤维素合成和/或分泌基因由群体感应调节启动子调节。

[0182] 在一些实施方案中,群体感应系统调节启动子与编码本发明的一种或更多种外源基因的核酸可操作地连接,其中所述基因的表达由群体感应系统调节。在一些实施方案中,外源基因包含bcsA基因;bcsB基因;bcsC基因;bcsD基因;cmc基因;ccp基因;bg1基因;pgm基因;galU基因;cdg操纵子;和dgc基因。在另一些实施方案中,基因是异源的。

#### [0183] 组合物

[0184] 在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物作为可直接添加至土壤的接种物被递送至植物。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的细菌作为可直接添加至土壤的细菌接种物被递送至植物。在另一个实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌作为可直接添加至土壤的液体制剂被递送至植物。在一些实施方案中,微生物或细菌接种物是基于泥炭的制剂。在另一些实施方案中,基于泥炭的制剂用于包被种子或丸粒以用于在沟中播种。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌以微珠形式递送至植物。在另一些实施方案中,微珠是藻酸盐微珠。预期这些藻酸盐微珠包封微生物或细菌并保护它们免受环境压力,并且当土壤微生物降解聚合物时将它们逐渐释放到土壤中。

[0185] 通常,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌可与生物肥料组合施加。本文中使用的“生物肥料”是包含活微生物的物质,其通过提高主要营养物向宿主植物的供应可用性来促进植物生长。生物肥料可通过固氮作用、溶解磷以及通过合成生长促进物质来刺激植物生长而将营养物添加至植物。生物肥料不含任何对活土壤有害的化学物质。一些实例包括根瘤菌(Rhizobium)、固氮菌(Azotobacter)、固氮螺菌(Azospirillum)和蓝绿藻(blue

green algae, BGA)。另外的一些实例包括菌株例如成团泛菌菌株P5或恶臭假单胞菌菌株P13,它们在本领域中已知溶解来自有机或无机磷酸盐来源的磷酸盐。预期本发明的经遗传修饰的微生物或细菌可与这样的生物肥料组合使用。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌可与生物肥料组合以单一组合物形式施用于土壤。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌可与多于一种的生物肥料组合以单一组合物形式施用于土壤。在另一个实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌与一种或更多种生物肥料分开施用。

[0186] 在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌与肥料组合以单一组合物形式递送至植物。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌与多于一种的肥料组合以单一组合物形式递送至植物。在另一个实施方案中,本发明的经遗传修饰的微生物或细菌与一种或更多种肥料分开施用。本文中使用的“肥料”是用于改善植物生长和产量的任何天然或合成来源的物质。

[0187] 在一些实施方案中,本发明的组合物以微珠形式递送至植物。在另一些实施方案中,微珠是藻酸盐微珠。通常,藻酸盐是用于包封用于多种工业微生物目的的微生物的最常见聚合物材料,但也可使用其他藻类多糖(Bashan, Y., et al. 2002)。与藻酸盐制剂相关的主要优点是其无毒性质(降低对当地环境的影响)、在土壤中降解、其将细菌缓慢释放到土壤中以及几乎无限的保质期(Bashan Y et al. 2002)。在一些实施方案中,微珠作为湿微珠进行施加。在一些实施方案中,微珠作为干微珠进行施加。在一些实施方案中,微珠的直径为100 $\mu\text{m}$ 至500 $\mu\text{m}$ 。在一个优选实施方案中,微珠的直径为100 $\mu\text{m}$ 至200 $\mu\text{m}$ 。预期直径为100 $\mu\text{m}$ 至500 $\mu\text{m}$ 的微珠将能够容纳 $>10^6$  CFU珠 $^{-1}$ ,这足以接种种子。在一些实施方案中,本发明的组合物作为大珠递送至植物。在另一些实施方案中,大珠是藻酸盐大珠。预期藻酸盐大珠以与微珠类似的方式表现。在一些实施方案中,大珠的直径为1mm至5mm。在另一些实施方案中,大珠的直径为1mm至3mm。

[0188] 在一些实施方案中,在植物种植之后但在收获之前将微生物或细菌组合物施加至所述植物。在一些实施方案中,在种植植物之前将微生物或细菌组合物施加至土壤。在一些实施方案中,植物是作物植物。在一些实施方案中,组合物用于包被种子或丸粒以用于在沟中播种。

[0189] 不受理论束缚,预期根据本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌将在接种到种子上之后定殖于植物的根并导致植物生长增强。以下步骤概述了定殖过程:a) 接种到种子上,b) 在种子际(spermosphere)(种子周围的区域)中繁殖以响应于种子渗出物,c) 附着至根表面,以及d) 定殖于发育中的根系。

[0190] 在一些实施方案中,微生物或细菌作为干燥制剂储存并作为液体肉汤(liquid broth)递送至土壤。

[0191] 方法

[0192] 在本发明的一个方面中,提供了提高植物根周围保水性的方法。该方法包括将本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌施加至植物的周围土壤。在一些实施方案中,植物根周围的保水性相对于在相同条件下但无本发明微生物的相同植物提高。在一些实施方案中,保水性的提高可通过土壤含水量的提高来测量。土壤含水量可基于重量或体积计算。例如,重量含水量( $\theta_g$ )是干土壤的质量,并且通过称量土壤样品( $m_{\text{湿}}$ )、干燥样品以除去

水、随后称量经干燥的土壤样品 ( $m_T$ ) 使用以下方程来测量:

$$[0193] \quad \theta_g = \frac{m_{\text{水}}}{m_{\text{土壤}}} = \frac{m_{\text{湿}} - m_{\text{干}}}{m_{\text{干}}}$$

[0194] 或者,土壤含水量可通过体积含水量 ( $\theta_v$ ) 来测量,其为每体积土壤中液体水的体积。体积是质量与密度 ( $\rho$ ) 的比,并且可使用以下方程来计算:

$$[0195] \quad \theta_v = \frac{\text{体积}_{\text{水}}}{\text{体积}_{\text{土壤}}} = \frac{\frac{m_{\text{水}}}{\rho_{\text{水}}}}{\frac{m_{\text{土壤}}}{\rho_{\text{土壤}}}} = \frac{\theta_g * \rho_{\text{土壤}}}{\rho_{\text{水}}}$$

[0196] 在一些实施方案中,土壤含水量提高至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍等。

[0197] 本发明的另一个方面提供了在农业中降低耗水量的方法,其包括将本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌施加至植物的周围土壤。在一些实施方案中,农业中耗水量的降低是相对于在相同条件下但无本发明微生物的相同植物降低的。在一些实施方案中,农业中使用的水的量降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%等。

[0198] 植物

[0199] 预期本发明的经遗传修饰的微生物或细菌将提高植物根系周围保留的水的量,并因此提高在降雨减少和/或干旱的气候中作物生存力和产量。保留的水相对于在相同条件(例如土壤)下但无本发明细菌的相同植物提高。

[0200] 在本发明的一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物、大豆植物、甘蔗植物、玉蜀黍植物、马铃薯植物、番茄植物、烟草植物和木薯植物。在另一些实施方案中,植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0201] 本发明的一个方面提供了包含本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌的植物。在一些实施方案中,植物包含本发明的分离的经遗传改造根相关细菌、本发明的经遗传改造根相关细菌的群体、或本发明的细菌组合物。在一些实施方案中,经遗传改造根相关细菌、分离的经遗传改造根相关细菌、或经遗传改造根相关细菌的群体与植物根相关。在一些实施方案中,经遗传改造的根相关细菌在植物根上生长。在一些实施方案中,经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌在植物根周围的土壤中生长。

[0202] 碳捕获

[0203] 本发明提供了捕获碳的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被微生物转化成纤维素。

[0204] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物是根据本发明的微生物、本发明的分离的经遗传改造微生物、本发明的经遗传改造微生物的群体、或本发明的组合物。

[0205] 在一些实施方案中,碳被吸收为从植物分泌的碳水化合物,并且碳水化合物被微生物转化成纤维素。在一些实施方案中,纤维素的产生导致植物根周围的保水性提高。

[0206] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0207] 根据本发明的经遗传改造微生物、细菌或根相关细菌在植物根周围分泌富含碳的

纤维素。除了储存大量水之外,这种分泌的纤维素还吸集大量的碳,如下所述。

[0208] 在合成过程期间,微生物或细菌体内产生的葡萄糖链通过其细胞包膜上存在的小孔挤出。随后葡萄糖链形成微原纤维,其进一步聚集以形成纤维素带。这些带产生在纤维之间有大量空的空间的网状网络结构。良好分离的细菌纤维素纳米原纤维产生扩大的表面积和高度多孔的基质。基本原纤维结构由具有以下分子式的 $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4葡聚糖链组成: $(C_6H_{10}O_5)_n$ 。这些链通过氢键连接在一起。细菌纤维素微原纤维是植物原纤维的约100分之一。细菌纤维素的纤维网络由排列良好的三维纳米纤维组成,导致形成具有大表面积和相当大孔隙率的水凝胶膜。由于其与如植物纤维素中的木质素或半纤维素不缔合,因此细菌纤维素较纯。此外,三维纳米原纤维网络具有高吸水能力和抗拉强度。

[0209] 已知在植物光合作用期间,大气二氧化碳被吸收并转化成碳水化合物。随后这些碳水化合物在根的渗出物中排出。这样的碳水化合物包括许多糖,其包括葡萄糖、果糖、阿拉伯糖等。认为这些碳水化合物作为土壤中微生物生命的碳源是必不可少的,其驱动细胞增殖和生长。认为植物中产生的约30%的糖被分泌到周围的土壤中,这饲养了植物微生物组。

[0210] 在植物周围土壤中发现的天然细菌不提供实质性的吸集事件来减缓/减少气候变化。

[0211] 本发明人出乎意料地发现,根据本发明的经遗传改造微生物、细菌和/或根相关细菌使用这种排出的葡萄糖来生长,而且它们还被有利地改造以代谢这些糖并将其作为细菌纤维素排出。纤维素由在结构上由 $\beta$ -1,4-糖苷键与分子内氢键形成的葡萄糖分子构成。这种在植物根周围的土壤中捕获的碳直接导致植物健康提高(例如,通过在植物根周围保留水)。作为结果,植物能够吸收更多的二氧化碳并继续循环。由于细菌纤维素能够在数月的时间内降解,因此吸集的碳随后可被植物和微生物使用以更强壮地生长,这维持了土壤中的碳。这将形成从不逃脱土壤的周期性事件。

[0212] 在一些实施方案中,纤维素产生的提高导致植物生存力的提高。预期这种植物生存力的提高导致植物对大气碳的捕获和糖的产生提高,这些糖转化成纤维素,从而吸集土壤中的碳。

[0213] 在一些实施方案中,由微生物或细菌引起的纤维素产生导致周围土壤中的碳吸集提高。在一些实施方案中,捕获的碳提高至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍等。相对于在相同条件下但无本发明的微生物的相同植物,捕获的碳提高。在一些实施方案中,碳是大气碳。

[0214] 在一些实施方案中,从植物分泌的碳水化合物是糖。在另一些实施方案中,糖是葡萄糖、果糖和/或阿拉伯糖。

[0215] 用途

[0216] 在一些方面中,本发明提供了经遗传修饰的微生物在农业中的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0217] 在另一个方面中,本发明提供了经遗传修饰的微生物用于提高植物根周围保水性的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0218] 在另一个方面中,本发明提供了经遗传修饰的微生物在碳捕获中的用途,其中所述微生物经遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所

述碳被微生物转化成纤维素。

[0219] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物是根据本发明的微生物、本发明的分离的经遗传改造微生物、本发明的经遗传改造微生物的群体、或本发明的组合物。

[0220] 在一些实施方案中,经遗传改造微生物选自细菌细胞、真菌细胞或藻类细胞。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌。在另一些实施方案中,经遗传改造微生物是根相关细菌。

[0221] 在一些实施方案中,微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,其中经遗传修饰的细菌是用包含bcs操纵子的外源核酸进行修饰的,其中bcs操纵子包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因。在另一些实施方案中,外源核酸还包含ccpAx基因。在一些实施方案中,外源核酸还包含cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。在另一些实施方案中,基因是异源的。

[0222] 在一些实施方案中,微生物是用一种或更多种异源基因进行遗传修饰的,其中所述基因选自:bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因、bcsD基因、cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。在一些实施方案中,所述基因各自分离自木驹形氏杆菌。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是细菌,任选地是根相关细菌。在一些实施方案中,经遗传改造微生物是促进植物生长的根际细菌。

[0223] \*\*\*

[0224] 在前面的描述中、或在以下编号的实施方案或所附权利要求书中或在附图中公开的以其特定形式或在用于执行所公开功能的方式或用于获得所公开结果的方法或过程方面来表示的特征适当时可单独地或以这样的特征的任意组合用于以其不同的形式实现本发明。

[0225] 虽然已经结合上述示例性实施方案描述了本发明,但是当给出本公开内容时,许多等同的修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,以上阐述的本发明的示例性实施方案被认为是举例说明性的而不是限制性的。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可对所描述的实施方案进行多种改变。

[0226] 为了避免任何疑问,出于改善读者的理解的目的提供了本文中提供的任何理论说明。本发明人不希望受到任何这些理论说明的束缚。

[0227] 本文使用的任何章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0228] 在整个说明书(包括所附的权利要求书)中,除非上下文另有要求,否则词语“包含”和“包括”以及变化形式将被理解为暗示包含所指出的整体或步骤或者整体或步骤的组,但是不排除任何其他整体或步骤或者整体或步骤的组。

[0229] 必须注意的是,除非上下文另外明确指出,否则说明书和所附权利要求书中使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。范围可在本文中表示为从“约”一个特定值和/或至“约”另一特定值。当表达这样的范围时,另一个实施方案包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当通过使用在前的“约”将值表示为近似值时,将理解的是,特定值形成另一个实施方案。与数值相关的术语“约”是任选地,并且意指例如+/-10%。

[0230] 编号的实施方案

[0231] 1.用于产生纤维素的经遗传改造微生物,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至

少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0232] 2. 实施方案1所述的经遗传改造微生物,其中所述纤维素是细菌纤维素。

[0233] 3. 实施方案1或实施方案2所述的经遗传改造微生物,其中与参照微生物相比,在经遗传修饰的微生物中纤维素的产生提高。

[0234] 4. 根据前述实施方案中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述经遗传修饰的微生物是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。

[0235] 5. 根据前述实施方案中任一项所述的经遗传改造微生物,其中外源核酸包含bcs操纵子。

[0236] 6. 根据实施方案5所述的经遗传改造微生物,其中所述外源核酸还包含以下基因或操纵子中的至少一种:

[0237] a) cmcAx基因;

[0238] b) ccpAx基因;

[0239] c) bglAx基因;

[0240] d) pgm基因;

[0241] e) galU基因;

[0242] f) cdg操纵子;和/或

[0243] g) dgc基因。

[0244] 7. 根据实施方案5所述的经遗传改造微生物,其中所述外源核酸还包含cmcAx基因、ccpAx基因和bglAx基因。

[0245] 8. 根据实施方案5至7中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述bcs操纵子、cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和/或dgc基因各自分离自木驹形氏杆菌。

[0246] 9. 根据前述实施方案中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述微生物是细菌,任选地其中所述微生物是荧光假单胞菌。

[0247] 10. 根据前述实施方案中任一项所述的经遗传改造微生物,其中所述纤维素被分泌到细胞外。

[0248] 11. 根据实施方案10所述的经遗传改造微生物,其中分泌的纤维素在细胞外形成网络。

[0249] 12. 根据实施方案11所述的经遗传改造微生物,其中分泌的纤维素网络提高植物根周围的保水性。

[0250] 13. 根据实施方案12所述的经遗传改造微生物,其中所述植物是谷类植物、玉米植物、稻植物、小麦植物或大豆植物。

[0251] 14. 在微生物中与参照微生物相比提高纤维素产生的方法,其中所述方法包括修饰所述微生物以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的步骤。

[0252] 15. 根据实施方案14所述的提高纤维素产生的方法,其中所述微生物是用编码至少一种来自纤维素合酶复合物的蛋白质的外源核酸进行修饰的。

[0253] 16. 载体,其包含含有以下的外源核酸:bcs操纵子,以及cmcAx基因、ccpAx基因、bglAx基因、pgm基因、galU基因、cdg操纵子和dgc基因中的至少一种。

[0254] 17. 产生用于产生纤维素的经遗传改造微生物的方法,其中所述方法包括修饰所

述微生物以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质的步骤,其包括:

[0255] a) 分离微生物;以及

[0256] b) 将包含外源核酸的载体引入到所述微生物中,所述外源核酸包含选自包含以下的组的基因中的至少一种:bcsA基因;bcsB基因;bcsC基因;bcsD基因;cmcAx基因;ccpAx基因;bglAx基因;pgm基因;galU基因;cdg操纵子;和dgc基因。

[0257] 18. 经遗传改造微生物,其可通过实施方案17所述的方法获得。

[0258] 19. 分离的经遗传改造微生物,其是根据实施方案1至13或实施方案18中任一项所述的。

[0259] 20. 包含根据实施方案1至13或实施方案18中任一项所述的经遗传改造微生物的群体。

[0260] 21. 包含经遗传改造群体的组合物,所述经遗传改造群体是实施方案20所述的。

[0261] 22. 根据实施方案21所述的组合物,其中所述组合物还包含肥料和/或生物肥料。

[0262] 23. 提高植物根周围保水性的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0263] 24. 根据实施方案23所述的方法,其中所述微生物选自:根据实施方案1至13或实施方案18中任一项所述的经遗传改造微生物、实施方案19所述的分离的经遗传改造微生物、实施方案20所述的经遗传改造微生物的群体、或者实施方案21或22所述的组合物。

[0264] 25. 在农业中降低耗水量的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0265] 26. 根据实施方案25所述的方法,其中所述微生物选自:根据实施方案1至13或实施方案18中任一项所述的经遗传改造微生物、实施方案19所述的分离的经遗传改造微生物、实施方案20所述的经遗传改造微生物的群体、或者实施方案21或22所述的组合物。

[0266] 27. 植物,其包含:根据实施方案1至13或实施方案18中任一项所述的经遗传改造微生物、实施方案19所述的分离的经遗传改造微生物、实施方案20所述的经遗传改造微生物的群体、或者实施方案21或22所述的组合物,其中所述经遗传改造微生物、分离的经遗传改造微生物或经遗传改造微生物的群体与植物根相关。

[0267] 28. 捕获碳的方法,其包括将经遗传改造微生物施加至植物根周围的土壤,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被微生物转化成纤维素。

[0268] 29. 根据实施方案28所述的方法,其中所述经遗传改造微生物是根据实施方案1至13或实施方案18中任一项所述的微生物、实施方案19所述的分离的经遗传改造微生物、实施方案20所述的经遗传改造微生物的群体、或者实施方案21或22所述的组合物。

[0269] 30. 根据实施方案28或实施方案29所述的方法,其中所述碳被吸收为从植物分泌的碳水化合物并且所述碳水化合物被所述微生物转化成纤维素。

[0270] 31. 根据实施方案28至30中任一项所述的方法,其中纤维素的产生实现了植物根周围的保水性提高。

[0271] 32. 经遗传修饰的微生物在农业中的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达

至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0272] 33. 经遗传修饰的微生物用于提高植物根周围保水性的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质。

[0273] 34. 经遗传修饰的微生物在碳捕获中的用途,其中所述微生物被遗传修饰以过表达至少一种参与纤维素合成和/或分泌的蛋白质,并且其中所述碳被所述微生物转化成纤维素。

[0274] 实施例

[0275] 实施例1-根相关细菌的改造

[0276] 1. 细菌菌株和质粒

[0277] 木驹形氏杆菌DSM 2325将获自DSMZ (Braunschweig, Germany)。一些示例性细菌菌株和质粒在表1中列出。

[0278] 木驹形氏杆菌是醋酸菌的成员,醋酸菌是在发酵期间产生乙酸的一组革兰氏阴性需氧菌。木驹形氏杆菌在也产生纤维素的组中是不常见的。

[0279] 2. 基因操作

[0280] 出于遗传操作的目的,将使用大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10细胞。大肠杆菌细胞将在卢里亚-贝尔塔尼 (Luria-Bertani, LB) 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中在37°C下在225rpm的轨道摇动下培养。当质粒维持需要时, LB将补充有抗生素 (50µg/ml 氨苄青霉素)。所有DNA操作均将根据标准方案 (Sambrook, J., 2001) 进行。

[0281] 荧光假单胞菌菌株SBW25 (Rainey and Bailey, 1996) 将用作宿主以进行细菌生物合成纤维素机器的插入。如前所述 (Rainey and Bailey, 1996) 和由 (BAILEY et al., 1995) 所示的方法, 将选择SBW25的6.6-Mbp染色体上的非必要基因座-6-。在-6-基因座 (约200bp) 侧翼的两个片段将通过用荧光假单胞菌基因组DNA进行PCR来扩增; 基因组DNA将使用来自Promega (Madison, WI) 的基因组DNA提取试剂盒来制备。上游和下游侧翼片段将通过PCR来扩增。来自木驹形氏杆菌 (Jang et al., 2019) 的-6-基因座的上游和下游区域、bcs操纵子、pgm (磷酸葡萄糖变位酶)、galU (UTP-葡萄糖-1-磷酸)、cdg操纵子和dgc独立基因 (表2) 将使用In-fusion HD克隆试剂盒 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) 在EcoRI限制性酶切位点处与pEX18Ap载体连接, 产生pEX-bcs载体。该质粒将转化到大肠杆菌TOP10细胞中, 用于扩增和鉴定经修饰的pEX-bcs质粒。随后通过电穿孔将纯化的质粒引入到荧光假单胞菌上的-6-基因座染色体位点中, 用于表达bcs细菌生物合成纤维素机器。

[0282] 3. 经改造菌株的生长条件

[0283] 以下条件将用于视觉验证荧光假单胞菌中成功的细菌生物合成纤维素机器表达。在此之后, 温室和田间试验将用于优化模型系统中纤维素的产生。营养肉汤培养基将用于使用包含以下的烧瓶的所有纤维素合成产生实验: 3.0g/L肉提取物、10.0g/L蛋白胨 (酪蛋白的酶消化物)、5.0g/L氯化钠、pH 7。细胞将在静态条件下在30°C下孵育5天。培养基将补充有多种碳水化合物以用于优化。可进行该方案的常规实验优化, 以根据特定的田间条件调整用于最佳结果的特定参数。

[0284] 表1. 细菌物种和质粒的描述。

物种或质粒	描述	参考文献
[0285] 木驹形氏杆菌 DSM 2325	木驹形氏杆菌是用于产生细菌纤维素的模式生物体。	( Jang <i>et al.</i> , 2019)
荧光假单胞菌 SBW25	荧光假单胞菌涵盖不同的细菌组，它们能够定殖于多种生态位，包括土壤、水以及许多活生物体（植物和动物二者）的表面和组织	( Rainey and Bailey, 1996)
One Shot TOP10 化	允许高效克隆和质粒繁殖，包括高拷贝数质粒的稳定复制。	( Walz <i>et al.</i> , 2002)
[0286] 学感受态大肠杆菌	定复制。	2002)
pEX18Ap	用于位点特异性切除染色体定位 DNA 序列的广泛宿主范围重组系统	(Baynham <i>et al.</i> , 2006)

[0287] 表2. 在用于在荧光假单胞菌中进行遗传修饰的木驹形氏杆菌中用于生物合成纤维素合成产生所必需的基因的描述。

基因	描述	参考文献
[0288] <i>bcs</i> 操纵子 ( <i>bcsA</i> , <i>bcsB</i> , <i>bcsC</i> , <i>bcsD</i> )	编码纤维素生物合成和分泌机器的组分的 <i>bcs</i> 基因。	(Wong <i>et al.</i> , 1990)
<i>cmcAx</i> ( <i>bcsZ</i> )	编码内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶	(Kawano <i>et al.</i> , 2002)
<i>ccpAx</i> ( <i>bcsH</i> )	纤维素补充蛋白	(Standal <i>et al.</i> , 1994)
<i>bglAx</i>	编码 $\beta$ -葡糖苷酶	(Tajima <i>et al.</i> , 2001)
<i>Pgm</i> ( <i>celb</i> )	磷酸葡萄糖变位酶	(Brautaset <i>et al.</i> , 1994)
<i>galU</i>	UTP-葡萄糖-1-磷酸	(Koo <i>et al.</i> , 2000)
<i>cdg</i> 操纵子 ( <i>pdeA</i> , <i>dgc</i> )	二鸟苷酸环化酶 (DGC)，其催化环二-GMP 的形成，并且磷酸二酯酶 A ( <i>pdeA</i> ) 催化降解。	(Ryngajlo <i>et al.</i> , 2019)
独立的 <i>dgc</i> 基因	二鸟苷酸环化酶 (DGC)，其催化环二-GMP 的形成	(Bae <i>et al.</i> , 2004)

[0289] 实施例2-经遗传修饰的细菌的应用

[0290] 经遗传修饰的细菌将在包含营养源的可生物降解微珠(微球)中递送,该营养源将在目前市售的生物肥料中补充。

[0291] 在该实施例中,使用藻酸盐微珠描述了用本发明的经遗传修饰的细菌接种植物(或种子)的方法。这些藻酸盐微珠包封细菌并保护它们免受环境压力,并当土壤微生物降解聚合物时将它们逐渐释放到土壤中。原料海带大藻(kelp macroalga)(巨藻(*Macrocystis pyrifera*))是太平洋中极丰富的可再生海洋资源。

#### [0292] 1. 微珠形成

[0293] 可使用如Bashan et al.2002中所述的装置或任何其他合适的装置来产生微珠。通常,产生的微珠直径为约100至200 $\mu\text{m}$ 。如上所述培养本发明的细菌,并随后将细菌悬液与2%的藻酸钠(CICIMAR,LaPaz,Mexico)混合,任选地,也可将不含Ca的脱脂乳添加至藻酸盐-细菌悬液以产生更可生物降解的珠。随后使用商用空气压缩机将该悬液加压至10至15psi。随后迫使细菌悬液通过222 $\mu\text{m}$ 直径的毛细管出口,这将产生细的微滴喷雾。随后将使用以40rpm旋转的包含0.1M  $\text{CaCl}_2$ 以使微珠固化的不锈钢烧瓶收集雾气。随后将允许微珠在 $\text{CaCl}_2$ 溶液中固化30分钟。随后从 $\text{CaCl}_2$ 溶液中提取湿微珠,并随后在无菌条件下在500ml盐水溶液(0.85% (w/v) NaCl)中清洗四次。任选地,可将微珠转移到细菌培养基中(在生长条件下)以允许细菌繁殖。随后通过使用Whatman滤纸过滤来将微珠从悬液中分离,并用500ml盐水溶液清洗三次。

#### [0294] 2. 干燥程序

[0295] 任选地,可在将微珠施加至土壤、植物根和/或种子之前将它们干燥。在该干燥方法中,可将10g微珠作为薄层放置在陪替氏培养皿(Petri dish)中的滤纸上,并在 $38 \pm 1^\circ\text{C}$ 下干燥48小时。随后可将干微珠收集在具有硅胶的密封容器中,直至其被使用。或者,可通过标准冻干来制备干微珠。

[0296] 随后将包含经遗传修饰的根相关细菌的湿和/或干微珠施加至土壤、植物根和/或种子。

### [0297] 实施例3-根相关细菌的改造

#### [0298] 1. 细菌菌株和质粒

[0299] 该方法将使用木驹形氏杆菌CGMCC 2955菌株以及微型CTX1载体和pFLP2切除载体来除去不需要的序列。

#### [0300] 2. 基因操作

[0301] 与之前一样,出于遗传操作的目的,将使用大肠杆菌TOP10细胞。大肠杆菌细胞将在卢里亚-贝尔塔尼(LB)培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA)中在 $37^\circ\text{C}$ 下在225rpm的轨道摇动下培养。当质粒维持需要时,LB将补充有抗生素(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素)。所有DNA操作均将根据标准方案(Sambrook,J.,2001)进行。

[0302] 假单胞菌菌株CHA0、F113、FW300 N2E2和Pf-5将用作宿主以进行细菌生物合成纤维素机器的插入。这些菌株基因组中的靶插入位点是attB位点(SEQ ID NO 1: TGAGTTCGAATCTCACCGCTCCGCATAT)。将使用微型CTX1载体和pFLP2(Flp重组酶)载体插入纤维素合成基因(cmcAx、ccpAx、BcsA、BcsA、BcsC、BcsD、BglAx)。在该实施例中,还将插入GFP作为报道基因,这可在图3中看到。也可将群体感应操纵子添加至假单胞菌菌株,以调节控制纤维素合酶基因表达的启动子(参见图4)。群体感应操纵子,例如PhzI/PhzR操纵子,将

在组成型启动子的控制下。

### [0303] 3. 方法

#### [0304] 缀合

[0305] 将接受体假单胞菌菌株以及大肠杆菌供体和辅助菌株在3ml LB(当适当具有抗生素)中在37℃下滚动(rolling)培养约8小时。将1毫升的每种培养物在微量离心管中在8,000×g下离心2分钟。吸出培养上清液,将细胞沉淀重悬于1ml LB中,并将细胞悬液离心。重复进行吸出、重悬和离心。吸出上清液,并将细胞沉淀重悬于35μl LB中。将细胞悬液点在LB琼脂上并在37℃下孵育过夜。将细胞刮下并重悬于LB中并连续稀释10倍,并将100μl的每种稀释液铺展在具有抗生素(庆大霉素或四环素)的Vogel-Bonner基本培养基(VBMM;10mM柠檬酸三钠、9.5mM柠檬酸、57mM磷酸氢二钾、17mM磷酸铵钠(sodium ammonium phosphate)、1mM硫酸镁、0.1mM氯化钙,pH 7.0)琼脂上并在37℃下孵育过夜。通过PCR使用寡核苷酸引物来确认miniTn7的染色体整合。

#### [0306] 电穿孔

[0307] 接受体假单胞菌菌株将在37℃下一式两份地在3ml LB中滚动培养约8小时。随后将两个3-ml培养物合并并分配到四个微量离心管中。将培养物在8,000×g下离心2分钟。随后将各细胞沉淀重悬于1ml 300mM蔗糖中并离心两次。随后将四个细胞沉淀重悬并合并在一起共300μl的300mM蔗糖中。将100微升的各悬液转移到1-mm间隙宽度的电穿孔比色皿中。将100纳克的pFLP2质粒添加至各悬液。在Eppendorf电穿孔仪2510中以1,800V电穿孔细胞。每次电穿孔添加900微升LB。随后将回收的培养物在37℃下滚动孵育1小时。培养物可连续稀释10倍,铺展在具有抗生素(羧苄青霉素)的LB琼脂上,并在37℃下孵育过夜。

#### [0308] 通过Flp-FRT重组切除抗生素抗性盒

[0309] 用pFLP2质粒电穿孔包含侧翼是FRT重组位点的染色体庆大霉素抗性盒的接受体假单胞菌菌株。将转化体在具有羧苄青霉素的LB上以及在具有庆大霉素的LB上划线,以筛选通过Flp重组对庆大霉素抗性盒的切除。将庆大霉素敏感性转化体从具有羧苄青霉素的LB划线到具有5%蔗糖的LB。具有pFLP2质粒的菌株是蔗糖敏感性的,而丢失该质粒的菌株是蔗糖抗性的。将蔗糖抗性克隆在LB、具有庆大霉素的LB和具有羧苄青霉素的LB上划线,以确认庆大霉素抗性盒的切除和pFLP2质粒的丢失二者。

### [0310] 实施例4-经遗传修饰的荧光假单胞菌的试验方案

#### [0311] 1. 实验设计

[0312] 使用种子在24个细胞模块托盘中培育玉蜀黍植物(品种Pioneer P7892),并且随后在3至4叶阶段将类似尺寸的植物移植到包含等同重量的以相同体积密度堆积的市售沙壤土的约10L盆中。用九种接种物处理中的一种接种盆(表3)。对照接种物将由使用相等培养体积的模拟接种物或其他缺乏细菌的培养基组成。

[0313] 针对每种接种物处理将使用五个盆重复。这些将在温室长凳上的随机区组(block)设计中布置在五个区组中(九种处理中的每一种在每个区组中展示),以允许通过方差分析(ANOVA)进行数据分析。在温室控制系统中捕获环境数据(温度、相对湿度、太阳辐射、设定点)。

[0314] 盆将根据以下两种处理每天手工浇水,并且一旦其达到8至10片叶,或当盆中可用的营养物质明显耗尽时开始,每周两次供给霍格兰溶液(Hoagland's solution)。饲料溶液将

替代给予的灌溉处理以达到田间持水量 (field capacity), 并且所有处理的饲料体积将相同, 用水加满至田间持水量。害虫和疾病可用适当的杀真菌剂和杀虫剂来控制。

[0315] 为了确定预期的土壤持水能力提高是否将导致植物生长的提高, 试验将在模拟雨养 (rain-fed) 环境中的有限水供应的条件下进行。除非水是有限的, 否则提高的持水能力将不影响植物生长, 因此将“充分浇水”的对照处理与限水处理进行比较:

[0316] 1. 每天充分浇水。每天或每隔一天给植物浇水至田间持水量, 使得水不成为生长的限制。当水不受限制时, 通过提高土壤持水能力的机制, 预期接种物没有产生影响。可观察到通过其他机制的影响。

[0317] 2. 在田间持水量与限制生长的土壤水分亏缺之间循环。在植物完全长势良好, 显示出在移植之后长出另外2至3片叶之后, 给它们浇水至田间持水量, 并随后允许通过蒸腾失水使其干燥直至对照植物显示出水分亏缺的迹象 (与充分浇水的植物相比萎蔫、卷叶、气孔导度降低)。随后将它们浇水回到田间持水量, 并重复该循环。具有较大持水能力的盆将在可用水耗竭之前维持较长时间的生长, 并因此预期其具有较长的不受限制的生长时间 (注意, 提高的生长速率也将提高蒸腾作用, 因此最终提高的生长将平衡提高的持水能力)。

[0318] 盆将以30cm的间距在1m宽的长凳上以排列成两排的方式间隔排列。温室隔室将在昼/夜加热至25°C/20°C, 并且将通过高压钠灯在16/8小时昼/夜循环中提供补充照明。玉蜀黍在25°C时具有最佳生长 (21°C至27°C广泛最佳)。

[0319] 除了“无假单胞菌”处理将使用10个重复 (因为所有线将与该基线进行比较) 之外, 对于所有处理均将使用五个重复盆。将进行两次灌溉处理。

[0320] 总盆数 = [ (5个重复 × 8个接种物) + (10个重复 × 1个接种物) ] × 2次处理 = 100

[0321] 长凳面积 = 1 × 6m<sup>2</sup> 和 1 × 9m<sup>2</sup> (30cm × 100, 1m宽长凳上的两排, 分成两个包含2或3个“区组”的长凳)。防护植物将安置在每排的末端 (共8株植物) 以降低边缘效应。

[0322] 表3: 接种物处理

编号	描述	菌株类型	观察结果	GM	
	1	无假单胞菌	-	阴性对照	n/a
[0323]	2	天然假单胞菌	CHA0	菌株对照	否
	3	天然假单胞菌	F113	菌株对照	否
	4	天然假单胞菌	FW300 N2E2	菌株对照	否
	5	天然假单胞菌	Pf-5	菌株对照	否
	6	经修饰的假单胞菌	CHA0	测试	是
[0324]	7	经修饰的假单胞菌	F113	测试	是
	8	经修饰的假单胞菌	FW300 N2E2	测试	是
	9	经修饰的假单胞菌	Pf-5	测试	是

[0325] 2. 测量

[0326] 持水能力:

[0327] 持水能力将使用漏斗技术来测量,其中将来自盆的土壤和根浸渍以将土壤和根混合,取样以估计重量含水量(在干燥之前和之后称重),并随后装入漏斗中。添加水至漏斗的顶部,并根据施加的和通过漏斗排出的水的质量记录保留的水的量。这是允许计算田间持水量(在自由排水之后保持的水)与经烘干土壤之间的总持水能力的快速方法。这种方法包括永久萎蔫点与烘干之间的水,这种水被认为与土壤结合太紧而无法用于植物。或者,可计算水分释放曲线,其是针对重量含水量( $\text{g g}^{-1}$ )的土壤水势(以兆帕MPa计)的图。后一种方法允许计算在田间持水量(-0.01MPa)与永久萎蔫点(-1.4MPa土壤水势)的土壤之间保持的重量水,即仅植物可用的水。每盆一次测量=100。

[0328] 通过使用与不同量的购自Fisher Scientific的纤维素粉末混合的土壤,将验证漏斗法对土壤纤维素含量的响应。约20次测量。

[0329] 根际的微生物定殖:

[0330] 来自水容量实验的约10g浸渍土壤/根样品(收获时每盆一个样品)将与水或缓冲溶液混合,并随后进行过滤。将系列稀释液平板接种到适当的选择性培养基上,并随后在25℃下孵育48小时。将计数菌落形成单位(colony forming unit, cfu)并计算 $\text{cfu ml}^{-1}$ 。阳性对照将由提取(在盆接种时完成)之前立即施加至未经接种土壤的样品的接种物组成。

[0331] 每个处理三个重复和三个系列稀释加对照=(3个重复×9个接种物×2次灌溉处理×3个稀释)+(8个对照接种物×3个重复×3个稀释)=162+72=234个板。

[0332] 土壤碳含量:

[0333] 收获(在浸渍土壤/根以用于水容量实验之前)时从根际采集约20g土壤样品,并通过以2mm筛分除去任何根碎片。在盐酸处理以除去碳酸盐之后,将通过元素分析仪测量总有机碳(total organic carbon, TOC)。

[0334] 每盆一个样品=100个样品。还将对与纤维素混合的土壤(在水容量实验中产生)=20个样品进行阳性对照分析。

[0335] 植物健康:

[0336] a) 在植物生长期间,将使用由农学实践定义的方法,以每周间隔测量植物高度和叶数。

[0337] 简言之,高度将被定义为“从土壤表面至尖端朝下的顶叶的拱形最高点”。叶数将使用以下三种快速方法记录:

[0338] 1. 从轮生体(whorl)中出现的叶尖的数目。

[0339] 2. 从最低的叶开始并到最后一片拱起(叶尖朝下)的叶结束的叶的数目。

[0340] 3. 有可见珠托(collar)的叶(即从轮生体中出现的叶)的数目。

[0341] b) 使用叶绿素仪(CCM-200)以每周间隔在用标准曲线(丙酮提取和分光光度计)进行验证的标准叶(例如最上面的拱形叶,每片叶两个读数)上测量叶绿素含量。3周×200次测量=600。

[0342] c) 在植物收获时,将所有地上物质切碎、装袋并在80℃下干燥直至完全干燥。将记录每株植物的干重(100次测量)。

[0343] 也可使用标准技术测量植物矿物质含量。

## [0344] 参考文献

[0345] 以上引用了许多出版物以更完全地描述和公开本发明以及本发明所属领域的现有技术。这些参考文献的完整引用如下提供。这些参考文献中每一个的全部内容并入本文。

[0346] Bae,S.O.et al.(2004) 'Features of bacterial cellulose synthesis in a mutant generated by disruption of the diguanylate cyclase 1 gene of *Acetobacter xylinum* BPR 2001', *Applied Microbiology and Biotechnology*,65(3), pp.315-322.doi:10.1007/s00253-004-1593-7.

[0347] BAILEY,M.J.et al.(1995) 'Site directed chromosomal marking of a fluorescent pseudomonad isolated from the phytosphere of sugar beet;stability and potential for marker gene transfer.', *Molecular Ecology*,4(6),pp.755-764.doi:10.1111/j.1365-294X.1995.tb00276.x.

[0348] Bashan,Y.,et al.(2002) 'Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria'. *Biol Fertil Soils*,35,359-368.

[0349] Baynham,P.J.et al.(2006) 'The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili', *Journal of Bacteriology*,188(1),pp.132-140.doi:10.1128/JB.188.1.132-140.2006.

[0350] Brautaset,T.et al.(1994) 'Nucleotide sequence and expression analysis of the *Acetobacter xylinum* phosphoglucomutase gene', *Microbiology*,140(5), pp.1183-1188.doi:10.1099/13500872-140-5-1183.

[0351] Buldum,G.et al.(2018). 'Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli*'. *Bioprocess Biosyst Eng*;41(2):265-279.doi:0.1007/s00449-017-1864-1.

[0352] Florea,M.et al.(2016). 'Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose producing strain'. *PNAS*;113(24):E3431-40.

[0353] Jang,W.D.et al.(2019) 'Genomic and metabolic analysis of *Komagataeibacter xylinus* DSM 2325 producing bacterial cellulose nanofiber', *Biotechnology and Bioengineering*, (July), pp.1-10.doi:10.1002/bit.27150.

[0354] Jozala,A.F.,et al.(2014) 'Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media'. *Appl Microbiol Biotechnol*;99(3):1181-90.Doi:1007/s00253-014-6232-3.

[0355] Kawano,S.,et al.(2008). 'Regulation of endoglucanase gene (cmca) expression in *Acetobacter xylinum*'. *J.Biosci.Bioeng*.106,88-94.doi:10.1263/jbb.106.88

[0356] Klemm,D.et al.(2001) 'Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery', *Progress in Polymer Science*,26(9),pp.1561-1603.doi:10.1016/S0079-6700(01)00021-1.

[0357] Koo,H.M.et al.(2000) 'Cloning,sequencing,and expression of UDP-glucose

pyrophosphorylase gene from acetobacter xylinum BRC5', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(3), pp.523-529. doi:10.1271/bbb.64.523.

[0358] Meyers A, Furtmann C, Gesing K, Tozakidis IEP, Jose J. 2019. Cell density-dependent auto-inducible promoters for expression of recombinant proteins in *Pseudomonas putida*. *Microb Biotechnol* 12:1003-1013

[0359] Rainey, P.B. and Bailey, M.J. (1996) 'Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome', *Molecular Microbiology*, 19(3), pp.521-533. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.391926.x.

[0360] Ryngajllo, M. et al. (2019) 'Comparative genomics of the Komagataeibacter strains-Efficient bionanocellulose producers', *MicrobiologyOpen*, 8(5), pp.1-25. doi:10.1002/mbo3.731.

[0361] Sambrook, J., & R. (2001) 'Molecular cloning: a laboratory manual', Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0362] Standal, R., et al. (1994). 'A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the bcs operon'. *J. Bacteriol.* 176, 665-672.

[0363] Tajima, K., et al. (2001). 'Cloning and sequencing of the beta-glucosidase gene from *Acetobacter xylinum* ATCC 23769'. *DNA Res.* 8, 263-269. doi: 10.1093/dnares/8.6.263.

[0364] Vandamme, E.J., et al. (1998). 'Improved production of bacterial cellulose and its application potential'. *Polymer Degradation and Stability*. 59(1-3):93-99. doi:10.1016/S0141-3910(97)00185-7.

[0365] Walz, A. et al. (2002) 'A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), pp.1718-1723. doi:10.1073/pnas.032450399.

[0366] Wong, H.C. et al. (1990) 'Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20), pp.8130-8134. doi:10.1073/pnas.87.20.8130.

[0367] For standard molecular biology techniques, see Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## 序列表

	<110> CroBio Ltd	
	<120> 经遗传改造微生物	
	<130> 007755267	
	<150> GB 1917651.0	
	<151> 2019-12-03	
	<150> GB 2016372.1	
	<151> 2020-10-15	
	<160> 18	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 宿主生物体attB插入位点	
	<400> 1	
[0001]	tgagttcgaa tctcaccgcc tccgcatat	30
	<210> 2	
	<211> 1080	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> cmcAx基因	
	<400> 2	
	atgctgttgg attttatgaa gctgcaaaaa caggtatccg gaatgggacg tegtctttc	60
	ctgtctgtca tggcggcagc tggcagtatt cttttcttt ctaccgccct ggccgaggat	120
	gacccggcca taaacgcgca atgggccatc ttccgcgcca agtatttcca ccccgacggc	180
	cgtatcatcg acacaggcaa cagtggcgaa tcccatagcg aggggcaggg ctacggcatg	240
	cttttcgccg cgacggcggg tgatcaggcc acgttcgagg ccatgtggtc ctggacacgc	300
	gccaacctgc agcacaagac cgatgccctg ttctcctggc gctatctgga cgggcataac	360
	ccgccggtcg cggacaagaa caacgcgacg gatggcgacc tgctgatagc cctgggtctg	420
	gtccgtgccg gacggctgtg gaagcgcgct gactatatte aggatgctat agccatctat	480
	ggcgacgtgc tgaagctcat gaccctgcag gtcggtcct atctggtgct tctgcccggc	540

	ggcgtggggt ttgccaccaa ggattcggtc acgctcaacc tgcctatta tgtcatgccc	600
	tcgctcatgc aggcccttcgc gctgacgggc gacgcacgct ggacagaaggt gatgggagat	660
	ggtctgatca tcataaacca ggggcgattc ggggagtgga agctcccgcc tgactggctt	720
	tcgatcaacc gccagaacgg gcatttctcc atagccaatg gctggccgcc gcgattctcc	780
	tatgatgcga ttcgcgtgcc gctgtatctt tactgggcgc atatgctgtc gccggacctg	840
	ctggccgact ttaccgcctt ctggaacat ttcggggcat cggccctgcc ggggtggatt	900
	gacctgacca atggtgccc ctcgccctac aatgcgccac cgggctatct ggccgtggcg	960
	acatgttccg gcctgtcatc cgccggtggg ttgccaacc tggacaaggc gccggattat	1020
	tattcggctg cctgacatt gctggtttat attgcccgtg gtgaggagg tggaatgtga	1080
	<210> 3	
	<211> 935	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ccpAx基因	
[0002]	<400> 3	
	gcatggatat ggacaatccg caggacgtga cgcgcatgct ctccagcggg tatggcctga	60
	gcggggagggt gttccactac cattccttca cgcgtcccgt catgctggac atgaccccgg	120
	aactgcccc a gattccgtg gacgatacag agcatcatct cgacgataac gtcaccgaac	180
	acgaatccgc cccggcaacg gcaccggtgt tcgtgttcga tgcggcacct gagcctgcgg	240
	caccacctgt tgttgccgag gccgcgccac cgccacctcc tccgccgcc ccagagcctg	300
	cgctctctga gccgccgcc gcaccgccac cctatacgcc ggttgtaacc cacgtgccgc	360
	cgccgccgcc cgtggaggaa acgccgttac ccgaaccgt ggctgaagcg gctgcacctg	420
	caaggcccc gccctgccg ccggcgcagc ccgcgccgga catggcatcg acgggcgggc	480
	gtgaacggcg cgggcttcag cctttacca cgccgcgtac gccatccgag ccgccggtgt	540
	cttcacgtgc ggccgcaccg gccacgccct tcgtccaggc agatgactgg gcgccggtgc	600
	caaaggcccc gcagcgtcgc ggccagcgtc cgaccgggcc tggtttcttc ttgccaagg	660
	ggaatgaccg ggttgcgact gcccggtgt tccagccggt ggcagtggcc cgtcctgctt	720
	ccaaacctga ctccaaggtg accacgatga ccaaattcga caagaccgca cagaatgccc	780
	ccacggggcg tcgtcctgcg ccatctgaca attcgccaac actgacggaa gttttcatga	840

	cactgggagg tcgtgccacc gaccggctgg tgcccaagcc cagcctgcgt gacgcgctgc	900
	tgcgcaagcg tgaggaagaa accgggcaat cctga	935
	<210> 4	
	<211> 9102	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> bcs操纵子, 其包含bcsA基因、bcsB基因、bcsC基因和bcsD基因	
	<400> 4	
	aatgtcagag gttcagtcgt cagcggccgc ggaaagttgg tttgatcgcc tttccaacaa	60
	gatactgtca ctgcgcggtg ccagttatat cgttggggca ataggcctgt gcgccctgct	120
	tgccgcgacc acggttatgc tgtcggtaaa tgaacagctg attgtggcat tagtgtcgt	180
	tgtggctctt tttatcgtcg gtcggcgcaa aagccgtcgg acgcagatat ttctcgaggt	240
	gctttcggcg ctggtgtccc tgcgttatct gacgtggcgg ctgaccgaaa cactggattt	300
	cgatacatgg ctccagggta cattgggggt cacgctgctt ctggcggaac tgtacgcgct	360
	gtacatgctg ttccctcagct attccagac catttcccc ctgcaccgcg cgccgctgcc	420
[0003]	cctgtctccc aatccggaag actggccac ggtcgacatc ttcattcccga cctatgacga	480
	aagcctgggc atcgtgcgct tgacggtgct gggcgcgctt ggtatcgact ggccaccgga	540
	caaggtgaac gtctatatcc ttgatgacgg caagcgtgag gaattcgccc gctttgccga	600
	agaatgcggt gcccgctaca ttgccgtcc cgataacgcg catgccaagg ccggtaacct	660
	gaactacgcc attcagcata caagtggcga atacatctg attctggact gcgatcacat	720
	cccgaccggt gcgttctgc agatctgat gggatggatg gtcgaggaca agaagatcgc	780
	cctgatgcag acgccgcatc acttctatc ccccgatcct ttccagcgta acctggccgt	840
	cggttaccgc acgccgctg aaggcaacct gttctatggt gtcattcagg atggcaacga	900
	cttctgggat gcgaccttct tctgtggttc ctgtgccatc ctgcgccgca aggccatoga	960
	agagatcaat ggtttcgcaa ccgagaccgt gacggaagat gcccataaccg ccctgcgcat	1020
	gcagcgcagg ggggtggtcga ccgcctatct gcgcattccg ctggccagcg ggctggcgac	1080
	ggagcgctg gtcacgcata tcgggcagcg tatgcgctgg gcccgaggca tgttccagat	1140
	cttccgctg gataatecca tgctggggcc gggcctgaag ctggggcagc ggctttgcta	1200
	tctttcggcc atgacgtcgt tcttcttcgc cattccgctg gtcattctcc ttgcctcccc	1260

	gctggccttc cttttcttca gccagaatat catcgcggcc tccccctgg cggtgctggc	1320
	ctacgccatt cccacatgt tccattccgt tgccacggcg gcaaaggatga acaagggatg	1380
	gcgctattca ttctggagtg aagtgtacga aaccgtcatg gcgctgttcc tgggtcgggt	1440
	gaccatcgtc acgatgatgt tcccctcgaa gggcaagttc aacgtgacgg aaaaagggtg	1500
	cgttctggag aacgaggaat tcgacctgg tgccacatat ccgaacatca tctttcgggt	1560
	catcatggcg attggcctga tgcgcgggct gtttgccctg gccttcagc atctggacat	1620
	aatttcagag cgtgcctacg cactcaactg tgtctggctc gtgatcagtc tcatcatcct	1680
	gcttgccggc attgcccgtc gccgtgagac caagcagatc ccccacagcc atcgtgtcga	1740
	tgcgcgaatt ccgtaacgg tttatgatta cgaagggat tccagccatg gcatcacgca	1800
	ggacgtgtcc atgggtgggt tggccattca tatgccgtgg cgcaatgtga caccggacca	1860
	gccggtgcag accgttgtcc acgccgtgct ggatgggtgag gtggtcaatc tccccgtac	1920
	catgatccgc tgtgcgaatg gcaaggcggc ctttacctgg aacatcacct cctcccgat	1980
	tgaagcctct gtctccgggt tcgtgttcgg tcgcgccgat gcctggctgc agtggaatga	2040
	ttacgagcat gatcggccgt tgcgaagcct gtggagcctg atcctcagca tcaaggcct	2100
[0004]	gttccgcaag aagggtcggg tgatgatcca tagtcgcccg caaaataaac ccattgcaact	2160
	gcctgttgag cgcagggagc caacaagcag tcagggtgggt cagaaacagg aaggaaagat	2220
	cagtcgtgcg gcctcgtgat atgaaaatgg tgtccctgat cgcgctgctg gtctttgca	2280
	cgggagcgca ggctgcgccg gttgcatcca aagcgcagc cccgcagcct gcgggcgata	2340
	acctgccgcc cctgcccgcc gcggcaccgg ccgccgcggc agccccggcc gggcagcagc	2400
	ctgctggcgc cgccagtgcg gcacctgccg tcgatccggc cgctgccagc gccgccgatg	2460
	ccatggtgga caatgcggag aatgcgaccg gcgtcggttc ggatgtggcg accgtgcata	2520
	cctattccct gcgcgaactt ggcgcggaga acgcgtgac catgcgtggc gcggcccccc	2580
	tgcaggggct gcagttcgggt attccggggc accagctcgt cacctcggcg cggttgtcg	2640
	tgtcgggtgc gatgtcacc aatctccagc ccgataacag cgcggtcacg attacgtga	2700
	acgagcagta tateggcacg ctccggcctg acccgtcaca tccggccttt ggtccgcttt	2760
	cctttgacat caaccatc ttctttgtca gcggcaaccg gctgaacttc aatttctcgg	2820
	caggtcgaag aggatgcacc gaccgagca acgattgca gtgggccagc gtgtccgagc	2880
	attcggaaact gcagatcacc accataccgc ttctccccg tcgtcagctg tcgcggtgc	2940

	cgcagccggt ctttgacaag aacgtaaggc agaagacggt cattccgttc gtccttgac	3000
	agacatttga tgctgaagtg ctcaaggctt cgggcatcct ggcgtcctgg ttcggccagc	3060
	agaccgattt ccgcggcgtg aacttccccg tattttccac cattccgcag acaggcaatg	3120
	ccgttgtggt ggggtgttgc gatgaactgc cttccgcgct ggggcgtccg gccatcagcg	3180
	ggccgaccct gatggaagtg gccaacccgt ccgatcccaa tggcacgata ctgctggtaa	3240
	cgggccggga ccgcgatgaa gtcattaccg caagcaaggc cataggcttc agctccagca	3300
	cgctgccggt tgccgcgcgc atggatgtgg cgcggattga cgtggcccc cgcgccccca	3360
	acgacgcgcc gtccttcata ccgaccagcc ggcctgtccg gctgggtgaa ctgggtgccg	3420
	tcagtgcctt gcagggcgaa ggctataccc cggcgctgct ttccgtggcg ttccgcacgg	3480
	cgctgacct gtatacctgg cgcgaccggc cgtacaagct gaacgtgcgc ttccggcg	3540
	ccgacgggcc gatcgtggac ctggcgcgtt cgcacttggc cgttggatc aacaatacct	3600
	acctgcagtc ctattccctg catgaaaagg acagtgtggt cgaccagctg gtccagcgtt	3660
	ttggcggccg gggccagacc agtggcgtgc agcagcatac gctgaccatt ccgccgtgga	3720
[0005]	tggtgttcgg tcaggatcag ctgcagttct attttgatgc ggccccctg acccagccc	3780
	gctgccgtcc cgccccagc ctgatccaca tgtcggttga tccggattcc acgatcgacc	3840
	tgtccaacgc ctatcacatc acgcgcgatc ccaatctggc ctacatggcc agcgcggggt	3900
	atccgttcac cacctatgcc gacctgtcgc actcggccgt ggtgctgccg gaccatcca	3960
	atggtacggt tgtcagcgc tatcttgacc tgatgggctt catggggcg acgacgtggt	4020
	atcccgtctc gggctctggac atcgtttccg cggatcatgt gaatgatgtg gcggaccgga	4080
	acctgatcgt cctgtccacg ctggccaata gcggggaggt ttcttcctg ctgtcgaact	4140
	cgctgtacca gattgccgac gggcgcctgc acatggggat gcgctccacc ctgagtggg	4200
	tgtggaacat cttccaggac ccgatggccg ccatcaaaa taccatccg accgaggtcg	4260
	agacgaccct gagcgggtggc gtgggcgcga tgggtggaagc ggaatccccg ctggcatccg	4320
	gacgcacggt tcttgccctg ctctcggctg acgggcaggg gctggacaat ctggtccaga	4380
	tcctcgggca gcgtaagaac caggccaaga ttcagggcga cctgggtgctt gccatgggg	4440
	atgacctgac atcgtaccgc agttcgcctt ttataccgt tggcacgctg ccgatgtggc	4500
	tcatgccgga ctggtatatg cataaccatc ccgttcgct gatcgtggtg gggctgttcg	4560
	gatgcctgct ggttgtggcc gtgctggttc gtgcctggt gcggcatgca ctgttccgcc	4620

	ggcggcagct gcaggaagaa aggcagaaat cgtgagcatg aacagacgct acgtcttttc	4680
	cctttctgcc ggctgcttg ccagcagttg catgaccgtg ctggtggcgg tgccactggc	4740
	gcgcgcgcag caggcctcca cggccatgac cggtagccag gcttcgggcg ggtcggcggc	4800
	gccacggcag atcctgctgc agcaggcccc gttctggctt cagcagcagc agtatgacaa	4860
	tgcccgtcag gccctgcaga atgcccagcg cgtggcgccg gatgcgcccg atgtcctgga	4920
	ggtacagggc gaataccaga cggcgatcgg caaccgggaa gcggcagccg atacgtgcg	4980
	ccacctccag caggttgcgc ccggcagtac ggccccaac agcctgagtg acctgttga	5040
	cgagcgttcc atctcgacat ccgacctgtc gcaggtgcgt tcccttgccg catccgggca	5100
	taacgcgcag gcggtgcagg ggtaccagaa gctgttcaat ggcgtaagc cgccgcatc	5160
	gcttgcggtg gaatattacc agaccatggc aggcgttccg gccgaatggg atcaggcccc	5220
	ggccgggctt gccggtatcg tggcatcaa tccacaggat tatcatgcc agctcgcatt	5280
	tgcgcaggcg ctgacctata atacggcgac ccgtatggaa ggtctggcgc ggctcaagga	5340
	cctgcagggt ttccgcagcc aggctccggt cgaggctgcg gccgccagcc agtcctaccg	5400
[0006]	gcagacgctg agctggctgc cggtaacgcc caccacgcag ccgctcatgc agcagtggct	5460
	ggatagccat cccaatgata ccgaactgcg tgagcatatg gtccaccgc ccggcggccc	5520
	gccggacaag gcgggtcttg cgcgtcaggc gggttatcag cagctgaatg ccggccgat	5580
	tgccgcagcc gagcagtcct tccagtccgc gttacagatc aattcccatg atgccgattc	5640
	acttggcggc atgggactgg tcagcatgcg gcagggtgac gcagccgaag cccgccgcta	5700
	tttccaggaa gcgatggcgg ccgatcccaa gacggcggat cgctggcgcc cggccctggc	5760
	cggcatggaa atcagcgggtg actatgccgc ggtccgccag cttattgccg cccaccagta	5820
	tgatgcggcc aagcagcgcc tgtccgcgct ggcacgccag tccggccagt ttaccggcgc	5880
	cacgctcatg ctggccgacc tgacagcac gaccggccag atgggtgcgg cggagcagga	5940
	ataccagtcc gttctggcac gcgaccgaa cagccagctt gccctgatgg gactggcgcg	6000
	ggtggagatg gcgcagggca agacggcgga agcccgccag ctgctgtcgc gtgtcggatc	6060
	gcagtatgcg acccaggtcg gggaaatcga ggtgacgggc cttatggccg ccgcctcgca	6120
	gacatcggat tccgcgcgca aggtctcgat cctgcgcgaa gccatggccc aggcaccgcg	6180
	tgacctatgg gtgcggatca atctggccaa tgccctgcag cagcaggggg acatggcggga	6240
	agccaatcgg gtcatgcagc ccatcctgtc caatcccgtg acggcgcagg accggcaggc	6300

	cggtatcctg tttacctatg gcagtggcaa tgatgcatg acacgccgcc tgctggctgg	6360
	cctgtcgccc gaggactatt cccccccat ccatgccatt gcgacggaaa tggagatcaa	6420
	gcaggatctg gccagccgcc tgtccatggt ggcgaacccg gttccgctga tccgtgaagc	6480
	cctttcgccg cccgaccga cgggcgcgcg tggcgtggcc gtggctgac tgttccgtca	6540
	gcgtggcgac atgattcatg cccgcatggc cctgcgcatt gcctcgacc gcacgctcga	6600
	tctttcggcg gaccagcgtc tggcctacgc caccgaatac atgaagatca gcaaccgggt	6660
	tgcggccgcc cgctgctgg ccccgctggg tgacggcagt ggcacggggg cgggcaatgc	6720
	cctgcttccc gagcaggtac agacgctgca gcagctgcgc atggggattg ccgtggccca	6780
	gtccgacctg ctgaaccagc gcggcgatca ggccgaggca tacgatcacc ttgctccggc	6840
	cctgcaggcc gatccggaag cgacatgcc caaactggcg ctggcgcggc ttacaatgg	6900
	tcagggaag tccggcaagg cgctggaaat cgatctggcc gtgctgcggc acaaccgca	6960
	ggatctggat gcgcgccagg cagcggtgca ggctgccgtc aatagcggcc gcaagagcct	7020
	ggccaccgc cttgccatgg atggtgtgca ggaaagccc atggatgcgc gtgctggct	7080
	ggccatggcc gtggccgatc aggccgatgg ccatggccac cggaccatca gtgacctgcg	7140
[0007]	ccgcgcctat gacctgcgtc tgcagcaggt ggaaggcacg cggcggtgg caagcgggac	7200
	gggtgagcag gaatcgcttg aacccccgtc cagcaaccg tttcgccacc atggctatgg	7260
	acgccagacg gaactgggcg caccggttac gggtggctcc tacagcatgg aggcaacgtc	7320
	tcccgaagca tcggaccaga tgcgtcctc catcgccggg cagatcacca cgctcgggga	7380
	aaacctggcc cctccatcg atggcggtct ggggttccgg tcgcttcgg gtgagcacgg	7440
	catggccgc ctgaccgaag cgaacattcc catcgtgggg cgctgccgc tgcaggcggg	7500
	tgagtccagc ctgaccttct cgateacgcc aacctgatc tggtcgggac agctcaatac	7560
	cggttcggtc tatgatgtgc cgcgctttgg caccgacatg gcaacacagg cgtataacca	7620
	gtacgtcagt tacataagcc agaacaattc cagcagcacc ctgcatagcg aacttgtaa	7680
	gggtggcgag gccgaggccg gttttgcgc agacgtgcag ttcggcaaca gctgggtgcg	7740
	ggcggacctg gggcatcgc ccatcggtt cccatcacc aacgtactgg gcggtgtgga	7800
	attctcgccg cgtgtcggac cggttacctt ccgcgtcagc gcggaacgcc gctccatcac	7860
	caacagcgtg ctgtcctatg gtggcatgcg cgacccaac tacaacacga cactgggccg	7920
	ctatgcccgc cagctttatg gcaaggagct gagttccag tggagtgagg aatggggcgg	7980

	ggtcgtgacc aaccacttcc atggtcaggt tgaggcaacg ctgggcaaca ccatcgtata	8040
	tggtggcggt ggctatgcca tccagaccgg caagcatgtg cagcgcaatg acgagcgcga	8100
	ggcgggcacg ggtgtcaaca cgctggctcg gcacaatgcc aacatgctgg tccgcatcgg	8160
	tgtcagcctg acctatttcg gctatgccaa caaccaggac ttctatacct acgggcaggg	8220
	tggtacttcc tcgccgcaat cctattacgc ggcgaccgta cccatccggt atgcggggca	8280
	gcacaagcgg ctggactggg acgtgacggg cagcgttggc taccaggtgt tccatgaaca	8340
	ctcgtcccca ttcttcccga cgtcttcctt gctgcagtct ggcgcgagc acattgctga	8400
	ctcgtatgtg cagaacgcaa ccagttccga ctatctctca caggagacgg tcaacagcgc	8460
	ctattatccc ggagatagta ttgctagtct tacgggtggc ttcaatgcta gggtagggta	8520
	tcgatttaca cacaatcttc gtcttgatct gtcggggcgc tggcagaagg ccgtaactg	8580
	gactgaaagc ggcgccatga tttccgcaca ctatcttatt atggaccagt aatgacaact	8640
	ttcaacgcaa aaccggactt ttccctgttc ctgcaggccc tctcctggga gattgatgat	8700
	caggccggga tcgaggtgag gaatgacctg ttgcgcgagg tcggtcacgg catggccggt	8760
	cggctgcagc ctccgctgtg caacaccatt catcagctgc agatcgagct gaactcgtg	8820
[0008]	ctggccatga tcaactgggg ctatgtgcag cttgaactgc tgcccaggga ccatgccatg	8880
	cgcacgtccc atgaggacct gccccagggt ggcagcgcgg gcgagccggc cggcacatgg	8940
	ctggcccccg tgctcgaagg gctgtatggc cgctggatca cgtcgcagcc gggtgccctt	9000
	ggcgattatg tcgtcacccg cgatgtggat gcggaggatc tcaactccgt tcccagccag	9060
	acgatcatcc tgtacatgcg caccgcagc agcagcaact ga	9102
	<210> 5	
	<211> 733	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> gfp基因	
	<400> 5	
	agaaggagat atacatatga gtaaaggaga agaactttc actggagttg tccaattct	60
	tgttgaatta gatggtgatg ttaatgggca caattctct gtcagtggag agggatgaagg	120
	tgatgcaaca tacggaaaac ttacccttaa atttatttgc actactggaa agctacctgt	180
	tccatggcca acacttgtca ctactttctc ttatggtgtt caatgctttt caagataccc	240

	agatcatatg aaacagcatg actttttcaa gagtgccatg cccgaagggtt atgtacagga	300
	aagaactata ttttacaag atgacgggaa ctacaaatca cgtgctgaag tcaagtttga	360
	aggtgatacc ctcgtttaata gaattgagtt aaaaggtatt gattttaaag aagatggaaa	420
	cattcttggga cacaaaatgg aatacaacta taactcacac aatgtataca tcatggcaga	480
	caaacaaaag aatggaatca aagttaactt caaaattaga cacaacattg aagatggaag	540
	cgttcaacta gcagaccatt atcaacaaaa tactccaatt ggcgatggcc ctgtcctttt	600
	accagacaac cattacctgt ccacacaatc tgccctttcc aaagatccca acgaaaagag	660
	agatcacatg atccttcttg agtttgaac agctgctggg attacacatg gcatggatga	720
	actatacaaa taa	733
	<210> 6	
	<211> 2219	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> bglAx基因	
[0009]	<400> 6	
	aaggaggaac aagccgcatg aaaccatccc gcaagtcatt cctgctttcc gccgtggcgt	60
	gggggctggt ggcccgctg cccgccatg cccgccacgc ggccacggct ggtgaccocgg	120
	ccgatgacca ggcgcggcag gtgctcgcgc atatgagcct tcaggacaag atggcccttc	180
	tgttcagtgt ggacgggggc ggcttcaatg gcagtgtcgc acctccgggg ggcttgggtt	240
	cggcggcgta tctgcgtgcc ccggcgggtt cgggcctgcc ggacctgcag atatcggatg	300
	cggggcttgg cgtgcgcaac cccgcgcata tccggcccaa tgggtcggcg gtttccctgc	360
	catcgggtct ggccacggcc agcacatggg atgtggacat ggcccggcag gcaggtgaaa	420
	tgatcgggcg cgaggcctgg ctgagcgggt tcaacatcct gctgggcgggt ggtgccgacc	480
	tgacgcgca cccgcgtggc ggccgcaatt ttgaatatgc gggggaagac ccgtccaga	540
	ccggcggat ggtgggcagc accattgccg gcatccagtc gcagcatgtg atttccacgc	600
	tcaagcatta cgcgatgaac gacctgaga catcgcgcat gaccatgagt gccgatatcg	660
	accccgtagc catgcgtgag agcgacctgc tgggtttcga gattgcgatt gaaaccgggc	720
	atcccggttc cgtcatgtgt tcgtacaacc gggatgaatga cctgtatgcg tgtgaaaacc	780
	cgtacctgct gaacacgacg ctgaagcagg actggcatta ccccggtttt gtcatgtccg	840

	actggggcgc cacgcattcc tccgcccgtg cggcgctggc gggactggat caggaatcgg	900
	ctgggtgacca tgccgatgcg egcccctatt tcaccgctct gttggcggcg gatgtaaagg	960
	cggggcgtgt gcccgtcgcc cgtattgacg acatggcgca gcgcattgtc cgctccctgt	1020
	tcgcggcggg gctggtggcc catccgccgc agcgcgggccc gctggatgtg gtgaccgaca	1080
	cccttgtggc ccagcgtgat gaggaagaag gcgcggttct gctgcgcaac gaaggggta	1140
	tectgccget ttccccacc gcgcgcatcg cggtcattgg cgggcatgcc gatgcgggcg	1200
	tgatctcggg cgggggggtcc agccaggtcg atcccatcgg gggtgaggcg gtcaaggac	1260
	cgggcaagaa ggaatggccg ggtgatccgg tctatttccc gtcacccccg ctcaaggcca	1320
	tgcgggccga ggcccccaac gcgcacatca cctatgaate cggcaccaat atcgccgccg	1380
	ccgtgcgcgc cgcgcgggcg gccgatgtgg cggtcgtgta tgcaacgcag ttcacctcg	1440
	aggggatgga cgcgccacgc atgcacctg atgccaatgc cgacgcgctg atcacagccg	1500
	tggccgcggc caaccgcgt accgtggtgg tgatggaaac cggcgacccg gtgctcatgc	1560
	catggaacag cagcgttgcg ggcgtgctgg aggcattggt ccccgttcc ggcggtgggc	1620
[0010]	cggccattgc acgcctgctg tttggcaagg ttgcgcctc gggccacctg accatgacct	1680
	tcccgcaggc ggaaagccag ctggcccata ccgatattgc cgggtgtgacg gcggacaacg	1740
	tgttcgagat gcagttcaag accgatcagg aactggtcta tgacgaaggc agcgacgtgg	1800
	gctaccgctg gtttgaccgc aaccatctca agccgctcta tcccttcggt tacggtctga	1860
	cctacaccac gttcagcacc gatggcctgg cgggtcacag gcatcatgat gcggtgacgg	1920
	tcacctttac cgtacataat accggcaacc gccccggtgt ggatgtgccg caggctctatg	1980
	tgggcctgcc cgatggcggg gcacgcaggc tggcgggctg gcagcgggtc agtctggcac	2040
	cgggtgaaag ccgtgcggtg acggtacagc ttgatccgcg cctgctggcg cattttgacg	2100
	ggaagaagga ccgctggagc attccttcgg gcacattccg gctgtggctt ggcacgtccg	2160
	ccacggatga cagccagcag gcaagcctgc acctgtccgg tcgcacctc gcgcctga	2219

<210> 7

<211> 1906

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ph1Z群体感应启动子

	<400> 7	
	ctggattcct gctcgaactc ttcgcgcctc gtttgcactc cagccccgcc gaccacacca	60
	gccccgccta caagatcttg tagtcgctaa ccctccacaa gtcctctata aaaaaccgca	120
	cttccccctt cccccaagga atcccctgcc atgcacatgg aagaacacgc cctgagcgcg	180
	atggacgacg aactgaaact gatgctgggc cgtttccgcc acgagcagtt cgtggagaag	240
	ttgggggtggc ggctgcctat ccctccgcac caagcaggct acgagtggga ccaatatgat	300
	accgaacacg cccgctactt gctggccttc aacgagcacc gcagcatcgt aggttgtgcc	360
	cgattgatcc ccactacctt cccgaatctg ctggaggggg tgttttccca tgcctgcgcg	420
	ggggccccac ctgggcaccc tgcgatatgg gagatgactc gcttcaccac caggagccg	480
	cagttagcga tgcccccttt ctggaaaacc cttaagaccg caagcctcgc cggcgccgac	540
	gcaatcgtgg gcatcgtgaa cagcacaatg gagcgttact ataaatcaa tggcgtgaaa	600
	tacgagcggc ttggcagcgt gatagaccat cagaacgaaa agattctcgc gatcaaattg	660
	agcgcctatc gagaacacca ccgtggtgcg agacttcaa gcggctttac gagcgaagcc	720
	cttttgagg aaaccgcgta gtaacggccg agtcgtctc ttggcgact cggcgagca	780
[0011]	gatgaacctt agatataacc cagcgtacc gcgtagctga cagcctgcac tcgattcgag	840
	gcgccaatct tcctttggat attgcggtga tggtagttca ccgtgtctgt gcacacgcc	900
	ataataacgc cgatctctc cgaggttttt ccgtcggcgg tccaccggag cacgtcgc	960
	tcgcgctcgg agaattctac atcgggtgta aaggcgcgga cgtcggtttc caggcggaa	1020
	atcttctcca gcgcggcggc agcgaaggcc ttggtaacgg gcttcagggc ttcgaactcc	1080
	tgtagcgaga tggcattgtc tttccgtgcg agagacagga caccacgcg acctgtgtg	1140
	ttaaacgacg gttgggcaag gccatggcaa aggctgctgt cattcgcctc gctccacaga	1200
	tccgggcagt tcctaaagag ttcgttcgac cagaggatgg gggcggaact cacctggag	1260
	tgtttaacgg tggggtcaat cagcgcatag tttgcggcct gatagcgctg cagccaatgt	1320
	tctggatagt taccgtaac ataggtttta ggcctcatga aaggcgtcac cgagcacatg	1380
	ccataggcaa agaagtcgaa tcgcagctcg cgcagcgcg gcaaggccac cacggtaaat	1440
	tcctccatgt tcatggcctg cgcaaagatg ctgtagaaat aggcgtccca tcccaacagc	1500
	tggcccagtt ccattttgaa cacctataac actccaaggg agtcgtgaga ctaaaccaac	1560
	ctgagcgcct gtcaactgcc aaaatcaacg gtcatagact gcttcgcact agcgacatgt	1620
	tttttatgtc taaccaact aactagccat aggccactgt ttatcagccg acgaatgagc	1680

	ctgcctattc ataataatgc aacactccct ccgaccgatc gcgcccgcc tgggccacta	1740
	caagatctgg tagttccaag ccccagaaac gcaggtgtat aaacgacacc gcacaaaacg	1800
	atcagtgcaa aacagttcaa gcattgtcat tcgtcgcgat caattatata attatataat	1860
	tgattgcgcg taatttcagt caactaagga gaacactgcc tagcta	1906
	<210> 8	
	<211> 308	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Rox群体感应启动子	
	<400> 8	
	gcctcctttc gtgtttcgca gcggcctgag cgagtgccgc tgatcactga aaaaacaaaa	60
	gccgggacgg taatgcgccc cggcctttgt ttgagccgat gaaaaccctg ccaagagtaa	120
	aacaccggat cagcttcaac gtagcacggc acctgcaagc cgccaccctg cgacggttcg	180
	ccgcaccctg ccagccagac cggtagatga agccctgaca ccgcacatgc gtcagaacgt	240
	cgcacctgac agggataacc aggcctcttat aatctgcctt ccaataaaaa acctgagagg	300
[0012]	tcggtcat	308
	<210> 9	
	<211> 1996	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> AfmR群体感应启动子	
	<400> 9	
	aacagaatat agcgcgccag cgtatcgtga cttaccaact tggtaggctc gcagctatgt	60
	atccacgtgc ttaggcataa taaaaatcct gcacgtctt cgccatccc tgaaggtaga	120
	gtaatcctga aatataatga gtcatgaca tggattcccg actcaagtac tcggacttca	180
	ttcccgcgga tgaaagcaag agtaacgtgt gcctcaact ggagctggaa aaactgctgg	240
	gcgacctgca aggcgctagc tacgcctact ttgccgccc gcgtaaccgg gaagtggcgc	300
	cgcttatcgt gtccaactac ccggcccgat ggctgaaggc gtacaagaac gcgaattatc	360
	acctgatcga tccatcctc caccacggat taaagagctg cgcccccttc tcttgagcgc	420
	acgccttgca ggccggcccc tgtgaacgca gccgtgagct gttccggagg agcagtcaat	480

	accgcatctg cacgggggcg actttcaccc tccacgacgc cgggggcatg ttcagttccc	540
	tctcgctgtg taacagcggc cctcaggccg agttcgaacg ccgtatggcg gaccagcagg	600
	gccacttgca gatggcgctt atccgctttc atggccgtct gctgtccctg cgcgcaatgg	660
	acgaactggt tccggaacca cagactggcc cgctgtcggc ccgcgagttg ggcgtgctca	720
	agtgggtcat gatgggcaag gcgtatcggg agattgccgt catctgcgcg atttcagaac	780
	gaaccgtcaa atttcacatg agcaacatca gcgggaaact gcagggtgtgc aacgccaaac	840
	aggccgtata tgaggcgcaa cggcagggca tcttgtagtc aggccgagat ccgctgcggc	900
	tcgcacagcg cagtttccag aggattcagc cgttgcggcc aggtatccag ccgggtcgag	960
	gagagcgggc actttcgggc aatgttgctg agcaagcgtt gtcggttcgc atcggacacc	1020
	ggcatgtcca gcaacagcac cttttcaccc ggggcagcct caccacgtc cagaatttca	1080
	taatgccagc ccgcgttccg cacaatacgg cccatggcgt tcgacacgac agtgatgatg	1140
	ctctccagtc cgctgtgcgc agcgtggttgc tgatacaca aaagcagcat ctcggtcagg	1200
	ggcagatgcg ccaggcccag ctgacgtgac cgagttttgt cgacgaagaa acggctactc	1260
[0013]	tctgccatca atgcctgctt aggcggttcg cagctgaaga agcccgaggaa cgggccttcg	1320
	accatatacg ggtccagcgt gttgatcaac ctccagaccg ccagcgggac gttcttccag	1380
	gtgcctacga gataggtcgt acgctcatta tcgtactcgt cgaactcgat gtcgtcacga	1440
	acgttcacct tccagttcaa gcggtcggca aaaacttctt tacgcaggcc gtacaggtcg	1500
	gccaccacg cgtggggcgt ggggctgtag tcgagtgcac gaaactcgat ggattccata	1560
	gtgttaaagt tcttccgtgg gctatggcca gtactaagga ttgggctcgc gcagtttgcg	1620
	gagagtcaac ttgcgttgtg cggcgcttgt tattataaca atgtctgtcc gatgacaacc	1680
	tgtacttagg tgcaggtaca gttgtatga actgattttc atctcgcact tcgccatctg	1740
	tacctagata cagttgtcct gcttgggcaa ttgcgacaac ttatgccggg cagtgggtaa	1800
	gccttcaatg acaccgcgaa gatgagcttt taatgttgga cgtttgttcc aactaacggg	1860
	ttcatggctt gtacttgcga gtacccact tgccttaatc gtcgaatatg ccaatgacag	1920
	tctgagtgtc tggatcaggc ttcttcacgc tgcgtggcat ctccagccaa gacatcghaa	1980
	cagggaagat cagcta	1996

<210> 10

<211> 1080

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> cmcAx基因	
	<400> 10	
	atgctgctgg attttatgaa gttgcagaag caggtgagcg gtatggggag gaggagttc	60
	ctttccgtca tggccgccgc tggtagcatt ccatttttga gtacggccct ggcggccgac	120
	gatccggcta tcaacgcgca gtgggctatc tttagggcga aatatttcca tcccgacggt	180
	cgcataattg atacggggaa ttctggcgaa agccatagtg aaggtcaagg ctacggcatg	240
	ttgttcgcgg ccaccgcagg tgaccaagcg acattcgagg ccatgtggag ctggaccg	300
	gcgaacctgc agcataagac cgacgccctg ttttcgtggt gctacctaga cgccataat	360
	ccgcccgtcg ccgacaaaaa caacgcgact gacggcgacc tgctgatcgc cctgggctg	420
	gttcgcgcgg gccgcctttg gaagcgcgcc gactacatcc aggatgcgat tgccatata	480
	ggcgacgttc tcaaaactcat gaccctgcaa gtcgggcccgt atctcgtcct ccttcgggc	540
	ggggtcggct tcgctaccaa agacagcgtc aactgaacc tgagctatta tgtgatgcct	600
[0014]	agcttgatgc aggccttcgc cctgaccggt gatgcgcggt ggcaaaaggt gatgggggat	660
	ggcctcatta ttattaacca gggccggttc ggcgaaatgga agctgcctcc tgactggctg	720
	tccatcaacc gtcagaacgg ccatttcage atcgccaacg gctggccgcc gcgctttagc	780
	tacgacgcta tccgcgtccc gctctacctc tattgggccc atatgctgag cccggacctc	840
	ctggctgatt ttacacgctt ttggaaccac tttggagcat ccgctctgcc gggctggatc	900
	gacttgacca acggtgcgcg ttctccctac aacgccccgc cggggtactt ggccgtcgcg	960
	acctgcagtg gcctgtcgtc ggcagggggt ttgccgacce tagataaagc tccagactac	1020
	tactctgcgg ccttgacgct cctcgtgtac attgcgcgcg gtgagggtgg tggatgtga	1080
	<210> 11	
	<211> 933	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ccpAx基因	
	<400> 11	
	atggacatgg acaaccaca ggatgttact cgcattgctga gcagcggata cggcctgagt	60
	ggtgaaggct tccactatca ttccttcaact cgcccggtaa tgcttgacat gacccagag	120

ctgccgcatg atagcgtgga tgatactgaa catcatttgg acgataatgt gaccgaacat	180
gagagcgcac ctgccacggc cccagttttc gtttttggatg cgcgcccgga accagcagcc	240
ccgccggctg tggctgaggc tgccccaccg ccacctccgc cacctcctcc tgaacctgcc	300
ccgcccgaac ccccgcccgc cccaccgccg tacacaccgg ttgtgacgca tgtgcctcct	360
ccgccgccgg tggagagac tccggtgcc gaaccagtag ccgaagcagc cgcgccagct	420
agaccgcgcc cagttccgcc ggcacagccg gccccgaca tggcaagcac cggcggccgt	480
gaacgccggg gcttgcagcc cttcacgacc cctcgcacgc caagcgagcc gcctgtatca	540
agtccggccg ccgcaccggc taccccgttc gtccaggccg acgattgggc gccctgccc	600
aaagcgcagc aacgacgcgg gcagcggccg accggccctg ggTTTTtctt cgccaagggc	660
aacgatcgcg tggcaacggc tcggctgttt caaccggtgg cgtggcacg cctgcctcc	720
aagcccgaca gtaaggtgac tacaatgacc aagtttgaca aaaccgcgca gaacgcgcc	780
accggccgtc gccctgcccc gtcagataac tctccgacgt tgaccgaagt gttcatgaca	840
ctcggcggtc gtgcgaccga ccgctggtg ccgaagccta gcctgcgca tgcgttctc	900
cggaagaggg aagaagaaac cggccaaagc taa	933

[0015]

<210> 12  
 <211> 2238  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> bcsA基因

<400> 12	
atgagcgaag tccaatcaag tgcgccgcc gaaagctggt tcgatcggtt gtcgaataaa	60
atcttgagct tgcggggcgc ctctacatc gtgggcgcca tcggcttgtg cgcgttctc	120
gccccacca cggatgatgct gagcgtcaac gagcagctga tcgtgccct ggtatgcgtg	180
gtggtgttct tcatcgtggg caggcgtgag agccgtcga cacagatctt cctggaggtc	240
ctgagcgcgc tgggtgtctt gaggtatctg acttggcgc ttaccgaaac cctgacttc	300
gacacctggc tgcaaggcac cctgggcgtg acctgttgc tggcggaact gtacgcgctg	360
tatatgctgt tcctgtcgtc cttccagacc atctctccgc tgcacgtgc acctctgcc	420
ctgagcccga accccgaaga ttggccaacg gtagacatat tcatcccccac ctacgacgaa	480
agcctggggg tagtccgctt gaccgtcttg ggtgcactgg gtatcgactg gccgcctgat	540

	aaggtaaacg tctatatacct ggacgacggc aaacgggagg aatttgctcg ctttgccgaa	600
	gaatgtgggg cgcgatacat cgctcgcccc gataacgccc acgccaagc gggcaacctc	660
	aactatgcta tccagcacac ctctggcgag tacatcctga ttctggactg cgaccacatc	720
	cccacccgcg ctttctcca aatctccatg ggggtgatgg tcgaagataa aaagatgcc	780
	ctgatgcaga cgccacacca ctttactcg ccggaccctg tccagcgaaa cttggccgtg	840
	gggtatagga caccaccgga gggcaacctc ttctacggcg tgatccagga cggtaacgac	900
	ttctgggacg caacatTTTT ctgtggctcg tgcgccatct tgcgccgga agctatcga	960
	gaaatcaacg gcttcgccac cgaaacggtc accgaggacg cgcataccgc actgcggatg	1020
	cagcggcgcg ggtggctgac cgcgtatctg cgtatcctc tggcctcggg cttgcaacg	1080
	gagcgttag tgaccatat tggccagcgc atgcgctggg ccgcgggat gttccaaatc	1140
	ttcagagtgg acaatcctat gctggccca ggcttgaagc tgggccaacg cctgtgttac	1200
	ctctctgcca tgacgtcgtt tttcttgcc atcccacgcg ttattttcct ggcgtcggc	1260
	ctggcctttc tgttcttcag ccagaatatac attgcagcct cgcggttggc cgtcctcgcg	1320
[0016]	tatgcatcc cgcacatggt ccatagcgtg gccaccgcgg cgaagtgaa caaggctgg	1380
	agatattcgt tctggctga agtttacgaa accgtgatgg ctctgttctt tgtccgcgtg	1440
	accatcgtca caatgatggt ccttcgaaa ggcaagtta acgtaaccga gaaaggcggc	1500
	gtcctggaac acgaagagtt tgacctagggt gccacctatc cgaacatcat cttcgcgctc	1560
	atcatggcaa tcggactgat gcgggtctg ttcgcgttgg cgttccaaca tctggacatt	1620
	attagcagc gcgcctacgc gctgaactgt gtctggagcg tgatttcct catcatcctg	1680
	cttgcggcca ttgcagtggg gcgggagaca aagcagatac gccacagcca ccgggtgac	1740
	gcgcgcatcc cggtgaccgt gtatgattat gaagggaata gctcgcacgg catcaccag	1800
	gacgtgtcga tgggccccgt tgcctaccac atgccttggc gcaacgtgac acccgaccag	1860
	ccggtcaaaa ccgtgttaca cgcggtgtg gacggggagg ttgttaacct gccggcgacc	1920
	atgattcggg gcgccaacgg taaggccgtt ttcacctgga acattacgct cttgcctatt	1980
	gaagccagcg tggctcgctt cgtgttcggc cgcgcagatg cctggttaca gtggaacgac	2040
	tacgagcacg accgccccct tcgtagcctg tggagcctga tctgtctat caaggcactg	2100
	tttcgcaaga agggctcgcg gatgatccac agtcggccgc agaataaacc cattgctctg	2160
	ccggtggaac gtcgtgaacc gacgtcgtcc caaggaggctc agaaacagga gggaaaaatc	2220

	agccgcgcgg cctcttga	2238
	<210> 13	
	<211> 2427	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> bcsB基因	
	<400> 13	
	atgggaggaa gtatgaaaat ggtgagcctg atcgcgctgc tggatttcgc caccggtgct	60
	caagcggccc cagtggcctc gaaggcgcgc gccctcaac cgcccggtga taacctcct	120
	ccgttgccag cagccgcccc cgcggcgcca gctgctcctg ctggtcaaca gcccgctggt	180
	gcggccagcg ccgccccagc agttgacca gcggccgcca gtgccgccga tgctatggtg	240
	gacaacgccg agaacgccac gggggtgggc tctgatgtcg ccaccgtgca tacctactcg	300
	ctgcgcgaac tgggagccga aaacgcccta accatgcgcg gtgcggcccc gttcaaggt	360
	ctgcagtttg gcatcccggg cgatcagttg gtgacttccg cgcgcctggt cgtatcgggc	420
[0017]	gccatgagcc ccaacttgca accggacaat tccgccgtca ccattaccct gaacgaacag	480
	tatatcgga ccttgcgccc ggaccgctcg caccggcct tcggtccgct gtcgttcgac	540
	attaacccaa tcttcttctg gagcggcaac cggttgaatt tcaacttttc ggcaggtcc	600
	aagggtgca ccgatccatc caacggcttg cagtgggcca gcgtgagtga aactccgag	660
	ctccagatta ccacaatccc gttccgccc cgccccaac tgagccggct gcccagccc	720
	ttcttcgata aaaacgtgcg ccagaaaaca gtcateccgt ttgttctggc ccaaaccctc	780
	gatgccgaag tgctgaaggc ctccggaatc ttggccagct ggttcgggca gcaaaccgat	840
	ttccggggtg tgaacttccc cgtcttttca acgatcccc agaccggcaa cgccgtggta	900
	gtgggcgtgg ctgatgaact gccaaagcga ctgggcccgc ctgcatcttc cggctccgacc	960
	ctgatggagg tggccaacc gagcgacct aacggtacca tcttgctggt gacaggccgg	1020
	gaccgcgacg aggtgatcac ggccagcaag ggtattggct tcagcagcag caccctgccg	1080
	gtggccgcac gcatggatgt ggcccctatt gacgtggccc cgagagctcc gaacgatgca	1140
	ccgagcttta tccccacgag ccgcccggtc cgtctgggcg aactggtccc ggttagtgcc	1200
	ctccaagtg aaggctacac accaggcgtc ctctcggtcg ccttccgcac ggcgccgat	1260
	ctgtatacct ggcgtgacc tccatacaaa ttgaatgtgc gcttccgtgc gccggatggc	1320

	cccatcgtgg atctcgcccg ttcacacctg gacgtgggga tcaacaacac gtacctccag	1380
	tcctatagtc tgcacgaaaa agactcgggtg gtggaccaac tcgtgcagcg atttggcggg	1440
	cgtggccaaa cctcaggtgt ccagcagcat accctgacca tccctccctg gatggtgttt	1500
	ggccaggacc agctgcagtt ctacttcgat gccgcgccac taaccagcc gggctgccgc	1560
	ccgggcccgt cgctcatcca catgtccgtt gaccggaca gcaccatcga cctgagtaat	1620
	gcctaccaca tcacacggat gccgaatctg gcctacatgg ctagtgcggg ctacccttc	1680
	accacttacg ccgacctctc ccattccgcc gtggtcctgc cggaccacc caatggcacc	1740
	gtggtgtcgg cgtatctgga tctgatgggc tttatgggcg ccaccacgtg gtaccccgtc	1800
	agcggtttgg acatcgtgtc cgcggatcat gtgaatgatg tggcagaccg gaacttgatt	1860
	gtgctgagta ccctcgccaa ctccaggcag gtcagcagct tgctgtcga tagttcctac	1920
	cagatcgccg atggccggct ccacatgggg atgcgctcta cgttgtccgg cgtgtggaac	1980
	atcttccaag acccgatggc ggccatcaat aacaccacc cgacagaagt ggaaaccacc	2040
	ctgtcgggtg gtgttggcgc gatggtagag gcagaaagtc cgctcgccag cggccgcacc	2100
[0018]	gtgttggcac tgctgagcgc cgatggccag ggcttgaca atttggtaga gatcctgggc	2160
	caacgcaaga accaagcgaa gatccaaggc gatctggtgc tggcacatgg cgacgacctg	2220
	acctcgtatc gtagtagccc gttgtacacc gtgggcacc tgccgatgtg gctcatgccg	2280
	gattggtata tgcacaacca cccggtgcgc gtgatcgtcg tcggcctctt cggctgcttg	2340
	ctttagtcg ccgtgcttgt ccgagccttg ctgcgccacg ctttattccg ccgccggcag	2400
	ctccaggagg agcgacaaaa gtcgtaa	2427
	<210> 14	
	<211> 3975	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> bcsC基因	
	<400> 14	
	atgaatcgtc gctatgtgtt cagcctgtct gcgggcctgc tcgccagtag ctgcatgact	60
	gtgctggtgg cggtagcgtt ggcccgtgct caacaggctt cgaccgcat gactgggacc	120
	caggcgagcg gcggcagcgc tgcaccggg caaatcctgt tgcaacaagc gcgcttctgg	180
	cttcagcagc agcagtagca caacgccgc caggcgttgc agaacgcaca acgctggcg	240

	cccgacgccc cggacgtgct ggaggtgcag ggtgagtatc agaccgctat cggcaaccgc	300
	gaggccgccc ccgacacctt cegtacactg cagcaggtcg ccccgggttc caccgcccgc	360
	aacagcttga gcgacctcct gcatgaacgc tccatcagca ccagtgcact gagccaggtc	420
	cgcagcctgg ccgcctcggg gcataacgcc caagccgtcc agggctacca gaagttgttt	480
	aacgggggta aaccgcccc aagcctcgcg gtggaatatt accaaacctt ggccggcgtc	540
	ccggcggagt gggatcaggc gcgggcgggc ctggctggta tcgtggccag caacccccaa	600
	gattaccacg cccagttggc cttcgcgcag gcgctgcact acaacaccgc caccgtatg	660
	gaaggtctgg cccgactgaa ggacttgcag ggctttcgtt cgcaggcgcc cgtggaagcc	720
	gctgcageta gccagagtta ccgtcagacc ctgagctggc tgccggtcac cccactacc	780
	cagccgttga tgcagcagtg gctggattcc catccgaatg aactgaact tcgcgagcac	840
	atggttcacc ctccgggagg tccccggac aaagcaggtc tggcccgcca ggccggctac	900
	cagcagctga acgcgggccc gattgccgcc gctgagcagt cttccagtc ggcgctgcaa	960
	atcaacagcc acgacgccga ctccctgggt ggcatgggcc tgggtgctgat gcgccaaggc	1020
	gacgcagcag aggcccggcg ttacttccag gaagctatgg ccgccgacc caaaaccgcc	1080
[0019]	gatcgttggc gccctgccct ggcagggatg gagatcagcg gtgactacgc tgccgttcgc	1140
	cagttgatcg cagctacca gtacgatgcc gccaagcaaa ggctgtcggc gctggcacgt	1200
	cagtccggcc aattcaccgg ggcgacgctc atgctcggc acctgcagcg gaccaccggt	1260
	cagatgggcg ccgcagaaca ggagtaccag agcgtactgg cccgggacc taactcacia	1320
	cttgcgctca tgggcttggc ccgcgttgaa atggcgcagg gtaagacagc cgaagcccgt	1380
	caattgctct cccgcgtcgg tagccagtat gctacacaag tcggcgagat cgaagttaca	1440
	ggtttgatgg ccgccgccag ccaaacaagc gactcggcgc gtaaagtaag cattttgcgc	1500
	gaagctatgg cccaggtccc ccgtgatcct tgggtgcgta tcaatttggc gaatgccctt	1560
	cagcaacaag gtgacatggc ggaagcaaac cgcgtgatgc agcctatcct gagcaacca	1620
	gtcaccgctc aagatcgcca agcgggcac ctgttcacat acggtagtgg caacgacgcg	1680
	atgaccgcc gcctgttggc tgggctgtcc ccagaggatt atagtccagc aattcacgcc	1740
	atagctaccg agatggagat caaacaagat ctggccagtc gcctgagcat ggtggcctaac	1800
	ccagtcccat tgattcgaga ggcctgagt cctccggacc ccaccggtgc ccgtggagtc	1860
	gcggtggcgg acctgtttcg ccagcgtggt gacatgatcc atgcccgaat ggctttacgc	1920

	attgctagca cgagaacctt ggacttgagc gctgaccaac gcctggccta cgcgaccgaa	1980
	tacatgaaga tctccaatcc ggtcgccgca gcgaggttat tggccccgct cggggatggt	2040
	agtggaaccg gcgctggcaa cgcactgttg ccggaacagg ttcaaaccct tcaacaactt	2100
	cggatgggga ttgccgtcgc acagtccgat ttgcttaatc agcgtgggga ccaagctcag	2160
	gcctacgacc atttggcccc ggctttgcag gccgacccc aagcgacctc accgaaatta	2220
	gcgctggctc gactctataa tggtcagggg aatcagggga aagctctgga aatcgacttg	2280
	gcggtgctcc gtcacaacct ccaagacttg gacgccagac aagcggcggg gcaagccgcc	2340
	gtcaactccg gccgaaagag tctggcgacg cggctggcta tggacggggg gcaagagagc	2400
	cccatggatg cccgcgcatg gttggccatg gccgtggccg atcaagccga tggacacggc	2460
	catcgtacta tcagtgatct ccggcgcgog tacgatttgc gattgcaaca gtttgagggc	2520
	accctgacg tggcatccgg taccggtgaa caggaaagcc tggaaacccc tagctcgaac	2580
	ccgttccgcc atcacgggta cggccggcag actgagttgg gcgcgcccgt gacaggcggg	2640
	tcgtactcga tggaaagcgc ctcccctgag gcgagtgatc aaatgctgtc cagcatcgcc	2700
	ggccagatca ccaccctgag agagaacctg gcaccctcca tagacggagg cctgggggtc	2760
[0020]	cgttcgcgta gcggcgaaca cggcatgggc cggctgaccg aggcgaacat cccgatcgtc	2820
	gggaggctcc cgctgcagge cggcgaatcc tccctacct tctccatcac cccgacctg	2880
	atctggtcag gccaaactgaa tactggcagc gtttatgacg ttccgcgctt tggcaccgac	2940
	atggccacct aggcatacaa ccagtacgtc agctacatca gccagaataa cagcagcagt	3000
	accctgcact cggagttggt taaggcggg gaagccgaag cgggcttcgc cccggacgtc	3060
	cagttcggca attcgtgggt gcgtgccgac ttgggggcaa gcccgatagg ctttctatc	3120
	acgaacgtac tgggcggtgt ggagttcagc ccccgctgg gacctgtac gttccgtgtc	3180
	agtgcagaac gccgttcgat caccaactct gtcctttcgt acggcggcat gcgcgacccg	3240
	aactacaaca ccacgctggg tcgatatgcc cgccagctgt acggcaaaga actgagctcc	3300
	cagtggagtg aagagtgggg cggcgttgtc accaaccatt ttcatggcca agtggaggcc	3360
	actctgggga acaccatcgt gtacggtggc gggggctacg cgattcaaac cggtaagcac	3420
	gtccagcga atgacgaacg tgaggccggg atcggcgtca acactttggt gtggcacaac	3480
	gccaacatgc tggtcggat aggcgtcagc ctgacctact tcggctatgc gaacaatcaa	3540
	gatttttaca cctacggtca aggcggctac ttctaccgc aatcctacta cgccgctact	3600

gtgccgatcc gctatgccgg ccagcacaag cgcctggact gggatgtcac cggctccgtg 3660  
 ggttaccaag ttttccacga aactctagt cgtttcttcc cgacatcgtc gctgctgcaa 3720  
 tccggcgccc aatacatcgc ggacagctac gtccaaaacg caacctcgtc tgactacctc 3780  
 agtcaggaaa ccgtcaactc cgcctactac ccgggcgaca gcategcctc gttgaccggt 3840  
 ggatttaatg cacgcgtcgg ctaccgcttc acgcacaatc tgcgtctgga cctgagcggg 3900  
 cgggtggcaaa aggccgggaa ctggaccgaa agcgggtgca tgatctccgc ccattacctg 3960  
 atcatggatc agtaa 3975

<210> 15  
 <211> 475  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> bcsD基因

<400> 15  
 atgaccacct tcaatgcaaa acccgacttc tcctgtttc tgcaggccct gagctgggaa 60  
 atcgaatgacc aggccggtat cgaggctcgt aacgatctgc tgcgagaagt ggggcacggc 120  
 atggcggggtc gcttgcaacc tccgctctgc aacaccattc atcaactcca gatcgaactg 180  
 aattccctgt tggccatgat caactggggc tatgtgcaac tggaaactgct gccagaagat 240  
 catgctatgc gtattgtaca cgaggatctg ccccagggtg gctccgccgg cgaaccagcg 300  
 ggcacctggt tggcccctgt cctggaaggt ctgtacggcc gctggatcac ctgcagccg 360  
 ggtgcctttg gcgattatgt ggtcaccgc gacgtcgtg ccgaggacct caatagcgtg 420  
 ccgtcccaaa ccatcact gtacatgcgg acccggtcgt cgtctaacta gatca 475

<210> 16  
 <211> 732  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> gfp基因

<400> 16  
 atgggggagg ttcgatgtc caaaggcgag gaactgttca ctggtgtggt ccccatcttg 60  
 gtggaattgg atggtgatgt taacggccat aagttctcgg tgtcgggtga aggcgagggc 120  
 gacgctacct atggtaaact gactttgaag tttatctgca ccaccggcaa actgcccgtg 180

[0021]

ccttggccga cgctggtgac gaccttcagc tatggagtcc agtgcttctc gcgctacccc	240
gaccacatga aacagcacga tttcttcaag tccgcgatgc cggaggggta tgttcaggag	300
cgtactatct tttacaaaga cgatgggaat tacaagagcc gcgccgaagt gaaattcgaa	360
ggcgatacct tggccaatcg catcgagctg aagggcattg acttcaagga agatggcaac	420
atcctgggtc ataaaatgga atacaactac aacagccaca acgtgtatat catggccgat	480
aaacagaaaa atggcataaa ggtcaacttc aaaatccgtc ataacatcga ggatggcagc	540
gtccagttgg ccgaccacta ccagcagaac actccaattg gcgacggccc cgtcctgttg	600
ccggacaacc actacttgtc aaccagagc gcgctgtcga aagaccccaa tgagaagcgg	660
gatcatatga tccttctgga gttcgtgacg gccgcgggta tcacccatgg catggacgag	720
ctgtacaagt aa	732

<210> 17  
 <211> 2202  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0022] <220>  
 <223> bglAx基因

<400> 17	
atgaaaccga gccgcaaaag ctttctgctc agtgccgtgg catggggcct cgtcgtgccc	60
ctgccggcac acgcccgtca cgctgccacc gctggcgacc cggcggacga tcaggcccg	120
caagttctgg cccatatgtc cctccaagac aagatggccc tgctgttttc tgttgacggc	180
gggggcttta acggcagcgt cgtcccgcct ggcggtcttg gcagcgcgc ctatctccgt	240
gctcctgctg gtagcggcct tccgatctg cagatatccg acgcgggtct ggcggtcgc	300
aaccccgccc acatccgtcc aaatggggcc gctgtgagcc tgccgtccgg cctcgcacc	360
gccagtactt gggatgtcga tatggcacgt caggcaggcg aaatgatcgg gcgcgaagct	420
tggttgagtg gctttaacat cctgctgggt gggggcgccg acctgacacg cgatccccgc	480
ggcgggcgca acttcgagta gcgggtgaa gatccgctgc agacgggtcg catggtcgg	540
agcaccatcg cgggaatcca gtcccagcac gtcatcagca ccttgaacaa ctacgcaatg	600
aacgatctgg aaacgtcacg gatgacgatg tccgccgaca tcgatccggg tgcaatgcgc	660
gaaagcgacc tgctcggctt cgaaatcgct atcgaaaccg gccatcctgg ctcggtgatg	720
tgcagctaca atcgcgtgaa cgacctgtac gcgtgcgaga acccgtacct gctgaacacc	780

accctgaaac aagattggca ttaccgggc tttgtgatgt cggactgggg tgccacccat	840
tccagtgecc gcgcggcggt ggccggtctg gaccaggagt ccgcgggcga ccatgccgac	900
gcacgtccgt acttcaccgc cttgctggcg gccgacgtga aagccggccg cgtaccctg	960
gcccgcattg atgacatggc ccagcgcacg gtccgcagcc tgttcgcggc tggcctggta	1020
gcacatccgc cgcagcgcgg tcctctggat gtcgtgaccg atacactggt ggctcaacgt	1080
gatgaagagg aaggcgccgt gctgctgcgc aacgaaggcg gcacccctgcc cctgagcccg	1140
accgctcgta tcgccgtcat cggcggccat gccgatgcgg gcgtaatctc ggggtgggggt	1200
agtagtcagg tggaccgat tggcggggag gcggttaagg gcccgggtaa aaaggagtgg	1260
ccaggggacc cgggtgattt ccctagctcg ccgctgaaag caatgcgtgc ggaggcggc	1320
aacgcacata ttacctacga gagcgggacc aatatgcag ccgccgtgcg cggcccccg	1380
gccgccgatg ttgccgttgt ttacgcgacc cagttcacct tcgaggggat ggatgccct	1440
agtatgcacc tcgacgctaa cgcggatgca ctgatcaccg ccgttgctgc cgcgaacca	1500
cgaaccgtcg ttgtgatgga aacaggcgac ccggtgctga tgccgtggaa tagctccgtc	1560
gcaggtgtct tggaagcatg gttccctggc tcgggcggcg ggcccgccat cggccgcctg	1620
[0023] ctgtttggca aggtcgcgcc cagcgggcat ctgacgatga cttttccgca ggccgaatcc	1680
caacttgcgc acccagatat agccggcgtg accgctgaca atgtgttcga gatgcagttc	1740
aagaccgatc aggagctggt gtacgatgaa ggcagtgacg tggggtatcg ctggtttgac	1800
cgtaaccacc tgaagccgct gtaccctttc ggctacggtc tgacctacac caccttctcc	1860
accgacggcc ttgcggtgca tcgccaccac gatgcggtca ccgtgacctt caccgtgcac	1920
aacaccggca accgtccagg cgtggatgtc ccgcaagtat acgtggggct gccggacggc	1980
ggtgcacggc gcttagctgg ctggcagcgg gtgtcattgg ctccgggcga gagtcgcct	2040
gtaaccgtcc agttggacce gcgcttggtg gccacttcg acggcaagaa agatcgtg	2100
tccatcccgt ccggtacctt tcgtctgtgg ctggggacct cggccactga cgattcgcag	2160
caggccagtc tgcacttgtc aggccggacc ttcgccccgt ga	2202

<210> 18  
 <211> 14542  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

	<223> 经修饰的微生物	
	<400> 18	
	aaaccaattg tccatattgc atcagacatt gccgtcactg cgtcttttac tggctcttct	60
	cgctaaccaa accgtaacc ccgcttatta aaagcattct gtaacaaagc gggaccaaag	120
	ccatgacaaa aacgcgtaac aaaagtgtct ataatcacgg cagaaaagtc cacattgatt	180
	atttgcacgg cgtcacactt tgctatgcca tagcattttt atccataaga ttagcggatc	240
	ctacctgacg ctttttatcg caactctcta ctgtttctcc ataccggtt tttgggctaa	300
	caggaggaat taacctgct gttggatttt atgaagctgc aaaaacaggt atccggaatg	360
	ggacgtcgtt ctttcctgtc tgctatggcg gcagctggca gtattccttt ctttctacc	420
	gccctggccg cggatgaccc ggccataaac gcgcaatggg ccatcttccg cgccaagtat	480
	ttccaccccg acggccgtat catcgacaca ggcaacagtg gcgaatcca tagcgagggg	540
	cagggtctacg gcatgctttt cgccgcgacg gcgggtgatc aggccacgtt cgaggccatg	600
	tggtcctgga cacgcgcaa cctgcagcac aagaccgatg ccctgttctc ctggcgtat	660
	ctggacgggc ataaccgcc ggtcgcggac aagaacaacg cgacggatgg cgacctgtg	720
[0024]	atagccctgg gtctggtccg tgccggacgg ctgtggaagc gcgctgacta tattcaggat	780
	gctatagcca tctatggcga cgtgtgaag ctcatgacc tgcaggtcgg tcctatctg	840
	gtgctttctg ccggcggcgt ggggtttgcc accaaggatt cggtcacgct caacctgtcc	900
	tattatgtca tgccctcgt catgcaggcc ttccgctga cgggcgacgc acgctggcag	960
	aaggtgatgg gagatggtct gatcatcata aaccaggggc gattcgggga gtggaagctc	1020
	ccgcctgact ggctttcgat caaccgccag aacgggcatt tctccatagc caatggctgg	1080
	ccgcccgat tctctatga tgcgattcgc gtgccgctgt atctttactg ggcgcatatg	1140
	ctgtcgcgg accctgctggc cgactttacc cgcttctgga accatttcgg ggcacggcc	1200
	ctgccgggt ggattgacct gaccaatggt gcccgtcgc cctacaatgc gccaccgggc	1260
	tatctggccg tggcgacatg ttccggcctg tcatccgccc gtgggttgc aacctggac	1320
	aaggcgcgg attattattc ggtgccctg acattgctgg tttatattgc ccgtggtgag	1380
	ggaggtggaa tgtgagcatg gatatggaca atccgcagga cgtgacgcgc atgctctcca	1440
	gcggttatgg cctgagcggg gaggggttcc actaccattc cttcacgcgt cccgtcatgc	1500
	tggacatgac cccggaactg ccccacgatt ccgtggacga tacagagcat catctcgacg	1560
	ataacgtcac cgaacacgaa tccgccccgg caacggcacc ggtgttcgtg ttcgatgcgg	1620

	cacctgagcc tgcggcacca cctgttggtg ccgaggccgc gccaccgcca ctcctccgc	1680
	cgccgccaga gcctgcgct cctgagccgc cgcccgcacc gccaccctat acgccggtg	1740
	taaccacgt gccgccgccc cgcccgtgg aggaaacgcc ggtaccgaa cccgtggctg	1800
	aagcggctgc acctgcaagg ccccggccc tgccgccggc gcagcccgc ccggacatgg	1860
	catcgacggg cgggcgtgaa cggcgcgggc ttcagcctt taccacgccc cgtacgcat	1920
	ccgagccgcc ggtgtcttca cgtgcggccg caccggccac gcccttcgtc caggcagatg	1980
	actgggcgcc ggtgccaaag gcccagcagc gtcgcggcca gcgtccgacc gggcctggtt	2040
	tcttctttgc caaggggaat gaccgggtg cgactgccc gctgttccag ccggtggcag	2100
	tggcccgtcc tgcttccaaa cctgactcca aggtgaccac gatgacaaa ttcgacaaga	2160
	ccgcacagaa tgccccacg gggcgtcgtc ctgcgccatc tgacaattcg ccaacactga	2220
	cggaagtttt catgacactg ggcggtcgtg ccaccgacc gctggtgcc aagcccagcc	2280
	tgcgtgacgc gctgctgcgc aagcgtgagg aagaaaccgg gcaatcctga aatgtcagag	2340
	gttcagtcgt cagcgcgccg ggaaagtgg ttgatcgcc tttccaaca gatactgtca	2400
[0025]	ctgcgcggtg ccagttatat cgttggggca ataggcctgt gcgccctgct tgccgcgacc	2460
	acggttatgc tgcggtaaa tgaacagctg attgtggcat tagtgtgctg tgtggtcttt	2520
	tttatcgtcg gtcggcgcaa aagccgtcg acgcagatat ttctcgaggt gctttcggcg	2580
	ctggtgtccc tgcgttatct gacgtggcgg ctgaccgaaa cactggattt cgatacatgg	2640
	ctccagggta cattgggggt cacgtgctt ctggcggaac tgtacgcgct gtacatgctg	2700
	ttcctcagct atttcagac catttcccc ctgcaccgcg cgccgctgcc cctgtctccc	2760
	aatccggaag actggcccac ggtcgacatc ttcattcccga cctatgacga aagcctgggc	2820
	atcgtgcgtc tgacggtgct gggcgcgctt ggtatcgact ggccaccgga caaggtgaac	2880
	gtctatatcc ttgatgacgg caagcgtgag gaattcgccc gctttgccga agaatgcggt	2940
	gcccgtaca ttgccctcc cgataacgcg catgccaaag ccggtaacct gaactagcc	3000
	attcagcata caagtggcga atacatcctg attctggact gcgatcacat cccgaccctg	3060
	gcgttctcgc agatctcgat gggatggatg gtcgaggaca agaagatcgc cctgatgcag	3120
	accccgcac acttctatc ccccgatcct ttccagcgta acctggccgt cggttaccgc	3180
	accccgcctg aaggcaacct gttctatggt gtcattcagg atggcaacga cttctgggat	3240
	gcgaccttct tctgtggttc ctgtgccatc ctgcgccgca aggccatcga agagatcaat	3300

	ggtttcgc	caa	ccgagaccgt	gacggaagat	gcccataccg	ccctgcgcat	gcagcgcagg	3360
	gggtgg	tcga	ccgctatct	gcgcattccg	ctggccagcg	ggctggcgac	ggagcgcctg	3420
	gtcacgc	ata	tcgggcagcg	tatgcgctgg	gcccgtggca	tgttccagat	cttccgcgtg	3480
	gataat	ccca	tgctggggcc	gggctgaag	ctggggcagc	ggctttgcta	tctttcggcc	3540
	atgacgt	ctgt	tcttcttcgc	cattccgcgt	gtcatcttcc	ttgcctcccc	gctggccttc	3600
	ctttct	tcca	gccagaatat	catcgcggcc	tccccctgg	cgggtgctggc	ctacgccatt	3660
	ccccat	gt	tccattccgt	tgccacggcg	gcaaaggtga	acaagggatg	gcgctattca	3720
	ttctgg	agtg	aagtgtaga	aaccgtcatg	gcgctgttcc	tgggtcgggt	gaccatcgtc	3780
	acgatgat	gt	tcccctcgaa	gggcaagttc	aacgtgacgg	aaaaaggtgg	cgttctggag	3840
	aacgag	gaat	tcgaccttgg	tgccacatat	ccgaacatca	tctttgcggt	catcatggcg	3900
	attggc	ctga	tgccgaggct	gtttgccctg	gccttcagc	atctggacat	aatttcagag	3960
	cgtagc	ctacg	cactcaactg	tgtctggtec	gtgatcagtc	tcatcatcct	gcttgcggcc	4020
	attgcc	gtcg	gccgtgagac	caagcagatc	cgccacagcc	atcgtgtcga	tgcgcgaatt	4080
[0026]	ccggt	aacgg	tttatgatta	cgaagggaat	tccagccatg	gcatcacgca	ggacgtgtcc	4140
	atgggt	gggtg	tgccattca	tatgccgtgg	cgcaatgtga	caccggacca	gccggtgcag	4200
	accgtt	gtcc	acgccgtgct	ggatggtgag	gtggtaaatc	tccccgtac	catgatccgc	4260
	tgtgcg	aatg	gcaaggcgg	ctttacctgg	aacatcacct	ccctcccgat	tgaagcctct	4320
	gtcgtc	ccgg	tcgtgttcgg	tcgcgccgat	gcctggctgc	agtggaatga	ttacgagcat	4380
	gatcgg	ccgt	tgcaagcct	gtggagcctg	atcctcagca	tcaagcgct	gttccgcaag	4440
	aagggt	tcgga	tgatgatcca	tagtcgccc	caaaataaac	ccattgcaact	gcctgttgag	4500
	cgcagg	gagc	caacaagcag	tcagggtggt	cagaaacagg	aaggaaagat	cagtcgtgcg	4560
	gcctcgt	gat	atgaaaatgg	tgtccctgat	cgcgctgctg	gtctttgcaa	cgggagcgc	4620
	ggctgc	gccg	gttgcattca	aagcgcagc	cccgcagcct	gcgggcgata	acctgccgcc	4680
	cctgcc	gcc	gcggcaccgg	ccgccgccc	agccccggcc	gggcagcagc	ctgctggcgc	4740
	cgccagt	gcg	gcacctgccg	tcgatccggc	cgctgccagc	gccgccgatg	ccatggtgga	4800
	caatgc	ggag	aatgcgaccg	gcgtcggttc	ggatgtggcg	accgtgcata	cctattccct	4860
	gcgcg	aactt	ggcgcggaga	acgcgctgac	catgcgtggc	gcggcccccc	tgcaggggct	4920
	gcagtt	cggt	attccgggcg	accagctcgt	cacctcggcg	cggcttgtcg	tgctcgggtgc	4980

	gatgtcacc aatctccagc ccgataacag cgcggtcacg attacgctga acgagcagta	5040
	tatcggcacg ctccggcctg acccgtcaca tccggccttt ggtccgcttt cctttgacat	5100
	caaccccatc ttctttgtca gcggcaaccg gctgaacttc aatttctcgg cagggtcgaa	5160
	aggatgcacc gacccgagca acggattgca gtgggccagc gtgtccgagc attcggaaact	5220
	gcagatcacc accataccgc ttctccccg tcgtcagctg tcgcggtgc cgcagccgtt	5280
	ctttgacaag aacgtaaggc agaagacggc cattccgttc gtccttgac agacatttga	5340
	tgctgaagtg ctcaaggctt ccggcatcct ggcgctctgg ttcggccagc agaccgattt	5400
	ccgcggcgtg aacttccccg tattttccac cattccgcag acaggcaatg ccgttgtggt	5460
	gggtgttgcc gatgaactgc ctccgcgct ggggcgtccg gccatcagcg ggccgaccct	5520
	gatggaagtg gccaacccgt ccgatcccaa tggcacgac ctgctggtaa cgggccggga	5580
	ccgcgatgaa gtcattaccg caagcaaggc cataggcttc agctccagca cgctgccggt	5640
	tgccgcgcgc atggatgtgg cgccgattga cgtggccccc cgcgccccca acgacgcgcc	5700
	gtccttcac ccgaccagcc ggctgtccg gctgggtgaa ctgggtccgg tcagtgcctt	5760
[0027]	gcagggcgaa ggctataccc ccggcgtgct ttccgtggcg ttccgcacgg gcctgacct	5820
	gtatacctgg cgcgaccggc cgtacaagct gaacgtgcgc ttccgggcgc ccgacgggcc	5880
	gatcgtggac ctggcgcgctt cgcactctgga cgttggatc aacaatacct acctgcagtc	5940
	ctattccctg catgaaaagg acagtgtggt cgaccagctg gtccagcgtt ttggcggccg	6000
	gggccagacc agtggcgtgc agcagcatac gctgaccatt ccgccgtgga tgggttcgg	6060
	tcaggatcag ctgcagttct atttgatgc ggccccctg acccagcccg gctgccgtcc	6120
	cggccccagc ctgatccaca tgtcggttga tccggattcc acgatcgacc tgtccaacgc	6180
	ctatcacatc acgcgcatgc ccaatctggc ctacatggcc agcgcggggt atccgttcac	6240
	cacctatgcc gacctgtgc actcggccgt ggtgctgccc gaccatcca atggtacggt	6300
	tgtcagcgc tatcttgacc tgatgggctt catgggggcg acgacgtggt atccgtctc	6360
	gggtctggac atcgtttccg cggatcatgt gaatgatgtg gcggaccgga acctgatcgt	6420
	cctgtccacg ctggccaata gcggggaggc ttctccctg ctgtcgaact cgtcgtacca	6480
	gattgccgac gggcgcctgc acatggggat gcgctccacc ctgagtgggg tgtggaacat	6540
	cttcaggac ccgatggccg ccatcaacaa taccatccg accgaggtcg agacgaccct	6600
	gagcgggtggc gtgggcgcga tgggtggaagc ggaatccccg ctggcatccg gacgcacggt	6660

	tcttgcctg ctctcggctg acgggcaggg gctggacaat ctggtccaga tcctcgggca	6720
	gcgtaagaac caggccaaga ttcagggcga cctgggtgctt gcccatgggg atgacctgac	6780
	atcgtaccgc agttcgcgcc tttataacctg tggcacgctg ccgatgtggc tcatgccgga	6840
	ctggtatatg cataaccatc ccgttcgctg gatcgtggtg gggctgttcg gatgcctgct	6900
	ggttgtggcc gtgctggttc gtgccctggt gcggcatgca ctgttccgcc ggcggcagct	6960
	gcaggaagaa aggcagaaat cgtgagcatg aacagacgct acgtcttttc cttttctgcc	7020
	ggcctgcttg ccagcagttg catgaccgtg ctgggtggcg tgccactggc gcgcgcgacg	7080
	caggcctcca cggccatgac cgttaccag gcttcgggcg ggtcggcggc gccacggcag	7140
	atcctgctgc agcaggcccc gttctggctt cagcagcagc agtatgacaa tgcccgtcag	7200
	gccctgcaga atgcccagcg cgtggcgccg gatgcgccgg atgtcctgga ggtacagggc	7260
	gaataccaga cggcgatcgg caaccgggaa gcggcagccg atacgctgcg ccacctccag	7320
	caggttgcgc ccggcagtac ggccccaac agcctgagtg acctgttgca cgagcgttc	7380
	atctcgacat ccgacctgtc gcaggtgct tcccttgccg catccgggca taacgcgacg	7440
[0028]	gcggtgcagg ggtaccagaa gctgttcaat ggcggtgtaagc cggcgattc gcttgcggtg	7500
	gaatattacc agacctggc aggcgttccg gccgaatggg atcaggcccg ggccgggctt	7560
	gccggtatcg tggcatccaa tccacaggat tatcatgccc agctcgcatt tgcgcaggcg	7620
	ctgacctata atacggcgac ccgtatggaa ggtctggcgc ggctcaagga cctgcagggt	7680
	ttccgcagcc aggctccggt cgaggctgcg gccgccagcc agtcctaccg gcagacgctg	7740
	agctggctgc cggtaacgcc caccacgcag ccgctcatgc agcagtggtt ggatagccat	7800
	cccaatgata ccgaactgcg tgagcatatg gtccaccgc cggcggccc gccggacaag	7860
	gcgggtcttg cgcgtcaggc gggttatcag cagctgaatg ccggccgtat tgccgcagcc	7920
	gagcagtcct tccagtccgc gttacagatc aattcccatg atgccgattc acttggcggc	7980
	atgggactgg tcagcatgcg gcagggtgac gcagccgaag cccgccgcta tttccaggaa	8040
	gcgatggcgg ccgatcccaa gacggcggat cgctggcgcc cggccctggc cggcatggaa	8100
	atcagcggtg actatgccgc ggtccgccag cttattgccc cccaccagta tgatgcggcc	8160
	aagcagcggc tgtccgcgct ggcacgccag tccggccagt ttaccggcgc cacgctcatg	8220
	ctggccgacc tgcagcgcac gaccggccag atgggtgcgg cggagcagga ataccagtcc	8280
	gttctggcac gcgaccgaa cagccagctt gccctgatgg gactggcgcg ggtggagatg	8340

	gcgcagggca agacggcgga agcccgccag ctgctgtcgc gtgtcggatc gcagtatgcg	8400
	accaggtcg gggaaatcga ggtgacgggc cttatggccg ccgcctcgca gacatcggat	8460
	tccgcgcgca aggtctcgat cctgcgcgaa gccatggccc aggcaccgcg tgacccatgg	8520
	gtgcggatca atctggccaa tgccctgcag cagcaggggg acatggcgga agccaatcgg	8580
	gtcatgcagc ccatcctgtc caatcccgtg acggcgcagg accggcaggc cggtatcctg	8640
	tttacctatg gcagtggcaa tgatgcgatg acacgccgcc tgctggctgg cctgtcggcc	8700
	gaggactatt cccccccat ccatgccatt gcgacggaaa tggagatcaa gcaggatctg	8760
	gccagccgcc tgtccatggt ggcgaaaccg gttccgctga tccgtgaagc ctttcgccg	8820
	cccgaccoga cgggcgcgcg tggcgtggcc gtggctgatc tgttccgtca gcgtggcgac	8880
	atgattcatg cccgcattgg cctgcgcatt gcctcgacce gcacgctcga tctttcggcg	8940
	gaccagcgtc tggcctacgc caccgaatac atgaagatca gcaaccgggt tgcggccgcc	9000
	cgctctctgg ccccgtggg tgacggcagt ggcacggggg cgggcaatgc cctgcttccc	9060
	gagcaggtac agacgctgca gcagctgcgc atggggattg ccgtggcca gtccgacctg	9120
[0029]	ctgaaccagc gcggcgatca ggcgcaggca tacgatcacc ttgctccggc cctgcaggcc	9180
	gatccggaag cgacatcgcc caaactggcg ctggcgcggc tttacaatgg tcagggaag	9240
	tccggcaagg cgctggaaat cgatctggcc gtgctgcggc acaaccgca ggatctggat	9300
	gcgcgccagg cagcgggtgca ggtgcccgtc aatagcggcc gcaagagcct ggccaccgc	9360
	cttgccatgg atggtgtgca ggaaagcccg atggatgcgc gtgcctggct ggccatggcc	9420
	gtggccgatc aggccgatgg ccatggccac cggaccatca gtgacctgcg ccgcgcctat	9480
	gacctgcgtc tgcagcaggt ggaaggcacg cgggcgggtg caagcgggac gggtagcag	9540
	gaatcgcttg aacccccgtc cagcaaccg tttcgcacc atggctatgg acgccagacg	9600
	gaactgggcg caccggttac ggggtgctcc tacagcatgg aggcaacgtc tcccgaagca	9660
	tggaccaga tgctgtcctc catcgccggg cagatcacca cgctgcggga aaacctggcc	9720
	ccctccatcg atggcggtct ggggttccgg tcgcttcgg gtgagcacgg catgggccg	9780
	ctgaccgaag cgaacattcc catcgtgggg cgctgccgc tgcaggcggg tgagtccagc	9840
	ctgaccttct cgatcacgcc aacctgatc tggctgggac agctcaatac cggttcggtc	9900
	tatgatgtgc cgcgctttgg caccgacatg gcaacacagg cgtataacca gtacgtcagt	9960
	tacataagcc agaacaattc cagcagcacc ctgcatagcg aacttgtcaa gggtagcgag	10020

	gccgaggccg gttttgcgcc agacgtgcag ttcggcaaca gctgggtgcg ggcggacctg	10080
	ggggcatcgc ccatcggcctt ccccatcacc aacgtactgg gcggtgtgga attctcgcgcg	10140
	cgtgtcggac cggttacctt ccgcgtcagc gcggaacgcc gctccatcac caacagcgtg	10200
	ctgtcctatg gtggcatgcg cgaccccaac tacaacacga cactgggccc ctatgcccgc	10260
	cagctttatg gcaaggagct gagttcccag tggagtgagg aatggggcgg ggtcgtgacc	10320
	aaccacttcc atggtcaggt tgaggcaacg ctgggcaaca ccatcgtata tgggtggcgg	10380
	ggctatgcca tccagaccgg caagcatgtg cagcgcgatg acgagcgcga ggcgggcatc	10440
	ggtgtcaaca cgctggctctg gcacaatgcc aacatgctgg tccgcacatcg tgcagcctg	10500
	acctatctcg gctatgcca caaccaggac ttctatacct acgggcaggg tggctacttc	10560
	tcgccgcaat cctattacgc ggcgaccgta cccatccggt atgcggggca gcacaagcgg	10620
	ctggactggg acgtgacggg cagcgttggc taccaggtgt tccatgaaca ctcgtcccca	10680
	ttcttcccga cgtcttccct gctgcagtct ggcgcgcatg acattgctga ctcgtatgtg	10740
	cagaacgcaa ccagttccga ctatctctca caggagacgg tcaacagcgc ctattatccc	10800
[0030]	ggagatagta ttgctagtct tacgggtggc ttcaatgcta gggtagggta tcgatttaca	10860
	cacaatcttc gtcttgatct gtcggggcgc tggcagaagg ccggtaactg gactgaaagc	10920
	ggcgccatga tttccgcaca ctatcttatt atggaccagt aatgacaact ttcaacgcaa	10980
	aaccggactt ttccctgttc ctgcaggccc tctcctggga gattgatgat caggccggga	11040
	tcgaggtgag gaatgacctg ttgctcgagg tcggtcacgg catggccggt cggctgcagc	11100
	ctccgctgtg caacaccatt catcagctgc agatcgagct gaactcgcctg ctggccatga	11160
	tcaactgggg ctatgtgcag cttgaactgc tgcccagagga ccatgccatg cgcacgtcc	11220
	atgaggacct gcccaggtg ggcagcgcgg gcgagccggc cggcacatgg ctggccccg	11280
	tgctcgaagg gctgtatggc cgctggatca cgctgcagcc ggggtgccttt ggcgattatg	11340
	tcgtcaccgg cgatgtggat gcggaggatc tcaactccgt tcccagccag acgatcatcc	11400
	tgtacatgcg caccgcagc agcagcaact gaagaaggag atatacatat gagtaaagga	11460
	gaagaacttt tcaactggagt tgtccaatt cttgttgaat tagatggtga tgtaaatggg	11520
	cacaaattct ctgtcagtgg agagggtgaa ggtgatgcaa catacggaaa acttaccctt	11580
	aaatttattt gcactactgg aaagetacct gttccatggc caacacttgt cactactttc	11640
	tcttatgggt ttcaatgctt ttcaagatac ccagatcata tgaaacagca tgactttttc	11700

	aagagtgcc	tgcccgaagg	ttatgtacag	gaaagaacta	tattttacia	agatgacggg	11760
	aactacaaat	cacgtgctga	agtcaagttt	gaaggtgata	ccctcgttaa	tagaattgag	11820
	ttaaaaggta	ttgattttaa	agaagatgga	aacattcttg	gacacaaaat	ggaatacaac	11880
	tataactcac	acaatgtata	catcatggca	gacaaacaaa	agaatggaat	caaagttaac	11940
	ttcaaaatta	gacacaacat	tgaagatgga	agcgttcaac	tagcagacca	ttatcaacaa	12000
	aatactccaa	ttggcgatgg	ccctgtcctt	ttaccagaca	accattacct	gtccacacaa	12060
	tctgcccttt	ccaaagatcc	caacgaaaag	agagatcaca	tgatccttct	tgagtttcta	12120
	acagctgctg	ggattacaca	tggcatggat	gaactataca	aataaaagga	ggaacaagcc	12180
	gcatgaaacc	atcccgaag	tcattctctg	tttccgccgt	ggcgtggggg	ctggtggccg	12240
	cgctgcccgc	ccatgcccgc	cacgcggcca	cggctgggtg	cccggccgat	gaccaggcgc	12300
	ggcaggtgct	cgcgcatatg	agccttcagg	acaagatggc	ccttctgttc	agtgtggacg	12360
	ggggcggctt	caatggcagt	gtcgcacctc	cggggggctt	gggttcggcg	gcgtatctgc	12420
	gtgccccggc	gggttcgggc	ctgccggacc	tgcatatc	ggatgcgggg	cttggcgtgc	12480
[0031]	gcaaccccgc	gcatatccgg	cccaatggtg	cggcggttcc	cctgccatcg	ggtctggcca	12540
	cggccagcac	atgggatgtg	gacatggccc	ggcaggcagg	tgaaatgatc	gggcgcgagg	12600
	cctggctgag	cgggttcaac	atcctgctgg	gcggtgggtg	cgacctgacg	cgcgaccccgc	12660
	gtggcggccg	caattttgaa	tatgcggggg	aagacccgct	ccagaccggg	cggatggtgg	12720
	gcagcaccat	tgccggcatc	cagtcgcagc	atgtgatttc	cacgctcaag	cattacgcga	12780
	tgaacgacct	tgagacatcg	cgcatgacca	tgagtgccga	tatcgacccc	gtagccatgc	12840
	gtgagagcga	cctgctgggt	ttcgagattg	cgattgaaac	cgggcatccc	ggttccgtca	12900
	tgtgttcgta	caaccgggtg	aatgacctgt	atgcgtgtga	aaaccggtac	ctgctgaaca	12960
	cgacgctgaa	gcaggactgg	cattaccccg	gctttgtcat	gtccgactgg	ggcgccacgc	13020
	attcctccgc	ccgtgcggcg	ctggcgggac	tggatcagga	atcggtggtg	gaccatgccg	13080
	atgcgcgccc	ctatttcacc	gctctgttgg	cggcggatgt	aaaggcgggg	cgtgtgcccg	13140
	tcgcccgtat	tgacgacatg	gcgacgcgca	ttgtccgctc	cctgttcgcg	gcggggctgg	13200
	tggcccatcc	gccgcagcgc	gggcccgtgg	atgtggtgac	cgacaccctt	gtggcccagc	13260
	gtgatgagga	agaaggcgcg	gttctgctgc	gcaacgaagg	gggtatcctg	ccgtttccc	13320
	ccaccgcgcg	catcgcggtc	attggcgggc	atgccgatgc	gggcgtgatc	tcgggcgggg	13380

	ggtccagcca ggtcgatccc atcgggggtg aggcggtcaa gggaccgggc aagaaggaat	13440
	ggccgggtga tccggtctat ttcccgatcat ccccgtcaa ggccatgcgg gccgaggccc	13500
	ccaacgcgca catcacctat gaatccggca ccaatatcgc cgccgccgtg cgcgccgcgc	13560
	gggcgccga tgtggcggtc gtgtatgcaa cgcagttcac cttcgagggg atggacgcgc	13620
	ccagcatgca ccttgatgcc aatgccgacg cgctgatcac agccgtggcc gcggccaacc	13680
	cgcgtaccgt ggtggtgatg gaaaccggcg acccggtgct catgccatgg aacagcagcg	13740
	ttgcgggctg gctggaggca tggttccccg gttccggcgg tggccggcc attgcacgcc	13800
	tgctgtttgg caaggttgcg ccctcgggcc acctgacat gaccttcccg caggcggaaa	13860
	gccagctggc ccatcccgat attgccggtg tgacggcgga caacgtgttc gagatgcagt	13920
	tcaagaccga tcaggaactg gtctatgacg aaggcagcga cgtgggctac cgctggtttg	13980
[0032]	accgcaacca tctcaagccg ctctatccct tcggttacgg tctgacctac accacgttca	14040
	gcaccgatgg cctggcggtg cacaggcatc atgatgcggt gaccggtacc tttaccgtac	14100
	ataataccgg caaccgcccc ggtgtggatg tgccgcaggt ctatgtgggc ctgcccgatg	14160
	gcggggcacg caggctggcg ggctggcagc gggtcagtct ggcaccgggt gaaagccgtg	14220
	cggtgacggt acagcttgat ccgcgcctgc tggcgcattt tgaccggaag aaggaccgct	14280
	ggagcattcc ttcgggcaca ttccgctgt ggcttggcac gtccgccacg gatgacagcc	14340
	agcaggcaag cctgcacctg tccggtcgca ctttcgcgcc ctgatgcctg gcggcagtag	14400
	cgcggtggtc ccacctgacc ccatgccgaa ctcagaagtg aaacgccgta gcgccgatgg	14460
	tagtgtgggg tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg	14520
	ctcagtcgaa agactgggcc tt	14542

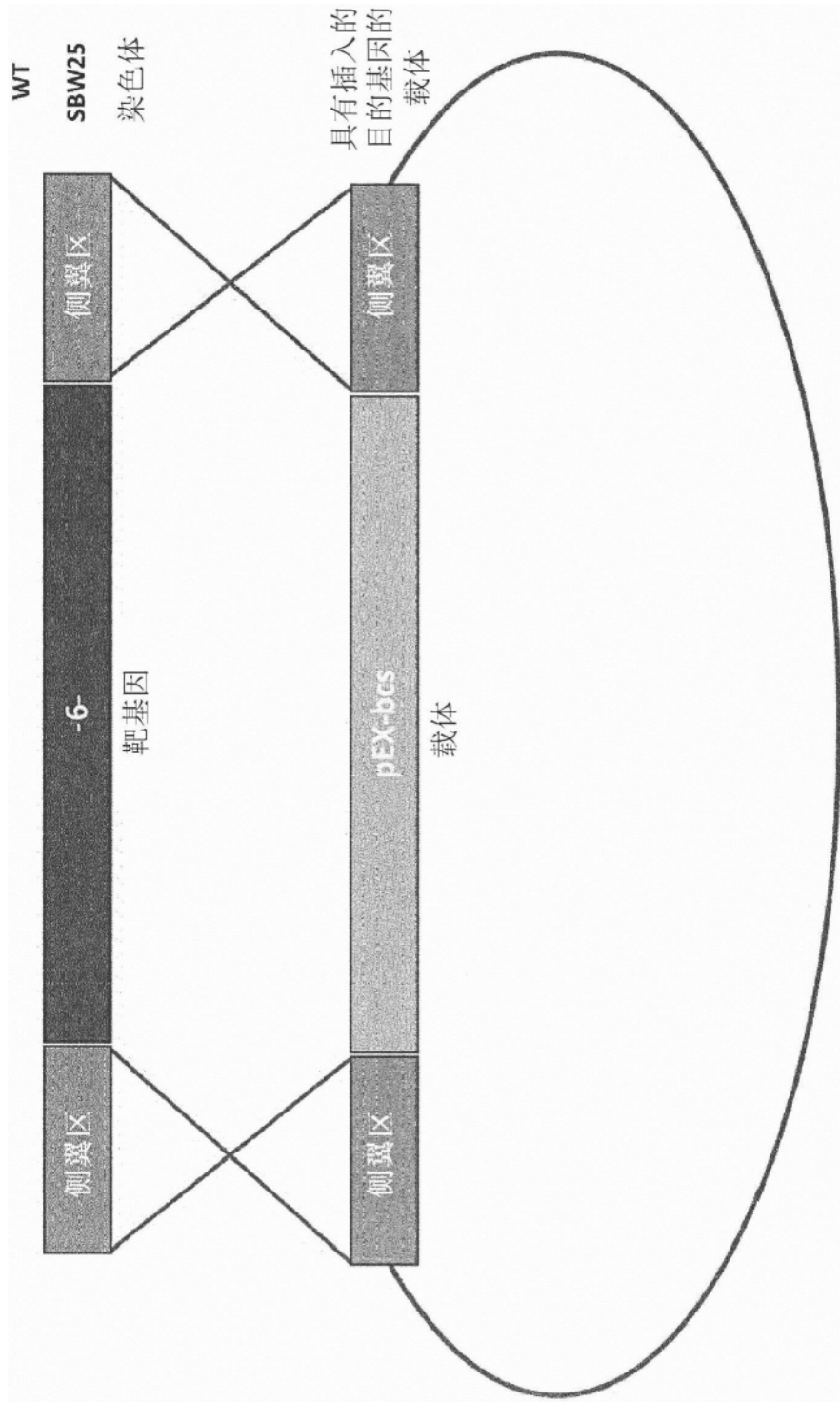


图1

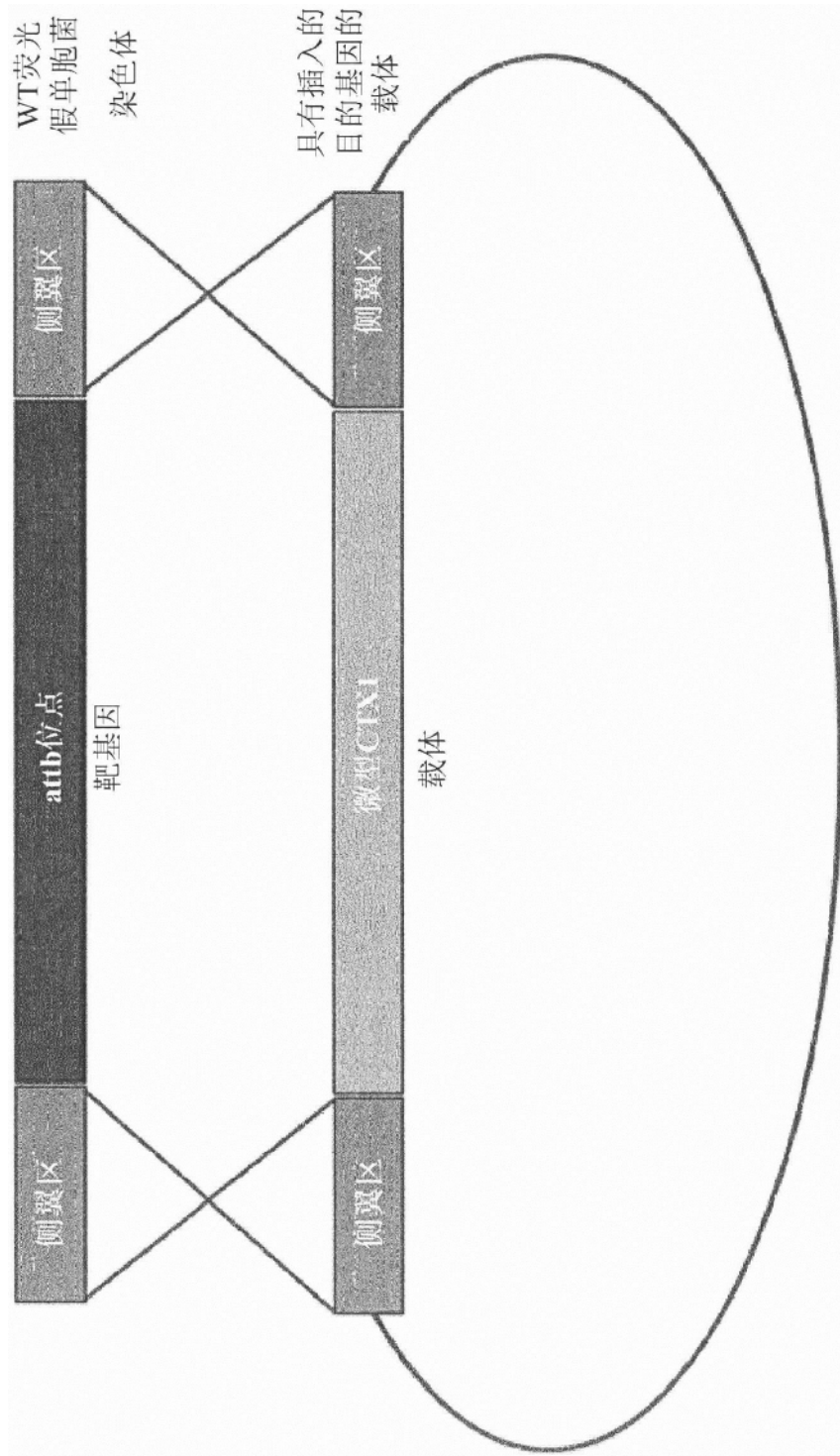


图2



图3

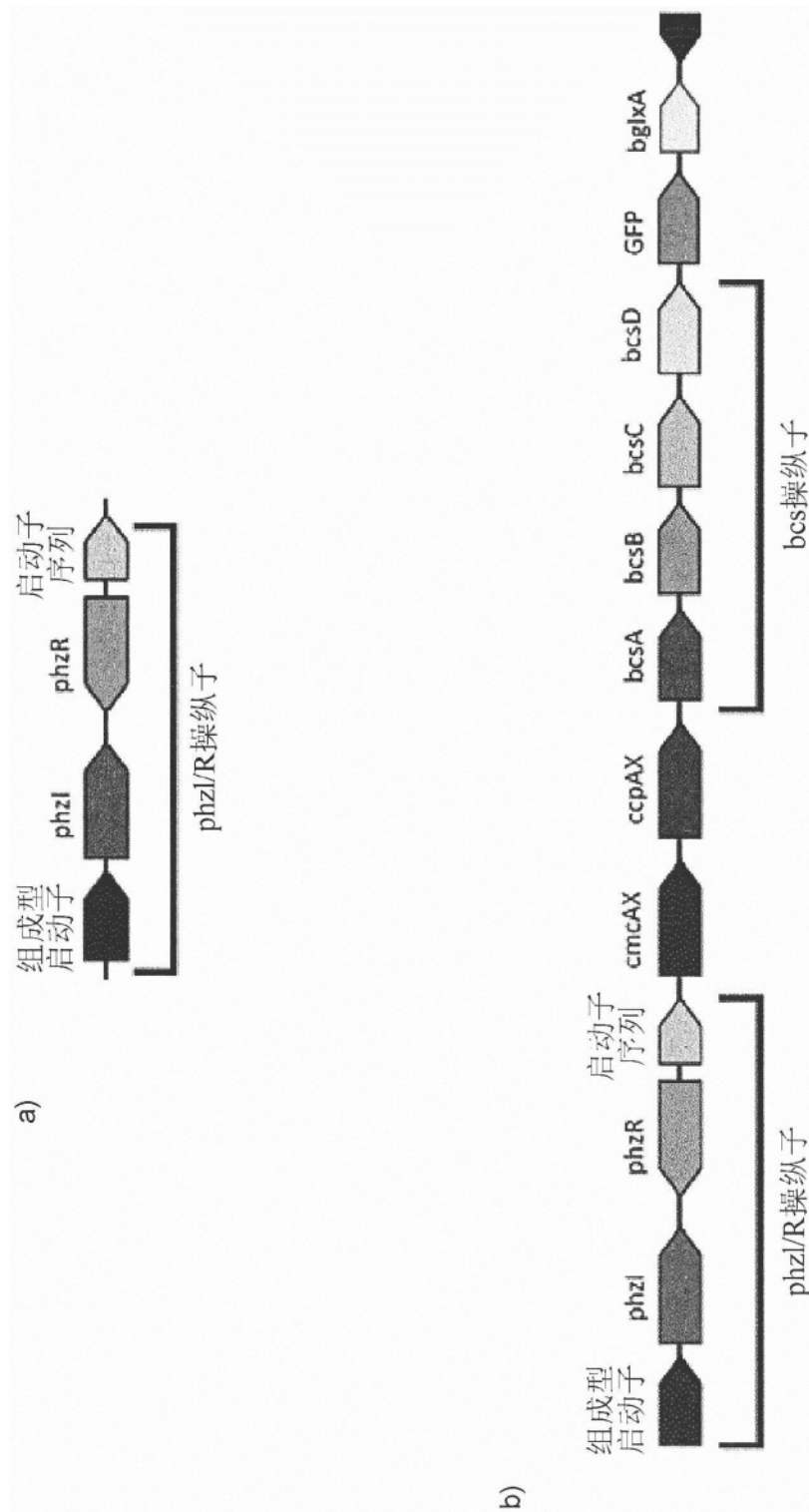


图4

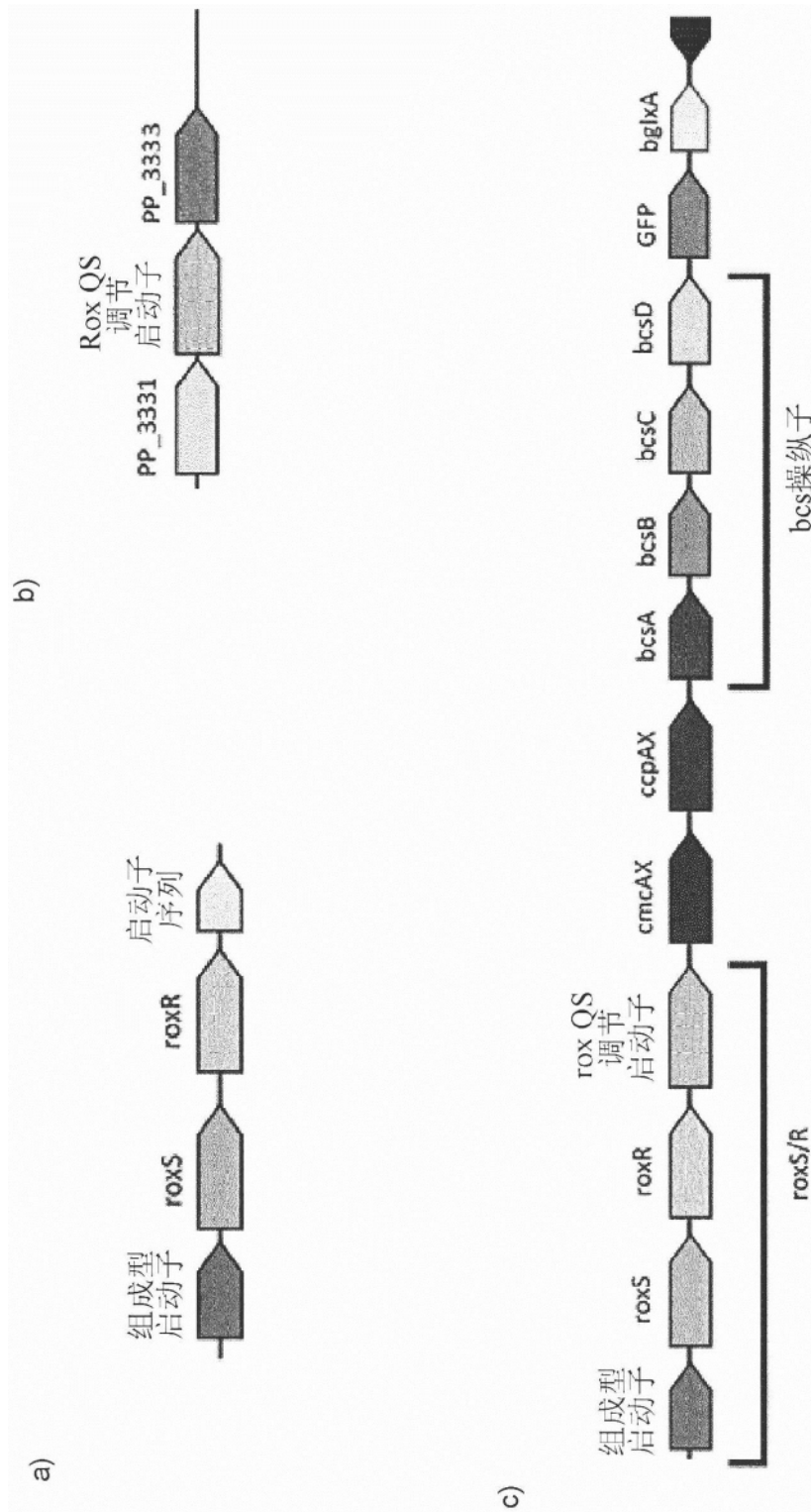


图5