

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710127898.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 9 日

[11] 公开号 CN 101157930A

[22] 申请日 2003.5.30

[21] 申请号 200710127898.9

分案原申请号 03817291.7

[30] 优先权

[32] 2002.5.30 [33] US [31] 60/384,333

[71] 申请人 卡吉尔道有限责任公司

地址 美国明尼苏达州

[72] 发明人 B·豪斯 V·赖格里亚

P·索米宁

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 程 泳

权利要求书 5 页 说明书 51 页 附图 19 页

[54] 发明名称

在酵母中生产 L-乳酸的方法与材料

[57] 摘要

一方面，提供了重组酵母，其具有整合到基因组内的多个外源 LDH 基因，而天然 PDC 基因保持完整。第二方面，提供了重组酵母，其具有整合到其基因组内天然 PDC 基因的基因座处的一个外源 LDH 基因，而该天然 PDC 基因已经删除。该重组酵母在生产乳酸的发酵方法中 useful。

1. 一种用于转化酵母种的细胞之重组核酸，其包含与 LDH 基因上游和下游侧翼序列共价连接的对于该酵母种而言外源的 LDH 基因，该侧翼序列分别与对于该酵母种天然的靶基因的上游和下游侧翼序列同源，并且含有至少一个选择性标记。

2. 权利要求 1 的重组核酸，其中所述 LDH 基因上游的侧翼序列包括与靶基因启动子序列同源的启动子序列，该 LDH 基因下游的侧翼序列包括靶基因的终止序列。

3. 权利要求 2 的重组核酸，其中所述选择性标记与启动子和终止序列有效连接。

4. 权利要求 2 的重组核酸，其中所述靶基因是 PDC 基因。

5. 权利要求 3 的重组核酸，其中所述选择性标记不中断上游侧翼序列、LDH 基因和下游侧翼序列的序列。

6. 权利要求 1 的重组核酸，其中所述外源乳酸脱氢酶基因来自于瑞士乳杆菌 (*L.helveticus*) 或巨大芽孢杆菌 (*B.megaterium*)。

7. 酵母种的一种重组细胞，其中该酵母种在其基因组的基因座内含有靶基因，该细胞具有整合到其基因组内的外源乳酸脱氢酶基因，其处于靶基因的启动子和终止序列的功能部分的转录控制之下，LDH 基因在靶基因的基因座处整合，而该靶基因被从细胞基因组中删除。

8. 权利要求 7 的细胞，其中靶基因是丙酮酸脱羧酶基因。

9. 权利要求 7 的细胞，它是酵母属 (*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、假丝酵母属 (*Candida*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉森酵母属 (*Hansenula*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*) 或 *Yamadazyma* 之一的一个种。

10. 权利要求 9 的细胞，其中所述酵母种是马克斯克鲁维酵母 (*K.marxianus*)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*)、乳酸克鲁维酵母 (*K.lactics*) 或 *C. sonorensis*。

11. 权利要求 8 的细胞，其中乳酸脱氢酶基因来源于瑞士乳杆菌或

巨大芽孢杆菌。

12. 一种将外源乳酸脱氢酶基因整合到细胞内的方法，其中在整合之前，该细胞在其基因组的基因座处含有一个靶基因，该方法包括下列步骤：(a)用一种重组核酸转化该细胞，该核酸具有乳酸脱氢酶(LDH)基因、LDH 基因上游和下游的侧翼序列和至少一个选择性标记基因，该侧翼序列与靶基因上游和下游的侧翼序列同源，使得 LDH 基因在单交换事件中插入该细胞的基因组内，与靶基因的基因座相邻，(b)选择含有 LDH 基因和选择性标记基因的第一种转化子，(c)非选择性培养所述第一种转化子，和(d)在所述第一种转化子中选择含有 LDH 基因但是删除了选择性标记基因和靶基因的第二种转化子。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述 LDH 基因上游的侧翼序列包括与靶基因的启动子序列同源的启动子序列，并且该 LDH 基因下游的侧翼序列包括靶基因的终止序列。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述靶基因是丙酮酸脱氢酶基因。

15. 权利要求 12 的方法，其中所述载体还包含与启动子和终止序列有效连接的标记基因。

16. 权利要求 15 的方法，其中与标记基因有效连接的启动子和终止序列对于该酵母菌株而言不是天然的。

17. 马克斯克鲁维酵母种的一种细胞，其具有整合到其基因组内的多个外源乳酸脱氢酶基因，各自处于功能启动子和终止序列的控制之下，其中该马克斯克鲁维酵母细胞的基因组还含有功能丙酮酸脱羧酶基因。

18. 权利要求 17 的细胞，其中所述功能丙酮酸脱羧酶基因对于马克斯克鲁维酵母而言是天然的。

19. 权利要求 18 的细胞，其中所述功能丙酮酸脱羧酶基因是 PDC1 基因。

20. 权利要求 19 的细胞，其中所述外源乳酸脱氢酶基因来源于瑞士乳杆菌或巨大芽孢杆菌。

21. 权利要求 20 的细胞，其含有多个拷贝的来源于瑞士乳杆菌的

乳酸脱氢酶基因。

22. 权利要求 20 的细胞，其含有来源于巨大芽孢杆菌的乳酸脱氢酶基因的多个拷贝。

23. 权利要求 20 的细胞，其含有来源于瑞士乳杆菌的乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝和来源于巨大芽孢杆菌的乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝。

24. 权利要求 21 的细胞，其中乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝处于 TEF1 启动子的转录控制之下。

25. 权利要求 22 的细胞，其中乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝处于 TEF1 启动子的转录控制之下。

26. 权利要求 21 的细胞，其中乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝处于 PGK 启动子的转录控制之下。

27. 权利要求 22 的细胞，其中乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝处于 PGK 启动子的转录控制之下。

28. 权利要求 21 的细胞，其中乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝处于 GAL10 终止子的转录控制之下。

29. 权利要求 22 的细胞，其中乳酸脱氢酶基因的至少一个拷贝处于 GAL10 终止子的转录控制之下。

30. 权利要求 23 的细胞，其中至少一个乳酸脱氢酶基因处于 TEF1 启动子的转录控制之下。

31. 权利要求 23 的细胞，其中至少一个乳酸脱氢酶基因处于 PGK 启动子的转录控制之下。

32. 权利要求 23 的细胞，其中至少一个乳酸脱氢酶基因处于 GAL10 终止子的转录控制之下。

33. 一种将糖发酵为乳酸的方法，其包括在发酵条件下在含有可被该细胞发酵的糖的培养基中培养权利要求 7 的细胞。

34. 权利要求 33 的方法，其中在整个发酵过程中，培养基的 pH 保持在约 pH 5-约 pH 8 的范围内。

35. 权利要求 33 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，

培养基的 pH 降到约 2.5-约 5.0。

36. 权利要求 34 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，培养基的 pH 降至约 2.5-约 3.8。

37. 权利要求 33 的方法，它还包括将至少一部分乳酸转化为与丙交酯的步骤。

38. 权利要求 37 的方法，它还包括聚合丙交酯形成聚丙交酯聚合物或共聚物的步骤。

39. 一种生产乳酸的方法，包括在发酵条件下在含有可被该细胞发酵的糖的培养基中培养权利要求 7 的细胞。

40. 权利要求 39 的方法，其中在整个发酵过程中，培养基的 pH 保持在约 pH 5-约 pH 8 的范围内。

41. 权利要求 39 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，培养基的 pH 降至约 2.5-约 5.0。

42. 权利要求 41 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，培养基的 pH 降至约 2.5-约 3.8。

43. 权利要求 39 的方法，它还包括将至少一部分乳酸转化为丙交酯的步骤。

44. 权利要求 43 的方法，它还包括聚合丙交酯形成聚丙交酯聚合物或共聚物的步骤。

45. 一种将糖发酵为乳酸的方法，包括在发酵条件下在含有可被该细胞发酵的糖的培养基中培养权利要求 17 的细胞。

46. 权利要求 45 的方法，其中在整个发酵过程中，培养基的 pH 保持在约 pH 5-约 pH 8 的范围内。

47. 权利要求 45 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，培养基的 pH 降至约 2.5-约 5.0。

48. 权利要求 47 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，培养基的 pH 降至约 2.5-约 3.8。

49. 一种生产乳酸的方法，包括在发酵条件下在含有可被该细胞发酵的糖的培养基中培养权利要求 17 的细胞。

50. 权利要求 45 的方法，它还包括将至少一部分乳酸转化为丙交酯的步骤。

51. 权利要求 50 的方法，它还包括聚合丙交酯形成聚丙交酯聚合物或共聚物的步骤。

52. 权利要求 49 的方法，其中在整个发酵过程中，培养基的 pH 保持在约 pH 5-约 pH 8 的范围内。

53. 权利要求 49 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，培养基的 pH 降至约 2.5-约 5.0。

54. 权利要求 53 的方法，其中在发酵过程中由于细胞产生乳酸，培养基的 pH 降至约 2.5-约 3.8。

55. 权利要求 49 的方法，它还包括将至少一部分乳酸转化为丙交酯的步骤。

56. 权利要求 55 的方法，它还包括聚合丙交酯形成聚丙交酯聚合物或共聚物的步骤。

在酵母中生产 L-乳酸的方法与材料

本申请要求对 2002 年 5 月 30 提交的美国临时专利申请号 60/384,333 的优先权。

本发明得到了美国政府的支持，由能源部资助，合同号为 DE-FC-36-00GO10598。美国政府在本发明中有一定的权利。

发明背景

乳酸具有广泛的工业适用性，包括在化学加工和合成、化妆品、制药、塑料和食品生产中的用途。大多数工业规模的生产乳酸的方法都是发酵法。这些发酵方法使用不同的产乳酸细菌。

最近的研究探索了重组酵母株在乳酸发酵方法中的用途。重组酵母与细菌发酵相比可能有几个优点。一些酵母株更能耐受较高的温度。这可能允许更高温度的发酵，这可以翻译成更快的发酵速度。对高温的更好的耐受性能够使清除发酵培养基的污染微生物变得更加容易，因为只需将培养基加热到希望的种能够耐受而不希望的种死亡的温度。产乳酸细菌，如乳酸杆菌，其高效生产需要复杂的发酵培养基。发酵培养基的复杂性增加了原料的成本，并且使得从培养基中分离乳酸更加困难且昂贵。使用重组酵母，通过使用简化的发酵培养基，提供了降低成本的可能性。

另外，有些酵母株比产乳酸细菌更能耐受降低的 pH 条件。这可能是一个非常重要的特征，因为当乳酸产生时，发酵培养基的 pH 自然下降。在常规方法中，必须使用一种碱，如氢氧化钙或碳酸钙，来缓冲培养基，使其 pH 约为 5-8。它中和酸，形成一种乳酸盐。这种乳酸盐在随后的步骤中必须分开，以便以希望的酸的形式回收乳酸盐。因此，需要缓冲发酵培养基导致增加原材料(缓冲剂，一般是硫酸，用来分解乳酸盐)、其它处理步骤(再生游离酸)和废物(最常见的是盐分解步骤产生

的碳酸钙)处理等明显的额外费用。如果发酵能够在低 pH 下进行,则这些费用能够明显减少。因此,成功开发能够耐受低 pH 培养基的产乳酸株是非常希望的。

Porro 及同事构建了一种产乳酸酵母,构建方法是将一种外源 LDH (乳酸脱氢酶)基因插入酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、乳酸克鲁维酵母(*K. lactic*)、*T. delbrueckii* 和 *Z. bailii* 种的酵母细胞内,并破坏细胞的天然丙酮酸途径。参见 Porro 等人,“用于生产乳酸的代谢工程酿酒酵母细胞的研究”, *Biotechnol. Prog.* 1995 May-Jun;11(3):294-8; Porro 等人,“为了由工程酵母大规模生产乳酸,一种代谢途径的替换”, *App. Environ. Microbiol.* 1999 Sep;65(9):4211-5; Bianchi 等人,“用异源 LDH 基因转化的丙酮酸利用缺陷的乳酸克鲁维酵母株的高效同型乳酸发酵”, *App. Environ. Microbiol.* 2001 Dec;67(12) 5621-5。Porro 能够生产一种产乳酸的重组酵母,但是该菌株的表现几乎不足以在任何工业化生产过程中使用。为了获准在工业环境中使用,该菌株必须有良好的乳酸收率(即底物向乳酸的高转化率)和高生产率(即底物向乳酸的快速代谢)。该酵母优选地能够耐受含有高滴度乳酸的培养基。

最近, Rajgarhia 及同事生产了比 Porro 的酵母显示更高收率和生产率的重组酵母。参见,例如 WO 00/71738、WO 02/42471 和 PCT/US02/16223。然而,希望产生收率和/或生产率进一步提高的重组酵母。具体而言,希望产生一种重组酵母株,它在有利于乳酸生产的厌氧和/或微需氧条件下以良好的收率和生产率产生乳酸。

发明概述

一方面,本发明是将外源乳酸脱氢酶基因整合到酵母细胞内的一种方法,其中在整合之前,该细胞在其基因组的一个基因座处具有一个靶定的基因,该方法包括下列步骤:(a)用一种重组核酸转化该细胞,该核酸含有乳酸脱氢酶(LDH)基因、LDH 基因上游(即 5')和下游(即 3')的侧翼序列和至少一个选择性标记基因,该侧翼序列与靶定的基因上游和下游的侧翼序列同源,其中 LDH 基因插入细胞基因组内,与靶定的基因

的基因座相邻, (b)通过在选择剂存在下培养转化细胞, 获得第一种转化细胞, 其含有 LDH 基因和选择性标记基因, (c)在非选择性培养基中培养所述第一种转化细胞, 和(d)由所述第一种转化细胞获得第二种转化细胞, 其含有 LDH 基因, 但是删除了选择性标记基因和靶定的基因。在优选的酵母细胞中, 靶定的基因有利地是丙酮酸脱羧酶(PDC)、醇脱氢酶(ADH)、乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶(*ura3*)和 3-异丙基苹果酸脱氢酶(*leu2*)。

在本发明的这一方面, 选择性标记基因和靶定的基因的删除在一定比例的第一种转化细胞内自发发生。结果, 插入的 LDH 与功能启动子和终止序列有效连接, 后者与靶基因的启动子和终止序列同源。

本发明的第二方面是用于转化一个酵母种的细胞的一种重组核酸, 它含有至少一个选择性标记和对于该酵母种外源的 LDH 基因, 其与 LDH 基因上游(5')和下游(3')的侧翼序列连接, 该侧翼序列分别与对于该酵母种天然的一种基因的上游和下游侧翼序列同源。

本发明的第三方面是一个酵母种的一种重组细胞, 其中该酵母种在其基因组的一个基因座处含有一个天然的靶定的基因。该重组细胞含有外源乳酸脱氢酶(LDH)基因, 该基因整合到基因组内的靶定的基因位点处, 且该靶定的基因已经删除。整合的 LDH 基因与功能启动子和终止序列有效连接, 后者与靶定的基因的启动子和终止序列同源。这些重组酵母细胞在发酵方法中使用, 显示出人意料地高的由碳水化合物底物产生乳酸的收率, 以及高生产率。该重组细胞也能够产生高滴度的乳酸。尽管本发明不局限于任何理论, 但是认为在天然基因的基因座处插入 LDH 基因, 以及使用如此处所述的天然启动子和终止子, 能够使细胞利用现有的基因调节系统, 并且使插入的 LDH 基因起作用。众所周知, 当细胞处于厌氧或微需氧发酵条件下时, 非常有利于产生乳酸的代谢途径。因此, 本发明的第四方面是将碳水化合物发酵为乳酸的一种方法, 包括在发酵条件下在含有可被该细胞发酵的碳水化合物的培养基中培养产生的细胞。

本发明的第五方面是马克斯克鲁维酵母种的一种细胞, 其具有整合

到其基因组内的多个外源乳酸脱氢酶基因，每个基因都在功能启动子和终止序列的控制之下，其中该马克斯克鲁维酵母细胞的基因组还含有一个功能丙酮酸脱羧酶基因。令人惊讶的是，使用这种细胞获得极高的乳酸生产率和收率，以及出乎意料地低的乙醇收率，甚至在低 pH 发酵条件下仍然如此。本发明不局限于任何理论，认为通过使 PDC 途径保持完整，该细胞能够更好地利用现有的代谢途径使其代谢过程保持平衡，有利于细胞的总体健康和生存力。因此，本发明的第六方面是将碳水化合物发酵为乳酸的一种方法，包括在发酵条件下在含有可被该细胞发酵的碳水化合物的培养基中培养所得的细胞。

根据以下某些优选实施方案和权利要求书的更详细描述，本发明的具体的优选实施方案将易于理解。

附图简述

图 1 是显示 pNC2 质粒的图。

图 2 是显示 pNC4 质粒的图。

图 3 是显示 pVR22 质粒的图。

图 4 是显示 pVR29 质粒的图。

图 5 是显示由 pPS1 质粒和 pNC14 质粒构建 pPS9 质粒的图。

图 6 是显示 pVR39 质粒的图，其含有瑞士乳杆菌 L-LDH 基因和 G418 抗性标记。

图 7 是显示 pVR1 质粒的图，其含有瑞士乳杆菌 L-LDH 编码基因序列、酿酒酵母 pTEF1 启动子和大肠杆菌 EM7 启动子。

图 8 是显示 pSO18 质粒的图。

图 9 是显示 pSO19 质粒的图。

图 10 是显示 pSO20 质粒的图。

图 11 是显示 pVR41 质粒的图，其含有瑞士乳杆菌 L-LDH 基因和 G418 抗性标记。

图 12 是显示 pCA3 质粒的图，其含有巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因和 G418 选择性标记。

图 13 是显示 pVR24 质粒的图。

图 14 是显示 pVR38 质粒的图，其含有巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因和潮霉素抗性基因。

图 15a 是显示 pBH5a 质粒构建的图。

图 15b 是显示由 pVR29 和 pBH5a 质粒构建 pBH5b 质粒的图。

图 16 是显示 pBH8 质粒的图。

图 17A 和 17B 是根据本发明的一个方面，可能与外源 LDH 基因定向整合到酵母染色体内有关的遗传事件的示意图。

发明详述

在本发明的前两个方面，一种外源 LDH 基因整合到酵母细胞的基因组内，位于靶定的天然基因的基因座处，且该靶定的天然基因已经删除。该外源 LDH 基因与一个启动子序列和一个终止序列有效连接，这两种序列分别与该靶定的基因的启动子和终止序列同源。

对于本发明，如果一种基因、启动子或终止子(1)未在未修饰细胞的基因组内发现，并且(2)不与未修饰细胞的基因组内存在的遗传物质同源，则认为它们是“外源的”。在此使用时，一种基因、终止子或启动子如果在该酵母种的未修饰细胞的基因组内发现(除了不影响其功能的个体-个体突变之外)，则它们对于该酵母种是“天然的”。

一种基因、启动子、终止子或其它基因组物质，如果在核苷酸序列上与其它遗传物质相同，即具有至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或约 99%的同一性，或者如果不同，而是与之足够相似，从而保持其功能，则认为该基因、启动子、终止子或其它基因组物质与其它遗传物质“同源”。因此，甚至如果遗传物质例如由于点突变、碱基对的缺失或添加而含有不同，只要这些突变、缺失或添加不影响该遗传物质的功能，则认为它们是“同源的”。对于侧翼序列，如果该序列与天然基因的侧翼序列足够相似，以致侧翼序列均能够参与与天然基因侧翼序列的单交换事件，则同源性是确定的。

如本领域所知,术语“同一性”是指两种或多种多肽分子或两种或多种核酸分子的序列之间的关系,通过比较它们的序列确定。在本领域中,“同一性”也指核酸分子或多肽之间的序列相关性(relatedness)的程度,视情况不同,根据两种或多种核苷酸串或两种或多种氨基酸序列之间的匹配确定。“同一性”决定两种或多种序列中的较小序列与通过具体数学模型或计算机程序(即“算法”)进行的缺口比对(如果有的话)之间相同匹配的百分比。

术语“相似性”在本领域中用于一种相关的概念,但是与“同一性”不同,“相似性”是指相关性的量度,包括相同的匹配和保守置换匹配。如果两种多肽序列例如有 10/20 个相同的氨基酸,并且其余的都是非保守置换,则百分同一性和相似性都是 50%。如果在同一个实例中,有 5 个以上的位点是保守置换,则百分同一性仍为 50%,但是百分相似性将是 75% (15/20)。因此,在保守置换的情况下,两种多肽之间的百分相似性将高于这两种多肽之间的百分同一性。

相关核酸和多肽的同一性和相似性能够用已知的方法容易地计算。这些方法包括但不限于以下所述:《计算分子生物学》(Lesk, A.M.编著), 1988, Oxford University Press, New York; 《生物计算:信息学和基因组计划》(Smith, D.W.编著), 1993, Academic Press, New York; 《序列数据的计算机分析》,第 1 部分(Griffin, A.M.和 Griffin, H.G.编著), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., 《分子生物学中的序列分析》, 1987, Academic Press; 《序列分析引物》(Gribskov, M.和 Devereux, J.编著), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo 等人, 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073; Durbin 等人, 1998, 《生物序列分析》, Cambridge University Press。

确定同一性的优选方法是用来获得所测序列之间的最大匹配。确定同一性的方法在可以公开获得的计算机程序中描述。测定两种序列之间同一性的优选计算机程序方法包括但不限于: GCG 程序包, 包括 GAP (Devereux 等人, 1984, Nucl. Acid. Res., 12:387; 遗传学计算机小组 (Genetics Computer Group), University of Wisconsin, Madison, WI)。

BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410)。BLASTX 程序可以从国家生物技术信息中心(NCBI)和其它来源(BLAST 手册, Altschul 等人. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD20894; Altschul 等人, 1990, 同上)公开获得。也可以利用众所周知的 Smith Waterman 算法确定同一性。

用于比对两种氨基酸或多核苷酸序列的某些算法可以使两个序列只有一个短区匹配, 这个小比对区可能具有极高的序列同一性, 尽管这两个全长序列之间没有明显的关系。因此, 在某些实施方案中, 选择的比对方法(GAP 程序)将使比对覆盖靶多肽的至少 50 个连续氨基酸。在某些实施方案中, 这种比对能够包含靶多肽的至少 60、70、80、90、100、110 或 120 个氨基酸。如果利用 GAP 比对多核苷酸, 则这种比对能够覆盖至少约 100、150 或 200 个核苷酸, 它们可能是连续的。

例如, 利用计算机算法 GAP (遗传学计算机小组, University of Wisconsin, Madison, WI), 比对将要测定百分序列同一性的两种多肽的各自氨基酸的最佳匹配(“匹配范围”, 取决于算法)。在某些实施方案中, 开放空位罚分(计算为平均对角线的三倍; 其中“平均对角线”是使用的比较矩阵的对角线的平均值; “对角线”是通过具体比对矩阵归属每个完美氨基酸匹配的得分或数字)和延伸空位罚分(通常为开放空位罚分的十分之一), 以及比较矩阵, 如 PAM250 或 BLOSUM 62, 与该算法一起使用。在某些实施方案中, 该算法也使用一种标准比较矩阵(关于 PAM 250 比较矩阵, 参见 Dayhoff 等人, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352; 关于 BLOSUM 62 比较矩阵, 参见 Henikoff 等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919)。

在某些实施方案中, 一种多肽序列比较的参数包括下列参数:

算法: Needleman 等人, 1970, J. Mol. Biol., 48:443-453;

比较矩阵: BLOSUM 62, 来自 Henikoff 等人, 1992, 同上;

空位罚分: 12

空位长度罚分: 4

相似性阈值: 0

GAP 程序可以使用上述参数。对于核苷酸序列，参数可能包括 50 的空位罚分和 3 的空位长度罚分，每个空位中每个符号的罚分为 3。在某些实施方案中，为了利用 GAP 算法进行多肽比较(末端空位无罚分)，上述参数是缺省参数。

“侧翼序列”是一种基因的上游(即 5')或下游(即 3')的碱基对序列。侧翼序列可以与该基因直接相邻，或者与该基因分开一段适中的碱基对序列，如 1-1000 个，优选地 1-100 个碱基对。本发明的重组核酸中使用的侧翼序列与靶基因的相应侧翼序列同源。侧翼序列的长度足以使其参与与天然基因的相应侧翼序列的单交换事件。有用的侧翼序列的长度为约 50-约 4000 个碱基对，优选地约 100-约 2000 个碱基对，特别是可达约 1200 个碱基对。上游侧翼序列优选地含有靶基因的一个启动子，下游侧翼序列优选地含有一个终止序列。

在优选实施方案中，侧翼序列分别与天然酵母的启动子和终止序列同源或者包含后者。最优选地，重组核酸向酵母基因组染色体 DNA 中靶基因的基因座内的整合使得它们编码的外源 LDH 基因处于包含该侧翼序列的天然基因表达调节序列的转录控制之下。

如此处所用的术语“启动子”是指未转录的序列，它位于一种结构基因的翻译起始密码子的上游(即 5')(通常在约 1-1000 bp 以内，优选地在 1-500 bp 以内，特别是 1-100 bp 以内)，控制一种结构基因的转录起始，或者以其它方式控制该基因的转录。

类似地，术语“终止子”是指未转录的序列，它位于一种结构基因的翻译终止密码子的下游(即 3')(通常在约 1-1000 bp 以内，更一般地在 1-500 个碱基对以内，特别是在 1-100 个碱基对以内)，控制该结构基因的转录终止，或者以其它方式控制该基因的转录。

在本发明内，视情况而定，如果一种启动子或终止子在整合到酵母基因组内后起作用，控制一种结构基因(例如 LDH 基因或选择性标记基因)的转录，则该结构基因与该启动子或终止子“有效连接”。

如此处所用的术语“转化”是指细胞遗传特征的一种变化，当一种细胞被修饰而含有新的核酸时，该细胞被转化。因此，当一种细胞由其天

然状态遗传修饰时, 该细胞被转化。例如, 在转染后, 转化的 DNA 优选地通过物理整合到细胞染色体内与细胞基因组 DNA 重组。此外, 至少是瞬时地(即在细胞转化 48-96 小时内), 核酸能够作为一种附加体元件短暂保持, 而不复制, 或者可以作为质粒独立地复制。当 DNA 整合到染色体内并且随着细胞分裂而复制时, 则认为该细胞已经被稳定地转化。

术语“转染”用来指细胞摄取外来或外源 DNA, 当外源 DNA 被导入细胞膜内时, 该细胞被“转染”。本领域公知大量转染技术。参见, 例如: Graham 等人, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook 等人, 2001, 《分子克隆, 实验室手册》, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis 等人, 1986, 《分子生物学基本方法》, Elsevier; Chu 等人, 1981, *Gene* 13:197。这些技术能够用来将一种或多种外源 DNA 种导入适当的宿主细胞内。

根据本发明第一方面的方法, 产生一种重组核酸, 其含有与侧翼序列连接的一个外源 LDH 基因和至少一种选择性标记。术语“重组核酸”在此是指用来向宿主细胞内转移蛋白质编码信息的任何分子(例如核酸片段、质粒或病毒)。合适的侧翼序列能够如下获得: 确定目标整合位点, 如酵母细胞基因组中的靶基因, 获得位于该位点侧翼的序列(使用任何一种适当的方法, 包括但不限于化学合成、重组遗传技术或体外扩增), 将这些序列掺入重组核酸中希望的位点处(例如, 通过共价连接分别位于 LDH 编码序列 5'和 3'的侧翼序列)。然后利用任何适当的转化技术, 用该重组核酸转化酵母细胞。这样获得细胞, 其中至少一个含有 LDH 基因的重组核酸片段整合到酵母细胞的基因组内。

该重组核酸包含一个或多个选择性标记基因, 它们更优选地处于其自身启动子和终止序列的转录控制之下。标记基因的启动子和终止序列优选地不与靶基因的启动子和终止序列同源。选择性标记基因及其各自的启动子和终止子优选地不打断上游侧翼序列-LDH 基因-下游侧翼序列的序列。选择性标记基因及其各自的启动子和终止子优选地位于载体上 LDH 启动子序列(和其它侧翼序列, 如果存在的话)的上游(5')。

在生产本发明的重组核酸和细胞中以及在实施本发明的方法中有

用的含有 LDH 基因的优选酵母种包括：瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)、乳酸片球菌 (*Pediococcus acidolactici*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、耐热克鲁维酵母 (*Kluyveromyces thermotolerans*)、戴尔有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 和巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)。具体而言，能够分离含有适当 L-乳酸脱氢酶基因的菌株，用来生产本发明的重组核酸。两种优选的 L-乳酸脱氢酶基因是瑞士乳杆菌和巨大芽孢杆菌 L-乳酸脱氢酶。

典型的选择性标记基因编码的蛋白质(a)为宿主细胞提供对抗生素或其它毒素如 zeocin (印度斯坦链异壁菌 (*Streptoalloteichus hindustanus*) 的 ble 博来霉素抗性基因)、G418 (Tn903 的卡那霉素抗性基因)、潮霉素 (来自大肠杆菌的氨基糖甙类抗生素抗性基因)、氨苄青霉素、四环素或卡那霉素的抗性；(b)补充细胞的营养缺陷，如亮氨酸缺陷 (Leu2)；或(c)提供无法从简单培养基中获得的重要养分，例如 ura3。优选的选择性标记包括 Zeocin 抗性基因、G418 抗性基因和潮霉素抗性基因等非限制性实例。

本发明的重组核酸也可以含有一个或多个限制性酶切位点，它们可以使该分子被酶切，形成含有 LDH 基因、启动子和侧翼序列、标记基因和有关启动子和终止子等的线性片段，用于向酵母细胞的基因组内插入。

本发明的重组核酸还可以含有一个骨架部分。骨架部分有利地含有复制起点(在酵母或细菌中有效，允许产生有用的量的核酸)和其它有用的特征，方便地由可商品获得的酵母载体获得。

用本发明的重组核酸转化酵母细胞。转化细胞的方法在本领域中公知，可包括如电穿孔、基于氯化钙或乙酸锂的方法等非限制性实例。转化中使用的本发明的重组核酸能够在使用前用具体限制性内切酶消化，或者不消化。因为 LDH 基因的侧翼序列显示与位于靶基因侧翼的序列高度同源，上游侧翼序列/LDH 基因/下游侧翼序列片段的插入可能在靶基因的基因座处发生。

靶基因是希望用 LDH 基因替换的任何基因。一种优选的靶基因是丙酮酸脱羧酶基因，因为替换该基因可破坏产生乙醇的一个竞争途径。另外，丙酮酸基因在酵母种中倾向于具有活性，因此在 PDC 启动子和终止子控制下向基因组内插入 LDH 基因有助于产生一种良好地表达 LDH 的突变体。其它优选的靶基因有 ADH、Leu2 和 Ura3。

由于用本发明的重组核酸转化酵母细胞，通过在针对选择性标记的选择性培养基中培养选择的重组细胞，并且在非选择性条件下进一步培养选择的转化子，获得含有外源 LDH 基因的重组酵母细胞，该基因中含有整合到酵母染色体靶基因的基因座内的重组核酸。如根据本发明的方法获得的，这些细胞已经删除了靶基因，并且整合的外源 D-LDH 基因插入靶基因的基因座内，使其与靶基因的表达控制序列(如启动子和终止序列)有效连接，并且处于后者的转录控制下。当靶基因是一种 PDC 基因时，发生 PDC 删除的细胞在厌氧条件下不能良好地生长。因此，通过暴露于厌氧条件下能够筛选鉴定并选择的细胞的菌落。不能生长的菌落被鉴定为已经发生 PDC 删除的菌落。类似地，根据与每种靶基因缺失有关的表型能够鉴定向其它任何靶基因内的定向整合。

图 17A 和 17B 显示可以产生这种结果的遗传事件的示意图。如图 17B 所示，选择性标记基因能够与靶基因的删除一起自发地删除。筛选选择性标记基因已经删除的转化子是优选的，因为具有某些特性，如耐药性提高的遗传工程酵母细胞可能产生不希望的环境危险。

产生的酵母细胞丢失了靶基因，含有整合到酵母细胞基因组内，位于靶基因的基因座处的一个外源 D-LDH 基因。LDH 基因处于一个启动子序列和一个终止序列的转录控制下，这两个序列与靶基因的启动子和终止序列同源。

如图 17B 所见，LDH 启动子和终止序列可以是在用来转化细胞的重组核酸所含侧翼序列中存在的序列，或者可以是最初存在于细胞基因组整合位点处的序列。靶基因的终止子保留而整合载体中存在的终止序列缺失也是可能的。

适于在本发明的第一和第二方面进行转化的酵母细胞包括来自下

列属的酵母细胞：假丝酵母属(*Candida*)、酵母属(*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、汉森酵母属(*Hansenula*)。优选不能积累丙酮酸(盐)，即可将丙酮酸(盐)自然代谢为乙醇或其它代谢产物的酵母细胞。来自假丝酵母属和克鲁维酵母属的细胞是特别优选的。特别优选的细胞是 *C. sonorensis* 和马克斯克鲁维酵母。

本发明第五方面的细胞是马克斯克鲁维酵母种的重组细胞。这些细胞一般通过略微不同的转化方法制备，但是上述方法是合适的，只要靶基因不是 PDC 基因。在此情况下，重组核酸并非用于在酵母细胞的天然 PDC 基因的基因座处定向插入。因此，用来转化细胞的载体一般不含与酵母细胞的天然 PDC 基因的侧翼序列高度同源的侧翼序列。

第五方面的细胞一般通过两次或多次转化制备，每次引入一个拷贝的 LDH 基因。然而，也能够构建含有多个 LDH 基因的重组核酸，从而使得多个 LDH 基因能够一步插入。因此，用来转化细胞的一个或多个载体含有一个或多个 LDH 基因，每个均与一个启动子和一个终止子有效连接。如前所述，该一个或多个重组核酸也可以含有多个标记基因，每一个均处于启动子和终止序列的控制之下，它们优选地不是对于酵母细胞天然的 PDC 启动子和终止序列。

合适的 LDH 基因包括以上关于本发明的前三个方面所述的基因。优选瑞士乳杆菌 L-LDH 和巨大芽孢杆菌基因 L-LDH 基因。用多个 LDH 基因，即至少两个这样的基因，优选地约 2-10 个这样的基因，更优选地 2-5 个这样的基因转化这些细胞。插入的 LDH 基因可以全部是相同的基因，或者可以由两种或多种不同类型的 LDH 基因(即来自一个以上的种的基因)组成。优选含有两个或多个拷贝的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因的重组酵母细胞，含有两个或多个拷贝的巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因的重组酵母细胞，以及含有瑞士乳杆菌和巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因各至少一个拷贝的重组酵母细胞。

在形成第五方面的细胞中供 LDH 使用的适当启动子包括用于酵母基因磷酸甘油酸激酶(PGK)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(TDH)、丙酮酸脱羧

酶(PDC)(来自马克斯克鲁维酵母以外的种)、磷酸丙糖异构酶(TPI)、转录增强因子-1(TEF)、嘌呤-胞嘧啶通透酶(PCPL3)和醇脱氢酶(ADH)的启动子。本发明优选的启动子包括酿酒酵母 PGK 启动子和酿酒酵母 PDC1 启动子。

合适的终止子包括来自酿酒酵母或其它酵母种的 GAL10 和 CYC-1 终止子。

合适的选择性标记如本发明前三方面所述。

当以多个步骤进行转化时,细胞首先用至少含有一个 LDH 基因的第一种载体转化。然后通常利用存在选择性标记产生的特性,筛选成功转化的细胞。成功的转化子然后另外转化一次或多次,直到获得最终的细胞,其含有希望的数量和类型的外源 LDH 基因。

转化的本发明的酵母细胞可用于利用一种发酵方法由碳水化合物生产乳酸。发酵能够用任何适当的发酵方法进行。这些细胞一般使用一种含有能够被该细胞代谢为丙酮酸(盐)的碳水化合物的发酵培养基,并且暴露于可以发生发酵的条件下。发酵培养基也含有提高细胞生存力的养分(如氮、磷、硫、痕量无机物等的来源)。

能够使用的具体碳水化合物取决于具体的宿主细胞,以及该宿主细胞是否工程改造为能够将任何一种具体碳水化合物代谢为丙酮酸(盐)。优选己糖,如葡萄糖和果糖,葡萄糖寡聚体,如麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、淀粉和蔗糖,麦芽糊精和木糖(一种戊糖)。次优选的碳水化合物包括半乳糖、甘露糖和阿拉伯糖。

发酵过程中的温度可以是大约室温,更优选地从大约 30℃,更优选地从大约 35℃,到大约 55℃,更优选地大约 50℃,更优选地大约 45℃。最高温度在一定程度上取决于具体的宿主细胞。例如,当宿主细胞是马克斯克鲁维酵母时,(本发明任一方面的)重组细胞能够耐受相对较高的温度(如 40℃以上,可达 50℃,特别是可达 45℃)。另外一个优选的宿主种是 *C. sonorensis*,它能够耐受可达约 40℃的温度。这一温度范围提供了在较高温度下进行发酵的可能性(从而降低了冷却成本),而没有明显的生产率损失。良好的高温耐受的另一个优点是,如果发酵被一种不

希望的微生物污染,则在许多情况下,能够通过将发酵培养基加热到 40℃或以上,特别是 45℃或以上,选择性地杀死这种不希望的微生物,而不会明显损伤本发明的重组细胞。

在发酵过程中,发酵培养基中的细胞浓度一般是约 1-150 克干细胞/升发酵培养基,优选地约 3-10 克干细胞/升发酵培养基,更优选地约 3-6 克干细胞/升发酵培养基。

在发酵的生产阶段,在某些情况下优选地可以微需氧操作,而不是严格厌氧操作。能够为每种微生物建立最佳通气条件,方法是测量氧吸收比速度(OUR),并将该速度与收率、底物消耗率和希望的发酵产物的生产率相关联。在许多情况下,在具体 OUR 范围内优化收率 and 生产率。对于含有 PDC 破坏的酵母,最佳 OUR 值倾向于在约 0.8-约 3.5 mmol O₂/干重细胞/小时的范围内。OUR 是指发酵过程中细胞消耗氧气的速度,表示为每单位时间每细胞干重的氧气单位(摩尔或克),如 mmol O₂/干重细胞/小时。通过测量向发酵中导入的氧气以及从发酵中排出的氧气,可以方便地测定耗氧量。为了使 OUR 保持在对于具体生物最佳的范围内,能够利用 OUR 测量作为在发酵的生产阶段控制通气条件(特别是通气速度、搅拌、通气气体中氧的比例等)的基础。同时培养液中溶解氧的浓度保持在不到饱和量的 1%,特别是不到 10 微摩尔 O₂/L。在一个特别优选的方法中,进行发酵的生长阶段,使得培养液中溶解氧的浓度减少至不到饱和量的 1%,特别是不到 10 微摩尔 O₂/L,保持一段时间,如大约 15-90 分钟,之后开始生产阶段(即从生长阶段的需氧条件转换为生产阶段的微需氧条件)。

当生产乳酸时,发酵培养基的 pH 趋于降低,除非加入一种碱来中和形成的全部或部分酸。在发酵方法的一个实施方案中,向培养液中加入一种中和剂,如碳酸钙、氢氧化钙、碳酸钠、氢氧化钠、氨、氢氧化铵等,使 pH 保持在希望的范围内,一般是约 5.0-约 8.0,特别是约 5.5-约 7.5。当加入这种碱时,形成相应的乳酸盐。因此,乳酸的回收包括再生游离乳酸。实现方法一般包括分离细胞,并用一种强酸(如硫酸)酸化发酵培养液。形成一种盐副产物(如果一种钙盐是中和剂,硫酸是酸

化剂, 则为石膏), 它与乳酸分离。然后通过如液液提取、蒸馏、吸附等技术回收乳酸, 如下所述: T.B. Vickroy, 《综合生物技术》, 第3卷, 第38章 (M. Moo-Young 编著), Pergamon, Oxford, 1985; R. Datta 等人, FEMS Microbiol. Rev., 1995; 16:221-231; 美国专利号 4,275,234、4,771,001、5,132,456、5,420,304、5,510,526、5,641,406 和 5,831,122 和国际专利申请号 WO 93/00440。

此外, 细胞产生乳酸也可以使发酵 pH 降低。因此, 由于乳酸的产生, 发酵培养液的 pH 可以处于约 1.5-约 5.0, 优选地约 1.5-约 4.2, 更优选地约 1.5-约 3.86 (乳酸的 pKa), 特别是约 2.0-不到 3.86 的范围内。如果达到可以接受的生产率和收率, 则这样进行发酵可能具有几个好处。中和剂的成本降低或消除。如果发酵 pH (在发酵结束时) 低于乳酸的 pKa, 则乳酸主要以酸的形式存在。这可以取消酸化步骤, 从而可以省略额外的加工步骤, 节约了酸化成本和盐副产物的处理成本。因此, 一种特别优选的方法包括继续发酵, 直到发酵培养液的 pH 下降到 3.86 以下。能够利用如 WO 99/19290 公开的方法, 从获得的发酵培养液中分离乳酸。

细胞耐受低 pH 环境的能力提供了另外一种机制, 通过这种机制能够清除不希望的微生物的污染。可以将含有本发明的细胞的培养物置于降低的 pH 条件下, 如约 1.5-4.2, 优选地约 2.0-3.86 的 pH, 保持足以杀死不耐酸的污染微生物的一段时间。

为了在商业上有用, 本发明的重组酵母应当显示几个特征。该酵母应当能够将相当比例的碳水化合物转化为乳酸(即产生高产量的产物)。这些酵母细胞应当显示高比生产率, 即每单位时间每细胞重量产生大量的乳酸。这些酵母细胞优选地能够耐受低于约 5.0、优选地约 1.5-4.2、特别是 2.0-3.86 的发酵 pH, 而在这些条件下达到良好的收率和生产率。在 5.0-8.0 的 pH 值, 优选地 1.5-5.0、优选地 1.5-4.2、特别是 2.0-3.86 的 pH 值下, 这些细胞优选地也能耐受高浓度的乳酸。这最后一个特性可以使该发酵方法使用高浓度的起始碳水化合物。

通常希望使用本发明的重组细胞的发酵方法具有下列某些或全部

特征:

A. 收率至少为 30 克乳酸/克碳水化合物, 优选地至少 40 克乳酸/克碳水化合物, 更优选地至少 60 克乳酸/克碳水化合物, 更优选地至少 75 克乳酸/克碳水化合物。希望的理论收率为 100%, 但是收率的实际上限约为 95%。

B. 比生产率至少为 0.1, 优选地至少 0.3, 更优选地至少约 0.4, 特别是至少约 0.5 克乳酸/克细胞/小时。比生产率希望尽可能高。

C. 滴度(乳酸的最大浓度)至少为 15 克/升发酵培养基, 优选地至少 20 g/L, 更优选地至少 40 g/L, 更优选地至少 80 g/L, 可达 150 g/L, 优选地可达约 120 g/L。发酵培养基的温度在一定程度上影响容易达到的滴度的最大范围, 因为高度浓缩的乳酸溶液(即高于约 150 g/L)在低于约 35°C 的温度下倾向于变得极为粘稠或者成为凝胶。使用较高的发酵温度, 如约 35-50°C, 可以获得更高的滴度, 而不会凝胶化或有不当的粘性发生(build-up)。

已经发现, 当对葡萄糖进行中性(pH 5.0-8.0)发酵时, 本发明第三方面的细胞可以达到 85-95%的收率, 0.5-2 g/g/小时的比生产率, 和 80-120 g/L 的滴度。在使 pH 降至约 2.8-3.0 的低 pH 发酵时, 发现本发明第三方面的细胞达到 75-81%或更高的收率, 和 0.1-0.4 g/g/小时的比生产率和 14-40 g/L 的滴度。在所有情况下, 不需优化发酵条件即可获得这些结果。

已经发现, 对葡萄糖进行中性 pH (5.0-8.0)发酵时, 本发明第五方面的细胞(含有多个拷贝的外源 LDH 基因, 并且含有一个完整的天然 PDC 基因)达到 40%以上的收率, 0.4-0.9 g/g/小时的比生产率, 和 40-75 g/L 的滴度。对葡萄糖进行低 pH (终 pH 为 2.8-3.0)发酵时, 本发明第五方面的细胞达到 30%以上的收率, 0.3-0.5 g/g/小时的比生产率, 和 20-35 g/L 的滴度。因此, 第五方面的细胞保持在低 pH 条件下良好发酵的能力。如前所述, 不需优化发酵条件即可获得这些结果。

另外, 本发明的发酵方法优选地达到高容积生产率。“容积生产率”表示为每单位时间每单位体积发酵培养基产生的产物量, 一般是克产物

/升培养基/小时。至少 1.5 g/L/小时，优选地至少 2.0 g/L/小时，更优选地至少 2.5 g/L/小时的容积生产率是希望的。在可达 3-6 克细胞/升发酵培养基的优选细胞密度时，最大生产率趋于可达约 5.0 g/L/小时，更一般地可达约 4.0 g/L/小时。非常优选的是进行发酵，使得当培养基的 pH、温度或这两者都处于上段所述范围内时，达到这些容积生产率。

根据本发明生产的乳酸可以用来生产丙交酯，即两个乳酸分子的一种环酐。根据乳酸的立体异构体不同，丙交酯可以是 D-丙交酯(由两个 D-乳酸分子组成)、L-丙交酯(由两个 L-乳酸分子组成)或 D-L-丙交酯(由 L-乳酸和 D-乳酸分子各一个组成)。由乳酸生产丙交酯的一种适当的方法是通过聚合/解聚方法，如授予 Gruber 等人的 USP 5,142,023 所述。

丙交酯又特别可以作为一种单体用来生产聚丙交酯聚合物(PLA)和共聚物。制备这些聚合物的方法在授予 Gruber 等人的 USP 5,142,023 中也有描述。优选的 PLA 产物是如授予 Gruber 等人的 USP 5,338,822 所述的熔解稳定的聚合物。PLA 可以是半晶体或非晶体。

下列实施例用来说明本发明的某些实施方案，并非限制其范围或精神。

实施例 1A: 基于酿酒酵母 ScPGK1 启动子的表达载体 pNC2 和基于酿酒酵母 PDC1 启动子的 pNC4 的构建

表达载体 pNC2 (图 1)通过在 pGEM5Z(+) (Promega, Wisconsin)骨架载体上组合酿酒酵母 ScPGK1 启动子和酿酒酵母 GAL10 终止子产生。酿酒酵母 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 终止子由一个多接头区隔开，该接头区含有限制酶切位点 XbaI、EcoRI 和 BamHI，用于在酵母启动子与终止子之间插入将要表达的具体基因。

使用的酿酒酵母 ScPGK1 启动子含有下列序列(SEQ ID No.1)

```
5'-GCGGCCGCGG ATCGCTCTTC CGCTATCGAT TAATTTTTTT TTCTTTCCTC
TTTTTATTAA CCTTAATTTT TATTTTAGAT TCCTGACTTC AACTCAAGAC
GCACAGATAT TATAACATCT GCACAATAGG CATTTGCAAG AATTACTCGT
GAGTAAGGAA AGAGTGAGGA ACTATCGCAT ACCTGCATTT
AAAGATGCCG
```

ATTTGGGCGC GAATCCTTTA TTTTGGCTTC ACCCTCATAC TATTATCAGG
GCCAGAAAAA GGAAGTGTTT CCCTCCTTCT TGAATTGATG TTACCCTCAT
AAAGCACGTG GCCTCTTATC GAGAAAGAAA TTACCGTCGC TCGTGATTTG
TTTGCAAAAA GAACAAAACCT GAAAAAACCC AGACACGCTC GACTTCCTGT
CTTCCTATTG ATTGCAGCTT CCAATTTTCGT CACACAACAA GGTCCTAGCG
ACGGCTCACA GGTTTTGTAA CAAGCAATCG AAGGTTCTGG
AATGGCGGGA
AAGGGTTTAG TACCACATGC TATGATGCCC ACTGTGATCT CCAGAGCAAA
GTTTCGTTTCA TCGTACTGTT ACTCTCTCTC TTTCAAACAG AATTGTCCGA
ATCGTGTGAC AACAAACAGCC TGTTCCTACA CACTCTTTTC TTCTAACCAA
GGGGGTGGTT TAGTTTAGTA GAACCTCGTG AAACCTACAT TTACATATAT
ATAAACTTGC ATAAATTGGT CAATGCAAGA AATACATATT TGGTCTTTTC
TAATTCGTAG TTTTCAAGT TCTTAGATGC TTTCTTTTTC TCTTTTTTAC
AGATCATCAA GGAAGTAATT ATCTACTTTT TACAACAAAT CTAGAATT-3'

该序列作为来自被命名为 **pBFY004** 的专利质粒的一条限制酶切片
段获得。此外，也能够以酿酒酵母染色体 DNA 为模板，使用根据 **SEQ**
ID NO:1 设计的引物，通过 **PCR** 扩增获得。

使用的酿酒酵母 **GAL10** 终止子含有下列序列(**SEQ ID NO:2**):

5'-GTAGATACAT TGATGCTATC AATCCAGAGA ACTGGAAAGA TTGTGTAGCC
TTGAAAAACG GTGAAACTTA CGGGTCCAAG ATTGTCTACA GATTTTCCTG
ATTTGCCAGC TTAATATCCT TCTTGAAAAT ATGCACTCTA TATCTTTTAG
TTCTTAATTG CAACACATAG ATTTGCTGTA TAACGAATTT TATGCTATTT
TTTAAATTTG GAGTTCAGTG ATAAAAGTGT CACAGCGAAT TTCCTCACAT
GTAGGGACCG AATTGTTTAC AAGTTCTCTG TACCACCATG GAGACATCAA
AAATTGAAAA TCTATGGAAA GATATGGACG GTAGCAACAA GAATATAGCA
CGAGCCGCGG ATTTATTTTCG TTACGC-3'

该序列作为被命名为 **pBFY004** 的专利质粒的一条限制酶切片
段获得。此外，也能够以酿酒酵母染色体 DNA 为模板，使用根据 **SEQ ID**
NO:2 设计的引物，通过 **PCR** 扩增获得。

构建载体 pNC4, 其含有基于酿酒酵母 PDC1 启动子和 ScGAL10 终止子的表达盒, 用该质粒作为一种通用表达载体。pNC4 载体在图 2 中显示。

pNC4 的载体骨架是 pGEM5Z(+) (Promega Corporation; Madison, WI)。以来源于酿酒酵母 GY5098 株的染色体 DNA 为模板(ATCC 4005098), 使用引物 PSPDCS1 (5'-CCA TCG ATA ACA AGC TCA TGCAAA GAG-3'; SEQ ID No:3)和 PSPDCAS2 (5'-GCT CTA GAT TTG ACT GTGTTA TTT TGCG-3'; SEQ ID No:4), PCR 扩增酿酒酵母 PDC1 启动子。使用 Pfu Turbo DNA 聚合酶(Stratagene)进行热循环: 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72°C 温育 7 min。

酿酒酵母 GAL10 终止子如上所述获得。图 2a(SEQ ID No:37)和 2b(SEQ ID No:38)显示了含有 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 终止子以及多克隆位点, 和含有 ScPDC1 启动子和 ScGAL10 终止子以及多克隆位点的片段。

实施例 1B: pVR22 载体的构建, 其含有与酿酒酵母 PDC1 启动子和 ScGAL10 终止子有效连接的 G418 抗性基因

克隆 G418 抗性标记(一种细菌 neo^R 基因), 将其置于酿酒酵母 PDC1 启动子的转录控制下; 这些构建体被命名为 pVR22 (图 3)。以质粒 pPIC9K (Invitrogen, Carlsbad, CA)为模板, 使用引物 5'-GCT CTA GAT GAG CCA TAT TCA ACG GGA AAC (5'G 片段; SEQ ID No:5) 和 5'-ATG GAT CCT TAG AAA AAC TCA TCG AGC ATC (3'G 片段; SEQ ID No:6), 使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene), PCR 扩增 G418 抗性基因。热循环如下进行: 开始时反应混合物 95°C 温育 5 min, 然后 95°C 30 sec, 49°C 30 sec, 72°C 2 min, 共 35 个循环, 最后 72°C 温育 10 min。PCR 产物用 BamHI 和 XbaI 消化, 分离到一条 821 bp 的片段, 将其与 pNC2 的 4303 bp 的 BamHI-XbaI 片段连接(实施例 1A)。获得的质粒(pVR22; 图 3)含有与 G418 抗性基因有效连接的 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 终止子。

实施例 1C: pVR29 质粒的构建, 其含有与酿酒酵母 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 终止子(pVR29)功能连接的 G418 抗性基因

将 G418 抗性标记(pVR22; 实施例 1B)克隆到 pNC2 (实施例 1A)内, 该构建体被命名为 pVR29 (图 4)。用酿酒酵母 ScPGK1 启动子和酿酒酵母 GAL10 终止子表达该 G418 抗性基因。以质粒 pVR22(实施例 1B)为模板, 使用引物 5'-GCT CTA GAT GAG CCA TAT TCA ACG GGA AAC (5'G 片段; SEQ. ID NO:5)和 5'-ATG GAT CCT TAG AAA AAC TCA TCG AGC ATC (3'G 片段; SEQ. ID NO:6), 用 Pfu 聚合酶 (Stratagene, Madison, WI) PCR 扩增该 G418 抗性基因。此外, 质粒 pPIC9K (Invitrogen, Carlsbad, CA)也能够作为模板。热循环如下进行: 开始时反应混合物 95℃温育 5 min, 然后 95℃ 30 sec, 49℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 共 35 个循环, 最后 72℃温育 10 min。PCR 产物用 BamHI 和 XbaI 消化, 分离一条 821 bp 的片段, 将其与 pNC2 的 4303 bp BamHI-XbaI 片段连接。产生的质粒 pVR29 (图 4)含有与 G418 抗性基因有效连接的 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 终止子。

实施例 1D: 质粒 pPS1(潮霉素抗性盒)、pNC14 (Lh-L-LDH 表达盒)和 pPS9 (用于向基因组内整合 Lh-L-LDH 的载体, 用于生产 L-乳酸, 使用潮霉素抗性作为选择性标记)的构建

制备一种重组核酸, 它使转化的酵母细胞具有潮霉素抗性, 从而允许筛选含有一种重组核酸构建体的酵母细胞转化子, 该构建体编码可用于合成乳酸的蛋白质。能够利用载体 pPS9 (图 5), 通过选择潮霉素抗性, 将瑞士乳杆菌 L-LDH 基因整合到酵母基因组内。

克隆潮霉素抗性标记(大肠杆菌 hph), 使其处于酿酒酵母 PDC1 (丙酮酸脱羧酶)启动子的转录控制下。以质粒 pRLMex30 为模板, 使用引物 5'HYGXBA1 (5'-AAG CTC TAG ATG AAA AAG CCT GAA CTC AC-3'; SEQ ID No:7)和 3'HYGBAMH1 (5'-CGC GGA TCC CTA TTC CTT TGC CCT CGG AC-3'; SEQ ID No:8), PCR 扩增提供潮霉素 B

抗性的大肠杆菌 *hph* 基因(Mach 等人, 1994, *Curr. Genet.* 25,567-570; Rajgarhia 等人, 美国专利申请号 10/154,360, 2002 年 5 月 23 日提交, 在此全文引用作为参考)。也能够以大肠杆菌染色体 DNA 为模板, 使用相同的引物, 获得 *hph* 基因。使用 Pfu Turbo DNA 聚合酶(Stratagene)进行热循环: 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 3 min, 共 30 个循环, 最后 72°C 温育 7 min。在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离 PCR 产物, 分离到 1026 bp 的产物。该 1026 bp 片段然后用 XbaI 和 BamHI 消化, 将其连接到含有酿酒酵母 ScPDC1 启动子和 ScGAL10 终止子的 pNC4 (实施例 1A)的 XbaI-BamHI 片段内, 产生质粒 pPS1 (图 5)。

克隆编码 L-乳酸脱氢酶的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因, 使其处于酿酒酵母 ScPDC1 启动子的转录控制下。以质粒 pSO20 (实施例 1H; 图 10) 为模板, 使用引物 PS15S (5'-GCT CTA GAA TTA TGG CAA GAG AGG AAAAAC-3'; SEQ. ID NO. 9)和 PS16AS (5'-CGG GAT CCT CAT TGA CGA ACC TTAACG-3'; SEQ. ID NO. 10), PCR 扩增编码 L-乳酸脱氢酶的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因。此外, 也能够以瑞士乳杆菌染色体 DNA 为模板, 使用相同的引物, 获得 LDH 基因。使用 Pfu Turbo DNA 聚合酶(Stratagene)进行热循环: 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 3 min, 共 30 个循环, 最后 72°C 温育 7 min。在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离 990 bp 的产物。PCR 产物用 XbaI 和 BamHI 消化, 将其连接到 XbaI 和 BamHI 消化的载体 pNC2 中(实施例 1A), 产生质粒 pNC14 (图 5)。pNC14 用 SalI 和 BsaHI 消化, 产生 LhLDH 表达盒。分离该 LhLDH 表达盒, 将其连接到 pPS1 的 SalI-ClaI 片段内, 产生质粒 pPS9 (图 5)。

实施例 1E: PVR39 质粒的构建, 其含有瑞士乳杆菌 L-LDH 基因和 G418 标记

pPS9 (实施例 1H; 图 5)用 SphI 消化, 用河虾碱性磷酸酶(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)按照厂商所述方案去磷酸化, 产生含有瑞士乳杆菌 LDH 表达盒的片段。pVR29(实施例 1C; 图 4)用 SphI 消化, 利用 0.8%琼脂糖凝胶分离含有 G418 抗性基因盒的 2048 bp 片段。连接

这些片段,获得的质粒 pVR39 (图 6)含有彼此相邻的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因和 G418 抗性基因标记(图 6)。

实施例 1F: pHES 和 pSEH 质粒的构建

按照 PCT 申请 PCT/US/44041 所述,用 0.5 µg 质粒 pGAD424 (如 Chien 等人, 1991, Proc. Natl Acad. Sci. USA 88:9578-9582 所述)构建 pHES 和 pSEH 质粒,用限制性内切酶 HindIII 消化。消化的混合物在 TBE 缓冲液(Biorad, USA)中通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离。然后如 Sambrook 等人(1989,《分子克隆》,第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)所述,从凝胶中纯化 5.9 kbp 片段。设计含有多个限制性内切酶识别位点的 92 bp 合成寡聚物的互补对。第一个被命名为“fwd HES”oligo, 含有下列序列:

5'-CCCAAGCTTGAATTCCCCGG GGGATCCCTG
CAGGGTACCACGCGTAGATC TACTAGTGCG GCCGCCTCGA
GTCTAGAGGGCCCAAGCTTG GG-3' (SEQ. ID NO:11)。第二个被命名为“comp (SO1)(CMA2)hes”oligo, 含有下列序列:

5'-CCAAGCTTGGGCCCTCTAGA CTCGAGGCGG CCGCACTAGT
AGATCTACGC GTGGTACCCT GCAGGGATCC CCCGGGGGAA
TTCAAGCTTG GG-3' (SEQ. ID NO:12)。通过将两种 oligos 在水浴中煮沸 10 分钟(100°C),并逐渐冷却到室温,使 500 nmoles 两种互补寡聚物彼此退火。双链 92 bp DNA 用 HindIII 消化,将其与 HindIII 消化的 pGAD424 (Clontech, USA)的 5.9 kbp 片段连接。如 Sambrook 等人(同上)所述,通过电穿孔,用连接混合物转化大肠杆菌 DH10B (electromax cells, Life Technologies, Rockville, MD)。将重组大肠杆菌接种于 Luria-Bertani 培养基平板(Difco, USA)上,利用 100 µg/ml 氨苄青霉素 (Sigma Chemicals, USA)筛选含有该质粒的细胞。从氨苄青霉素抗性大肠杆菌克隆中筛选质粒 DNA,获得两种质粒 pHES 和 pSEH。这两种质粒在载体上多克隆位点-合成双链寡聚物相对于醇脱氢酶启动子(ADH1)的方向上不同。

实施例 1G: 含有瑞士乳杆菌 L-LDH 的 pVR1 质粒的构建, 用于进一步构建 pSO20 和 pPS9

瑞士乳杆菌 L-LDH 如下所述分离。瑞士乳杆菌细胞从美国模式培养物保藏中心获得(ATCC 保藏号 10797), 并在标准条件下生长。然后使用下列方案从这些细胞中纯化基因组 DNA:

用来自细菌甘油贮存液的单菌落(或 5 mL)接种两个 250 mL 无菌摇瓶, 其中各含有 50 mL 无菌 MRS 培养液(Difco, USA)。培养物在 37°C 和 170 rpm 充分搅拌下培养 48 小时。将培养物转移到 50 mL 无菌蓝帽试管中, 以 3000 rpm 离心 10 分钟。将沉淀悬浮于 50 mL 12.5% w/v 蔗糖溶液中, 再次以 3000 rpm 离心 10 分钟。将新形成的沉淀在 50 mL 无菌蓝帽试管中重悬浮于 5 mL 12.5% w/v 蔗糖中。向试管中加入 5 mL TES 溶液(200 ml TES: 2 ml 1.0 M Tris (pH 8.0), [10 mM Tris (pH 8.0)], 20 ml 500 mM EDTA (pH 8.0), [50 mM EDTA (pH 8.0)], 0.584 g NaCl [50 mM NaCl], 使用前过滤除菌)。向试管中加入 12.5% w/v 蔗糖溶液, 混合。加入 300 mg 溶菌酶粉末(Sigma Chemicals, USA), 混合物以 2000 rpm 振荡 1 分钟。向混合物中加入 25 μ L 变溶菌素溶液(Sigma) (浓度为 2.2 mg/mL), 该混合物在 37°C 下温育过夜(~10-12 小时)。

向混合物中加入 2.5 mL 20% SDS 溶液(Biorad, USA)和 168 μ L 蛋白酶 K 溶液(浓度=28 mg/1.4 mL) (Sigma), 获得的混合物通过颠倒混合, 在 50°C 下温育 1 小时。细胞膜物质较好地破裂, 溶液变为半透明。在试管中用 NaCl 稀释该混合物, 达到 0.15 M 的浓度。

将该混合物转移到一个 50 mL Oakridge 管中, 用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液处理。振荡获得的混合物, 以 10,000 rpm 离心 10 分钟。将水层转移到一个清洁的 Oakridge 管中, 加入等体积的氯仿。然后充分振荡该混合物, 以 5000 rpm 离心 10 分钟。将水层吸到一个新试管中, 加入 25 μ L RNase (100 mg/mL), 颠倒混合。获得的混合物在 37°C 下温育 15 分钟。

沿试管壁向混合物中加入 2.5 倍体积的 EtOH, 但是不混合。收集

在界面处形成的 DNA，在 70% EtOH 中洗涤，混合物以 10000 rpm 离心 10 分钟。在底部形成的沉淀是 DNA，使其风干，在微量离心管中重悬浮于 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 中。该混合物在试管中 50℃ 温育，直到 DNA 进入溶液(~2-3 小时)。

根据 Genbank 中可以获得的瑞士乳杆菌 L-LDH 的序列(Genbank 保藏号 Z81318)设计引物。使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene, WI, USA)进行 PCR 扩增。每个反应体系含有浓度为 500 ng 的瑞士乳杆菌基因组 DNA，浓度各为 0.2 mM 的 4 种 dNTP，和浓度各为 1 μ M 的扩增引物 SO22 5'-CCG GGA TCC ATG GCA AGA GAG GAA AAA CCTC (SEQ. ID NO. 13)和 SO23 5'-CCA AGA TCT TTA TTG ACG AAC CTT AAC GCC AG (SEQ. ID NO. 14)。热循环如下进行：开始时 95℃ 温育 10 min，随后 95℃ 30 sec，41℃ 30 sec，72℃ 60 sec，共 35 个循环。利用常规方法凝胶纯化该反应产生的 990 bp 片段，用限制性内切酶 BamHI 和 BglII 消化，然后将其克隆到 BamHI 和 BglII 消化的 pHES (实施例 1F)中，产生质粒 pLhLDH-HES。获得的序列能够被翻译为一种多肽，该多肽显示与 Genbank 中已知的瑞士乳杆菌 L-LDH 编码基因序列(保藏号 Z81318)有极高的同源性。

设计其它引物，以在瑞士乳杆菌 L-LD 基因的 5'端和 3'端分别引入 NcoI 和 DraIII 限制酶切位点。使用 Pfu 聚合酶(Stratagene, Wisconsin, USA)进行 PCR 扩增反应。每个反应体系含有浓度为 5 ng 的 pLH-LDH/HES，浓度各为 0.2 mM 的 4 种 dNTP，和浓度各为 1 μ M 的扩增引物 VR1 5'-ATC CAT GGC AAG TAT TAC GGA TAA GGA TCA CCAA (SEQ. ID NO. 15)和 VR2 5'-ATC ACG AAG TGT CAC GTA CGG GTT TCG ATG TC (SEQ. ID NO. 16)。热循环如下进行：开始时 95℃ 温育 10 min，随后 95℃ 30 sec，55℃ 30 sec，72℃ 60 sec，共 35 个循环。利用常规方法凝胶纯化该反应产生的 982 bp 片段，用 NcoI 和 DraIII 限制性内切酶消化，将其克隆到 NcoI 和 DraIII 消化的 pTEF1/Zeo (Invitrogen, Carlsbad, CA)中，产生的质粒 pVR1 (图 7)证实含有瑞士乳杆菌 L-LDH 编码基因序列，处于酿酒酵母 pTEF1 启动子控

制下。存在大肠杆菌 EM7 启动子，但是它不是本发明的整合载体的一个必要成分。

实施例 1H: 质粒 pSO20 的构建，其用于在马克斯克鲁维酵母中表达瑞士乳杆菌 L-LDH 质粒

质粒 pSO20 如下构建：将 BamHI (NEB)消化的、河虾碱性磷酸酶处理的(Roche Diagnostics, USA) pUC19 质粒(Life Technologies, USA)与消化 pVRI (实施例 1F)获得的含有瑞士乳杆菌 L-LDH 基因+相邻的启动子和终止序列的 BamHI 片段相连接。产生的质粒为 pSO18 (图 8)。然后用 SphI 消化 pSO18，与 pSPHI 构建体(Chen 等人, 1986, “来自酵母果蝇克鲁维酵母(*Kluyveromyces drosophilarum*)的环形质粒 pKD1 的序列组织”, Nucleic acids Res. 14:4471-4481)的含有 pKD1 骨架的 SphI 片段相连接，产生质粒 pSO19 (图 9)。

pTEF1/Zeo (Invitrogen, Inc)用 XhoI/XbaI 消化，产生酿酒酵母 TEF1 启动子、Zeocin 抗性基因和酿酒酵母 GAL10 终止子。该 1195bp 片段的末端然后用 Pfu DNA 聚合酶(Stratagene, Madison, WI)补平。构建体 pSO19 用 AatII 消化，用 Pfu DNA 聚合酶产生平端，用河虾碱性磷酸酶处理获得的片段。然后将该 9.3 kbp 与含有酿酒酵母 TEF1 启动子、Zeocin 抗性基因和酿酒酵母 GAL10 终止子的 1195bp pTEF/Zeo 片段相连接。产生的构建体是 pSO20 (图 10)。

实施例 1I: 通过转化的 DNA 向马克斯克鲁维酵母基因组内的随机整合，瑞士乳杆菌 L-LDH 基因的引入

通过用 SstI 和 ApaI 消化 pVR39，从该质粒中分离含有瑞士乳杆菌 L-LDH:G418 抗性基因盒的 4.28 kbp 片段。用 0.8%琼脂糖凝胶分离该片段，利用如下所述的电穿孔方案，用该片段转化马克斯克鲁维酵母 (CD21):

用马克斯克鲁维酵母的一个单菌落接种 50 mL YPD 培养基(在 250 mL 带挡板的摇瓶中含有 10 g/L 酵母提取物，20 g/L 蛋白胨，和 20 g/L

葡萄糖, 至 $OD_{600}=0.1$)。培养物在 30°C 和 250 rpm 下温育 16 小时, 直到终 $OD_{600}=10$ 。从 10 mL 培养物中离心收集细胞, 用电穿孔缓冲液(10 mM Tris-Cl, 270 mM 蔗糖, 1 mM MgCl_2 , pH 7.5)洗涤一次。然后将细胞重悬浮于温育缓冲液(YPD + 25 mM DTT, 20mM HEPES, pH 8.0)中, 在 30°C 和 250 rpm 下温育 30 分钟。离心收集细胞, 用电穿孔缓冲液洗涤一次, 将其重悬浮于 1 mL 电穿孔缓冲液中。然后将 400 μL 细胞转移到一个 0.4 cm 的电穿孔杯(BioRad; USA)中。

用 SstI 和 ApaI 消化 pVR39, 将 2 μg 获得的 4.3 kbp 片段加入杯中。然后这些细胞以 1.8 kV, 1000 Ω , 25 μF 电穿孔。将细胞转移到 50 mL 螺帽 Falcon 管中的 1 mL YPD 中, 在 30°C 和 250 rpm 下温育 4 小时, 之后选择性接种于含有 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 YPD 上。这些转化子在 37°C 下生长 3 天。将 G418 抗性转化子在含有 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的新鲜选择平板上重新划线。

使用与瑞士乳杆菌 L-LDH 基因同源的 PCR 引物和与 G418 抗性基因同源的反向引物证实该片段向马克斯克鲁维酵母基因组内的整合。

VR146 5'-GCT GAG TAC CCA GAT TGT AAGGATG-3' (SEQ. ID NO. 17)和 VR143 5'-CTG CCA GCG CAT CAA CAA TAT TTT CAC-3' (SEQ. ID NO. 18)用来在含有该盒的菌株中扩增位于瑞士乳杆菌 L-LDH 与 G418 抗性基因之间的 2.3 kb 的产物。在不含该盒的菌株中, 这些引物不能扩增任何片段。

使用 Taq DNA 聚合酶(Qiagen, USA)对转化子菌落进行热循环: 开始时反应混合物 94°C 温育 2 min, 随后 94°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 3 min, 共 35 个循环, 最后 72°C 温育 7 min。分析的 10 个转化子产生预期的 2.3 kb PCR 产物。使用可与作为探针的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因杂交的 10 个菌株的基因组 DNA 进行 Southern 印迹分析, 所分析的 10 个转化子中有 2 个显示适当的带型, 与来自 pVR39 的一个拷贝的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因的整合相一致。两个菌株中的一个被鉴定为 CD484。

实施例 1J: 通过转化的 DNA 向马克斯克鲁维酵母基因组内的随机

整合，另外一个拷贝的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因的导入

通过用 SstI 和 ApaI 消化 pPS9，从该质粒中分离含有瑞士乳杆菌 L-LDH:HPH 抗性基因盒的 4.7 kbp 片段。用 0.8%琼脂糖凝胶分离该片段，通过电穿孔用来转化马克斯克鲁维酵母 CD484：

用马克斯克鲁维酵母 CD484 的一个单菌落接种 50 mL YPD 培养基(在 250 mL 带挡板的摇瓶中含有 10 g/L 酵母提取物，20 g/L 蛋白胨，和 20 g/L 葡萄糖和 2%琼脂，至 OD₆₀₀=0.1)。培养物在 30℃和 250 rpm 下温育 16 小时，至终 OD₆₀₀=10。从 10 mL 培养物中离心收集细胞，用电穿孔缓冲液(10 mM Tris-Cl, 270 mM 蔗糖，1 mM MgCl₂, pH 7.5)洗涤一次。然后将细胞重悬浮于温育缓冲液(YPD + 25 mM DTT, 20mM HEPES, pH 8.0)中，在 30℃和 250 rpm 下温育 30 分钟。离心收集细胞，用电穿孔缓冲液洗涤一次，将其重悬浮于 1 mL 电穿孔缓冲液中。然后将 400 μ L 细胞转移到一个 0.4 cm 的电穿孔杯(BioRad; USA)中。

用 SstI 和 ApaI 消化 pPS9，将 5 μ g 获得的 4.7 kbp 片段加入杯中。然后这些细胞以 1.8 kV, 1000 Ω , 25 μ F 电穿孔。将电穿孔的细胞转移到 50 mL 螺帽 Falcon 管中的 1 mL YPD 中，在 30℃和 250 rpm 下温育 4 小时，之后选择性接种于含有 200 μ g/mL 潮霉素(Invitrogen, Carlsbad, CA)的 YPD 上。潮霉素抗性转化子在 37℃下生长 3 天。将这些转化子在含有 300 μ g/mL G418 的新鲜选择平板上重新划线，以确保该菌株含有两种抗性基因。

使用与瑞士乳杆菌 L-LDH 基因同源的 PCR 引物以及与潮霉素抗性基因同源的反向引物，证实瑞士乳杆菌 L-LDH:G418 盒的新 4.7 kbp 片段的整合。VR146(SEQ ID NO. 17)和 VR142 5'-GTG ACA CCC TGT GCA CGG CGG GAG ATG-3' (SEQ. ID NO. 19)用来在含有该盒的菌株中扩增位于瑞士乳杆菌 L-LDH 与潮霉素抗性基因之间的 2.3 kb 产物。在不含该盒的菌株中，这些引物不能扩增任何片段。

使用 Taq DNA 聚合酶(Qiagen, USA)进行热循环：开始时反应混合物 94℃温育 2 min，随后 94℃ 30 sec，53℃ 30 sec，72℃ 3 min，共 35 个循环，最后 72℃温育 7 min。使用上述 PCR 分析的 4 个转化子产生

预期的 1.76 kb PCR 产物。

利用与瑞士乳杆菌 L-LDH 基因同源的 PCR 引物以及与 G418 抗性基因同源的反向引物，证实来自马克斯克鲁维酵母 CD484 的 4288 bp 瑞士乳杆菌 L-LDH:G418 基因的存在。VR146(SEQ ID NO. 17)和 VR143 (SEQ. ID NO. 18)用来在含有该盒的菌株中扩增位于瑞士乳杆菌 L-LDH 与 G418 抗性基因之间的 2.3 kb 产物。在不含该盒的菌株中，这些引物不能扩增任何片段。

使用 Taq DNA 聚合酶(Qiagen, USA)进行热循环：开始时反应混合物 94℃ 温育 2 min，随后 94℃ 30 sec，53℃ 30 sec，72℃ 3 min，共 35 个循环，最后 72℃ 温育 7 min。所有 4 个菌株都产生预期的 2.3 kb PCR 产物。

与瑞士乳杆菌 L-LDH 探针杂交的菌株基因组 DNA 的 Southern 印迹分析证明，对于 G418 和潮霉素盒产生阳性 PCR 结果的 4 个转化子也含有插入基因组内的两个拷贝的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因。该菌株被鉴定为马克斯克鲁维酵母 CD492，进一步分析 L-乳酸的产生。

实施例 1K：摇瓶培养物在 YPD+葡萄糖培养基中的 L-乳酸产生

重组菌株 CD492 在一个 250 mL 带挡板的摇瓶中培养，其中含有补充了 100 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD。来自于 YPD 琼脂平板的细胞在 30℃ 和 250 rpm 下温育 16 小时，至 $OD_{600}=0.1$ 。然后利用 YSI 分析检测摇瓶的残余葡萄糖，以确保细胞处于指数生长期。离心收集 4 g/L 细胞干重 (“gcdw”)当量，将其重悬浮于一个 250 mL 带挡板的摇瓶中，其中含有补充了约 100 g/L 葡萄糖和 55 g/L $CaCO_3$ 的 50 mL YPD。该培养物然后在 30℃ 和 70 rpm 下温育。在 0、12、24 小时的时间间隔后采样。通过过滤从样品中除去细胞，通过 HPLC 分析上清液的葡萄糖、乳酸盐、丙酮酸盐和乙醇。在这些条件下，CD492 株产生对映体纯度大于 99% 的 L-乳酸。终滴度为 69 g/L。容积生产率为 3.6 g/L/小时。

为了比较，CD 484 株(实施例 1)在相同条件下培养。与 CD492 所见相比，L-乳酸产量较低，乙醇产量较高。

实施例 1L: 摇瓶培养物在 YPD+葡萄糖培养基中的 L-乳酸产生

492 株在一个 250 mL 带挡板的摇瓶中培养, 其中含有补充了 100 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD。细胞接种到摇瓶中, 至 $OD_{600}=0.1$, 摇瓶在 30℃ 和 250 rpm 下温育 16 小时。终 pH<3.1。然后利用 YSI 分析检测摇瓶的残余葡萄糖, 以确保细胞处于指数生长期。离心收集 4 g/L 细胞干重当量, 将其重悬浮于一个 250 mL 带挡板的摇瓶中, 其中含有补充了约 25 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD。培养物然后在 30℃ 和 70 rpm 下温育。以不同时间间隔采样, 过滤除去细胞。通过 HPLC 分析培养上清液的葡萄糖、乳酸盐、丙酮酸(盐)和乙醇。

产生的 L-乳酸对映体纯度大于 99%。L-乳酸滴度为 15 g/L, 容积生产率为 2 g/L/hr。当在相同条件下检测 CD484 株时, 乳酸产量较低, 而乙醇产量较高。

在一个不同的实验中, 含有 100 mL YPD +100 g/L 葡萄糖的一个 500 mL 带挡板的摇瓶接种 CD492 株, 至 $OD_{600}=0.1$ 。摇瓶在 37℃ 和 250 rpm 下培养约 16 小时。在确保细胞处于指数生长期后, 收集 4 g/L 细胞干重当量。将细胞沉淀重悬浮于 50mL YPD+40 g/L 葡萄糖中, 将其转移到一个 250 mL 带挡板的摇瓶中。该摇瓶置于 37℃ 和 70 rpm 下。在生物质生长结束时, 以及进入生产阶段 0、15、18.5、23 小时, 直到所有葡萄糖消耗光, 采样进行 HPLC 分析。在生产开始和结束时测量 pH。终 pH 为 3.00+/-0.06。

CD 492 株在 15-23 小时内消耗葡萄糖。在生产结束时(当葡萄糖完全消耗光时)采样进行游离酸分析, 并分析总乳酸、乙酸盐、乙醇和丙酮酸盐。CD492 株产生 32 g/L 游离乳酸、32 g/L 乙醇和各 < 1 g/L 的乙酸盐和丙酮酸盐。游离乳酸为 32 g/L。在所有情况下, 在发酵结束时, 质子化形式的酸的百分比至少为 97%。基于葡萄糖的乳酸收率为 59%。

在类似的条件下评价 CD 484 株。它产生 26-28 g/L 游离乳酸, 基于葡萄糖的收率为 46-58%。

实施例 2A: pVR24 质粒的构建, 其含有巨大芽孢杆菌 L-LDH, 用于在酿酒酵母 ScPGK1 启动子控制下表达 L-LDH

编码 L-LDH 基因的巨大芽孢杆菌 DNA 如下分离。巨大芽孢杆菌从美国模式培养物保藏中心获得(ATCC 保藏号 6458), 在标准条件下培养。使用 Invitrogen 的“Easy-DNA”试剂盒, 按照厂商方案, 从这些细胞中纯化基因组 DNA。以可从 Genbank 获得的巨大芽孢杆菌 L-LDH 的序列(Genbank 保藏号 M22305)为基础设计引物。使用 Perkin Elmer 缓冲液 II (1.5 mM MgCl₂)和 AmpliTaq Gold 聚合酶进行 PCR 扩增反应。每个反应体系含有浓度为 6 ng/μL 的巨大芽孢杆菌基因组 DNA、浓度各为 0.2 mM 的 4 种 dNTP 和浓度各为 1 μM 的两种扩增引物 BM1270 和 BM179:

(5' - CCT GAG TCC ACG TCA TTA TTC -3'; SEQ. ID NO. 20)

(5' - TGA AGC TAT TTA TTC TTG TTAC -3'; SEQ. ID NO. 21)

热循环如下进行: 开始时 95°C 温育 10 min, 随后 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 60 sec, 共 35 个循环。利用常规方法凝胶纯化该反应产生的 1100 bp 片段, 克隆, 测序。获得的序列能够被翻译为一种多肽, 该多肽显示与已知 L-LDH 编码基因的同源性, 其中两种序列之间的同源程度至少为 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或大约 99%的序列同一性。

巨大芽孢杆菌 LDH 的编码序列与来自质粒 pNC2 (实施例 1A)的酿酒酵母 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 转录终止子有效连接。两种寡核苷酸引物, 被命名为 Bmeg5'和 Bmeg3', 用来在该基因的编码序列的末端引入限制酶切位点: (5'-GCT CTA GAT GAA AAC ACA ATT TAC ACC-3; SEQ ID No:22)和(5-ATGG ATC CTT ACA CAA AAG CTC TGT CGC-3'; SEQ ID No:23)。

使用上述 dNTP 和引物浓度, 使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene), 在厂商提供的缓冲液中进行扩增反应。热循环如下进行: 开始时反应混合物 95°C 温育 3 min, 随后 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 60 sec, 共 20 个循环, 最后 72°C 温育 9 min。产物用限制性内切酶 XbaI 和 BamHI

消化,然后将其连接到质粒 pNC2(实施例 1A)的 XbaI 和 BamHI 片段内。这种连接产生质粒 pVR24,其含有与巨大芽孢杆菌 LDH 编码序列有效连接的 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 终止子(图 12)。

实施例 2B: 编码巨大芽孢杆菌 L-LDH 的 G418 抗性标记质粒 (pCA3)

修饰从 Invitrogen (Carlsbad, CA)获得的 G418 抗生素选择性标记,将其与来自酿酒酵母的丙酮酸脱羧酶基因启动子和一个转录终止子有效连接。在构建该构建体中,制备下列寡核苷酸,用来从含有 G418 抗性基因插入片段的质粒中扩增编码序列。两种 oligo-寡核苷酸引物 G5' 和 G3'根据该序列设计,用来在该基因编码序列的末端引入限制酶切位点:

5'-AAA TCT AGA TGA GCC ATA TTCAAC GGGA-3'; (SEQ. ID No. 24)和 5'-CCG GAT CCT TAG AAA AAC TCA TCG AGCAT3'; (SEQ. ID No. 25)。

使用 G5'和 G3'引物和所有 4 种 dNTP 和 Pfu Turbo 聚合酶,PCR 扩增来自 pPIC9K 载体(Invitrogen, Carlsbad, CA)的 G418 抗性基因。使用上述 dNTP 和引物浓度,使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene),在厂商提供的缓冲液中进行扩增反应。热循环如下进行:开始时反应混合物 95℃温育 3 min,随后 95℃ 30 sec, 50℃ 30 sec, 72℃ 60 sec, 共 30 个循环,最后 72℃温育 9 min。产物用限制性内切酶 XbaI 和 BamHI 消化,然后将其连接到质粒 pNC4(实施例 1A)的 XbaI 和 BamHI 位点内。

将与酿酒酵母 ScPGK1 启动子和 ScGAL10 终止子有效连接的巨大芽孢杆菌 LDH 基因引入该载体中,位于 G418 基因 ScGAL10 终止子的 3'末端的 SphI 位点处,产生质粒 pCA3(图 13)。

实施例 2C: pVR38 质粒的构建,其含有巨大芽孢杆菌 LDH 基因和潮霉素抗性标记

pVR24 (实施例 2A)用 SphI 消化,并用河虾碱性磷酸酶(Roche

Diagnostics, Indianapolis USA)按照厂商所述方案去磷酸化,产生含有巨大芽孢杆菌 LDH 表达盒的片段。pPSI (实施例 1D)用 SphI 消化,利用 0.8%琼脂糖凝胶分离含有潮霉素抗性基因盒的 2259 bp 片段,将其与去磷酸化的 pVR24 连接。产生的质粒 pVR38(图 14)含有彼此相邻的巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因和潮霉素抗性基因标记。

实施例 2D: 通过转化的 DNA 向马克斯克鲁维酵母基因组内的随机整合,巨大芽孢杆菌 LDH 基因的引入

通过用 SstI 和 ApaI 消化 pCA3,从该质粒中分离含有巨大芽孢杆菌 L-LDH:G418 抗性基因盒的 4.2 kbp 片段。用 0.8%琼脂糖凝胶分离该片段,利用如下所述的电穿孔方案,用该片段转化马克斯克鲁维酵母(CD21)。

用马克斯克鲁维酵母的一个单菌落接种 50 mL YPD 培养基(在 250 mL 带挡板的摇瓶中含有 10 g/L 酵母提取物,20 g/L 蛋白胨,20 g/L 葡萄糖,和 2%琼脂,至 $OD_{600}=0.1$)。培养物在 30°C 和 250 rpm 下温育 16 小时,至终 $OD_{600}=10$ 。从 10 mL 培养物中离心收集细胞,用电穿孔缓冲液(10 mM Tris-Cl, 270 mM 蔗糖,1 mM $MgCl_2$, pH 7.5)洗涤一次。然后将细胞重悬浮于温育缓冲液(YPD + 25 mM DTT, 20mM HEPES, pH 8.0)中,在 30°C 和 250 rpm 下温育 30 分钟。然后离心收集细胞,用电穿孔缓冲液洗涤一次。然后将细胞重悬浮于 1 mL 电穿孔缓冲液中,将 400 μ L 细胞转移到一个 0.4 cm 的电穿孔杯(BioRad; USA)中。

将 2 μ g 来自 pCA3 的 4.2 kbp SstI/ApaI 片段加入杯中,这些细胞以 1.8 kV, 1000 Ω , 25 μ F 电穿孔。然后将细胞转移到 50 mL 螺帽 Falcon 管中的 1 mL YPD 中,在 30°C 和 250 rpm 下温育 4 小时,之后选择性接种于含有 300 μ g/mL G418 的 YPD 上。这些转化子在 37°C 下生长 3 天。将 G418 抗性转化子在含有 300 μ g/mL G418 的新鲜选择平板上重新划线。

使用与巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因同源的 PCR 引物和与 G418 抗性基因同源的反向引物证实该片段向马克斯克鲁维酵母基因组内的整合。

BmLDH3 5'-GTA CGC ATT ACC AAG GCT ATT TTA GAT-3' (SEQ. ID NO. 26)和 VR143 (SEQ. ID NO. 18)用来在含有该盒的菌株中扩增位于巨大芽孢杆菌 L-LDH 与 G418 抗性基因之间的 1.8 kb 产物。在不合该盒的菌株中，这些引物不能扩增任何片段。

使用 Taq DNA 聚合酶(Qiagen, USA)对转化子菌落进行热循环：开始时反应混合物 94℃温育 2 min，随后 94℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 3 min，共 35 个循环，最后 72℃温育 7 min。PCR 分析的 10 个转化子中有 7 个产生预期的 1.8 kb PCR 产物。利用来自 7 个菌株的基因组 DNA 与作为探针的巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因的 Southern 印迹杂交，所分析的 7 个 PCR 阳性转化子中有 2 个显示适当的带型，与来自 pCA3 的一个拷贝的巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因的整合相一致。两个菌株中的一个被鉴定为 CD162。

实施例 2E：通过转化的 DNA 向马克斯克鲁维酵母基因组内的随机整合，另外一个拷贝的巨大芽孢杆菌 LDH 基因的导入

通过用 SstI 和 ApaI 消化 pVR38，从该质粒中分离含有巨大芽孢杆菌 L-LDH:HPH 抗性基因盒的 4.5 kbp 片段。用 0.8%琼脂糖凝胶分离该片段，通过电穿孔用来转化马克斯克鲁维酵母 CD162 株。

用马克斯克鲁维酵母 CD162 的一个单菌落接种 50 mL YPD 培养基(在 250 mL 带挡板的摇瓶中含有 10 g/L 酵母提取物，20 g/L 蛋白胨，和 20 g/L 葡萄糖和 2%琼脂，至 OD₆₀₀=0.1)。培养物在 30℃和 250 rpm 下温育 16 小时，至终 OD₆₀₀=10。从 10 mL 培养物中离心收集细胞，用电穿孔缓冲液(10 mM Tris-Cl, 270 mM 蔗糖，1 mM MgCl₂, pH 7.5)洗涤一次。然后将细胞重悬浮于温育缓冲液(YPD+25 mM DTT, 20mM HEPES, pH 8.0)中，在 30℃和 250 rpm 下温育 30 分钟。离心收集细胞，用电穿孔缓冲液洗涤一次，将其重悬浮于 1 mL 电穿孔缓冲液中。然后将一等份(400 μL)细胞转移到一个 0.4 cm 的电穿孔杯(BioRad; USA)中。

用 SstI 和 ApaI 消化 pVR38，将 5 μg 获得的 4.5 kbp 片段加入电穿孔杯中。然后这些细胞以 1.8 kV, 1000 Ω, 25 μF 电穿孔。将电穿孔的细

胞转移到 50 mL 螺帽 Falcon 管中的 1 mL YPD 中，在 30℃和 250 rpm 下温育 4 小时，之后选择性接种于含有 200 µg/mL 潮霉素(Invitrogen, Carlsbad, CA)的 YPD 上。这些转化子在 37℃下生长 3 天。将潮霉素抗性转化子在含有 300 µg/mL G418 的新鲜选择平板上重新划线，以确保该菌株含有两种抗性基因。

使用与巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因同源的 PCR 引物和与潮霉素抗性基因同源的反向引物证实含有巨大芽孢杆菌 L-LDH:HPH 盒的新 4.5 kbp 片段的整合。BmLDH3 (SEQ. ID NO. 26)和 VR142 (SEQ. ID NO. 19)用来在含有该盒的菌株中扩增位于巨大芽孢杆菌 L-LDH 与潮霉素抗性基因之间的 1.76 kb 产物。在不含该盒的菌株中，这些引物不能扩增任何片段。

使用 Taq DNA 聚合酶(Qiagen, USA)对转化子菌落进行热循环：开始时反应混合物 94℃温育 2 min，随后 94℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 3 min，共 35 个循环，最后 72℃温育 7 min。使用上述 PCR 法分析的 9 个转化子产生预期的 1.76 kb PCR 产物。

使用与巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因同源的 PCR 引物以及与 G418 抗性基因同源的反向引物证实马克斯克鲁维酵母 CD162 株中已经存在的 4.2 kbp 巨大芽孢杆菌 L-LDH:G418 基因的存在。BmLDH3 (SEQ. ID NO. 26)和 VR143 (SEQ. ID NO. 18)用来在含有该盒的菌株中扩增位于巨大芽孢杆菌 L-LDH 与 G418 抗性基因之间的 1.8 kb 产物。在不含该盒的菌株中，这些引物不能扩增任何片段。

使用 Taq DNA 聚合酶(Qiagen, USA)对转化子菌落进行热循环：开始时反应混合物 94℃温育 2 min，随后 94℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 3 min，共 35 个循环，最后 72℃温育 7 min。所有 9 个菌株都产生预期的 1.8 kb PCR 产物。来自这些菌株的基因组 DNA 与作为探针的巨大芽孢杆菌 LDH 杂交的 Southern 印迹分析表明，对于 G418 和潮霉素盒产生阳性 PCR 结果的 9 个转化子中有 7 个也含有插入基因组内的两个拷贝的巨大芽孢杆菌 L-LDH 基因。这些菌株中的一个被鉴定为 CD355。

实施例 2F: 摇瓶培养物在 YPD+葡萄糖培养基中的 L-乳酸产生

重组菌株 CD492 以实施例 1K 所述的通用方法培养。在这些条件下, CD355 株产生对映体纯度大于 99% 的 L-乳酸。终滴度为 52 g/L。容积生产率为 1.5 g/L/小时。

为了比较, CD 162 株在相同条件下培养。与 CD162 所见相比, L-乳酸产量较低, 乙醇产量较高。

实施例 2G: 摇瓶培养物在 YPD+葡萄糖培养基中的 L-乳酸产生

355 株在一个 250 mL 带挡板的摇瓶中培养, 其中含有补充了 100 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD。这些细胞接种到摇瓶中, 至 $OD_{600}=0.1$, 摇瓶在 30°C 和 250 rpm 下温育 16 小时。终 pH<3.1。然后利用 YSI 分析检测摇瓶的残余葡萄糖, 以确保细胞处于指数生长期。然后离心收集 4 g/L 细胞干重当量, 将其重悬浮于一个 250 mL 带挡板的摇瓶中, 其中含有补充了约 25 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD。培养物然后在 30°C 和 70 rpm 下温育。以不同时间间隔采样, 过滤除去细胞。通过 HPLC 分析培养上清液的葡萄糖、乳酸(盐)、丙酮酸(盐)和乙醇。

产生的 L-乳酸对映体纯度大于 99%。L-乳酸滴度为 12 g/L, 容积生产率为 1.9 g/L/小时。当在相同条件下检测 CD162 株时, 乳酸产量较低, 而乙醇产量较高。

实施例 3A: pBH5a/b 质粒的构建, 其用于将 DNA 定向整合到马克斯克鲁维酵母 PDC1 基因座内

将位于马克斯克鲁维酵母丙酮酸脱羧酶(KmPDC1)基因侧翼的 DNA 克隆到载体 pVR29 (实施例 1C)内, 产生一种载体, 用于在 KmPDC1 基因座处进行定向 DNA 整合。产生的构建体被命名为 pBH5b (图 15)。克隆到 pBH5b 的 SbfI 限制酶切位点内的一个基因与马克斯克鲁维酵母启动子和终止子有效连接。

以质粒 pSO21 为模板, 使用引物 5'-Flank5': 5'-CAA GAA GGT ACC CCT CTC TAA ACT TGA ACA-3' (SEQ. ID NO. 27) 和

5'-Flank3': 5'-GTA ATT CCT GCA GGT GCA ATT ATT TGG TTT GG-3' (SEQ. ID NO. 28), PCR 扩增位于马克斯克鲁维酵母 PDC1 直接上游的 DNA 的 1254 bp 片段。热循环如下进行: 开始时反应混合物 94℃ 温育 2 min, 随后 94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1.5 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 温育 7 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶分离 1254 bp PCR 产物。该 PCR 产物和 pVR29 质粒(实施例 1C)均用 KpnI 和 SbfI 消化。消化的 PCR 产物与 5067 bp pVR29 片段连接, 产生 6315 bp pBH5a (图 15)。pBH5a 质粒含有与酿酒酵母 ScPDC1 启动子和 ScGAL10 终止子有效连接的 G418 抗性基因, 和与马克斯克鲁维酵母 PDC1 基因直接上游的 DNA 同源的 DNA 的 1240 bp 片段。

以质粒 pSO21 为模板, 使用引物 **3'-Flank 5': 5'-CCA AGC CCT GCA GGA GAG GGA GAG GAT AAA GA-3' (SEQ. ID NO. 29)**和 **3'-Flank3': 5'- CTC GTA ACG CGT GTA CAA GTT GTG GAA CAA-3' (SEQ. ID NO. 30)**, PCR 扩增位于马克斯克鲁维酵母 PDC1 直接下游的 DNA 的 535 bp 片段。热循环如下进行: 开始时反应混合物 94℃ 温育 2 min, 随后 94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 共 35 个循环, 最后 72℃ 温育 4 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶分离 PCR 产物, 分离到 535 bp 的产物。529 bp PCR 产物用 SbfI 和 MluI 消化, 该片段与 pBH5a 的 SbfI-MluI 片段连接, 产生质粒 pBH5b (图 15)。pBH5b 质粒含有位于马克斯克鲁维酵母 PDC1 基因直接上游的 1.2 kb DNA 和直接下游的 0.5 kb DNA, 在侧翼 PDC1 序列之间有一个唯一的 SbfI 位点, 以及与酿酒酵母 ScPDC1 启动子和 ScGAL10 终止子有效连接的选择性 G418 抗性标记。

实施例 3B: pBH8 质粒的构建, 其用于将瑞士乳杆菌 L-LDH 基因定向整合到马克斯克鲁维酵母的 KmPDC1 基因座内

将来自瑞士乳杆菌的 L-乳酸脱氢酶基因克隆到 pBH5b (实施例 3A) 的 SbfI 位点内, 产生一种载体, 该载体能够将瑞士乳杆菌 L-LDH 整合到马克斯克鲁维酵母的 KmPDC1 基因座内, 并且使用内源马克斯克鲁

维酵母 KmPDC1 启动子和终止子表达瑞士乳杆菌 L-LDH。

以 pPS9 (实施例 1D)为模板, 使用引物 L-LDH 5': 5'-ACA AAT CCT GCA GGA TGG CAA GAG AGG AAA AA-3' (SEQ. ID NO. 31)和 L-LDH 3': 5'-TAT CTA CCT GCA GGT CAT TGA CGA ACC TTA AC-3' (SEQ. ID NO. 32), PCR 扩增瑞士乳杆菌 L-LDH 基因。使用 Failsafe PCR 系统(Epicentre, Madison, WI)进行热循环: 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1.5 min, 共 30 个循环, 最后 72°C 温育 4 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶分离 971 bp PCR 产物。PCR 产物用 SbfI 消化, 将其与 SbfI 消化的 pBH5b 的 6844 bp 片段连接, 产生 7824 bp 质粒 pBH8 (图 16)。pBH8 含有与马克斯克鲁维酵母 KmPDC1 启动子和终止子有效连接的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因, 以及与酿酒酵母 ScPDC1 启动子和 ScGAL10 终止子有效连接的 G418 抗性标记。

实施例 3C: 通过 pBH8 向 KmPDC1 基因座内的整合, 马克斯克鲁维酵母 CD606 株的构建

用 pBH8 质粒(实施例 3B)转化野生型马克斯克鲁维酵母。将整个 pBH8 质粒整合到 CD21 的 KmPDC1 基因座内, 位于 pBH8 的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因直接上游的侧翼 KmPDC1 DNA 与马克斯克鲁维酵母染色体上 KmPDC1 基因直接上游的 DNA 之间。产生的菌株被命名为 CD606, 含有野生型拷贝的 KmPDC1 以及在 KmPDC1 基因座处整合的一个拷贝的 pBH8。

在一个 250 mL 带挡板的摇瓶中, 用 CD21 接种补充了 100 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD 培养基(含有 10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖和 2% 琼脂), 至 $OD_{600}=0.1$ 。培养物在 30°C 和 250 rpm 下温育 16 小时, 至终 $OD_{600}=12$ 。从 10 mL 培养物中离心收集细胞, 用电穿孔缓冲液(电穿孔缓冲液: 10 mM Tris-Cl, 270 mM 蔗糖, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.5)洗涤一次。然后将细胞重悬浮于温育缓冲液(YPD + 25 mM DTT, 20mM HEPES, pH 8.0)中, 在 30°C 和 250 rpm 下温育 30 分钟。离心收集细胞, 用电穿孔缓冲液洗涤一次, 将其重悬浮于 1 mL 电穿孔缓冲液

中。然后将一等份(400 μ L)细胞转移到一个 0.4 cm 的电穿孔杯中。将总体积为 50 μ L 的 12 μ g 未酶切的 pBH8 加入杯中, 这些细胞以 1.8 kV, 1000 Ω , 25 μ F 电穿孔。将电穿孔的细胞转移到 50 mL 螺帽 Falcon 管中的 1 mL YPD 中, 在 30°C 和 250 rpm 下温育 4 小时, 之后选择性接种于含有 300 μ g/mL G418 的 YPD 上。这些转化子在 37°C 下温育 2 天, 在新鲜选择平板上重新划线。

pBH8 向位于 pBH8 的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因直接上游的侧翼 KmPDC1 DNA 与马克斯克鲁维酵母染色体上 KmPDC1 基因直接上游的 DNA 之间的 KmPDC1 基因座内的适当整合, 用引物 PDC1 染色体 5': 5'-AAG CAC CAA GGC CTT CAA CAG-3' (SEQ. ID NO. 33)和 L-LDH 3': 5'-TCG ATA TCG CTA AGG AAC GCG-3' (SEQ. ID NO. 34)证实。这些引物用来扩增 2.7 kb 产物, 其位于 KmPDC1 基因上游且掺入 pBH8 中的同源区之外的染色体 DNA 与瑞士乳杆菌 L-LDH 基因之间。热循环如下进行: 开始时反应混合物 94°C 温育 2 min, 然后 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 3 min, 共 35 个循环, 最后 72°C 温育 7 min。PCR 分析的 10 个转化子中有 4 个产生预期的 2.7 kb PCR 产物。

使用用来扩增 KmPDC1 基因座的引物 PDC1 5' 5'-CGC AAA GAA AAG CTC CAC ACC-3' (SEQ. ID NO. 35)和 PDC1 3' 5'-CCC ATA CGC TTA TAA TCC CCC-3' (; SEQ. ID NO. 36)进行 PCR, 产生两种产物。一种产物是对应于马克斯克鲁维酵母 PDC1 的 1.7 kb 片段, 第二种产物是对应于瑞士乳杆菌 L-LDH 的 1.0 kb 片段。热循环如下进行: 开始时反应混合物 94°C 温育 2 min, 然后 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 2 min, 共 35 个循环, 最后 72°C 温育 5 min。使用 G418 抗性基因编码区作为探针, 通过 Southern 印迹分析进一步证实单拷贝整合。所分析的 3 个转化子中有 1 个显示与一个 pBH8 拷贝整合相一致的适当带型。通过 PCR 和 Southern 分析证实, 在 KmPDC1 基因座处含有一个 pBH8 拷贝的菌株, 被命名为 CD606。

这些结果表明, 转化的 pBH8 DNA 向 CD21 的 KmPDC1 基因座内的定向整合在 KmPDC1 启动子序列之间发生。

实施例 3D: 由马克斯克鲁维酵母 CD606 株构建 CD607 株和 CD608 株

CD606 在非选择性培养基上繁殖数轮, 以利于靶 PDC1 基因的删除。分离一种菌株, 其中 KmPDC1 基因已经被替换为瑞士乳杆菌 L-LDH 基因。该菌株也不含 G418 抗性标记基因, 显示 G418 敏感表型, 通过在 G418 存在下的生长抑制得到证实; neo^R 基因的丢失通过 Southern 印迹分析证实。另外, 该菌株也不能够厌氧生长。

将 CD606 接种于 YPD 琼脂平板上, 在 37°C 下培养过夜约 16 小时。将一个菌落拭子转移到新鲜的 YPD 琼脂平板上。该过程重复 4 次。在 YPD 琼脂平板上进行第 5 轮非选择性培养后, 由第 5 轮非选择性生长的 CD606 平板接种 6 个 250 mL 带挡板的摇瓶, 至 OD₆₀₀=0.1, 摇瓶中含有补充了 100 g/L 葡萄糖和 42 g/L CaCO₃ 的 50 mL YPD。摇瓶在 30°C 和 250 rpm 下温育 16 小时。然后通过将豌豆大小的菌落拭子连续稀释到 PBS (磷酸缓冲液) 中, 稀释培养物。豌豆大小的菌落拭子的最初悬液在 1 mL PBS 中的 10-5、10-6、10-7 稀释液在 YPD 琼脂平板上使用。

将在 YPD 平板上第 5 轮非选择性生长的另外一个菌落拭子悬浮于 1 mL PBS (磷酸缓冲液; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4) 中, 随后稀释, 用单菌落接种 YPD 琼脂平板。将单菌落接种于 YPD 琼脂上, 置于一个厌氧培养室 [Becton Dickinson, "GasPak System", 使用三个气囊] 中, 按照厂商说明使用。在 37°C 下生长 2 天后, 打开厌氧培养室, 标记厌氧生长的菌落。平板在 37°C 下再温育一天。将需氧而不是厌氧生长的菌落转移到三份平板上进行筛选。使用的筛选条件是需氧 YPD 平板、厌氧 YPD 平板和补充了 300 µg/mL G418 的 YPD 平板。鉴定了两个转化子, 其具有希望的 G418 敏感表型, 不能厌氧生长, 被命名为 CD607 和 CD608。

使用引物 PDC1 5' (SEQ. ID NO. 35) 和 PDC1 3' (SEQ. ID NO. 36) 证实 KmPDC1 被瑞士乳杆菌 L-LDH 的替换。以来自 CD607 和 CD608 的 DNA 为模板, 用这些引物扩增 PDC1 基因座。热循环如下进行: 开

始时反应混合物 94℃温育 2 min, 随后 94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 共 35 个循环, 最后 72℃温育 5 min。两个菌株的染色体 DNA 产生对应于瑞士乳杆菌 L-LDH 的 1.0 kb PCR 产物。使用用来杂交 G418 基因的 G418 基因的完整编码区作为探针进行 Southern 印迹分析, 表明 PCR 产物不含 G418 基因。使用 KmPDC1 编码探针的 Southern 分析显示没有条带, 表明没有用来杂交 KmPDC1 直接上游和下游区域的 KmPDC1 编码序列探针。使用的探针是与 PDC1 基因直接上游和下游的染色体区域同源的 DNA 片段。用寡聚体 5'探针=CA110 和 CA111; 3'探针=CA112 和 CA113 经 PCR 扩增探针, 产生大小与 KmPDC1 被瑞士乳杆菌 L-LDH 置换相一致的条带。

这些结果表明, CD606 的染色体中丢失了 KmPDC1 基因以及含有与酿酒酵母 ScPDC1 启动子和 ScGAL10 终止子连接的 G418 抗性标记的 pBH8 质粒骨架, 产生一种菌株, 其中 KmPDC1 基因被侧翼为 SbfI 位点的瑞士乳杆菌 L-LDH 基因准确替换。

实施例 3E: CD607 在复杂 CaCO₃ 缓冲培养基中的 L-乳酸产生

CD607 株在一个 250 mL 带挡板的摇瓶中培养, 其中含有补充了 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L CaCO₃ 的 50 mL YPD 培养基, 由 YPD 琼脂平板接种至 OD₆₀₀=0.1, 之后在 30℃和 250 rpm 下培养 16 小时。在确定摇瓶中含有残余葡萄糖, 因此细胞处于指数生长期后, 离心收集 4 g/L 细胞干重当量, 将其重悬浮于一个 250 mL 带挡板的摇瓶中, 其中含有补充了 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L CaCO₃ 的 50 mL YPD。培养物在 30℃和 70 rpm 下温育(48 小时)。在不同时间(0、8、24、48 小时间隔)采样, 过滤除去细胞。通过 HPLC 分析培养上清液的葡萄糖、乳酸(盐)、丙酮酸(盐)和乙醇。

24 小时后, CD607 株消耗了 59-61 g/L 葡萄糖, 产生 58-60 g/L 乳酸(盐)和 0.3 g/L 丙酮酸(盐)。48 小时后, CD607 株消耗了 101-104 g/L 葡萄糖, 产生了 94-99 g/L 乳酸(盐)和 0.4 g/L 丙酮酸(盐)。这些乳酸滴度代表微需氧生产阶段基于葡萄糖的 90-98%的乳酸收率, 和

大于 2.1 g/L/hr 的容积生产率。48 小时后, 由于培养物中产生高水平的乳酸盐, 形成一种不可溶的乳酸钙沉淀(“结块”), 妨碍了进一步的分析。乳酸盐酶分析显示, 乳酸(盐)是对映体纯度大于 99%的 L-乳酸(盐)。在 CD607 的培养物中未检测到乙醇, 因此表明只有一个拷贝的 PDC1 被一个 L-LDH 替换。

与之相比, CD 606 株(含有 PDC 基因和瑞士乳杆菌 L-LDH 基因)在相同发酵条件下消耗了 124 g/L 葡萄糖, 产生 83 g/L 乳酸(盐)、20 g/L 乙醇和 0.2 g/L 丙酮酸(盐)。

实施例 3F: 在不添加缓冲剂的复杂培养基中, 游离 L-乳酸的产生
CD607 株在一个 250 mL 带挡板的摇瓶中培养, 其中含有补充了 100 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD 培养基, 由 YPD 琼脂平板接种至 $OD_{600}=0.1$, 之后在 30°C 和 250 rpm 下培养 16 小时。在确定摇瓶中含有残余葡萄糖, 因此细胞处于指数生长期后, 离心收集 2 g/L 细胞干重当量, 将其重悬浮于一个 250 mL 带挡板的摇瓶中, 其中含有补充了另外 40 g/L 葡萄糖的 50 mL YPD。培养物在 30°C 和 70 rpm 下温育(72 小时)。在不同时间(在开始生产后 0、24、47、72 小时)采样。通过 HPLC 分析培养样品的葡萄糖、乳酸(盐)(总和游离酸)、丙酮酸(盐)、甘油、乙酸(盐)和乙醇。在生产开始和结束时测定 pH。

72 小时后, CD607 株消耗了 10.8 g/L 葡萄糖, 产生 9.1 g/L 乳酸(盐)、0.5 g/L 乙酸(盐)和 1.2 g/L 丙酮酸(盐)。这些乳酸滴度代表微需氧生产阶段基于葡萄糖的 84%的乳酸收率, 和大于 0.1 g/L/hr 的容积生产率。乳酸(盐)酶分析显示, 乳酸(盐)是对映体纯度大于 99%的 L-乳酸(盐)。在 CD607 株的培养物中未检测到乙醇。另外, 也未检测到甘油。在生产阶段, 由于有机酸的产生, 培养液的 pH 由 6.50 降为 3.05。通过 HPLC 测定游离乳酸(质子化乳酸), 发现 9.1 g/L 游离乳酸, 表明 CD607 产生的所有乳酸基本上都是质子化形式。

应当理解, 上述公开内容强调了本发明的某些具体实施方案, 与之

相当的所有修饰和改变都在如权利要求书所述的本发明的精神和范围之内。此处引用的所有参考文献均全文引用作为参考。

序列表

<110> Cargill Dow Polymers LLC
 Hause, Ben
 Rajgarhia, Vineet
 Suominen, Pirkko

<120> 在酵母中生产 L-乳酸的方法和材料

<130> 00-1237-P

<150> US 60/384,333

<151> 2002-05-30

<160> 38

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 848
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母

<400> 1
 gcggccgcgg atcgctcttc cgctatcgat taattttttt ttctttcctc tttttattaa 60
 ccttaatttt tatttttagat tcctgacttc aactcaagac gcacagatat tataacatct 120
 gcacaatagg catttgcaag aattactcgt gagtaaggaa agagtgagga actatcgcat 180
 acctgcattt aaagatgccg atttgggcgc gaatccttta ttttggttc accctcatac 240
 tattatcagg gccagaaaaa ggaagtgttt ccctccttct tgaattgatg ttaccctcat 300
 aaagcacgtg gcctcttatc gagaaagaaa ttaccgtcgc tcgtgatttg ttgcaaaaa 360
 gaacaaaact gaaaaaaccc agacacgctc gacttcctgt cttcctattg attgcagctt 420
 ccaatttcgt cacacaacaa ggtcctagcg acggctcaca ggttttgtaa caagcaatcg 480
 aaggttcttg aatggcggga aagggttag taccacatgc tatgatgccc actgtgatct 540
 ccagagcaaa gttcgttcga tcgtactgtt actctctctc tttcaaacag aattgtccga 600
 atcgtgtgac aacaacagcc tgttctcaca cactcttttc ttctaaccac ggggggtggtt 660
 tagtttagta gaacctcgtg aaacttacat ttacatatat ataaacttgc ataaattggt 720
 caatgcaaga aatacatatt tgggtctttc taattcgtag tttttcaagt tcttagatgc 780
 tttctttttc tcttttttac agatcatcaa ggaagtaatt atctactttt tacaacaaat 840
 ctagaatt 848

<210> 2
 <211> 376
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母

<400> 2
 gtagatacat tgatgctatc aatccagaga actggaaaga ttgtgtagcc ttgaaaaacg 60
 gtgaaactta cgggtccaag attgtctaca gattttcctg atttgccagc ttactatcct 120
 tcttgaaaat atgcactcta tatcttttag ttcttaattg caacacatag atttgctgta 180

taacgaattt tatgctattt tttaaatttg gagttcagtg ataaaagtgt cacagcgaat 240
 ttcttcacat gtagggaccg aattgtttac aagttctctg taccaccatg gagacatcaa 300
 aaattgaaaa tctatggaaa gatatggacg gtagcaacaa gaatatagca cgagccgcgg 360
 atttatttcg ttacgc 376

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PSPDCS1 引物

<400> 3
 ccatcgataa caagctcatg caaagag 27

<210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PSPDCAS2 引物

<400> 4
 gctctagatt tgactgtggtt attttgcg 28

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5'G 片段引物

<400> 5
 gctctagatg agccatattc aacgggaaac 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 3'G 片段引物

<400> 6
 atggatcctt agaaaaactc atcgagcatc 30

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5'HYGXBA1 引物

<400> 7
 aagctctaga tgaaaaagcc tgaactcac 29

<210>	8	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3'HYGBAMH1 引物	
<400>	8	29
	cgcggatccc tattcctttg ccctcggac	
<210>	9	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PS15S 引物	
<400>	9	30
	gctctagaat tatggcaaga gaggaaaaac	
<210>	10	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PS16AS 引物	
<400>	10	27
	cgggatcctc attgacgaac cttaacg	
<210>	11	
<211>	92	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	fwd HES 寡	
<400>	11	60
	cccaagcttg aattccccgg gggatccctg cagggtacca cgcgtagatc tactagtgcg	
	gccgcctcga gtctagaggg cccaagcttg gg	92
<210>	12	
<211>	91	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	[S01][CMA2] 寡	
<400>	12	60
	ccaagcttg gcccctctaga ctcgaggcgg ccgcactagt agatctacgc gtgggtaccct	
	gcagggatcc cccggggaat tcaagcttg g	91
<210>	13	
<211>	31	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> SO22 引物	
<400> 13	
ccgggatcca tggcaagaga ggaaaaacct c	31
<210> 14	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SO23 引物	
<400> 14	
ccaagatctt tattgacgaa ccttaacgcc ag	32
<210> 15	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VR1 引物	
<400> 15	
atccatggca agtattacgg ataaggatca ccaa	34
<210> 16	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VR2 引物	
<400> 16	
atcacgaagt gtcacgtacg ggtttcgatg tc	32
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VR146 引物	
<400> 17	
gctgactacc cagattgtaa ggatg	25
<210> 18	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VR143 引物	
<400> 18	
ctgccagcgc atcaacaata ttttcac	27

<210>	19	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VR142 引物	
<400>	19	
	ctgccagcgc atcaacaata ttttcac	27
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BM1270 引物	
<400>	20	
	cctgagtcca cgtcattatt c	21
<210>	21	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BM179 引物	
<400>	21	
	tgaagctatt tattcttggt ac	22
<210>	22	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Bmeg5' 引物	
<400>	22	
	gctctagatg aaaacacaat ttacacc	27
<210>	23	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Bmeg3' 引物	
<400>	23	
	atggatcctt acacaaaagc tctgtcgc	28
<210>	24	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	G5' 引物	

<400> 24 aaatctagat gagccatatt caacggga	28
<210> 25 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> G3' 引物	
<400> 25 ccggatcctt agaaaaactc atcgagcat	29
<210> 26 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> BmLDH3 引物	
<400> 26 gtacgatta ccaaggctat tttagat	27
<210> 27 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 5'-侧翼 5' 引物	
<400> 27 caagaaggta cccctctcta aacttgaaca	30
<210> 28 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 5'-侧翼 3' 引物	
<400> 28 gtaattcctg caggtgcaat tatttggttt gg	32
<210> 29 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 3'-侧翼 5' 引物	
<400> 29 ccaagccctg caggagaggg agaggataaa ga	32
<210> 30 <211> 30 <212> DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3'-侧翼 3' 引物	
<400>	30	
	ctcgtaacgc gtgtacaagt tgtggaacaa	30
<210>	31	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	1-LDH 5' 引物	
<400>	31	
	acaaatcctg caggatggca agagaggaaa aa	32
<210>	32	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	1-LDH 3' 引物	
<400>	32	
	tatctacctg caggtcattg acgaacctta ac	32
<210>	33	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PDC1 引物	
<400>	33	
	aagcaccaag gccttcaaca g	21
<210>	34	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	1-LDH 3' 引物	
<400>	34	
	tcgatatcgc taaggaacgc g	21
<210>	35	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PDC1 5' 引物	
<400>	35	
	cgcaaagaaa agctccacac c	21

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PDC1 3' 引物

<400> 36
 cccatacgct tataatcccc c

21

<210> 37
 <211> 1235
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母

<400> 37
 ggccgcggat cgctcttccg ctatcgatta attttttttt ctttcctctt tttattaacc 60
 ttaatttttta ttttagattc ctgacttcaa ctcaagacgc acagatatta taacatctgc 120
 acaataggca tttgcaagaa ttactcgtga gtaaggaaaag agtgaggaaac tatcgcatac 180
 ctgcatttaa agatgccgat ttgggcgcga atcctttatt ttggcttcac cctcatacta 240
 ttatcagggc cagaaaaagg aagtgtttcc ctcttcttg aattgatgtt accctcataa 300
 agcacgtggc ctcttatcga gaaagaaatt accgtcgctc gtgatttggt tgcaaaaaga 360
 acaaaactga aaaaaccag acacgctcga ctctctgtct tcctattgat tgcagcttcc 420
 aatttcgtca cacaacaagg tcctagcgac ggctcacagg ttttgtaaca agcaatcgaa 480
 ggttctggaa tggcgggaaa gggtttagta ccacatgcta tgatgcccac tgtgatctcc 540
 agagcaaagt tcgttcgac gtactgttac tctctctctt tcaaacagaa ttgtccgaat 600
 cgtgtgacaa caacagcctg ttctcacaca ctcttttctt ctaaccaagg ggggtggttta 660
 gtttagtaga acctcgtaga acttacattt acatatatat aaacttgcat aaattgggtca 720
 atgcaagaaa tacatatattg gtcttttcta attcgtagtt tttcaagttc ttagatgctt 780
 tctttttctc ttttttacag atcatcaagg aagtaattat ctacttttta caacaaatct 840
 agaattcgga tccggtagat acattgatgc tatcaatcaa gagaactgga aagattgtgt 900
 aaccttgaaa aacggtgaaa cttacgggtc caagaccctc tacagatttt cctgatttgc 960
 cagcttacta tccttcttga aaatatgcac tctatatctt ttagttctta attgcaacac 1020
 atagatttgc tgtataacga attttatgct attttttaaa tttggagttc agtgataaaa 1080
 gtgtcacagc gaatttcctc acatgtagga ccgaattgtt tacaagttct ctgtaccacc 1140
 atggagacat caaagattga aaatctatgg aaagatatgg acggtagcaa caagaatata 1200
 gcacgagccg cggatttatt tcgttacgca tgcgc 1235

<210> 38
 <211> 1314
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母

<400> 38

ggccgcggat cgctcttccg ctatcgataa caagctcatg caaagaggtg gtacccgcac	60
gccgaaatgc atgcaagtaa cctattcaaa gtaatatctc atacatgttt catgagggta	120
acaacatgcg actgggtgag catatgttcc gctgatgtga tgtgcaagat aaacaagcaa	180
ggcagaaact aacttcttct tcatgtaata aacacacccc gcgtttattt acctatctct	240
aaacttcaac accttatatc ataactaata tttcttgaga taagcacact gcacccatac	300
cttccttaaa aacgtagctt ccagtttttg gtggttccgg cttccttccc gattccgccc	360
gctaaacgca tatttttggt gcctggtggc atttgcaaaa tgcataacct atgcatttaa	420
aagattatgt atgctcttct gacttttctg gtgatgaggc tcgtggaaaa aatgaataat	480
ttatgaattt gagaacaatt ttgtgttggt acggtatttt actatggaat aatcaatcaa	540
ttgaggattt tatgcaaata tcgtttgaat atttttccga ccctttgagt acttttcttc	600
ataattgcat aatattgtcc gctgcccctt tttctgttag acggtgtctt gatctacttg	660
ctatcgttca acaccacctt attttctaac tatttttttt ttagctcatt tgaatcagct	720
tatggtgatg gcacattttt gcataaacct agctgtcctc gttgaacata ggaaaaaaaa	780
atatataaac aaggctcttt cactctcctt gcaatcagat ttgggtttgt tccctttatt	840
ttcatatttc ttgtcatatt cttttctcaa ttattatttt ctactcataa cctcacgcaa	900
aataacacag tcaaatctag aattcggatc cggtagatac attgatgcta tcaatccaga	960
gaactggaaa gattgtgtag ctttgaaaaa cggtgaaact tacgggtcca agattgtcta	1020
cagattttcc tgatttgcca gcttactatc cttcttgaaa atatgcactc tatactcttt	1080
agttcttaat tgcaacacat agatttgctg tataacgaat tttatgctat tttttaaatt	1140
tggagttcag tgataaaagt gtcacagcga atttcctcac atgtagggac cgaattgttt	1200
acaagttctc tgtaccacca tggagacatc aaaaattgaa aatctatgga aagatatgga	1260
cggtagcaac aagaatatag cacgagccgc ggatttattt cgttacgcat gcgc	1314

通用表达载体 pNC2

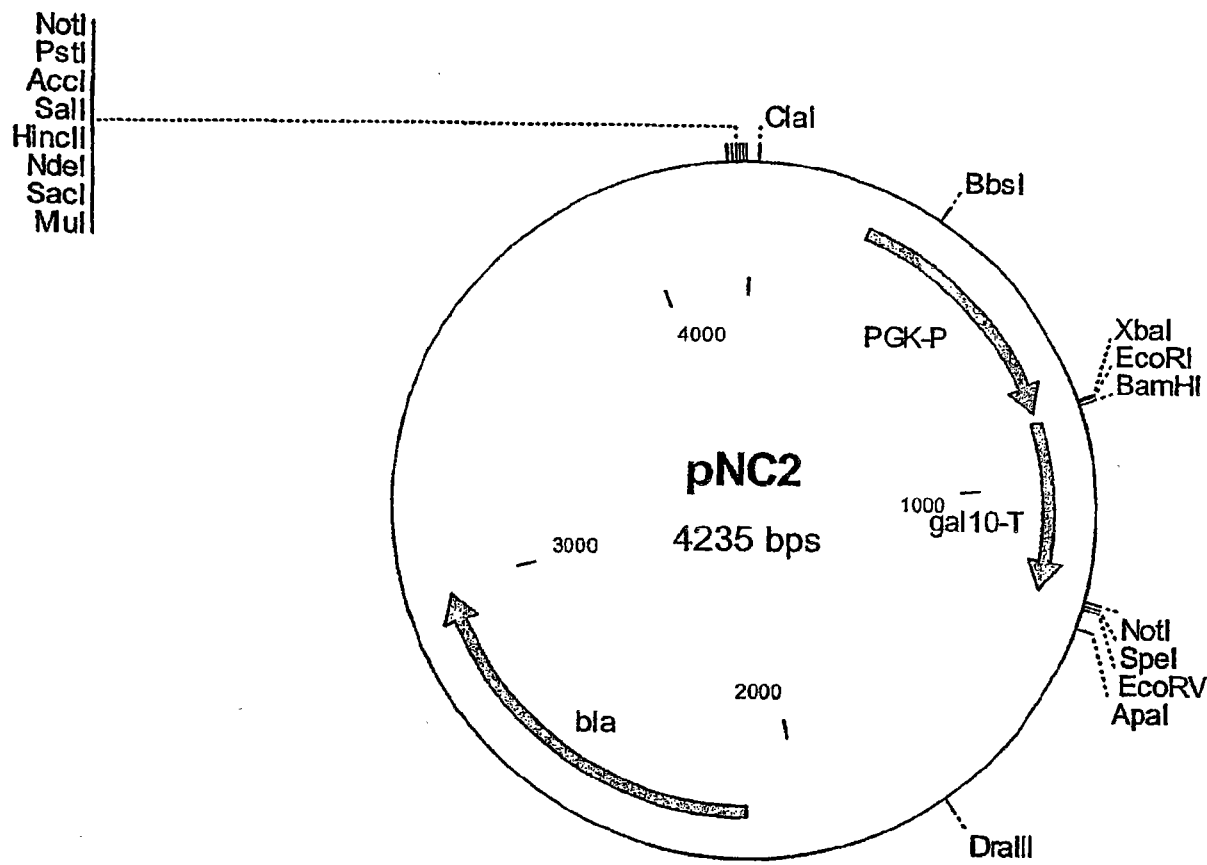


图 1

通用表达载体 pNC4

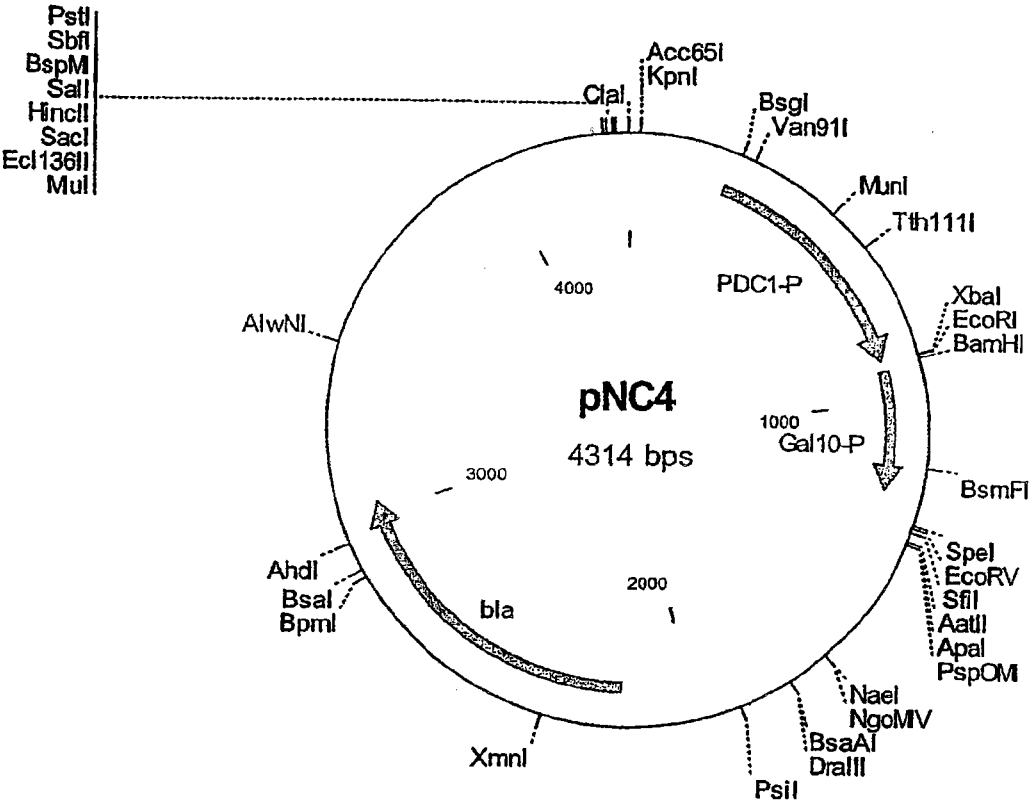


图 2

1.235kbp的NotI消化的片段，其具有用于基因表达的
酿酒酵母ScPGK1启动子、多克隆位点和ScGAL10终止子

```

5'- GGCCGCGGAT CGCTCTTCCG CTATCGATTA ATTTTTTTTT
CTTTCCTCTT TTTATTAACC TTAATTTTTA TTTTAGATTC CTGACTTCAA
CTCAAGACGC ACAGATATTA TAACATCTGC ACAATAGGCA TTTGCAAGAA
TTACTCGTGA GTAAGGAAAG AGTGAGGAAC TATCGCATAC CTGCATTTAA
AGATGCCGAT TTGGGCGCGA ATCCTTTTATT TTGGCTTCAC CCTCATACTA
TTATCAGGGC CAGAAAAAGG AAGTGTTTCC CTCCTTCTTG AATTGATGTT
ACCCTCATAA AGCACGTGGC CTCTTATCGA GAAAGAAATT ACCGTCGCTC
GTGATTTGTT TGCAAAAAGA ACAAACTGA AAAAACCAG ACACGCTCGA
CTTCCTGTCT TCCTATTGAT TGCAGCTTCC AATTTCTGTC CACAACAAGG
TCCTAGCGAC GGCTCACAGG TTTTGTAACA AGCAATCGAA GGTTCCTGGAA
TGGCGGGAAA GGGTTTAGTA CCACATGCTA TGATGCCAC TGTGATCTCC
AGAGCAAAGT TCGTTCGATC GTECTGTAC TCTCTCTCTT TCAAACAGAA
TTGTCCGAAT CGTGTGACAA CAACAGCCTG TTCTCACACA CTCTTTTCTT
CTAACCAAGG GGGTGGTTTA GTTTAGTAGA ACCTCGTGAA ACTTACATTT
ACATATATAT AAACCTGTCAT AAATTGGTCA ATGCAAGAAA TACATATTTG
GTCTTTTCTA ATTCGTAGTT TTTCAAGTTC TTAGATGCTT TCTTTTCTC
TTTTTTTACAG ATCATCAAGG AAGTAATTAT CTACTTTTTA CAACAAATCT
AGAATTCGGA TCCGGTAGAT ACATTGATGC TATCAATCAA GAGAACTGGA
AAGATTGTGT AACCTTGAAA AACGGTGAAA CTTACGGGTC CAAGACCCTC
TACAGATTTT CCTGATTTGC CAGCTTACTA TCCTTCTTGA AAATATGCAC
TCTATATCTT TTAGTTCTTA ATTGCAACAC ATAGATTTGC TGTATAACGA
ATTTTATGCT ATTTTTTAAA TTTGGAGTTC AGTGATAAAA GTGTCACAGC
GAATTTCTC ACATGTAGGA CCGAATTGTT TACAAGTTCT CTGTACCACC
ATGGAGACAT CAAAGATTGA AAATCTATGG AAAGATATGG ACGGTAGCAA
CAAGAATATA GCACGAGCCG CGGATTTATT TCGTTACGCA TGCGC - 3'

```

图 2a

1. 3kbp的NotI 限制性片段序列，含有酿酒酵母PDC1启动子和ScGAL10终止子以及终止子和启动子之间的多克隆位点

5'- GGCCGCGGATCGCTCTTCCGCTATCGATAACAAGCTCATGCAAAG
AGGTGGTACCCGCACGCCGAAATGCATGCAAGTAACCTATTCAAAGTAAT
ATCTCATACATGTTTCATGAGGGTAACAACATGCGACTGGGTGAGCATAT
GTTCCGCTGATGTGATGTGCAAGATAAACAAGCAAGGCAGAACTAACT
TCTTCTTCATGTAATAAACACACCCCGCGTTTATTTACCTATCTCTAAACT
TCAACACCTTATATCATAACTAATATTTCTTGAGATAAGCACACTGCACC
CATACCTTCCTTAAAAACGTAGCTTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCCT
TCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCATATTTTTGTTGCCTGGTGGCATTGCA
AAATGCATAACCTATGCATTTAAAAGATTATGTATGCTCTTCTGACTTTTC
GTGTGATGAGGCTCGTGGAAAAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAA
TTTTGTGTTGTTACGGTATTTTACTATGGAATAATCAATCAATTGAGGATT
TTATGCAAATATCGTTTGAATATTTTTCCGACCCTTGAGTACTTTTCTTCA
TAATTGCATAATATTGTCCGCTGCCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGA
TCTACTTGCTATCGTTCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTTAG
CTCATTTGAATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTG
TCCTCGTTGAACATAGGAAAAAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCACCTC
TCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTTCCTTTATTTTCATATTTCTTGTCAT
ATTCCTTTCTCAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAAAATAACAC
AGTCAAATCTAGAATTCGGATCCGGTAGATACATTGATGCTATCAATCCA
GAGAACTGGAAAGATTGTGTAGCCTTGAAAAACGGTGAAACTTACGGGT
CCAAGATTGTCTACAGATTTTCTGATTTGCCAGCTTACTATCCTTCTTGA
AAATATGCACTCTATATCTTTTAGTTCTTAATTGCAACACATAGATTTGCT
GTATAACGAATTTTATGCTATTTTTTAAATTTGGAGTTCAGTGATAAAAGT
GTACACAGCGAATTTCTCACATGTAGGGACCGAATTGTTTACAAGTTCTC
TGTACCACCATGGAGACATCAAAAATTGAAAATCTATGGAAAGATATGG
ACGGTAGCAACAAGAATATAGCACGAGCCGCGGATTTATTTTCGTTACGCA
TGCGC - 3'

图 2b

质粒 pVR22 图谱

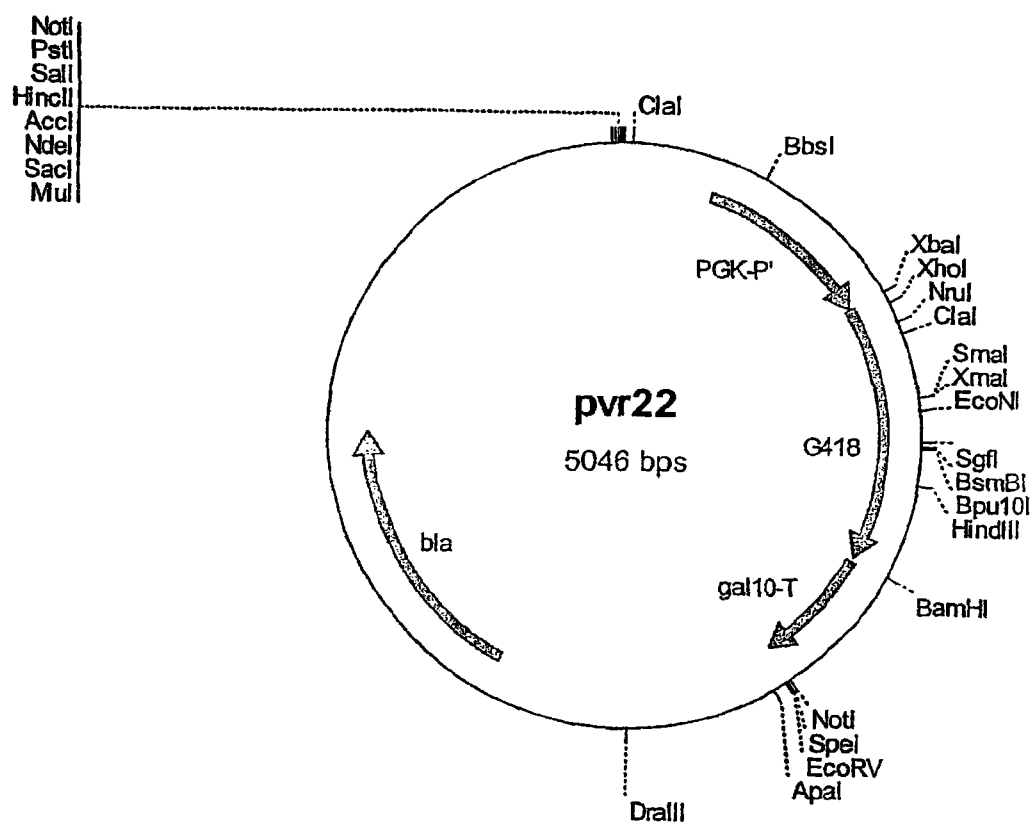


图 3

pVR29图谱

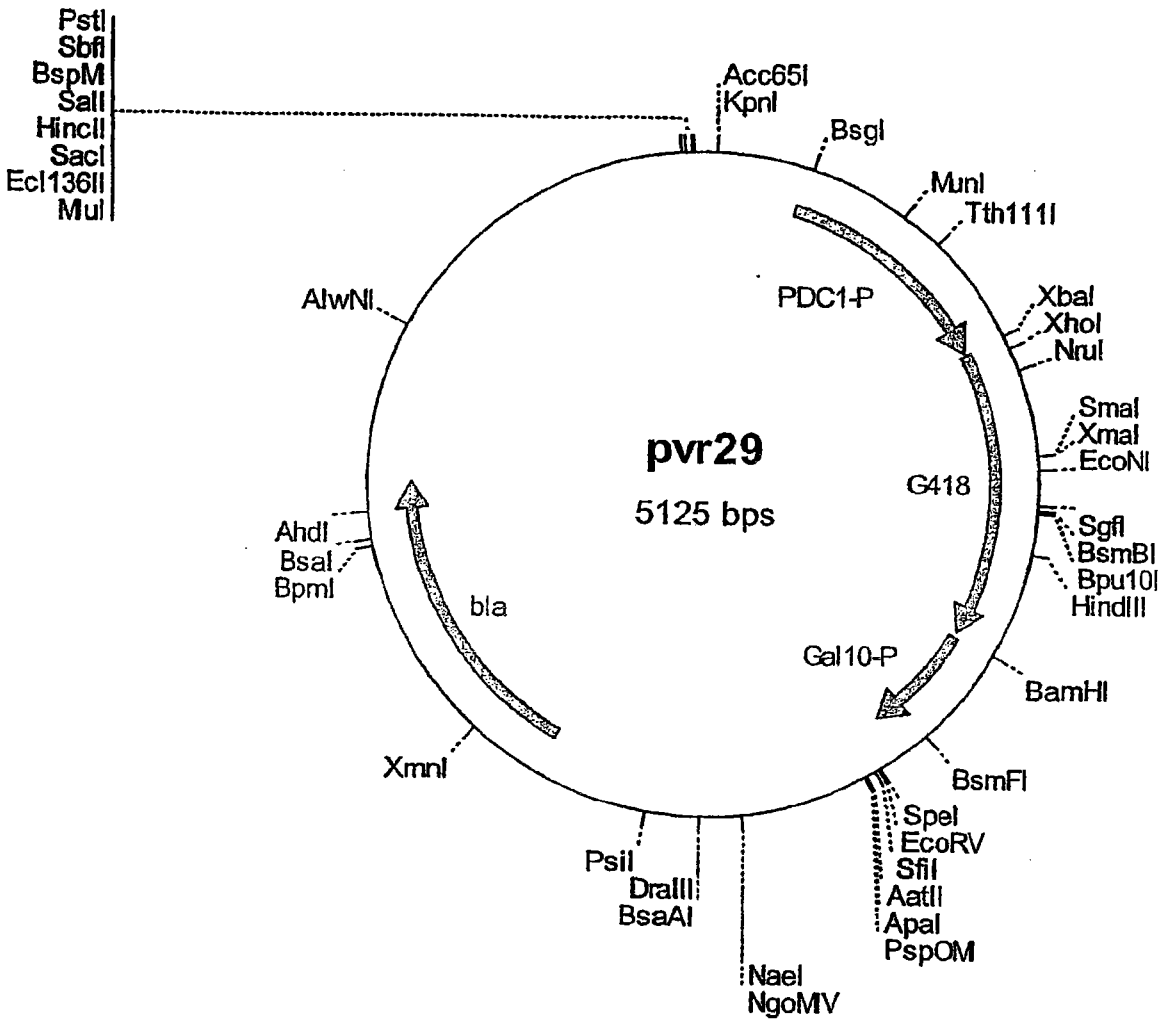


图 4

pPS9.的构建

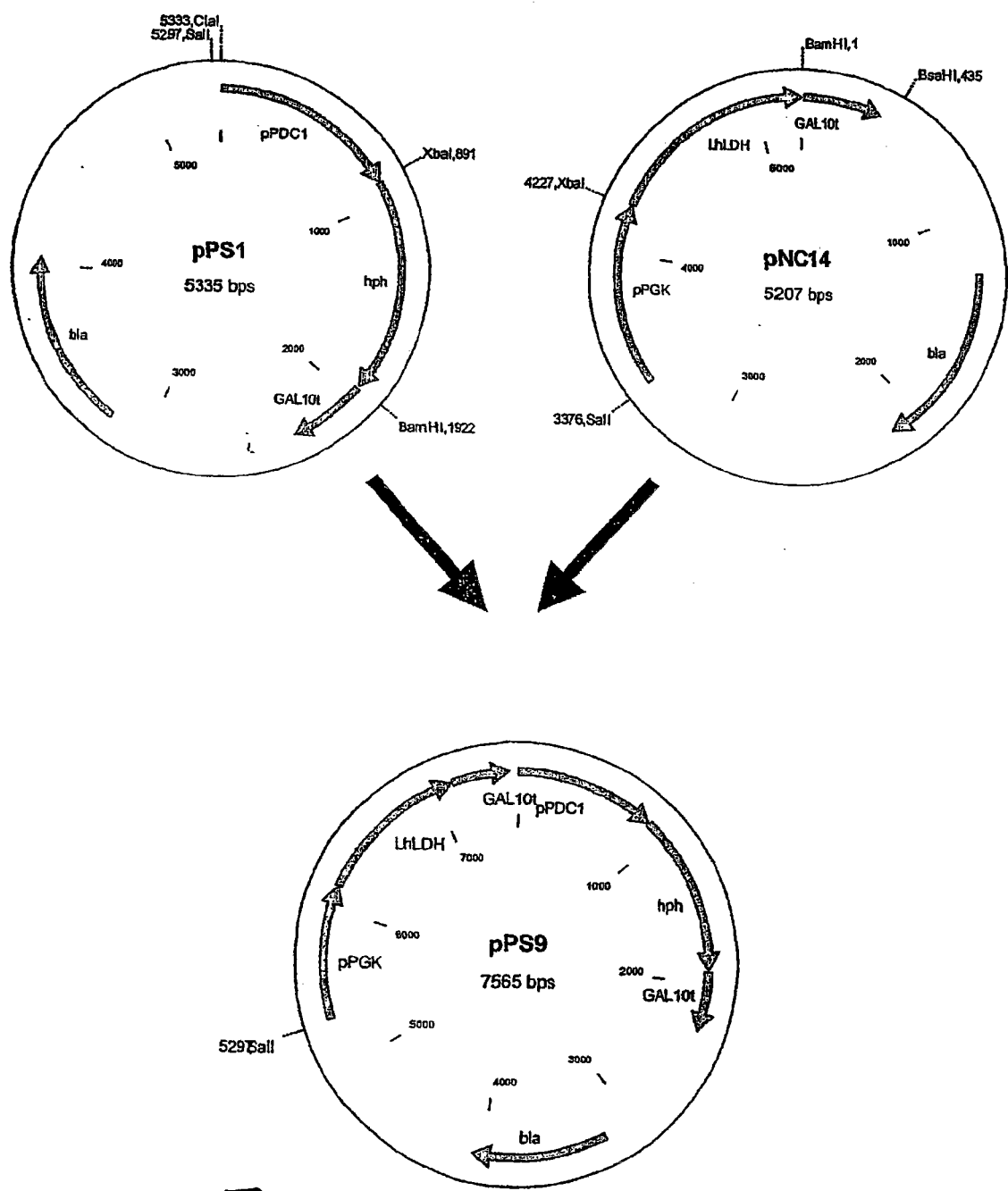


图 5

pVR39 图谱

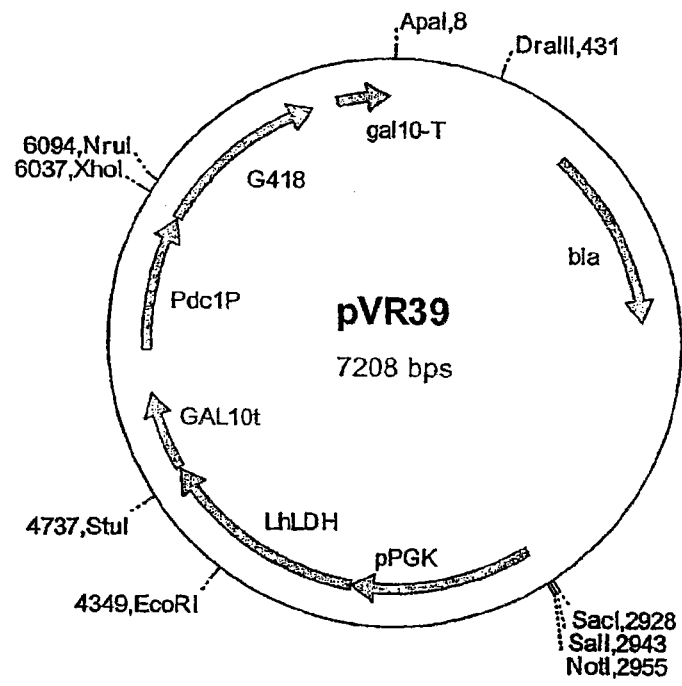


图 6

pVR1图谱

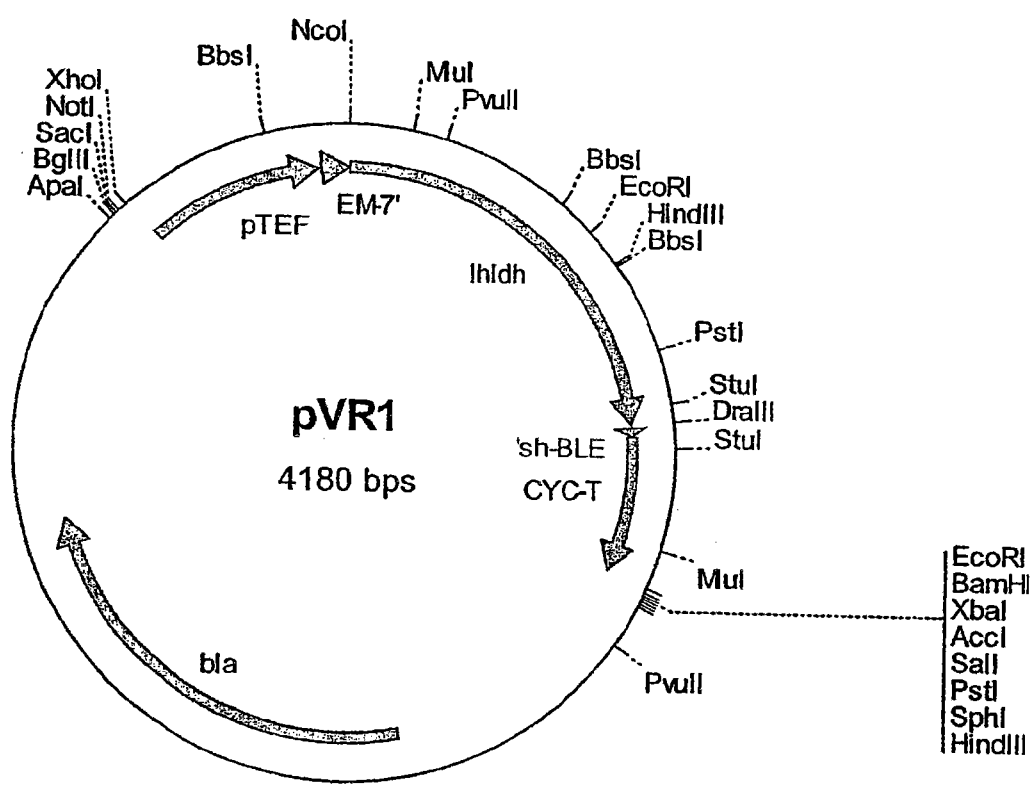


图7a/b/c/d

质粒 pSO18 图谱

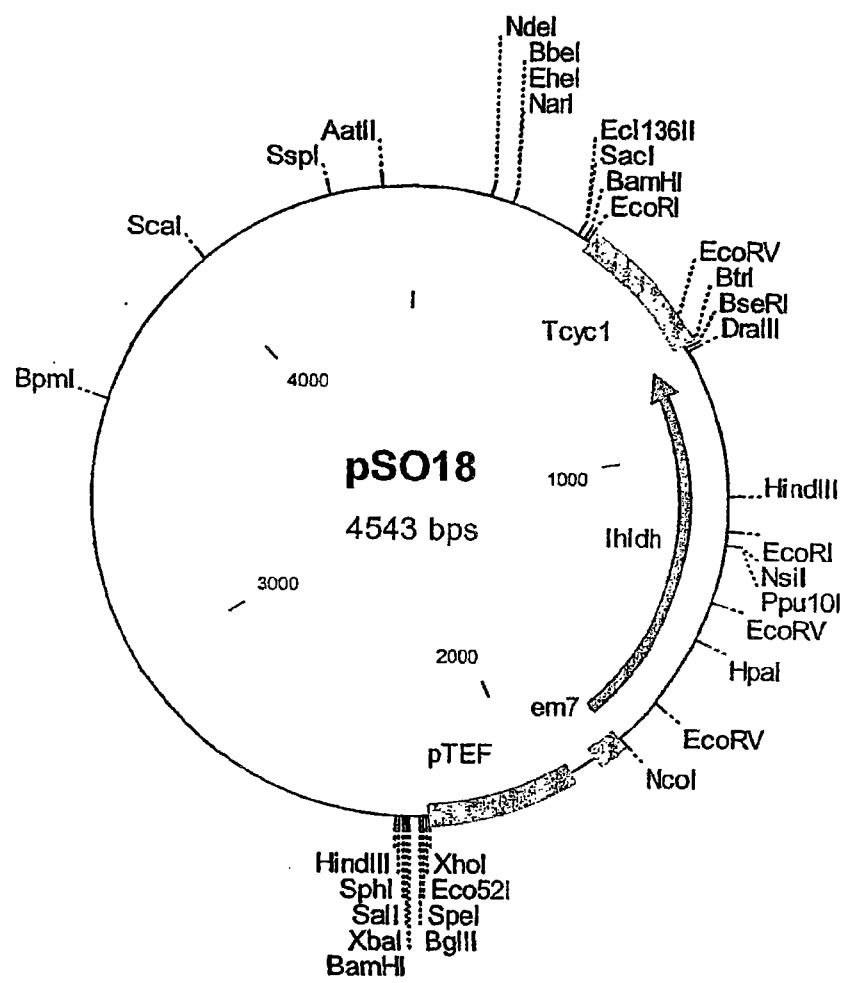


图 8

质粒pSO19图谱

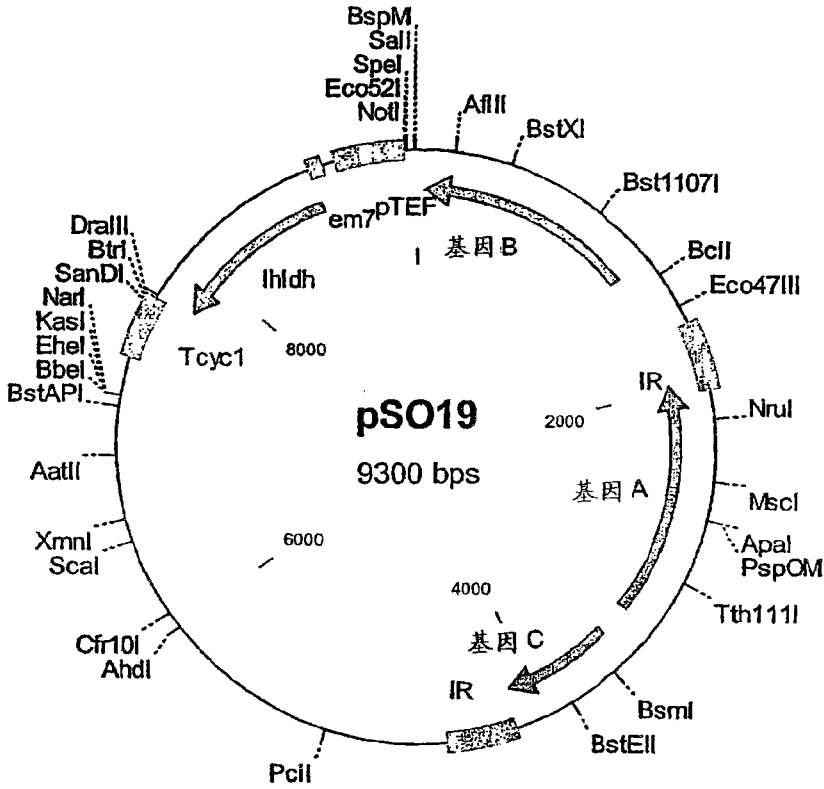


图9

质粒 pSO20 图谱

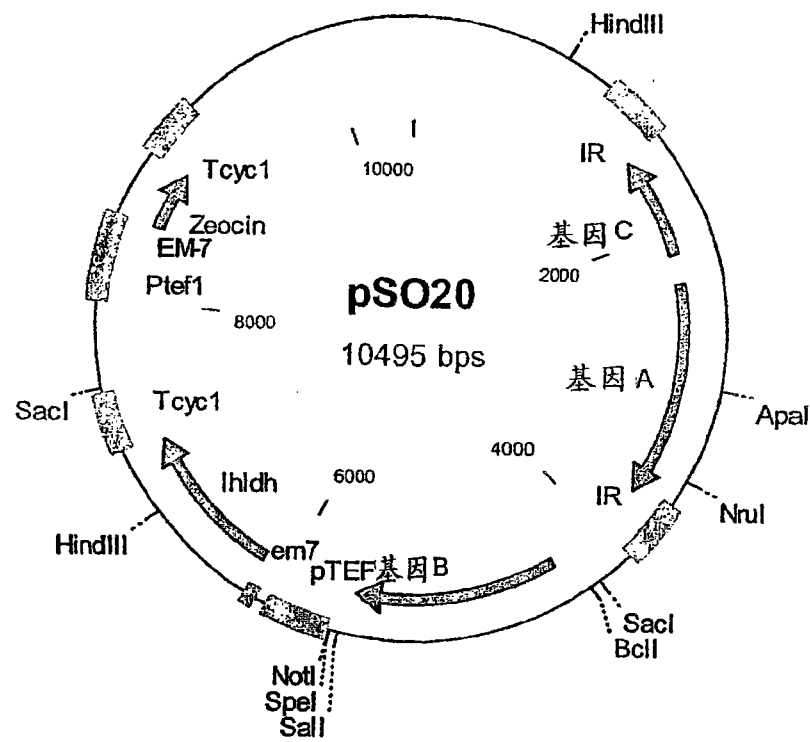


图 10

pVR41图谱

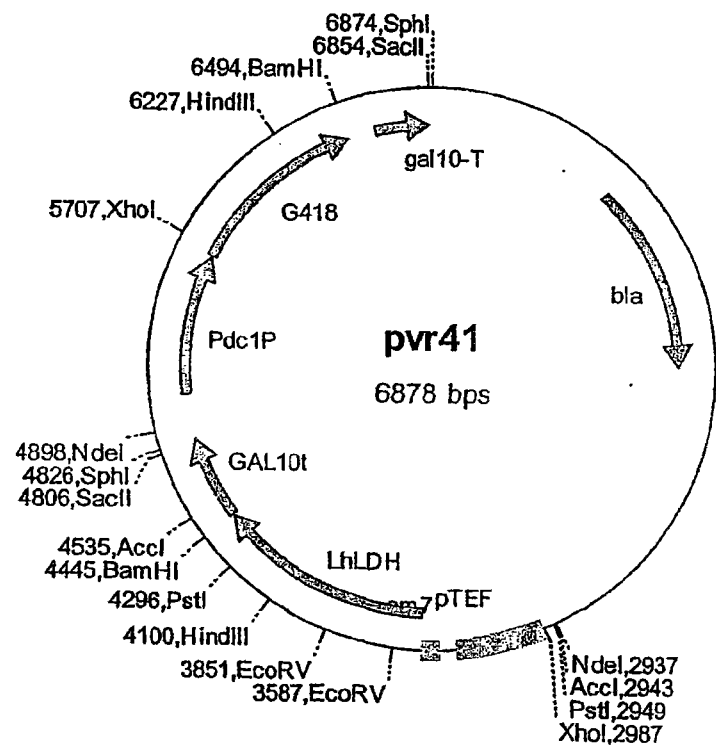


图 11

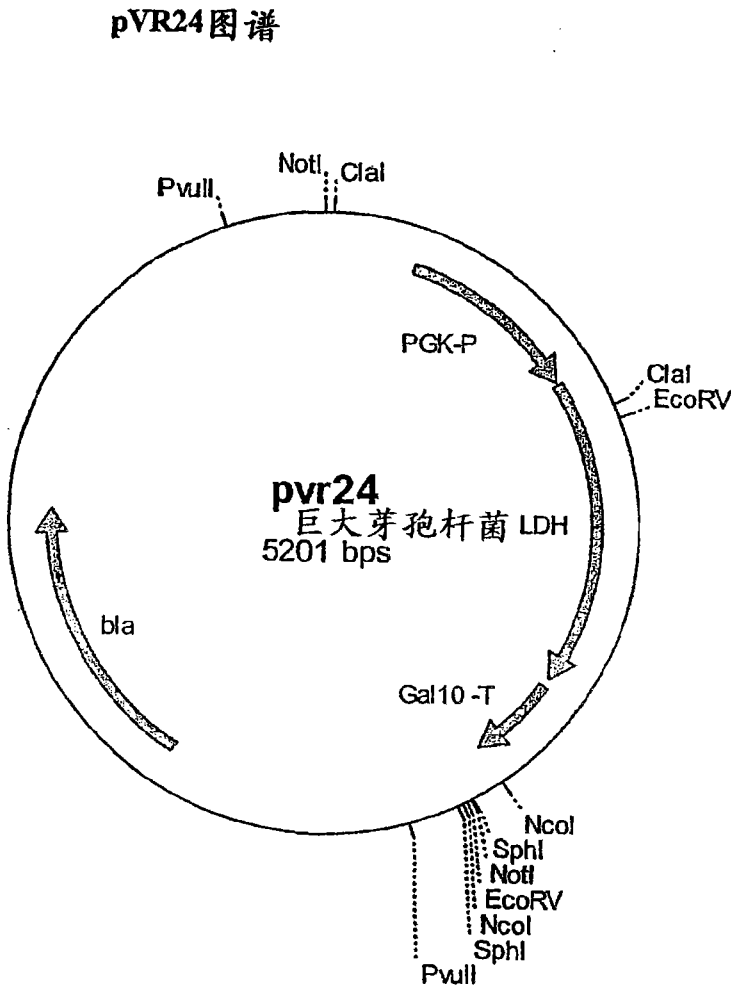


图 12

pCA3质粒图谱

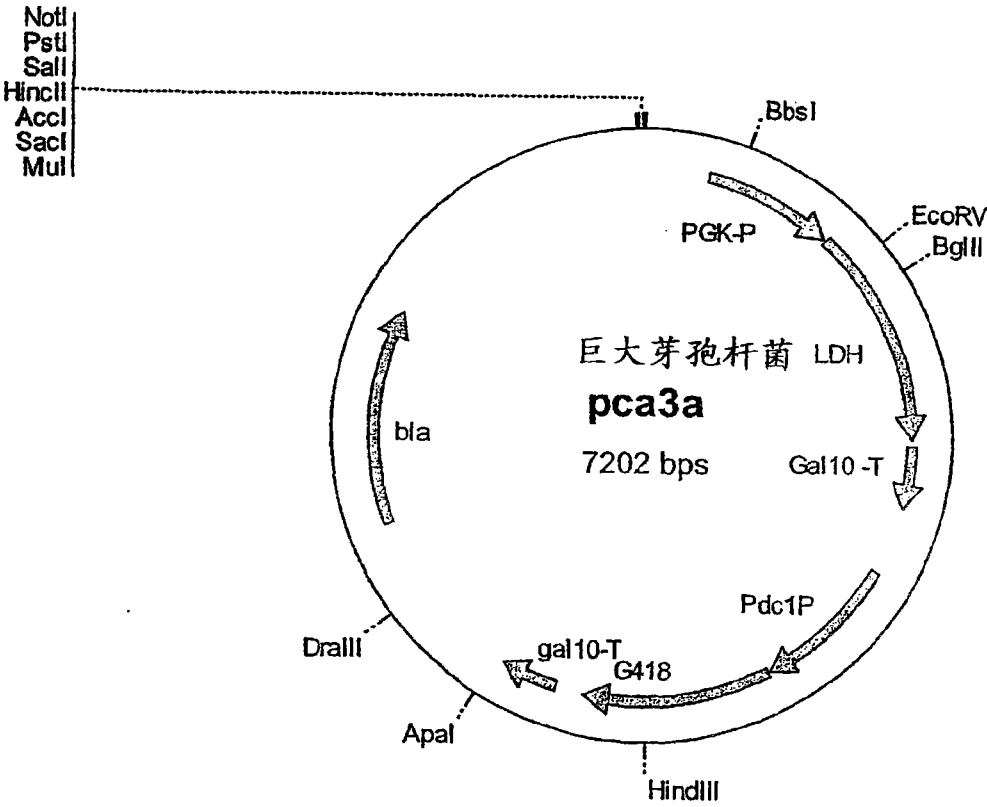


图13

pVR38 图谱

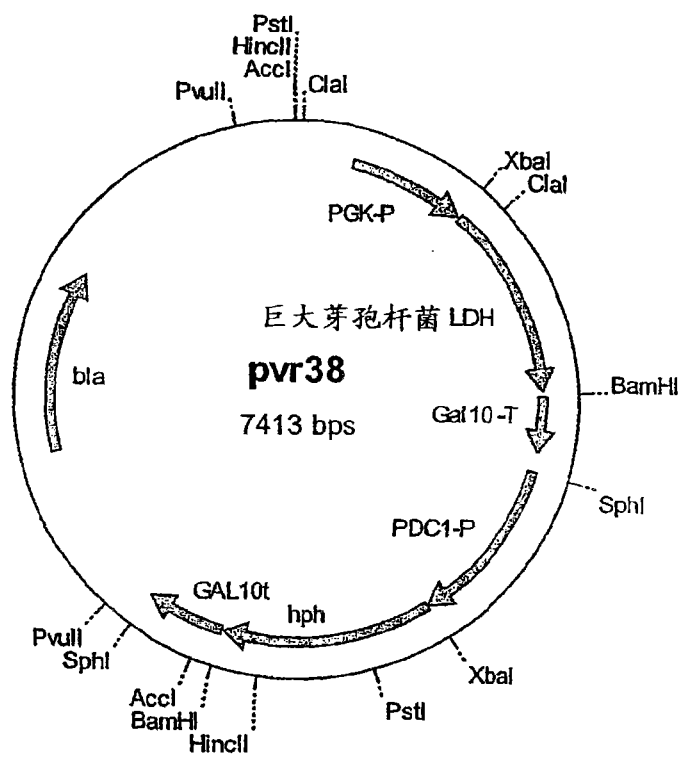


图 14

用于DNA靶向整合入马克斯鲁维酵母的丙酮酸脱羧酶1基因座的载体pBH5b

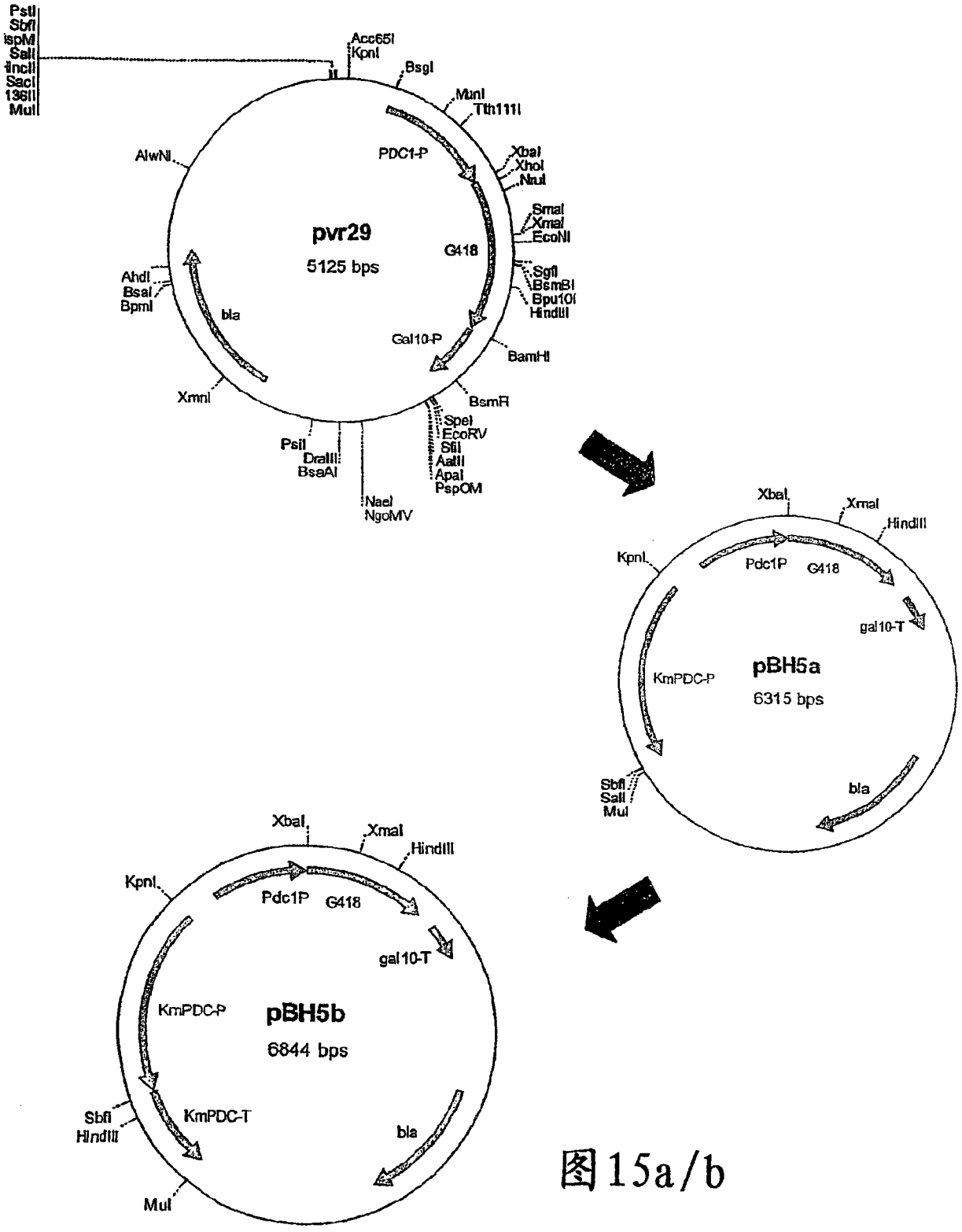


图15a/b

用于Lh-L-LDH靶向整合入马克斯鲁维酵母的丙酮酸脱羧酶1基因座的载体pBH8

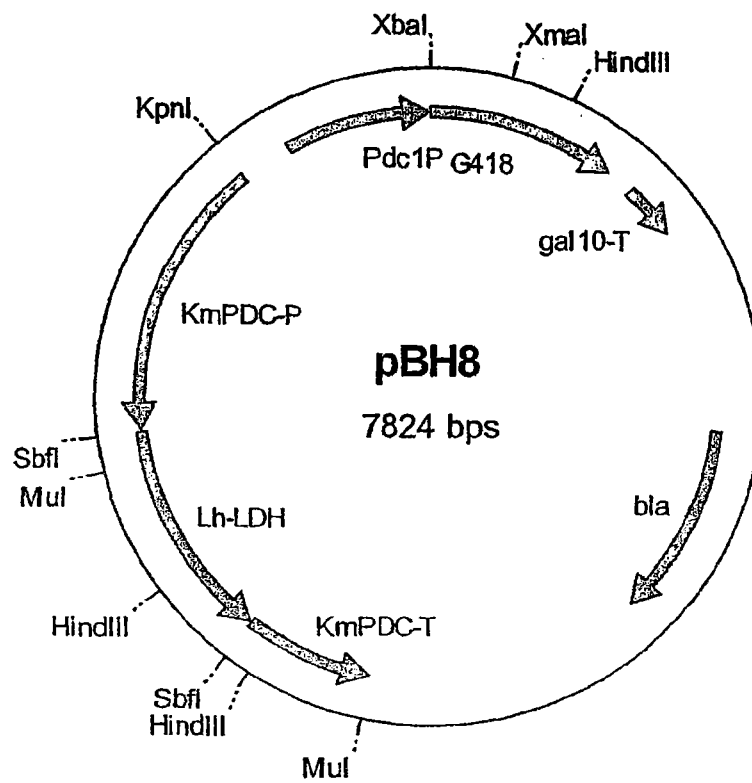
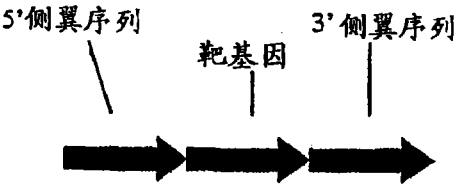
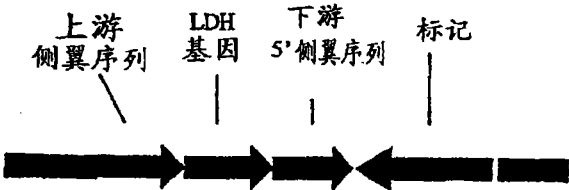


图 16

靶基因



载体



第一次交换

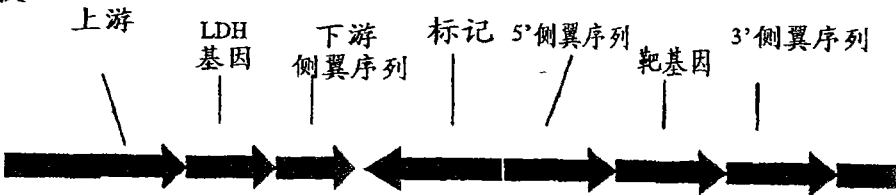


图17A

第二次交换变化

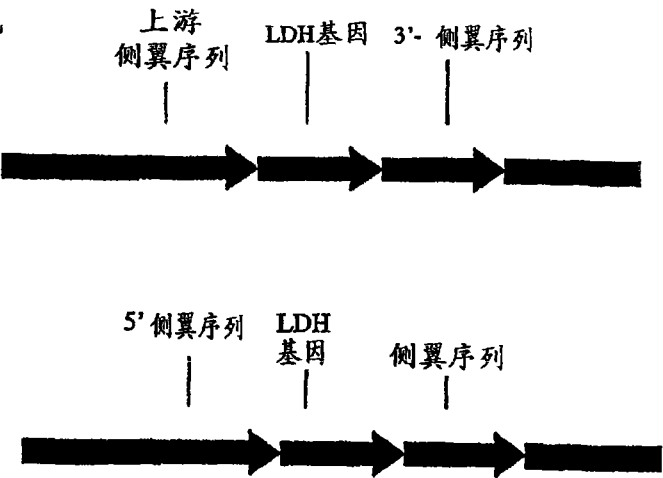


图17B