

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610084130.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月7日

[11] 公开号 CN 1908174A

[22] 申请日 1997.6.5

[21] 申请号 200610084130.3

分案原申请号 97112960.6

[30] 优先权

[32] 1996.6.5 [33] JP [31] 142812/96

[71] 申请人 味之素株式会社

地址 日本东京都中央区京桥一丁目15-1

[72] 发明人 平野圣子 杉本雅一 中野英一

泉井正子 早川敦 吉原康彦

中松亘

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书1页 说明书63页 附图14页

[54] 发明名称

生产L-赖氨酸的方法

[57] 摘要

增强编码二氨基庚二酸脱羧酶的DNA和编码二氨基庚二酸脱氢酶的DNA的棒杆菌在培养基上培养,以在培养物中生产和积累L-赖氨酸以及从培养物中回收L-赖氨酸。

1. 能够在棒杆菌细胞中自主复制的重组 DNA，包括编码二氨庚二酸脱羧酶的 DNA 顺序和编码二氨庚二酸脱氢酶的 DNA 顺序。
- 5 2. 根据权利要求 1 的重组 DNA，其中表明了编码二氨庚二酸脱羧酶的所述 DNA 顺序编码显示在序列表的 SEQ ID NO: 5 中的氨基酸顺序，或编码显示在 SEQ ID NO: 5 的氨基酸顺序，其中有一个或多个的氨基酸经取代、缺失或插入。
- 10 3. 根据权利要求 1 的重组 DNA，其中表明了编码二氨庚二酸脱氢酶的所述 DNA 顺序编码显示在序列表的 SEQ ID NO: 9 中的氨基酸顺序，或编码显示在 SEQ ID NO: 9 的氨基酸顺序，其中有一个或多个的氨基酸的取代、缺失或插入。
- 15 4. 棒杆菌，其中增强了编码二氨庚二酸脱羧酶的所述 DNA 顺序和编码二氨庚二酸脱氢酶的所述 DNA 顺序。
- 20 5. 根据权利要求 4 的棒杆菌，它是通过引入权利要求 1 中定义的重组 DNA 转化的。
6. 生产 L-赖氨酸的方法，包括在培养基上培养权利要求 4 定义的所述棒杆菌，在培养物中生产和积累 L-赖氨酸以及从培养物中收集 L-赖氨酸的步骤。
7. 生产 L-赖氨酸的方法，包括在培养基上培养权利要求 5 定义的所述棒杆菌，在培养物中生产和积累 L-赖氨酸以及从培养物中收集 L-赖氨酸的步骤。
- 25 8. 一种棒杆菌，其中的一道编码二氨庚二酸脱羧酶的 DNA 顺序以及一道编码二氨庚二酸脱氢酶的 DNA 顺序是通过增加所述两道 DNA 顺序的拷贝数、通过使用强促进子，或其组合，而得到增强。

生产 L-赖氨酸的方法

5 本申请是申请日为 1997 年 6 月 5 日，申请号为 97112960.6，
发明名称为“生产 L-赖氨酸的方法”的发明专利申请的分案申请。

本发明涉及用培养普通发酵生产氨基酸的棒杆菌的变异菌株或
借助于基因工程技术得到的类似菌株生产 L-赖氨酸的方法。

10 用于饲料添加剂的 L-赖氨酸通常用棒杆菌的生产 L-赖氨酸的变
异菌株发酵方法生产的。目前许多已知的 L-赖氨酸产生菌都是由属于
棒杆菌的野生型菌株经过人工诱变得到的。

对于棒杆菌，已经公开的载体质粒在细菌细胞中可以自主复制
并有抗药标记基因(见美国专利 No.4,514,502)、也阐明了引进基因到细
菌细胞中的方法(实施例、日本专利申请特许公开 No.2-207791)。同时
15 提出用上述技术培育 L-苏氨酸或 L-异亮氨酸产生菌的可能性(见美国
专利 No. 4,452,890 和 No. 4,442,208)。关于 L-赖氨酸产生菌的育种，
已知技术将参与 L-赖氨酸生物合成的基因引入到载体质粒中并在细菌
细胞中扩增。(实施例、日本专利申请特许公开 No. 56-160997)。

20 已知的 L-赖氨酸生物合成的基因包括，实施例，二氢二皮考啉
酸还原酶基因(日本专利申请特许公开 No. 7-75578)、参与 L-赖氨酸
生物合成的克隆二氨庚二酸脱氢酶基因(Ishino, S.等人, Nucleic
Acids Res., 15, 3917(1987))、以及磷烯醇丙酮酸羧化酶基因(日本专
利申请特许公开 No. 60-87788)、二氢二皮考啉酸合成酶基因(日本
专利公开 No. 6-55149)、二氨庚二酸脱羧酶基因(日本专利申请特许
25 公开 No. 60-62994)；这些基因的扩增影响 L-赖氨酸的生产力。

如上所述，借助于 L-赖氨酸生物合成基因的扩增已经得到改善
L-赖氨酸生产力的某些成功结果。然而，虽然基因的扩增能够改善 L-
赖氨酸的生产力，但是某些基因的扩增却降低了细菌生长速度，导致
降低 L-赖氨酸的生产速度。

30 还没有一个报告说明以增强 L-赖氨酸生物合成基因来改善细菌

的生长。目前,还不知道谁能成功地用结合各种 L-赖氨酸生物合成基因的方法在棒杆菌中不抑制菌的生长从而明显提高 L-赖氨酸产量。

本发明的目的是,用增强棒杆菌内组合的多种 L-赖氨酸生物合成基因方法,改善 L-赖氨酸生产力但不降低菌的生长速度。

5 当产品是由微生物发酵得到时,与引进的原料有关的生产速度及产品的产量是极其重要的因素。增加单位发酵设备生产速度可以明显降低生产成本。发酵速度与发酵产量彼此相融是在工业生产中极其重要的。本发明提出了解决棒杆菌发酵生产 L-赖氨酸中存在的上述问题。

10 本发明的原理是基于这样一个事实:通过增强二氨庚二酸脱羧酶的 DNA 编码顺序(必要时,下文二氨庚二酸脱羧酶称作“DDC”, DDC 蛋白的编码基因称作“LysA”)和二氨庚二酸脱氢酶的 DNA 编码顺序(必要时,二氨庚二酸脱氢酶”称作“DDH”, DDH 蛋白的编码基因称作“ddh”)两者与每一个单独增强 DNA 顺序比较,可以改善棒杆菌的生长,也改善了 L-赖氨酸的生产速度。

换句话说,本发明是基于包括二氨庚二酸脱氢酶的 DNA 编码顺序和二氨庚二酸脱羧酶的 DNA 编码顺序在内的重组 DNA 在棒杆菌中的自主复制。

另一方面,本发明提供了载有增强了的二氨庚二酸脱氢酶的和二氨庚二酸脱羧酶的 DNA 编码顺序的棒杆菌。

还有,本发明提供了生产 L-赖氨酸的方法,包括上述棒杆菌在培养基中培养以产生和积累 L-赖氨酸、并从培养物中收集 L-赖氨酸的步骤。

25 本发明提到的棒杆菌是在 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., 页 599(1974)手册中定义的一组微生物,它们是不能形成芽孢、非耐酸的好氧革兰氏阳性杆菌。棒杆菌包括属于棒杆菌属的细菌、已经归类于短杆菌属的细菌但目前合并到棒杆菌属中的细菌,以及与棒杆菌属细菌有着密切的亲缘关系的属于短杆菌属的细菌。

菌。

根据本发明，可以改善棒杆菌的生长速度和生产 L-赖氨酸的能力。本发明可以应用到普通的 L-赖氨酸产生菌，也可用于具有高产 L-赖氨酸的能力的菌株。

5 图 1.描述构建携带 lysA 的质粒 p299LYSA 的方法。

图 2.描述构建携带 lysA 和 Brevi.-ori 的质粒 pLYSAB 的方法。

图 3.描述构建携带 ddh 和 Brevi.-ori 的质粒 pPK4D 的方法。

图 4.描述构建携带 ddh 和 lysA 的质粒 p399DL 的方法。

图 5.描述构建携带 ddh 、 lysA 和 Brevi.-ori 的质粒 pDL 的方法。

10 图 6.描述构建携带 lysC 的质粒 p399AKYB 和 p399AK9B 的方法。

图 7.描述构建携带 dapB 和 Brevi.-ori 的质粒 pDPRB 的方法。

图 8.描述构建携带 dapA 和 Brevi.-ori 的质粒 pDPSB 的方法。

15 图 9.描述构建携带 lysC 、 dapB 和 Brevi.-ori 的质粒 pCRCAB 的方法。

图 10.描述构建携带突变型 lysC 、 dapB 和 Brevi.-ori 的质粒 pCB 的方法。

图 11.描述构建携带 dapA 、 dapB 和 Brevi.-ori 的质粒 pAB 的方法。

20 图 12.描述构建携带突变型 lysC 、 dapA 、 dapB 和 Brevi.-ori 的质粒 pCAB 的方法。

图 13.描述构建携带突变型 lysC 、 dapA 、 dapB 、 Brevi.-ori 和 lysA 的质粒 pCABL 的方法。

25 图 14.描述构建携带突变型 lysC 、 dapA 、 dapB 、 ddh 、 lysA 和 Brevi.-ori 的质粒 pCABDL 的方法。

本发明详细说明如下：

<1>用于本发明的 L-赖氨酸生物合成基因的制备

用于本发明的 L-赖氨酸生物合成基因可以分别地由下列步骤得到：从细菌作为 DNA 供体制备染色体 DNA、用载体质粒或类似物构建染色体 DNA 文库、从文库中筛选载有所需基因的菌株、从筛选的菌株回收基因插入的重组 DNA。用于本发明的 L-赖氨酸生物合成基因的 DNA 供体没有特殊的限制,只要所需的 L-赖氨酸生物合成基因能够表达在棒杆菌细胞的功能酶蛋白。但是, DNA 的供体最好是棒杆菌。

已经知道来源棒杆菌的 lysA 和 ddh 两种基因的顺序。因此,可以根据聚合酶链反应方法经过扩增得到这些基因(PCR;参见 White,T.J.等人,Trends Genet.,5,185 (1989))。

用于本发明的每一种 L-赖氨酸生物合成基因可以采用下面例举的某些方法得到。

(1)突变型 lysA 的制备

根据例如 Saito 和 Miura 的方法(H. Saito and K. Miura, Biochem.Biophys. Acta,72, 619 (1963)),制备染色体 DNA,并根据聚合酶链反应方法(PCR;参见 White,T.J. 等人,Trends Genet.,5,185 (1989))扩增 lysA,可以从棒杆菌的染色体中分离出 lysA。DNA 的供体没有特殊的限制,然而用 Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 菌株来举例说明。

在棒杆菌中,lysA 和 argS 一起形成一个操纵子(精氨酰-tRNA 合成酶基因)并且 lysA 处于 argS 的下游。lysA 的表达由处于 argS 上游的启动子调节(参见 Journal of Bacteriology,Nov.,7356-7362(1993))。谷氨酸棒杆菌(C.glutamicum)的这些基因的 DNA 顺序是已知的(参见 Molecular Microbiology,4(11),1819-1830(1990); Molecular and General Genetics,212,112-119(1988)), 在该基础上,可以制备 PCR 的 DNA 引物。这样的 DNA 引物,特以 23-mers of DNA 为例,它们的核苷酸顺序分别显示在顺序表 SEQ ID NO : 1(相当于 Molecular Microbiology, 4(11),1819-1830(1990)描述的核苷酸顺序中的核苷酸数 11-33)和 SEQ ID NO:2(相当于 Molecular and General Genetics,212,112-119(1988) 描述的核苷酸

顺序中的核苷酸数 1370-1392)。

下文描述的实例中，为了增强 lysA，采用含有启动子、argS 和 lysA 的 DNA 片断。然而，argS 对本发明来说是不必要的。因为容许用 lysA 刚好连接在启动子的下游的 DNA 片断。

5 在 SEQ ID NO:3 中举例，含有 argS 和 lysA 的 DNA 片断的核苷酸顺序和按核苷酸顺序推导的氨基酸编码顺序。由 argS 编码的氨基酸顺序实施例显示在 SEQ ID NO:4 中，由 lysA 编码的氨基酸顺序实施例显示在 SEQ ID NO:5 中。除了编码这些氨基酸顺序的 DNA 片断以外，
10 本发明也可同样使用实质上与在 SEQ ID NO:5 中氨基酸顺序相同的其他 DNA 片断，即具有由于例如取代、缺失或插入一个或多个对 DDC 活性没有实质性影响的氨基酸而产生变异的氨基酸顺序。

 可根据普通方法使用应用生物系统公司生产的 380B 型 DNA 合成仪和磷酸酰胺酯方法(参见 Tetrahedron Letters (1981), 22 1859)合成 DNA。根据厂家提供的方法用 Taq DNA 聚合酶和 Takara Shuzo 公司
15 生产的 PJ2000 型 DNA 扩增仪可以实行 PCR。

 最好是将经 PCR 扩增的 lysA 与在大肠杆菌和/或棒杆菌细胞中自主复制的载体 DNA 相连，以制备重组 DNA，而且预先将制备好的重组 DNA 引入大肠杆菌细胞中。这样的准备工作使下列操作容易进行。在大肠杆菌细胞中自主复制的载体最好是能在宿主细胞中自主复制的质粒载体，包括例如 pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、
20 pHSG399、pHSG398 和 RSF1010。

 当具备能使质粒在棒杆菌中自主复制的 DNA 片断插入这些载体时，它们可用作在大肠杆菌和/或棒状两种细菌中都可以自主复制的所谓穿梭载体。

25 这样的穿梭载体如下所示。在国际储存文库权威机构中藏有每一种载体的微生物和它们的在园括号中的登记号码。

pHC4: 大肠杆菌 AJ12617(FERM BP-3532)

pAJ655: 大肠杆菌 AJ11882(FERM BP-136)

谷氨酸棒杆菌 SR8201(ATCC 39135)

PAJ1844: 大肠杆菌 AJ11883(FERM BP-137)

谷氨酸棒杆菌 SR8202(ATCC 39136)

PAJ611: 大肠杆菌 AJ11884(FERM BP-138)

5 PAJ3148: 谷氨酸棒杆菌 SR8203(ATCC 39137)

PAJ440: 枯草杆菌 AJ11901(FERM BP-140)

可用如下方法从储存的微生物得到这些载体。在对数生长期收集的细胞用溶菌酶和 SDS 裂解, 溶菌产物在 $30,000 \times g$ 下离心分离得到上清液。将聚乙二醇加入上清液中, 借助氯化铯-溴化乙锭平衡密度梯度离心进行分部分离和纯化。

10 根据例如 D. M. Morrison 的方法(Methods in Enzymology, 68, 326 (1979) 或用氯化钙处理受体细胞以增加 DNA 的透性的方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 引入质粒转化大肠杆菌。

15 (2) ddh 的制备

用 PCR 方法从棒杆菌的染色体中制备含有 ddh 的 DNA 片断。DNA 的供体没有专门的限制, 然而, 例举的菌株是 Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 菌株。

20 已知谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)的 DDH 基因(Ishino, S. 等人, Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)), 在此基础上可以制备 PCR 的引物。这样的 DNA 引物以分别具有顺序表的 SEQ ID NO:6 和 NO:7 中所示核苷酸顺序的 20-mers DNA 为具体的实例。DNA 的合成、PCR 以及携带 ddh 的质粒的制备都可以用与上述用于 lysA 的同样方法进行。

25 含有 ddh 的 DNA 片断的核苷酸顺序以及由核苷酸顺序推导出来的氨基酸顺序在 SEQ ID NO:8 中说明。SEQ ID NO:9 只显示氨基酸顺序。除了编码该氨基酸顺序的 DNA 片断外, 本发明也可以同样使用编码与 SEQ ID NO:9 中所示的基本相同的氨基酸顺序(即具有基于例如取代、缺失或插入一个或多个对 DDH 活性没有实质性影响的氨基酸的

变异体的氨基酸顺序)的 DNA 片断。

<2>本发明的棒杆菌和重组 DNA

本发明的棒杆菌含有用增强的编码二氨庚二酸脱羧酶(lysA)的 DNA 顺序和编码二氨庚二酸脱氢酶(ddh)的 DNA 顺序。术语“增强 DNA 顺序”含义例如是用增加基因的拷贝数、使用强启动子、使用具有高比活性酶的编码基因或混合这些方法等提高细胞内由 DNA 顺序编码的酶活性。

上面描述过 DNA 顺序的棒杆菌是产生 L-赖氨酸的棒杆菌，其实例包括产生 L-赖氨酸的野生菌株、人工突变菌株和用基因工程增强了 L-赖氨酸生产力的棒杆菌。即使细菌 L-赖氨酸的生产力很低，也可以通过增强 lysA 和 ddh 提高 L-赖氨酸的生产力。如果细菌的 L-赖氨酸生产率高，通过增强 lysA 和 ddh 可能会使其 L-赖氨酸生产效率有更大的提高。

(1)属于棒杆菌的 L-赖氨酸产生菌株

用于引进 lysA 和 ddh 的棒杆菌包括例如下列 L-赖氨酸产生菌株：

嗜乙酰乙酸棒杆菌 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870;

嗜乙酰谷氨酸棒杆菌 Corynebacterium ATCC 15806;

美棒杆菌(Corynebacterium callunae) ATCC 15991;

谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum) ATCC 13032;

叉开短杆菌(Brevibacterium divaricatum) ATCC 14020;

(Brevibacterium lactofermentum) ATCC 13869;

(Corynebacterium lilium) ATCC 15990;

黄色短杆菌 (Brevibacterium flavum) ATCC 14067;

Corynebacterium melassecola ATCC 17965;

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066;

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068;

Brevibacterium roseum ATCC 13825;

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240;

嗜氨微杆菌 Microbacterium ammoniophilum ATCC 15354;

5 Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539).

除了上述的菌株外, 那些可用作增强 lysA 和 ddh 的宿主菌株, 包括例如由上述菌株衍生来的有 L-赖氨酸生产力的突变株。这样的人工突变株包括下列菌株: S-(2-氨基乙基)半胱氨酸(下文缩写为“ AEC”)抗性突变株(Brevibacterium lactofermentum AJ11082 (NRRL B-11470), 10 日本专利公告 No. 56-1914、56-1915、57-14157、57-14158、57-30474、58-10075、59-4993、61-35840、62-24074、62-36673、5-11958、7-112437、和 7-112438);其生长需要一种氨基酸(诸如 L-高丝氨酸)的突变株(日本专利公告 No. 48-28078 和 No. 56-6499);表现 AEC 抗性并需要一种氨基酸(诸如 L-亮氨酸、L-高丝氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-精氨酸、L-丙氨酸和 L-缬氨酸)的突变株(美国专利 No. 3,708,395 和 No. 3,825,472);对 DL- α -氨基- ϵ -己内酰胺、 α -氨基-月桂内酰胺、天门冬氨酸-类似物、磺胺药物、醌类(quinoid)、和 N-月桂亮氨酸有抗性的 L-赖氨酸产生突变株;对 oxaloacetate 脱羧酶或呼吸系统的酶的抑制剂有抗性的 L-赖氨酸产生突变株;(日本专利申请特公开 No. 50-53588、50-31093、52-102498、53-9394、20 53-86089、55-9783、55-9759、56-32995、和 56-39778, 和日本专利公告 No.53-43591 和 53-1833);需要肌醇或乙酸的 L-赖氨酸产生突变株(日本专利申请特公开 No.55-9784 和 56-8692);对氟丙酮酸或不低于 34 °C 的温度敏感的 L-赖氨酸产生突变株;(日本专利申请特公开 No.55-9783 和 53-86090);和对乙二醇有抗性并生产 L-赖氨酸、属于短杆菌属和棒杆菌属的生产突变株(美国专利 No.4,411,997).

(2) 通过基因重组增强 L-赖氨酸生产力的 L-赖氨酸产生棒杆菌
如果用基因工程方法,例如引入具有突变的酶(使其对反馈抑制不

敏感, 在参与 L-赖氨酸生物合成的酶中, 野生型的该酶受反馈抑制) 的编码基因, 或增强除 lysA 和 ddh 外的 L-赖氨酸的生物合成的基因来增强了棒杆菌的 L-赖氨酸生产, 那么通过增强 lysA 和 ddh 可以进一步提高 L-赖氨酸的生产速度。

5 L-赖氨酸生产力增强的棒杆菌包括含有编码对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的反馈抑制不敏感的天门冬氨酸激酶的 DNA 顺序(天门冬氨酸激酶下文称为“AK”、编码 AK 蛋白的基因下文称为“lysC”, 必要时对编码 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的反馈抑制不敏感的 AK 蛋白的基因)和编码二氢二皮考啉酸还原酶的增强的 DNA 顺序(二氢二皮考啉酸还原酶
10 下文称为“DDPR”、必要时编码 DDPR 蛋白的基因下文称为“dapB”)的棒杆菌, 以及还含有编码二氢二皮考啉酸合成酶的增强的 DNA 顺序(二氢二皮考啉酸合成酶下文称“DDPS”、必要时编码 DDPS 蛋白的基因下文称为“dapA”)的棒杆菌。用于本发明的每一个 L-赖氨酸的生物合成基因可按照下面例举的某些方法得到。

15 (i) 突变型 lysC 的制备

含有突变型 lysC 的 DNA 片断可以由 L-赖氨酸和 L-苏氨酸对 AK 活性的协同反馈抑制作用实质上不敏感的突变菌株制备(International
Publication No. WO 94/25605)。例如用常用的突变处理(诸如紫外线照射)和突变剂(诸如 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍)处理, 由一组源于经过
20 诱变处理的棒杆菌的野生型细胞, 能够得到这样的突变型。AK 的活性可用 Miyajima (Miyajima, R. 等人, The Journal of Biochemistry (1968), 63(2), 139-148) 的方法测定。这样的突变株的最优选的代表是由 Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869(现更名为 Corynebacterium glutamicum) 的野生型菌株经过突变处理得到 L-赖氨酸产生菌 AJ3445
25 (FERM P-1944)。

另一种方法, 体外诱变处理含有野生型 lysC 的质粒 DNA 也能够得到突变型 lysC。另一方面, 具体突变得到的 L-赖氨酸和 L-苏氨酸对 AK 的协同反馈抑制不敏感的资料已为人知(国际专利 No. WO

94/25605)。因此, 根据这些资料突变型 lysC 也可以由野生型的 lysC 通过例如位点诱变方法得到。

含有 lysC 的 DNA 片断可用 PCR 方法由棒杆菌的染色体制备。根据已知的谷氨酸棒杆菌的顺序(参见 Molecular Microbiology (1991), 5(5), 1197-1204; Mol. Gen. Genet. (1990), 224, 317-324), 为了扩增例如
5 大约 1,643bp 的 lysC 编码区域, 例举具有在顺序表 SEQ ID NO:10 和 NO:11 中所示核苷酸顺序的 23-mer 和 21-mer 的单链 DNA 作为 DNA 引物。合成 DNA、PCR、制备携带得到的 lysC 的质粒都能够用上述制备 lysA 的相同方法进行。

10 按照上述方法, 从 AK 野生型菌株分离 lysA 时, 可得到野生型 lysC, 而从 AK 突变菌株分离 lysA 时, 可得到突变型 lysC。

含有野生型 lysC 的 DNA 片断的核苷酸顺序的实例是显示在顺序表 SEQ ID NO:12 上。由核苷酸顺序推导出野生型 AK 蛋白的 α -亚基的氨基酸顺序, 与 DNA 顺序一起显示在顺序表 SEQ ID NO:13 上。
15 SEQ ID NO:14 只显示氨基酸顺序。由核苷酸顺序推导出的野生型 AK 蛋白 β -亚基的氨基酸顺序, 与 DNA 顺序一起显示在顺序表 SEQ ID NO:15 上。SEQ ID NO:16 只显示氨基酸顺序。在每一个亚基中, GTG 用作起始密码子, 而相应的氨基酸用蛋氨酸表示。然而, 该代表不仅仅是蛋氨酸, 还有缬氨酸或甲酰蛋氨酸。

20 用于本发明的突变型 lysC 没有特别的限制, 只是它编码对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的协同反馈抑制作用不敏感的 AK。然而, 突变型 lysC 的实例是具有突变的突变型 lysC, 其中从 N-端算起第 279 个丙氨酸残基换成除了丙氨酸和 α -亚基中的酸性氨基酸外的氨基酸残基, 而且在野生型 AK 的氨基酸顺序中第 30 个丙氨酸残基换成除了丙氨酸和 β -
25 亚基中的酸性氨基酸外的氨基酸残基。野生型 AK 的氨基酸顺序具体包括作为 α -亚基显示在顺序表 SEQ ID NO:14 中的氨基酸顺序、作为 β -亚基显示在顺序表 SEQ ID NO:16 中的氨基酸顺序。

除了丙氨酸和酸性氨基酸以外, 作为优选的氨基酸残基有苏氨

酸、精氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸和缬氨酸残基。

与待替换的氨基酸残基相应的密码子对其类型没有特别的限制，只要它编码氨基酸残基。假定野生型 AK 的氨基酸顺序可能由于细菌的种间和菌株间的差异而有轻微的不同。具有突变(由例如在一个或多个上述与活性否关的位点上替换、缺失、或插入一个或多个氨基酸残基而引起的)的 AK 也可用于本发明中。具有突变(由例如替换、缺失、或插入一个或多个氨基酸残基而引起的)的其它 AK，只要对 AK 的活性和对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的协同反馈抑制作用不敏感基本上没影响，也可以用于本发明。

由引入一个突变型 lysC 质粒 p399AK9B 到 *Brevibacterium lactofermentum* 野生型菌株 AJ12036(FERM BP-734)中得到 AJ12691 菌株；AJ12691 菌株已经于 1992 年 4 月 10 日保藏在国际贸易工业部的工业科学技术署国家生物科学和人类技术研究所(邮政编码: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 登记号为 FERM P-12918；AJ12961 菌株按照布达佩斯条约于 1995 年 2 月 10 日转移到国际保藏中心，登记号为 FERM BP-4999。

(ii)dapB 的制备

含有 dapB 的 DNA 片断可借助 PCR 由棒杆菌的染色体制备。DNA 供体没有特别的限制，然而，最好是 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 菌株。

对于 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 菌株已经知道 DDPR 的 DNA 编码顺序(Journal of Bacteriology,175(9),2743-2749 (1993)), 在此基础上可以制备 PCR 的 DNA 引物。这样的 DNA 引物具体以 23-mers 的 DNA 为例,它们的核苷酸顺序分别显示在顺序表 SEQ ID NO:21 和 22 中。合成 DNA、PCR、制备携带得到的 dapB 的质粒都能够用上述制备 lysC 相同的方法进行。

含有 dapB 的 DNA 片断的核苷酸顺序和由核苷酸顺序推导出的氨

5 氨基酸顺序显示在 SEQ ID NO:23 中。SEQ ID NO:24 只显示氨基酸顺序。除了编码该氨基酸顺序的 DNA 片断外,本发明也可以同样采用编码氨基酸顺序与显示在 SEQ ID NO:24 中基本相同的氨基酸顺序的 DNA 片断,即具有突变(由例如替换、缺失、或插入一个或多个氨基酸残基而引起的)的氨基酸顺序,只要对 DDPR 活性没有实质性影响。

10 将携带 dapB(下文实例得到)的 pCRDAPB 质粒引入到大肠杆菌 JM109 菌株中得到转化菌株 AJ13107,按照布达佩斯条约,此菌株进行国际保藏,已经于 1995 年 5 月 26 日保藏在国际贸易工业部的工业科学技术署国家生物科学和人类技术研究所(邮政编码: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan),登记号为 FERM BP-5114。

(iii) dapA 的制备

15 含有 dapA 的 DNA 片断可借助 PCR 由棒杆菌的染色体制备。DNA 供体没有特别的限制,然而,以 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 菌株为例。

20 已经知道谷氨酸棒杆菌编码 DDPS 的 DNA 顺序(参见 Nucleic Acid Research, 18(21),6421 (1990); EMBL 登记号 X53993),在此基础上可以制备 PCR 的 DNA 引物。这样的 DNA 引物具体以 23-mers 的 DNA 为例,它们的核苷酸顺序分别显示在顺序表 SEQ ID NO:17 和 18 中。合成 DNA、PCR、制备携带得到的 dapA 的质粒都能够用上述制备 lysC 相同的方法进行。

25 含有 dapA 的 DNA 片断的核苷酸顺序和由核苷酸顺序推导出的氨基酸顺序显示在 SEQ ID NO:19 中。SEQ ID NO:20 只显示氨基酸顺序。除了编码该氨基酸顺序的 DNA 片断外,本发明也可以采用编码氨基酸顺序与显示在 SEQ ID NO:20 中基本相同的氨基酸顺序的 DNA 片断,即具有突变(由例如替换、缺失、或插入一个或多个氨基酸残基而引起的)的氨基酸顺序,只要对 DDPR 活性没有实质性影响。

将携带 dapA(由后面的实施例中得到)的 pCRDAPA 质粒引入到大

肠杆菌 JM109 菌株中得到转化菌株 AJ13106, 按照布达佩斯条约, 此菌株进行国际保藏, 已经于 1995 年 5 月 26 日保藏在国际贸易工业部的工业科学技术署国家生物科学和人类技术研究所(邮政编码: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 登记号为 FERM BP-5113。

在特定的实施方案中, 为了增强如上述的 L-赖氨酸产生棒杆菌的 lysA 和 ddh, 基因是用质粒载体、转座子或噬菌体载体等引入到宿主中。在引入中, 即使用低拷贝型载体, 也预期能够达到某种程度的增强。然而, 还是优选多拷贝型载体。这样的载体包括例如上述的质粒载体、pAJ655、pAJ1844、pAJ611、pAJ3148、和 pAJ440。此外, 由棒杆菌衍生的转座子记载在国际专利 No. WO 92/02627 and WO 93/18151; 欧洲专利公告 No.445385; 日本专利申请特许公开 No. 6-46867; Vertes, A. A. 等人, Mol. Microbiol., 11, 739-746(1994); Bonamy, C., 等人, Mol. Microbiol., 14, 571-581(1994); Vertes, A. A. 等人, Mol. Gen. Genet., 245, 397-405(1994); Jagar, W. 等人, FEMS Microbiology Letters, 126, 1-6 (1995); 日本专利申请特许公开 No.7-107976 和 7-327680 等资料上。

例如用引进含有 lysA 和 ddh 的重组 DNA 到宿主棒杆菌中, 并在宿主细胞中进行自主复制, 能够得到根据本发明增强了 lysA 和 ddh 的棒杆菌。例如用插入 lysA 和 ddh 到载体(诸如上述的质粒载体、转座子或噬菌体载体之类)中, 可以得到重组 DNA。

lysA 和 ddh 基因的每一个都可以通过不同的载体分别连续引入宿主中。或者, 两种基因可用一个载体一起引入宿主中。当使用不同的载体时, 基因可以任何次序引入, 可是, 应优选具有能在宿主中稳定分配并停留的机制的载体, 以及能够彼此共存的载体。

在采用质粒定为载体的情况下可以按照电子脉冲方法(Sugimoto 等人, 日本专利申请特许公开 No. 2-207791)将重组 DNA 引入宿主中。引入一个带转座子的质粒到宿主中并使转座子转位, 可以利用转座子

进行基因扩增。

并且，当突变型 lysC、dapA 和 dapB 引进到棒杆菌中时，每一个 lysA 和 ddh 的基因都可以用不同的载体分别连续引入宿主中，或者，两种或多种基因可用一个载体一起引入宿主中。

5 <3>生产 L-赖氨酸的方法

通过在合适的培养基中培养包含上述增强的 L-赖氨酸生物合成基因的棒杆菌，能够在培养物中产生、积累和回收 L-赖氨酸，从而有效地生产 L-赖氨酸。

10 所用培养基的实例是普通的含有碳源、氮源、无机离子、和可选的其它有机成份的培养基。

作为碳源，可能用糖类（诸如葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露糖和淀粉水解物之类）、有机酸（诸如富马酸、柠檬酸和琥珀酸之类）。

作为氮源，可能用无机铵盐（诸如硫酸铵、氯化铵和磷酸铵之类）、有机氮（诸如大豆水解物之类）、氨气、氨水。

15 有机微量营养源，需要含有适量的所需物质诸如维生素 B₁ 和 L-高丝氨酸或酵母浸汁等。此外，如果所需还可以加入少量的磷酸钾、硫酸镁、铁离子、锰离子等等。

20 最好在好氧条件下培养大约 30-90 小时。在培养期间，培养温度最好控制在 25-37 °C，pH 值最好控制在 5-8。无机或有机、酸或碱物质、或氨气等都可用来调节 pH 值。可以通过组合普通的离子交换树脂方法、沉淀方法或其他已知的方法从培养物中回收 L-赖氨酸。

实施例

下面参考实施例更详细地解释本发明。

25

实施例 1：从 Brevibacterium lactofermentum 中制备 lysA

<1>制备 lysA 和构建携带 lysA 的质粒

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 野生型菌株作为染色

体 DNA 的供体。按照普通的方法从 ATCC 13869 菌株制备染色体 DNA。按照 PCR 方法从染色体 DNA 上扩增含有 argS、lysA 和含有这些基因的操纵子的启动子 DNA 片断。关于用来扩增的 DNA 引物，根据 *Corynebacterium glutamicum* 已知顺序，具有分别显示在顺序表 SEQ ID NO:1 和 2 的核苷酸顺序的 20-mers 合成 DNA 用来扩增编码精氨酸-tRNA 合成酶和 DDC 的大约 3.6kb 的区间(参见 *Molecular Microbiology*, 4(11), 1819-1830(1990); *Molecular and General Genetics*, 212, 112-119(1988))。

根据普通方法使用 380B 型 DNA 合成仪(应用生物系统公司生产)和磷酸酰胺酯方法(参见 *Tetrahedron Letters* (1981), 22, 1859)合成 DNA。

根据厂家提供的方法用 Taq DNA 聚合酶和 PJ2000 型 DNA 扩增仪(Takara Shuzo 公司生产)，通过 PCR 扩增基因。pHSG399 用作扩增的 3,579bp 基因片断的克隆载体。用限制酶 SamI(Takara Shuzo 生产)消化 pHSG399，并与含有已扩增 lysA 的 DNA 片断连接。如上述得到的含有来源于 ATCC 13869 菌株的 lysA 的质粒定为 p399LYSA。

用 KpnI 和 BamHI(Takara Shuzo 生产)消化 p399LYSA 来提取含有 lysA 的 DNA 片断。该 DNA 片断与用 KpnI 和 BamHI 消化的 pHSG299 连接。得到的质粒定为 p299LYSA。构建 p299LYSA 的过程示于图 1 中。

将能够使质粒在棒杆菌中自主复制的 DNA 片断(下文称为“Brevi.-ori”)引入 p299LYSA 中，以制备可在棒杆菌中自主复制、携带 lysA 的质粒。Brevi.-ori 是从含 Brevi.-ori 的质粒载体 pHK4 制备的，而且可在大肠杆菌和棒杆菌的细胞中自主复制。pHK4 是通过用 KpnI 和 BamHI(Takara Shuzo 生产)消化 pHK4、提取 Brevi.-ori 片断、并使其与用 KpnI 和 BamHI 消化过的 pHSG298 连接而构建的(日本专利申请特许公开 No.5-7491)。pHK4 使宿主对卡那霉素有抗性。含有 pHK4 的大肠杆菌 HB101 定为大肠杆菌 AJ13136，已经于 1995 年 8

月1日保藏在国际贸易工业部的工业科学技术署国家生物科学和人类技术研究所(邮政编码: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 登记号为 FERM BP-5186。

pHK4 用限制酶 BamHI 消化, 并且使切开端成平端。用 DNA 平齐试剂盒(Takara Shuzo 生产)按照设计的方法实现平端形成。平端形成后, 连接磷酸化 KpnI 接头以进行修饰, 这样只有用 KpnI 消化才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 部分的 DNA 片断。用 KpnI 消化该质粒, 将产生的 Brevi.-ori DNA 片断与也用 KpnI 消化的 p299LYSA 连接, 以制备在棒杆菌中自主复制、携带 lysA 的质粒。制备的质粒定为 pLYSAB。构建的 pLYSAB 方法示于图 2 上。

<2>测定来自 *Brevibacterium lactofermentum* 的 lysA 的核苷酸顺序
制备 p299LYSA 的质粒 DNA, 按照 Sanger 等人的方法测定核苷酸顺序 (例如 F. Sanger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463 (1977))。测定的核苷酸顺序与由核苷酸顺序推导出编码的氨基酸顺序显示在 SEQ ID NO:3 中。关于核苷酸顺序, 由 argS 编码的氨基酸顺序和由 lysA 编码的氨基酸顺序分别显示在 SEQ ID NO:4 和 5 中。

实施例 2: 从 *Brevibacterium lactofermentum* 制备 ddh

ddh 基因是用两个寡聚核苷酸引物(SEQ ID NO:6 和 7, 根据 *Brevibacterium lactofermentum* 已知的 ddh 基因的核苷酸顺序制备的), 通过 PCR 方法扩增 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 的染色体 DNA 的 ddh 基因而得到 (Ishino, S. 等人, Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987))。所得的扩增的 DNA 片断用 EcoT22I 和 AvaI 消化并切成平端。然后, 该片断插入 pMW119 的 SamI 位点得到质粒 pDDH。

接着, pDDH 用 SalI 和 EcoRI 消化后, 生成平端。然后, 得到的片断与用 SamI 消化的 pUC18 连接。这样得到的质粒定为 pUC18DDH。

将 Brevi.-ori 引入 pUC18DDH 中以构建可在棒杆菌中自主复制、

携带 ddh 的质粒。pHK4 用限制酶 KpnI 和 BamHI 消化, 并且使切开端成平端。用 DNA 平齐试剂盒(Takara Shuzo 生产)按照设计的方法形成平端。平端形成后, 连接磷酸化 PstI 接头(Takara Shuzo 生产), 这样它可插入 pHSG299 的 PstI 位点。按上述构建的质粒定为 pPK4。接着,
5 pUC18DDH 用 XbaI 和 KpnI 消化, 得到的片断与用 KpnI 和 XbaI 消化的 pPK4 连接。这样就构建了可在棒杆菌中自主复制、携带 ddh 的质粒。该质粒定为 pPK4D。构建 pPK4D 的过程示于图 3 中。

实施例 3: 携带 ddh 和 lysA 的质粒的构建

10 携带 ddh 的质粒 pUC18DDH 用 EcoRI 消化然后平端化, 再用 XbaI 消化以提取含 ddh 的 DNA 片断。该 ddh 片断与含有 lysA 的的质粒 p399LYSA(用 BamHI 消化, 然后平端化, 再用 XbaI 消化)连接。该质粒定为 p399DL。构建 p399DL 的过程示于图 4 中。

15 将 Brevi.-ori 引入 p399DL 中。pHK4 用限制酶 XbaI 和 BamHI 消化, 并且使切开端成平端。平端形成后, 连接磷酸化 XbaI 接头以进行修饰, 这样只有用 XbaI 消化 pHK4 才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 部分的 DNA 片断。该质粒用 XbaI 消化, 产生的 Brevi.-ori DNA 片断与也用 XbaI 消化的 p399DL 连接, 构建了可在棒杆菌中自主复制含有 ddh 和 lysA 的质粒。该质粒定为 pDL。构建 pDL 的过程
20 示于图 5 中。

实施例 4: 由 Brevibacterium lactofermentum 制备突变型 lysC、dapA 和 dapB

25 <1> 由 Brevibacterium lactofermentum 菌株制备野生型 lysC 基因和突变型 lysC 基因

(1) 制备野生型 lysC 和突变型 lysC 以及制备携带它们的质粒

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 菌株和由其经过诱变处理得到的 L-赖氨酸产生突变型菌株 AJ3445(FERM p-1944)作为染色

体 DNA 的供体。由于 AJ3445 菌株已经经过诱变处理, 所以 lysC 产生了变化而对赖氨酸和苏氨酸的协同抑制作用基本上不敏感(Journal of Biochemistry, 68, 701-710 (1970))。

5 从染色体 DNA 按照 PCR 方法进行扩增含有 lysC 的 DNA 片段 (聚合酶链反应; 参见 White, T.J. 等人, Trends Genet., 5, 185 (1989))。关于扩增的 DNA 引物, 为了扩增编码 lysC 的大约 1,643 bp 区域, 根据已知的谷氨酸棒杆菌的顺序(参见 Molecular Microbiology (1991), 5(5), 1197-1204; 和 Mol. Gen. Genet. (1990), 224, 317-324), 合成具有显示在 SEQ ID NO :10 和 11 中核苷酸顺序的单链 23-mer 和 21-mer DNA。

10 已扩增的 1,643 kb 的基因片段用琼脂糖凝胶电泳确认。然后按照普通方法纯化从凝胶上切出的片段, 再用限制酶 NruI 和 EcoRI (Takara Shuzo 公司生产)进行消化。

15 pHSG399(参见 Takeshita, S. 等人, Gene (1987), 61, 63-74)作为基因片段的克隆载体。用限制酶 SmaI 和 EcoRI(Takara Shuzo 生产)消化 pHSG399, 并与已扩增 lysC 的片段连接。DNA 是用 DNA 连接试剂盒 (Takara Shuzo 公司生产)及其方法连接的。这样, 质粒制备成功, 其中从谷氨酸棒杆菌染色体扩增的 lysC 片段分别与 pHSG399 连接。携带来源于 ATCC 13869(野生型菌株)的 lysC 的质粒定为 p399AKY。携带来源于 AJ3463(L-赖氨酸产生菌)的 lysC 的质粒定为 p399AK9。

20 将 Brevi.-ori 引入制备的 p399AKY 和 p399AK9 中, 分别构建了可在棒杆菌中自主复制、携带 lysC 的质粒。pHK4 用限制酶 KpnI 和 BamHI (Takara Shuzo 公司生产)消化, 并且使切开端成平端。平端形成使用 DNA 平齐试剂盒及其方法进行的(Takara Shuzo 公司生产)。平端形成后, 连接磷酸化 BamHI 接头以进行修饰, 这样只有用 BamHI 消化才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 的 DNA 片段。用 BamHI 消化
25 该质粒, 将产生的 Brevi.-ori DNA 片段与用 BamHI 消化的 p399AKY 和 p399AK9 连接, 制备可在棒杆菌中自主复制、携带 lysC 的质粒。

来源于 p399AKY 的携带野生型 lysC 质粒定为 p399AKYB, 来源

于 p399AK9 的携带突变型 lysC 的质粒定为 p399AK9B。构建 p399AKYB 和 p399AK9B 的过程示于图 6 中。通过引进突变型 lysC 的质粒 p399AK9B 到 *Brevibacterium lactofermentum* 野生型菌株 (AJ12036 菌株, FERM BP-734) 得到的菌株 AJ12691 已于 1992 年 4 月 10 日保藏在国际贸易工业部的工业科学技术署国家生物科学和人类技术研究所(邮政编码: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 登记号为 FERM P-12918; 按照布达佩斯条约, 此菌株已于 1995 年 2 月 10 日转入国际保藏中心, 登记号为 FERM BP-4999。

(2) 来自 *Brevibacterium lactofermentum* 的野生型 lysC 基因和突变型 lysC 的核苷酸顺序的测定

为了测定野生型和突变型 lysC 的核苷酸顺序, 分别从各自的转化体制备携带野生型 lysC 的质粒 p399AKYB 和携带突变型 lysC 的质粒 p399AK9B。核苷酸顺序的测定是按照 Sanger 等人的方法(例如 F. sanger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463 (1977))进行的。

由 p399AKY 编码的野生型 lysC 的核苷酸顺序显示在顺序表 SEQ ID NO:12 上。另一方面, 由 p399AK9 编码的突变型 lysC 的核苷酸顺序与野生型 lysC 比较, 显示在顺序表 SEQ ID NO:12 上的只有一个核苷酸第 1051 个 G 变成 A。已知谷氨酸菌株的 lysC 有两个亚基(α , β), 编码在同一 DNA 链的同一阅读框架内(参见 Kalinowski, J. 等人, *Molecular Microbiology* (1991) 5(5), 1197-1204)。从同源性判断, 预期经顺序分析的基因也有编码在同一 DNA 链的同一阅读框架内的两个亚基(α , β)。

由核苷酸顺序推导出的野生型 AK 蛋白 α -亚基的氨基酸顺序与 DNA 顺序一起显示在顺序表 SEQ ID NO:13 中。单独氨基酸顺序显示在顺序表 SEQ ID NO:14 中。由核苷酸顺序推导出的野生型 AK 蛋白 β -亚基的氨基酸顺序与 DNA 顺序一起显示在顺序表 SEQ ID NO:15 中。SEQ ID NO:16 只显示氨基酸顺序。在每一个亚基中, GTG 都用作起

始密码子，而相应的氨基酸用蛋氨酸表示。可是，这种表示是指蛋氨酸、缬氨酸或甲酰蛋氨酸。

另一方面，突变型 lysC 顺序上的突变是指发生了氨基酸的替代，因此， α -亚基的第 279 个丙氨酸残基换成苏氨酸残基，而且在野生型 AK 蛋白的 β -亚基氨基酸顺序中第 30 个丙氨酸残基换成苏氨酸残基 (SEQ ID NO:14、16)。

<2> 由 *Brevibacterium lactofermentum* 制备 dapB

(1) 制备 dapB 和构建携带 dapB 的质粒

Brevibacterium lactofermentum 的野生型菌株 ATCC 13869 作为染色体 DNA 的供体。根据普通方法由 ATCC 13869 菌株制备染色体 DNA。按照 PCR 方法从染色体 DNA 中含扩增 dapB 的 DNA 片断。关于扩增的 DNA 引物，为了经过扩增达到大约 2.0kb 编码 DDPR，根据已知的谷氨酸棒杆菌的顺序(参见 *Journal of bacteriology*, 157(9), 2743-2749 (1993))，分别合成具有显示在核苷酸顺序表 SEQ ID NO :21 和 22 中核苷酸顺序的 23-mer DNA。DNA 的合成和 pCR 是用与实施例 1 中叙述的同样方法进行。pCR-Script (Invitrogen 生产)作为已扩增的 2,001 bp 基因片断的克隆载体，并与已扩增的 dapB 片断连接。这样构建了由菌株染色体扩增的 2,001 bp 的 dapB 片断与 pCR-Script 连接的质粒。如上述得到的、含有来源于 ATCC 13869 的 dapB 的质粒定为 pCRDAPB。由引入 pCRDAPB 到大肠杆菌 JM109 中得到的转化体菌株 AJ13107 已经按照布达佩斯条约于 1995 年 5 月 26 日保藏在国际贸易工业部的工业科学技术署国家生物科学和人类技术研究所(邮政编码: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 登记号为 FERM BP-5114。

含有 DDPR 结构基因的 1,101bp 片断是通过用 EcoRV 和 SphI 消化 pCRDAPB 提取得到的。该片断与用 HincII 和 SphI 消化的 pHSG399 连接制备成质粒。制备的质粒定为 p399DPR。

Brevi.-ori 引入制成的 p399DPR 中,构建可在棒杆菌中自主复制、

携带 dapB 的质粒。pHK4 用限制酶 KpnI (Takara Shuzo 公司生产) 消化, 并且使切开端成平端。平端形成使用 DNA 平齐试剂盒及其方法进行(Takara Shuzo 公司生产)。平端形成后, 连接磷酸化 BamHI 接头 (Takara Shuzo 公司生产) 以进行修饰, 这样只有用 BamHI 消化 pHK4 才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 的 DNA 片断。该质粒用 BamHI 消化, 产生的 Brevi.-ori DNA 片断与用 BamHI 消化的 p399DPR 连接, 构建了可在棒杆菌中自主复制、携带 dapB 的质粒。制备的质粒定为 pDPRB。构建 pDPRB 的过程示于图 7 中。

(2) 测定来源于 *Brevibacterium lactofermentum* 的 dapB 的核苷酸顺序

从含有 pDPRB 的 AJ13107 菌株制备质粒 DNA, 并以与实施例 1 中相同的方法测定它的核苷酸顺序。测定的核苷酸顺序和由其推导出的氨基酸顺序显示在 SEQ ID NO:23 中。SEQ ID NO:24 只显示氨基酸顺序。

<3>从 *Brevibacterium lactofermentum* 制备 dapA

(1) 制备 dapA 并构建携带 dapA 的质粒

Brevibacterium lactofermentum 野生型菌株 ATCC13869 用作染色体 DNA 的供体。用普通方法由 ATCC 13869 菌株制备染色体 DNA。断用 PCR 方法从染色体 DNA 扩增含有 dapA 的 DNA 片断。关于扩增的 DNA 引物, 为了扩增编码 DDPS 的大约 1.5kb 区间, 需根据已知的谷氨酸棒杆菌的顺序, 分别合成具有显示在核苷酸顺序表 SEQ ID NO :17 和 18 上核苷酸顺序的 23-mer DNA(参见 Nucleic Acid Research, 18(21), 6421 (1990); EMBL 登记号 No. X53993)。合成 DNA 和 PCR 是用与实施例 1 中叙述的同样方法进行。pCR-1000 (Invitrogen 生产, 参见 Bio/Technology, 9, 657-663 (1991)) 作为已扩增的 1,411 bp 基因片断的克隆载体, 与已扩增的 dapA 片断连接。DNA 的连接是用 DNA 连接试剂盒(Takara Shuzo 公司生产)和其方法实行的。由 *Brevibacterium lactofermentum* 染色体扩增的 1,411 bp dapA 片断与

pCR-1000 连接,这样就构建了一个质粒。如上述得到的、含有来源于 ATCC 13869 菌株的 dapA 的质粒定为 pCRDAPA。由引入 pCRDAPA 到大肠杆菌 JM109 中得到的转化体菌株 AJ13106 已经按照布达佩斯条约于 1995 年 5 月 26 日保藏在国际贸易工业部的工业科学技术署国家
5 生物科学和人类技术研究所 邮政编码: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 登记号为 FERM BP-5113。

将 Brevi.-ori 引入制成的 pCRDAPA 中以构建可在棒杆菌中自主复制、携带 dapA 的质粒。pHK4 用限制酶 KpnI 和 BamHI (Takara Shuzo 公司生产) 消化, 并且使切开端成平端。平端形成使用 DNA 平齐试剂盒 (Takara Shuzo 公司生产) 及其方法进行的。平端形成后, 连接磷酸化 SmaI 接头 (Takara Shuzo 公司生产) 以进行修饰, 这样只有用 SmaI 消化 pHK4 才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 的 DNA 片断。该质粒用 SmaI 消化, 产生的 Brevi.-ori DNA 片断与也用 SmaI 消化的 pCRDAPA 连接, 制备了可在棒杆菌中自主复制、携带 dapA 的质粒。
10 该质粒定为 pDPSB。构建 pDPSB(Km^r) 的过程示于图 8 中。

(2) 测定来自 *Brevibacterium lactofermentum* 菌株的 dapA 的核苷酸顺序

从含有 pCRDAPA 的菌株 AJ13106 制备质粒 DNA 并以与实施例 1 中相同的方法测定它的核苷酸顺序。测定的核苷酸顺序和由其推导出的氨基酸顺序显示在 SEQ ID NO:19 中。SEQ ID NO:20 只显示氨基酸顺序。
20

<4> 构建携带突变型 lysC 和 dapA 二者的质粒

携带突变型 lysC、dapA 和棒杆菌的复制起始区的质粒是由携带 dapA 的 pCRDAPA 质粒以及携带 lysC 和 Brevi.-ori 的 p399AK9B 质粒构建。p399AK9B 用 Sall 完全消化, 并且使切开端成平端。连接 EcoRI 接头以此构建 Sall 位点被修饰到 EcoRI 位点的质粒。得到的质粒定为 p399AK9BSE。突变型 lysC 和 Brevi.-ori 是作为一个片断用 EcoRI 部分消化 p399AK9BSE 而切出。该片断再与用 EcoRI 消化的 pCRDAPA 质
25

粒连接。得到的质粒定为 pCRCAB。该质粒可在大肠杆菌和棒杆菌中自主复制，并使宿主具有对卡那霉素的抗性，此质粒携带突变型 lysC 和 dapA 二者。构建 pCRCAB 的过程示于图 9 中。

<5>构建携带突变型 lysC 和 dapB 二者的质粒

5 携带突变型 lysC 和 dapB 的质粒是由携带突变型 lysC 的 p399AK9 质粒和携带 dapB 的 p399DPR 质粒构建的。含有 DDPR 结构基因的 1,101 bp 片断是用 EcoRV 和 SphI 消化 p399DPR 提取的。该片断与用 Sall 消化的 p399AK9 连接并使切开端成平端，再用 SphI 消化，构建成的携带突变型 lysC 和 dapB 二者的质粒，该质粒定为 p399AKDDPR。

10 下一步，Brevi.-ori 引入制成的 p399AKDDPR。含有 Brevi.-ori 的 pHK4 质粒用限制酶 KpnI (Takara Shuzo 公司生产) 消化，并且使切开端成平端。平端形成使用 DNA 平齐试剂盒 (Takara Shuzo 公司生产) 及其方法进行的。平端形成后，连接磷酸化 BamHI 接头 (Takara Shuzo 公司生产) 以进行修饰，这样只有用 BamHI 消化 pHK4 才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 的 DNA 片断。该质粒用 BamHI 消化，产生的 Brevi.-ori DNA 片断与也用 BamHI 消化的 p399AKDDPR 连接，制备了可在棒杆菌中自主复制、携带突变型 lysC 和 dapB 的质粒。制备的质粒定为 pCB。构建 pCB 的过程示于图 10 中。

20 <6>构建携带 dapA 和 dapB 二者的质粒

携带 dapA 的 pCRDAPA 质粒可用 KpnI 和 EcoRI 消化以提取含有 dapA 的 DNA 片断，并且该片段与用 KpnI 和 EcoRI 消化的载体质粒 pHSG399 连接。得到的质粒定为 p399DPS。

25 另一方面，携带 dapB 的 pCRDAPB 质粒用 SacII 和 EcoRI 消化以提取含有 DDPR 编码区的 2,0bp DNA 片断，并且该片段与用 SacII 和 EcoRI 消化的载体质粒 p399DPS 连接，构建了携带 dapA 和 dapB 二者的质粒。得到的质粒定为 p399AB。

下一步，Brevi.-ori 引入制成的 p399AB。携带 Brevi.-ori 的 pHK4

质粒用限制酶 BamHI (Takara Shuzo 公司生产)消化, 并且使切开端成平端。平端形成使用 DNA 平齐试剂盒(Takara Shuzo 公司生产) 及其方法进行的。平端形成后, 连接磷酸化 KpnI 接头(Takara Shuzo 公司生产)以进行修饰,这样只有用 KpnI 消化 pHK4 才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 的 DNA 片断。该质粒用 KpnI 消化,产生的 Brevi.-ori DNA 片断与用 KpnI 消化的 p399AB 连接, 构建了可在棒杆菌中自主复制、携带 dapA 和 dapB 的质粒。制备的质粒定为 pAB。构建 pAB 的过程示于图 11 中。

<7>构建同时携带突变型 lysC、dapA 和 dapB 的质粒

10 为了提取 dapA 基因片断, p399DPS 用 EcoRI 和 SphI 消化并形成平端。该片断与用 SpnI 消化的 p399AK9 质粒连接并平端以构建突变型 lysC 和 dapA 共存的质粒 p399CA。

15 为了提取包括 dapB 的 2.0kb 的 DNA 基因片断, 载体质粒 pCRDAPB 用 EcoRI 消化、形成平端、接着用 SacI 消化。携带突变型 lysC 和 dapA 的质粒 p399CA 用 SpeI 消化并平端, 然后再用 SacI 消化并与提取的 dapB 片断连接, 得到了一个同时携带突变型 lysC、dapA 和 dapB 的质粒。该质粒定为 p399CAB。

20 下一步, Brevi.-ori 引入制成的 p399CAB。含有 Brevi.-ori 的 pHK4 质粒用限制酶 BamHI (Takara Shuzo 公司生产)消化, 并且使切开端成平端。平端形成使用 DNA 平齐试剂盒(Takara Shuzo 公司生产) 及其方法进行的。平端形成后, 连接磷酸化 KpnI 接头(Takara Shuzo 公司生产)以进行修饰,这样只有用 KpnI 消化 pHK4 才可能从 pHK4 中切出相应于 Brevi.-ori 的 DNA 片断。该质粒用 KpnI 消化, 产生的 Brevi.-ori DNA 片断与也用 KpnI 消化的 p399CAB 连接, 构建了可在棒杆菌中自主复制、携带突变型 lysC、dapA 和 dapB 的质粒。制备的质粒定为 pCAB。构建 pCAB 的过程示于图 12 中。

<8>构建同时携带突变型 lysC、dapA、dapB 和 lysA 的质粒

携带 lysA 的 p299LYSA 质粒用 KpnI 和 BamHI 消化和形成平端,

然后提取 lysA 基因片断。该片断与用 HpaI(Takara Shuzo 公司生产)消化的 pCAB 连接并形成平端以构建可在棒杆菌细胞内自主复制、携带突变型 lysC、dapA、dapB 和 lysA 的质粒。构建的质粒定为 pCABL。构建 pCABL 的过程示于图 13 中。请注意, lysA 片断插入 pCABL 含有 dapB 的 DNA 片断的 HpaI 位点, 然而, HpaI 位点处于 dapB 基因启动子的上游(在 SEQ ID NO: 23 中的核苷酸酸序号为 611-616), dapB 基因并未分割。

<9>构建同时携带突变型 lysC、dapA、dapB、ddh 和 lysA 的质粒

10 pHSG299 用 XbaI 和 KpnI 消化, 并与用 XbaI 和 KpnI 消化的携带 ddh 和 lysA 的 p399DL 质粒连接, 构建的质粒定为 p299DL。p299DL 用 XbaI 和 KpnI 消化并形成平端。平端形成后, 提取携带 ddh 和 lysA 的 DNA 片断。该 DNA 片断与同时携带 lysC、dapA 和 dapB 并用 HpaI 消化和形成平端的 pCAB 质粒连接以构建同时携带突变型 lysC、
15 dapA、dapB、ddh 和 lysA、可棒杆菌细胞内自主复制的质粒。构建的质粒定为 pCABDL。构建 pCABDL 的过程示于图 14 上。

实施例 5：将携带 L-赖氨酸的生物合成基因的质粒引入 Brevibacterium lactofermentum 的 L-赖氨酸产生菌中

20 如上述构建的携带 L-赖氨酸的生物合成基因的质粒, 即 pLYSAB(Cm^r)、pPK4D(Cm^r)、p399AK9B(Cm^r)、pDPSB(Km^r) pDPRB(Cm^r)、pCRCAB(Km^r)、pAB(Cm^r)、pDL(Cm^r)、pCB(Cm^r) pCAB(Cm^r)、pCABL(Cm^r)和 pCABDL(Cm^r)分别引入 Brevibacterium lactofermentum 的 L-赖氨酸产生菌 AJ11082(NRRL B-11470)中。
25 AJ11082 菌株对 AEC 有抗性。采用电脉冲方法引入质粒(Sugimoto 等人, 日本专利特许公开 No.2-207791)。转化体是根据各自质粒具有的抗药标记选择。当引进携带氯霉素抗性基因的质粒时, 转化体可在含有 5ug/ml 氯霉素的完全培养基上选择, 当引进携带卡那霉素抗性基因的

质粒时，转化体可在含有 25ug/ml 卡那霉素的完全培养基上选择。

实施例 6：L-赖氨酸的生产

从实施例 5 中得到的每种转化体培养在 L-赖氨酸产生培养基中以
5 估计它的生产力。L-赖氨酸产生培养基含有下列成份。

[L-赖氨酸产生培养基]

溶解除碳酸钙外的下列组分(每升)，以能够用 KOH 调至 pH8.0。
培养基在 115 °C 下灭菌 15 分钟，碳酸钙(50g)在干燥热空气中单独灭菌
后加入灭菌的培养基中。

10	葡萄糖	100 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgSO ₄ •7H ₂ O	1 g
	生物素	500 ug
15	维生素 B ₁	2000 ug
	FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01 g
	MnSO ₄ •7H ₂ O	0.01 g
	尼克酰胺	5 mg
	蛋白水解物 (Mamenou)	30 ml
20	碳酸钙	50 g

各种类型转化体和原始菌种中的每种在含有上述成份的培养基
中在 31.5 °C 往返式摇床上培养。培养 48 或 72 小时后的 L-赖氨酸的产
量和 72 小时后的增长(OD₅₆₂)示于表 1 中。表中 lysC* 代表突变型 lysC。
增长是定量测定 101 倍稀释后在 560nm 处的 OD 值。

25

表 1

培养 40 小时或 72 小时后 L-赖氨酸的积累

	菌株/质粒	引入的基因	L-赖氨酸		增长
			产量(g/L)		(OD ₅₆₂ /101)
5			40hrs	72hrs	
			后	后	
	AJ11082		22.0	29.8	0.450
	AJ11082/pLYSAB	<u>lysA</u>	19.8	32.5	0.356
	AJ11082/pPK4D	<u>ddh</u>	19.0	33.4	0.330
10	AJ11082/p399AK9B	<u>lysC*</u>	16.8	34.5	0.398
	AJ11082/pDPSB	<u>dapA</u>	18.7	33.8	0.410
	AJ11082/pDPRB	<u>dapB</u>	19.9	29.9	0.445
	AJ11082/pCRCAB	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u>	19.7	36.5	0.360
	AJ11082/pAB	<u>dapA</u> , <u>dapB</u>	19.0	34.8	0.390
	AJ11082/pDL	<u>lysA</u> , <u>ddh</u>	23.3	31.6	0.440
15	AJ11082/pCB	<u>lysC*</u> , <u>dapB</u>	23.3	35.0	0.440
	AJ11082/pCAB	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> , <u>dapB</u>	23.0	45.0	0.425
	AJ11082/pCABL	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> , <u>dapB</u> , <u>lysA</u>	26.2	46.5	0.379
	AJ11082/pCABDL	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> , <u>dapB</u> , <u>lysA</u> , <u>ddh</u>	26.5	47.0	0.409

正如上表所示, 当单独增强 lysA、ddh、突变型 lysC、dapA 或 dapB 时, 培养 72 小时后 L-赖氨酸产量高于或等于原始菌株的产量, 但是培养 40 小时后产量却低于原始菌株的。这就是说, 在短期培养中 L-赖氨酸的生产速度降低了。同样地, 当使用突变型 lysC 和 dapA 结合或 dapA 和 dapB 结合增强时, 培养 72 小时后 L-赖氨酸产量高于或等于原始菌株的产量, 但是培养 40 小时后产量却低于原始菌株的。因此, 在短期培养中 L-赖氨酸的生产速度降低了。

另一方面, 只有当 lysA 和 ddh 结合增强时, 生长得到了改善, 在短期培养中 L-赖氨酸的生产速度也成功地得到了恢复, 并且在长期培养中 L-赖氨酸的积累量也得到提高。

而且, 在 dapB 和突变型 lysC 一起在菌株中增强的情况下, 以及 dapA 和它们同时在菌株中增强时, 与原始菌株比较生长得到了改善, 而且 L-赖氨酸的生产速度也增加了。在这三个基因同时在菌株中增强时, 通过进一步增强 lysA 和 ddh 时, L-赖氨酸的生产速度和 L-赖氨酸积累量都进一步得到提高。

5

顺序表

(1) 一般资料

- 5 (i) 申请者:AJINOMOTO CO.,有限公司
(ii) 发明的题目:生产 L-赖氨酸的方法
(iii) 顺序数目:24
(iv) 通讯地址
(A) 地址:
(B) 街道:
(C) 城市:
10 (E) 国家:
(F) 邮政编码:
(v) 计算机可读形式
(A) 媒体类型:软盘
(B) 计算机:IBM PC 兼容
15 (C) 操作系统:PC-DOS/MS-DOS
(D) 软件:PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(vi) 流通的申请资料
(A) 申请号:
(B) 存档日期:
20 (C) 分类:
(vii) 前申请资料
(A) 申请号码:JP 8-142812
(B) 存档日期:1996 年 6 月 5 日
(viii) 委托/代理资料
25 (A) 名称:
(B) 登记号码:
(ix) 电讯资料
(A) 电话:

(B) 传真:

(2) SEQ ID NO:1 的资料

(i) 顺序特性

5 (A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 其他核酸

10 (A)说明: /desc="合成 DNA"

(iv) 反向: 否

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:1:

GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGG

23

15 (2) SEQ ID NO:2 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

20 (D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 其他核酸

(A) 说明: /desc="合成 DNA"

(iv) 反向: 是

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:2:

25 CCAAACCGC CCTCCACGGC GAA

23

(2) SEQ ID NO:3 的资料

(i) 顺序特性

-
- (A) 长度: 3579 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 双链
 - (D) 拓扑学: 线形
- 5 (ii) 分子类型: 基因组 DNA
- (vi) 初始来源:
- (A) 有机体: *Brevibacterium lactofermentum*
 - (B) 菌株: ATCC 13869
- (ix) 特点:
- 10 (A) 名称/关键: CDS
- (B) 位置: 533..2182
- (ix) 特点:
- (A) 名称/关键: CDS
 - (B) 位置: 2182..3522
- 15 (xi) 顺序说明: SEQ ID NO:3:

GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGGCTGCACT GCAACGAGGT CGTAGTTTTG GTACATGGCT	60
TCTGGCCAGT TCATGGATTG GCTGCCGAAG AAGCTATAGG CATCGCACCA GGGCCACCGA	120
GTTACCGAAG ATGGTGCCGT GCTTTTCGCC TTGGGCAGGG ACCTTGACAA AGCCCACGCT	180
GATATCGCCA AGTGAGGGAT CAGAATAGTG CATGGGCACG TCGATGCTGC CACATTGAGC	240
GGAGGCAATA TCTACCTGAG GTGGGCATT CTTCCAGCGG ATGTTTTCTT GCGCTGCTGC	300
AGTGGGCATT GATACCAAAA AGGGGCTAAG CGCAGTCGAG GCGGCAAGAA CTGCTACTAC	360
CCTTTTTTATT GTCGAACGGG GCATTACGGC TCCAAGGACG TTTGTTTTCT GGGTCAGTTA	420
CCCCAAAAAG CATATACAGA GACCAATGAT TTTTCATTAA AAAGGCAGGG ATTTGTTATA	480
AGTATGGGTC GTATTCTGTG CGACGGGTGT ACCTCGGCTA GAATTTCTCC CC ATG	535
	Met
	1
ACA CCA GCT GAT CTC GCA ACA TTG ATT AAA GAG ACC GCG GTA GAG GTT	583
Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu Val	
5 10 15	
TTG ACC TCC CGC GAG CTC GAT ACT TCT GTT CTT CCG GAG CAG GTA GTT	631
Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val Val	
20 25 30	
GTG GAG CGT CCG CGT AAC CCA GAG CAC GGC GAT TAC GCC ACC AAC ATT	679
Val Glu Arg Pro Arg Asn Pro Glu His Gly Asp Tyr Ala Thr Asn Ile	
35 40 45	
GCA TTG CAG GTG GCT AAA AAG GTC GGT CAG AAC CCT CGG GAT TTG GCT	727
Ala Leu Gln Val Ala Lys Lys Val Gly Gln Asn Pro Arg Asp Leu Ala	
50 55 60 65	
ACC TGG CTG GCA GAG GCA TTG GCT GCA GAT GAC GCC ATT GAT TCT GCT	775
Thr Trp Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Asp Asp Ala Ile Asp Ser Ala	
70 75 80	
GAA ATT GCT GGC CCA GGC TTT TTG AAC ATT CGC CTT GCT GCA GCA GCA	823
Glu Ile Ala Gly Pro Gly Phe Leu Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ala Ala	
85 90 95	
CAG GGT GAA ATT GTG GCC AAG ATT CTG GCA CAG GGC GAG ACT TTC GGA	871
Gln Gly Glu Ile Val Ala Lys Ile Leu Ala Gln Gly Glu Thr Phe Gly	
100 105 110	
AAC TCC GAT CAC CTT TCC CAC TTG GAC GTG AAC CTC GAG TTC GTT TCT	919
Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val Ser	
115 120 125	

GCA AAC CCA ACC GGA CCT ATT CAC CTT GGC GGA ACC CGC TGG GCT GCC	967
Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala Ala	
130 135 140 145	
GTG GGT GAC TCT TTG GGT CGT GTG CTG GAG GCT TCC GGC GCG AAA GTG	1015
Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys Val	
150 155 160	
ACC CGC GAA TAC TAC TTC AAC GAT CAC GGT CGC CAG ATC GAT CGT TTC	1063
Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg Phe	
165 170 175	
GCT TTG TCC CTT CTT GCA GCG GCG AAG GGC GAG CCA ACG CCA GAA GAC	1111
Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu Asp	
180 185 190	
GGT TAT GGC GGC GAA TAC ATT AAG GAA ATT GCG GAG GCA ATC GTC GAA	1159
Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val Glu	
195 200 205	
AAG CAT CCT GAA GCG TTG GCT TTG GAG CCT GCC GCA ACC CAG GAG CTT	1207
Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu Leu	
210 215 220 225	
TTC CGC GCT GAA GGC GTG GAG ATG ATG TTC GAG CAC ATC AAA TCT TCC	1255
Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser Ser	
230 235 240	
CTG CAT GAG TTC GGC ACC GAT TTC GAT GTC TAC TAC CAC GAG AAC TCC	1303
Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn Ser	
245 250 255	
CTG TTC GAG TCC GGT GCG GTG GAC AAG GCC GTG CAG GTG CTG AAG GAC	1351
Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys Asp	
260 265 270	
AAC GGC AAC CTG TAC GAA AAC GAG GGC GCT TGG TGG CTG CGT TCC ACC	1399
Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser Thr	
275 280 285	
GAA TTC GGC GAT GAC AAA GAC CGC GTG GTG ATC AAG TCT GAC GGC GAC	1447
Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly Asp	
290 295 300 305	
GCA GCC TAC ATC GCT GGC GAT ATC GCG TAC GTG GCT GAT AAG TTC TCC	1495
Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe Ser	
310 315 320	

CGC GGA CAC AAC CTA AAC ATC TAC ATG TTG GGT GCT GAC CAC CAT GGT	1543
Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His Gly	
325 330 335	
TAC ATC GCG CGC CTG AAG GCA GCG GCG GCG GCA CTT GGC TAC AAG CCA	1591
Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Pro	
340 345 350	
GAA GGC GTT GAA GTC CTG ATT GGC CAG ATG GTG AAC CTG CTT CGC GAC	1639
Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Gly Gln Met Val Asn Leu Leu Arg Asp	
355 360 365	
GGC AAG GCA GTG CGT ATG TCC AAG CGT GCA GGC ACC GTG GTC ACC CTA	1687
Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr Leu	
370 375 380 385	
GAT GAC CTC GTT GAA GCA ATC GGC ATC GAT GCG GCG CGT TAC TCC CTG	1735
Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser Leu	
390 395 400	
ATC CGT TCC TCC GTG GAT TCT TCC CTG GAT ATC GAT CTC GGC CTG TGG	1783
Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu Trp	
405 410 415	
GAA TCC CAG TCC TCC GAC AAC CCT GTG TAC TAC GTG CAG TAC GGA CAC	1831
Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly His	
420 425 430	
GCT CGT CTG TGC TCC ATC GCG CGC AAG GCA GAG ACC TTG GGT GTC ACC	1879
Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val Thr	
435 440 445	
GAG GAA GGC GCA GAC CTA TCT CTA CTG ACC CAC GAC CGC GAA GGC GAT	1927
Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly Asp	
450 455 460 465	
CTC ATC CGC ACA CTC GGA GAG TTC CCA GCA GTG GTG AAG GCT GCC GCT	1975
Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Pro Ala Val Val Lys Ala Ala Ala	
470 475 480	
GAC CTA CGT GAA CCA CAC CGC ATT GCC CGC TAT GCT GAG GAA TTA GCT	2023
Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu Ala	
485 490 495	
GGA ACT TTC CAC CGC TTC TAC GAT TCC TGC CAC ATC CTT CCA AAG GTT	2071
Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys Val	
500 505 510	

GAT GAG GAT ACG GCA CCA ATC CAC ACA GCA CGT CTG GCA CTT GCA GCA	2119
Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala Ala	
515 520 525	
GCA ACC CGC CAG ACC CTC GCT AAC GCC CTG CAC CTG GTT GGC GTT TCC	2167
Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val Ser	
530 535 540 545	
GCA CCG GAG AAG ATG TAACA ATG GCT ACA GTT GAA AAT TTC AAT GAA	2214
Ala Pro Glu Lys Met Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu	
550 1 5	
CTT CCC GCA CAC GTA TGG CCA CGC AAT GCC GTG CGC CAA GAA GAC GGC	2262
Leu Pro Ala His Val Trp Pro Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly	
10 15 20 25	
GTT GTC ACC GTC GCT GGT GTG CCT CTG CCT GAC CTC GCT GAA GAA TAC	2310
Val Val Thr Val Ala Gly Val Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr	
30 35 40	
GGA ACC CCA CTG TTC GTA GTC GAC GAG GAC GAT TTC CGT TCC CGC TGT	2358
Gly Thr Pro Leu Phe Val Val Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys	
45 50 55	
CGC GAC ATG GCT ACC GCA TTC GGT GGA CCA GGC AAT GTG CAC TAC GCA	2406
Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala	
60 65 70	
TCT AAA GCG TTC CTG ACC AAG ACC ATT GCA CGT TGG GTT GAT GAA GAG	2454
Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu	
75 80 85	
GGG CTG GCA CTG GAC ATT GCA TCC ATC AAC GAA CTG GGC ATT GCC CTG	2502
Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu	
90 95 100 105	
GCC GCT GGT TTC CCC GCC AGC CGT ATC ACC GCG CAC GGC AAC AAC AAA	2550
Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys	
110 115 120	
GGC GTA GAG TTC CTG CGC GCG TTG GTT CAA AAC GGT GTG GGA CAC GTG	2598
Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val	
125 130 135	
GTG CTG GAC TCC GCA CAG GAA CTA GAA CTG TTG GAT TAC GTT GCC GCT	2646
Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala	
140 145 150	

GGT GAA GGC AAG ATT CAG GAC GTG TTG ATC CGC GTA AAG CCA GGC ATC	2694
Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile	
155 160 165	
GAA GCA CAC ACC CAC GAG TTC ATC GCC ACT AGC CAC GAA GAC CAG AAG	2742
Glu Ala His Thr His Glu Phe Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys	
170 175 180 185	
TTC GGA TTC TCC CTG GCA TCC GGT TCC GCA TTC GAA GCA GCA AAA GCC	2790
Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala	
190 195 200	
GCC AAC AAC GCA GAA AAC CTG AAC CTG GTT GGC CTG CAC TGC CAC GTT	2838
Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val	
205 210 215	
GGT TCC CAG GTG TTC GAC GCC GAA GGC TTC AAG CTG GCA GCA GAA CGC	2886
Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg	
220 225 230	
GTG TTG GGC CTG TAC TCA CAG ATC CAC AGC GAA CTG GGC GTT GCC CTT	2934
Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu	
235 240 245	
CCT GAA CTG GAT CTC GGT GGC GGA TAC GGC ATT GCC TAT ACC GCA GCT	2982
Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala	
250 255 260 265	
GAA GAA CCA CTC AAC GTC GCA GAA GTT GCC TCC GAC CTG CTC ACC GCA	3030
Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala	
270 275 280	
GTC GGA AAA ATG GCA GCG GAA CTA GGC ATC GAC GCA CCA ACC GTG CTT	3078
Val Gly Lys Met Ala Ala Glu Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu	
285 290 295	
GTT GAG CCC GGC CGC GCT ATC GCA GGC CCC TCC ACC GTG ACC ATC TAC	3126
Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr	
300 305 310	
GAA GTC GGC ACC ACC AAA GAC GTC CAC GTA GAC GAC GAC AAA ACC CGC	3174
Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg	
315 320 325	
CGT TAC ATC GCC GTG GAC GGA GGC ATG TCC GAC AAC ATC CGC CCA GCA	3222
Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala	
330 335 340 345	

Ile Ala Leu Gln Val Ala Lys Lys Val Gly Gln Asn Pro Arg Asp Leu
 50 55 60
 Ala Thr Trp Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Asp Asp Ala Ile Asp Ser
 65 70 75 80
 Ala Glu Ile Ala Gly Pro Gly Phe Leu Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ala
 85 90 95
 Ala Gln Gly Glu Ile Val Ala Lys Ile Leu Ala Gln Gly Glu Thr Phe
 100 105 110
 Gly Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val
 115 120 125
 Ser Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala
 130 135 140
 Ala Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys
 145 150 155 160
 Val Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg
 165 170 175
 Phe Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu
 180 185 190
 Asp Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val
 195 200 205
 Glu Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu
 210 215 220
 Leu Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser
 225 230 235 240
 Ser Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn
 245 250 255
 Ser Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys
 260 265 270
 Asp Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser
 275 280 285
 Thr Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly
 290 295 300
 Asp Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His
 325 330 335

Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro
 1 5 10 15
 Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly Val Val Thr Val Ala Gly Val
 20 25 30
 Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val
 35 40 45
 Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe
 50 55 60
 Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys
 65 70 75 80
 Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala
 85 90 95
 Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser
 100 105 110
 Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala
 115 120 125
 Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu
 130 135 140
 Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp
 145 150 155 160
 Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe
 165 170 175
 Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser
 180 185 190
 Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu
 195 200 205
 Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala
 210 215 220
 Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln
 225 230 235 240
 Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala
 260 265 270

(2) SEQ ID NO:7 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 20 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= "合成 DNA"

(iv) 反向: 是

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:7:

TGCCCCTCGA GCTAAATTAG

(2) SEQ ID NO:8 的资料

20

(i) 顺序特性

(A) 长度: 1034 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 基因组 DNA

(vi) 初始来源:

(A) 有机体: *Brevibacterium lactofermentum*

(B) 菌株: ATCC 13869

(ix) 特点:

(A) 名称/关键: CDS

(B) 位置: 61..1020

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:8:

ATGCATCTCG	GTAAGCTCGA	CCAGGACAGT	GCCACCACAA	TTTTGGAGGA	TTACAAGAAC	60
ATG ACC AAC ATC CGC GTA GCT ATC GTG GGC TAC GGA AAC CTG GGA CGC	108					
Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg						
1 5 10 15						
AGC GTC GAA AAG CTT ATT GCC AAG CAG CCC GAC ATG GAC CTT GTA GGA	156					
Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly						
20 25 30						
ATC TTC TCG CGC CGG GCC ACC CTC GAC ACA AAG ACG CCA GTC TTT GAT	204					
Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp						
35 40 45						

GTC GCC GAC GTG GAC AAG CAC GCC GAC GAC GTG GAC GTG CTG TTC CTG	252
Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu	
50 55 60	
TGC ATG GGC TCC GCC ACC GAC ATC CCT GAG CAG GCA CCA AAG TTC GCG	300
Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala	
65 70 75 80	
CAG TTC GCC TGC ACC GTA GAC ACC TAC GAC AAC CAC CGC GAC ATC CCA	348
Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro	
85 90 95	
CGC CAC CGC CAG GTC ATG AAC GAA GCC GCC ACC GCA GCC GGC AAC GTT	396
Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val	
100 105 110	
GCA CTG GTC TCT ACC GGC TGG GAT CCA GGA ATG TTC TCC ATC AAC CGC	444
Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg	
115 120 125	
GTC TAC GCA GCG GCA GTC TTA GCC GAG CAC CAG CAG CAC ACC TTC TGG	492
Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp	
130 135 140	
GGC CCA GGT TTG TCA CAG GGC CAC TCC GAT GCT TTG CGA CGC ATC CCT	540
Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro	
145 150 155 160	
GGC GTT CAA AAG GCA GTC CAG TAC ACC CTC CCA TCC GAA GAC GCC CTG	588
Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu	
165 170 175	
GAA AAG GCC CGC CGC GGC GAA GCC GGC GAC CTT ACC GGA AAG CAA ACC	636
Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr	
180 185 190	
CAC AAG CGC CAA TGC TTC GTG GTT GCC GAC GCG GCC GAT CAC GAG CGC	684
His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg	
195 200 205	
ATC GAA AAC GAC ATC CGC ACC ATG CCT GAT TAC TTC GTT GGC TAC GAA	732
Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu	
210 215 220	
GTC GAA GTC AAC TTC ATC GAC GAA GCA ACC TTC GAC TCC GAG CAC ACC	780
Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr	
225 230 235 240	

GGC ATG CCA CAC GGT GGC CAC GTG ATT ACC ACC GGC GAC ACC GGT GGC	828
Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly	
245 250 255	
TTC AAC CAC ACC GTG GAA TAC ATC CTC AAG CTG GAC CGA AAC CCA GAT	876
Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp	
260 265 270	
TTC ACC GCT TCC TCA CAG ATC GCT TTC GGT CGC GCA GCT CAC CGC ATG	924
Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met	
275 280 285	
AAG CAG CAG GGC CAA AGC GGA GCT TTC ACC GTC CTC GAA GTT GCT CCA	972
Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro	
290 295 300	
TAC CTG CTC TCC CCA GAG AAC TTG GAC GAT CTG ATC GCA CGC GAC GTC	1020
Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val	
305 310 315 320	
TAATTTAGCT CGAG	1034

(2) SEQ ID NO:9 的资料**(i) 顺序特性****(A) 长度: 320 个氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(D) 拓扑学: 线形****(ii) 分子类型: 蛋白质****(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:9:**

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

Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val
 100 105 110
 Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg
 115 120 125
 Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp
 130 135 140
 Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro
 145 150 155 160
 Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu
 165 170 175
 Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr
 180 185 190
 His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg
 195 200 205
 Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
 210 215 220
 Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr
 225 230 235 240
 Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
 245 250 255
 Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
 260 265 270
 Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
 275 280 285
 Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
 290 295 300
 Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
 305 310 315 320

(2) SEQ ID NO:10 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 其他核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA”

(iv) 反向: 否

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:10:

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT

23

(2) SEQ ID NO:11 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 其他核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA”

(iv) 反向: 是

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:11:

ACGGAATTCA ATCTTACGGC C

21

(2) SEQ ID NO:12 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 1643 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 基因组 DNA

(vi) 初始来源:

(A) 有机体: *Brevibacterium lactofermentum*

(B) 菌株: ATCC 13869

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:12:

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTA	TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC	TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT	ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTA ACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG	CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTTCT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG	TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG	CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GA ACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC	CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG	CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480

GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC 540
 GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC 600
 AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG 660
 TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGC GTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT 720
 GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCCT 780
 AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACCTGC TGCTGTTGGC 840
 TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC 900
 GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT 960
 CCTGTGGAAG AAGCAGTCCT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC 1020
 GTTCTGGGTA TTTCCGATAA GCCAGGCGAG GCTGCCAAGG TTTTCCGTGC GTTGGCTGAT 1080
 GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTTCTGCAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC 1140
 GACATCACGT TCACCTGCCC TCGCGCTGAC GGACGCCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG 1200
 CTTCAAGTTC AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGACG ACCAGGTCGG CAAAGTCTCC 1260
 CTCGTGGGTG CTGGCATGAA GTCTACCCA GGTGTTACCG CAGAGTTCAT GGAAGCTCTG 1320
 CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG 1380
 ATCCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCATTGC ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC 1440
 GGCGAAGACG AAGCCGTCGT TTATGCAGGC ACCGGACGCT AAAGTTTTAA AGGAGTAGTT 1500
 TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGCCA GGTCGGCCAG GTTATGCGCA 1560
 CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT TCCCCGCGTT 1620
 CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC 1643

(2) SEQ ID NO:13 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 1643 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 基因组 DNA

(vi) 初始来源:

(A) 有机体: *Brevibacterium lactofermentum* fermentum

(B) 菌株: ATCC 13869

(ix) 特点:

(A) 名称/关键: CDS

(B) 位置: 217..1482

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:13:

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTTAA TCGAATATCA ATATACGGTC 60

TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG	234
Met Ala Leu Val Val Gln	
1 5	
AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC	282
Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val	
10 15 20	
GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT	330
Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val	
25 30 35	
GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA	378
Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala	
40 45 50	
GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG	426
Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu	
55 60 65 70	
ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG	474
Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu	
75 80 85	
TCC CTT GGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG	522
Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val	
90 95 100	
CTC ACC ACC GAG CGC CAC GGA AAC GCA CGC ATT GTT GAC GTC ACA CCG	570
Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro	
105 110 115	
GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT	618
Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala	
120 125 130	
GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT	666
Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly	
135 140 145 150	
CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC	714
Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asn	
155 160 165	

GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCG GAC GTT GAC GGT GTG TAT ACC GCT	762
Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala	
170 175 180	
GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCA CAG AAG CTG GAA AAG CTC AGC TTC	810
Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe	
185 190 195	
GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC TCC AAG ATT TTG GTG CTG	858
Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu	
200 205 210	
CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT GTG CCA CTT CGC GTA CGC	906
Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg	
215 220 225 230	
TCG TCT TAT AGT AAT GAT CCC GGC ACT TTG ATT GCC GGC TCT ATG GAG	954
Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu	
235 240 245	
GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG	1002
Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys	
250 255 260	
TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG	1050
Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu	
265 270 275	
GCT GCC AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC	1098
Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp	
280 285 290	
ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC	1146
Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile	
295 300 305 310	
ACG TTC ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG	1194
Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu	
315 320 325	
AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC	1242
Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp	
330 335 340	
CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA	1290
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro	
345 350 355	

GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC	1338
Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn	
360 365 370	
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT	1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg	
375 380 385 390	
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG	1434
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln	
395 400 405	
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA	1482
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
410 415 420	
AGTTTTAAAG GAGTAGTTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG	1542
TCGGCCAGGT TATGCGCACC CTTTTGGAAG AGCGCAATTT CCCAGCTGAC ACTGTTTCGTT	1602
TCTTTGCTTC CCCGCGTTC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C	1643

(2) SEQ ID NO:14 的资料**(i) 顺序特性****(A) 长度: 421 个氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(D) 拓扑学: 线形****(ii) 分子类型: 蛋白质****(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:14:**

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

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380

GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008
Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu	
1 5 10 15	
GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCC	1056
Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala	
20 25 30	
AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104
Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val	
35 40 45	
CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152
Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe	
50 55 60	
ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200
Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys	
65 70 75	
CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248
Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val	
80 85 90 95	
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1296
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val	
100 105 110	
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1344
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu	
115 120 125	
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1392
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp	
130 135 140	
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC	1440
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly	
145 150 155	
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTAA	1490
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
160 165 170	
AGGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG	1550
GTTATGCGCA CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT	1610

TCCCCGCGTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC

1643

(2) SEQ ID NO:16 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 172 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:16: D NO:16:

```

Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala
 1             5             10             15
Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys
          20             25             30
Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu
          35             40             45
Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr
          50             55             60
Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu
          65             70             75             80
Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly
          85             90             95
Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr
          100            105            110
Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu
          115            120            125
Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp
          130            135            140
Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly
          145            150            155            160
Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
          165            170

```

(2) SEQ ID NO:17 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 其他核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(iv) 反向: 否

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:17:

GTCGACGGAT CGCAAATGGC AAC

(2) SEQ ID NO:18 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 其他核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(iv) 反向: 是

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:18:

GGATCCTTGA GCACCTTGCG CAG

(2) SEQ ID NO:19 的资料

(i) 顺序特性

(A) 长度: 1411 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 基因组 DNA

(vi) 初始来源:

(A) 有机体: *Brevibacterium lactofermentum*

(B) 菌株: ATCC 13869

(ix) 特点:

(A) 名称/关键: CDS

(B) 位置: 311..1213

(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:19:

CTCTCGATAT CGAGAGAGAA GCAGCGCCAC GGTTTTTCGG TGATTTTGAG ATTGAAACTT 60

TGGCAGACGG ATCGCAAATG GCAACAAGCC CGTATGTCAT GGACTTTTAA CGCAAAGCTC 120

ACACCCACGA GCTAAAAATT CATATAGTTA AGACAACATT TTTGGCTGTA AAAGACAGCC	180
GTA AAAACCT CTTGCTCATG TCAATTGTTC TTATCGGAAT GTGGCTTGGG CGATTGTTAT	240
GCAAAAAGTTG TTAGGTTTTT TGC GGGGTTG TTTAACCCCC AAATGAGGGA AGAAGGTAAC	300
CTTGA ACTCT ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC	349
Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His	
1 5 10	
TTC GGC ACC GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TCC GGA	397
Phe Gly Thr Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly	
15 20 25	
GAC ATC GAT ATC GCT GCT GGC CGC GAA GTC GCG GCT TAT TTG GTT GAT	445
Asp Ile Asp Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp	
30 35 40 45	
AAG GGC TTG GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TCC CCA	493
Lys Gly Leu Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro	
50 55 60	
ACG ACA ACC GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG	541
Thr Thr Thr Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu	
65 70 75	
GAA GTT GGG GAT CGG GCG AAC GTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC	589
Glu Val Gly Asp Arg Ala Asn Val Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn	
80 85 90	
ACG CGG ACA TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA	637
Thr Arg Thr Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala	
95 100 105	
GAC GGC CTT TTA GTT GTA ACT CCT TAT TAC TCC AAG CCG AGC CAA GAG	685
Asp Gly Leu Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu	
110 115 120 125	
GGA TTG CTG GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA	733
Gly Leu Leu Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro	
130 135 140	
ATT TGT CTC TAT GAC ATT CCT GGT CGG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT	781
Ile Cys Leu Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser	
145 150 155	
GAT ACC ATG AGA CGC CTG AGT GAA TTA CCT ACG ATT TTG GCG GTC AAG	829
Asp Thr Met Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys	
160 165 170	

GAC GCC AAG GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG	877
Asp Ala Lys Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr	
175 180 185	
GGA CTT GCC TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT	925
Gly Leu Ala Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu	
190 195 200 205	
GCT TTG GGC GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC CCC	973
Ala Leu Gly Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro	
210 215 220	
ACA GCA TTA CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC	1021
Thr Ala Leu Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val	
225 230 235	
CGT GCG CGG GAA ATC AAC GCC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA	1069
Arg Ala Arg Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln	
240 245 250	
GGT CGC TTG GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT CTG CGT CTG CAG	1117
Gly Arg Leu Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln	
255 260 265	
GGC ATC AAC GTA GGA GAT CCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG	1165
Gly Ile Asn Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu	
270 275 280 285	
CAG GAA CTT GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA	1213
Gln Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu	
290 295 300	
TAAATATGAA TGATTCCCGA AATCGCGGCC GGAAGGTTAC CCGCAAGGCG GCCCACCAGA	1273
AGCTGGTCAG GAAAACCATC TGGATACCCC TGTCTTTCAG GCACCAGATG CTTCTCTAA	1333
CCAGAGCGCT GTAAAAGCTG AGACCGCCGG AAACGACAAT CGGGATGCTG CGCAAGGTGC	1393
TCAAGGATCC CAACATTC	1411

(2) SEQ ID NO:20 的资料**(i) 顺序特性****(A) 长度: 301 个氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(D) 拓扑学: 线形****(ii) 分子类型: 蛋白质****(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:20:**

Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr
 1 5 10 15
 Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp
 20 25 30
 Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu
 35 40 45
 Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr
 50 55 60
 Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Asp Arg Ala Asn Val Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr
 85 90 95
 Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu
 100 105 110
 Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu
 115 120 125
 Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu
 130 135 140
 Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys
 165 170 175
 Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala
 180 185 190
 Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly
 195 200 205
 Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu
 210 215 220
 Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg
 225 230 235 240
 Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu
 245 250 255
 Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln Gly Ile Asn
 260 265 270
 Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Gln Glu Leu
 275 280 285

Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu
 290 295 300

(2) SEQ ID NO:21 的资料**(i) 顺序特性****(A) 长度: 23 个碱基对****(B) 类型: 核酸****(C) 链型: 单链****(D) 拓扑学: 线形****(ii) 分子类型: 其他核酸****(A) 说明: /desc= "合成 DNA "****(iv) 反向: 否****(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:21:**

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAA

23

(2) SEQ ID NO:22 的资料**(i) 顺序特性****(A) 长度: 23 个碱基对****(B) 类型: 核酸****(C) 链型: 单链****(D) 拓扑学: 线形****(ii) 分子类型: 其他核酸****(A) 说明: /desc= "合成 DNA "****(iv) 反向: 是****(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:22:**

CGGTTCATCG CCAAGTTTTT CTT

23

(2) SEQ ID NO:23 的资料**(i) 顺序特性****(A) 长度: 2001 个碱基对****(B) 类型: 核酸****(C) 链型: 双链****(D) 拓扑学: 线形****(ii) 分子类型: 基因组 DNA****(vi) 初始来源:****(A) 有机体: Brevibacterium lactofermentum**

(B) 菌株: ATCC 13869**(ix) 特点:****(A) 名称/关键: CDS****(B) 位置: 730..1473****(xi) 顺序说明: SEQ ID NO:23:**

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAACGACAAC CTGATCAGGA TATCCAATGC CTTGAATATT	60
GACGTTGAGG AAGGAATCAC CAGCCATCTC AACTGGAAGA CCTGACGCCT GCTGAATTGG	120
ATCAGTGGCC CAATCGACCC ACCAACCAGG TTGGCTATTA CCGGCGATAT CAAAAACAAC	180
TCGCGTGAAC GTTTCGTGCT CGGCAACGCG GATGCCAGCG ATCGACATAT CGGAGTCACC	240
AACTTGAGCC TGCTGCTTCT GATCCATCGA CGGGGAACCC AACGGCGGCA AAGCAGTGGG	300
GGAAGGGGAG TTGGTGGACT CTGAATCAGT GGGCTCTGAA GTGGTAGGCG ACGGGGCAGC	360
ATCTGAAGGC GTGCGAGTTG TGGTGACCGG GTTAGCGGTT TCAGTTTCTG TCACAACCTGG	420
AGCAGGACTA GCAGAGGTTG TAGGCGTTGA GCCGCTTCCA TCACAAGCAC TTA AAAAGTAA	480
AGAGGCGGAA ACCACAAGCG CCAAGGAACT ACCTGCGGAA CGGGCGGTGA AGGGCAACTT	540
AAGTCTCATA TTTCAAACAT AGTTCACCT GTGTGATTAA TCTCCAGAAC GGAACAAACT	600
GATGAACAAT CGTTAACAAC ACAGACCAA ACGGTCAGTT AGGTATGGAT ATCAGCACCT	660
TCTGAATGGG TACGTCTAGA CTGGTGGGCG TTTGAAAAAC TCTTCGCCCC ACGAAAATGA	720
AGGAGCATA ATG GGA ATC AAG GTT GGC GTT CTC GGA GCC AAA GGC CGT	768
Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg	
1 5 10	
GTT GGT CAA ACT ATT GTG GCA GCA GTC AAT GAG TCC GAC GAT CTG GAG	816
Val Gly Gln Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu	
15 20 25	
CTT GTT GCA GAG ATC GGC GTC GAC GAT GAT TTG AGC CTT CTG GTA GAC	864
Leu Val Ala Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp	
30 35 40 45	
AAC GGC GCT GAA GTT GTC GTT GAC TTC ACC ACT CCT AAC GCT GTG ATG	912
Asn Gly Ala Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met	
50 55 60	
GGC AAC CTG GAG TTC TGC ATC AAC AAC GGC ATT TCT GCG GTT GTT GGA	960
Gly Asn Leu Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly	
65 70 75	
ACC ACG GGC TTC GAT GAT GCT CGT TTG GAG CAG GTT CGC GCC TGG CTT	1008
Thr Thr Gly Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Ala Trp Leu	
80 85 90	

GAA GGA AAA GAC AAT GTC GGT GTT CTG ATC GCA CCT AAC TTT GCT ATC	1056
Glu Gly Lys Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile	
95 100 105	
TCT GCG GTG TTG ACC ATG GTC TTT TCC AAG CAG GCT GCC CGC TTC TTC	1104
Ser Ala Val Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe	
110 115 120 125	
GAA TCA GCT GAA GTT ATT GAG CTG CAC CAC CCC AAC AAG CTG GAT GCA	1152
Glu Ser Ala Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala	
130 135 140	
CCT TCA GGC ACC GCG ATC CAC ACT GCT CAG GGC ATT GCT GCG GCA CGC	1200
Pro Ser Gly Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg	
145 150 155	
AAA GAA GCA GGC ATG GAC GCA CAG CCA GAT GCG ACC GAG CAG GCA CTT	1248
Lys Glu Ala Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu	
160 165 170	
GAG GGT TCC CGT GGC GCA AGC GTA GAT GGA ATC CCA GTT CAC GCA GTC	1296
Glu Gly Ser Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val	
175 180 185	
CGC ATG TCC GGC ATG GTT GCT CAC GAG CAA GTT ATC TTT GGC ACC CAG	1344
Arg Met Ser Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln	
190 195 200 205	
GGT CAG ACC TTG ACC ATC AAG CAG GAC TCC TAT GAT CGC AAC TCA TTT	1392
Gly Gln Thr Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe	
210 215 220	
GCA CCA GGT GTC TTG GTG GGT GTG CGC AAC ATT GCA CAG CAC CCA GGC	1440
Ala Pro Gly Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly	
225 230 235	
CTA GTC GTA GGA CTT GAG CAT TAC CTA GGC CTG TAAAGGCTCA TTTCAGCAGC	1493
Leu Val Val Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu	
240 245	
GGGTGGAATT TTTAAAAGG AGCGTTTAAA GGCTGTGGCC GAACAAGTTA AATTGAGCGT	1553
GGAGTTGATA GCGTGCA GTT TTTACTCC ACCCGCTGAT GTTGAGTGGT CAACTGATGT	1613
TGAGGGCGCG GAAGCACTCG TCGAGTTTGC GGGTCGTGCC TGCTACGAAA CTTTTGATAA	1673
GCCGAACCCT CGAACTGCTT CCAATGCTGC GTATCTGCGC CACATCATGG AAGTGGGGCA	1733
CACTGCTTTG CTTGAGCATG CCAATGCCAC GATGTATATC CGAGGCATTT CTCGGTCCGC	1793
GACCCATGAA TTGGTCCGAC ACCGCCATTT TTCCTTCTCT CAACTGTCTC AGCGTTTCGT	1853

图 1

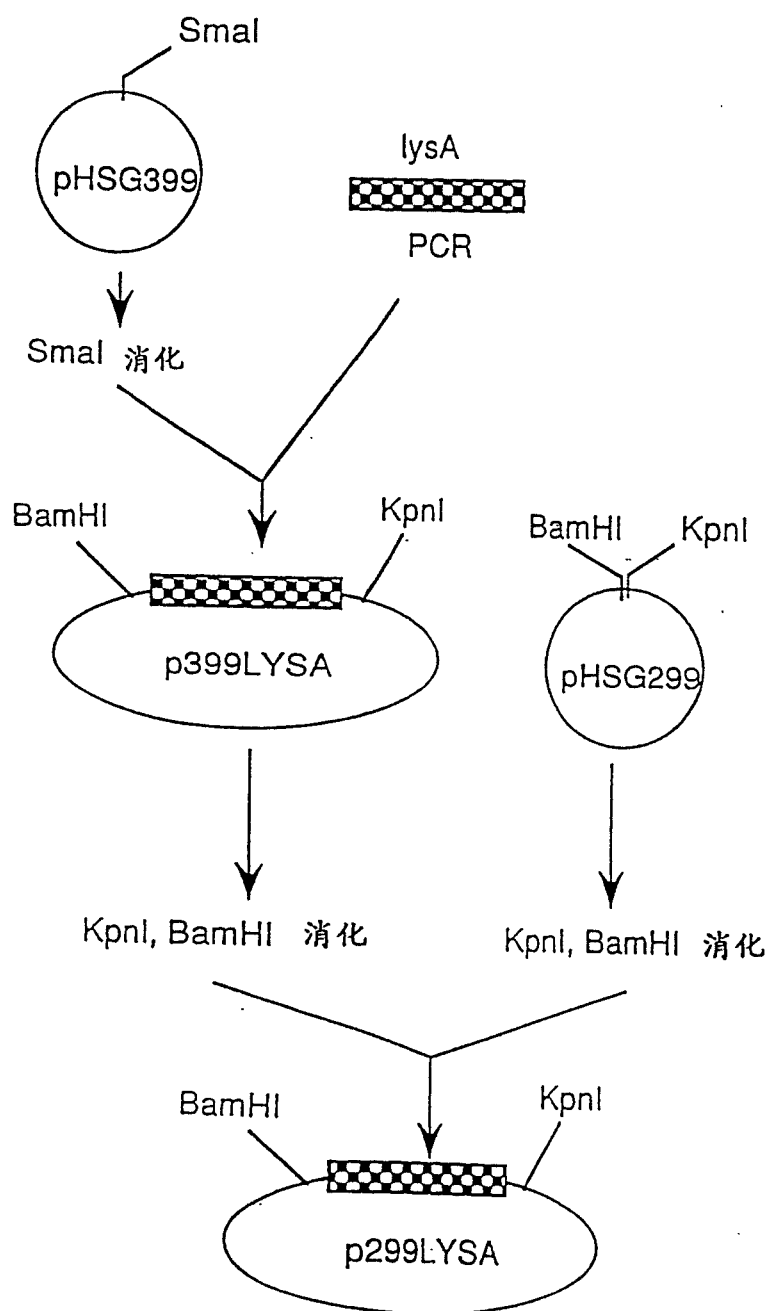


图 2

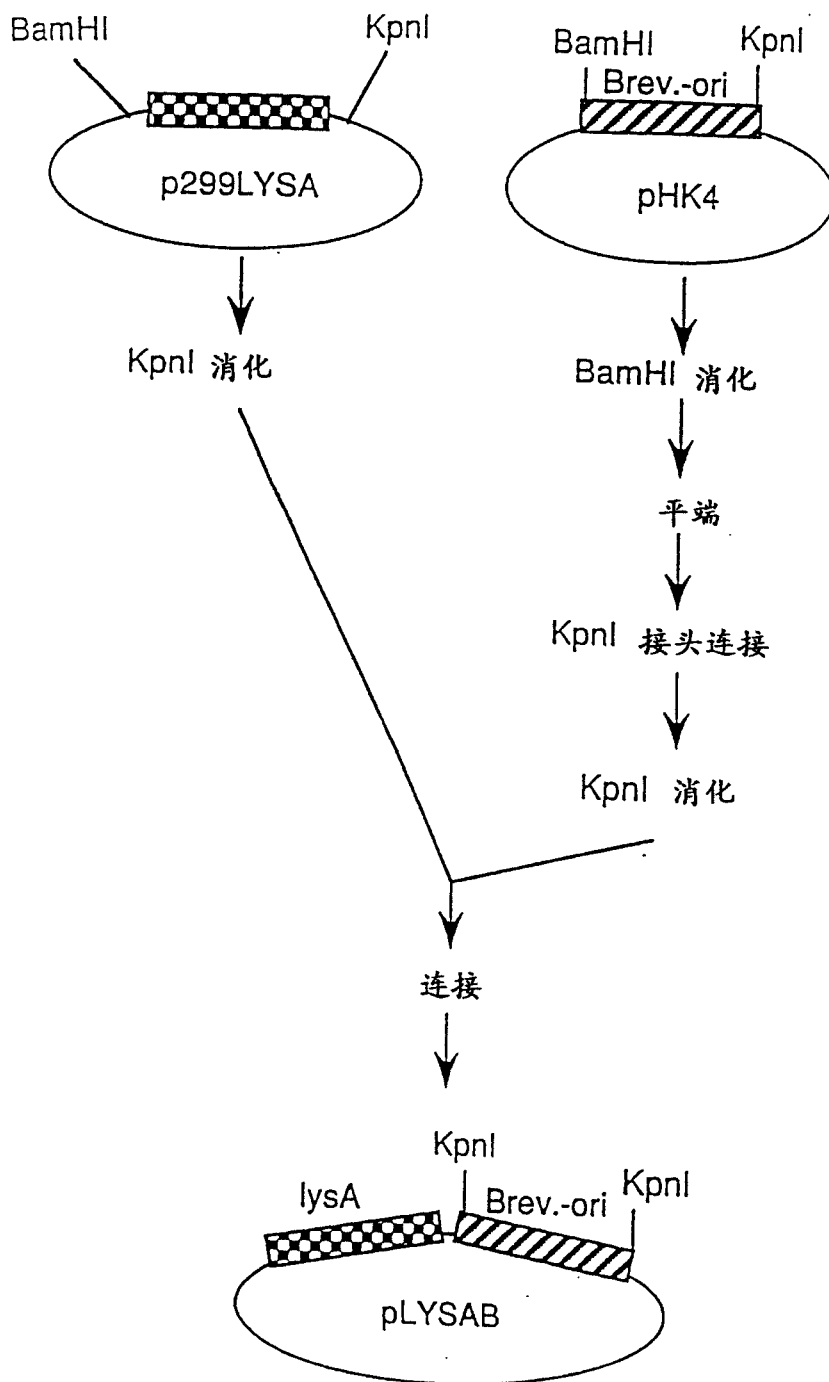


图 3

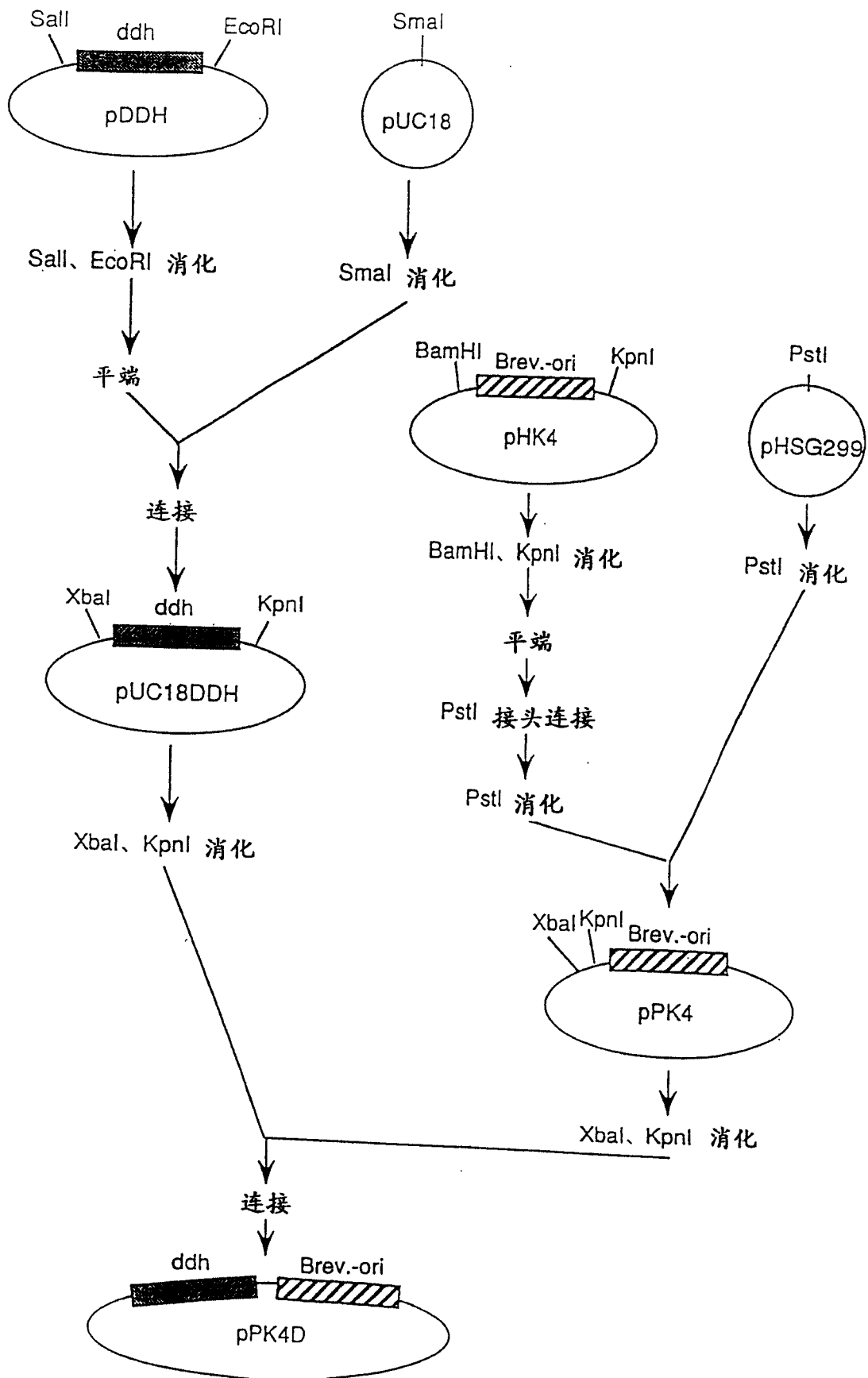


图 4

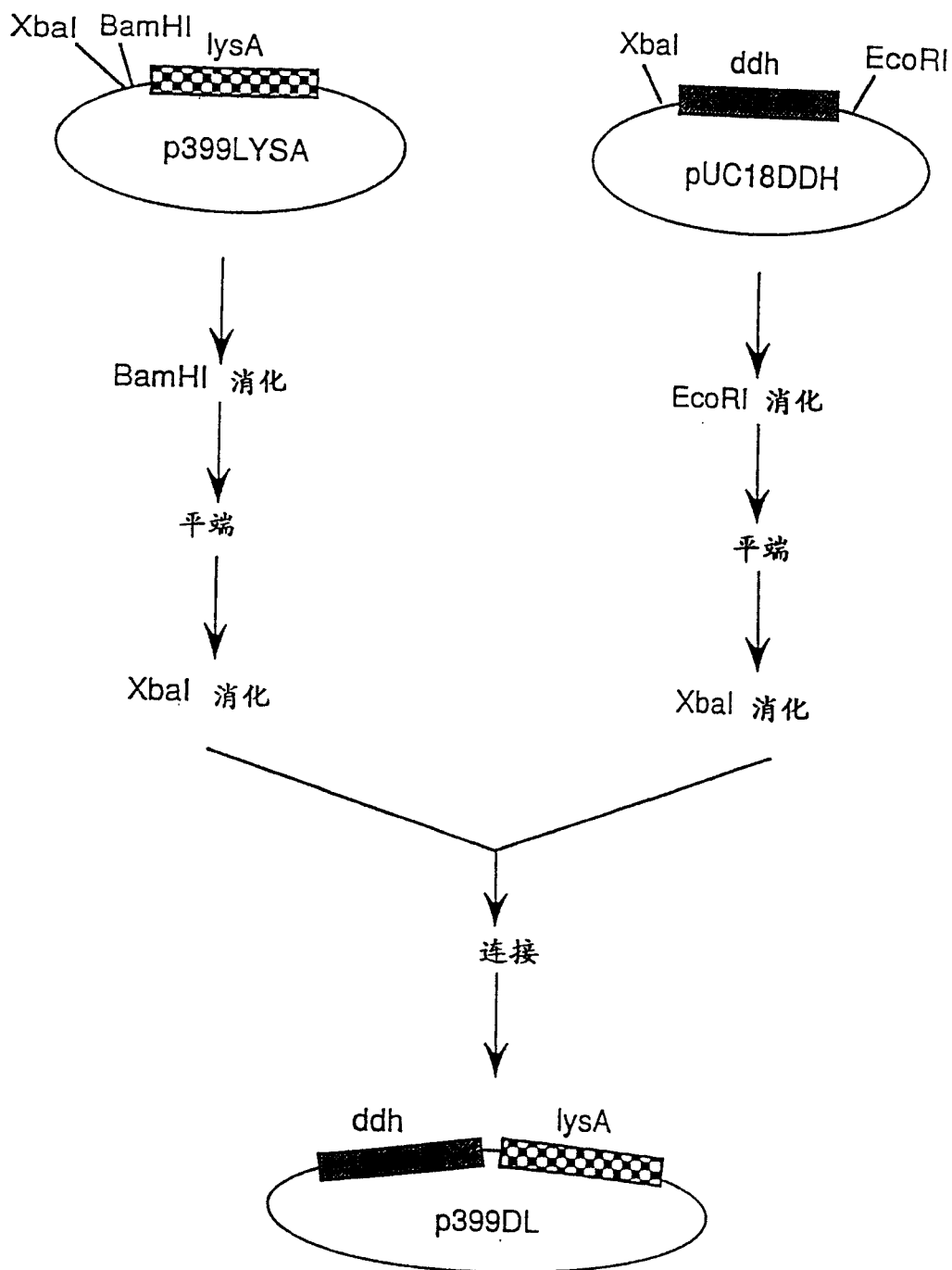


图 5

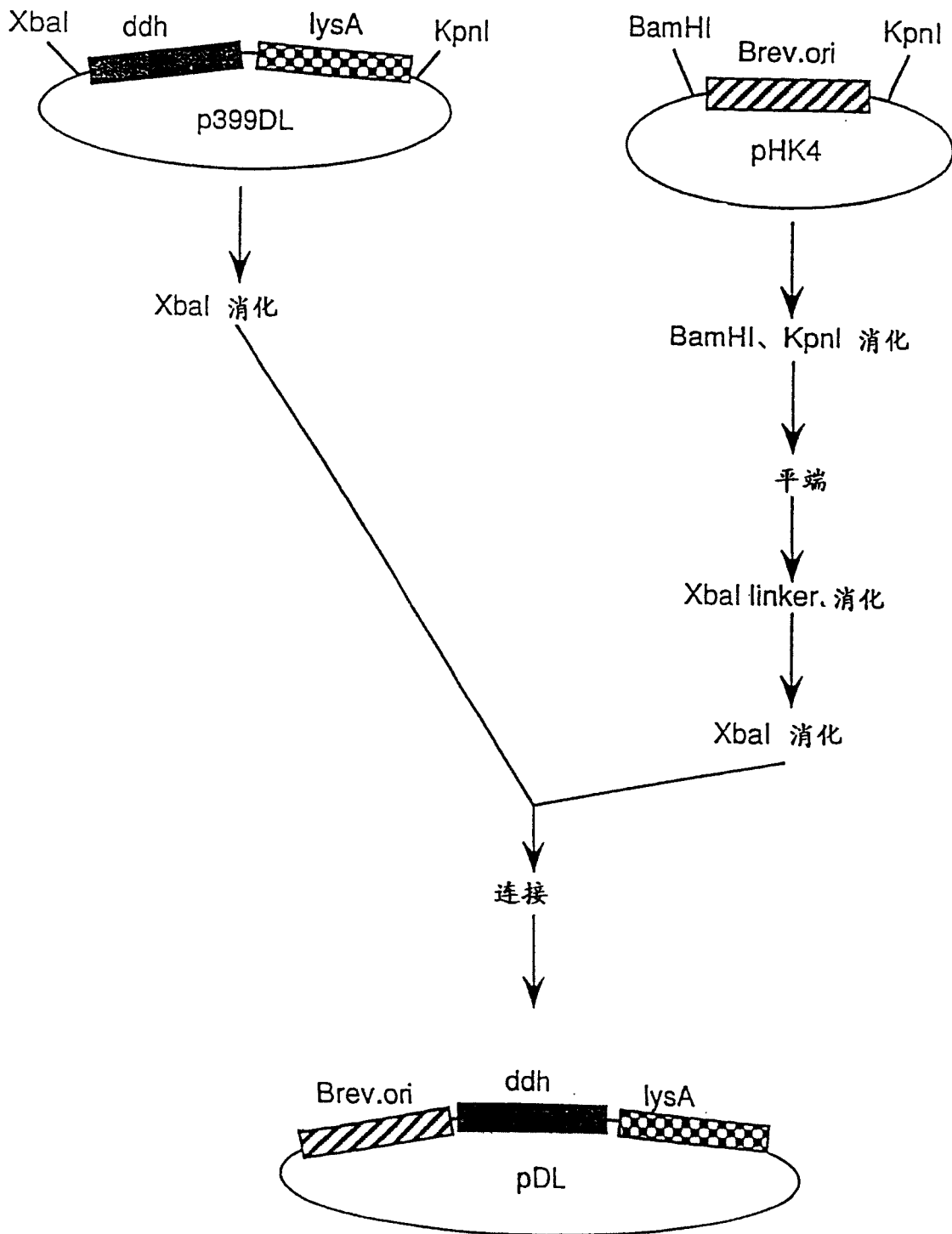


图 6

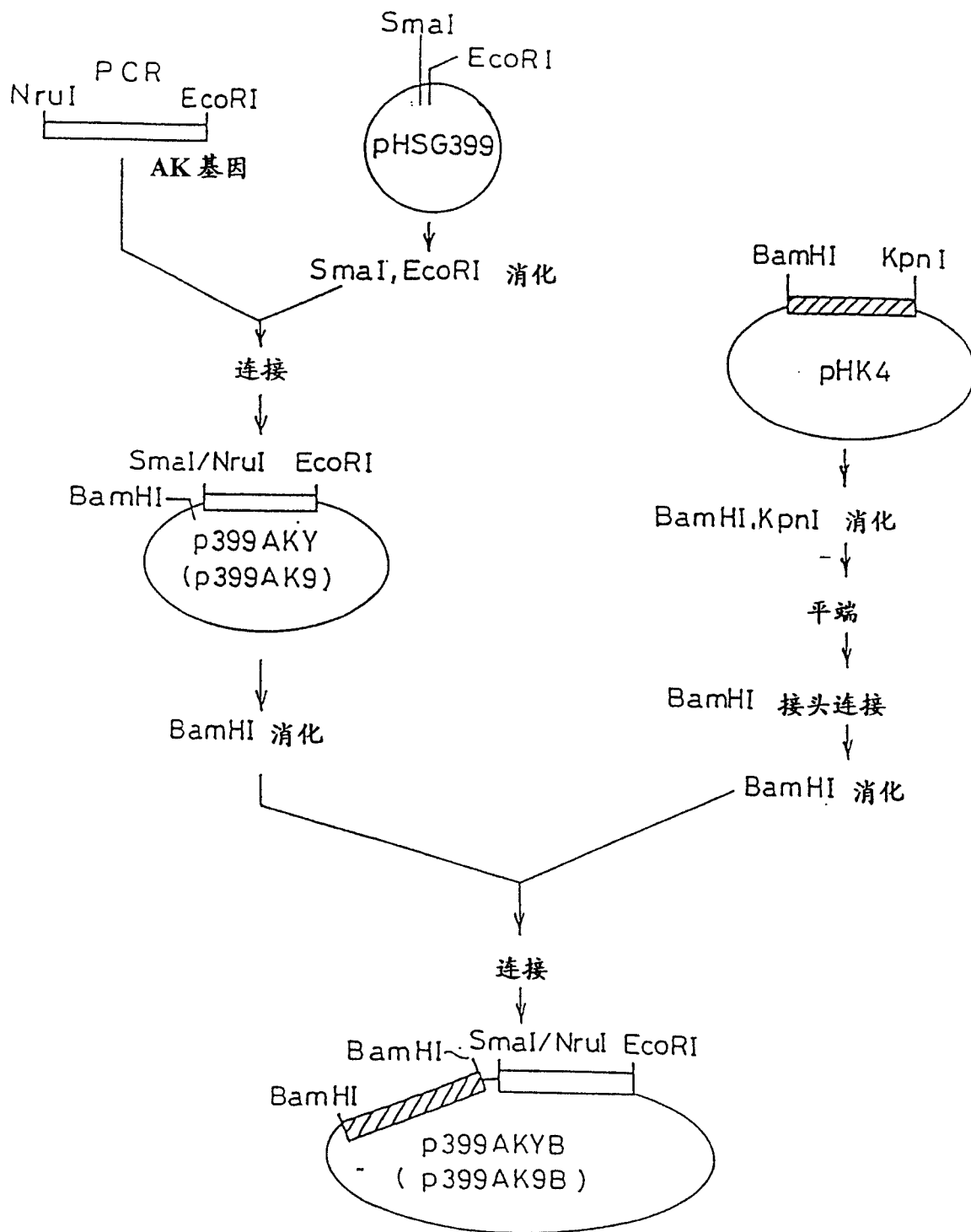


图 7

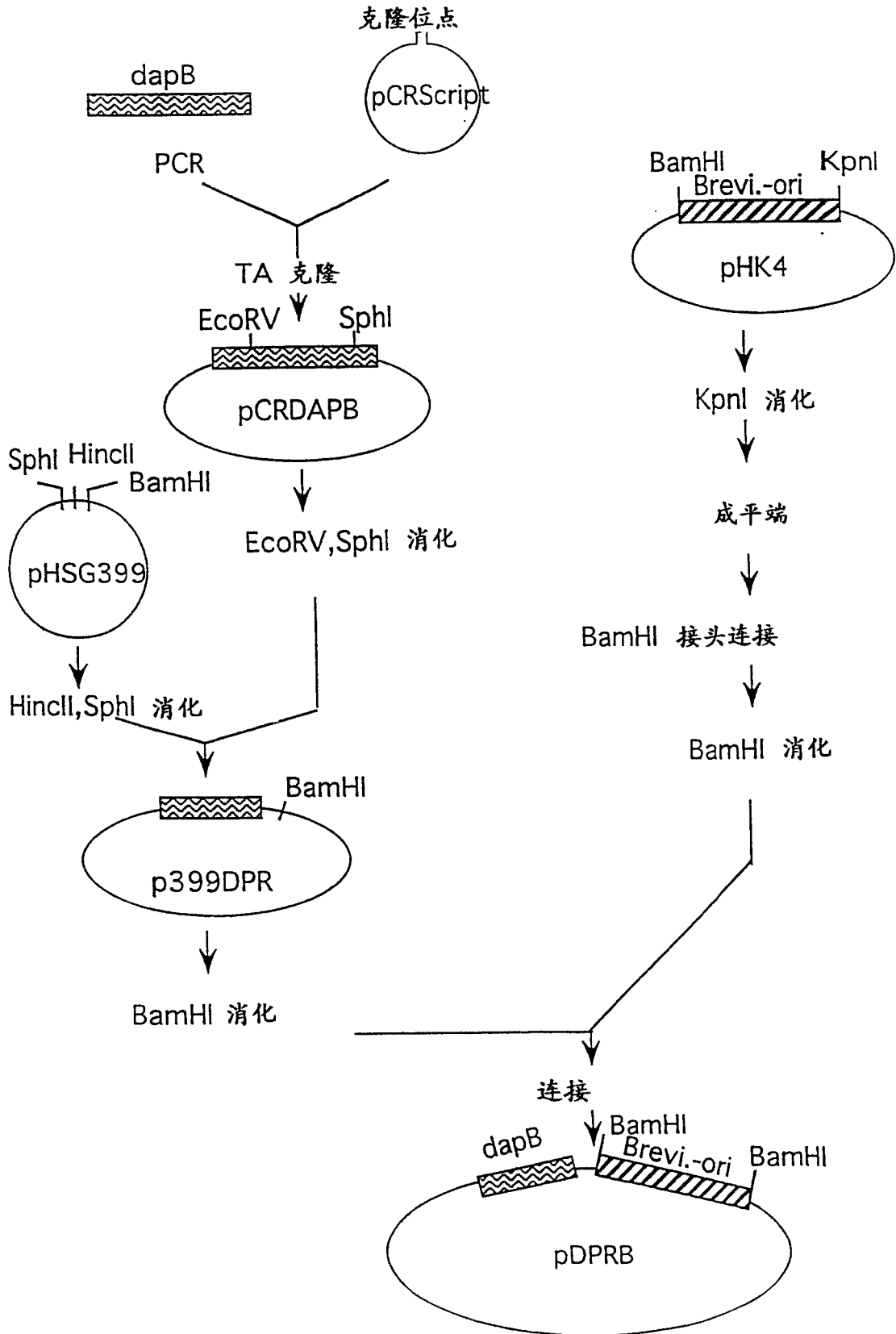


图 8

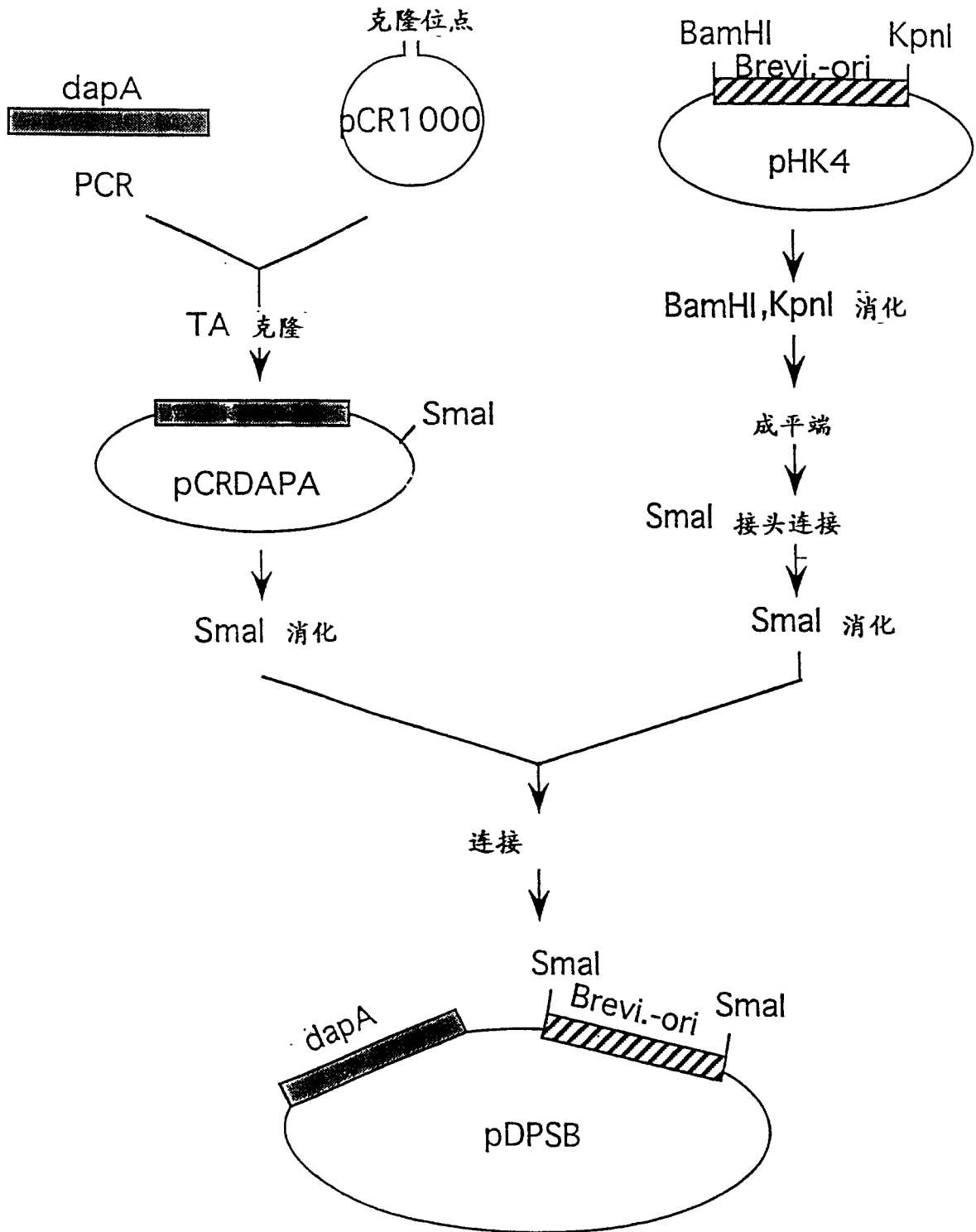


图 9

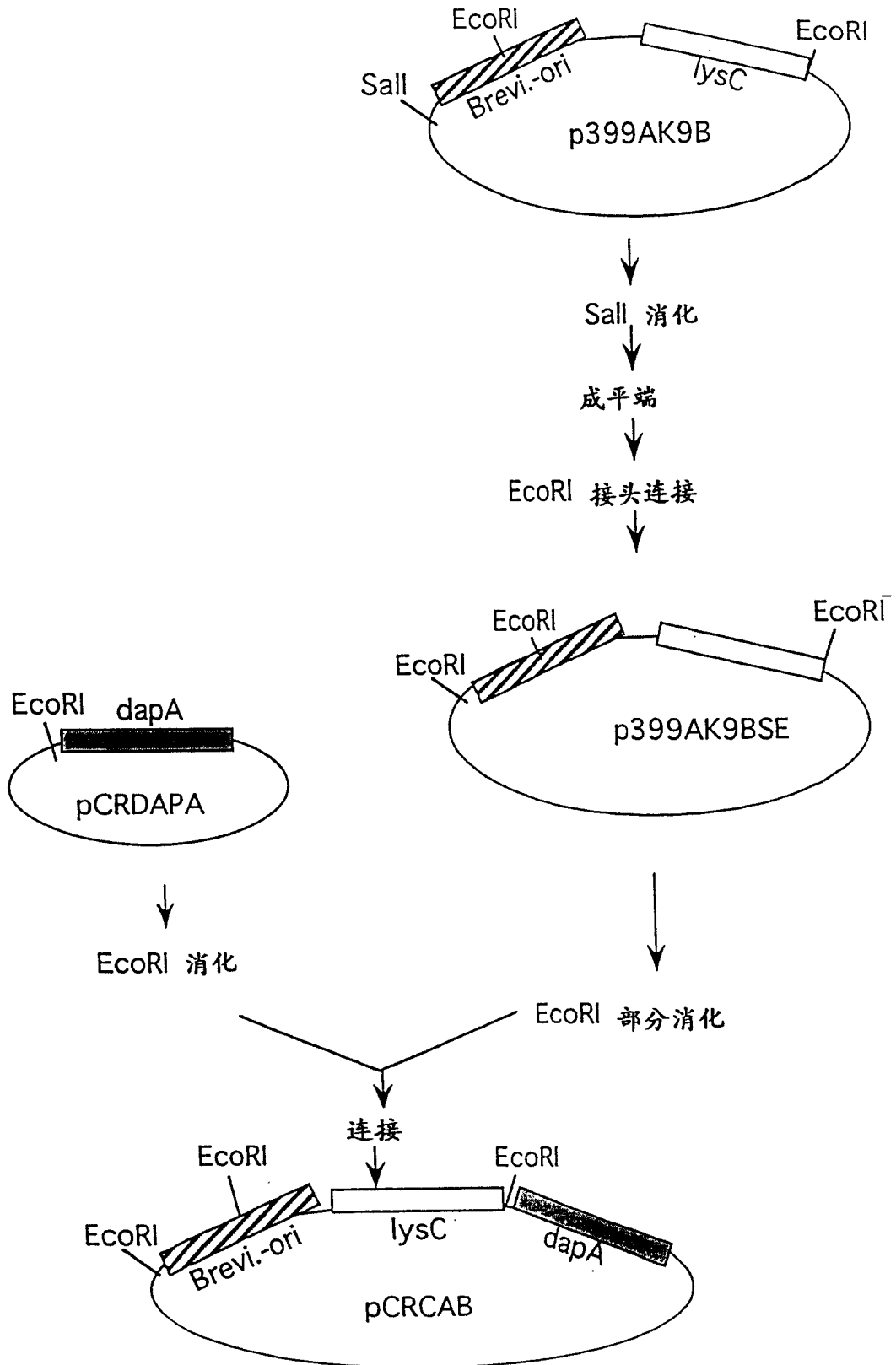


图 10

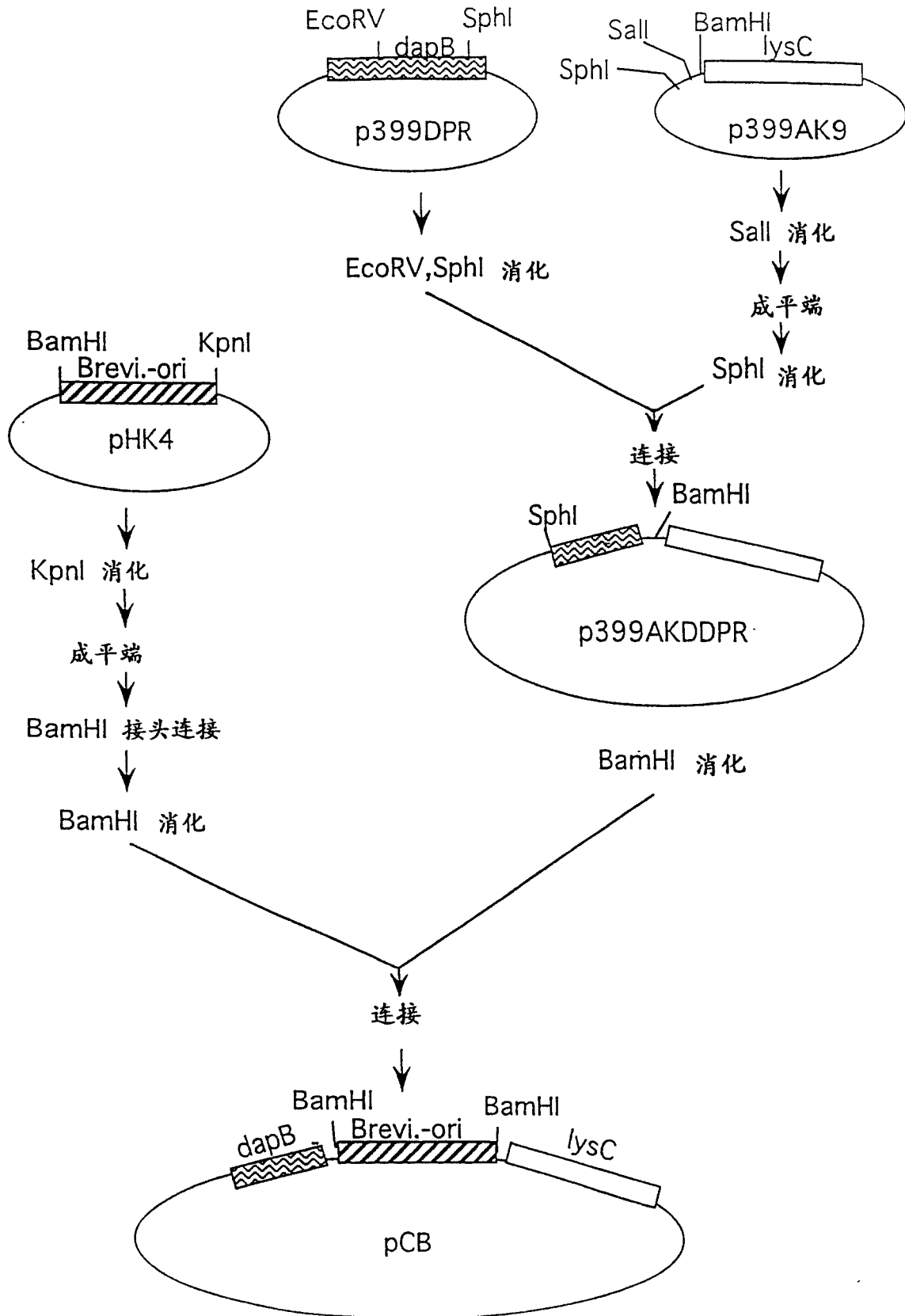


图 11

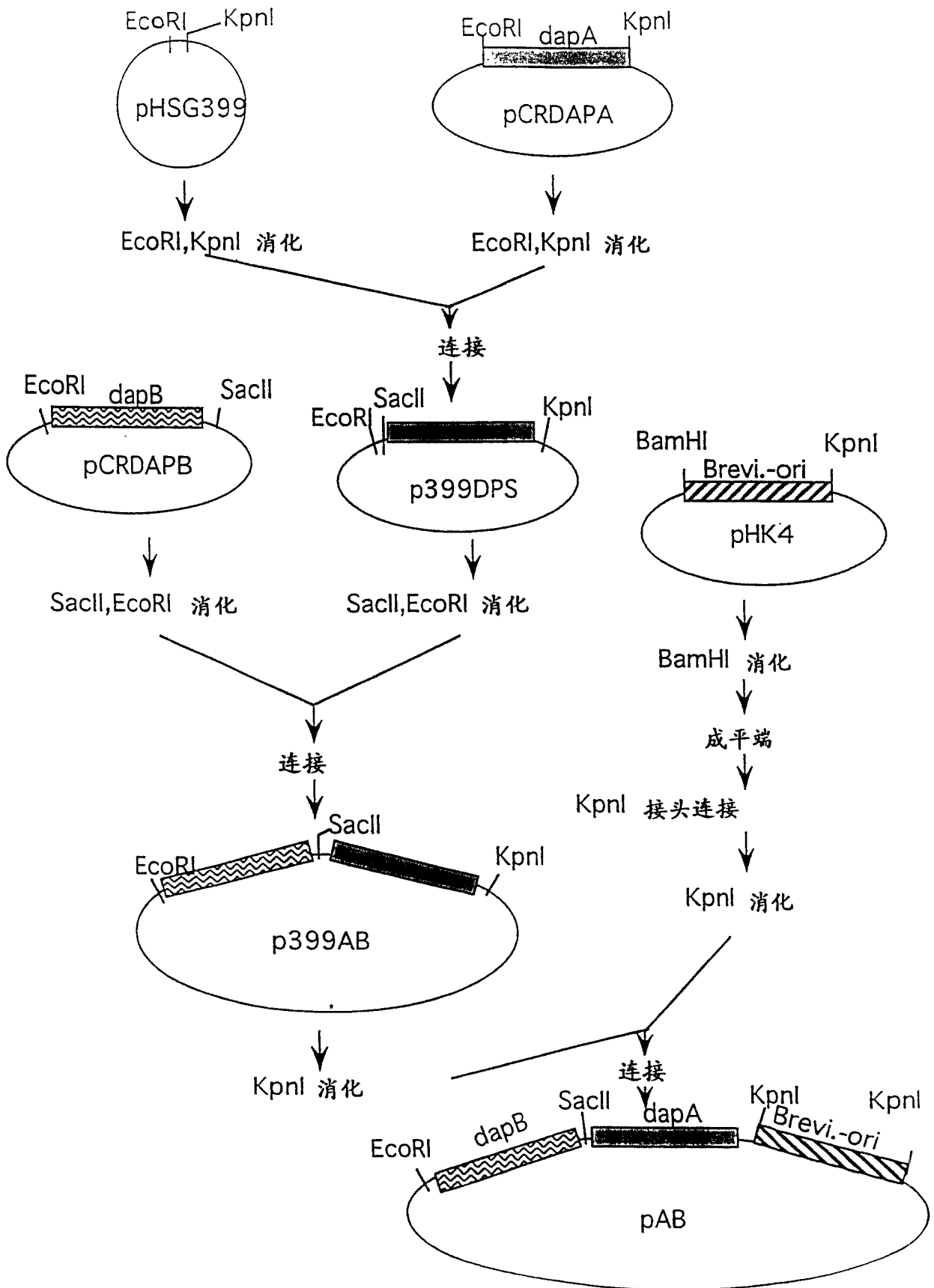


图 12

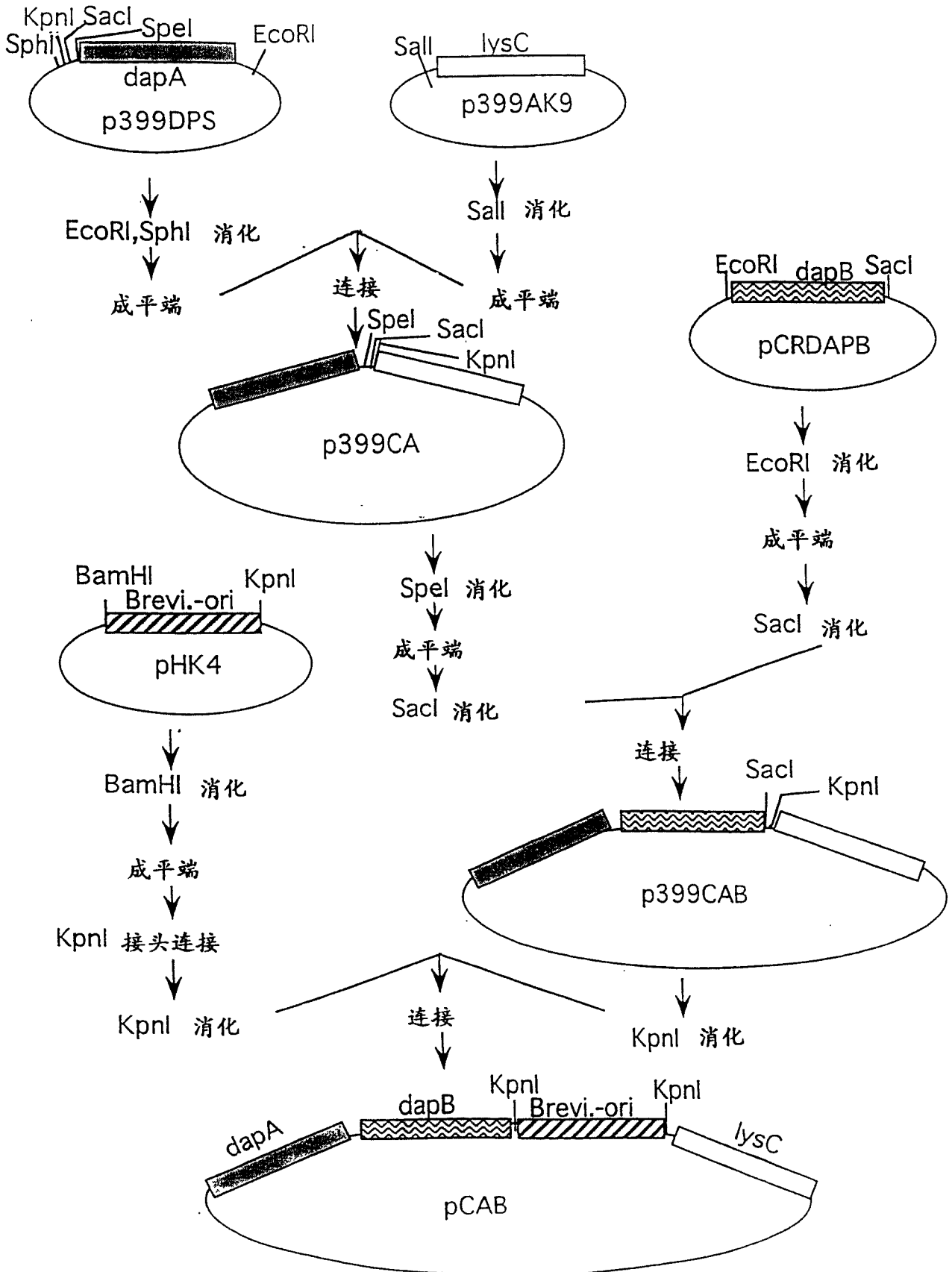


图 13

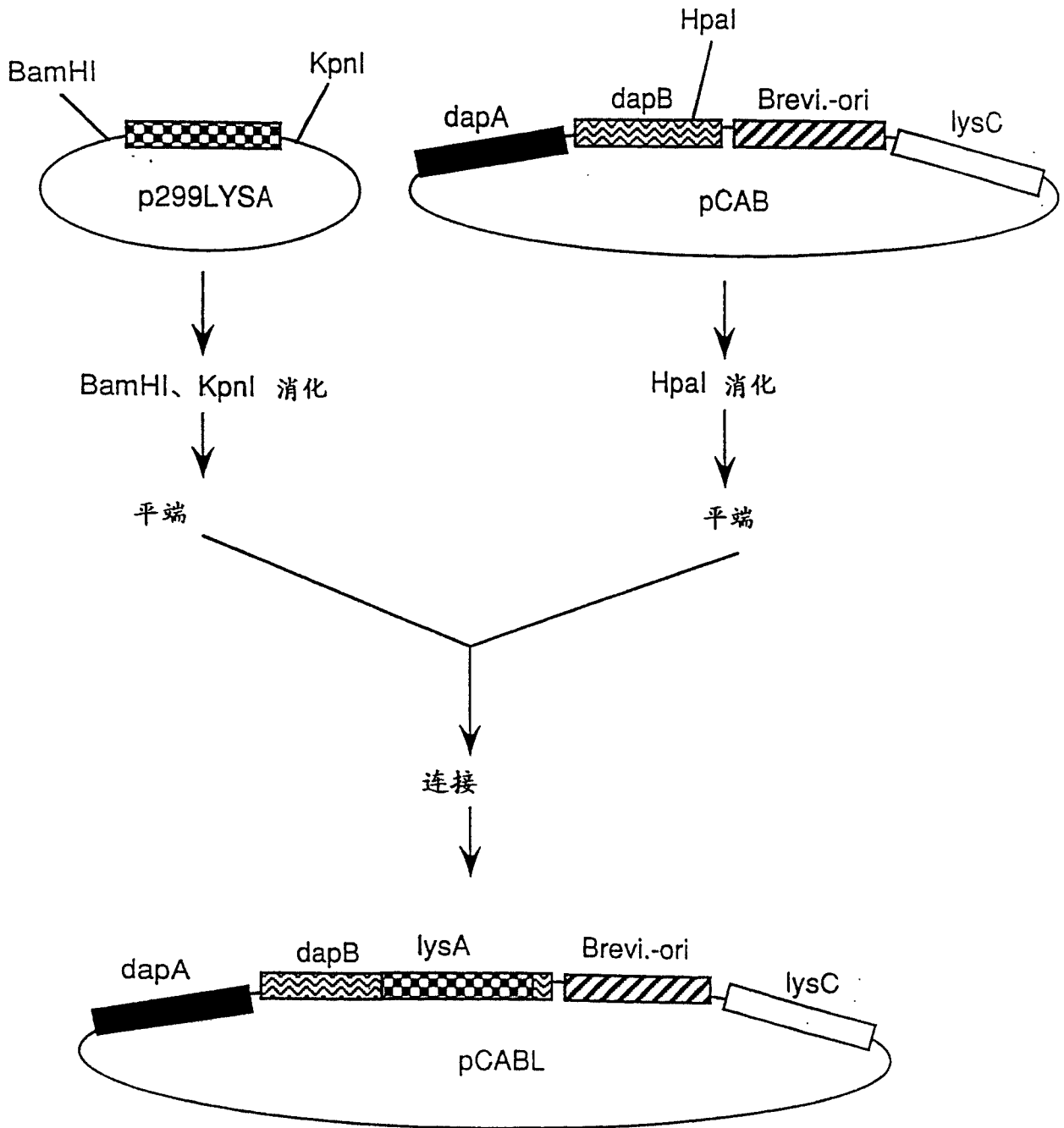


图 14

