[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 13/20 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98809838.5

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1323171C

[22] 申请日 1998.9.30 [21] 申请号 98809838.5

[30] 优先权

[32] 1997.10. 4 [33] DE [31] 19743894.6

[32] 1998. 7.14 [33] DE [31] 19831609.7

[86] 国际申请 PCT/EP1998/006210 1998.9.30

[87] 国际公布 WO1999/018228 德 1999.4.15

[85] 进入国家阶段日期 2000.4.3

[73] 专利权人 德古萨股份公司

地址 德国哈瑙－沃尔夫冈

[72] 发明人 伯恩德·艾克曼斯

佩特拉·彼得斯－温迪希

赫尔曼·萨姆

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 范明娥

[56] 参考文献

EP0723011 1996.7.24

审查员 王佩兰

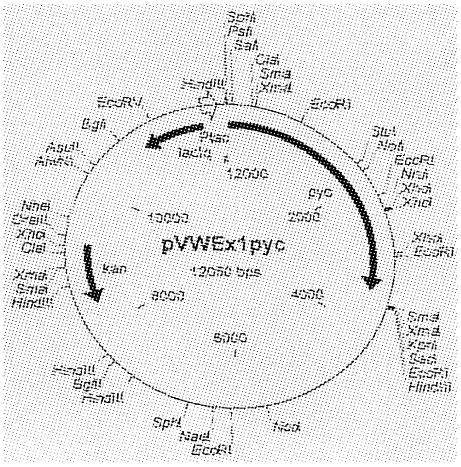
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称

天冬氨酸和/或谷氨酸系氨基酸的生物制备方法和该方法用的添加剂

[57] 摘要

本发明涉及天冬氨酸和/或谷氨酸系氨基酸的微生物制备方法，其中通过基因改变酶和/或产生相应氨基酸的微生物的丙酮酸羧化酶基因表达而提高丙酮酸羧化酶的活性。 另外，本发明涉及丙酮酸羧化酶基因和可用于本发明方法的添加剂。



1. 选自 L－赖氨酸、L－高丝氨酸、L－苏氨酸和 L-谷氨酸组成的组的 L－氨基酸的微生物制备方法，其特征在于发酵包含过表达的 pyc 基因的棒状杆菌，制备所需的 L－氨基酸，其中的过表达通过增加所述 pyc 基因的拷贝数来实现。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中 tac－启动子连接在所述 pyc 基因前方并且调节序列与该基因相连。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中所用的棒状杆菌通过含有 pyc 基因的载体转化。

4. 根据权利要求 2 的方法，其中所用的棒状杆菌通过含有 pyc 基因的载体转化，所述的 pyc 基因的前方连接有 tac 启动子并且与调节序列相连。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中所述 pyc 基因是内源基因。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中所述棒状杆菌所含参与相应氨基酸合成的中央代谢的代谢物之比例升高。

7. 根据权利要求 1 的方法，其中在所用的棒状杆菌中，与相应氨基酸的生物合成途径相竞争的生物合成途径的活性降低。

8. 根据权利要求 1 的方法，其中所用的丙酮酸羧化酶基因是编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 的蛋白质的基因。

9. 根据权利要求 2 的方法，其中所述丙酮酸羧化酶基因是具有 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 165－3587 的核苷酸序列的基因。

天冬氨酸和/或谷氨酸系氨基酸的生物制备方法和该方法用的添加剂

本发明涉及权利要求 1-17 天冬氨酸和/或谷氨酸系氨基酸的生物制备方法、权利要求 18-23 的丙酮酸羧化酶基因、权利要求 24 的基因构建体、权利要求 25 的载体、权利要求 26-31 的转化细胞以及权利要求 32-37 的用途。

氨基酸具有很大的经济价值，因为，氨基酸有各种各样的用途。例如：L-赖氨酸以及 L-苏氨酸、L-蛋氨酸和 L-色氨酸可用作饲料添加剂，L-谷氨酸用作香料添加剂，L-异亮氨酸和 L-酪氨酸用于制药工业，L-精氨酸和 L-异亮氨酸用作药物或 L-谷氨酸、L-天冬氨酸和 L-苯丙氨酸用作合成精细化工品的原料。

制备各种氨基酸的一个优选方法是借助于微生物的生物制备技术；因为用这些方法能直接获得生物有效和光学活性形式的各种氨基酸，同时可使用廉价、易得的原料。微生物例如可使用谷氨酸棒杆菌和其同源物 ssp. flavum 和 ssp. 乳酵母(lactofermentum)(Liebl 等人，Int J System Bacteriol 1991,41: 255-260)，也可使用大肠杆菌和其有关细菌。

这些细菌以正常方式或只以生长需求量产生氨基酸，因此形成不过量的氨基酸，并且被回收。这是基于按各种方法控制细胞内氨基酸的生物合成的缘故。因此，去除控制机制以提高产率的各种方法已经是众所周知的。在这些方法中，为了除去有效调节生物合成，例如引入氨基酸类似物。为此，现有技术公开了一种方法，该方法使用了抗 L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸类似物的棒状杆菌菌株(JP19037/1976 和 39517/1978)。同样也公开了一种方法，该方法为了抑制控制机制而使用了抗 L-赖氨酸或 L-苏氨酸类似物的细菌(EP0205849、GB2152509)。

此外，通过重组体 DNA 技术构建的微生物也是已知的，其中同样是调节生物合成，在该生物合成中克隆并表达基因，该基因是编码不再反馈抑制的关键酶。例如，众所周知：一种重组体它产生 L-赖氨酸的细菌具有质粒编码、抗反馈的天冬氨酸激酶(EP0381527)。同样还公开了一种重组体它产生 L-苯丙氨酸的细菌，该细菌具有抗反馈的预苯酚酸脱氢酶

(JP123475/1986, EP0488424)。

除此以外，通过基因的过表达来提高氨基酸的产率，所述的基因不对氨基酸合成的反馈敏感性酶进行编码。这里例如通过提高双氢吡啶二羧酸合成酶的合成改进赖氨酸的形成(EP0197335)。同样通过提高苏氨酸脱水酶的合成改进异亮氨酸的形成(EP0436886)。

为提高氨基酸产率进行了其他的尝试，目的在于更好地制备中央物质交替(Zentralstoffwechsel)的细胞初级代谢物。众所周知，通过重组体技术获得的转酮酶的过表达可改进 L-色氨酸、L-酪氨酸或 L-苯丙氨酸产物的形成(EP0600463)。而降低棒状杆菌中烯醇丙酮酸磷酸羧化酶的活性改进了芳香族氨基酸的形成(EP03331145)，相反，提高棒状杆菌中烯醇丙酮酸磷酸羧化酶的活性则增加了天冬氨酸系氨基酸的析出(EP0358940)。

在氨基酸的生长，特别是氨基酸生产条件下，三羧酸循环(Cyclus)必须连续、有效地用诸如草乙酸酯类的 C_4 化合物补充，以代替氨基酸合成中提取的中间产物。直到不久之前，人们还认为：棒状杆菌中的烯醇丙酮酸磷酸羧化酶起所谓的添补作用(Kinoshita, 《工业微生物生物学》, 1985: 115-142, Benjamin/Cummings Publishing 公司，伦敦; Liebl, 《原核生物 II》, 1991: 1157-1171, Springer Verlag N.Y.; Vallino 和 Stephanopoulos, 《生物技术、生物工程》 1993, 41: 633-646)。但是，已经发现：烯醇丙酮酸磷酸羧化酶负突变体与所有试验介质的各种起始菌株同样生长(Peters-Wendisch 等人，FEMS Microbiology Letters 1993, 112: 269-274; Gubler 等人，Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40: 857-863)。结果表明：烯醇丙酮酸磷酸羧化酶基本上不生长，对于添补反应无作用或仅起次要作用。上述结果进一步说明：在棒状杆菌中必须至少有另一种酶，这种酶对合成生长所需的草乙酸酯起作用。实际上，最近还在棒状杆菌的透化细胞中发现了丙酮酸羧化酶活性(Peters-Wendisch 等人，《微生物学》, 1997, 143: 1095-1103)。这些酶受到了 AMP、ADP 和乙酰基辅酶 A 的有效抑制，并且在乳酸的存在下形成大量的碳源。从生长过程中这种酶主要补充三羧酸循环(Cycluses)这一点出发，可以预料：提高基因表达或酶活性不会或者说充其量不会太提高属于天冬氨酸系的氨基酸。还可以预料：提高丙酮酸羧化酶的基因表达或酶活性同样对生产其他系列的氨基酸没有影响。

现在令人惊奇地发现：在通过基因改变酶而提高丙酮酸羧化酶活性后

和/或在提高丙酮酸羧化酶基因表达后，能提高天冬氨酸和/或谷氨酸系氨基酸的生物制备。结果表明：特别是有丙酮酸羧化酶基因的提高拷贝数的菌株在培养基中析出约 50％以上的赖氨酸、40％以上的苏氨酸和 150％以上的高丝氨酸菌株。结果进一步表明：谷氨酸的产量也是令人惊奇地大幅度增加(特别参照实施例第 6 点和表 4)。

为了提高酶活性而进行的丙酮酸羧化酶的基因改变最好通过内源基因的突变进行。这种突变既可按常规方法(例如通过 UV 辐射或突变诱发的化学品)进行，也可借助于基因技术方法例如缺失、插入和/或核苷酸交换进行。

通过提高基因拷贝数和/或通过增强对基因表达有正影响的调节元件可提高丙酮酸羧化酶的基因表达。因此，调节元件的增强优选在转录平面水平上进行，其中尤其是提高转录信号。例如可按下列方式进行：通过改变在结构基因之前的启动子序列来提高启动子的效果，或用更为有效的启动子替换该启动子。也可通过相应地影响与丙酮酸羧化酶基因相连的调节基因来增强转录。这可可通过，例如调节基因序列的突变来影响调节蛋白与需调节的丙酮酸羧化酶基因的 DNA 的结合效力，使得转录增强并以此提高基因表达。此外，丙酮酸羧化酶基因也可以与作为调节序列的所谓的“增强子”相连，该增强子通过改善 RNA 聚合酶和 DNA 之间的互换同样能提高丙酮酸羧化酶的基因表达。此外，也可增强翻译，例如提高 m-RNA 的稳定性。

为了提高基因拷贝数，在一个基因构建体或载体中构建进丙酮酸羧化酶基因。基因构建体具体含有与丙酮酸羧化酶基因相连的调节序列，优选是增强基因表达的调节序列。对于基因构建体中的丙酮酸羧化酶基因的掺入来说，优选从棒状杆菌属的微生物菌株中分离的基因并在产生氨基酸的微生物菌株具体是棒状杆菌或在大肠杆菌或粘质沙雷氏菌属中转化。对于本发明的方法，特别合适的是从谷氨酸棒状杆菌或谷氨酸棒状杆菌 ssp. flavum 或棒状杆菌 ssp. 乳酵母中分离的基因。在分离基因后并用已知的载体在体外重组(例如参照 Simon 等人，《生物技术》，1983，1：784-791；Eikmanns 等人，《基因》，1991，102：93-98)，通过电穿孔(Liebl 等人，FEMS Microbiology Letters 1991，65：299-304)或接合(Schafer 等人《细菌学杂志》，1990，172：1663-1666)转化成产生氨基酸的菌株。优选使用

这样的氨基酸产品作为宿主菌株，即它们在合成相应的氨基酸时失调(dereguliert)和/或使相应的氨基酸具有提高的输出载体活性。此外，优选的是在中心代谢代谢物中含量高并且参与相应氨基酸合成的菌株和/或在不参与相应氨基酸合成的中心代谢代谢物中含量低，尤其是在负责竞争反应的代谢物中的菌株；即优选这样的菌株，对相应的氨基酸生物合成法竞争的生物合成法具有降低的活性。尤其是抗 L-天冬氨酸-β-甲酯(AME)的有柠檬酸-合成酶-活性降低的形成棒状的(coyneformer)微生物菌株(EP0551614)。

在进行分离后获得具有核苷酸序列的丙酮酸羧化酶基因，该基因编码 SEQ ID No.2 列出的氨基酸序列或其等位基因变异体或具有 SEQ ID No.1 核苷酸 165-3587 的核苷酸序列或基本上相同作用的 DNA 序列。还可获得这样的基因，该基因具有相应 SEQ ID No.1 的核苷酸 20-109 的核苷酸序列或基本上作用相同的 DNA 序列的蛋白质启动子。等位基因变异体或相同作用的 DNA 序列尤其包括功能衍生物，它们是通过缺失、插入和/或取代核苷酸而由相应的序列中获得的，其中酶活性或酶功能得到保持或甚至得到提高。最好在本发明的方法中使用这种丙酮酸羧化酶基因。

有或没有在先启动子或者有或没有、相连的调节基因的丙酮酸羧酸酶基因，可在先或在后结合一个或多个 DNA 序列，以便在基因构建体中包含该基因。

优选将 tac 启动子($lacI^q$基因)连接到丙酮酸羧化酶基因前方，所述启动子与调节序列相连。

通过克隆丙酮酸羧化酶基因获得质粒，该质粒含有基因并且适于转化氨基酸生产者。通过转化获得的细胞优选是含有可复制的基因(即染色体上附加拷贝形式的基因)的棒状杆菌的转化细胞，其中所述的基因拷贝是通过在基因组的任一位置上通过重组而整合。

实施例

1.由谷氨酸棒状杆菌克隆丙酮酸羧化酶基因

由酿酒酵母(《生物化学杂志》，1988，263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991，229: 307-315)，人(Biochim Biophys Acta 1994,1227: 46-52)、

小鼠(Proc Natl Acad Sci,USA 1993，90: 1766-1770)、埃及伊蚊属(aegypti)(EMBL-基因库: 登记号 L36530)的所有至今已知的丙酮酸羧化酶(pyc-)基因的保守区开始或以及由结核分枝杆菌(EMBL-基因库: 登记号 U00024)开始合成PCR引物(MWG生物技术)。该引物相当于结核分枝杆菌pyc基因的碱基810-831和1015-1037。用这些引物借助于PCR按Innis等人的标准方法(PCR 方案，《方法和应用导论》，1990，Academic 出版)对于非产生的同源的引物从谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032的染色体DNA(例如Eikmann等人公开，《微生物学》，1994，140: 1817-1828)中分离约200bp的片段，并进行扩增。200bp的大小符合pyc基因的要求。正如Sanger等人(Proc Natl Acad Sci USA 1977,74: 5463-5467)所描述的，测序 PCR 产物。测序是用荧光标记的ddNTPs和DNA自动测序仪(生物系统使用)进行。

基于谷氨酸棒状杆菌的DNA片段制备下列同源寡核苷酸:

pyc 1 5′- CGTCTTCATCGAAATGAAC-3′

pyc2 5′- ACGGTGGTGATCCGGCACT-3′

将寡核苷酸用作 PCR 引物以分离由谷氨酸棒状杆菌的丙酮酸羧化酶(pyc)基因用的探针。向谷氨酸棒状杆菌染色体DNA和标记洋地黄毒苷的核苷酸的PCR反应中加入引物。按Boehringer Mannheim公司的 'PCR DIG 标记试剂盒' 步骤进行反应。可用这种添加物扩增洋地黄毒苷标记的 DNA 片段，该片段的大小相当于约 200bp 的预定大小。然后使用由此制备的 pyc 探针，用于通过Southern印迹杂交鉴定在谷氨酸棒状杆菌的染色体DNA中的DNA片段，在该DNA片段上定位有pyc基因。对此，用限制酶HindIII、SphI、SalI、DraI、EcoRI和BamHI切割各2-5微克谷氨酸棒状杆菌WT的染色体DNA，在20V、于0.8%的琼脂糖凝胶中进行凝胶电泳16小时分离获得的相应大小的DNA片段。在将琼脂糖凝胶中的DNA片段按Southern印迹变性(J Mol Biol 1975，98: 503-517)，用Pharmacia LKB的Vacu基因印迹装置(Uppsala ，瑞典)从转移到尼龙膜(Schleicher 和 Schull,Dassel,瑞士的Nytran N13)上的凝胶基质通过真空支持进行分离，固定，借助于用碱性磷酸酶转变 NBT/X-磷酸盐，检测洋地黄毒苷标记。接着，可用与pyc-DNA-探针杂交的染色体片段检测下列染色体片段: 17kb HindIII 片段、6.5kb SalI 片段和1.35kb EcoRI 片段。

分离和亚克隆17kb HindIII片段。对此，使用粘粒pHC79中来自谷氨

酸棒状杆菌的染色体 DNA 的粘粒基因库，这代表了 99％谷氨酸棒状杆菌的基因组(Mol Microbiol 1992, 6:317-326)。按 Sambrook 等人的 $CaCl_2$法(《分子克隆》，实验室手册，1989，Cold Spring Habour 实验室印刷)。用这种基因库转化大肠杆菌菌株 DH5α并用 50 微克/升卡那酶素使每个 LB-琼脂板上平铺(ausplattiert)了约 300 株菌落(总共 5000 株菌落)。接着将获得的转化体产物转移到 Nytran N13-滤膜中，为碱性裂解细胞和变性 DNA，在用 0.5M NaOH 和 1.5M NaCl 浸泡的 Whatmann 纸上将其温育 5 分钟。接着用 1MTris/HCl pH7.5 和 1.5M NaCl 进行中和。在温育滤纸 2×SSC 后，通过 366 纳米的 UV 辐射将释放的 DNA 固定在滤膜上。接着在 50℃、3×SSC，0.1％SDS 中振动除去剩余的细胞碎片。使用这种形式的滤膜用特异性 pyc 探针进行杂交，如 Southern 所公开的(J Mol Biol 1975,98，503-517)。由 pyc 探针杂交鉴别 3 个转化体。按 Birnboim 的碱性裂解法(Meth Enzymol 1983，100: 243-255)用质粒-制剂从该转化体中分离出粘粒 DNA，接着通过限制和 Southern 印迹分析对存在的 HindIII 片段进行检测。含 40kb 插入片段的粘粒 pHC79-10 总共携带了 17kb HindIII 片段并进一步进行分析。结果表明：在用内切核酸酶 SaII 和 EcoRI 限制后，获得了与染色体 DNA 相同的杂交片段，即 6.5kb SaII 片段和 1.35kb EcRI 片段。通过用 HindIII 限制从粘粒中分离出 17kb HindIII 片段并连接在同样用 HindIII 切割的大肠杆菌载体 pUC18 上。在产生的载体 pUCpyc 中进行片段的限制分析。图 1 示出了片段的物理图谱。

2.丙酮酸羧化酶基因的测序

在其他的亚克隆步骤中，通过用相应的限制酶如 1.35kb EcoRI 片段、1.6kb EcoRI-EcoRI-StuI 片段以及一部分和 0.85kb SaII-EcoRI 片段重叠的 1.6kb ClaI 片段限制而从质粒 pUCpyc 中分离 0.85kb SaII-EcoRI 片段。通过连接，将该片段克隆在相应的限制载体 pUC18 中，接着按照如上所述的 Sanger 等人的方法进行测序(Proc Natl Acad Sci USA 1977,74:5463-5467)。用德国肿瘤研究中心(Heidelberg)的程序包 HUSAR(释放 3.0)分析获得的核苷酸序列。片段的序列分析获得了 3576bp 完全敞开的读框(Leseraster)，对 1140 氨基酸的蛋白质序列进行编码。将得

到的蛋白质序列与 EMBL 基因数据库(Heidelberg)进行对比，表明与所有已知的丙酮酸羧化酶类似。人们发现：高度的同一性(62％)是与来自结核分枝杆菌(EMBL 基因库：登记号 U00024)的丙酮酸羧化酶的同一性。在考虑到保守氨基酸交换的情况下，相似性为 76％。与其他生物体的丙酮酸羧化酶对比，同一性为 46-47％，类似的氨基酸为 64-65％(《基因》，1997，191：47-50；《细菌学杂志》，1996，178：5960-5970；Proc Natl Acad Sci USA 1993,90:1766-1770;《生物化学杂志》，1996，316：631-637；EMBL 基因库：登记号 L36530;《生物化学杂志》，1988，263：11493-11497；Mol Gen Genet 1991，229：307-315)。由这些结果得出：克隆的片段是来自谷氨酸棒状杆菌的丙酮酸羧化酶基因。该基因的核苷酸序列是 SEQ ID No1，相应的氨基酸序列为 SEQ ID No2。

3. 丙酮酸羧化酶基因的过表达

为了过表达来自谷氨酸棒状杆菌的丙酮酸羧化酶基因，将来自质粒 pUCpyc 的基因作为 6.2kb SspI-ScaI 片段克隆在大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌摇摆(swing)载体 pEK0 中(《基因》1991，102：93-98)，用限制内切核酸酶 EcoRI 和 PstI 切割该载体。借助于科列诺聚合酶处理，将突出端添满(EcoRI)或连接(abgedaut)(PstI)成平端并且将线性化的载体与 6.2kb SspI-ScaI 片段连接。首先将获得的构建体 pEK0pyc 在大肠杆菌菌株 DH5α 中转化，接着从获得的转化体中分离质粒 DNA，通过限制控制插入片段的正确性。接着通过电穿孔将 DNA 加入到菌株 SP733 中(FEMS Microbiol Lett 1989,65:299-304)。该菌株是限制性负谷氨酸棒状杆菌菌株 R127 的突变体(Dechema 生物技术会议 1990，4：323-327，化学出版社)，它们通过化学突变制得，其特征在于：它不可能在有作为单个碳源的丙酮酸和乳酸的基本培养基上生长(《微生物学》1997，143：1095-1103)。这种表型是以丙酮酸羧化酶基因缺损而识别的，可通过引入来自谷氨酸棒状杆菌的丙酮酸羧化酶基因进行补偿，即质粒 pEK0pyc 携带的菌株与起始菌株相反，前者在有作为单个碳源的乳酸基本培养基上具有生长的能力。因此，结果证明：基因编码了功能性的丙酮酸羧化酶。

此外，质粒 pEK0pyc 通过电穿孔被转化成谷氨酸棒状杆菌野生型

ATCC13032。与有关的野生型 ATCC 13032 相比，研究所制成的菌株 WT(pEKOpyc)的丙酮酸羧化酶活性。在有 0.5％乳酸的复合介质(Luria-Bertani,《分子克隆》，实验手册，1989，Cold Spring Harbour 实验室出版)中，并在有 2％乳酸或 4％葡萄糖的基本培养基上培育菌株，并且按 Peters-Wendisch 等人描述的相应方法进行丙酮酸羧化酶试验(《微生物学》1997，143：1095-1103)。分析结果(表 1)表明：pEKO-pyc-携带的菌株中丙酮酸羧化酶活性比起始菌株高约 4 倍。

4.通过谷氨酸棒状杆菌菌株 DG52-5 中的丙酮酸羧化酶基因的过表达增强赖氨酸的积累

为了检测基因对赖氨酸生产菌株 DG52-5 中的丙酮酸羧化酶基因的过表达效果(《基因微生物杂志》1988，134：3221-3229)，使用表达载体 pVWEX1 以促进 IPTG 可诱导表达。在该载体中无启动子克隆 pyc 基因。为此，先合成 PCR 引物(根据 SEQ ID No.1，在核苷酸序列中，引物 1＝位置 112-133；引物 2＝位置 373-355)并借助于 PCR 扩增丙酮酸羧化酶基因的 261bp 的无启动子的开始范围。如此地选择引物，以使得引物 1 可产生 PstI 切割位点，引物 2 可产生 BamHI 切割位点。PCR 后分离制得的 274bp PCR 产物，以连接多联体和接着用限制酶 PstI 和 BamHI 切割，通过乙醇沉淀浓缩限制产物，接着与切割的 PstI-BamIII 的载体 pVWEXI 连接。通过限制试验获得构建体 pVWEXI-PCR。通过 RcaI-Klenow-SaII 处理从载体 pEKOpyc 中分离 pyc 基因的末端范围并连接到 BamHI-Klenow-SalI 处理的载体 pVWEX1-PCR 上。通过限制酶切作图分析获得的构建体 pVWX1pyc。图 2 示出了质粒的物理图谱。

通过电穿孔将质粒引入到谷氨酸棒状杆菌菌株 DG52-5 中。作为对照，在无插入片段的情况下用载体 pVWEXI 转化菌株 DG52-5，对比 3 种不同转化体的 L 赖氨酸析出。对此，在复合介质中(2×TY；《分子克隆》，实验室手册，1989，Cold Spring Harbour 实验室出版，含有 50 微克/升卡那霉素)培育 DG52-5(pVWEXI)1、2 和 3 以及 DG52-5(pVWEXIpyc)3、4 和 6，并由各预培养基中分别接种各发酵介质 CGXII(《细菌学杂志》1993，175：5595-5603)。为使质粒保持稳定，该介质还含有卡那霉素。每次进行 2 种平行添加，其中向一个烧瓶中添加 200 微克 IPTG/毫升，而第二个烧瓶不含

IPTG。在 30℃、在 120Upm 的旋转摇动器上培养 48 小时后，测定在该介质中积累的赖氨酸量。用高压液相色谱法进行氨基酸浓度的测量(《色谱杂志》，1983，266：471-482)。表 2 示出了发酵结果，其中所给出的值分别是利用各种克隆的 3 次试验得出的平均值。结果表明：丙酮酸羧化酶基因的过表达导致介质中赖氨酸的积累增加约 50％。因此使用隐蔽的和公开的基因作为丙酮酸羧化酶的补充酶使得大大提高 L-赖氨酸的形成的方法成为可能。

5.通过谷氨酸棒状杆菌菌株 DM368-3 中的丙酮酸羧化酶基因的过表达增强苏氨酸和高丝氨酸的积累

与 L-赖氨酸的形成中的试验类似，也通过对丙酮酸羧化酶基因的过表达检测在培养上清液中苏氨酸的积累。对此，按第 4 点描述，用质粒 pVWEX1pyc 以及作为对照用质粒 pVWEX1 转化苏氨酸产物菌株谷氨酸棒状杆菌 DM368-3(DegussaAG)，检测 3 种不同转化体中每一种的苏氨酸的析出。对此，在复合介质中(2×TY，含有 50 微克/升卡那霉素)培育 DM368-3(pVWEXI)1、2 和 3 以及 DM368-3(pVWEXIpyc)1、2 和 3，并且在每种情况下，自预培养阶段分别接种发酵介质 CGXII(《细菌学杂志》1993，175：5595-5603)。为使质粒保持稳定，该介质还含有卡那霉素。每次进行 2 个平行试验组，其中向一个烧瓶中添加 200 微克 IPTG/毫升，而第二个烧瓶不含 IPTG。在 30℃、在 120Upm 的旋转摇动器上培养 48 小时后，测定在该介质中积累的苏氨酸量。使用高压液相色谱法进行氨基酸浓度的测量(《色谱杂志》，1983，266：471-482)。表 3 示出了发酵结果，其中所给出的值分别是利用各种克隆由每 3 次试验得出的平均值。结果表明：丙酮酸羧化酶基因的过表达导致介质中苏氨酸的浓度增加约 40％。因此，在 L-苏氨酸的形成的过程中使用隐蔽的和公开的基因作为丙酮酸羧化酶的补充酶可大大提高 L-苏氨酸的形成。

氨基酸浓度的测定进一步表明：令人惊奇地是有过表达的丙酮酸羧化酶基因的菌株使在介质中析出的高丝氨酸比没有过表达的菌株高出约 150％。相应的结果，同样示于表 3，这很明显，通过本发明方法不仅苏氨酸而且高丝氨酸都有重大的改良。

6.通过野生型谷氨酸棒状杆菌菌株中的丙酮酸羧化酶基因的过表达增强谷氨酸的积累

与试验 L-赖氨酸、L-苏氨酸和 L-高丝氨酸的形成类似(参见上文第 4 和 5 点)，也通过对丙酮酸羧化酶基因的过表达检测在培养基上清液中谷氨酸的积累。对此，如第 4 点的描述，用质粒 pVWEX1pyc 以及作为对照用质粒 pVWEX1 转化野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032，检测每 2 种不同转化体的谷氨酸的析出。对此，在复合介质中(2×TY，含有 50 微克/升卡那霉素)培育谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032(pVWEXIpyc)D1 和 D2 以及谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032(pVWEXIpyc)1 和 2，并且在每种情况下，自预培养阶段分别接种发酵介质 CGXII(《细菌学杂志》1993，175: 5595-5603)。为使质粒保持稳定，该介质还含有卡那霉素。为了诱导谷氨酸析出，在接种后 6 小时在介质中加入 25 毫克/毫升的 Tween60。进行 2 组平行试验，其中向一个烧瓶中添加 200 微克 IPTG/毫升，而第二个烧瓶不含 IPTG。在 30℃、在 120Upm 的旋转摇动器上培养 48 小时后，测定在该介质中积累的谷氨酸量。同样用高压液相色谱法进行氨基酸浓度的测量(《色谱杂志》，1983，266: 471-482)。表 4 示出了发酵结果，其中所给出的值分别是利用不同克隆的 2 次试验得出的平均值。结果表明：丙酮酸羧化酶基因的过表达导致介质中谷氨酸的浓度增加约 500％。因此，用隐蔽的和公开的基因作为丙酮酸羧酸酶的添补酶可大大提高 L-谷氨酸的形成。

表 1

菌株	IPTG[微克/毫升]	丙酮酸羧化酶 [毫微摩尔 分钟$^{-1}$毫克 干重$^{-1}$]
13032(pEK0pyc)	0	75±13
ATCC 13032	0	19±4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88±13
	0	11±2
DG52-5(pVWEX1)	200	5±2
	0	6±1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76±10
	0	12±3
DM368-3(pVWEX1)	200	10±1
	0	11±2

表 2

菌株	IPTG[微克/毫升]	赖氨酸[mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35.4±2.6
	0	23.6±2.9
DG52-5(pVWEX1)	200	23.3±2.9
	0	22.1±4.0

表 3

菌株	IPTG[微克/毫升]	苏氨酸[mM]	高丝案酸[mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10.2±0.5	14.4±1.2
	0	7.9±1.0	5.6±0.2
DM368-3(pVWEX1)	200	8.0±0.5	5.8±0.7
	0	7.5±0.8	6.1±1.0

表 4

菌株	IPTG[微克/毫升]	谷氨酸[mM]
ATCC 13032	200	11±2
ATCC 13032	0	13±2
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	200	67±4
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	0	32±4

序列记录

（1）一般数据:

（i）申请人:

（A）名称: Juelich GmbH 研究中心

（B）街道: Postfach 1913

（C）地点: Juelich

（E）国家: 德国

（F）邮编: 52425

（ii）本发明的特征: 丙酮酸羧酸酶

（iii）序列的总数: 2

（iv）计算机易读文本:

（A）数据载体: Floppy 盘

（B）计算机: IBM PC compatible

（C）驱动系统: PC-DOS/MS-DOS

（D）软件: PatenIn Release #1.0 ,Version #1.30（EPA）

（2）SEQ ID No:1 数据:

（i）序列标记:

（A）长度: 3728 碱基对

（B）种类: 核苷酸

（C）束状形式: 单束

（D）拓扑学: 线性

（ii）分子种类: 基因组-DNA

（xi）序列描述: SEQ ID No:1

```
CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA      60
AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG     120
CTATCACCCT TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTCG ACTCACACAT     180
CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC     240
GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCGTGAAG     300
ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT     360
CACCAGTCAA GGCGTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG     420
```

CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCCGCGAGT 480

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCCAGA GGTTCTTGAT CTCACCGGTG 540

ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTTG GCGGAATCCA 600

CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT 660

TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTTGCT TCACCTGATG 720

AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG 780

CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG 840

ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC 900

AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT 960

GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT 1020

TCTTGGTCGA TGAAAAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG 1080

AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG 1140

CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG 1200

CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG 1260

GAACTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC 1320

AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG 1380

GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT 1440

CTGGTGTTGC AACCAACATT GGTTTCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT 1500

CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCCGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG 1560

CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAGCCTC 1620

ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGCAGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC 1680

TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC 1740

GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTACTGATAC CACCTTCCGC GATGCACACC 1800

AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTCG 1860

CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG 1920

CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC 1980

CGAATGTAAA CATTCAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCCGTACC 2040

CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTTAAGG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC 2100

GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAATCGAC GCAGTCCTGG 2160

AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA 2220

ATGAAAAGCT CTACACCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG 2280

GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA 2340

AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCACGACA 2400

CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG 2460

ACGGTGCTTC CGCACCACTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG 2520

CTGCATTCGC GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG 2580

AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC 2640

CAACCGGTCG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC 2700

AGGCCACCGC ACTGGGCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG 2760

TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC 2820

TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA 2880

AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCCTCCAG 2940

GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC 3000

CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC 3060

GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC 3120

GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG 3180

AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG 3240

ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TGCGCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC 3300

AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTCACCGCA ACCGCAGAAA 3360

AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATT CGCTGGTGTT GTCACCGTGA 3420

CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCAGT CGCAATCATC GAGGCTATGA 3480

AGATGGAAGC AACAATCACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCCTG 3540

CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GGCGACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA 3600

AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT 3660

GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG 3720

GCTCAAAG

（2）SEQ ID No 数据：2：

（i）序列标记

（A）长度：1140 氨基酸

（B）种类：氨基酸

（C）束状形式：单束

（D）拓扑学：线性

（ii）分子种类：蛋白质

（xi）序列描述：SEQ ID No:2：

```
Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu
1               5                  10                  15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu
            20                  25                  30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly
        35                  40                  45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu
    50                  55                  60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala
65                  70                  75                  80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu
                85                  90                  95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr
            100                 105                 110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser
        115                 120                 125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu
    130                 135                 140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly
145                 150                 155                 160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg
                165                 170                 175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
            180                 185                 190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr
```

195 200 205

Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu
210 215 220

Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser
225 230 235 240

Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His
245 250 255

Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe
260 265 270

Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val
275 280 285

Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln
290 295 300

Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys
305 310 315 320

Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu
325 330 335

Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile
340 345 350

Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile
355 360 365

Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala
370 375 380

Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val
385 390 395 400

Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala
405 410 415

Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile
420 425 430

Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg
435 440 445

Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro
450 455 460

Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val
465 470 475 480

Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro

485 490 495

Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser
500 505 510

Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu
515 520 525

Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala
530 535 540

His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro
545 550 555 560

Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Lys Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu
565 570 575

Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu
580 585 590

Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val
595 600 605

Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro
610 615 620

Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser
625 630 635 640

Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln
645 650 655

Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala
660 665 670

Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys
675 680 685

Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys
690 695 700

Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg
705 710 715 720

Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp
725 730 735

Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala
740 745 750

Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala
755 760 765

Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile

770 775 780

Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu
785 790 795 800

Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr
805 810 815

Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg
820 825 830

His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr
835 840 845

Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala
850 855 860

Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser
865 870 875 880

Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp
885 890 895

Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser
900 905 910

Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp
915 920 925

Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys
930 935 940

Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala
945 950 955 960

Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro
965 970 975

Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr
980 985 990

Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg
995 1000 1005

Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg
1010 1015 1020

Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val
1025 1030 1035 1040

Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser
1045 1050 1055

Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys

1060 1065 1070

Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala
1075 1080 1085

Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala
1090 1095 1100

Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp
1105 1110 1115 1120

Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile
1125 1130 1135

Val Val Val Ser
1140

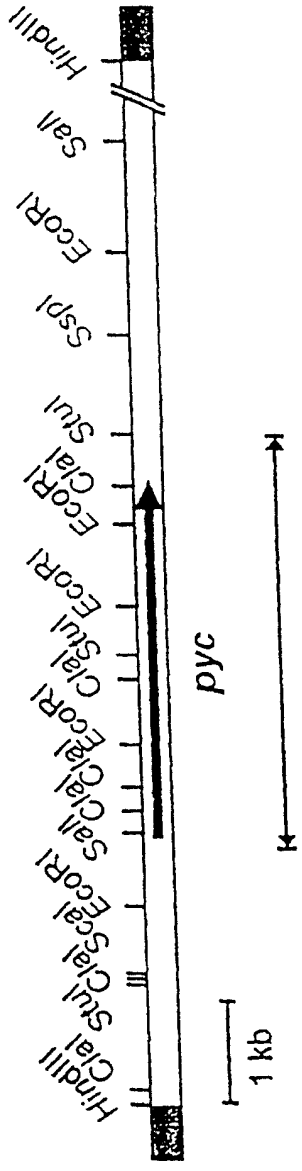

HindIII
SalI
EcoRI
SspI
StuI
EcoRI
ClaI
EcoRI
StuI
ClaI
EcoRI
SalI
ClaI
ClaI
EcoRI
HindIII
ClaI
StuI
ClaI
SacI
EcoRI
pyc
1 kb

图 1

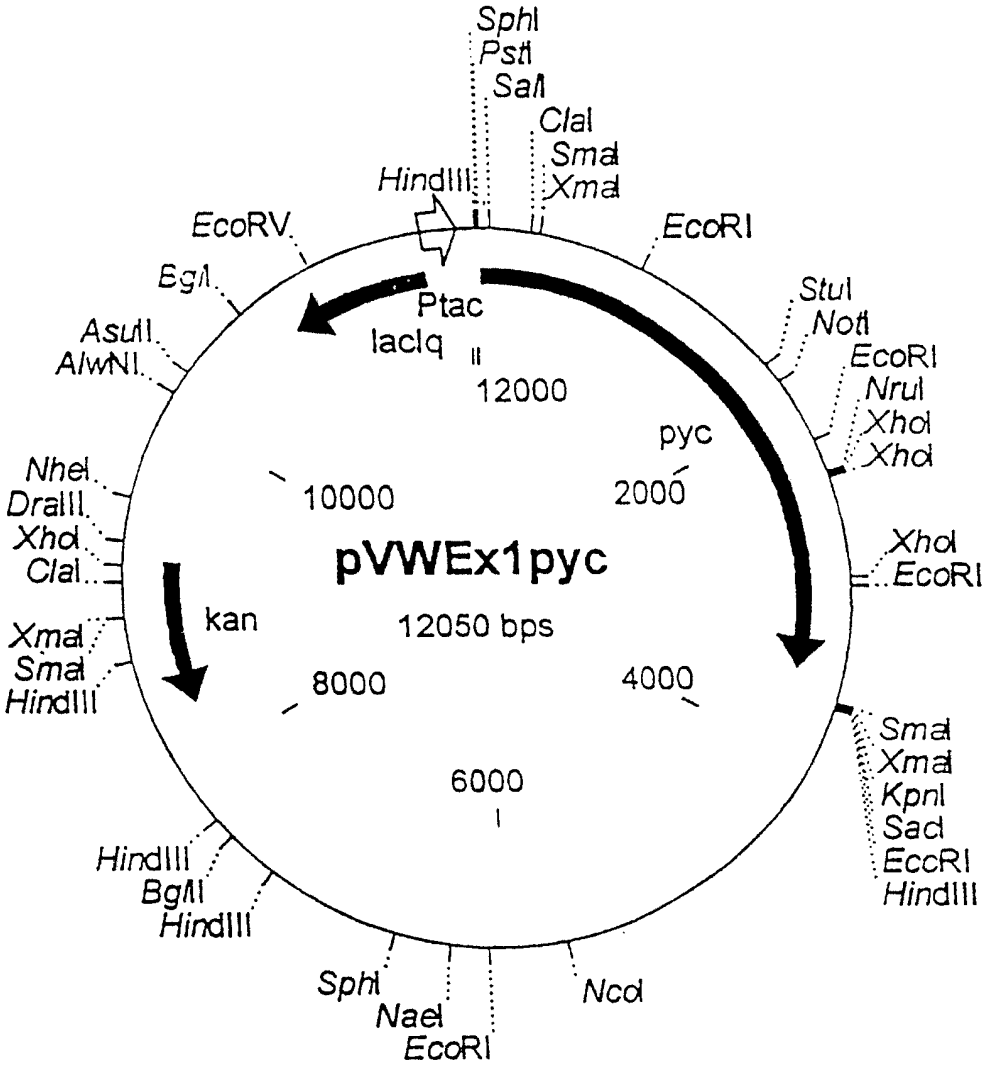

SphI
PstI
SalI
ClaI
SmaI
XmaI
HindIII
EcoRV
EcoRI
EgII
StuI
NotI
AsuII
AlwNI
EcoRI
NruI
XhoI
XhoI
Ptac
lacIq
12000
pyc
2000
10000
NheI
DraIII
XhoI
ClaI
pVWEx1pyc
12050 bps
XhoI
EcoRI
kan
XmaI
SmaI
HindIII
8000
4000
SmaI
XmaI
KpnI
SacI
EccRI
HindIII
6000
HindIII
BglII
HindIII
SphI
NaeI
EcoRI
NcoI

图 2