



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102209780 B

(45) 授权公告日 2016.02.10

(21) 申请号 200980144726.X

(22) 申请日 2009.11.09

(30) 优先权数据

08019492.1 2008.11.07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.05.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/064825 2009.11.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/052319 EN 2010.05.14

(73) 专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司
司

地址 荷兰海尔伦

(72) 发明人 马丁·莱玛恩 迈克尔·汉斯

汉斯-彼得·霍曼

迪特马尔·卢达尔特

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

C12N 1/08(2006.01)

C12P 25/00(2006.01)

C12N 15/75(2006.01)

(56) 对比文件

US 20030232406 A, 2003.12.18, 说明书摘要.

CN 1049185 A, 1991.02.13, 全文.

Mironov, AS. Relationship between the secondary structure and the regulatory activity of the leader region of the riboflavin biosynthesis operon in *Bacillus subtilis*. 《RUSSIAN JOURNAL OF GENETICS》. 2008, 第44卷(第4期), 399-404.

周世奇. 强启动子枯草芽孢杆菌核黄素操纵子整合型载体的构建并在枯草芽孢杆菌中的表达. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2007, 全文.

Mironov, AS. Relationship between the secondary structure and the regulatory activity of the leader region of the riboflavin biosynthesis operon in *Bacillus subtilis*. 《RUSSIAN JOURNAL OF GENETICS》. 2008, 第44卷(第4期), 399-404.

审查员 李振鹏

权利要求书1页 说明书28页

序列表26页 附图8页

(54) 发明名称

经改进的核黄素生产

(57) 摘要

本发明提供了经改进的核黄素(在本文中也称作维生素B2)生物技术生产,所述生产通过在含有核黄素生物合成基因的操纵子(rib操纵子)中进行的修饰,特别是相应的核黄素生物合成基因(rib操纵子)上游前导序列(rib前导区)的/中的修饰来完成。另外,本发明涉及带有所述经修饰的序列的经遗传改造的微生物,产生所述经修饰的序列/微生物的方法,及其用于生产核黄素的用途。

1. 编码经修饰的核黄素生物合成操纵子前导区的多核苷酸, 其为: 与组成型启动子融合了的、选自由 SEQ ID NO:42 中所示 1 到 135 并在 3' 端插入 5'-ATGG-3' 和 SEQ ID NO:42 中所示 1 到 165 组成的组的核苷酸序列所示的多核苷酸, 所述经修饰的多核苷酸在对应于 SEQ ID NO:42 中所示核苷酸序列的下述位置上编码氨基酸取代, 所述位置选自由 T31、G39、G40、G41、C55、C85、C86、G88、C93、A116、G121、C128 及其组合组成的组, 其中从包含所述经修饰的前导区的核黄素生物合成操纵子转录的完整的、全长的 rib mRNA 的量与处于野生型 rib 前导区控制下的转录相比被提高至少 5%。

2. 根据权利要求 1 的经修饰的多核苷酸, 其中所述取代选自由对应于 SEQ ID NO:42 所示的 G39、G40、G41、C85、G121 的位置上的取代及其组合组成的组。

3. 根据权利要求 2 的经修饰的多核苷酸, 其中所述取代是 G39、G40 和 G41 的组合。

4. 根据权利要求 1 的经修饰的多核苷酸, 其选自由以下组成的组:

包含由 SEQ ID NOs:65、67、68、69、70 或 71 定义的经修饰的核苷酸序列的多核苷酸或其互补链。

5. 生产核黄素的微生物, 所述微生物包含根据权利要求 1 到 4 中任一项的编码经修饰的核黄素生物合成操纵子前导区的多核苷酸, 并且与使用具有野生型 rib 前导区的微生物的核黄素生产相比能够从给定的碳源生产至少多 5% 的核黄素。

6. 根据权利要求 5 的生产核黄素的微生物, 其中与具有野生型 rib 前导区的微生物相比完整的、全长核黄素 mRNA 的积累被改进。

7. 根据权利要求 1 的经修饰的多核苷酸或根据权利要求 5 的微生物用于从给定碳源生产核黄素的用途。

8. 用于生产核黄素的方法, 所述方法包括使用根据权利要求 5 的微生物, 其中与使用具有野生型 rib 前导区微生物的核黄素生产相比从给定碳源的核黄素生产至少提高 5%。

9. 根据权利要求 8 的方法, 所述方法还从反应混合物中分离和 / 或纯化所生产的核黄素。

10. 在根据权利要求 5 的生产核黄素的微生物中由核黄素生物合成基因生产全长 mRNA 转录本的方法。

经改进的核黄素生产

[0001] 本发明提供了经改进的核黄素生物技术生产,所述生产通过在含有核黄素生物合成基因的操纵子(rib 操纵子)中进行的修饰,特别是相应的核黄素生物合成基因(rib 操纵子)上游前导序列(rib 前导区)的/在相应的核黄素生物合成基因(rib 操纵子)上游前导序列(rib 前导区)中的修饰来完成。另外,本发明涉及带有所述经修饰的序列的经遗传改造的微生物,产生所述经修饰的序列/微生物的方法,及其用于生产核黄素的用途。

[0002] 核黄素由所有植物和许多微生物合成,但是不被高等动物所生产。核黄素是基础代谢必需的,因为它是碳水化合物的酶促氧化中需要的辅酶(例如黄素腺嘌呤二核苷酸和黄素单核苷酸)的前体。在高等动物中,核黄素供应不足可引起脱发、皮肤炎症、视力衰退和生长障碍(growth failure)。

[0003] 核黄素的生物合成从三磷酸鸟苷(GTP)和5-磷酸核酮糖开始。涉及核黄素生物合成的基因已知来自多种来源,例如 *Bacillus subtilis*, *Ereothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Candida flareri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*(见例如 EP 405370 或 Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7th Edition, 2007, Chapter Vitamins)。

[0004] 以 *Bacillus subtilis* 中的情况作为生产核黄素的(微)生物的一个例子,涉及核黄素生物合成的基因包括 ribG(ribD)、ribB(ribE)、ribA 和 ribH。ribA 基因编码两种酶活性,即催化核黄素生物合成中第一步的 GTP 环式水解酶 II 和催化 5-磷酸核糖体转化成 4-磷酸 3,4-二羟基-2-丁酮(DHBP)的 4-磷酸 3,4-二羟基-2-丁酮合酶(DHBPS)。脱氢酶和还原酶由操纵子的第一个基因 ribG(ribD) 编码。核黄素生物合成的倒数第二步由 2,4-二氧四氢蝶啶(lumazine)合酶催化,所述 2,4-二氧四氢蝶啶是 ribH 的基因产物。催化途径最后一步的核黄素合酶由操纵子的第二个基因 ribB(ribD) 编码。位于 rib 操纵子 3' 端的 ribT 的功能目前是不清楚的;然而,其基因产物不是核黄素合成所必需的。

[0005] 核黄素操纵子从 rib 启动子(P_{rib})起的转录由核糖开关(riboswitch)控制,所述核糖开关涉及位于 rib 操纵子 5' 区中几乎 300 个核苷酸的非翻译调节前导区(下文中称作 rib 前导区),所述非翻译调节前导区在操纵子中第一个基因 ribG 的转录起点和翻译起始密码子之间。根据使用 *Bacillus subtilis* 的研究已知,rib 前导区内至少三个不同的部分涉及 rib 操纵子的转录调节:(i) 位于 rib 前导区 3' 端的 rho-非依赖性终止子,其包含反向重复,所述反向重复之后是 rho-非依赖性转录终止或弱化结构特征性的多聚-T 段(Kil et al., Mol. Gen. Genet. 233, 483-486, 1992; Mironov et al., Mol. Biol. 24, 256-261, 1990);(ii) 提示发挥反终止子功能的终止子 5' 一半边的反向重复(Mironov et al., Cell 111, 747-756, 2002);(iii) 推测发挥反-反终止子作用,防止反终止子与终止子碱基配对,并且干扰反终止结构形成的,位于终止子中心部分并且彼此反向互补的两个元件(Mironov et al., Cell 111(5):747-56, 2002)。体外转录研究已经证实,终止子的功能取决于转录实验中 FMN 的存在(Winkler et al., PNAS 99(25):15908-13, 2002)。对例如 SEQ ID NO:1 中展示的 *B. subtilis* 的 rib 操纵子而言,分别地,终止子由 SEQ ID NO:1 的核苷酸 230 到 263 组成,反终止子由 SEQ ID NO:1 的核苷酸 30 到 37 组成,反-反终止子由 SEQ ID NO:1

的核苷酸 157 到 164 组成。

[0006] 根据目前的 rib 基因表达调节的模型,从 rib 前导区转录的新生 mRNA 采取两种替代性的结构(所谓的 FMN 核糖开关):如果 FMN 与位于 rib 前导区内的 RFN 元件(见例如 SEQ ID NO:1 中从第 25 到 164 位的 DNA 序列)结合,则反-反终止子与反终止子碱基配对,因此不能干扰转录终止环形成,导致 rib 基因转录过早终止。FMN 不与 RFN 元件结合时,反终止子与转录终止子的反向互补序列碱基配对,允许通读转录和全长 ribmRNA 的形成。这种机制将决定 FMN-结合型 RFN 元件与未结合形式比例的细胞内 FMN 浓度与全长 rib mRNA 形成的程度联系在一起。其显示 RFN 元件仅用作 FMN 而非核黄素的结合位点(Mironov et al,2002;Winkler et al,2002)。

[0007] 因此,脱调节(deregulation)、核黄素过量生产和分泌进培养液中可以通过以下任何途径来实现:(i) 干扰 FMN 与从 rib 前导序列转录的新生 mRNA 的结合,(ii) 修饰反-反终止子,使其不能与反终止子有效地碱基配对,或(iii) 修饰或缺失终止子。

[0008] 经鉴定的一类过量生产核黄素的 *B. subtilis* 突变体在 rib 前导序列 5' - 半边中的多个位置处含有称作 rib0 突变的单点突变(Kil et al.,1992)。rib0 突变或者位于 RFN 元件中并因此干扰 FMN 结合,或者位于反-反终止子 DNA 序列中。可以预期,缺失终止子结构后实现核黄素分泌和 rib 基因表达的最大脱调节,因为在这种情况下,rib 基因转录阻抑所依赖的最终元件被去除。Rib0 突变还在例如 *Lactobacillus plantarum*、*Leuconostoc mesenteroides* 或 *Propionibacterium freudenreichii* 中被鉴定(Burges et al., *Microbial Cell Factories* 5:24,2006)。

[0009] 在称作 ribC 突变体的第二类过量生产核黄素的 *B. subtilis* 突变体中,染色体损伤被定位于 *B. subtilis* 基因组的 147° (Kreneva and Perumov, *Mol. Gen. Genet.* 222, 467-469,1990)。RibC 突变体在 ribC 基因中含有错义突变。已显示 ribC 基因编码 *B. subtilis* 的黄素激酶/FAD 合酶(Mack et al., *J. Bacteriol.*, 180:950-955,1998)。突变脱调节核黄素生物合成降低 ribC 基因产物的黄素激酶活性,导致降低的黄素单核苷酸(FMN) 细胞内浓度,所述黄素单核苷酸是核黄素调节系统的效应器模块。

[0010] 另外,经典的诱变被用于产生在所选生物基因组中带有随即突变的变体,之后例如选择对嘌呤类似物的更高抗性。或者,如下过表达涉及核黄素生物合成的基因:例如用强启动子代替天然(弱)启动子,或在染色体内扩增表达盒,所述表达盒含有与感兴趣的基因以及可扩增的可选择标记物基因(例如抗生素抗性标记物)可操作地连接的单个启动子。扩增导致在基因组中生产多拷贝的表达盒和可选择标记物基因。另外,可以通过将核黄素生产与所述宿主细胞的生长脱耦合(decoupling) 来实现提高的进入培养液的核黄素分泌。

[0011] 上述方式伴随着若干缺点。例如,通过由单个启动子驱动的基因的扩增,可能无法实现饱和的 mRNA 水平。另外,宿主细胞染色体中多拷贝表达盒和可选择标记物基因的生产可能不稳定,或者可能甚至阻止各个基因的进一步表达(反馈抑制)。

[0012] 惊讶地发现,除了目前模型所设想的作为 rib 基因表达负调节器的功能以外,rib 前导区还对全长 rib mRNA 的丰度具有强的影响,从而表明了 5' mRNA 稳定化功能。向 rib 前导序列中引入特定的突变/缺失导致提高的核黄素生产。

[0013] 因此,通过提供下述突变体核黄素生产菌株提高核黄素生产的产率和/或生产力

是本发明的一个目的,所述突变体核黄素生产菌株中 rib 前导区以下述方式被修饰,所述方式导致对连续的 rib 基因表达的抑制效应松弛或减小,导致完整的、全长的 rib mRNA 转录本的积累。因此,向合适的宿主细胞中引入经修饰的 rib 前导区(即与野生型 rib 前导区相比经改进的 rib 前导区)导致全长 rib mRNA 更高的稳定性或更多的 rib 操纵子脱调节,即更加脱调节的核黄素生产。

[0014] 特别地发现,rib 前导区 3' 端的缺失在改进核黄素生产的产率和 / 或生产力中尤其有效,所述缺失包括 (i) 终止子序列或其功能性部分和 (ii) 终止子的 5' 侧翼区。其中从 RFN 元件 3' 端到终止子 3' 端的整个 DNA 序列被缺失的经修饰的 rib 前导区在改进核黄素生产中特别有用。

[0015] 另外已发现,rib0 突变与 rib 前导区 3' 端的缺失(包括终止子序列或其功能性部分)的组合在改进核黄素生产的产率和 / 或生产力中尤其有效。这可通过包括终止子的 5' 侧翼区被进一步增强。出乎意料的是,与更大的缺失(包括终止子以及 5' 侧翼区)或终止子缺失与 rib0 突变的组合相反,整个终止子序列或其功能性部分的缺失或修饰(而不与 rib0 突变组合)对核黄素生产没有强的影响。事实上,仅仅终止子序列或其功能性部分的缺失或修饰在脱调节核黄素生产中清楚地不如经典的 rib0 突变有效。其中从 RFN 元件 3' 端到终止子 3' 端的整个 DNA 被缺失并组合了一个或多个 rib0 突变的经修饰的 rib 前导区在改进核黄素生产中特别有用。RFN 元件的更大部分被缺失时,例如 RFN 元件 3' 端的约五分之一被缺失时,这可被进一步增强。

[0016] 因此,本发明涉及经修饰或经突变的多核苷酸,所述多核苷酸选自自由:

[0017] (a) 包含根据 SEQ ID NO:42 的核苷酸序列的多核苷酸,

[0018] (b) 包含具有 rib 前导区活性的 (a) 片段或衍生物的多核苷酸,

[0019] (c) 具有 rib 前导区活性的多核苷酸,其互补链在严格条件下与 (a) 到 (b) 任一中定义的多核苷酸杂交,

[0020] (d) 具有 rib 前导区活性的多核苷酸,其与 (a) 到 (b) 任一中定义的多核苷酸至少 70%,例如 80%,85%,90%,95%或 98%相同;和

[0021] (e) 是 (a) 到 (d) 中定义的多核苷酸互补链的多核苷酸,

[0022] 组成的组,

[0023] 其中所述多核苷酸,特别是以 SEQ ID NO:42 展示的多核苷酸,包含修饰 / 突变,并且其中与未经修饰的 rib 前导区相比,完整的、全长 ribmRNA 转录本的积累被提高至少 5%,并且还导致核黄素生产的提高,所述修饰 / 突变选自自由以下组成的组:

[0024] (i) rib 前导区 3' 端的一个或多个突变,包括终止子及其 5' 侧翼区;和

[0025] (ii) 一个或多个 rib0 突变以及 rib 前导区 3' 端的一个或多个突变。

[0026] 未经修饰的 rib 前导区(例如 SEQ ID NO:42 中所示的)可以是未经修饰的 rib 操纵子(例如分离自 *Bacillus subtilis* 的 SEQ ID NO:1 中所示)的部分。本发明的 rib 前导区序列可以与天然 rib 启动子一起使用,或与组成型启动子一起使用,所述组成型启动子例如 P_{spo15} 或 P_{veg} 并例如 SEQ ID NO:55 或 56 中所示。

[0027] 被引入 rib 前导区中并与前导区 3' 端修饰组合从而导致本文定义的经修饰的 rib 前导序列的 rib0 突变是指位于 rib 前导区 5' 端任何位置的任何突变(碱基交换、缺失、插入),包括 Kil et al.,1992 定义 / 表征的 RFN 元件,并且所述突变导致与带有本文定

义的未经修饰的 rib 前导区的菌株相比经改进的核黄素生产。

[0028] 特别地,本发明涉及经修饰的 rib 前导区,其在 3' 部分中被修饰,并且额外含有对应于 Kil et al. (1992) 所鉴定突变的一个或多个 rib0 突变,或在对应于 SEQ ID NO:42 中所示选自例如第 31、39、40、41、55、85、86、88、93、116、121 和 128 位位置的位置上含有一个或多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个)rib0 突变(即取代)。优选地,rib0 突变选自 T31G、G39A、G40A、G41A、C55T、C85T、C86T、G88A、C93T、A116C、G121A、C128G 及其组合,其中所述核苷酸对应于 SEQ ID NO:42 中所示位置。带有此类 rib0 突变(包括 5' 端的天然 rib 启动子)的 rib 前导序列的例子展示于 SEQ ID NOs:45、46 和 47 中。这些 rib0 突变也可以与组成型启动子(例如分别在 SEQ ID NOs:57、58 或 60 和 SEQ ID NO:59 中展示的例如 P_{veg} 或 P_{spo15})融合。优选地,本文定义的经修饰的 rib 前导区包含单个 rib0 突变,例如位于对应于 SEQ ID NO:42 中第 39、40、41、85 或 121 位的位置上,更优选地,rib0 突变选自 G39A、G40A、G41A、C85T(称作“RK41”)、G121A(称作“RK1a”)及其组合。所述 rib0 突变还与本文定义的 rib 前导区 3' 中的突变组合。

[0029] 在一个特别的实施方案中,本发明的经修饰的 rib 前导区带有与 rib 前导区 3' 端中突变组合的多于一个 rib0 突变。优选的是三种 rib0 突变的组合,更优选地是对应于 SEQ ID NO:42 第 39、40 和 41 位的位置上的 rib0 突变,进一步更优选地是称作“三重 rib0”的 rib0 突变 G39-G40A-G41A。引入 rib 前导区中的此类三重 rib0 突变的一个例子展示于 SEQ ID NO:47 中(包括天然的 rib 启动子)。也可以通过代替天然启动子将这些 rib0 突变与组成型启动子(例如 SEQ ID NO:57 中所示)融合。

[0030] 所述 rib0 突变还与 rib 前导区 3' 端中的修饰组合。Rib 前导区 3' 端中的此类修饰可至少包括终止子或其功能性部分的缺失,以得到本发明的经修饰的 rib 前导区,所述本发明的经修饰的 rib 前导区导致在引入合适的宿主细胞后与带有未经修饰的 rib 前导区的宿主细胞相比提高的核黄素生产。3' 端中的所述修饰可还包括终止子 5' 侧翼区、特别是对应于 RFN 元件 3' 端的核苷酸、例如对应于 SEQ ID NO:42 的核苷酸 166 到 263 或 136 到 263 的修饰(例如缺失)。

[0031] 在一个优选的实施方案中,与上文所示 rib0 突变组合的 rib 前导区 3' 端处/中的修饰位于 RFN 元件 3' 端(即位于 RFN 元件下游的所有序列)与 rib 前导区 3' 端之间,其中可以缺失任一条完整序列或仅其部分。在一个特别的实施方案中,终止子或至少其功能性部分包括在所述缺失中。

[0032] 从 *B. subtilis* 分离的终止子序列的一个例子展示于 SEQ ID NO:39 中,其可从 rib 前导区中缺失,导致例如 SEQ ID NOs:51 或 80 中所示包括天然 rib 启动子的经修饰的 rib 前导区。天然启动子也可以被组成型启动子例如 P_{spo15} 和 P_{veg}(见例如 SEQ ID NOs:63 或 64)代替。因此,本发明的经修饰的 rib 前导区可在对应于 SEQ ID NO:42 的核苷酸 231 到 263 的核苷酸中被缺失,即称作“del 终止子”的整个终止子(不含侧翼区)缺失,与上文定义的任何 rib0 突变组合。

[0033] 终止子功能性部分的缺失可包括一个或多个茎环和/或其侧翼区的缺失。其中仅终止子功能性部分被缺失并组合上述 rib0 突变的 rib 前导序列的例子展示于 SEQ ID NOs:48、49、50、77、78 和 79 中。天然 rib 启动子也可以被组成型启动子例如 P_{spo15} 和 P_{veg}(见例如 SEQ ID NOs:61 或 62)代替。以 SEQ ID NO:42 中所示 *B. subtilis* rib 操纵子作为参照

序列,所述功能性部分缺失可包括对应于核苷酸 250 到 257(称作“del 茎环-右”),核苷酸 231 到 238(称作“del 茎环-左”)或核苷酸 239 到 263(称作“del 侧翼-右”)的核苷酸缺失。

[0034] 其中终止子和 5'侧翼区被缺失并组合上述 rib0 突变的经修饰的 rib 前导序列的例子展示于 SEQ ID NOs:52、53、81 和 82 中。天然 rib 启动子也可以被组成型启动子例如 P_{spo15}和 P_{veg}(见例如 SEQ ID NO:65)代替。以 SEQ ID NO:42 中所示 B. subtilis rib 操纵子作为参照序列,本发明的经修饰的 rib 前导区可含有对应于 SEQ ID NO:42 的核苷酸 166 到 263(称作“SWITCH 缺失”)的核苷酸缺失,与任何上述 rib0 突变组合。

[0035] 本文所述经修饰的 rib 前导序列带有上文定义的 rib0 突变,所述 rib0 突变与 rib 前导区 3'端中的突变/修饰组合,其中 3'端中的修饰可选自例如完整终止子、终止子功能性部分或与 5'侧翼区一起的终止子的缺失。

[0036] 另外,作为本发明的部分,本文定义的经修饰的 rib 前导序列在 rib 前导区的 3'端带有突变/修饰,其中所述修饰可选自终止子与其 5'侧翼区一起的缺失,例如多达终止子上游 60、70、80、90 或 100,特别是上游 64 或 94 个核苷酸,优选地对应于 SEQ ID NO:42 的核苷酸 166 到 263 或 136 到 263。

[0037] 在一个特别优选的实施方案中,与 Kil et al. (1992) 中定义的已知 rib0 突变体例如 rib0 突变 T31G、G39A、G40A、G41A、C55T、C85T、C86T、G88A、C93T、A116C、G121A、C128G(其中核苷酸对应于 SEQ ID NO:42 中所示位置)及其组合相比,带有上文定义的经修饰的 rib 前导区的宿主细胞在培养基中积累了多于 25mg/l 核黄素,例如 50、100、200、300、400、500、600、700、800mg/l 或更多核黄素,或甚至多于 1g/l 的核黄素。技术人员已知这些量取决于例如培养条件、宿主菌株和/或底物而变化。

[0038] 在一个实施方案中,本发明的经修饰的 rib 前导区含有对应于选自 B. subtilis rib 操纵子(SEQ ID NO:42)中 RK1a、RK41 或三重 rib 的 rib0 突变的 rib0 突变,与选自整个终止子缺失、SWITCH 缺失或 del mro175(见上文)的 3'端缺失组合。一种优选的组合是 RK1a 与 del 终止子、SWITCH 缺失或 del mro175。还优选的是 RK41 与 del 终止子、SWITCH 缺失或 del mro175 的组合。还优选的是三重 rib0 与 del 终止子、SWITCH 缺失或 del mro175 的组合。更优选地,本发明的经修饰的 rib 前导区含有 RK41 与 del 终止子、RK41 与 SWITCH 缺失、三重 rib0 与 del mro175 的组合。进一步更优选的是与组成型启动子例如 P_{spo15} and P_{veg}(见例如 SEQ ID NOs:67、68、69、70 或 71)融合的所述经修饰的 rib 前导序列。

[0039] 根据本发明的经修饰的 rib 前导区也可以通过引入 mRNA 稳定化元件来包括修饰。所述元件可以被引入 rib 基因的启动子和编码序列之间。此类元件的例子包括 SEQ ID NO:43(所谓的 aprE mRNA 稳定化元件)或 SEQ ID NO:44(所谓的 grpE mRNA 稳定化元件)中所示元件和优选地在高度严格的条件下与之杂交的序列。

[0040] 本发明的核酸序列,即经修饰的 rib 前导序列可与适当的启动子可操作地连接,所述启动子可以是组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然启动子,或者是原来与涉及核黄素生物合成的各个基因不天然连接的启动子。技术人员应当知道如何选择合适的启动子。有用的启动子的例子可在文献(特别是例如 EP 405370)中找到。

[0041] 因此,本发明在一个优选的实施方案中涉及选自由以下多核苷酸组成的组的经修饰或经突变的多核苷酸(rib 前导序列):

[0042] (a) 包含根据 SEQ ID NOs :65、67、68、69、70 或 71 的（经修饰的）核苷酸序列的多核苷酸；

[0043] (b) 具有经修饰的 rib 前导区活性的多核苷酸，其互补链在严格条件下与 (a) 中定义的多核苷酸杂交，

[0044] (c) 具有经修饰的 rib 前导区活性的多核苷酸，其与 (a) 中定义的多核苷酸至少 70%，例如 80%，85%，90%，95% 或 98% 相同；和

[0045] (d) 是 (a) 到 (c) 中定义的多核苷酸互补链的多核苷酸；

[0046] 其中所述多核苷酸，特别是在 SEQ ID NO :65、67、69、70 或 71 下展示的序列被称作经修饰或经突变的序列，其中在引入合适的宿主细胞后与带有相应的未经修饰的序列的细胞相比，完整的、全长 rib mRNA 转录本的积累被提高至少 5%。

[0047] 在本文中使用时，术语“rib 前导序列”是指任何下述 DNA 序列，所述 DNA 序列与一个或多个下游 rib 基因相关联，并且含有影响连续的 rib 基因表达的非翻译调节元件。这些调节元件典型地包含 (i) DNA 序列 3' 端的终止子，(ii) 反-终止子，和 (iii) 终止子上游的 RFN 结合位点。如从 *Bacillus subtilis* 所已知的，rib 前导区包括位于 rib 操纵子 5' 区中操纵子中第一个基因 ribG 的转录起点和翻译起始密码子之间的几乎 300 个核苷酸。*B. subtilis* 的 rib 前导区中的终止子序列位于核苷酸 231 和 263 之间（见图 1）。此类 rib 前导序列还已在其他真细菌如 *Bacillus*、*Corynebacterium*、*Pseudomonas* 特别是 *B. anthracis*、*B. cereus*、*B. stearothermophilus*、*B. halodurans*、*B. amyloliquefaciens*、*C. diphtheriae* 和 *C. glutamicum*、*P. aeruginosa*、*P. putida* 或 *P. syringiae* 中被鉴定（见 Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30,3141-3151,2002 的表 1,所述文献通过引用并入本文）。

[0048] 在本文中使用时，术语“RFN 元件”是指 rib 前导序列中高度保守的 DNA 序列。转录进 mRNA 中后，RFN 可折叠成保守的结构，五个发夹形成 FMN 的结合位点。可以使用 RFAM 鉴定潜在的 RFN 元件，这是代表非编码 RNA 家族的协方差模型和多序列比对的集合（Griffiths-Jones et al. :Rfam:an RNA family database.*Nucleic Acids Res* 2003,31 : 439-441 ;可在 <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Rfam/getacc?RF00050> 获得）。多种细菌基因组中 RFN 元件的例子由 Gelfand et al., *Trends Genet.* 15,439-442,1999 提供。Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30,3141-3151,2002 的图 2 中给出了包含来自不同生物物的 RFN 元件核苷酸序列的综述。根据 Mironow et al., *Cell* 111(5) :747-56,2002 的定义，*B. subtilis* 的 rib 前导序列内的 RFN 元件位于核苷酸 22 到 165 之间（见图 1 或 SEQ ID NO :42）。通过 Vitreschak et al.,2002 的图 2 中所示比对的帮助，技术人员能够在含有此类 RFN 元件的生物中产生经修饰的 rib 前导区，导致提高的核黄素生产。

[0049] 术语“未经修饰的 rib 前导区”或“未经修饰的多核苷酸”和“野生型 rib 前导区”或“野生型多核苷酸”在本文中可互换使用。未经修饰的 rib 前导区或未经修饰的多核苷酸可包括优选地在高度严格条件下与 SEQ ID NO :42 中所示序列杂交的任何多核苷酸，期望提高其比活性从而缓解 rib 前导区的阻抑效应，提高 rib 基因 mRNA 的稳定性，导致更脱调节的 rib 操纵子和 / 或提高给定微生物中核黄素的产生。然后使用这些序列作为设计根据本发明的具有提高的活性的突变体 rib 前导序列的起点。本发明上下文中，“野生型”可包括可源自天然的序列以及合成序列的变体，只要它们能够通过本发明的任何教导变得更有

活性即可。特别地,此类多核苷酸是原核起源的,优选地是细菌起源,特别是源自革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌,例如 *Bacillus*, 优选地 *Bacillus subtilis*。

[0050] 术语“经修饰的多核苷酸”或“经修饰的 rib 前导区”和“突变体多核苷酸”或“突变体 rib 前导区”在本文中可互换使用。突变体 / 经修饰的多核苷酸或经修饰的 rib 前导区可包括根据本发明的教导可源自给定的野生型多核苷酸 / rib 前导区 (根据上文的定义) 并且比各自野生型序列更有活性 (例如可作为由给定底物生产的核黄素的提高或提高的 rib mRNA 稳定性来测量) 的任何变体。就本发明的范围而言,如何获得突变体并不重要,此类突变体可以例如通过完整细胞 / 生物的定点诱变、饱和诱变、随即有百年 / 定向进化、化学或 UV 诱变和本领域已知的其他方法获得。这些突变体也可以例如通过设计合成的基因来产生。Rib 前导序列中的修饰及其对 rib 基因表达的影响可以通过本领域技术人员已知的方法测量。例如,这些模型包括下述实验,所述实验使用 β -半乳糖苷酶作为报告子基因,或进入下述微生物培养液中的核黄素分泌,所述微生物含有经修饰的 rib 前导序列代替野生型 rib 前导序列,或除野生型 rib 前导序列以外还含有经修饰的 rib 前导序列。也可以通过 Northern 印迹或实时 PCR 测定经修饰的 rib 前导区对各个 mRNA 水平的 (积极) 影响。

[0051] 技术人员知道如何产生经突变的 / 经修饰的 rib 前导序列,包括引入 mRNA 稳定化元件和 / 或替换天然启动子。在一个实施方案中,通过将 mRNA 稳定化元件引入先前未经修饰的 rib 前导区中,产生经修饰的 rib 前导区。引入此类 mRNA 稳定化元件的有用方法的一个例子展示于图 2 中。

[0052] 经突变的 / 经修饰的 rib 前导序列的所述产生可例如如下完成:以使得宿主生物生产经突变的 rib 前导区的方式遗传修饰宿主生物,其中与未经修饰的 rib 前导区相比对 rib 基因表达的阻抑作用被减轻或减小,这随即导致完整、全长 rib mRNA 转录本的提高的积累,因此导致核黄素生产效率和 / 或产率的提高。因此,具有经修饰的 rib 前导区时,rib 操纵子与带有未经修饰的 rib 前导区的菌株相比更少被调节或更加脱调节。

[0053] 在本文中使用时,“经改进的活性”或“增强的活性”应当被理解为核黄素生产微生物中 rib 前导区调节的减小 / 阻抑效应的减轻 (完全或部分) 或减小。因此,就本发明的目的而言,具有提高的活性的经修饰的 rib 前导区对 rib 基因转录具有更少的阻抑影响,导致与未经修饰的 rib 前导区相比 rib 操纵子的脱调节。另外,本文定义的具有经改进的活性的经修饰的 rib 前导区导致完整、全长 rib mRNA 的积累,通过 Northern 印迹或实时 PCR 测定时所述 mRNA 增加至少 5%、10%、25%、50%、75%、100%、200% 或甚至多于 500%。这可以通过最小化 rib 前导区阻抑 / 调节后核黄素生产的提高或通过全长转录本的 mRNA 浓度测定或由 rib 基因转录而来的核黄素生物合成酶的浓度测定来 (间接) 测量。与野生型 rib 前导区相比,经修饰的 rib 前导区对 rib 基因表达的阻抑 / 调节至少减少 5%、10%、25%、50%、75%、100%、200% 或甚至多于 500%。因此,具有经改进的活性的经修饰的 rib 前导区是指与本文所述未经修饰的 rib 前导区相比,脱调节水平被提高至少 5%、10%、25%、50%、75%、100%、200% 或甚至多于 500% 的 rib 前导区。

[0054] 在本文中使用时,术语“mRNA 稳定化元件”是指下述 DNA 序列,所述 DNA 序列在引入 5'-非翻译区中 (例如各个基因转录起点下游) 后,能够对由包含所述 mRNA 稳定化元件的各个基因转录而来的 mRNA 提供提高的稳定性。mRNA 稳定化元件优选地含有 1 个或多个

茎环,但是也可不含有茎环。

[0055] 能够形成一个或多个茎环,导致来自(优选地涉及核黄素生产的)一个或多个目标基因的 mRNA 具有提高的稳定性的任何核酸序列可以在本发明的范围内。也可能通过强核糖体结合位点(RBS)进行 mRNA 的稳定化,所述核糖体结合位点不必须形成环。

[0056] 上文定义的 mRNA 稳定化元件可以是任何长度,但是优选地由至少 15 个核苷酸组成,更优选地由至少 20、30、40、50、60、70、80、90、100 个核苷酸组成,最优选地由 39–87 个核苷酸组成,所述核苷酸优选地包含 1 个或多个茎环,特别是 1 个或 2 个茎环。茎可由至少 4 个碱基对,优选地至少 8、10、12、15 个碱基对(可能存在错配核苷酸/内部环和/或膨胀环)组成,环可由例如 3–30 个非结合的核苷酸,优选地 4、6、8、10、11、14、15、25 或更多个核苷酸组成。内部环的长度优选地是 2、4、6、8、10、12 个非结合的核苷酸。可存在一个或多个膨胀环,由例如 1、2 或甚至 6 个非结合的核苷酸组成。计算的茎环热力学稳定性(ΔG)可根据 Zuker(2003, *Nucleic Acids Res.* 31 :3406–3415)发明的算法来计算。在一个实施方案中,计算的热力学稳定性是 -2.8kcal/mol 或更低,优选地是 -3 、 -4 、 -5 、 -6 、 -7 、 -8 、 -9 、 -10 、 -11 、 -12 、 -15 、 -20kcal/mol 或更低。在本发明的另一个实施方案中,mRNA 稳定化元件可不包含环。

[0057] 可例如使用例如 Allenby et al., *Microbiology*, 150, p. 2619–2628 (2004) 或 Sharp and Bechhofer, *Mol. Microbiol.* 57, 484–495 (2005) 所述的 Northern 印迹和/或实时 PCR 稳定化测定 mRNA 半衰期,来测量 rib mRNA 转录本的稳定性。在本文中使用,如果与野生型 rib 操纵子(即不含有本发明的经修饰的 rib 前导区)转录而来的 mRNA 半衰期相比, mRNA 的半衰期被提高至少 1%、2%、5%、10%、25%、50%、75%、100%、200% 或甚至多于 500%,则所述 mRNA 稳定性或完整性被提高(或 mRNA 降解被减小/阻断)。

[0058] 模板 DNA 可源自用于生产核黄素的相同或不同的宿主生物。另外,反应的模板可以通过反转录下述 mRNA 获得的 cDNA,所述 mRNA 由已知或怀疑包含本发明多核苷酸的菌株制备。可以对 PCR 产物亚克隆和测序,以确保被扩增的序列代表本文所述的新的核酸序列或其功能性等同物。另外,可以使用本领域公知的方法完全或部分合成根据本发明的核酸序列。

[0059] 本发明还涉及下述多核苷酸(rib 前导序列)及其用于生产核黄素的用途,所述多核苷酸的互补链在严格条件下与本文定义的多核苷酸杂交,并且能够改进完整、全长的 rib mRNA 转录本的积累。

[0060] 本发明还涉及下述多核苷酸及其用于生产核黄素的用途,所述多核苷酸与本文定义的多核苷酸至少 70% 相同,并且具有经修饰的 rib 前导区的活性。在一个实施方案中,本发明的核酸与 SEQ ID NO :42、55、56、67、68、69、70、71 中所示多核苷酸或其互补体至少 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更加相同。

[0061] 本发明还涉及下述引物、探针和片段,所述引物、探针和片段可用于扩增或检测根据本发明的 DNA 和鉴定也带有此类 rib 前导序列的相关微生物物种或科。

[0062] 本发明还涉及包含本发明多核苷酸的载体,和用多核苷酸或所述载体遗传改造的微生物。

[0063] 本发明还涉及用于产生带有本文定义的经修饰的多核苷酸的微生物(即遗传改

造合适的微生物从而提高完整、全长的 rib mRNA 转录本的积累)的方法,及其用于改进和 / 或增强核黄素生产产率和 / 或效率的用途。

[0064] 本文使用的 DNA 序列的引入可例如是通过转化、接合或转导进宿主细胞染色体中来添加或插入 DNA 序列。所述添加或插入可通过 DNA 重组进行,这可导致或不导致染色体 DNA 核苷酸的去除或缺失。将 DNA 序列引入宿主细胞(例如微生物)中的方法尤其通过位点特异性引入来实现,这是本领域公知的并且描述于例如 Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N.Y.) 中。

[0065] 合适的宿主细胞包括下述微生物细胞,所述微生物细胞能够生产核黄素(例如将给定的碳源转化成核黄素),并且带有未经修饰的 rib 操纵子,包括未经修饰的前导区或其等同物或同源物(随后以如本文所述导致核黄素生产提高的方式被突变),或向其中引入经修饰版本的所述 rib 操纵子 / rib 前导区或其等同物。此类细胞随后被称作“重组细胞”或“经转化的细胞”。带有此类未经修饰的 rib 操纵子 / rib 前导区或其等同物的合适的微生物可选自细菌,例如革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌,其为野生型菌株、通过经典诱变和选择方法获得的突变体菌株,或重组菌株。带有 RFN 元件的合适菌株列于 Vitreschak et al., Nucleic Acid Res 30, 3141-3151, 2002 的表 1 和图 2 中。此类细菌的例子包括 *Bacillus*、*Streptococcus*、*Lactococcus*、*Streptomyces*、*Clostridium*、*Deionococcus*、*Thermus*、*Fusobacterium*、*Chloroflexus* 和 *Thermomonospora*。优选地,微生物或宿主细胞选自由以下组成的组:*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus stearothermophilus*、*Bacillus halodurans*、*Bacillus licheniformis* 和 *Streptococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium difficile*、*Lactococcus lactis* 或相关度较低的生物如 *Streptomyces coelicolor*、*Thermomonospora fusca*、*Deionococcus radiodurans*、*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*、*Fusobacterium nucleatum* 和 *Chloroflexus aurantiacus*。更优选的是 *B. subtilis*, 特别是 *B. subtilis* 1A747 或 *B. subtilis* 168。还在本发明范围内的是本文公开的例如来自 *B. subtilis* 的脱调节 / 经修饰的 rib 前导区被用于代替上文所述其他微生物之一中的天然 / 野生型 rib 前导区,或上文提到的另一生物经修饰的 rib 前导区被用于 *B. subtilis* 的 rib 操纵子之前。

[0066] 带有所述经修饰的 rib 前导区的此类微生物还涉及经遗传修饰的或重组的微生物,或重组生产的 / 经遗传改造的宿主细胞。

[0067] 公众可以从不同的来源例如 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, 德国, American Type Culture Collection (ATCC), P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, IL, USA, Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, 日本(曾用名: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, 日本)或 *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC), The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 USA 获得可用

于本发明的微生物。

[0068] 关于本发明应当理解,上述微生物还包括具有相同生理特性的此类物种的同物异名(synonyms)或有效名(basonyms),如 International Code of Nomenclature of Prokaryotes 定义。本文使用的微生物的命名法是 International Committee on Systematics of Prokaryotes and the Bacteriology and Applied Microbiology Division of the International Union of Microbiological Societies 正式接受(在优先权文件的提交日)并由其官方出版媒介 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology(IJSEM)公开的命名法。

[0069] 本发明涉及经修饰的微生物,其中所述修饰导致由底物(例如葡萄糖)到核黄素提高的产率、生产和/或效率。这可通过提高本文所述的 rib 前导区的活性,即降低调节水平来进行。另外,本发明的微生物可带有更多修饰,只要此类修饰对核黄素生产的产率、生产和/或效率具有直接影响即可。

[0070] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及带有本文所述经修饰的 rib 前导区和额外修饰的微生物,所述额外修饰例如是用强(组成型或诱导型)启动子例如 P_{spo15} 或 P_{veg} 代替 rib 操纵子的天然启动子。此类强启动子的引入导致与在天然启动子下游带有经修饰的 rib 前导区的微生物相比,核黄素生产被提高至少 50%、75%、100%、200%、250%、300%、350%、500% 或甚至多于 1000%。这可通过一个或多个 rib 基因、特别是 ribA 的过表达,或通过在宿主细胞中引入多拷贝的 rib 操纵子被进一步提高,例如在 *B. subtilis* 菌株 RB50 中完成(见例如 EP 405370)。与 *B. subtilis* RB50 中的核黄素生产相比,通过遗传改变微生物使其在与强启动子融合的本文定义的 rib 前导区中带有修饰,可以将核黄素生产提高至少 100%、200%、250%、500% 或甚至多于 750%。带有任选地与强启动子和/或多拷贝 rib 操纵子组合的本文定义的经修饰的 rib 前导区的微生物可以如下被进一步改变:将生长与核黄素的生产脱偶合,例如引入营养缺陷型(例如 EP 1186664 中针对例如生物素所述),和/或进一步与经修饰的转酮酶基因的引入组合,例如 WO 07/051552 中所述。

[0071] 本发明提供了本文定义的经修饰的 rib 前导区,其包含 (i) 一个或多个 rib0 突变,与 rib 前导区 3' 端的修饰一起,或 (ii) 终止子及其 5' 侧翼区的缺失,其中所述经修饰的 rib 前导区与强启动子例如 P_{spo15} 或 P_{veg} 融合。

[0072] 用于生产核黄素的一种特别优选的菌株是 *B. subtilis*。一种更优选的菌株是含有多(n)拷贝(例如约 5 到约 20 个拷贝)pRF69 的 *B. subtilis* RB50::[pRF69]_n, pRF69 编码用强启动子 P_{spo15} 修饰的 rib 操纵子,以增强 rib 基因的转录(菌株的构建和导致核黄素生产的培养条件见例如 EP 405370 和 Perkins et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 22:8-18, 1999)。 *B. subtilis* RB50 和质粒 pRF69 可分别得自 NRRL(登记号 B 18502) 和 ATCC(登记号 ATCC 68338)。

[0073] 根据本发明的又一个目的,提供了上文定义经修饰的多核苷酸或用此类多核苷酸遗传改造的微生物用于核黄素生产的用途。

[0074] 本发明还提供了用于在微生物中表达包含经修饰的 rib 前导区的(经修饰的)rib 操纵子的方法,在微生物中生产上文定义的(经修饰的)多核苷酸的方法,和生产能够生产核黄素的此类经修饰的微生物的方法。所有这些方法可包含改变微生物的步骤,其中在本文中使用,“改变”包括以下述方式“遗传改变”的方法,所述方式使得与野生型微生物相

比核黄素的产率和 / 或生产力以及完整、全长 rib mRNA 的积累能够被改进。术语“改变”还包括本文所述经修饰的多核苷酸、特别是 rib 前导区修饰的产生。在本文中使用时,“经改进的核黄素产率”表示与野生型 / 未经修饰的微生物(即没有被遗传改变的微生物)相比,至少 50%、75%、100%、200%、250%、300%、350%、500% 或甚至多于 10000% 或 100000% (见上文)的提高。

[0075] 术语“经遗传改造的”或“经遗传改变的”表示生物中遗传材料结构的科学性改变。其涉及重组 DNA 的生产和使用。更特别地,其被用于描绘来自天然存在的生物的经遗传改造的或经修饰的生物。遗传改造可以通过本领域中已知的大量技术(例如基因替换,基因扩增,基因破裂、添加、插入、缺失,使用质粒、病毒或其他载体的转染、转化)完成。经遗传修饰的生物(例如经遗传修饰的微生物)通常也被称作重组生物,例如重组微生物。经遗传改造的微生物带有如上文定义的经修饰的 rib 前导区。

[0076] 根据本发明提供了经遗传改造 / 重组生产的宿主细胞(也称作重组细胞或经转化的细胞),所述细胞带有本发明的此类经修饰的 rib 前导区,使得核黄素生产的产率、生产和 / 或效率被改进。宿主细胞可选自能够由给定碳源生产核黄素的微生物,特别是 *Bacillus*, 优选地是 *B. subtilis*。

[0077] “经转化的细胞”或“重组细胞”是下述细胞,所述细胞中通过重组 DNA 技术引入了根据本发明的核酸,导致提高的和 / 或增强的完整、全长 rib mRNA 的积累。其还包括向所述细胞中已经存在的野生型 rib 前导区中引入一个或多个突变。合适的宿主细胞包括能够生产核黄素(例如将给定的碳源转化成上文定义的核黄素)的微生物细胞。进行所述发酵过程的有用的菌株列于上文并且是本领域已知的。

[0078] 本发明的核酸优选地以经分离的方式提供,并优选地被纯化至同质。

[0079] 术语“经分离的”表示材料从其原始环境(例如在天然存在时为天然环境)中取出。例如,存在于活微生物中天然存在的多核苷酸不是经分离的,但是从天然系统中一些或所有共存材料中分离的相同多核苷酸则是经分离的。此类多核苷酸可以是载体的部分和 / 或此类多核苷酸可以是组合物的部分并且仍然是经分离的,因为此类载体或组合物不是其天然环境的部分。

[0080] 在本文中使用时,术语“基因”是指可从染色体 DNA 中分离的核酸分子,其包括编码蛋白质(例如涉及核黄素合成的蛋白质,例如来自 *B. subtilis* 核黄素生物合成途径的酶)的开放读码框。

[0081] 基因可包括编码序列、非编码序列(例如位于基因编码区 3' 和 5' 端的非翻译序列,例如对源自基因的多肽的适当表达和稳定化而言重要的启动子区、调节子区和终止子区)。

[0082] 在本文中使用时,术语“多核苷酸”或“核酸分子”旨在包括 DNA 分子(例如 cDNA 或基因组 DNA) 和 RNA 分子(例如 mRNA) 和使用核苷酸类似物产生的 DNA 或 RNA 类似物。核酸分子可以是单链的或双链的,但是优选是双链 DNA。可以使用寡核苷酸类似物或衍生物(例如肌苷或硫代磷酸核苷酸)来合成核酸。此类寡核苷酸可被用于例如制备下述核酸,所述核酸具有改变的碱基配对能力或提高的核酸酶抗性。

[0083] 除非另有说明,通过对本文的 DNA 分子测序确定的所有核苷酸序列均使用自动 DNA 测序仪测定。因此,如本领域所已知的,对通过该自动化途径测定的任何 DNA 序列而言,

本文测定的任何核苷酸序列可含有一些错误。通过自动化测定的核苷酸序列与被测序的 DNA 分子的实际核苷酸序列典型地至少约 90% 相同,更典型地至少约 95% 到至少约 99.9% 相同。可以通过其它途径(包括本领域公知的手动 DNA 测序法)更精确地测定实际序列。

[0084] 本领域技术人员能够鉴定此类被错误鉴定的碱基,并知道如何纠正此类错误。

[0085] 根据本发明的多核苷酸可以被用作杂交探针或 PCR 引物,无论它们是经修饰的或是未经修饰的。还包括在内的是本文所述的多核苷酸用于增强和/或改进与 *Bacillus* 密切相关和在上文中被描述为合适宿主细胞的其他生物中同源性 rib 前导序列功能或活性的用途。在本文中使用时,术语“同源性 rib 前导序列”包括根据 Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30,3141-3151,2002 中图 2(其中比对了不同的 RFN 元件)来自不同生物的 rib 前导序列。通过所述比对,技术人员能够容易地鉴定对应于源自 *B. subtilis* 的本文所述 rib 前导序列部分的 rib 前导序列的部分,从而在所列的本文所述生物中产生经修饰的 rib 前导序列。

[0086] 本发明还涉及能够在严格条件下,优选地在高度严格条件下,与本发明的多核苷酸,例如 SEQ ID NOs:42、45、46、47、48、49、50、51、52、53、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82 中所示,优选地选自 SEQ ID NO:42、67、68、69、71、70 的多核苷酸杂交的经分离的多核苷酸。有利地,此类多核苷酸可得自能够生产核黄素的微生物,特别是 *Bacillus subtilis*。

[0087] 在本文中使用时,术语“杂交”旨在描述下述杂交和洗涤的条件,在所述条件下彼此至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、更优选地至少约 80%、进一步更优选地至少约 85% 到 90%、最优选地至少 95% 同源的核苷酸序列典型地保持彼此杂交。

[0088] 严格杂交条件的一个优选的非限制性例子是:于约 45°C 下在 6X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交,然后于 50°C、优选 55°C、更优选 60°C 和进一步更优选 65°C 下,在 1X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次或多次。

[0089] 高度严格条件包括:例如,使用经标记的 DNA 探针例如地高辛(DIG)-标记的 DNA 探针,于 42°C 下孵育若干天的一段时间,之后于室温下在 2x SSC,0.1% SDS 中洗涤一次或多次,和于 65-68°C 下在 0.5x SSC,0.1% SDS 或 0.1x SSC,0.1% SDS 中洗涤一次或多次。具体地,高度严格条件包括例如于 42°C 下,在溶液例如含有或不含 100 μ g/ml 鲑鱼精 DNA 的 DigEasyHyb 溶液(Roche Diagnostics GmbH)或包含 50% 甲酰胺、5x SSC(150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、0.02% 十二烷基硫酸钠、0.1% N-月桂酰肌氨酸和 2% 封闭试剂的溶液(Roche Diagnostics GmbH)中,使用 DIG-标记的 DNA 探针(通过例如使用 DIG 标记系统制备;Roche Diagnostics GmbH,68298 Mannheim,德国)孵育 2 小时到 4 天,之后将滤纸于室温下在 2x SSC 和 0.1% SDS 中洗涤两次,每次 5 到 15 分钟,然后于 65-68°C 下在 0.5x SSC 和 0.1% SDS 或 0.1x SSC 和 0.1% SDS 中洗涤两次,每次 15-30 分钟。

[0090] 技术人员应当知道对于严格和高度严格的杂交条件而言应用何种条件。涉及此类条件的其它指示在本领域中、例如在 Sambrook et al.,1989, *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.) 中能够容易地获得。

[0091] 另外,对应于本发明核苷酸序列或能与本发明核苷酸序列杂交的寡核苷酸可以通

过标准合成技术,例如使用自动化 DNA 合成仪来制备。

[0092] 术语“同源性”或“同一性百分比”在本文可互换使用。就本发明的目的而言,其在本文被定义来测定两条核酸序列的同一性百分比,所述序列就最适比较的目的被排列(例如为了与第二核酸序列最适比对,可以向第一核酸序列的序列中引入缺口)。然后比较相应的位置上的核苷酸。当第一条序列中的一个位置被与第二序列中相应位置上相同的核苷酸占据时,则所述分子在该位置上是相同的。两条序列之间的同一性百分比是所述序列共享的相同位置数的函数(即 $\% \text{同一性} = \text{相同位置数} / \text{位置总数} (\text{即重叠位置}) \times 100$)。优选两条序列有相同的长度。

[0093] 技术人员应当明白下述事实:可获得若干种不同的计算机程序以测定两条序列之间的同源性。例如,可以使用数学算法完成两条序列之间的序列比较和同一性百分比测定。在一个优选的实施方案中,使用 Needleman and Wunsch(J. Mol. Biol. (48): 444-453(1970)) 算法,使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重测定两条氨基酸序列之间的同一性百分比,所述算法已经被整合进 GCG 软件包内的 GAP 程序中(可得自 <http://www.gcg.com>)。技术人员应当知道:所有这些不同的参数会产生轻微差异的结果,但是使用不同算法时两条序列的整体同一性百分比不会被显著改变。

[0094] 还在另一实施方案中,使用 GCG 软件包(可得自 <http://www.gcg.com>) 中的 GAP 程序,使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和 40、50、60、70 或 80 的缺口权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重测定两条核苷酸序列之间的同一性百分比。在另一实施方案中,使用 E. Meyers and W. Miller 算法(CABIOS, 4:11-17(1989)),使用 PAM120 权重残表、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分测定两条核苷酸序列的同一性百分比,所述算法已被整合进 ALIGN 程序(2.0 版)中(可得自 <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>)。

[0095] 实施例给出了构建本发明微生物(即在涉及核黄素生产的基因的 5' 非翻译区中引入经修饰的 rib 前导区)的一种有用方法,其中本文公开的经修饰的 rib 前导区的引入导致来自各个 rib 基因的更多完整、全长 mRNA 转录本,这进一步导致提高的核黄素产率和/或生产力。重组微生物的选择可以通过引入抗生素抗性基因(例如氯霉素、新霉素、链霉素、壮观霉素等等)来进行。

[0096] 本发明涉及使用带有经修饰的 rib 前导区的微生物发酵生产核黄素。在本文中使用时,术语“核黄素”包括但不限于核黄素、黄素单核苷酸(FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),以及核黄素、FMN 或 FAD 的前体、衍生物和盐,例如 5-磷酸核黄素或 5-磷酸核黄素钠。核黄素、FMN 和 FAD 的前体和/或衍生物可选自例如 DRAPP;5-氨基-6-核糖氨基-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮-5'-磷酸;2,5-二氨基-6-核糖醇氨基-4(3H)-嘧啶酮-5'-磷酸(2,5-diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinone-5'-phosphate);5-氨基-6-核糖醇氨基-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮-5'-磷酸;5-氨基-6-核糖醇氨基-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮;6,7-二甲基-8-核糖醇,2,4-二氧蝶啶(6,7-dimethyl-8-ribityllumazine,DMRL);和黄素蛋白。术语“核黄素”和“维生素 B2”在本文中可互换使用。涉及核黄素生物合成的基因以及用于发酵生产核黄素的方法,特别是使用 Bacillus 菌株的发酵生产是已知的(见例如 EP 405370 或 Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7th Edition, 2007, Chapter Vitamins)。这些方法也可以用于使用包含本文所述经修饰的 rib 前导序列的突

变体菌株来生产核黄素。

[0097] 在本发明的方法（即如上文所述生产核黄素的方法）中可以使用若干底物作为碳源。特别合适的案源可选自包含 3、5 或 6 个碳原子的化合物，例如 D- 葡萄糖、甘油、稠果汁、右旋糖、淀粉、蔗糖或核糖。优选地，碳源是 D- 葡萄糖。与上述方法关联时术语“碳源”、“底物”和“生产底物”可在本文中互换使用。

[0098] 在本文中使用经修饰的微生物的上述方法中使用的培养基可以是生产核黄素的任何合适的培养基。典型地，培养基是包含例如盐、底物和某 pH 的水性培养基。其中底物被转化成核黄素的培养基也被称作生产培养基。

[0099] 在本文中使用时，“发酵”或“生产”或“发酵方法”可以是在合适底物转化成核黄素的适当条件下，使用技术人员已知的培养基、条件和流程使用生长中的细胞，或者通过使用技术人员已知的培养基、条件和流程培养后使用非生长中的所谓的静息细胞。

[0100] 可以通过任何合适的手段从细胞中回收所生产的核黄素。回收表示例如所生产的核黄素可与生产培养基分离。任选地，由此生产的发酵产物可以被进一步加工，例如纯化。

[0101] 与使用微生物的上述方法有关时，在一个方面中，生长步骤可以在需氧条件下，在补充有适当生长用营养物的水性培养基（即生长培养基）中进行。培养可以例如以分批、补料分批、半连续或连续模式进行，其中补料分批或半连续模式是优选的。

[0102] 培养周期可取决于例如使用的宿主、pH、温度和营养培养基而变化，并可以是例如约 10 小时到约 10 天，优选地约 4 天到约 7 天，更优选地约 2 天到约 8 天，取决于微生物。技术人员应当知道合适微生物的最佳培养条件。

[0103] 培养可例如在约 7.0 的 pH 下进行，优选地在约 6 到约 8 范围内，更优选地约 6.5 到 7.5 的 pH 下进行。进行培养合适温度范围可以例如是从约 13℃到约 70℃，优选地从约 35℃到约 39℃，更优选地从约 30℃到约 39℃，最优选地从约 36℃到约 39℃。生长培养基通常可含有此类营养物，如可同化的碳源，例如 D- 葡萄糖、甘油、稠果汁、右旋糖、淀粉、蔗糖或核糖；和可消化的氮源，例如有机物质，例如胨、酵母提取物和氨基酸。培养基可以含有或不含尿素和 / 或玉米浸出液和 / 或烘焙酵母。多种无机物质也可以被用作氮源，例如硝酸盐和铵盐。另外，生长培养基通常可含有无机盐，例如硫酸镁、硫酸锰、磷酸钾和碳酸钙。使用上述流程获得的细胞可在与上文所述基本相同的模式、温度和 pH 条件下，在存在上述底物时，以下述方式被进一步孵育，所述方式使得它们将这些底物转化成想要的目标发酵产物。孵育可在富含氮的培养基中进行，所述培养基含有例如有机氮源，例如胨、酵母提取物、烘焙酵母、尿素、氨基酸和玉米浸出液，或无机氮源，例如硝酸盐和铵盐，在这种情况下细胞应当能够进一步生长同时生产想要的发酵产物。或者，孵育可以在缺乏氮的培养基（nitrogen-poor medium）中进行，在这种情况下细胞基本上不生长，并且会处于静息细胞的模式或生物转化的模式。在所有情况下，孵育培养基也可以含有无机盐，例如硫酸镁、硫酸锰、磷酸钾和氯化钙。用于生产核黄素的合适培养基的一个例子描述于 WO 04/113510 中（VF- 培养基），所述培养基对 *Bacillus* 特别有用。

[0104] 术语“生产”或“生产力”是本领域公知的，并且包括在给定时间和给定发酵体积内形成的核黄素的浓度（例如每小时每升的 kg 产物）。术语“生产效率”包括达到具体生产水平所需的时间（例如，细胞达到具体的发酵产物输出速率花费的时间）。术语“产率”是本领域公知的，并且包括将碳源转化成产物（即核黄素）的效率。这通常被描述成例如每

kg 碳源的 kg 产物。“提高化合物的产率和 / 或生产 / 生产力”表示在给定的时间期间给定量的培养物中,回收的分子或所述化合物的有用的回收分子的量。

[0105] 测定核黄素产率 / 生产力的分析方法是本领域已知的。此类方法可包括但不限于 HPLC 或指示器菌株的使用 (见例如 Bretzel et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22, 19-26, 1999)。

[0106] 附图

[0107] 图 1 展示了 *Bacillus subtilis* 的 rib 前导区,包括其 5' 和 3' 侧翼序列。Rib 前导区位于核苷酸位置 562 到 857 之间。(A) 野生型 rib 操纵子,其中以粗体标明 5' 调节元件 (分别为 "**ttgctg**" 和 "**tataat**") 以及对应于 SEQ ID NO:42 中所示 rib 前导区第一个核苷酸的转录起点 (" A")。(B) rib 前导区,其中 rib0 突变如三重 rib0、RK41 和 RK1a 的位置以粗体标明。(C) 到 (I) rib 前导区,其中侧翼 - 右、终止子、茎环 - 右、茎环 - 左、SWITCH 缺失、del mro175 和整个 rib 前导区的位置分别通过下划线标明。更多解释见文本,特别是实施例。

[0108] 图 2 展示了通过 LFH-PCR 构建在强组成型 P_{spo15} 启动子下游带有 mRNA 稳定化元件 (St) 的经遗传改变的微生物的不同步骤,所述 mRNA 稳定化元件位于包含基因 ribD、ribE、ribA 的 rib 操纵子的 5' 端。为了选择重组微生物,使用氯霉素 (Cm) 抗生素抗性盒。(A) 使用 LFH-PCR,用强启动子代替天然启动子。(B) 引入 mRNA 稳定化元件。更多解释见实施例。

[0109] 以下实施例仅用于阐述而不旨在以任何方式限制本发明的范围。本申请通篇中引用的所有参考文献、专利申请、专利和公开的专利申请通过引用并入本文,特别是 EP 405370、WO 04/106557、WO 07/051552 和 EP1186664。

实施例

[0110] 实施例中涉及的下述培养基描述于 WO 04/106557 中:胰蛋白胍血琼脂培养液 (Tryptone Blood Agar Broth, TBAB, Difco) 培养基, Veal Infusion- 酵母提取物培养液 (VY) 培养基, 10X Spizizen 盐和最小培养基 (Minimal Medium, MM)。另外,使用以下培养基:

[0111] 100X 微量元素溶液 A: 12.5g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.55g $CaCl_2$; 1.35g $FeCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.1g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0.17g/l $ZnCl_2$; 0.043g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.06g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.06g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 加 H_2O 至 1l, 经高压灭菌。

[0112] 5X 最小盐溶液: 0.057M K_2SO_4 ; 0.31M $K_2HPO_4 \cdot 5H_2O$; 0.22M KH_2PO_4 ; 0.017M 柠檬酸钠 $\cdot 7H_2O$; 0.004M $MgSO_4 \cdot H_2O$, pH 7.0, 经高压灭菌。

[0113] 100X 微量元素溶液 B: 0.55g $CaCl_2$; 0.17g $ZnCl_2$; 0.043g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.06g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.06g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 加 H_2O 至 1l, 经高压灭菌。

[0114] 核黄素筛选培养基 (RSM): 200ml 10X Spizizen 盐; 10ml 100X 微量元素溶液 A; 2ml 50% 葡萄糖; 36ml 25% 棉子糖; 10ml 10% 酵母提取物; 加 H_2O 至 1l。

[0115] Spizizen 最小培养基 (SMM): 100ml 10X Spizizen 盐; 10ml 50% 葡萄糖; 1ml 40% 谷氨酸钠; 10ml 微量元素溶液 A; 加 H_2O 至 1l。

[0116] 摇瓶中的核黄素生产如下进行: 从冷冻甘油菌种中将菌株接种于 5ml 富含 VY 的培

培养基中,以 280rpm 的转动,于 37℃ 下生长过夜。通过离心收集细胞,并重悬于 1ml RSM(见上文)中。使用 250 μ l 细胞悬浮液接种 250ml 带挡板摇瓶中的 25ml RSM。在 39℃ 和 220rpm 摇动下孵育 48 小时后,采取 500 μ l 培养物,并在室温下将 35 μ l 4N NaOH 与样品混合 1 分钟,允许溶解核黄素晶体。通过添加 465 μ l 1M 磷酸钾缓冲液 (pH 6.8) 中和样品,并通过离心沉淀 (5 分钟,13200rpm)。使用上清液进行核黄素和两种副产物浓度的 HPLC 测定,所述两种副产物是 6,7-二甲基-8-核糖醇 2,4-二氧四氢蝶啶 (DMRL) 和奥索马嗪 (oxolumazine)。另外,采取第二培养物样品,并在离心 (5 分钟,13200rpm) 后使用上清液测定培养基中残余的葡萄糖和棉子糖浓度,来计算相对于碳源的核黄素产率。

[0117] 通过 HPLC 分析来自摇瓶培养物的样品。在装有恒温自动采样器、二极管阵列和荧光检测器的 Agilent 1100HPLC 系统上进行色谱。在装有 4mm LC-8DB 保护柱的 Supelcosil LC-8DB-5 μ 柱 (150mmx4.6mm) 上进行分离。使用 0.1M 乙酸和甲醇的混合物作为移动相。通过从 2% 甲醇 (持续 5 分钟) 开始并在 15 分钟内达到 50% 甲醇,应用梯度洗脱。将柱保持在 20℃ 下。通过 280nm 下的 UV 记录信号。核黄素与杂质 (例如副产物:DMRL 和奥索马嗪) 充分分离并在 15.2min 被洗脱。计算以得自 Fluka 的参考材料为基础。方法从 10 μ g/ml 到 1mg/ml 校准。

[0118] 另外,使用四元泵、自动采样器、UV- 和折射指数检测器,通过 Agilent 1100 系列 HPLC 系统分析培养液中葡萄糖和棉子糖的浓度。分离在 CAPCELL PAK NH2UG80 柱 (4.6mmx250mm,5 μ) (Shiseido) 上进行。最佳柱温度为 35℃。移动相是乙腈 DI 水以 65/35 比例的混合物。流速为 1.0ml/min,注射体积被设置为 5 μ l。检测折射指数信号并用于检测。每种化合物的校准范围是从 0.5mg/ml 到 30mg/ml。

[0119] 实施例 1

[0120] 生产核黄素营养缺陷型菌株

[0121] 为了改造 *B. subtilis* 的核黄素操纵子的原始前导序列和启动子序列,用得自质粒 pUB110 (Itaya et al., 1989, Nucleic Acid Res. 17:4410) 的新霉素抗性 (neo) 盒代替编码 RibD 脱氢酶结构域的 *ribD* (*ribG*) 的 5' 部分、5' 前导序列和核黄素启动子,得到核黄素-营养缺陷型菌株 *B. subtilis* BS3813。源自 *B. subtilis* 菌株 1A747 (SP β^+ , 原养型) 的基因组 DNA 得自 Bacillus Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 USA, 所述 *B. subtilis* 菌株 1A747 是 *B. subtilis* 168 (*trpC2*) 的衍生物。

[0122] 为了构建菌株,使用长侧翼同源性聚合酶链式反应 (Long Flanking Homology Polymerase Chain Reaction, LFH-PCR) 产生含有 1236bp neo 抗性盒的 DNA 片段,所述 neo 抗性盒侧翼是天然 P_{rib} 启动子上游区 526bp (侧翼 5') 和 *ribD* 基因的 502bp 3' 端 (侧翼 3')。因此,首先通过 PCR 扩增 3 个 DNA 片段:侧翼 5'、neo 抗性盒和侧翼 3'。如下产生 DNA 片段侧翼 5' 和侧翼 3':对含 1 μ l 10mM dNTP' s、5 μ l 10X 缓冲液和 0.5 μ l Pfu 聚合酶 (Stratagene) 的 50 μ l 反应体积中 0.1 μ g *B. subtilis* 1A747 的染色体 DNA 添加 1 μ l 引物 p50 (SEQ ID NO:6) 与 p51 (SEQ ID NO:7) 一起或引物 p44 (SEQ ID NO:4) 与 p45 (SEQ ID NO:5) 一起的 100 μ M 溶液。为了产生含有 neo 抗性盒的 DNA 片段,对含有 1 μ l 10mM dNTP' s、5 μ l 10X 缓冲液和 0.5 μ l Pfu 聚合酶 (Stratagene) 的 0.05 μ g pUB110 DNA 添加 1 μ l 引物 p9 (SEQ ID NO:2) 与 p10 (SEQ ID NO:3) 一起的 100 μ M 溶液。在 35 个循环

的三个相继步骤中进行 PCR 反应:(i)94℃下 30 秒的变性步骤;(ii)52℃下 30 秒的退火步骤;(iii)72℃下 1 分钟的延伸步骤。PCR 循环之前是 95℃下 3 分钟的变性步骤。三种 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分离,并使用 MinElute Gel Extraction Kit(Qiagen) 从凝胶中提取。在最终的 LFH-PCR 反应中,组合了三种经纯化的 PCR 产物(侧翼 5'、neo 抗性盒和侧翼 3'):对含有 1 μl 10mM dNTP's、5 μl 10X 缓冲液和 0.5 μl Pfu 聚合酶(Stratagene)的 50 μl 的最终反应体积添加 1 μl 引物 p45 与 p51 一起的 100 μM 溶液,1 μl 侧翼 5' PCR 产物(50ng),1 μl 侧翼 3' PCR 产物(50ng)和 1 μl neo 抗性盒(100ng)。在 35 个循环的三个相继步骤中进行 LFH-PCR 反应:(i)94℃下 30 秒的变性步骤;(ii)52℃下 30 秒的退火步骤;(iii)72℃下 2.5 分钟的延伸步骤。PCR 循环之前是 95℃下 3 分钟的变性步骤。使用 QiaQuick PCR 纯化试剂盒(Qiagen) 纯化组合的 LFH-PCR 产物。使用经纯化的 LFH-PCR 产物(2 μg) 转化感受态 *B. subtilis* 1A747 细胞。在含有 2mg/l 新霉素和 100mg/l 核黄素的 TBAB 平板上选择新霉素抗性(Nm^r) 转化体。使用引物 p45 与 p10,和引物 p51 与 p9,和转化体的染色体 DNA 作为模板 DNA,通过两个 PCR 实验证实得到的核黄素-营养缺陷型和 Nm^r BS3813 菌株的正确基因型。使用上文所述用于产生 DNA 片段侧翼 5' 和侧翼 3' 的标准反应条件进行 PCR 反应。另外,通过测序证实来自 BS3813 的 *ribD* 的序列。

[0123] 根据 WO 07/051552 中所述方法(见实施例 6) 用 PBS-1 噬菌体进行缺失构建体的转导,其中使用 BS3813 的溶解产物转导在转酮酶基因中带有突变的过量生产核黄素的菌株 *B. subtilis* BS3534(BS3534 的构建见 WO 07/051552)。BS3534 以过量生产核黄素的菌株 *B. subtilis* RB50 为基础,所述菌株 *B. subtilis* RB50 详细描述于 EP 405370 并可以保藏号 NRRL B-18502 获得。在含有 2mg/l 新霉素和 100mg/l 核黄素的 TBAB 琼脂平板上选择 Nm^r转导体。如上文所述通过 PCR 证实经分离的转导体的基因型。得到的菌株称作 BS3798。

[0124] 实施例 2

[0125] 生产带有经修饰的 *rib* 前导序列的菌株

[0126] 将两种突变引入 *rib* 前导区中,以脱调节 *rib* 基因的转录,其中 I 型是指 *rib0* 突变,II 型是指 *rib* 前导区的(部分)缺失(见图 1)。

[0127] 产生三种 *rib0* 突变,即称作"RK41"的 C85T,称作"RK1a"的 G121A,和称作"三重 *rib0*"的三重组合 G39A-G40A-G41A。对 II 型突变体而言,从 *rib* 前导区中缺失以下部分,其中核苷酸的编号是指分离自 *B. subtilis* 的 SEQ ID NO:42 中所示的 *rib* 前导序列:称作"del 茎环-右"的核苷酸 250 到 257(SEQ ID NO:36) 的缺失,称作"del 茎环-左"的核苷酸 231 到 238(SEQ ID NO:37) 的缺失,称作"del 侧翼-右"的核苷酸 239 到 263(SEQ ID NO:38) 的缺失,称作"del 终止子"的核苷酸 231 到 263(SEQ ID NO:39) 的缺失,称作"SWITCH 缺失"的核苷酸 166 到 263(SEQ ID NO:40) 的缺失,称作"del *mro175*"的核苷酸 135 到 263(SEQ ID NO:41) 的缺失,称作"前导区缺失的"整个前导区即核苷酸 1 到 263(SEQ ID NO:42) 的缺失。在 *mro175* 缺失的情况下,也发生四个核苷酸的插入(5' -ATGG-3')。

[0128] 带有经修饰的 *rib* 前导序列以及 *rib* 启动子(SEQ ID NOs:45-54) 的菌株的构建基本上通过根据实施例 1 中列出的流程/条件的两个 PCR 反应进行,其中在第一个 PCR 反应中,使用来自 *B. subtilis* 1A747 的染色体 DNA 产生称作侧翼 5' 和侧翼 3' 的两条 DNA 片段。在根据实施例 1 中所述流程/条件的第二个 PCR 反应中,使用引物 p45 和 p51 组合这两条 PCR- 片段。第一 PCR 反应的各个引物对(即用于产生侧翼 5' 的引物和用于产生侧翼 3'

的引物,所述侧翼 5' 和侧翼 3' 导致想要的突变 / 缺失,见上文) 分别列于表 1 第 2 列和第 3 列中。使用 QiaQuick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化后,使用 2 μ g 经纯化的全长 PCR 产物转化感受态 *B. subtilis* BS3813 细胞 (见实施例 1)。将细胞涂布在 SMM 平板上。将核黄素 - 原养型转化体悬浮于 1ml 0.9% NaCl 溶液中。将原始细胞悬浮液的 100 μ l 500- 倍稀释液涂布在 TBAB 琼脂平板上。将单个菌落转移至新鲜的 TBAB 琼脂平板上和补充有 2mg/l Nm 和 100mg/l 核黄素的 TBAB 琼脂平板上。正确的转化体对新霉素敏感,因此仅在 TBAB 琼脂平板上生长,不在补充有新霉素的平板上生长。另外,通过对新引入的 *rib* 启动子和 *ribD* 测序证实基因型。如表 1 第 4 列中所示为在 *rib* 前导区中含有各个突变 / 缺失的新产生的 *B. subtilis* 菌株命名。

[0129] 制备来自新产生的菌株的 PBS-1 溶解产物,并用于转导 (在实施例 1 中产生的) BS3798。在 SMM 平板上选择经转导的细胞。将核黄素 - 原养型 *B. subtilis* 转导体悬浮于 1ml 0.9% NaCl 溶液中。将原始细胞悬浮液的 100 μ l 500- 倍稀释液涂布在 TBAB 琼脂平板上。将单个菌落转移至新鲜的 TBAB 琼脂平板上和补充有 2mg/l Nm 和 100mg/l 核黄素的 TBAB 琼脂平板上。正确的转化体仅在 TBAB 琼脂平板上生长,因此是新霉素敏感的。如表 1 第 5 列中所示为新产生的菌株命名。

[0130] 表 1: 分别用于构建侧翼 5' 和侧翼 3' 片段导致经修饰的 *rib* 前导序列的引物对,和用所述 PCR 片段转化或用各个溶解产物转导得到的菌株的命名 (更多解释见文本)。

[0131]

<i>rib</i> 前导区突变的命名	侧翼 3'引物对 (SEQ ID NOs)	侧翼 5'引物对 (SEQ ID NOs)	经转化的菌株	经转导的菌株
RK1a	p74 / p51 (20 / 7)	p45 / p75 (5 / 21)	BS3833	BS3839
RK41	p72 / p51 (16 / 7)	p45 / p73 (5 / 18)	BS3958	BS3987, BS3988, BS3989
三重 <i>ribO</i>	p72a / p51 (17 / 7)	p45 / p73a (5 / 19)	BStripe_ <i>ribO</i>	
del 侧翼-右	p56 / p51 (8 / 7)	p45 / p57 (5 / 9)	BS3814	BS3832
del 终止子	p58 / p51 (10 / 7)	p45 / p59 (5 / 11)	BS3815	BS3821
del 茎环-右	p76 / p51 (22 / 7)	p45 / p77 (5 / 23)	BS3842	BS3846
Del 茎环-左	p79 / p51 (25 / 7)	p45 / p78 (5 / 24)	BS3847	BS3859
SWITCH 缺失	p80 / p51 (26 / 7)	p45 / p81 (5 / 28)	BS3867	BS3900, BS3916
del mro175	p80a / p51 (27 / 7)	p45 / p81a (5 / 29)	BSmro175	
前导区缺失	p96 / p51 (31 / 7)	p45 / p95 (5 / 30)	BSleader	

[0132] 经转化的菌株：用各个 PCR 片段转化 *B. subtilis* BS3813 后 *B. subtilis* 菌株的命名 (neo⁻ 抗性；基于 wt- 菌株 *B. subtilis* 1A747 的 B2- 营养缺陷型)；经转导的菌株：用根据第 4 列的各个菌株的溶解产物转导 *B. subtilis* BS3798 后 *B. subtilis* 菌株的命名 (neo⁻ 抗性，基于 *B. subtilis* RB50 的 B2- 营养缺陷型)。更多解释见文本。

[0133] 如上文所述在摇瓶筛选中针对核黄素生产检验新产生的菌株。48 小时后，通过添加 4N NaOH 溶解 500 μ l 样品的核黄素，中和并离心后，通过 HPLC 测定经加工的样品的核黄素浓度以及 DMRL 和奥索马嗪 (DMRL 的降解产物) 浓度。为了计算相对于碳源的核黄素产率，通过 HPLC 测定所有碳源的起始和残余浓度。

[0134] 结果展示于表 2 中。尽管野生型菌株 (1A747) 背景中天然的 *rib* 操纵子基本上不向培养基内分泌任何核黄素，但是针对核黄素过量生产选择的菌株背景 (RB50) 中相同的 *rib* 操纵子分泌可测出量的核黄素。用 *ribO* 突变体 RK41 分别在 wt (BS3958) 和 RB50 背景 (BS3987) 二者中获得了最好的结果。终止子的缺失未导致出人意料的结果，特别是在 wt 背景 (BS3815) 中。尽管在 wt 背景中用 RK1a *ribO* 突变体 (BS3833) 获得了第二好的结果，但是用 SWITCH 缺失 (BS3900 和 BS3916) 实现了 RB50 背景中的第二好的结果，这显示比前导区缺失菌株甚至更高的核黄素产率。

[0135] 表 2A:以带有天然 rib 前导区的 wt 菌株 *B. subtilis* 1A747 为基础的如所示经转化的 *B. subtilis* 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出 (更多解释见文本)。

[0136]

菌株	Rib 前导区突变	产率 [%]
1A747	野生型	0.0004
BS3833	RK1a	0.0570
BS3958	RK41	0.1100
BS3814	del 侧翼 - 右	0.0090
BS3815	del 终止子	0.0103
BS3867	SWITCH 缺失	0.0139

[0137] 表 2B:以带有天然 rib 前导区的过量生产核黄素的菌株 *B. subtilis* RB50 为基础如所示经转导的 *B. subtilis* 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出 (更多解释见文本)。

菌株	Rib 前导区突变	产率 [%]
RB50	野生型 <i>rib</i> 操纵子	0.46
BS3839	RK1a	1.29
BS3987	RK41	1.64
BS3832	del 侧翼-右	0.33
BS3821	del 终止子	0.74
BS3900, BS3916	SWITCH 缺失	1.48
BS3846	del 茎环-右	0.11
BS3859	Del 茎环-左	0.52

[0138]

[0139] 实施例 3

[0140] 用强组成型启动子代替天然 rib 启动子

[0141] 为了评估 rib 前导区突变与强启动子组合的可能的协同效应,用强组成型启动子 P_{veg} 或用 P_{Spo15} 代替新产生的构建体 (见实施例 2) 的原始 rib 启动子。构建方式与实施例 2 的途径密切相似。为了产生 DNA 片段侧翼 3' 和侧翼 5', 对含 1 μ l 10mM dNTP's、5 μ l 10X 缓冲液和 0.5 μ l Pfu 聚合酶 (Stratagene) 的 50 μ l 反应体积中 0.1 μ g 1A747 的染色体 DNA 添加 1 μ l 引物 p60 (SEQ ID NO:12) 与 p51 (用于构建 P_{veg}) 一起或引物 p62 (SEQ ID NO:14) 与 p51 (用于构建 P_{Spo15}) 一起和引物对 p45 与 p61 (SEQ ID NO:13) (用于构建 P_{veg}) 或引物 p45 与 p63 (SEQ ID NO:15) 一起 (用于构建 P_{Spo15}) 的 100 μ M 溶液。在 35 个循环

的三个相继步骤中进行 PCR 反应：(i) 94℃ 下 30 秒的变性步骤；(ii) 52℃ 下 30 秒的退火步骤；(iii) 72℃ 下 1 分钟的延伸步骤。PCR 循环之前是 95℃ 下 3 分钟的变性步骤。两种 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分离，并使用 MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) 从凝胶中提取。在最终的 PCR 反应中，组合了两种经纯化的 PCR 产物（侧翼 5' 和侧翼 3'）：在含有 1 μl 10mM dNTP's、5 μl 10X 缓冲液和 0.5 μl Pfu 聚合酶 (Stratagene) 的 50 μl 的最终反应体积中混合 1 μl 引物 p45 与 p51 的 100 μM 溶液，1.0 μl 侧翼 5' PCR 产物 (50ng) 和 1.0 μl 侧翼 3' PCR 产物 (50ng)。在 35 个循环的三个相继步骤中进行 PCR 反应：(i) 94℃ 下 30 秒的变性步骤；(ii) 52℃ 下 30 秒的退火步骤；(iii) 72℃ 下 2.5 分钟的延伸步骤。PCR 循环之前是 95℃ 下 3 分钟的变性步骤。使用 QiaQuick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化组合的 PCR 产物。使用经纯化的全长 PCR 产物 (2 μg) 转化感受态 *B. subtilis* BS3813 细胞。将细胞涂布在 SMM 平板上。将核黄素 - 原养型 *Bacillus* 转化体悬浮于 1ml 0.9% NaCl 溶液中。将原始细胞悬浮液的 100 μl 500- 倍稀释液涂布在 TBAB 琼脂平板上。将单个菌落转移至新鲜的 TBAB 琼脂平板上和补充有 2mg/l Nm 和 100mg/l 核黄素的 TBAB 琼脂平板上。正确的转化体仅在 TBAB 琼脂平板上生长，因此是新霉素敏感的。另外，通过对新整合的启动子、rib 前导区和 ribD 测序证实基因型。带有 P_{veg} 驱动的 rib 操纵子的菌株被称作 BS3811，带有 P_{Spo15} 驱动的 rib 操纵子的菌株被称作 BS3817。

[0142] 为了将强启动子与前导区修饰组合，在实施例 2 中描述的所有 PCR 反应中，分别用菌株 BS3811 (P_{veg} 启动子) 和 BS3817 (P_{Spo15} 启动子) 代替菌株 1A747 的 gDNA。每个 PCR 反应的所有其他条件（包括使用的引物对）保持不变。将最终的 PCR 产物转化进 BS3813 中，并如所述验证获得的转化体（实施例 2）。在构建体 P_{Spo15} 前导区缺失的情况下，如表 4 中所示使用针对侧翼 5' PCR 产物的引物对 p45/p9 和针对侧翼 3' PCR 产物的 p96/p51。所述其他步骤如上文所述进行。制造以下构建体，括号中是用所述构建体转化得到的 *B. subtilis* 菌株的命名：P_{veg}_del 侧翼 - 右 (BS3840)，P_{Spo15}_del 侧翼 - 右 (BS3831)，P_{veg}_del 终止子 (BS3844)，P_{Spo15}_del 终止子 (BS3871)，P_{Spo15}_SWITCH 缺失 (BS3874)，P_{Spo15}_leader 缺失 (BS3944)，P_{veg}_RK41 (BS3887)，P_{veg}_RK1a (BS3953)，P_{Spo15}_RK1a (BS3884)，P_{veg}_三重 rib0 (BS3912)。

[0143] 由上述菌株制备 PBS-1 溶解产物，并转导进 BS3798 中。在 SMM 平板上选择经转导的细胞。将核黄素营养缺陷型 *B. subtilis* 转化体悬浮于 1ml 0.9% NaCl 溶液中。将原始细胞悬浮液的 100 μl 500- 倍稀释液涂布在 TBAB 琼脂平板上。将单个菌落转移至新鲜的 TBAB 琼脂平板上和补充有 2mg/l Nm 和 100mg/l 核黄素的 TBAB 琼脂平板上。正确的转化体仅在 TBAB 琼脂平板上生长，因此是新霉素敏感的。产生以下菌株：用来自 BS3953 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3970 和 BS3971；用来自 BS3884 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3905 和 BS3907；用来自 BS3887 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3903 和 BS3914；用来自 BS3912 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3981-83；用来自 BS3840 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3890；用来自 BS3844 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3880 和 BS2882；用来自 BS3817 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3850 和 BS3851；用来自 BS3944 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS5026 和 BS5041；用来自 BS3831 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3853；用来自 BS3874 的 PBS-1 溶解产物转导的 BS3897 和 BS3956。

[0144] 如上文所述在摇瓶中检验大部分菌株的核黄素生产。48 小时后，通过添加 4N NaOH 溶解 500 μl 样品的核黄素，中和并离心后，通过 HPLC 测定经加工的样品的核黄素浓度以及

DMRL 和奥索马嗪浓度。为了计算相对于碳源的核黄素产率,通过 HPLC 测定所有碳源的起始和残余浓度。结果展示于表 3 中。

[0145] 表 3A:以带有天然 rib 前导区的 wt 菌株 *B. subtilis* 1A747 为基础的如所示经转化的 *B. subtilis* 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出 (更多解释见文本)。

[0146]

菌株	Rib 前导区突变	产率 [%]
1A747	野生型	0.0004
BS3811	P _{veg}	0.0120
BS3817	P _{Spo15}	0.0163
BS3953	P _{veg} _RK1a	0.1600
BS3884	P _{Spo15} _RK1a	0.7706
BS3887	P _{veg} _RK41	0.3757
BS3912	P _{veg} _三重 rib0	1.0900
BS3840	P _{veg} _del 侧翼 - 右	0.0748
BS3831	P _{Spo15} _del 侧翼 - 右	0.0702
BS3844	P _{veg} _del 终止子	0.0666
BS3871	P _{Spo15} _del 终止子	0.0359
BS3874	P _{Spo15} _SWITCH 缺失	0.2823
BS3944	P _{Spo15} _前导区缺失	0.1150

[0147] 表 3B:以带有天然 rib 前导区的过量生产核黄素的菌株 *B. subtilis* RB50 为基础的如所示经转导的 *B. subtilis* 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出 (更多解释见文本)。

[0148]

菌株	Rib 前导区突变	产率[%]
RB50	野生型 <i>rib</i> 操纵子	0.46
BS3849	P _{veg}	1.33
BS3850, BS3851	P _{Spo15}	1.57
BS3970, BS3971	P _{veg_RK1a}	2.88
BS3905, BS3907	P _{Spo15_RK1a}	3.31
BS3903, BS3914	P _{veg_RK41}	4.18
BS3981	P _{veg} 三重 <i>ribO</i>	2.52
BS3890	P _{veg_del} 侧翼-右	1.14
BS3853	P _{Spo15_del} 侧翼-右	1.63
BS3880	P _{veg_del} 终止子	1.80
BS3875	P _{Spo15_del} 终止子	2.38
BS3897	P _{Spo15_SWITCH} 缺失	3.76
BS5026	P _{Spo15} 前导区缺失	2.16

[0149] 对 *rib* 前导区或 *rib* 启动子进行的所有操作导致提高的核黄素生产。根据实施例 2 中所述结果（见表 2），用强的组成型启动子代替天然启动子时，*ribO* 突变 RK41 也是最有效的突变。通过使用强启动子，用 P_{veg} 与 RK41 的组合达到了高达 4.2% 的产率。P_{Spo15} 与 SWITCH 缺失的组合令人惊讶地显示 3.8% 的第二最佳产率，这比导致 2.4% 产率的 P_{Spo15} 与 *del* 终止子的组合好得多。

[0150] 对 *rib* 前导区或 *rib* 启动子进行的所有操作导致提高的核黄素生产。根据实施例 2 中所述结果（见表 2），用强的组成型启动子代替天然启动子时，*ribO* 突变 RK41 也是最有效的突变。通过使用强启动子，用 P_{veg} 与 RK41 的组合达到了高达 4.2% 的产率。P_{Spo15} 与 SWITCH 缺失的组合令人惊讶地显示 3.8% 的第二最佳产率，这比导致 2.4% 产率的 P_{Spo15} 与 *del* 终止子的组合好得多。

[0151] 实施例 4

[0152] *ribO* 突变与前导区缺失和用强组成型启动子代替天然 *rib* 启动子的组合

[0153] 为观察典型脱调节性 *ribO* 突变与前导区缺失的组合是否能够提高核黄素恒产，组合了实施例 2 和 3 中产生的一些突变。构建按照上文所列流程进行。用于侧翼 5' 和 3' PCR 的模板和引物展示于表 4 中（更多信息也见实施例 1）。组合性 PCR 和进入 BS3813 的转化如实施例 2 和 3 中所述进行。测序揭露了构建体 P_{Spo15} 三重 *ribO_del mro175* 和 P_{veg} 三重 *ribO_del mro175* 中存在两种额外的突变，即 T25G 和 C101T，其中编号对应于 SEQ ID NO:42。带有新产生的构建体的新菌株的命名展示于表 4 第 4 列中。

[0154] 制备来自新产生的菌株的 PBS-1 溶解产物并用于转导（实施例 1 中产生的）

BS3798。经转导的细胞在 SMM 平板上的选择如实施例 2 中所述进行。新转导的菌株如表 4 第 5 列中所示命名。

[0155] 表4:分别用于构建侧翼 5 和侧翼 3' 片段导致经修饰的 rib 前导区序列与各自组成型启动子组合的引物对,和用所述 PCR- 片段转化或用各自溶解产物转导得到的菌株的命名(更多解释见文本)。

[0156]

Rib 前导区突变的命名 (PCR 的模板)	侧翼 3'引物对 (SEQ ID NOs)	侧翼 5'引物对 (SEQ ID NOs)	经转化的菌株	经转导的菌株
P _{veg} _三重 ribO_del mro175 (BS3912)	p45 / p81a (5 / 29)	p80a / p51 (27 / 7)	BS3889	BS3908
P _{Spol5} _三重 ribO_del mro175 (BS3889)	p45 / p63 (5 / 15)	p62 / p51 (14 / 7)	BS3923	BS3922
P _{Spol5} _RK41_del 终止子 (BS3871)	p45 / p73 (5 / 18)	p72 / p51 (16 / 7)	BS3954	BS3984
P _{Spol5} _RK41_SWITCH 缺失 (BS3874)	p45 / p73 (5 / 18)	p72 / p51 (16 / 7)	BS3915	BS3964
P _{veg} _RK41_SWITCH 缺失 (BS3887)	p45 / p81 (5 / 28)	p80 / p51 (26 / 7)	BS3920	BS3899

[0157] 如上文所述通过摇瓶筛选进行新产生的菌株的核黄素生产的检验。结果展示于表 5 中,显示与实施例 3 中所示结果(见表 4)相比核黄素生产的进一步提高。rib0 突变 RK41 和三重 rib0 分别与强启动子和 rib 前导区缺失的组合导致摇瓶筛选中大于 7.6% 的核黄素产率,与之相比,无前导区缺失的最佳组合——P_{veg} 启动子与 rib0 突变 RK41 的组合实现了 4.2% 的核黄素产率(见表 4)。本文所述的特异性前导区缺失几乎使脱调节的(rib0 突变,组成型启动子)rib 前导区-启动子组合的产率翻番。除“SWITCH 缺失”之外,“del mro175”也出人意料地能够改进 RB50 背景中的核黄素产率,超过无缺失的构建体。终止子的缺失(“del 终止子”)也具有积极但是较不显著的效果。P_{Spol5}被直接置于 ribD 的 Shine-Dalgarno 序列之前的前导区缺失构建体显示比最好的三重构建体(BS5026,见表 4 和 6)小 3.6- 倍的产率。这些结果指出,rib 前导区不仅是调节必需的,而且也是全长转录本稳定化所必需的。

[0158] 表5:以带有天然 rib 前导区的过量生产核黄素的菌株 B. subtilis RB50 为基础的如所示经转导的 B. subtilis 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出(更多解释见文本)。

[0159]

菌株	Rib 前导区突变	产率 [%]
RB50	野生型 rib 操纵子	0.46
BS3908	P _{veg} _三重 ribO_del mro175	6.79

BS3922	P _{Spo15} _三重 rib0_del mro175	6.47
BS3984	P _{Spo15} _RK41_del 终止子	5.24
BS3964	P _{Spo15} _RK41_SWITCH 缺失	7.80
BS3899	P _{veg} _RK41_SWITCH 缺失	7.67
BS5026	P _{Spo15} _前导区缺失	2.16

[0160] 实施例 5

[0161] 用 mRNA 稳定化元件代替天然 rib 前导区

[0162] aprE mRNA 稳定化元件的 DNA 序列分布于两种 PCR 产物上。为了扩增在 aprE mRNA 稳定化元件 5' 端含有 rib 操纵子 5' 区域的 PCR 产物 1, 在标准 PCR 条件下使用引物 p45 与 p143' (SEQ ID NO :33) 和来自菌株 BS3817 的染色体 DNA 作为模板。为了扩增在 aprE mRNA 稳定化元件 3' 端含有 ribD 的 PCR 产物 2, 在标准 PCR 条件下使用引物 p51 和 p142 (SEQ ID NO :32) 和来自菌株 BS3817 的染色体 DNA 作为模板。在标准 LFH-PCR 反应中, 如上文所述将经凝胶纯化的 PCR 产物 1 和 2 组合进一条 DNA 片段中。相同方法适用于 grpE mRNA 稳定化元件, 使用来自菌株 BS3817 的染色体 DNA 作为模板, 在如上文所述的条件下使用引物对 p45/p145' (SEQ ID NO :35) 和引物对 p51/p144 (SEQ ID NO :34) 用于最先两次 PCR, 之后使用引物对 p45/p51 组合 PCR。再次将经纯化的 LFH-PCR 产物转化进核黄素营养缺陷型 *B. subtilis* BS3813 的感受态细胞中, 其中核黄素启动子区和 ribD 的 5' 部分被新霉素抗性盒代替。在 SMM 平板上选择核黄素原养型转化体。将经分离的转化体悬浮于 1ml 0.9% NaCl 溶液中, 并将原始细胞悬浮液的 100 μ l 500- 倍稀释液涂布在 TBAB 琼脂平板上。将单个菌落转移至新鲜的 TBAB 琼脂平板上和补充有 2mg/l Nm 和 100mg/l 核黄素的 TBAB 琼脂平板上。正确的转化体仅在 TBAB 琼脂平板上生长, 因此是新霉素敏感的。另外, 通过测序新引入的 DNA 段证实基因型。得到的菌株分别被称作 BS5193 (带有构建体 P_{15 Ω aprE}ribDEAHT) 和 BS5196 (带有构建体 P_{15 Ω grpE}ribDEAHT)。

[0163] 制备来自菌株 BS5193 和 BS5196 的 PBS-1 溶解产物, 并用于转导 (在实施例 1 中产生的) BS3798。如实施例 2 中所述在 SMM 平板上选择经转导的细胞。基于菌株 BS5193 的新转导的菌株分别被称作 BS5260 和 BS5262, 基于菌株 BS5196 的新转导的菌株被称作 BS5244。

[0164] 如上文所述在摇瓶实验中检验核黄素生产。结果展示于表 6 中。

[0165] 表 6A: 与带有天然 rib 前导区的 wt *B. subtilis* 菌株 1A747 相比, 如所示经转化的 *B. subtilis* 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出 (更多解释见文本)。

[0166]

菌株	Rib 前导区突变	产率 [%]
1A747	野生型	0.0004
BS3817	P _{Spo15}	0.0163

BS3944	P _{Spo15} _前导区缺失	0.1150
BS5193	P _{Spo15} _aprE	0.1000
BS5196	P _{Spo15} _grpE	0.3700

[0167] 表 6B:与带有天然 rib 前导区的过量生产核黄素的菌株 *B. subtilis* RB50 相比,如所示经转导的 *B. subtilis* 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出(更多解释见文本)。

[0168]

菌株	Rib 前导区突变	产率 [%]
RB50	野生型 rib 操纵子	0.46
BS3850	P _{Spo15}	1.57
BS5026	P _{Spo15} _前导区缺失	2.16
BS5260	P _{Spo15} _aprE	2.07
BS5244	P _{Spo15} _grpE	2.99

[0169] 与被调节的野生型 rib 操纵子相比,用未经调节的(non-regulated)组成型启动子例如 P_{Spo15}代替 rib 启动子将摇瓶筛选中的核黄素产率提高了 41 倍(在野生型背景中)和 3.4 倍(在 RB50 背景中)。去除 rib 前导区并将 P_{Spo15}启动子直接置于 ribD 前时,核黄素产率再被提高 7 倍(在野生型宿主菌株中)和 1.4 倍(在 RB50 背景中)。用 aprE mRNA 稳定化元件代替 rib 前导区显示在上文使用的两种菌株背景中均对产率无影响。然而,用 grpE mRNA 稳定化元件代替 rib 前导区时,核黄素产率提高 3.7 倍(在野生型宿主中)和 1.44 倍(在 RB50 背景中)。

[0170] 为了检验经修饰的 rib 操纵子的表现对宿主菌株的影响,还将来自 *B. subtilis* 1A747(野生型 rib 操纵子)、BS5193、BS5196 和 BS3944 的溶解产物转导进称作 BS5178(spo0A, rib::neo, ribC1, bpr::cam, tkt^{mut})的另一 RB50 变体中。如上文所述进行摇瓶筛选。结果(包括新构建的菌株的名称)展示于表 7 中。

[0171] 表 7:如上文所示经转导的 *B. subtilis* 菌株的核黄素生产。产率作为每 g 碳源的 g 核黄素给出,并与 BS5240 的产率比较。

[0172]

菌株	Rib 前导区突变	产率 [%]
BS5240	P _{Spo15} _前导区缺失	100
BS5191	野生型 rib 操纵子	40
BS5237	P _{Spo15} _aprE	140

BS5238	P _{Spo15} _grpE	270
--------	--------------------------	-----

[0173] 以摇瓶模式检验时,新菌株背景中稳定化元件的积极影响更为显著。与带有无前导区的 rib 操纵子的菌株相比,目前 aprE mRNA 稳定化元件也将核黄素产率提高了 40%。与无 rib 前导区的构建体相比,grpE mRNA 稳定化元件甚至显示提高至 2.7 倍的产率。

[0174] 以摇瓶模式检验时,新菌株背景中稳定化元件的积极影响更为显著。与带有无前导区的 rib 操纵子的菌株相比,目前 aprE mRNA 稳定化元件也将核黄素产率提高了 40%。与无 rib 前导区的构建体相比,grpE mRNA 稳定化元件甚至显示提高至 2.7 倍的产率。

[0175] 实施例 6

[0176] 额外的 rib0 突变与前导区缺失和强组成型启动子的组合

[0177] 以与 rib0 突变 RK41(= RK61a), RK1a 和组合了 Kil et al.,1992 的 rib0 突变 RK4、RK8、RK5(= RK2) 的“三重 rib0”被引入 rib 前导区中相同的方式,可以将 Kil et al.,1992 中描述的额外的 rib0 突变用于产生替代性的经优化的 rib 前导区。突变的编号涉及 SEQ ID NO:42 中所示的 rib 前导序列。所述突变 RK111a(G59A)、RK116a(G56A)、RK62a(G60A;与 RK82a 相同)、RK93a(C87T) 和 RK27a(C 128T) 与 del 终止子、SWITCH 缺失和 del mro175(见上文)以及强组成型启动子 P_{Spo15}或 P_{veg}组合在一起,取决于用于产生侧翼 5' 和侧翼 3' 的模板。作为 rib0 突变有效的任何突变可以通过这种方式与所述启动子和前导区缺失组合。

[0178] 使用以下引物对构建 rib0 突变:用于构建 RK111a 的引物对 p111a_f/p111a_r(SEQ ID NO:83 和 84);用于构建 RK116a 的引物对 p116a_f/p116a_r(SEQ ID NO:85 和 86);用于构建 RK62a 的引物对 p62a_f/p62a_r(SEQ ID NO:87 和 88);用于构建 RK93a 的引物对 p93a_f/p93a_r(SEQ ID NO:89 和 90);用于构建 RK27a 的引物对 p27a_f/p27a_r(SEQ ID NO:91 和 92)。这些引物在如实施例 2 中所述的 PCR 反应中使用。为了产生侧翼 5', 引物 p45 与反义引物一起应用。为了产生侧翼 3', 有义引物与引物 p51 一起应用。使用引物 p45 和 p51 在第三 PCR 中组合侧翼 5' 和 3' (见实施例 2)。如实施例 2 中所述进行菌株的转化和转导。为了代替天然启动子,遵照根据权利要求 3 的指示,为了将 rib0 突变与前导区突变组合,遵照根据权利要求 4 的指示。

[0179] 表 9:通过先前实施例中上述基于 PCR 的方法产生 rib0 构建体所需的模板(更多解释见文本)。

[0180]

rib 前导区突变的命名	侧翼 5' 的模板	侧翼 3' 的模板
P _{Spo15} _RK111a	BS3817	BS3817
P _{veg} _RK111a	BS3811	BS3811
P _{Spo15} _RK111a_SWITCH 缺失	BS3874	BS3874
P _{veg} _RK111L_SWITCH 缺失	BS3811	BS3867

P _{Spo15} _RK111a_del 终止子	BS3871	BS3871
P _{veg} _RK111a_del 终止子	BS3844	BS3844
P _{Spo15} _RK111a_del mro175	BS3817	BSmro175
P _{veg} _RK111a_del mro175	BS3811	BSmro175

[0181] 将针对表 9 中所列所有构建体产生的 PCR 产物转化进 BS3813 中。如实施例 2 中所述进行选择,并使用经证实的菌株的溶解产物转导 BS3798。如上文所述在摇瓶实验中获得核黄素产率在构建体 RK41_SWITCH 缺失或三重 rib0_del mro175 的范围内(见表 5)。使用另一菌株背景(例如实施例 5 中所述)时,这些量被进一步提高。

[0182] 实施例 7

[0183] 生产除带有经修饰的 rib 前导序列的 *B. subtilis* 之外的其他菌株

[0184] 可以使用上文实施例中所述的构建体在来自其他菌株的 rib 前导序列中鉴定/产生相应的修饰,所述其他菌株已知具有到位的核糖开关,并且是核黄素生产的合适宿主菌株。

[0185] 在根据 Vitreschak et al., Nucleic Acid Res 30,3141-3151,2002 图 2 中所示的比对中,鉴定了其他生物中未经修饰的 rib 前导区的相应部分。如上文所述产生缺失突变并任选地与 rib0 突变(与在 *B. subtilis* 中鉴定突变的同源)组合。构建体可进一步与上述宿主菌株的其他已知修饰或强启动子组合,从而在本领域技术人员已知的合适培养条件下提高核黄素生产。

[0001]

序列表

<110> 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

<120> 经改进的核黄素生产

<130> 26251

<160> 92

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4230

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

taaggacaaa tgaataaaga ttgtatcctt cggggcaggg tggaaatccc gaccggcggt	60
agtaaagcac atttgcttta gagcccgatga cccgtgtgca taagcacgcg gtggattcag	120
tttaagctga agccgacagt gaaagtctgg atgggagaag gatgatgagc cgctatgcaa	180
aatgtttaaa aatgcatagt gttatttcct attgcgtaaa atacctaaag cccgaattt	240
tttataaatt cggggctttt ttgacggtaa ataacaaaag aggggagggg aacaaatgga	300
agagtattat atgaagctgg ccttagatct tgcgaagcag ggcaaggac agaccgaatc	360
caatccgctc gtcggcgctg ttgtcgtaaa ggacggacaa attgtcgga tgggcgcca	420
tttaaaatat ggtgaagctc atgcagaagt tcatgccatc catatggctg gagcacatgc	480
agagggtgcc gacatttacg ttacactcga accgtgcagc cattacggaa aaacaccgcc	540
atgtgcagaa ttgattatca actctggtat caaaagagtg ttcgtggcga tgagagatcc	600
taatccgctt gtggctggaa gagggatcag catgatgaaa gaagctggca ttgaggtaa	660
ggaaggcatc ctggcagacc aggcggagag gctgaatgaa aaatttctgc actttatgag	720
gacaggcctt ccgtacgtca cgctaaaagc ggctgccagc cttgacggca agatagctac	780
cagcacgggt gacagcaaat ggatcacgtc agaggctgca agacaggatg ctcagcaata	840
caggaaaaca caccaaagca ttttagtcgg agttggcaca gtgaaagccg acaatccgag	900
cttaacctgc agactgccga atgtaacaaa acagccgggt cgggtcatac ttgataccgt	960
actctcgatt cctgaggacg ctaaagtgat ttgcgatcaa atagcgccga catggatttt	1020
tacgacggca cgcgcagacg aggaaaagaa aaaacggctt tcagctttcg gagtgaacat	1080
atttacactt gaaaccgagc gcattcaaat tcctgatgtt ttgaagatcc tagcggaaga	1140
aggcatcatg tcggtgtatg tggaaggcgg ttcagctgtt cacggaagct ttgtcaaaga	1200

[0002]

aggctgtttt caagaaatca ttttctattht tgcccctaaa ctaatcggag gaacgcatgc	1260
tcccagctta atctccggtg aaggthtttca atcaatgaaa gatgtcccct tattacaatt	1320
cactgatata acccaaatcg gccgtgatat caaactgacg gcaaaaccga caaaggaata	1380
ggatggtgac catgtttaca ggaattatcg aagaaacagg cacaatcgaa tccatgaaaa	1440
aagcagggca tgcaatggcc ttaactatta aatgctcaaa gatttttagag gatgttcac	1500
ttggcgacag cattgcagtg aacggcattt gtctgactgt cactgatttt acaaaaaatc	1560
aattcacagt ggatgttatg cctgaaacag tcaaagctac gtcactgaat gatttaacaa	1620
aaggaagcaa agtaaatctg gaaagagcga tggcggcaaa cggccgtttc ggaggccatt	1680
tcgtctcagg ccatgtcgac ggaactgcgg aaatcacacg aattgaagag aaaagcaacg	1740
cagtttacta tgatttaaaa atggaccctgt cattaacaaa aacattgggt ttaaagggat	1800
caattactgt ggatggcgtg agcttaacca tattcggcct gacagaagac acagtgcga	1860
tctccttaat accgcatacg atcagcgaaa cgatcttttc agaaaaaacg atcggctcta	1920
aagtgaatat cgaatgcgat atgatcggaa aatatatgta tcgatttttg cataaagcca	1980
atgaaaataa gaccaacaa accattacaa aagccttctt aagcgaaaac ggctttttaga	2040
gaggaagatt tgcatgtttc atccgataga agaagcactg gacgctttaa aaaaaggcga	2100
agtcacatc gttgtagatg atgaagacag agaaaatgaa ggagactttg tggctcttgc	2160
cgagcatgca acgccggaag tcattaactt tatggcgaca catgggagag gactgatctg	2220
cacgccgtc agtgaggaaa tcgcagacag gcttgatctt caccctatgg ttgagcataa	2280
tacagactct caccacactg catthaccgt aagcatagac catcgtgaaa cgaagacagg	2340
tatcagcgt caagaaagat cttttaccgt tcaagcattg ctggacagca aatccgtgcc	2400
atctgatttt cagcgtccgg ggcacatttt tccactgatt gcgaaaaaag gaggtgtcct	2460
gaaaagagcg ggccatacag aagctgctgt tgatcttgct gaagcttgcg gatctccagg	2520
agccggcgtc atttgtgaaa ttatgaatga agacggaacg atggcgagag tgcttgagct	2580
cattgaaatt gcgaaaaagc atcaattaaa aatgatcacc attaaggatt tgattcaata	2640
ccgttacaat ctgacaacac ttgtcgagcg tgaagttgac attacgtgc ctactgattt	2700
tgggacattt aaggthttatg gatacacaaa tgaggtagat ggaaaagagc atgtcgcat	2760
tgtgatggga gatgtgccgt tcggagaaga accggtattg gtccgggtgc attcagaatg	2820
tctcacaggt gacgtgtttg gctctcatcg ctgtgattgc ggaccgcagc tgcacgccgc	2880

[0003]

```

gctgaaccaa attgccgcag aaggccgtgg agtgctcctg tacttgccgc aagaaggacg 2940
aggcatcggg ttaatcaata aattaaaagc ttataagctt caggaacaag gctatgacac 3000
cgtagaagcc aatgaggcgc ttggattctt gccggatctt cgcaactatg gcatcggagc 3060
acaaatttta cgcgacctcg gtgtccggaa tatgaagctt ttgacgaata atccgcgaaa 3120
aatcgcaggc cttgaaggct acggactcag tatttcagaa agagtgccgc ttcaaattga 3180
ggcgaaagaa cacaataaaa aatatttgca aacccaaatg aacaagctag gtcatttact 3240
tcattttctaa tcacaaatat cacaaaaaag gatgggaatc atatgaatat catacaagga 3300
aatttagttg gtacaggctc taaaatcgga atcgtagtag gaagatttaa tgattttatt 3360
acgagcaagc tgctgagcgg agcagaagat gcgctgctca gacatggcgt agacacaaat 3420
gacattgatg tggcttgggt tccaggcgca tttgaaatac cgtttgctgc gaaaaaaatg 3480
gcggaaacaa aaaaatatga tgctattatc acattgggca ctgtcatcag aggcgcaacg 3540
acacattacg attatgtctg caatgaagct gcaaaaggca tcgcgcaagc agcaaact 3600
actggtgtac ctgtcatctt tggaattgta acaactgaaa acatcgaaca ggctatcgag 3660
cgtgccggca caaagcggg caacaaagggt gtagattgtg ctgtttctgc cattgaaatg 3720
gcaaatttaa accgctcatt tgaataatct gctgaaaaca gtttaaaaat atggcgaaaa 3780
tgatataatg tgagaaaacg gatcacctat tcgtatccgt taatagcaga ctggacattt 3840
tggaataga ggggttttta tgtaattcgt ttataaaaaa tcgtttgaaa agattgcgat 3900
ggggcttctt tcgtttatgc cgaatgaaaa agaccttaag cagcttcagc agacaattaa 3960
ggactacgaa acggatacag accgccagct ctttctttgg aaagaggacg aggatatcgt 4020
cggagcaatc ggagtcgaaa aaaaggattc tgaggttgag atccggcata tcagtgtgaa 4080
tccttctcat cgccatcaag gaatcggaaa acagatgatg gatgctttaa agcatttatt 4140
caaaacgcaa gtactggttc caaatgaatt aacgcagagc tttttcgaaac gttgtcaagg 4200
tcagcaggat caagacattt catacaataa 4230

```

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 引物

<400> 2
 gcttgggctg caggtcgaga tc

22

[0004]

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 3
gttcaaaatg gtatgcgttt tgacac

26

<210> 4
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 4
gatctcgacc tgcagcccaa gcgaaataaa cttacaattt gagaaaaac

49

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 5
acatattccc gttatgcac g

21

<210> 6
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 6
gtgtcaaaac gcataccatt ttgaacgagt tggcacagtg aaagccg

47

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

[0005]

<400> 7	
ctattccttt gtcggttttg ccg	23
<210> 8	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 8	
aatacctaaa gccccgaaga cggtaaataa caaaagagg	39
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 9	
ttcggggcgt taggtatttt acg	23
<210> 10	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 10	
cctattgcgt aaaataccta aagacggtaa ataacaaaag ag	42
<210> 11	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
tttaggtatt ttacgcaata ggaaataac	29
<210> 12	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工的	

[0006]

<220>

<223> 引物

<400> 12

taattttaaat tttatttgac aaaaatgggc tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg 60

acaaatgaat aa

72

<210> 13

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 13

tttgtcaaataaaa ttagaaataa acttacaatt tgagaaaaac 50

<210> 14

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 14

taaaaattttt acaaaaaggt attgactttc cctacagggt gtgtaataat ttaattataa 60

ggacaaatga ataaagattg

80

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 15

caataccttt ttgtaaaatt tttagaaata aacttacaat ttgagaaaaa c 51

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 16

[0007]

ccgtgaccog tgtgcataag c	21
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 17	
aaatggaaat cccgaccggc ggtag	25
<210> 18	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 18	
tatgcacacg ggtaacggac tctaaagcaa atgtgcttta c	41
<210> 19	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 19	
ctaccgcccgg tcgggatttc catTTtgccc cgaaggatac aatctttatt c	51
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 20	
tttaagctga agccgacagt g	21
<210> 21	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

[0008]

<223> 引物

<400> 21

tgtcggcttc agcttaaatt gaatccaccg cgtgctt

37

<210> 22

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 22

gccccgattt ttttataaat tttttgacgg taaataacaa aagagg

46

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 23

aaaaaattta taaaaaattc ggggctttag

30

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 24

tttaggtatt ttacgcaata gg

22

<210> 25

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 25

cctattgcgt aaaataccta aattttttat aaattcgggg cttttttg

48

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

[0009]

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 26

agtctggatg ggagaaggat ggacggtaaa taacaaaaga gg

42

<210> 27

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 27

cagtttaagc tgaagccatg ggacggtaaa taacaaaaga gg

42

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 28

catccttctc ccatccagac t

21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 29

ccatggcttc agcttaaact g

21

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 30

ataattaaat tattacacac cctg

24

[0010]

<210>	31	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	31	
	caggggtgtgt aataatttaa ttgacggtaa ataacaaaag agggg	45
<210>	32	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	32	
	ttttaagtaa gtctactctg aattttttta gacggtaaata aacaaaagag ggg	53
<210>	33	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	33	
	cagagtagac ttacttaaaa gactattctg caatctttat tcatttgtcc ttataa	56
<210>	34	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	34	
	cctgtccttc tccttaacct ttgagggagg tgaacacaga cggtaaataa caaaagaggg	60
	g	61
<210>	35	
<211>	64	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	

[0011]

<400> 35
gtgtaaggag aaggacaggt gctgcccttc gataaaatca atctttattc attgtcctt 60
ataa 64

<210> 36
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 缺失

<400> 36
ttcggggc 8

<210> 37
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 缺失

<400> 37
gccccgaa 8

<210> 38
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 缺失

<400> 38
ttttttataa attcggggct ttttt 25

<210> 39
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 缺失

<400> 39
gccccgaatt ttttataaat tcggggcttt ttt 33

<210> 40
<211> 98

[0012]

<212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 缺失

 <400> 40
 atgagccgct atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac 60
 ctaaagcccc gaatttttta taaattcggg gctttttt 98

 <210> 41
 <211> 128
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 缺失

 <400> 41
 gacagtga aa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct atgcaaaatg tttaaaaatg 60
 catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc gaatttttta taaattcggg 120
 gctttttt 128

 <210> 42
 <211> 263
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

 <400> 42
 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
 tagtaaagca catttgcttt agagcccggtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
 gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
 aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240
 ttttataaat tcggggcctt ttt 263

 <210> 43
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

 <400> 43
 acagaatagt cttttaagta agtctactct gaattttttt a 41

 <210> 44
 <211> 57
 <212> DNA

[0013]

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 44
atattatcga agggcagcac ctgtccttct ccttacactt tgaggagggt gaacaca 57

<210> 45
<211> 328
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 45
tttggttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gcttttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcaattta agctgaagcc gacagtgaag gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 46
<211> 328
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 46
tttggttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gcttttagagt ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaag gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 47
<211> 328
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 47
tttggttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgtact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaaaatgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gcttttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaag gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

[0014]

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 48
<211> 320
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 48
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gcttttagagc ccgtgaccog tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaag gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
gaatttttta taaatttttt 320

<210> 49
<211> 320
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 49
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gcttttagagc ccgtgaccog tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaag gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaattttt 300
tataaattcg gggtttttt 320

<210> 50
<211> 303
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 50
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gcttttagagc ccgtgaccog tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaag gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240

[0015]

atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
gaa 303

<210> 51
<211> 295
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 51
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaa 295

<210> 52
<211> 230
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 52
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg 230

<210> 53
<211> 204
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 53
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tcgctataat 60
aaccaataag gacaaatgaa taaagattgg atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc 120
ggcggtagta aagcacattt gctttagagc ccgtgacccg tgtgtataag cacgcggtgg 180
attcagttta agctgaagcc atgg 204

<210> 54
<211> 65
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

[0016]

<400> 54
 tttgttttttc tcaaattgta agttttatttc attgctgact ttaaaaagga tcgctataat 60
 aacca 65

<210> 55
 <211> 349
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

<400> 55
 tttgttttttc tcaaattgta agttttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60
 cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120
 ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag cccgtgaccc 180
 gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg 240
 ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300
 gcgtaaaata cctaaagccc cgaatttttt ataaattcgg ggctttttt 349

<210> 56
 <211> 347
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

<400> 56
 tttgttttttc tcaaattgta agttttatttc taatttaaatt tttatttgac aaaaatgggc 60
 tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120
 cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgaccctg 180
 gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaag tctggatggg 240
 agaaggatga tgagccgcta tgcaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300
 gtaaaatacc taaagccccg aattttttat aaattcgggg cttttttt 347

<210> 57
 <211> 347
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

<400> 57
 tttgttttttc tcaaattgta agttttatttc taatttaaatt tttatttgac aaaaatgggc 60
 tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgga tccttcgggg 120
 caaatggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgaccctg 180

[0017]

```

gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240
agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300
gtaaaatacc taaagccccg aattttttat aaattcgggg cttttttt 347

```

```

<210> 58
<211> 347
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

```

```

<400> 58
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaa at tttatttgac aaaaatgggc 60
tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120
caggggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagtc cgtgaccgct 180
gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240
agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300
gtaaaatacc taaagccccg aattttttat aaattcgggg cttttttt 347

```

```

<210> 59
<211> 349
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

```

```

<400> 59
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaagggt attgactttc 60
cctacaggggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120
ggcaggggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgccttagag cccgtgaccc 180
gtgtgcataa gcacgcggtg gattcaattt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg 240
ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300
gcgtaaaata cctaaagccc cgaatttttt ataaattcgg ggctttttt 349

```

```

<210> 60
<211> 328
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

```

```

<400> 60
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaa at tttatttgac aaaaatgggc 60
tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120
caggggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgaccgct 180

```

[0018]

gtgcataagc acgcggtgga ttcaatttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240
agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300
gtaaaatacc taaagccccg aatttttt 328

<210> 61
<211> 324
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 61
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60
cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120
ggcaggggtg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180
gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg 240
ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttctatt 300
gcgtaaaata cctaaagccc cgaa 324

<210> 62
<211> 322
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 62
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaa atttatttgac aaaaatgggc 60
tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120
caggggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg cttagagcc cgtgaccgt 180
gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg 240
agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300
gtaaaatacc taaagccccg aa 322

<210> 63
<211> 316
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 63
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60
cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120
ggcaggggtg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc 180

[0019]

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg 240
 ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300
 gcgtaaaata cctaaa 316

<210> 64
 <211> 314
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 64
 tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaa at tttatttgac aaaaatgggc 60
 tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg 120
 cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgaccctg 180
 gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaag tctggatggg 240
 agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc 300
 gtaaaatacc taaa 314

<210> 65
 <211> 251
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 65
 tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt aaaaaagggt attgactttc 60
 cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg 120
 ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag cccgtgaccc 180
 gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg 240
 ggagaaggat g 251

<210> 66
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 66
 tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt aaaaaagggt attgactttc 60
 cctacagggt gtgtaataat ttaatt 86

<210> 67
 <211> 225
 <212> DNA

[0020]

<213> Bacillus subtilis

<400> 67

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg gatccttcgg 120

ggcaaaatgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag cccgtgaccc 180

gtgtgtataa gcacgcgggtg gattcagttt aagctgaagc catgg 225

<210> 68

<211> 223

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 68

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taattttaaatt tttatttgac aaaaatgggc 60

tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgga tccttcgggg 120

caaatggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg cttagagcc cgtgaccctg 180

gtgtataagc acgcgggtgga ttcagtttaa gctgaagcca tgg 223

<210> 69

<211> 316

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 69

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tacccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag tccgtgaccc 180

gtgtgcataa gcacgcgggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg 240

ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt 300

gcgtaaaata cctaaa 316

<210> 70

<211> 251

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 70

tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc 60

cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tacccttcgg 120

ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag tccgtgaccc 180

[0021]

gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg	240
ggagaaggat g	251
<210> 71	
<211> 249	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 71	
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaa at tttatttgac aaaaatgggc	60
tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg	120
cagggtgga atccccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagtc cgtgaccgct	180
gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240
agaaggatg	249
<210> 72	
<211> 186	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 72	
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaagggt attgactttc	60
cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg cagaatagtc	120
ttttaagtaa gtctactctg aattttttta gacggtaaat aacaaaagag gggagggaaa	180
caaatg	186
<210> 73	
<211> 203	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 73	
tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaagggt attgactttc	60
cctacagggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg attttatcga	120
agggcagcac ctgtccttct ccttacactt tgagggaggt gaacacagac ggtaaataac	180
aaaagagggg agggaaacaa atg	203
<210> 74	
<211> 263	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	

[0022]

<400> 74
 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
 tagtaaagca catttgcttt agagcccggtg acccggtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
 atttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
 aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240
 ttttataaat tcggggccttt ttt 263

<210> 75
 <211> 263
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 75
 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
 tagtaaagca catttgcttt agagtccgtg acccggtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
 gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
 aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240
 ttttataaat tcggggccttt ttt 263

<210> 76
 <211> 263
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 76
 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcaaa atggaaatcc cgaccggcgg 60
 tagtaaagca catttgcttt agagcccggtg acccggtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
 gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
 aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240
 ttttataaat tcggggccttt ttt 263

<210> 77
 <211> 263
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 77
 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
 tagtaaagca catttgcttt agagcccggtg acccggtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120

[0023]

```

gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240
ttttataaat tcggggcttt ttt 263

```

```

<210> 78
<211> 230
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

```

```

<400> 78
ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgctg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa 230

```

```

<210> 79
<211> 255
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

```

```

<400> 79
ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgctg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt 240
ttttataaat ttttt 255

```

```

<210> 80
<211> 255
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

```

```

<400> 80
ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgctg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagccgacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca 180
aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa tttttataa 240
attcggggct ttttt 255

```

```

<210> 81

```

[0024]

<211> 165
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 81
ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagcogacag tgaaagtctg gatgggagaa ggatg 165

<210> 82
<211> 135
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 82
ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
gtttaagctg aagcc 135

<210> 83
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 83
gtagtaaagc acatttgctt tagagc 26

<210> 84
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 84
caaatgtgct ttactactgc cggtcgggat ttccac 36

<210> 85
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

[0025]

<400> 85 gcggtagtaa agcacatttg c	21
<210> 86 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 86 caaattgtgct ttactaccgc tggtcgggat ttccaccctg	40
<210> 87 <211> 26 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 87 tagtaaagca catttgcttt agagcc	26
<210> 88 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 88 gctctaaagc aaatgtgctt tactatcgcc ggtcgggatt tccac	45
<210> 89 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 89 gtgaccctg tgcataagca c	21
<210> 90 <211> 45 <212> DNA <213> 人工的	

[0026]

<220>

<223> 引物

<400> 90

tgcttatgca cacgggtcac aggctctaaa gcaaattgtgc ttac

45

<210> 91

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 91

tgaagccgac agtgaaagtc tg

22

<210> 92

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 92

gactttcact gtoggettca acttaaactg aatccacgc g

41

A.

```
1   acatattcccgttatgcatcggttatattaattattttacgagaatttacgggttttttattc   60
61   atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttagaaa   120
121  tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg   180
181  gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct   240
241  tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtacgaaaattgacggct   300
301  cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa   360
361  atcaggatttatctgatataaaagaaggtagacaagattaaggcttacttcagcaaataca   420
421  agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg   480
481  gatcgaaggggtgatgttttgtttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa   540
541  aaaggatcgcttataataaccaAtaaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag   600
601  ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagaccggtgtg   660
661  cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga   720
721  aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta   780
781  aaatacctaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa   840
841  agaggggaggggaaacaa atg 860
```

图 1

B.

1 acatattcccgttatgcatcggttatattaattattttacgagaattttacgggttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggattttatctgatataaaagaaggtagacaagattaaggcttacttcagcaaataca 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttggttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
A
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggca**G** 600
AA (triple ribO) **T** (RK41)
601 **GG**tggaaatcccgaccggcggttagtaaagcacatttgcttttagag**C**ccgtgaccgtgtg 660
A (RK1a)
661 cataagcacgcggtggattca**G**tttaagctgaagccgacagtgaaggtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataaatacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860

图 1 续

C.

1 acatattcccggttatgcatcggttatattaattatattacgagaatttacgggttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggttttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaagggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgcttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
841 agaggggaggggaaacaa atg 860

D.

1 acatattcccggttatgcatcggttatattaattatattacgagaatttacgggttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggttttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaagggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgcttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
841 agaggggaggggaaacaa atg 860

图 1 续

E.

1 acatattcccggttatgcatcggttatattaattattttacgagaattttacgggtttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggattttatctgatataaaagaagggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagaccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaggtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860

F.

1 acatattcccggttatgcatcggttatattaattattttacgagaattttacgggtttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggattttatctgatataaaagaagggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttgttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagaccgtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaggtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860

图 1 续

G.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacgggttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggttttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggattttatctgatataaaagaagggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttggttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtacttttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtagcccggtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860

H.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacgggttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggttttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggattttatctgatataaaagaagggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttggttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtacttttaa 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgctttagagcccgtagcccggtgtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
841 agaggggagggaaacaa atg 860

图 1 续

I.

1 acatattcccggttatgcatcggttatattaattatttacgagaatttacgggttttttattc 60
61 atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
361 atcaggatttatctgatataaaagaagggtgacaagattaaggcttacttcagcaaataca 420
421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
481 gatcgaagggtgatgttttggttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtacttta 540
541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaaataacaaa 840
841 agaggggaggggaaacaa atg 860

图 1 续

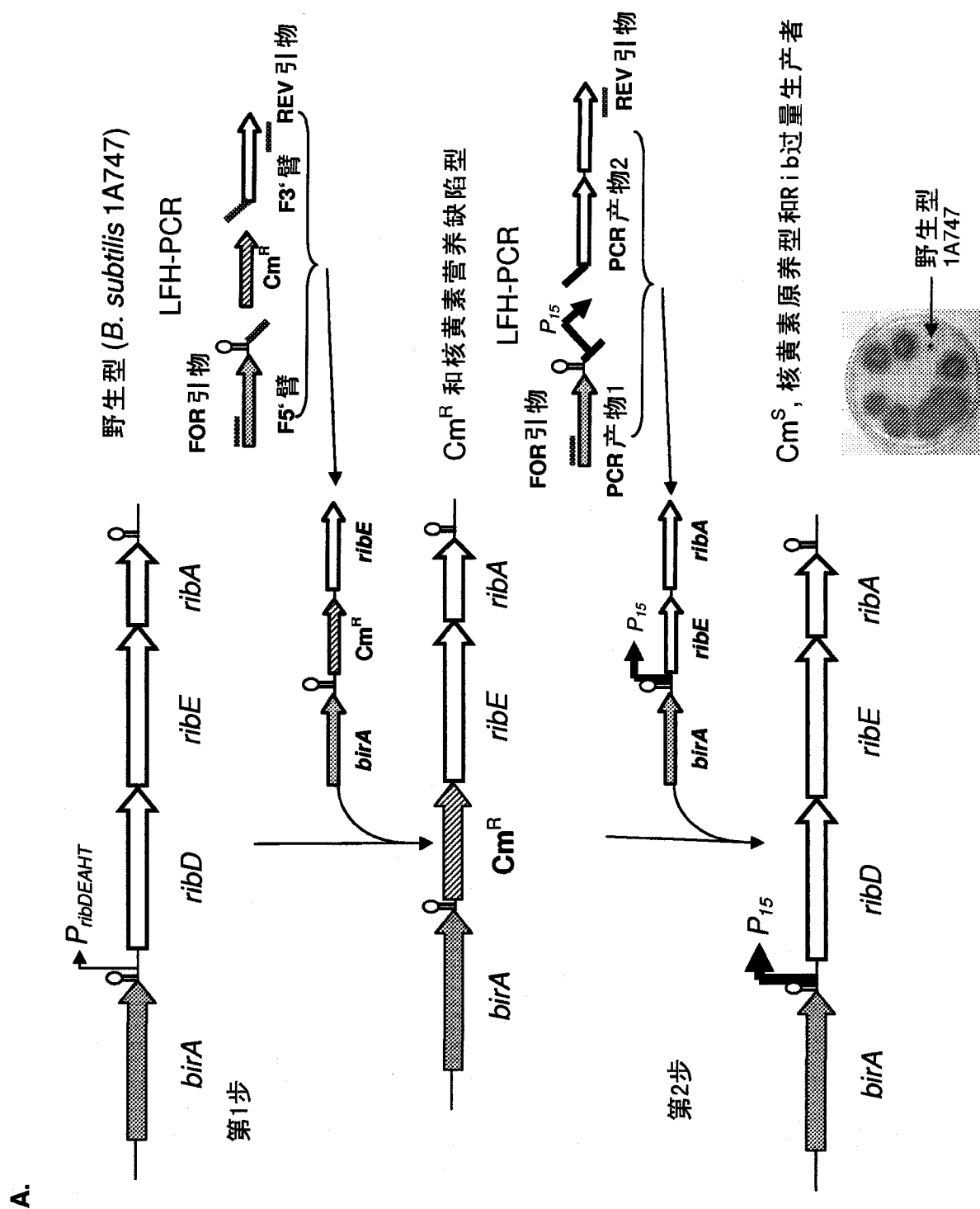


图 2

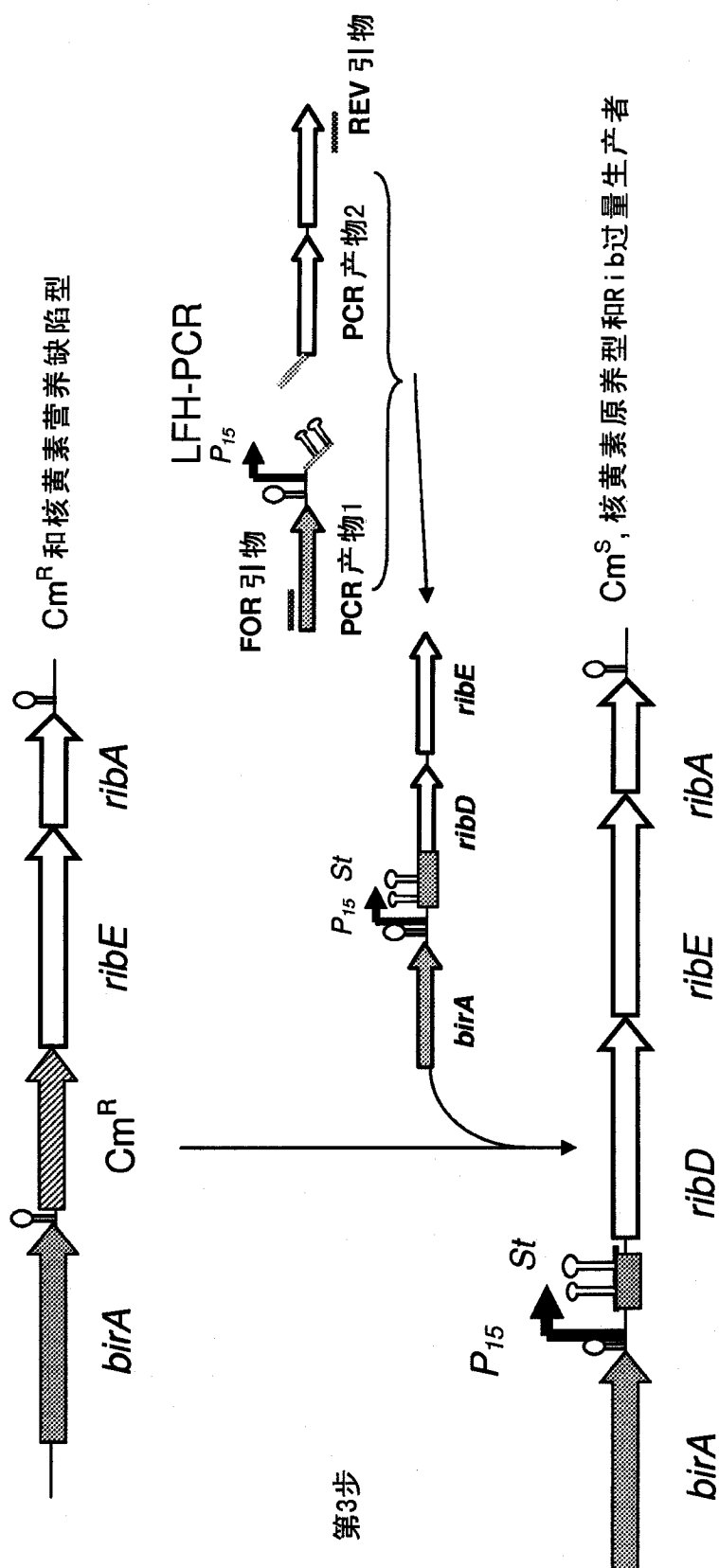
B.

图 2(续)