



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105368764 B

(45)授权公告日 2019.03.12

(21)申请号 201510649452.7

(22)申请日 2008.12.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105368764 A

(43)申请公布日 2016.03.02

(30)优先权数据

61/013,574 2007.12.13 US

(62)分案原申请数据

200880126504.0 2008.12.15

(73)专利权人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 固特异轮胎和橡胶公司

(72)发明人 M·塞尔温 G·M·怀特德

G·K·肖塔尼 F·瓦耳

K·J·桑福德 J·C·麦考利夫

F·J·费赫尔 A·S·普哈拉

A·米亚斯尼科夫 R·J·拉杜卡

M·米勒 C·佩雷斯 Z·贝克

A·尼尔森

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 柴云峰 黄草生

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12P 5/02(2006.01)

(56)对比文件

US 7183089 B2, 2007.02.27,

WO 98/02550 A2, 1998.01.22,

EP 1229122 A2, 2002.08.07,

Thomas D. Sharkey et al.. "Evolution of the Isoprene Biosynthetic Pathway". 《Plant Physiology》. 2005, 第137卷第700-712页.

Barbara Miller et al.. "First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in Escherichia coli". 《Planta》. 2001, 第213卷第483-487页.

审查员 樊艳爽

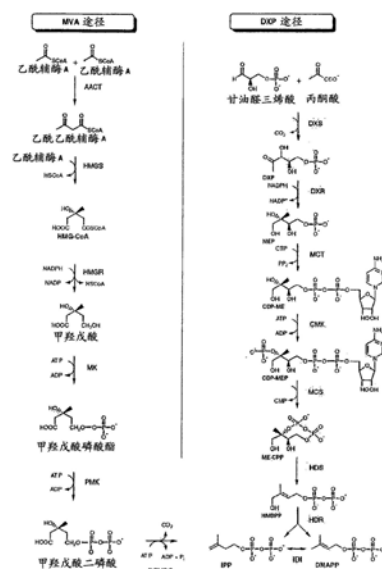
权利要求书2页 说明书114页 附图134页

(54)发明名称

用于生产异戊二烯的组合物和方法

(57)摘要

本发明描述了从培养的细胞生产异戊二烯的方法。本发明也提供了包含这些培养的细胞的组合物。



1. 一种生产异戊二烯的方法,该方法包括

(a) 在适于生产异戊二烯的培养条件下培养重组细菌或真菌细胞,其中所述细胞包含一种或多种核酸,所述核酸编码

(i) 异戊二烯合酶多肽,其中所述异戊二烯合酶多肽由异源核酸编码,

(ii) 异戊二烯二磷酸 $\delta$ 异构酶 (IDI) 多肽,和

(iii) (A) 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合酶 (DXS) 多肽,和/或

(B) 甲羟戊酸 (MVA) 途径多肽,所述甲羟戊酸途径多肽选自乙酰-CoA乙酰转移酶 (AA-CoA硫解酶)、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA合酶 (HMG-CoA合酶)、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶 (HMG-CoA还原酶)、甲羟戊酸激酶 (MVK)、磷酸甲羟戊酸激酶 (PMK) 和二磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (MVD) 多肽,

其中所述细胞

(iv) 产生大于400纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 的异戊二烯;

(v) 将细胞从细胞培养基中消耗的碳中大于0.002摩尔%的碳转化成异戊二烯;

(vi) 具有大于0.1mg/L<sub>培养液</sub>/hr的异戊二烯平均体积生产力;或

(vii) 其中细胞产生至少0.0037克异戊二烯/克干细胞质量 ( $g_{dcm}$ ), 和 (b) 生产异戊二烯。

2. 权利要求1的方法,其中所述细胞产生至少500、600、700、800、900、1000、1250、1500、1750、2000、2500、3000、4000、5000、10000或12500纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 的异戊二烯。

3. 权利要求1的方法,其中所述细胞产生400纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 到 $2.0 \times 10^5$ 纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 的异戊二烯。

4. 权利要求1的方法,其中所述异戊二烯合酶多肽是植物异戊二烯合酶多肽。

5. 权利要求4的方法,其中所述植物异戊二烯合酶多肽是杨属 (Populus) 异戊二烯合酶多肽。

6. 权利要求4的方法,其中所述异戊二烯合酶多肽是葛属 (Pueraria) 异戊二烯合酶多肽。

7. 权利要求1的方法,其中编码 (ii) 的 IDI 多肽的核酸是编码 IDI 多肽的异源核酸。

8. 权利要求7的方法,其中所述 IDI 多肽是酵母 IDI 多肽。

9. 权利要求1的方法,其中编码 (ii) 的 IDI 多肽的核酸是编码 IDI 多肽的内源核酸的拷贝。

10. 权利要求1的方法,其中编码 (iii) 的 DXS 多肽的核酸是编码 DXS 多肽的异源核酸。

11. 权利要求1的方法,其中编码 (iii) 的 DXS 多肽的核酸是编码 DXS 多肽的内源核酸的拷贝。

12. 权利要求1的方法,其包含编码MVA途径多肽的一种或多种异源核酸,所述MVA途径多肽选自乙酰-CoA乙酰转移酶 (AA-CoA硫解酶)、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA合酶 (HMG-CoA合酶)、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶 (HMG-CoA还原酶)、甲羟戊酸激酶 (MVK)、磷酸甲羟戊酸激酶 (PMK) 和二磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (MVD) 多肽。

13. 权利要求1的方法,其中编码 (i)、(ii)、或 (iii) 任一种的多肽的一种或多种核酸的至少一种过表达。

14. 权利要求13的方法,其中所述过表达的核酸被克隆到多拷贝质粒中。



15. 权利要求13的方法,其中所述过表达的核酸被置于诱导型启动子或组成型启动子下。

16. 权利要求1的方法,其中所述细胞是革兰氏阳性细菌细胞或革兰氏阴性细菌细胞。

17. 权利要求1的方法,其中所述细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱性芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝固芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、浅青紫链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌和假单胞菌细胞。

18. 权利要求17的方法,其中所述假单胞菌细胞是产碱假单胞菌细胞。

19. 权利要求1的方法,其中所述细胞是真菌细胞。

20. 权利要求19的方法,其中所述真菌细胞是曲霉属、酵母或木霉属细胞。

21. 权利要求20的方法,其中所述酵母细胞是耶氏酵母属细胞。

22. 权利要求20的方法,其中所述酵母细胞是酵母属 (*Saccharomyces* sp.)、裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces* sp.)、毕氏酵母 (*Pichia* sp.) 或假丝酵母 (*Candida* sp.) 细胞。

23. 权利要求19的方法,其中所述真菌细胞选自米曲霉、黑曲霉、酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、里氏木霉、特异腐质霉、疏毛腐质霉、灰色腐质霉、*C. iucknowense*、酱油曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、棘孢曲霉、泡盛曲霉、粉红镰孢、赤禾镰孢、*F. cerealis*、*F. venenatum*、粗糙脉孢菌、米黑毛霉、绿色木霉、尖镰孢和腐皮镰孢细胞。

24. 权利要求1的方法,其中所述编码(i)、(ii)、或(iii)的多肽的一种或多种核酸的至少一种在载体上。

25. 权利要求1的方法,其中所述编码(i)、(ii)、或(iii)的多肽的一种或多种核酸的至少一种整合到细胞的染色体中。

26. 权利要求1的方法,其中所述细胞包含一种或多种核酸,所述核酸编码:

(iii) (A) DXS多肽和

(B) MVA途径多肽,所述MVA途径多肽选自乙酰-CoA乙酰转移酶(AA-CoA硫解酶)、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA合酶(HMG-CoA合酶)、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶(HMG-CoA还原酶)、甲羟戊酸激酶(MVK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)和二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD)多肽。

27. 权利要求1-26任一项的方法,其中所述方法还包括:

(c) 回收所述异戊二烯。

## 用于生产异戊二烯的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2008年12月15日、发明名称为“用于生产异戊二烯的组合物和方法”的中国专利申请200880126504.0 (国际申请号PCT/US2008/086869) 的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2007年12月13日递交的美国临时专利申请号61/013,574的优先权。该申请的内容在此通过整体引用作为参考。

### 发明领域

[0004] 本发明大体涉及从培养细胞的胞生产异戊二烯的方法以及包括这些培养细胞的组合物。

[0005] 发明背景

[0006] 异戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)是多种合成聚合物,最典型为合成橡胶的关键起始材料。异戊二烯是由多种微生物、植物、和动物种类所天然生产的。特别地,已经鉴定出异戊二烯的两种生物合成途径:甲羟戊酸(MVA)途径和非甲羟戊酸(DXP)途径(图19A和19B)。然而,来自天然发生的生物的异戊二烯产量在商业上并不具吸引力。每年从异戊二烯的聚合生产约800,000吨的顺式聚异戊二烯;该聚异戊二烯中大多数被用于轮胎和橡胶工业。异戊二烯也被共聚合以在其他产品如鞋类、机械产品、医药产品、运动商品和胶乳中用作合成高弹体。

[0007] 目前,轮胎和橡胶工业是基于天然和合成橡胶的使用。天然橡胶获自橡胶树或在非洲雨林中发现的植物的乳汁。合成橡胶主要是基于丁二烯聚合物。对于这些聚合物,丁二烯作为乙烯和丙烯生产的副产物而获得。

[0008] 虽然异戊二烯可以通过石油分馏而获得,但是这一物质的纯化是昂贵且耗时的。对C5烃类流的石油裂化只产生约15%的异戊二烯。因此,需要生产异戊二烯的更加经济的方法。特别地,期望在速度、滴定度和纯度方面有足以满足稳健的商业化工艺要求的生产异戊二烯的方法。也期望从廉价的起始材料生产异戊二烯的系统。

[0009] 发明简要说明

[0010] 一方面,本发明表征了生产异戊二烯的培养细胞。在一些实施方式中,本发明提供培养细胞,该培养细胞产生基于异戊二烯的细胞湿重/小时(纳摩尔/g<sub>wcm</sub>/hr)计,大于约400纳摩尔的异戊二烯/克细胞。在一些实施方式中,该细胞具有(i)编码异戊二烯合酶多肽和(ii)有效地连接到启动子的异源核酸。在一些实施方式中,该细胞在包括碳源的培养基中培养,该碳源例如但不限于碳水化合物(例如木糖或葡萄糖)、乙酸盐/酯、丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源(例如水解的生物量碳源)、多肽(例如微生物或植物蛋白或肽)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分或前述两种或更多种的任一组合。

[0011] 在一些实施方式中,本发明提供具有异戊二烯的平均体积生产力大于约0.1mg/L<sub>培养液</sub>/hr的培养细胞。在一些实施方式中,本发明提供具有异戊二烯的峰值体积生产力大于约0.5mg/L<sub>培养液</sub>/hr的培养细胞。在一些实施方式中,该细胞具有(i)编码异戊二烯合酶多肽

和(ii)有效地连接到启动子的异源核酸。在一些实施方式中,该细胞在包括碳源的培养基中培养,该碳源例如但不限于碳水化合物(例如,木糖或葡萄糖)、乙酸盐/酯、丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源(例如水解的生物量碳源)、多肽(例如微生物或植物蛋白或肽)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分或前述两种或更多种的任一组合。

[0012] 在一些实施方式中,本发明提供将细胞培养基中大于约0.002%的碳转化成异戊二烯的培养细胞。在一些实施方式中,该细胞具有(i)编码异戊二烯合酶多肽和(ii)有效地连接到启动子的异源核酸。在一些实施方式中,该细胞在包括碳源的培养基中培养,该碳源例如但不限于碳水化合物(例如,木糖或葡萄糖)、乙酸盐/酯、丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源(例如水解的生物量碳源)、多肽(例如微生物或植物蛋白或肽)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分或前述两种或更多种的任一组合。

[0013] 在一些实施方式中,本发明提供包括编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸的培养细胞。在一些实施方式中,该细胞具有(i)编码异戊二烯合酶多肽和(ii)有效地连接到启动子的异源核酸。在一些实施方式中,该细胞在包括碳源的培养基中培养,该碳源例如但不限于碳水化合物(例如,木糖或葡萄糖)、乙酸盐/酯、丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源(例如水解的生物量碳源)、多肽(例如微生物或植物蛋白或肽)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分或前述两种或更多种的任一组合。

[0014] 在一方面,本发明表征了生产异戊二烯的方法,例如使用在此所述的任何细胞生产异戊二烯的方法。在一些实施方式中,该方法包括在足以生产大于约400纳摩尔/g<sub>wcm</sub>/hr的异戊二烯的条件下,培养细胞。在一些实施方式中,该方法也包括回收由该细胞生产的异戊二烯。在一些实施方式中,该方法包括纯化由该细胞生产的异戊二烯。在一些实施方式中,该方法包括使异戊二烯聚合。在一些实施方式中,该细胞具有(i)编码异戊二烯合酶多肽和(ii)有效地连接到启动子的异源核酸。在一些实施方式中,该细胞在包括碳源的培养基中培养,该碳源例如但不限于碳水化合物(例如,木糖或葡萄糖)、乙酸盐/酯、丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源(例如水解的生物量碳源)、多肽(例如微生物或植物蛋白或肽)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分或前述两种或更多种的任一组合。

[0015] 在一方面,本发明表征了生产异戊二烯的方法,例如使用在此所述的任何细胞生产异戊二烯的方法。在一些实施方式中,该方法包括在使得异戊二烯的平均体积生产力大于约0.1mg/L<sub>培养液</sub>/hr的条件下,培养细胞。在一些实施方式中,该方法包括在使得异戊二烯的峰值体积生产力大于约0.5mg/L<sub>培养液</sub>/hr的条件下,培养细胞。在一些实施方式中,该方法也包括回收由该细胞生产的异戊二烯。在一些实施方式中,该方法包括纯化由该细胞生产的异戊二烯。在一些实施方式中,该方法包括使异戊二烯聚合。在一些实施方式中,该细胞具有(i)编码异戊二烯合酶多肽和(ii)有效地连接到启动子的异源核酸。在一些实施方式中,该细胞在包括碳源的培养基中培养,该碳源例如但不限于碳水化合物(例如木糖或葡萄糖)、乙酸盐/酯、丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源(例如水解的生物量碳源)、多肽(例

如微生物或植物蛋白或肽)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分或前述两种或更多种的任一组合。

[0016] 在一些实施方式中,该方法包括在足以将细胞培养基中大于约0.002%的碳转化成异戊二烯的条件下,培养细胞。在一些实施方式中,该方法也包括回收由该细胞生产的异戊二烯。在一些实施方式中,该方法包括纯化由该细胞生产的异戊二烯。在一些实施方式中,该方法包括使异戊二烯聚合。在一些实施方式中,该细胞具有(i)编码异戊二烯合酶多肽和(ii)有效地连接到启动子的异源核酸。在一些实施方式中,该细胞在包括碳源的培养基中培养,该碳源例如但不限于碳水化合物(例如,木糖或葡萄糖)、乙酸盐/酯、丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源(例如水解的生物量碳源)、多肽(例如微生物或植物蛋白或肽)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分或前述两种或更多种的任一组合。

[0017] 在本发明任何方面的一些实施方式中,培养细胞以大于或约400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、12,500、20,000、30,000、40,000、50,000、75,000、100,000、125,000、150,000、188,000,或更多纳摩尔/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$ 的异戊二烯来生产异戊二烯。在一些实施方式中,培养细胞具有异戊二烯的平均体积生产力为大于或约0.1、1.0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500,或更多mg的异戊二烯/ $\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr}$  (mg/ $\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr}$ ,其中培养液的体积包括细胞和细胞培养基的体积)。在一些实施方式中,培养细胞具有异戊二烯的峰值体积生产力高于或约0.5、1.0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500、3,750、4,000、4,250、4,500、4,750、5,000、5,250、5,500、5,750、6,000、6,250、6,500、6,750、7,000、7,250、7,500、7,750、8,000、8,250、8,500、8,750、9,000、9,250、9,500、9,750、10,000、12,500、15,000,或更多mg的异戊二烯/ $\text{L}$ 的培养液/ $\text{hr}$  (mg/ $\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr}$ ,其中培养液的体积包括细胞和细胞培养基的体积)。在本发明任何方面的一些实施方式中,培养细胞将在细胞培养基中以大于或约0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.12、0.14、0.16、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、2.0、2.2、2.4、2.6、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0、15.0、16.0、17.0、18.0、19.0、20.0、21.0、22.0、23.0、23.2、23.4、23.6、23.8、24.0、25.0、30.0、31.0、32.0、33.0、35.0、37.5、40.0、45.0、47.5、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0、90.0摩尔%,或更多的碳转化成异戊二烯。在本发明任何方面的一些实施方式中,培养细胞以基于细胞湿重/ $\text{hr}$  (ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ )计,大于或约1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、100,000,或更多ng的异戊二烯/克细胞来生产异戊二烯。在本发明任何方面的一些实施方式中,培养细胞以大于或约1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000,或更多mg的异戊二烯/ $\text{L}_{\text{培养液}}$  (mg/ $\text{L}_{\text{培养液}}$ ,其中培养液的体积包括细胞和细胞培养基的体积)来生产累积滴定度(总量)的异戊二烯。在此公开了其

他示例性的异戊二烯生产速率和异戊二烯生产总量。

[0018] 在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞还包括编码IDI多肽的异源核酸。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞还包括编码IDI多肽的内源核酸拷贝的插入。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞还包括编码DXS多肽的异源核酸。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞还包括编码DXS多肽的内源核酸拷贝的插入。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞还包括编码IDI多肽和DXS多肽的一种或多种核酸。在本发明任何方面的一些实施方式中,一种核酸编码异戊二烯合酶多肽、IDI多肽和DXS多肽。在本发明任何方面的一些实施方式中,一种载体编码异戊二烯合酶多肽、IDI多肽和DXS多肽。在本发明一些实施方式中,载体包括选择标记,如抗生素抗性核酸。

[0019] 在本发明任何方面的一些实施方式中,异源异戊二烯合酶核酸有效连接T7启动子,例如在中或高拷贝质粒中含有的T7启动子。在本发明任何方面的一些实施方式中,异源异戊二烯合酶核酸有效连接Trc启动子,例如在中或高拷贝质粒中含有的Trc启动子。在本发明任何方面的一些实施方式中,异源异戊二烯合酶核酸有效连接Lac启动子,例如在低拷贝质粒中含有的Lac启动子。在本发明任何方面的一些实施方式中,异源异戊二烯合酶核酸有效连接内源启动子,例如内源性碱性丝氨酸蛋白酶启动子。在一些实施方式中,异源异戊二烯合酶核酸整合到不带选择性标记的细胞的染色体中。

[0020] 在本发明任何方面的一些实施方式中,至少一部分细胞在连续培养(如未稀释的连续培养)中维持异源异戊二烯合酶核酸至少或约5、10、20、40、50、60、65或更多的细胞分裂。在本发明任何方面的一些实施方式中,包括异戊二烯合酶、IDI或DXS核酸的核酸也包括选择性标记,例如抗生素抗性核酸。

[0021] 在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞还包括编码MVA途径多肽(例如来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisi*)、马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)、或粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的MVA途径多肽)的异源核酸。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞还包括编码MVA途径多肽(例如来自酿酒酵母、马氏甲烷八叠球菌、或粪肠球菌的MVA途径多肽)的内源核酸拷贝的插入。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞包括异戊二烯合酶、DXS和MVA途径核酸。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞包括异戊二烯合酶核酸、DXS核酸、IDI核酸和MVA途径核酸(除了IDI核酸以外)。

[0022] 在本发明任何方面的一些实施方式中,异戊二烯合酶多肽是天然发生的多肽,其来自植物如葛属(*Pueraria*) (例如,葛麻姆(*Pueraria montana*))、或杨(*Populus*) (如 *Populus tremuloides*, 银白杨(*P. alba*), 黑杨(*Populus nigra*), *Populus trichocarpa*, 或银白杨欧洲山杨的杂交品种)。

[0023] 在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞是细菌细胞,如革兰氏阳性细菌细胞(例如芽孢杆菌细胞如枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)细胞或链霉菌(*Streptomyces*)细胞如浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*)、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、白色链霉菌(*Streptomyces albus*)、或灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)细胞)。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞是革兰氏阴性细菌细胞(例如埃希氏菌(*Escherichia*)细胞如大肠杆菌细胞或泛菌(*Pantoea*)细胞如柠檬泛菌(*Pantoea citrea*)细胞)。在一些实施方式中,大肠杆菌细胞是大肠杆菌FadR *atoC*突变细胞。在一些实施方式中,大肠杆菌细胞表达(例如组成型表达) *ybhE* (也称作

pgl)。在本发明任何方面的一些实施方式中,细胞是真菌细胞如丝状真菌细胞(例如木霉属(*Trichoderma*)细胞如里氏木霉(*Trichoderma reesei*)细胞或曲霉(*Aspergillus*)细胞如米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)或酵母细胞(如耶氏酵母属(*Yarrowia*)细胞如解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)细胞)。

[0024] 在本发明任何方面的一些实施方式中,微生物多肽碳源包括来自酵母或细菌的一或多种多肽。在本发明任何方面的一些实施方式中,植物多肽碳源包括来自大豆、玉米、油菜、麻风树、棕榈树、花生、向日葵、椰子、芥菜、油菜籽、棉籽、棕榈仁、橄榄、红花、芝麻、或亚麻籽的一或多种多肽。

[0025] 在一方面,本发明提供包含聚异戊二烯的轮胎。在一些实施方式中,该聚异戊二烯是由(i)聚合来自在此所述的任一组合物或方法的异戊二烯或(ii)聚合由在此所述的任一组合物或方法回收的异戊二烯所生产的。在一些实施方式中,聚异戊二烯包含顺式-1,4-聚异戊二烯。

[0026] 在一方面,本发明表征了由任何的本发明组合物或方法所生产的产物(例如轮胎)。

[0027] 应理解的是,可组合在此所述的多种实施方式的一个、多个或全部特性以形成本发明的其它实施方式。本发明的这些以及其他方面对于本领域技术人员是显而易见的。

[0028] 附图简要说明

[0029] 图1是用于在大肠杆菌中表达而密码子优化的野葛异戊二烯合酶基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。atg起始密码子为斜体,终止密码子为粗体而添加的PstI位点有下划线。

[0030] 图2是pTrcKudzu的图谱。

[0031] 图3是pTrcKudzu的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。RBS有下划线,野葛异戊二烯合酶起始密码子为粗体大写字母而终止密码子为粗体、大写、斜体字母。载体骨架是pTrcHis2B。

[0032] 图4是pETNHisKudzu的图谱。

[0033] 图5是pETNHisKudzu的核苷酸序列(SEQ ID NO:5)。

[0034] 图6是pCL-lac-Kudzu的图谱。

[0035] 图7是pCL-lac-Kudzu的核苷酸序列(SEQ ID NO:7)。

[0036] 图8A是示出在没有载体的大肠杆菌BL21细胞中异戊二烯生产的图。

[0037] 图8B是示出在具有pCL-lac-Kudzu的大肠杆菌BL21细胞中异戊二烯生产的图。

[0038] 图8C是示出在具有pTrcKudzu的大肠杆菌BL21细胞中异戊二烯生产的图。

[0039] 图8D是示出在具有pETN-HisKudzu的大肠杆菌BL21细胞中异戊二烯生产的图。

[0040] 图9A是示出在14升补料分批发酵中大肠杆菌BL21/pTrcKudzu随发酵进程的OD的图。

[0041] 图9B是示出在14升补料分批发酵中大肠杆菌BL21/pTrcKudzu随发酵进程的异戊二烯生产的图。

[0042] 图10A是示出在柠檬泛菌中的异戊二烯生产的图。对照细胞没有重组野葛异戊二烯合酶。灰色菱形表示异戊二烯合成,黑色方块表示OD<sub>600</sub>。

[0043] 图10B是示出在表达pCL-lac Kudzu的柠檬泛菌中异戊二烯的生产的图。灰色菱形表示异戊二烯合成,黑色方块表示OD<sub>600</sub>。

[0044] 图10C是示出在表达pTrcKudzu的柠檬泛菌中的异戊二烯生产的图。灰色菱形表示

异戊二烯合成,黑色方块表示OD<sub>600</sub>。

[0045] 图11是示出在表达重组异戊二烯合酶的枯草杆菌中的异戊二烯生产的图。BG3594comK是没有质粒的枯草杆菌菌株(天然异戊二烯生产)。CF443-BG3594comK是具有pBSKudzu的枯草杆菌菌株(重组异戊二烯生产)。y-轴上的IS表示异戊二烯。

[0046] 图12是pBS Kudzu#2的核苷酸序列(SEQ ID NO:57)。

[0047] 图13是用于在耶氏酵母中表达而密码子优化的野葛异戊二烯合酶的核苷酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0048] 图14是包含用于在耶氏酵母中表达而密码子优化的野葛异戊二烯合酶基因的pTrex3g图谱。

[0049] 图15是载体pSPZ1(MAP29Spb)的核苷酸序列(SEQ ID NO:11)。

[0050] 图16是用于在耶氏酵母中表达而密码子优化的合成的野葛(葛麻姆)异戊二烯基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:12)。

[0051] 图17是合成的杂交杨(银白杨x欧洲山杨)异戊二烯合酶基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:13)。ATG起始密码子为粗体而终止密码子有下划线。

[0052] 图18A示出描绘载体pYLA1、pYL1和pYL2的构建的示意图。

[0053] 图18B示出描绘载体pYLA(POP1)的构建的示意图。

[0054] 图18C示出描绘载体pYLA(KZ1)的构建的示意图。

[0055] 图18D示出描绘载体pYL1(KZ1)的构建的示意图。

[0056] 图18E示出描绘载体pYLI(MAP29)的构建的示意图。

[0057] 图18F示出描绘载体pYLA(MAP29)的构建的示意图。

[0058] 图19A示出异戊二烯的MVA和DXP代谢途径(根据F.Bouvier等人,Progress in Lipid Res.44:357-429,2005)。下面的描述包括对于途径中每种多肽的替代名称以及公开有用于测量所示多肽活性的检测法的参考(这些参考各在此通过整体引用作为参考,特别是对于在MVA和DXP途径中的多肽的多肽活性检测法)。甲羟戊酸途径:AACT;乙酰基-CoA乙酰基转移酶,MvaE,EC 2.3.1.9.Assay:J.Bacteriol.,184:2116-2122,2002;HMGS;羟甲基戊二酰基-CoA合成酶,MvaS,EC 2.3.3.10.Assay:I Bacteriol.,184:4065-4070,2002;HMGR;3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶,MvaE,EC 1.1.1.34.Assay:I Bacteriol.,184:2116-2122,2002;MVK;甲羟戊酸激酶,ERG 12,EC 2.7.1.36.Assay:Curr Genet 19:9-14,1991.PMK;磷酸甲羟戊酸激酶,ERG8,EC 2.7.4.2,Assay:Mol Cell Biol.,11:620-631,1991;DPMDC;二磷酸甲羟戊酸脱羧酶,MVD1,BC4.1.1.33.Assay:Biochemistry,33:13355-13362,1994;IDI;异戊烯二磷酸 $\delta$ 异构酶,IDI1,EC 5.3.3.2.Assay:I Biol.Chem.264:19169-19175,1989。DXP途径:DXS;1-脱氧木酮糖-5-磷酸合酶,dxs,BC 2.2.1.7.Assay:PNAS,94:12857-62,1997;DXR;1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶,dxr,BC2.2.1.7.Assay:Eur.I Biochem.269:4446-4457,2002;MCT;4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D赤藓糖醇合酶,IspD,EC 2.7.7.60.Assay:PNAS,97:6451-6456,2000;CMK;4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D赤藓糖醇激酶,IspE,BC 2.7.1.148.Assay:PNAS,97:1062-1067,2000;MCS;2C-甲基-D-赤藓糖醇2,4-环二磷酸合酶,IspF,BC 4.6.1.12.Assay:PNAS,96:11758-11763,1999;HDS;1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-二磷酸合酶,ispG,EC1.17.4.3.Assay:I Org.Chem.,70:9168-9174,2005;HDR;1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-二磷酸还原酶,

IspH, BC 1.17.1.2. Assay: JACS, 126:12847-12855, 2004。

[0059] 图19B说明了经典的和改良的MVA途径。1,乙酰-CoA乙酰基转移酶(AACT);2,HMG-CoA合酶(HMGS);3,HMG-CoA还原酶(HMGR);4,甲羟戊酸激酶(MVK);5,磷酸甲羟戊酸激酶(PMK);6,二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD或DPMDC);7,异戊烯基二磷酸异构酶(IDI);8,磷酸甲羟戊酸脱羧酶(PMDC);9,异戊烯基磷酸激酶(IPK)。经典MVA途径从反应1开始,通过反应5和6至反应7来进行,而改良MVA途径经反应8和9至反应7。结构式中的P和PP分别是磷酸和焦磷酸。这一图取自Koga和Morii, Microbiology and Mol. Biology Reviews, 71:97-120, 2007, 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于改良MVA途径的核酸和多肽。改良MVA途径例如存在于诸如马氏甲烷八叠球菌的一些古生物中。

[0060] 图20示出表示由没有(左)或具有(右)野葛异戊二烯合酶基因的重组解脂耶氏酵母菌株生产的异戊二烯的GC-MS分析结果的图。箭头表示真正的异戊二烯标准的洗脱时间。

[0061] 图21是pTrcKudzu yIDI DXS Kan的图谱。

[0062] 图22是pTrcKudzu yIDI DXS Kan的核苷酸序列(SEQ ID NO:20)。

[0063] 图23A是示出在BL21/pTrcKudzu kan中从葡萄糖生产异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu$ mol) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生产力( $\mu$ g/L顶空或比生产力( $\mu$ g/L顶空/OD)。菱形表示OD<sub>600</sub>,圆圈表示总异戊二烯生产力( $\mu$ g/L)而方块表示异戊二烯的比生产力( $\mu$ g/L/OD)。

[0064] 图23B是示出在BL21/pTrcKudzu yIDI kan中从葡萄糖生产的异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu$ mol) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生产力( $\mu$ g/L顶空或比生产力( $\mu$ g/L顶空/OD)。菱形表示OD<sub>600</sub>,圆圈表示总异戊二烯生产力( $\mu$ g/L)而方块表示异戊二烯的比生产力( $\mu$ g/L/OD)。

[0065] 图23C是示出在BL21/pTrcKudzu DXS kan中从葡萄糖生产的异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu$ mol) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生产力( $\mu$ g/L顶空或比生产力( $\mu$ g/L顶空/OD)。菱形表示OD<sub>600</sub>,圆圈表示总异戊二烯生产力( $\mu$ g/L)而方块表示异戊二烯的比生产力( $\mu$ g/L/OD)。

[0066] 图23D是示出在BL21/pTrcKudzu yIDI DXS kan中从葡萄糖生产的异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu$ mol) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生产力( $\mu$ g/L顶空或比生产力( $\mu$ g/L顶空/OD)。菱形表示OD<sub>600</sub>,圆圈表示总异戊二烯生产力( $\mu$ g/L)而方块表示异戊二烯的比生产力( $\mu$ g/L/OD)。

[0067] 图23E是示出在BL21/pCL PTrcKudzu中从葡萄糖生产异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu$ mol) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生产力( $\mu$ g/L顶空或比生产力( $\mu$ g/L顶空/OD)。菱形表示OD<sub>600</sub>,圆圈表示总异戊二烯生产力( $\mu$ g/L)而方块表示异戊二烯的比生产力( $\mu$ g/L/OD)。

[0068] 图23F是示出在BL21/pCL PTrcKudzu yIDI中从葡萄糖生产异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu$ mol) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生产力( $\mu$ g/L顶空或比生产力( $\mu$ g/L顶空/OD)。菱形表示OD<sub>600</sub>,圆圈表示总异戊二烯生产力( $\mu$ g/L)而方块表示异戊二烯的比生产力( $\mu$ g/L/OD)。

[0069] 图23G是示出在BL21/pCL PTrcKudzu DXS中从葡萄糖生产异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu$ mol) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生



产力 ( $\mu\text{g/L}$ 顶空或比生产力 ( $\mu\text{g/L}$ 顶空/OD)。菱形表示OD<sub>600</sub>, 圆圈表示总异戊二烯生产力 ( $\mu\text{g/L}$ ) 而方块表示异戊二烯的比生产力 ( $\mu\text{g/L/OD}$ )。

[0070] 图23H是示出在BL21/pTrcKudzuIDIDXkan中从葡萄糖生产的异戊二烯的图。时间0是以IPTG (400 $\mu\text{mol}$ ) 诱导的时间。x轴是诱导后的时间;y轴是OD<sub>600</sub>并且y2轴是异戊二烯的总生产力 ( $\mu\text{g/L}$ 顶空或比生产力 ( $\mu\text{g/L}$ 顶空/OD)。黑色菱形表示OD<sub>600</sub>, 黑色三角表示总异戊二烯生产力 ( $\mu\text{g/L}$ ) 而白色方块表示异戊二烯的比生产力 ( $\mu\text{g/L/OD}$ )。

[0071] 图24是pTrcKKDyIkIS kan的图谱。

[0072] 图25是pTrcKKDyIkIS kan的核苷酸序列 (SEQ ID NO:33)。

[0073] 图26是pCL PTrcUpperPathway的图谱。

[0074] 图27是pCL PTrcUpperPathway的核苷酸序列 (SEQ ID NO:46)。

[0075] 图28示出含有下游MVA途径和用于整合到枯草杆菌染色体nprE座位的酵母idi的表达盒的图谱。nprE上游/下游表示来自nprE位点用于整合的各1kb序列。aprE启动子(碱性丝氨酸蛋白酶启动子)表示aprE基因的启动子(-35,-10,+1转录起始位点,RBS)。MVK1表示酵母甲羟戊酸激酶基因。RBS-PMK表示具有起始位点的芽孢杆菌RBS上游的酵母磷酸甲羟戊酸激酶基因。RBS-MPD表示具有起始位点上游的芽孢杆菌RBS的酵母二磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因。RBS-IDI表示具有起始位点上游的芽孢杆菌RBS的酵母idi基因。终止子表示来自解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)的终止子碱性丝氨酸蛋白酶转录终止子。SpecR表示壮观霉素抗性标记。“用于扩增的nprE上游重复”表示用于扩增的上游区域的直接重复。

[0076] 图29是含有下游MVA途径和用于整合到枯草杆菌染色体nprE座位的酵母idi的表达盒的核苷酸序列 (SEQ ID NO:47)。

[0077] 图30是p9796-poplar的图谱。

[0078] 图31是p9796-poplar的核苷酸序列 (SEQ ID NO:48)。

[0079] 图32是pTrcPoplar的图谱。

[0080] 图33是pTrcPoplar的核苷酸序列 (SEQ ID NO:49)。

[0081] 图34是pTrcKudzu yIDI Kan的图谱。

[0082] 图35是pTrcKudzu yIDI Kan的核苷酸序列 (SEQ ID NO:50)。

[0083] 图36是pTrcKudzuDXS Kan的图谱。

[0084] 图37是pTrcKudzuDXS Kan的核苷酸序列 (SEQ ID NO:51)。

[0085] 图38是pCL PTrcKudzu的图谱。

[0086] 图39是pCL PTrcKudzu的核苷酸序列 (SEQ ID NO:52)。

[0087] 图40是pCL PTrcKudzu A3的图谱。

[0088] 图41是pCL PTrcKudzu A3的核苷酸序列 (SEQ ID NO:53)。

[0089] 图42是pCL PTrcKudzu yIDI的图谱。

[0090] 图43是pCL PTrcKudzu yIDI的核苷酸序列 (SEQ ID NO:54)。

[0091] 图44是pCL PTrcKudzu DXS的图谱。

[0092] 图45是pCL PTrcKudzu DXS的核苷酸序列 (SEQ ID NO:55)。

[0093] 图46示出表示从生物质原料生产异戊二烯的图。小图A示出来自玉米秸秆的异戊二烯生产, 小图B示出来自甘蔗渣的异戊二烯生产, 小图C示出来自软木材木浆的异戊二烯生产, 小图D示出来自葡萄糖的异戊二烯生产, 和小图E示出没有添加原料的细胞的异

戊二烯生产。灰色方块表示在接种后的指定时间处,对培养物的OD<sub>600</sub>测量而黑色三角表示在接种后的指定时间的异戊二烯生产。

[0094] 图47A示出表示在没有添加葡萄糖的培养物中由BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 生产的异戊二烯的图。方块表示OD<sub>600</sub>,而三角表示所生产的异戊二烯(μg/ml)。

[0095] 图47B示出表示由BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 从1%葡萄糖原料转化糖生产的异戊二烯的图。方块表示OD<sub>600</sub>,而三角表示所生产的异戊二烯(μg/ml)。

[0096] 图47C示出表示由BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 从1%转化糖原料生产的异戊二烯的图。方块表示OD<sub>600</sub>,而三角表示所生产的异戊二烯(μg/ml)。

[0097] 图47D示出表示由BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 从1%AFEX玉米秸秆原料生产的异戊二烯的图。方块表示OD<sub>600</sub>,而三角表示所生产的异戊二烯(μg/ml)。

[0098] 图48示出表明酵母提取物对异戊二烯生产的影响的图。小图A示出在供给不同量的酵母提取物的发酵罐中光密度的时间进程。小图B示出在供给不同量的酵母提取物的发酵罐中异戊二烯滴定度的时间进程。滴定度定义为每升发酵培养液产生的异戊二烯的量。小图C示出酵母提取物对在生长于补料分批培养物中的大肠杆菌中异戊二烯生产的影响。

[0099] 图49示出表明在500L生物反应器中含有pTrcKudzu和yIDI和DXS质粒的大肠杆菌细胞生产异戊二烯的图。小图A示出在供应葡萄糖和酵母提取物的500-L生物反应器中的光密度的时间进程。小图B示出在小图葡萄糖和酵母提取物的500-L生物反应器中异戊二烯滴定度的时间进程。滴定度定义为每升发酵培养液产生的异戊二烯的量。小图C示出从供应葡萄糖和酵母提取物的500-L生物反应器生产的总异戊二烯的时间进程。

[0100] 图50是pJMupperpathway2的图谱。

[0101] 图51是pJMupperpathway2的核苷酸序列(SEQ ID NO:56)。

[0102] 图52是pBS Kudzu#2的图谱。

[0103] 图53A是示出在14升补料分批发酵中表达重组野葛异戊二烯合酶的芽孢杆菌发酵时间期间的生长。黑色菱形表示没有重组异戊二烯合酶(天然异戊二烯生产)的对照菌株(BG3594comK)而灰色三角表示具有pBSKudzu(重组异戊二烯生产)的芽孢杆菌。

[0104] 图53B是示出在14升补料分批发酵中表达重组野葛异戊二烯合酶的芽孢杆菌发酵时间期间的异戊二烯生产。黑色菱形表示没有重组异戊二烯合酶(天然异戊二烯生产)的对照菌株(BG3594comK)而灰色三角表示具有pBSKudzu(重组异戊二烯生产)的芽孢杆菌。

[0105] 图54是质粒pET24P.alba HGS的图谱。

[0106] 图55A和55B是质粒pET24P.alba HGS的核苷酸序列(SEQ ID NO:87)。

[0107] 图56是示出用于内切核酸酶消化以构建质粒EWL230的限制性位点以及在BspHI和NcoI位点之间的相容性粘性末端的示意图。

[0108] 图57是质粒EWL230的图谱。

[0109] 图58A和58B是质粒EWL230的核苷酸序列(SEQ ID NO:88)。

[0110] 图59是示出用于内切核酸酶消化以构建质粒EWL244的限制性位点以及在NsiI和PstI位点之间的相容性粘性末端的示意图。

[0111] 图60是EWL244的图谱。

[0112] 图61A和61B是质粒EWL244的核苷酸序列(SEQ ID NO:89)。

[0113] 图62是质粒MCM484-487的图谱。

[0114] 图63A-63C是质粒MCM484的核苷酸序列(SEQ ID NO:90)。

[0115] 图64A-64C是质粒MCM485的核苷酸序列(SEQ ID NO:91)。

[0116] 图65A-65C是质粒MCM486的核苷酸序列(SEQ ID NO:92)。

[0117] 图66A-66C是质粒MCM487的核苷酸序列(SEQ ID NO:93)。

[0118] 图67A-67D是表达MVA途径的基因并且在以15-L规模的没有酵母提取物供料的补料分批培养中生长的大肠杆菌菌株(EWL256)的异戊二烯生产图。图67A示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中光密度的时间进程。图67B示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中异戊二烯滴定度的时间进程。滴定度定义为每升发酵培养液产生的异戊二烯的量。图67C示出从供料葡萄糖的15-L生物反应器生产的总异戊二烯的时间进程。图67D示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中的总二氧化碳进化率(TCER)、或代谢活性谱。

[0119] 图68A-68E是表达MVA途径的基因并且在以15-L规模的具有酵母提取物供料的补料分批培养中生长的大肠杆菌菌株(EWL256)的异戊二烯生产图。图68A示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中光密度的时间进程。图68B示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中异戊二烯滴定度的时间进程。滴定度定义为每升发酵培养液产生的异戊二烯的量。图68C示出从供料葡萄糖的15-L生物反应器生产的总异戊二烯的时间进程。图68D示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中的体积生产力。在40小时期间(23-63小时)维持平均值为1.1g/L/hr的酵母提取物加料。图68E示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中的二氧化碳进化率(TCER)、或代谢活性谱。

[0120] 图69A-69D示出从不同碳源通过MVA(途径)的异戊二烯生产。图69A示出含有MVA途径和异戊二烯合酶的大肠杆菌EWL256在葡萄糖、生物量水解物、丙三醇或乙酸盐/酯作为唯一碳源上的生长。在培养基中添加不同碳源至浓度为1%。包括没有添加碳源的阴性对照。以600nm处的光密度测量生长。图69B示出含有MVA途径和异戊二烯合酶的大肠杆菌EWL256在葡萄糖、生物量水解物、丙三醇或乙酸盐/酯作为唯一碳源上生长时的异戊二烯比生产力。在培养基中添加不同碳源至浓度为1%。包括没有添加碳源的阴性对照。接种后190分钟、255分钟和317分钟取样并使用GC-MS测量细菌生产的异戊二烯。图69C示出大肠杆菌EWL256在葡萄糖或木糖作为唯一碳源上的生长。在培养基中添加不同碳源至浓度为1%。包括没有添加碳源的阴性对照。生长测量为600nm下的光密度。图69D示出大肠杆菌EWL256在葡萄糖或木糖作为唯一碳源上生长的比生产力。在培养基中添加碳源至浓度为1%。包括没有添加碳源的阴性对照。接种后260分钟、322分钟和383分钟取样并使用GC-MS测量细菌生产的异戊二烯。

[0121] 图70A和70B示出由大肠杆菌菌株分别从葡萄糖和脂肪酸的异戊二烯生产。对于图70A,挑取11个来自具有下游甲羟戊酸途径的质粒pMCM118转化WW4的菌落来验证下游途径的存在。在含有0.1%酵母提取物和2%葡萄糖的TM3培养基中培养来自这些菌落的细胞。在诱导4小时后检测等份诱导培养物的异戊二烯生产。所有菌落都示出了异戊二烯生产。诱导物IPTG具有强的生长抑制作用,这可见于由50至900μM浓度的诱导物得到3至4.6倍降低的细胞密度(数据未示出)。该图示出较高诱导,导致较高的异戊二烯比滴定度。对于图70B,生产培养物是由以1至10倍稀释的冲洗后的过夜培养物接种。培养物生长若干小时并用50μM IPTG诱导。左栏示出诱导4小时后紧接着1小时异戊二烯累积检测的异戊二烯检测结果。中栏示出对于相同培养物用相同诱导时间,但分析12小时异戊二烯累积检测的1小时归

一化数值。右栏示出诱导1小时的培养物的1小时异戊二烯累积检测的数值。

[0122] 图71是用于从野葛克隆异戊二烯合酶的大肠杆菌-链霉菌(*Streptomyces*)穿梭载体pUWL201PW(6400bp)的图谱。Tsr, 硫链丝菌肽抗性基因。图片取自Doumith等人, *Mol. Gen. Genet.* 264:477-485, 2000。

[0123] 图72示出由白色链霉菌(*Streptomyces albus*)野生型菌株("wt")和带有质粒pUWL201PW(阴性对照)或pUWL201\_iso(编码来自野葛的异戊二烯合酶)的菌株的异戊二烯形成。

[0124] 图73A是马氏甲烷八叠球菌古细菌的Lower Pathway操纵子的图谱。

[0125] 图73B和73C是马氏甲烷八叠球菌古细菌的Lower Pathway操纵子的核苷酸序列(SEQ ID NO:113)。

[0126] 图74A是来自马氏甲烷八叠球菌古细菌的Lowerin pET200D的MCM376-MVK图谱。

[0127] 图74B和74C是来自马氏甲烷八叠球菌古细菌的Lowerin pET200D的MCM376-MVK的核苷酸序列(SEQ ID NO:114)。

[0128] 图75A-75D示出相比于RM11608-2, EWL256的异戊二烯生产的生长和比生产力。白色菱形表示生长(OD<sub>550</sub>)；实心条表示异戊二烯的比生产力。x-轴是以200(图75A和75B)或400(图75C和75D)  $\mu$ M IPTG诱导后的时间(小时)。Y-1轴是异戊二烯的生产力( $\mu$ g/L/OD/hr)而Y-2是波长为550处的光密度的任意单位。对于OD<sub>550</sub>的这些数值必须乘以6.66以获得培养物的实际OD。

[0129] 图76是质粒pBBRCMPGI1.5-pgl的图谱。

[0130] 图77A和77B是质粒pBBRCMPGI1.5-pgl的核苷酸序列(SEQ ID NO:122)。

[0131] 图78A-78F是由表达甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、银白杨异戊二烯合酶和pgl(RHM111608-2)并且在15L规模的补料分批培养中生长的大肠杆菌菌株的异戊二烯生产的图。图78A示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中光密度的时间进程。图78B示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中异戊二烯滴定度的时间进程。滴定度定义为每升发酵培养液生产的异戊二烯的量。计算异戊二烯的方法:59hr中的累积异戊二烯生产,在59hr时的g/发酵罐体积,  $L [=]$  g/L培养液。图78C也示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器中的异戊二烯滴定度的时间进程。计算异戊二烯的方法:  $\int$  (瞬时异戊二烯生产速率, g/L/hr) dt,  $t=0$ 至59小时  $[=]$  g/L培养液。图78D示出由供料葡萄糖的15-L生物反应器产生的总异戊二烯的时间进程。图78E示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器内的体积生产力。图78F示出在供料葡萄糖的15-L生物反应器内的二氧化碳进化率(CER), 或代谢活性谱。

[0132] 图79A是质粒pJ201:19813的图谱。

[0133] 图79B和79C是pJ201:19813的核苷酸序列(SEQ ID NO:123)。

[0134] 发明详细说明

[0135] 本发明表征了生产增加量的异戊二烯的组合物和方法。特别地, 这些组合物和方法增加异戊二烯生产力并且增加生产的异戊二烯的总量。例如, 制造了产生 $4.8 \times 10^4$  纳摩尔/g<sub>wcm</sub>/hr的异戊二烯的细胞培养体系(表1)。这些体系的效率被细胞从细胞培养基所消耗的 $\sim 23.6$  摩尔%产率(10.7重量%产率)的碳转化成异戊二烯(%碳产率)所阐明。如实施例和表2所示, 产生了每升培养液约60.5g异戊二烯。以 $1.88 \times 10^5$  nmol/OD/hr ( $1.88 \times 10^5$  纳摩尔/g<sub>wcm</sub>/hr)的峰值比速率生产异戊二烯。如果需要, 可以使用其他条件, 如在此所述的那

些,获得更大量的异戊二烯。在一些实施方式中,将可再生的碳源用于异戊二烯的生产。本发明的组合物和方法是想要的,因为它们允许每细胞的高异戊二烯产率,允许高碳产率、高异戊二烯纯度、高生产力、低能量利用、低生产成本和投资、以及最小的副反应。这一用于异戊二烯生产的有效、大规模、生物合成工艺为合成异戊二烯类橡胶提供了异戊二烯来源,并且为使用天然橡胶提供了期望的低成本替代。

[0136] 如下面进一步讨论,可以通过向细胞导入编码异戊二烯合酶多肽(例如植物异戊二烯合酶多肽)的异源核酸来显著增加由该细胞生产的异戊二烯量。异戊二烯合酶多肽将二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)转化成异戊二烯。如在实施例中所示,在诸如大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草杆菌、解脂耶氏酵母菌和里氏木霉的多种宿主细胞中表达异源葛麻姆(*Pueraria Montana*) (野葛)或银白杨(杨)异戊二烯合酶多肽。如也在实施例中所示,在诸如大肠杆菌的宿主细胞中表达异源马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶(MVK)来增加异戊二烯生产。所有这些细胞比没有异源异戊二烯合酶多肽的相应细胞生产出更多的异戊二烯。如表1和2所示,使用在此所述的方法生产了大量的异戊二烯。例如,具有异源异戊二烯合酶核酸的枯草杆菌细胞在14升发酵罐中比没有异源核酸的相应对照枯草杆菌细胞生产出高约10倍的异戊二烯(表2)。在发酵罐中由大肠杆菌生产出每升培养液(mg/L,其中培养液的体积包括细胞培养基的体积和细胞的体积)60.5g异戊二烯而由枯草杆菌生产的是30mg/L,这表明可以产生相当量的异戊二烯(表2)。如果需要,可以在更大规模生产异戊二烯或者可以使用在此所述的其他条件来进一步增加异戊二烯的量。在下面以及在实施例部分中进一步详述表1和2所列出的载体以及实验条件。

[0137] 表1:使用本发明的细胞培养物和方法,从摇瓶生产异戊二烯的示例性产率。用于测量异戊二烯生产的检测法描述于实施例I,第II部分。对于这一检测法,在一或多个时间点从摇瓶取出样品并培养30分钟。然后测量这一样品中生产的异戊二烯量。表1中列出了异戊二烯生产的顶空浓度和比速率,并且在此进一步描述。

[0138]

菌株	在顶空瓶中的异戊二烯生产*
----	---------------

[0139]

	顶空浓度 $\mu\text{g/L}$ 气体	比速率 $\mu\text{g/L}$ 培养液 /hr/OD ( $\text{nmol/g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$ )
大肠杆菌 BL21/ pTrcKudzu IS	1.40	53.2 (781.2)
大肠杆菌 BL21/Pcl DXS yidiKudzu IS	7.61	289.1 ( $4.25 \times 10^3$ )
具有 Kudzu IS 和整个 MVA 途径 的大肠杆菌 BL21/MCM127	23.0	874.1 ( $1.28 \times 10^4$ )
大肠杆菌 BL21/Pet N- HisKudzu IS	1.49	56.6 (831.1)
柠檬泛菌/pTrcKudzu IS	0.66	25.1 (368.6)
大肠杆菌 w/杨 IS [Miller(2001)]	-	5.6 (82.2)
地衣芽孢杆菌 ( <i>Bacillis lichenformis</i> ) Fall US 5849970	-	4.2 (61.4)
具有野葛异戊二烯合酶的解脂耶 氏酵母菌	$\sim 0.05 \mu\text{g/L}$	$\sim 2$ ( $\sim 30$ )
具有野葛异戊二烯合酶的里氏木 霉	$\sim 0.05 \mu\text{g/L}$	$\sim 2$ ( $\sim 30$ )
具有野葛 IS 和下游 MVA 途径的 大肠杆菌 BL21/pTrcKKD <sub>y</sub> I <sub>k</sub> IS	85.9	$3.2 \times 10^3$ ( $4.8 \times 10^4$ )

[0140] \*标准化为10D<sub>600</sub>的1mL,在密封顶空瓶中培养1小时,其中液体与顶空体积比为1:19。

[0141] 表2:使用本发明的细胞培养物和方法,在发酵罐中的示例性异戊二烯产率。用于测量异戊二烯生产的检测法描述于实施例I,第II部分。对于这一检测法,取发酵罐的废气样品,并分析异戊二烯的量。表2中列出了峰值顶空浓度(它是发酵期间的最高顶空浓度)、滴定度(它是每升培养液所生产的异戊二烯的累积总量)以及异戊二烯生产的峰值比速率(它是发酵期间的最高比速率),并且在此进一步描述。

[0142]

菌株	发酵罐中的异戊二烯生产		
	峰值顶空 浓度** ( $\mu\text{g/L}$ 气体)	滴定度 ( $\text{mg/L}$ 培养液)	峰值比速率 $\mu\text{g/L}$ 培养液/hr/OD ( $\text{nmol/g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$ )
具有野葛 IS 的大肠杆菌 <i>BL21/pTrcKudzu</i>	52	41.2	37 (543.3)
大肠杆菌 <i>FM5/pTrcKudzu IS</i>	3	3.5	21.4 (308.1)
大肠杆菌 BL21/ 三重的 菌株 (DXS, yidi, IS)	285	300	240 ( $3.52 \times 10^3$ )
大肠杆菌 FM5/三重的菌 株 (DXS, yidi, IS)	50.8	29	180.8 ( $2.65 \times 10^3$ )
具有野葛 IS 和整个 MVA 途径的大肠杆菌 <i>/MCM127</i>	1094	250	875 ( $1.28 \times 10^4$ )
枯草杆菌野生型	1.5	2.5	0.8 (11.7)
芽孢杆菌 <i>pBSKudzu IS</i>	16.6	~30( 超过 100 小时 )	5 (73.4)
<i>Bacillus Marburg 6051</i> [Wagner and Fall (1999 )]	2.04	0.61	24.5 (359.8)
<i>Bacillus Marburg 6051</i> <i>Fall US 5849970</i>	0.7	0.15	6.8 (100)
大肠杆菌 BL21/pCLPtrcUpper Pathway 和 <i>gil.2KKDyI</i> 和 <i>pTrcAlba-mMVK</i>	$2.03 \times 10^4$	$3.22 \times 10^4$	$5.9 \times 10^3$ ( $8.66 \times 10^4$ )
大肠杆菌 BL21/pCLPtrcUpper Pathway 和 <i>gi1.2KKDyI</i> 和 <i>pTrcAlba-mMVK</i> 加 <i>pBBRCMPGI1.5pgl</i>	$3.22 \times 10^4$	$6.05 \times 10^4$	$1.28 \times 10^4$ ( $1.88 \times 10^5$ )

[0143] \*\*标准化为1vvm的废气流速(每1L培养液每分钟1体积废气)。

[0144] 此外,通过含有异源异戊二烯合酶核酸的细胞的异戊二烯生产可以经增加由该细胞所表达的1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)多肽和/或异戊烯基二磷酸异构酶(IDI)多肽的量所增强。例如,可以将DXS核酸和/或IDI核酸导入细胞中。DXS核酸可为异源核酸或内源核酸的拷贝。类似地,IDI核酸可为异源核酸或内源核酸的拷贝。在一些实施方式中,通过用产生DXS和/或IDI核酸更大转录的其他启动子和/或调控区代替内源DXS和/或IDI启动子和/或调控区来增加DXS和/或IDI多肽的量。在一些实施方式中,细胞含有编码异戊二烯合酶多肽(例如植物异戊二烯合酶核酸)的异源核酸以及编码异戊二烯合酶多肽的内源核酸的拷贝。

[0145] 编码的DXS和IDI多肽是用于生物合成异戊二烯的DXP途径的一部分(图19A)。DXS多肽将丙酮酸和D-甘油醛3-磷酸转变成1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸。虽然不想受任何特定理论所限,但相信增加DXS多肽量会增加通过DXP途径的碳流动,导致更大的异戊二烯生产。IDI多肽催化异戊烯二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)的相互转化。虽然不想受任何特定理论所限,但相信增加细胞中的IDI多肽量会增加IPP的量,IPP被转化成DMAPP,其又被转化成异戊二烯。

[0146] 例如,使用具有野葛异戊二烯合酶、酿酒酵母IDI和大肠杆菌DXS的大肠杆菌细胞发酵生产异戊二烯。异戊二烯的水平在15小时的时间段从50至300 $\mu$ g/L变化(实施例7,第VII部分)。作为另一实例,使用具有马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶(MVK)、银白杨异戊二烯合酶、上游MVA途径和整合的下游MVA途径的大肠杆菌发酵生产异戊二烯。异戊二烯的水平在67小时的时间段从32至36.5g/L变化(实施例10,第III部分)。

[0147] 在又一实施例中,使用具有马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶(MVK)、银白杨异戊二烯合酶、pgl1过表达(RHM 111608-2)、上游MVA途径和整合下游MVA途径的大肠杆菌细胞发酵生产异戊二烯。异戊二烯的水平在40小时的时间段从33.2g/L至40.0g/L变化或在59小时的时间段从48.6g/L至60.5g/L变化(实施例13,第(ii)部分)。

[0148] 在一些实施方式中,异源或额外的内源异戊二烯合酶、IDI和DXS核酸的存在使得细胞相比于只具有这些异源或额外的内源核酸中一种或两种的相应细胞更加可繁殖地生长或者存活更长。例如,含有异源异戊二烯合酶、IDI和DXS核酸的细胞比只有异源异戊二烯合酶和DXS核酸或者只有异源异戊二烯合酶核酸的细胞生长得更好。而且,已将异源异戊二烯合酶、IDI和DXS核酸成功地有效连接至在大肠杆菌细胞中维持的高拷贝质粒上的强启动子,这表明大量的这些多肽可以在细胞中表达而不会对细胞造成过量的毒性。虽然不想受特定理论所限,但是相信异源或额外的内源异戊二烯合酶和IDI核酸的存在可降低一种或多种潜在的毒性中间产物的量,该中间产物本来是在细胞中存在仅仅一种异源或额外的内源DXS核酸时积累的。

[0149] 在一些实施方式中,通过增加细胞表达的MVA多肽的量,由含有异源异戊二烯合酶核酸的细胞生产的异戊二烯增加(图19A和19B)。示例性MVA途径多肽包括任何下述多肽:乙酰-CoA乙酰转移酶(AA-CoA硫解酶)多肽、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA合酶(HMG-CoA合酶)多肽、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶(HMG-CoA还原酶)多肽、甲羟戊酸激酶(MVK)多肽、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)多肽、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD)多肽、磷酸甲羟戊酸脱羧酶(PMDC)多肽、异戊烯磷酸激酶(IPK)多肽、IDI多肽和具有两种或更多种MVA途径多肽活性的多肽(例如融合多肽)。例如,可以将一或多个MVA途径核酸导入细胞中。在一些实施方式中,



细胞含有上游MVA途径,其该上游MVA途径包括AACoA硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶核酸。在一些实施方式中,细胞含有下游MVA途径,该下游MVA途径包括MVK、PMK、MVD和IDI核酸。在一些实施方式中,细胞含有整个MVA途径,该整个MVA途径包括AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合酶、HMG-CoA还原酶、MVK、PMK、MVD和IDI核酸。在一些实施方式中,细胞含有包括AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合酶、HMG-CoA还原酶、MVK、PMDC、IPK和IDI核酸的整个MVA途径。MVA途径核酸可为异源核酸或者内源核酸的拷贝。在一些实施方式中,通过用导致MVA途径核酸更大转录的其他启动子和/或调控区来替代MVA途径核酸的内源启动子和/或调控区而增加该一种或多种MVA途径多肽的量。在一些实施方式中,细胞含有编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸(例如植物异戊二烯合酶核酸)和编码异戊二烯合酶多肽的内源核酸的拷贝。

[0150] 例如,含有编码野葛异戊二烯合酶多肽的核酸以及编码酿酒酵母MVK、PMK、MVD和IDI多肽的核酸的大肠杆菌细胞以 $6.67 \times 10^4 \text{ nmol/L}_{\text{培养液}}/\text{OD}_{600}/\text{hr}$ 的比率产生异戊二烯(参见实施例8)。此外,14升具有编码粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶的核酸的大肠杆菌发酵物产生22克甲羟戊酸(MVA途径的中间产物)。这些细胞的摇瓶产生每升2-4克的甲羟戊酸。这些结果表明异源MVA途径核酸在大肠杆菌中是有活性的。含有上游MVA途径和下游MVA途径以及野葛异戊二烯合酶的核酸的大肠杆菌细胞(菌株MCM 127)相比于具有只用于下游MVA途径和野葛异戊二烯合酶的核酸的大肠杆菌细胞(菌株MCM 131)产生显著更多的异戊二烯( $874 \mu\text{g/L}_{\text{培养液}}/\text{hr}/\text{OD}$ ) (参见表3和实施例8,第VIII部分)。

[0151] 作为另一实例,含有编码银白杨异戊二烯合酶多肽的核酸以及编码马氏甲烷八叠球菌MVK多肽的核酸的大肠杆菌细胞,在没有酵母提取物加料下,在67小时发酵期间产生320.6g(峰值比速率为 $9.54 \times 10^4 \text{ nmol/L}_{\text{培养液}}/\text{OD}_{600}/\text{hr}$ (即 $9.5 \times 10^4 \text{ nmol/L}_{\text{培养液}}/\text{OD}_{600}/\text{hr}$ ))的异戊二烯,或在存在酵母提取物加料下,在68小时发酵期间产生395.5g(峰值比速率为 $8.66 \times 10^4 \text{ nmol/L}_{\text{培养液}}/\text{OD}_{600}/\text{hr}$ )的异戊二烯(参见实施例10)。

[0152] 在一些实施方式中,在连续培养物(例如没有稀释的连续培养物)中,至少一部分的细胞维持异源异戊二烯合酶、DXS、IDI、和/或MVA途径核酸至少约5、10、20、50、75、100、200、300或更多的细胞分裂。在本发明任何方面的一些实施方式中,包含异源或内源异戊二烯合酶拷贝、DXS、IDI、和/或MVA途径核酸的核酸也包含选择标记,如卡那霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素、庆大霉素、潮霉素、腐草霉素、博来霉素、新霉素、或氯霉素抗生素抗性核酸。

[0153] 如实施例7,第VI部分所示,可以通过将酵母提取物加入细胞培养基中,使用具有野葛异戊二烯合酶、酿酒酵母IDI和大肠杆菌DXS核酸的大肠杆菌细胞来生产异戊二烯而进一步增加所生产的异戊二烯的量。特别地,所生产的异戊二烯的量与用于浓度检测的细胞培养基中的酵母提取物的量为线性比例的(图48C)。此外,从具有酵母提取物和葡萄糖的细胞培养基生产了约每升培养液0.11克异戊二烯(实施例7,第VIII部分)。相比于在酵母提取物存在下增加葡萄糖的量,在葡萄糖存在下增加酵母提取物的量导致生产更多的异戊二烯。而且,增加酵母提取物的量允许细胞在更长的时间里生产高水平的异戊二烯并且提高细胞的健康水平。

[0154] 也使用三种类型的水解生物量(甘蔗渣,玉米秸秆和软木材木浆)作为碳源来阐述了异戊二烯的生产(图46A-C和图69A和69B)。具有野葛异戊二烯合酶、酿酒酵母IDI和大肠

杆菌DXS核酸的大肠杆菌细胞从这些水解的生物量碳源比从等量葡萄糖(例如,1%葡萄糖,w/v)生产出更多的异戊二烯。表达银白杨异戊二烯合酶和MVA途径的大肠杆菌细胞从氨纤维膨胀(AFEX)预处理的玉米秸秆比从等量葡萄糖以更高的初始生长率生产异戊二烯(图69A和69B)。如果需要,本发明的组合物和方法中可以使用任何其他生物量碳源。生物量碳源是想要的,因为它们比许多常规细胞培养基更便宜,从而促进经济地生产异戊二烯。

[0155] 此外,转化糖显示出起用于生产异戊二烯的碳源的作用(图47D)。

[0156] 此外,木糖、乙酸盐/酯、以及丙三醇也显示出起生产异戊二烯的碳源的作用(图69A-69D)。例如,在乙酸盐/酯作为唯一碳源上生长的具有银白杨异戊二烯合酶和MVA途径的大肠杆菌细胞的异戊二烯的比生产力是在葡萄糖上生长期间约两倍高(实施例10,第IV部分;图69A和69B)。

[0157] 在一些实施方式中,细胞培养基中包括油。例如,含有野葛异戊二烯合酶核酸的枯草杆菌细胞在含有油和葡萄糖源的细胞培养基中培养时,产生异戊二烯(实施例4,第III部分)。作为另一实例,含有上游和下游MVA途径加野葛异戊二烯合酶的大肠杆菌fadR atoC突变细胞在含有棕榈油和葡萄糖源的细胞培养基中培养时,产生异戊二烯(实施例12,第II部分)。在一些实施方式中,细胞培养基中包括一种以上的油(例如2、3、4、5或更多种油)。虽然不想受任何特定理论所限,但相信(i)油可增加在细胞中可用于向异戊二烯转变的碳量,(ii)油可增加在细胞中的乙酰-CoA的量,从而增加通过MVA途径的碳流动,和/或(ii)油可向细胞提供额外的营养,这是想要的,因为细胞中的许多碳转变成异戊二烯而不是其他产物。在一些实施方式中,在含有油的细胞培养基中培养的细胞天然使用MVA途径来生产异戊二烯或者通常被修饰以含有用于整个MVA途径的核酸。在一些实施方式中,油在加入细胞培养基中之前部分或全部水解以促进宿主细胞对油的使用。

[0158] 示例性多肽和核酸

[0159] 多种异戊二烯合酶,DXS,IDI,和/或MVA途径多肽和核酸可以用于本发明的组合物和方法。

[0160] 如在此使用,“多肽”包括多肽、蛋白质、肽、多肽片段和融合多肽,该融合多肽包括第一多肽(例如异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽)的部分或全部以及第二多肽(例如方便融合多肽纯化及检测的肽,如His-标签)的部分或全部。在一些实施方式中,融合多肽具有两种或更多种MVA途径多肽(例如AA-CoA硫解酶和HMG-CoA还原酶多肽)的活性。在一些实施方式中,多肽是具有两种或更多种MVA途径多肽活性的天然发生的多肽(例如由粪肠球菌mvaE核酸编码的多肽)。

[0161] 在多种实施方式中,多肽具有至少或约50、100、150、175、200、250、300、350、400或更多个氨基酸。在一些实施方式中,多肽片段含有来自全长多肽的至少或约25、50、75、100、150、200、300或更多个连续氨基酸并且它具有相应全长多肽活性的至少或约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。在具体实施方式中,多肽包括任何天然发生的异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽的整个氨基酸序列或序列区段。在一些实施方式中,多肽相比于野生型(即天然发生的序列)异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽序列具有一或多个突变。

[0162] 在一些实施方式中,多肽是分离的多肽。如在此所用,“分离的多肽”不是多肽文库,例如2、5、10、20、50或更多种不同多肽的文库的一部分,并且与至少一种与其一起天然

发生的组分分离。分离的多肽可以例如通过表达编码该多肽的重组核酸而获得。

[0163] 在一些实施方式中,多肽是异源多肽。对于“异源多肽”,指氨基酸序列与在相同宿主细胞中天然表达的另一多肽的氨基酸序列不相同的多肽。

[0164] 如在此使用,“核酸”指单链或双链形式的两个或更多个脱氧核糖核酸和/或核糖核酸。在一些实施方式中,核酸是重组核酸。“重组核酸”,指不含一种或多种核酸(例如基因)的目的核酸,该一种或多种核酸在该目的核酸所源自的生物的天然发生的基因组中,以该目的核酸为侧翼。该术语因此包括,例如整合到载体、整合到自主复制的质粒或病毒,或整合到原核或真核生物的基因组DNA,或者以独立于其他序列而作为分离分子(如cDNA、基因组DNA片段、或由PCR或限制性内切酶酶切所产生的cDNA片段)存在的重组DNA。在一些实施方式中,异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸有效连接到编码全部或部分的另一多肽的另一核酸以便该重组核酸编码包括异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽以及全部或部分另一多肽(例如,促进融合多肽纯化或检测的肽,例如His-标签)的融合多肽。在一些实施方式中,部分或全部的重组核酸是化学合成的。

[0165] 在一些实施方式中,核酸是异源核酸。对于“异源核酸”,指核酸序列与在相同宿主细胞中天然发现的另一核酸的核酸序列不相同的核酸。

[0166] 在具体实施方式中,核酸包括任何天然发生的异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸的整个核酸序列或其区段。在一些实施方式中,核酸包括来自天然发生的异戊二烯合酶核酸、DXS、IDI或MVA途径核酸的至少或约50、100、150、200、300、400、500、600、700、800或更多连续核苷酸。在一些实施方式中,核酸相比于野生型(即天然发生的序列)异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸的序列具有一个或多个突变。在一些实施方式中,核酸具有增加异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸转录或翻译的一或多个突变(例如,沉默突变)。在一些实施方式中,核酸是任何编码异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽的核酸的简并变体。

[0167] “密码子简并性”指遗传密码的发散,这允许核苷酸序列的变化而不会影响编码多肽的氨基酸序列。熟练技术人员会充分意识到在使用核苷酸密码子来说明给定氨基酸时,由特定宿主细胞所展现的“密码子偏好”。因此,当合成核酸以改善在宿主细胞中的表达时,想要在一些实施方式中设计核酸,使得其密码子使用频率接近宿主细胞的偏好密码子使用频率。

[0168] 示例性异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸的登录号列于附录1(附录1的登录号和它们相应的序列在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸的氨基酸和核酸序列)。Kegg数据库也含有许多示例性异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸的氨基酸和核酸序列(参见,例如,网址为“genome.jp/kegg/pathway/map/map00100.html”的互联网和其中的序列,其在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸的氨基酸和核酸序列)。在一些实施方式中,一种或多种异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽和/或核酸具有与2007年12月12日或2008年12月11日公开可获得的序列(例如对应于附录1中任何登录号的任何序列或者Kegg数据库中存在的任何序列)相同的序列。进一步在下面描述其他的示例性异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸。

[0169] 示例性异戊二烯合酶多肽和核酸

[0170] 如上面所指出,异戊二烯合酶多肽将二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)转变成异戊二

烯。示例性的异戊二烯合酶多肽包括多肽、多肽片段、肽和具有异戊二烯合酶多肽的至少一种活性的融合多肽。标准方法可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将DMAPP转变成异戊二烯的能力而用来测定该多肽是否具有异戊二烯合酶多肽活性。在示例性的检测法中,通过按实施例1所述以摇瓶法生长菌株(例如在此所述的*E.coli*/pTrcKudzu菌株)来制备细胞提取物。在完成诱导后,将约10mL的细胞在7000x g离心10分钟沉淀并在5ml没有甘油的PEB中重悬浮。使用标准方法,用弗氏压碎器裂解细胞。或者,在-80℃冻融后,用溶菌酶(Ready-Lyse溶菌酶溶液;EpiCentre)处理细胞。

[0171] 例如,可以按照Silver等人,*J Biol.Chem.*270:13010-13016,1995以及其中参考文献所述来测量细胞提取物中的异戊二烯合酶多肽活性,它们在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯合酶多肽活性的检测法。在氮蒸汽下蒸发DMAPP(Sigma)至干燥并且在pH 8.2的100mM磷酸钾缓冲液中再水化至100mM浓度并储存于-20℃。为了进行检测法,在具有金属螺帽和涂覆特氟龙的硅隔板(Agilent Technologies)的20ml顶空样品瓶(Agilent Technologies)中,将5μl的1M  $MgCl_2$ 、1mM(250μg/ml) DMAPP、65μl的Plant Extract Buffer(PEB)(50mM Tris-HCl,pH 8.0,20mM  $MgCl_2$ ,5%丙三醇,和2mM DTT)加入25μl的细胞提取物中并在37℃振荡培养15分钟。通过加入200μl的250mM EDTA淬灭反应并通过GC/MS来量化,如在实施例1,第II部分所述。

[0172] 示例性异戊二烯合酶核酸包括编码多肽、多肽片段、肽或具有异戊二烯合酶多肽的至少一种活性的融合多肽的核酸。示例性的异戊二烯合酶多肽和核酸包括来自任何在此所述的来源生物的天然发生的多肽和核酸以及源自在此所述任何来源生物的突变多肽和核酸。

[0173] 在一些实施方式中,异戊二烯合酶多肽或核酸是来自豆科(Fabaceae),例如蝶形花亚科(Faboideae)。在一些实施方式中,异戊二烯合酶多肽或核酸是来自葛麻姆(*Pueraria montana*)(野葛)(Sharkey等人,*Plant Physiology* 137:700-712,2005),野葛(*Pueraria lobata*),杨(如银白杨、黑杨、*Populus trichocarpa*、银白杨x *tremula*(CAC35696)或银白杨)(Sasaki等人,*FEBS Letters* 579(11):2514-2518,2005;Miller等人,*Planta* 213:483-487,2001)、白杨(如*Populus tremuloides*)(Silver等人,*JBC* 270(22):13010-1316,1995)或英国栎(夏栎(*Quercus robur*))(Zimmer等人,WO 98/02550)的多肽或核酸,其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯合酶核酸和异戊二烯合酶多肽的表达。适合的异戊二烯合酶包括但不限于,Genbank登录号AY341431、AY316691、AY279379、AJ457070和AY 182241所鉴定的那些,其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯合酶核酸和多肽的序列。在一些实施方式中,异戊二烯合酶多肽或核酸不是来自夏栎的天然发生的多肽或者核酸(即异戊二烯合酶多肽或核酸是除了来自夏栎的天然发生的多肽或者核酸以外的异戊二烯合酶多肽或核酸)。在一些实施方式中,异戊二烯合酶核酸或多肽是来自杨的天然发生的多肽或核酸。在一些实施方式中,异戊二烯合酶核酸或多肽不是来自杨的天然发生的多肽或核酸。

[0174] 示例性DXS多肽和核酸

[0175] 如上所指出,1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(DXS)多肽将丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸转变成1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸。示例性DXS多肽包括多肽、多肽片段、肽和具有DXS多肽的至少一种活性的融合多肽。标准方法(如在此所述的那些)可以通过测量多肽在体外、在

细胞提取物中或在体内将丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸转变成1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸的能力而用来测定该多肽是否具有DXS多肽活性。示例性DXS核酸包括编码具有DXS多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性DXS多肽和核酸包括来自在此所述的任何源生物的天然发生的多肽和核酸以及源自在此所述的任何源生物的突变多肽和核酸。

[0176] 示例性IDI多肽和核酸

[0177] 异戊烯二磷酸异构酶多肽(异戊烯二磷酸 $\delta$ 异构酶或IDI)催化异戊烯二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)的相互转变(例如将IPP转变成DMAPP和/或将DMAPP转变成IPP)。示例性IDI多肽包括具有IDI多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。标准方法(如在此所述的那些)可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内对IPP和DMAPP相互转变的能力而用来测定该多肽是否具有IDI多肽活性。示例性IDI核酸包括编码具有IDI多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性IDI多肽和核酸包括来自在此所述的任何源生物的天然发生的多肽和核酸以及源自在此所述的任何源生物的突变多肽和核酸。

[0178] 示例性MVA途径多肽和核酸

[0179] 示例性MVA途径多肽包括乙酰基-CoA乙酰转移酶(AACoA硫解酶)多肽、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA合酶(HMG-CoA合酶)多肽、3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶(HMG-CoA还原酶)多肽、甲羟戊酸激酶(MVK)多肽、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)多肽、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD)多肽、磷酸甲羟戊酸脱羧酶(PMDC)多肽、异戊烯磷酸激酶(IPK)多肽、IDI多肽、和具有两种或更多种MVA途径多肽活性的多肽(例如融合多肽)。特别地, MVA途径多肽包括具有MVA途径多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。示例性MVA途径核酸包括编码具有MVA途径多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性MVA途径多肽和核酸包括来自在此所述的任何源生物的天然发生的多肽和核酸以及源自在此所述的任何源生物的突变多肽和核酸。

[0180] 特别地, 乙酰基-CoA乙酰转移酶多肽(AA-CoA硫解酶或AACT)将两分子的乙酰基-CoA转变成乙酰乙酰基-CoA。标准方法(如在此所述的那些)可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将两分子乙酰基-CoA转变成乙酰乙酰基-CoA的能力而用来测定该多肽是否具有AA-CoA硫解酶多肽活性。

[0181] 3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA合酶(HMG-CoA合酶或HMGS)多肽将乙酰乙酰基-CoA转变成3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA。标准方法(如在此所述的那些)可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将乙酰乙酰基-CoA转变成3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA的能力而用来测定该多肽是否具有HMG-CoA合酶多肽活性。

[0182] 3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶(HMG-CoA还原酶或HMGR)多肽将3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA转变成甲羟戊酸。标准方法(如在此所述的那些)可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA转变成甲羟戊酸的能力而用来测定该多肽是否具有HMG-CoA还原酶多肽活性。

[0183] 甲羟戊酸激酶(MVK)多肽使甲羟戊酸磷酸化以形成甲羟戊酸-5-磷酸。标准方法(如在此所述的那些)可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将甲羟戊酸转变成甲羟戊酸-5-磷酸的能力而用来测定该多肽是否具有MVK多肽活性。

[0184] 磷酸甲羟戊酸激酶 (PMK) 多肽使甲羟戊酸-5-磷酸磷酸化以形成甲羟戊酸-5-二磷酸。标准方法 (如在此所述的那些) 可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将甲羟戊酸-5-磷酸转变成甲羟戊酸-5-二磷酸的能力而用来测定该多肽是否具有PMK多肽活性。

[0185] 二磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (MVD或DPMDC) 多肽将甲羟戊酸-5-二磷酸转变成异戊烯二磷酸 (IPP)。标准方法 (如在此所述的那些) 可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将甲羟戊酸-5-二磷酸转变成IPP的能力而用来测定该多肽是否具有MVD多肽活性。

[0186] 磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (PMDC) 多肽将甲羟戊酸-5-磷酸转变成异戊烯磷酸 (IP)。标准方法 (如在此所述的那些) 可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将甲羟戊酸-5-磷酸转变成IP的能力而用来测定该多肽是否具有PMDC多肽活性。

[0187] 异戊烯磷酸激酶 (IPK) 多肽使异戊烯磷酸 (IP) 磷酸化以形成异戊烯二磷酸 (IPP)。标准方法 (如在此所述的那些) 可以通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将IP转变成IPP的能力而用来测定该多肽是否具有IPK多肽活性。

[0188] 示例性IDI多肽和核酸如上所述。

[0189] 分离核酸的示例性方法

[0190] 可以使用标准方法来分离异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径核酸。从目的源生物 (例如细菌基因组) 获得想要的核酸的方法是常规的并且是分子生物学领域公知的 (参见, 例如WO 2004/033646及其中引用的文献, 其各在此通过整体引用作为参考, 特别是对于目的核酸的分离)。例如, 如果核酸序列是已知的 (例如任何在此所述的已知核酸), 那么可通过限制性内切核酸酶消化来产生适当的基因组文库并且可用与想要的核酸序列互补的探针筛选该文库。一旦分离了序列, 可使用标准引物导向扩增方法, 如聚合酶链式反应 (PCR) 来扩增DNA (美国专利号4,683,202, 其在此通过整体引用作为参考, 特别是对于PCR方法) 来获得适于使用适当的载体来转化的DNA量。

[0191] 或者, 可以使用标准方法来化学合成异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径核酸, 例如具有已知核酸序列的任何异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径核酸。

[0192] 可以使用标准方法来鉴定可适合用于在此所述组合物和方法的其他异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径的多肽。例如, 可以在诸如大肠杆菌的生物中构建已知天然产生异戊二烯的生物的染色体DNA的黏粒文库, 然后筛选异戊二烯生产。特别地, 可产生黏粒文库, 在该文库中, 基因组DNA的大区段 (35-45kb) 包装到载体并用于转化适当的宿主。黏粒载体是独特的, 因为能接纳大量DNA。通常, 黏粒载体具有封装以及随后环化异源DNA所需的至少一个拷贝的cos DNA序列。除了cos序列, 这些载体也含有诸如ColEI的复制起点以及药物抗性标记如对于氨苄青霉素或新霉素有抗性的核酸。使用黏粒载体来转化适当的细菌宿主的方法充分描述于Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor, 1989, 其在此通过整体引用作为参考, 特别是对于转化方法。

[0193] 通常对于克隆黏粒, 使用适当的限制性内切核酸酶分离异源DNA并使用适当的连接酶将与其邻近黏粒载体的cos区连接。然后将含有线性异源DNA的黏粒载体与DNA包装载体如噬菌体反应。在包装过程期间, 切割cos位点并将异源DNA包装到细菌病毒颗粒的头部。然后使用这些颗粒来转染适当的宿主细胞如大肠杆菌。一旦注入细胞, 异源DNA在cos粘末端的影响下环化。以这一方式, 可以将大区段异源DNA导入宿主细胞并表达。

[0194] 其他获得异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径核酸的方法包括通过检测法(例如在此所述的顶空检测法)或通过使用针对于编码一段保守氨基酸(例如,至少3个保守氨基酸)的核苷酸的引物进行PCR来筛选宏基因组文库。可以通过比对已知异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径多肽的氨基酸序列来鉴定保守氨基酸。可以基于已知的异戊二烯合酶多肽的比对序列鉴定异戊二烯合酶多肽的保守氨基酸。可以对发现能天然生产异戊二烯的生物进行标准蛋白纯化方法(这是本领域公知的)并且可以使用标准方法对得到的纯化多肽测序。文献中记载了其他方法(参见,例如Julsing等人, *Applied Microbiol. Biotechnol.* 75:1377-84, 2007; Withers等人, *Appl Environ Microbiol.* 73(19):6277-83, 2007, 其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于参与异戊二烯合成的核酸鉴定)。

[0195] 此外,可以使用标准序列比对和/或结构预测程序来根据其他DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸的一级和/或预测的多肽二级结构与已知DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸的结构相似性而鉴定它们。也可以使用标准数据库如swissprot-trembl数据库(网址在“expasy.org”, Swiss Institute of Bioinformatics Swiss-Prot group CMU-1 rue Michel Servet CH-1211 Geneva 4, Switzerland)来鉴定异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽和核酸。可以使用标准结构预测程序(例如PredictProtein(630 West, 168 Street, BB217, New York, N.Y. 10032, USA))的默认设置来预测异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽的二级和/或三级结构。或者,可以使用标准方法来测定异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽的实际二级和/或三级结构。也可以通过与从已知异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸产生的探针杂交来鉴定其他异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸。

[0196] 示例性启动子和载体

[0197] 任何在此所述的异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸可以包括在一或多个载体中。因此,本发明也表征了具有编码在此所述的任何异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽的一种以上的核酸的载体。如在此使用,“载体”指能够递送,并期望地在宿主细胞中表达一种或多种目的核酸的构建体。载体的实例包括但不限于质粒、病毒载体、DNA或RNA表达载体、黏粒和噬菌体载体。在一些实施方式中,载体含有受表达控制序列所控的核酸。

[0198] 如在此使用,“表达控制序列”指指导目的核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子,如组成型或诱导型启动子,或增强子。“诱导型启动子”是在环境或发育调控下有活性的启动子。表达控制序列有效地连接待转录的核酸区段。

[0199] 在一些实施方式中,载体含有选择标记。术语“选择标记”指能够在宿主细胞中表达的核酸,该选择标记允许轻易选择那些含有导入的核酸或载体的宿主细胞。选择标记的实例包括但不限于抗生素抗性核酸(例如卡那霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素、庆大霉素、潮霉素、腐草霉素、博来霉素、新霉素或氯霉素)和/或赋予宿主细胞代谢优势如营养优势的核酸。示例性营养选择标记包括本领域已知的那些标记如amdS、argB和pyr4。可用于转化木霉的载体系统中的标记是本领域已知的(参见例如Finkelstein, *Biotechnology of filamentous Fungi*, 第6章, Finkelstein等人编, Butterworth-Heinemann, Boston, MA, Chap. 6., 1992; 和Kinghorn等人, *Applied Molecular Genetics of filamentous Fungi*, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London, 1992, 其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于选择标记)。在一些实施方式中,选择标记是amdS核酸,其编码



乙酰胺酶,允许转化的细胞在作为氮源的乙酰胺上生长。构巢曲霉 (*A.nidulans*) amdS 核酸作为选择标记的使用描述于 Kelley 等人,EMBO J.4:475-479,1985 和 Penttila 等人,Gene 61:155-164,1987 (其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于选择标记)。在一些实施方式中,异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸整合到没有选择标记的细胞的染色体中。

[0200] 适当的载体是与所用宿主细胞兼容的那些。适当的载体可以源自,例如细菌、病毒(如噬菌体 T7 或源自 M13 的噬菌体)、黏粒、酵母或植物。获得和使用此种载体的方法是本领域技术人员已知的(参见,例如 Sambrook 等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor,1989,其在此通过整体引用作为参考,特别是对于载体的使用)。

[0201] 启动子是本领域公知的。任何在宿主细胞中起作用的启动子可以用于在宿主细胞中表达异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸。用于在多种宿主细胞中驱动异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸表达的起始控制区或启动子很多并且是本领域技术人员所熟知的(参见,例如 WO 2004/033646 及其中引用的文献,其每篇都在此通过整体引用作为参考,特别是对于表达目的核酸的载体)。事实上,任何能够驱动这些核酸的启动子都适于本发明,这些启动子包括但不限于 CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADCI、TRP1、URA3、LEU2、ENO 和 TPI (用于在酵母菌中表达);AOX1 (用于在毕赤酵母 (*Pichia*) 中表达);和 lac、trp、 $\lambda$ P<sub>L</sub>、 $\lambda$ P<sub>R</sub>、T7、tac 和 trc (用于在大肠杆菌中表达)。

[0202] 在一些实施方式中,使用葡萄糖异构酶启动子(参见,例如美国专利号 7,132,527 及其中引用的文献,其每篇都在此通过整体引用作为参考,特别是对于用于表达目的多肽的启动子和质粒系统)。可以使用报道的葡萄糖异构酶启动子突变体来改变由有效连接葡萄糖异构酶启动子的核酸所编码的多肽的表达水平(美国专利号 7,132,527)。在多种实施方式中,葡萄糖异构酶启动子含于低、中或高拷贝质粒中(美国专利号 7,132,527)。

[0203] 在多种实施方式中,异戊二烯合酶、DXS、IDI 和/或 MVA 途径核酸含于低拷贝质粒中(例如维持在每个细胞约 1 至约 4 拷贝的质粒)、中度拷贝质粒(例如维持在每个细胞约 10 至约 15 拷贝的质粒)或高拷贝质粒(例如维持在每个细胞约 50 或更高拷贝的质粒)。在一些实施方式中,异源或额外内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸有效连接 T7 启动子。在一些实施方式中,有效连接 T7 启动子的异源或额外的内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸含于中或高拷贝质粒中。在一些实施方式中,异源或额外的内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸有效连接 Trc 启动子。在一些实施方式中,有效连接 Trc 启动子的异源或额外的内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸含于中或高拷贝质粒中。在一些实施方式中,异源或额外的内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸有效连接 Lac 启动子。在一些实施方式中,有效连接 Lac 启动子的异源或额外的内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸含于低拷贝质粒中。在一些实施方式中,异源或额外的内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸有效连接内源启动子,如内源埃希氏菌、泛菌、芽孢杆菌、耶氏酵母、链霉菌、或木霉菌启动子或内源碱性丝氨酸蛋白酶、异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径启动子。在一些实施方式中,有效连接内源启动子的异源或额外的内源异戊二烯合酶、DXS、IDI 或 MVA 途径核酸含于高拷贝质粒中。在一些实施方式中,载体是不整合到细胞染色体的复制质粒。在一些实施方式中,载体部分或全部整合到细胞染色体中。

[0204] 在一些实施方式中,载体是任何在引入到真菌宿主细胞时,整合到该宿主细胞基



基因组中并复制的载体。载体列表参考Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, 网址为“fgsc.net”及其引用的文献, 其每篇都在此通过整体引用作为参考, 特别是对于载体)。其他适合的表达和/或整合载体的实例提供于Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人编, 1987, Supplement 30, section 7.7.18); van den Hondel等人, Bennett and Lasure (编) *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press pp. 396-428, 1991; 以及美国专利号5,874,276, 其每篇都在此通过整体引用作为参考, 特别是对于载体。特别有用的载体包括pFB6、pBR322、PUC18、pUC 100和pENTR/D。

[0205] 在一些实施方式中, 异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸有效连接在真菌宿主细胞中显示出转录活性的适当的启动子。启动子可源自一种或多种编码宿主内源或异源的多肽的核酸。在一些实施方式中, 启动子可用于木霉宿主。启动子的适当的非限制性实例包括cbh1、cbh2、egl1、egl2、pepA、hfb1、hfb2、xyn1, 和amy。在一些实施方式中, 启动子是宿主细胞天然的启动子。例如, 在一些实施方式中, 当里氏木霉是宿主时, 启动子是天然里氏木霉启动子。在一些实施方式中, 启动子是里氏木霉cbh1, 它是诱导型启动子并且以登录号D86235保藏于GenBank, 其在此通过整体引用作为参考, 特别是对于启动子。在一些实施方式中, 启动子是真菌宿主细胞异源的启动子。有用的启动子的其他实例包括来自泡盛曲霉 (*A. awamori*) 和黑曲霉 (*A. niger*) 葡糖淀粉酶 (glaA) 基因的启动子 (Nunberg等人, *Mot Cell Biol.* 4:2306-2315, 1984和Boel等人, *EMBO J.* 3:1581-1585, 1984, 其每篇都在此通过整体引用作为参考, 特别是对于启动子); 黑曲霉 $\alpha$ 淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉酶、里氏木霉xln 1和里氏木霉纤维二糖水解酶1的基因的启动子 (EP 137280, 其在此通过整体引用作为参考, 特别是对于启动子)。

[0206] 在一些实施方式中, 表达载体也包括终止序列。终止控制区也可源自宿主细胞天然的多重基因。在一些实施方式中, 终止序列和启动子序列源自相同来源。在另一实施方式中, 终止序列是宿主细胞内源的。特别适合的终止子序列是源自木霉菌株 (例如里氏木霉) 的cbh1。其他有用的真菌终止子包括来自黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶核酸的终止子 (Nunberg等人, *Mot Cell Biol.* 4:2306-2315, 1984和Boel等人, *EMBO J.* 3:1581-1585, 1984; 其每篇都在此通过整体引用作为参考, 特别是对于真菌终止子)。任选地, 可包括终止位点。对于多肽的有效表达, 编码该多肽的DNA通过起始密码子而有效连接至选择的表达控制区以便表达导致适当信使RNA的形成。

[0207] 在一些实施方式中, 启动子、编码区和终止子都源自待表达的异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸。在一些实施方式中, 异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸的编码区插入通用表达载体以便其处在表达构建体启动子和终止子序列的转录控制下。在一些实施方式中, 基因或其部分插入到强cbh1启动子的下游。

[0208] 可以使用标准技术 (Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1982, 其在此通过整体引用作为参考, 特别是对于适当DNA序列的筛选和载体的构建) 将异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸插入载体, 如表达载体。用于连接包含目的核酸 (例如异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸)、启动子、终止子或其他序列的DNA构建体以及将它们插入适当载体的方法是本领域公知的。例如, 可以使用限制性酶来

切割异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸和载体。然后,可以将切割下的异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸的相容末端和切割下的载体相连。连接通常是在常规限制性位点处连接来完成。如果不存在此种位点,根据常规实践使用合成的寡核苷酸接头(参见,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor,1989以及Bennett和Lasure,More Gene Manipulations in Fungi,Academic Press,San Diego,pp 70-76,1991,其在此通过整体引用作为参考,特别是对于寡核苷酸接头)。此外,可以使用已知的重组技术(例如Invitrogen Life Technologies,Gateway Technology)来构建载体。

[0209] 在一些实施方式中,可能想要以远高于目前在天然发生的细胞中发现的水平来过表达异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸。这一结果可通过将编码那些多肽的核酸选择性地克隆到多拷贝质粒或将那些核酸放在强诱导型或组成型启动子下而实现。过表达想要的多肽的方法是常见的并且是分子生物学领域公知的,并且实例可见于Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor,1989,其在此通过整体引用作为参考,特别是对于克隆技术)。

[0210] 下面的来源包括根据本发明有用的其他通用方法学的描述:Kreigler, Gene Transfer and Expression;A Laboratory Manual,1990和Ausubel等人编,Current Protocols in Molecular Biology,1994,其每篇都在此通过整体引用作为参考,特别是对于分子生物学和克隆技术)。

[0211] 示例性源生物

[0212] 异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸(以及它们的编码多肽)可以获自任何天然含有异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径核酸的生物。如上所指出,通过多种生物,如细菌、酵母、植物和动物而天然形成异戊二烯。生物含有用于生产异戊二烯的MVA途径、DXP途径或MVA和DXP途径两者(图19)。因此,DXS核酸可以获自,例如任何含有DXP途径或含有MVA和DXP途径两者的生物。IDI和异戊二烯合酶核酸可以获自,例如任何含有MVA途径、DXP途径或MVA和DXP途径两者的生物。MVA途径核酸可以获自,例如任何含有MVA途径或MVA和DXP途径两者的生物。

[0213] 在一些实施方式中,异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸的核酸序列与由自然界中任何下述生物所产生的核酸序列相同。在一些实施方式中,异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径多肽的氨基酸序列与由自然界中任何下述生物所产生的多肽序列相同。在一些实施方式中,异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸或多肽是源自在此所述的任何生物的突变核酸或多肽。如在此使用,“源自”指被导入一或多个突变的核酸或多肽来源。例如,“源自植物多肽”的多肽指通过向野生型植物多肽的序列(即,天然发生的序列)导入一或多个突变所产生的目的多肽。

[0214] 在一些实施方式中,源生物是真菌,其实例是曲霉种如米曲霉和黑曲霉,酵母种如酿酒酵母,裂殖酵母(Schizosaccharomyces)种如粟酒裂殖酵母(S.pombe),和木霉种如里氏木霉。在一些实施方式中,源生物是丝状真菌细胞。术语“丝状真菌”指真菌亚门的所有丝状形式(参见,Alexopoulos,C.I.(1962),Introductory Mycology,Wiley,New York)。这些真菌特征为营养菌丝体,其细胞壁由几丁质、纤维素和其他复杂多糖所构成。丝状真菌在形态、生理和遗传上与酵母不同。丝状真菌的营养生长是菌丝延伸并且碳代谢是专性有氧的。

丝状真菌的亲本细胞可为下述物种的细胞：木霉（如里氏木霉，红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*) 的无性形态，以前归类为 *T.longibrachiatum*、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、康氏木霉 (*Trichoderma koningii*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)）(Sheir-Neirs 等人, *Appl.Microbiol.Biotechnol* 20:46-53,1984;ATCC No.56765和ATCC No.26921)；青霉属 (*Penicillium* sp.)，腐质霉属 (*Humicola* sp.)（如特异腐质霉 (*H.insolens*)、疏毛腐质霉 (*H.lanuginose*) 或灰色腐质霉 (*H.grisea*)）；金孢霉属 (*Chrysosporium* sp.)（如 *C.iuacknowense*)、*Gliocladium* sp.、曲霉属（如米曲霉、黑曲霉、酱油曲霉 (*A.sojae*)、日本曲霉 (*A.japonicus*)、构巢曲霉 (*A.nidulans*) 或泡盛曲霉 (*A.awamori*)）(Ward 等人, *Appl.Microbiol.Biotechnol*.39:7380743,1993和Goedegebuur 等人, *Genet* 41:89-98,2002)、镰孢 (*Fusarium* sp.)、（如粉红镰孢 (*F.roseum*)、赤禾镰孢 (*F.graminum*)、*F.cerealis*、尖镰孢 (*F.oxysporum*) 或 *F.venenatum*)、脉孢菌 (*Neurospora* sp.)、（如粗糙脉孢菌 (*N.crassa*)）、肉座菌 (*Hypocrea* sp.)、毛霉菌 (*Mucor* sp.)、（如米黑毛霉 (*M.miehei*)）、根霉菌 (*Rhizopus* sp.) 和 *Emericella* sp.（也参见 Innis 等人, *Sci.*228:21-26,1985），但不限于此。术语“*Trichoderma*”或“*Trichoderma* sp.”或“*Trichoderma* spp.”指任何以前或目前被归类为木霉属的真菌属。

[0215] 在一些实施方式中，真菌是构巢曲霉、泡盛曲霉、米曲霉、棘孢曲霉 (*A.aculeatus*)、黑曲霉、日本曲霉、里氏木霉、绿色木霉、尖镰孢或腐皮镰孢 (*F.solani*)。曲霉菌株公开于 Ward 等人, *Appl.Microbiol.Biotechnol*.39:738-743,1993和Goedegebuur 等人, *Curr Gene* 41:89-98,2002,其每篇都在此通过整体引用作为参考，特别是对于真菌。在具体实施方式中，真菌是木霉属的菌株，例如里氏木霉的菌株。里氏木霉的菌株是已知的并且非限制性实例包括 ATCC No.13631, ATCC No.26921, ATCC No.56764, ATCC No.56765, ATCC No.56767 和 NRRL 15709,其每篇都在此通过整体引用作为参考，特别是对于里氏木霉菌株。在一些实施方式中，宿主菌株是 RL-P37 的衍生物。RL-P37 公开于 Sheir-Neiss 等人, *Appl.Microbiol.Biotechnology* 20:46-53,1984,其在此通过整体引用作为参考，特别是对于里氏木霉菌株。

[0216] 在一些实施方式中，源生物是酵母，例如酿酒酵母，裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces* sp.)，毕氏酵母 (*Pichia* sp.) 或假丝酵母 (*Candida* sp.)。

[0217] 在一些实施方式中，源生物是细菌，例如芽孢杆菌菌株，如地衣芽孢杆菌或枯草杆菌，泛菌 (*Pantoea*) 菌株如柠檬泛菌 (*P.citrea*)，假单胞菌 (*Pseudomonas*) 菌株如产碱假单胞菌 (*P.alcaligenes*)，链霉菌 (*Streptomyces*) 菌株如白色链霉菌 (*S.albus*)、浅青紫链霉菌 (*S.lividans*) 或锈赤链霉菌 (*S.rubiginosus*)，或埃希氏菌菌株如大肠杆菌。

[0218] 如在此所述，“芽孢杆菌属”包括如本领域技术人员已知的“芽孢杆菌”属中的所有种，包括但不限于枯草杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌 (*B.lentus*)、短小芽孢杆菌 (*B.brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B.stearothermophilus*)、嗜碱性芽孢杆菌 (*B.alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B.amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B.clausii*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B.halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B.megaterium*)、凝固芽孢杆菌 (*B.coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B.circulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*B.lautus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B.thuringiensis*)。已经意识到该芽孢杆菌属持续经历分类学重组。因此，该属意在包括已经被重分类的种，包括但不限于如嗜热脂肪芽孢杆菌（现称作嗜热脂肪土芽孢杆菌

(*Geobacillus stearothermophilus*)) 的生物。认为在氧气存在下,抗性内孢子的生产是芽孢杆菌属的限定特征,但是这一特征也用于近来命名的脂环酸杆菌属(*Alicyclobacillus*)、双芽孢杆菌属(*Amphibacillus*)、硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、短芽孢杆菌(*Brevibacillus*)、*Filobacillus*、薄壁芽孢杆菌属(*Gracilibacillus*)、喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、需盐芽孢杆菌属(*Salibacillus*)、热杆菌属(*Thermobacillus*)、脲芽孢杆菌属(*Ureibacillus*)和枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)。

[0219] 在一些实施方式中,源生物是革兰氏阳性细菌。非限制性实例包括链霉菌(如,白色链霉菌、浅青紫链霉菌、天蓝色链霉菌(*S.coelicolor*)或灰色链霉菌(*S.griseus*)和芽孢杆菌菌株。在一些实施方式中,源生物是革兰氏阴性细菌,如大肠杆菌或假单胞菌。

[0220] 在一些实施方式中,源生物是植物,如来自豆科(*Fabaceae*)的植物,如蝶形花亚科。在一些实施方式中,源生物是野葛,杨(如银白杨x *tremula* CAC35696或银白杨)(Sasaki等人,FEBS Letters 579(11):2514-2518,2005),白杨(如*Populus tremuloides*),或夏栎(*Quercus robur*)。

[0221] 在一些实施方式中,源生物是藻类,如绿藻、红藻、灰绿藻(*glaucophyte*)、*chlorarachniophyte*、眼虫、*chromista*或沟鞭藻。

[0222] 在一些实施方式中,源生物是蓝藻,如根据形态学而被分类为下述组的蓝藻:色球藻目(*Chroococcales*)、宽球藻目(*Pleurocapsales*)、颤藻目(*Oscillatoriales*)、念珠藻目(*Nostocales*)或真枝藻目(*Stigonematales*)。

[0223] 示例性宿主细胞

[0224] 可以使用多种宿主细胞来表达异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径多肽并按所要求保护的发明的方法来生产异戊二烯。示例性的宿主细胞包括来自在前面标题为“示例性源生物”部分所列出的任何生物的细胞。宿主细胞可为天然产生异戊二烯的细胞或不天然产生异戊二烯的细胞。在一些实施方式中,宿主细胞天然使用DXP途径生产异戊二烯,并且加入异戊二烯合酶、DXS和/或IDI核酸以增强使用这一途径的异戊二烯生产。在一些实施方式中,宿主细胞天然使用MVA途径生产异戊二烯,并且加入异戊二烯合酶和/或一或多种MVA途径核酸以增强使用这一途径的异戊二烯生产。在一些实施方式中,宿主细胞天然使用DXP途径生产异戊二烯,并且加入一或多种MVA途径核酸来使用DXP途径以及MVA途径的部分或者全部来生产异戊二烯。在一些实施方式中,宿主细胞天然使用DXP和MVA两种途径生产异戊二烯,并且加入一或多种异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸以增强使用这些途径中一种或两种的异戊二烯生产。

[0225] 示例性转化方法

[0226] 可以使用用于表达编码的异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径多肽的标准技术将异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径核酸或含有它们的载体插入宿主细胞(例如,在此所述的植物细胞、真菌细胞、酵母细胞或细菌细胞)。可以使用诸如转化、电穿孔、核微注射、转导、转染(如,脂转染介导的或DEAE-Dextrin介导的转染或使用重组噬菌体病毒的转染)、磷酸钙DNA沉淀孵育、DNA包被微粒的高速轰击以及原生质体融合这些技术进行DNA构建体或载体向宿主细胞的导入。通用的转化技术是本领域已知的(参见例如,Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编,Chapter 9,1987;Sambrook等人,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor, 1989; 和 Campbell 等人, Curr. Genet. 16: 53-56, 1989, 其各在此通过整体引用作为参考, 特别是对于转化方法)。异源多肽在木霉菌中的表达描述于美国专利号 6,022,725; 美国专利号 6,268,328; 美国专利号 7,262,041; WO2005/001036; Harkki 等人, Enzyme Microb. Technol. 13: 227-233, 1991; Harkki 等人, Bio Technol. 7: 596-603, 1989; EP 244,234; EP 215,594; 和 Nevalainen 等人, The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and heterologous Genes, 在 Molecular Industrial Mycology, Leong 和 Berka 编, Marcel Dekker Inc., NY pp.129-148, 1992, 其各在此通过整体引用作为参考, 特别是对于转化和表达方法)。对于曲霉菌株的转化也参考 Cao 等人, Sci. 9: 991-1001, 2000; EP 238023; 和 Yelton 等人, Proceedings. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474, 1984 (其各在此通过整体引用作为参考, 特别是对于转化方法)。所导入的核酸可整合到染色体 DNA 或者作为染色体外复制序列维持。

[0227] 任何本领域已知的方法可用于筛选转化体。在一个非限制性实例中, 包括 amdS 标记的稳定转化体与不稳定转化体的区别在于它们更快的生长速率以及在含有乙酰胺的固体培养基上形成平滑而非齿状轮廓的圆形菌落。此外, 在通过于固体非选择性培养基 (例如缺乏乙酰胺的培养基) 上生长转化体来进行稳定性的进一步检测的情形下, 从这一培养基收获孢子, 并测定随后在含有乙酰胺的选择培养基上萌发并生长的这些孢子的百分数。

[0228] 在一些实施方式中, 通过如下方法来转化真菌细胞, 该方法涉及原生质体形成以及原生质体转化以及以已知方式再生细胞壁。在一个具体实施方式中, 制备木霉菌用来转化包括从真菌菌丝体制备原生质体 (参见, Campbell 等人, Curr. Genet. 16: 53-56, 1989, 其在此通过整体引用作为参考, 特别是对于转化方法)。在一些实施方式中, 菌丝体获自萌发的营养孢子。用消化细胞壁的酶来处理菌丝体, 得到原生质体。然后通过向悬浮培养基中渗透压稳定剂的存在来保护原生质体。这些稳定剂包括山梨醇、甘露醇、氯化钾、硫酸镁等。通常, 这些稳定剂的浓度在 0.8M 和 1.2M 之间变化。希望使用在悬浮培养基中约 1.2M 的山梨醇溶液。

[0229] DNA 向宿主木霉菌菌株的摄取取决于钙离子浓度。通常, 在摄取溶液中使用约 10mM  $\text{CaCl}_2$  到 50mM  $\text{CaCl}_2$ 。除了摄取溶液中的钙离子, 通常包括的其他化合物是缓冲系统, 如 TE 缓冲液 (10mM Tris, pH 7.4; 1mM EDTA) 或 10mM MOPS, pH 6.0 缓冲液 (吗啉丙磺酸) 和聚乙二醇 (PEG)。尽管不希望受任何具体理论所限, 但相信聚乙二醇用于融合细胞膜, 从而允许培养基中的内容物被送到木霉菌菌株的细胞质中并且质粒 DNA 被转入核中。这一融合经常留下多拷贝的整合到宿主染色体的质粒 DNA。

[0230] 通常, 在转化中使用含有木霉菌原生质体或细胞的悬浮液, 这些原生质体或细胞以  $10^5$  至  $10^7/\text{mL}$  (如  $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) 的密度进行了通透性处理。在适当溶液 (如 1.2M 山梨醇和 50mM  $\text{CaCl}_2$ ) 中 100 $\mu\text{L}$  体积的这些原生质体或细胞与想要的 DNA 混合。通常, 向摄取溶液中加入高浓度 PEG。可将 0.1 至 1 体积的 25% 的 PEG 4000 加入原生质体悬浮液中。在一些实施方式中, 约 0.25 体积加入原生质体悬浮液。也可将诸如二甲亚砜、肝素、亚精胺、氯化钾等添加剂加入摄取溶液, 帮助转化。对于其他真菌宿主细胞可以用类似的方法 (参见例如, 美国专利号 6,022,725 和 6,268,328, 其每篇都在此通过整体引用作为参考, 特别是对于转化方法)。

[0231] 通常,然后在约0℃培养混合物10至30分钟的时间。然后向混合物加入另外的PEG以进一步增强想要的核酸序列的摄取。通常以转化混合物体积的5至15倍体积来添加25%的PEG 4000;然而,更大或更小的体积也可为适合的。希望25%的PEG 4000是转化混合物体积的约10倍。在加入PEG后,在室温或在冰上培养该转化混合物,然后加入山梨醇和CaCl<sub>2</sub>溶液。然后向熔化的生长培养基等份进一步加入原生质体悬浮液。当生长培养基包括生长选择(如乙酰胺或抗生素)时,其仅允许转化体生长。

[0232] 可根据常规方法进行细菌细胞的转化,如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,1982所述,其在此通过整体引用作为参考,特别是对于转化方法。

[0233] 示例性细胞培养基

[0234] 本发明也包括产生异戊二烯的培养细胞或细胞群。“培养细胞”指在允许细胞经历一或多次细胞分裂的溶液(如细胞培养基)中的两种或更多种细胞。“培养细胞”不包括这样的植物细胞,其是含有已经分化成植物组织的细胞的活的多细胞植物的一部分。在多种实施方式中,细胞培养物包括至少或约10、20、50、100、200、500、1,000、5,000、10,000或更多的细胞。

[0235] 任何碳源可以用于培养宿主细胞。术语“碳源”指能够被宿主细胞或生物所代谢的一种或多种含碳化合物。例如,用于培养宿主细胞的细胞培养基可包括任何适于维持宿主细胞存活或生长的碳源。

[0236] 在一些实施方式中,碳源是碳水化合物(例如单糖、二糖、寡糖或多糖)、转化糖(例如,酶促处理的蔗糖浆)、丙三醇、甘油(例如,生物柴油或制造肥皂工艺的甘油副产物)、二羟丙酮、单碳源、油(例如,植物油如玉米、棕榈或大豆油)、乙酸盐/酯、动物脂肪、动物油、脂肪酸(例如,饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、或多不饱和脂肪酸)、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、多肽(例如,微生物或植物蛋白或肽)、可再生碳源(例如,生物量碳源,如水解的生物量碳源)、酵母提取物、来自酵母提取物的组分,聚合物,酸,醇,醛,酮,氨基酸,琥珀酸,乳酸,乙酸,乙醇、或者前述两种或更多种的任意组合。在一些实施方式中,碳源是光合合成的产物,包括但不限于葡萄糖。在一些实施方式中,碳水化合物是木糖或葡萄糖。

[0237] 示例性单糖包括葡萄糖和果糖;示例性寡糖包括乳糖和蔗糖,而示例性多糖包括淀粉和纤维素。示例性碳水化合物包括C<sub>6</sub>糖(例如果糖、甘露糖、半乳糖或葡萄糖)和C<sub>5</sub>糖(例如木糖或阿拉伯糖)。在一些实施方式中,细胞培养基包括碳水化合物以及碳水化合物之外的碳源(例如丙三醇、甘油、二羟丙酮、单碳源、油、动物脂肪、动物油、脂肪酸、脂类、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源、或酵母提取物的组分)。在一些实施方式中,细胞培养基包括碳水化合物以及多肽(例如微生物或植物蛋白或肽)。在一些实施方式中,微生物多肽是来自酵母或细菌的多肽。在一些实施方式中,植物多肽是来自大豆、玉米、油菜、麻风树、棕榈树、花生、向日葵、椰子、芥菜、油菜籽、棉籽、棕榈仁、橄榄、红花、芝麻、或亚麻籽的多肽。

[0238] 在一些实施方式中,碳水化合物的浓度为至少或约每升培养液5克(g/L,其中,培养液的体积包括细胞培养基的体积和细胞的体积),例如至少或约10、15、20、30、40、50、60、80、100、150、200、300、400或更多g/L。在一些实施方式中,碳水化合物的浓度在约50和约

400g/L之间,例如约100和约360g/L之间,约120和约360g/L之间,或约200和约300g/L之间。在一些实施方式中,碳水化合物的这一浓度包括在宿主细胞培养之前和/或培养期间,加入的碳水化合物的总量。

[0239] 示例性脂类是任何含有一种或多种脂肪酸的物质,所述脂肪酸是饱和、不饱和或分支的C4以及以上的脂肪酸。

[0240] 示例性油是室温为液态的脂类。在一些实施方式中,脂类含有一种或多种C4或更高的脂肪酸(例如,含有具有四个或更多个碳的一种或多种饱和、不饱和或分支脂肪酸)。在一些实施方式中,油获自大豆、玉米、油菜、麻风树、棕榈树、花生、向日葵、椰子、芥菜、油菜籽、棉籽、棕榈仁、橄榄、红花、芝麻、亚麻籽、产油微生物细胞、乌桕、或者是前述两种或更多种的任一组合。

[0241] 示例性脂肪酸包括通式为RCOOH的化合物,其中“R”是烃。示例性不饱和脂肪酸包括其中“R”包括至少一个碳-碳双键的化合物。示例性不饱和脂肪酸包括但不限于油酸、11-十八碳烯酸、亚油酸、棕榈油酸以及花生四烯酸。示例性多不饱和脂肪酸包括化合物,其中“R”包括多个碳-碳双键。示例性饱和脂肪酸包括化合物,其中“R”是饱和脂族基团。在一些实施方式中,碳源包括一或多种C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>脂肪酸,例如C<sub>12</sub>饱和脂肪酸、C<sub>14</sub>饱和脂肪酸、C<sub>16</sub>饱和脂肪酸、C<sub>18</sub>饱和脂肪酸、C<sub>20</sub>饱和脂肪酸、或C<sub>22</sub>饱和脂肪酸。在示例性实施方式中,脂肪酸是棕榈酸。在一些实施方式中,碳源是脂肪酸(例如不饱和脂肪酸)的盐、脂肪酸(例如不饱和脂肪酸)的衍生物、或者脂肪酸(例如不饱和脂肪酸)衍生物的盐。适当的盐包括但不限于锂盐、钾盐、钠盐等。甘油二酯和甘油三酯是丙三醇的脂肪酸酯。

[0242] 在一些实施方式中,脂类、油、脂肪、脂肪酸、甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯的浓度是至少或约每升培养液1克(g/L,其中培养液的体积包括细胞培养基的体积和细胞的体积),例如至少或约5、10、15、20、30、40、50、60、80、100、150、200、300、400或更多g/L。在一些实施方式中,脂类、油、脂肪、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯的浓度是约10和约400g/L之间,例如约25和约300g/L之间,约60和约180g/L之间,或约75和约150g/L之间。在一些实施方式中,浓度包括在培养宿主细胞之前和/或期间添加的脂类、油、脂肪、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯的总量。在一些实施方式中,碳源包括(i)脂类、油、脂肪、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯和(ii)碳水化合物,如葡萄糖。在一些实施方式中,脂类、油、脂肪、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯与碳水化合物基于碳的比率是约1:1(即每个碳水化合物碳对应脂类、油、脂肪、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯中的一个碳)。在具体实施方式中,脂类、油、脂肪、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯的量为约60和约180g/L之间,而碳水化合物的量为约120和约360g/L之间。

[0243] 示例性微生物多肽碳源包括来自酵母或细菌的一或多种多肽。示例性植物多肽碳源包括来自大豆、玉米、油菜、麻风树、棕榈树、花生、向日葵、椰子、芥菜、油菜籽、棉籽、棕榈仁、橄榄、红花、芝麻、或亚麻籽的一或多种多肽。

[0244] 示例性的可再生碳源包括奶酪乳清渗透物(cheese whey permeate)、玉米浆、甜菜糖浆、大麦芽、和来自任何前述物质的组分。示例性可再生碳源也包括存在于生物量中的乙酸盐/酯、葡萄糖、己糖、戊糖和木糖,生物量如玉米、柳枝稷、甘蔗、发酵工艺的细胞废物,以及来自大豆、玉米、或小麦碾磨的蛋白副产物。在一些实施方式中,生物量碳源是木质纤维素、半纤维素或纤维素物质,例如但不限于草、小麦、麦秸、甘蔗渣、甘蔗渣、软木材木浆、

玉米、玉米穗轴或外壳、玉米仁、来自玉米仁的纤维、玉米秸秆、柳枝稷、稻壳产品、或来自谷物(如玉米、高粱、黑麦、小黑麦(triticale)、大麦、小麦和/或酒糟)的湿或干碾磨的副产物。示例性纤维素物质包括木、纸和纸浆废物、草本植物和果浆。在一些实施方式中,碳源包括任何植物部分,例如茎、谷物、根或块茎。在一些实施方式中,将任何下述植物的全部或部分用作碳源:玉米、小麦、黑麦、高粱、小黑麦、水稻、粟、大麦、木薯、豆类例如豆和豌豆、马铃薯、甜薯、香蕉、甘蔗、和/或树薯粉。在一些实施方式中,碳源是生物量水解物,如包括木糖和葡萄糖或包括蔗糖和葡萄糖的生物量水解物。

[0245] 在一些实施方式中,可再生碳源(例如生物量)在添加到细胞培养基之前被预处理。在一些实施方式中,预处理包括酶预处理、化学预处理、或酶和化学预处理两者的组合(参见,例如Farzaneh等人,Bioresource Technology 96(18):2014-2018,2005;美国专利号6,176,176;美国专利号6,106,888;其每篇都在此通过整体引用作为参考,特别是对于可再生碳源的预处理)。在一些实施方式中,可再生碳源在添加到细胞培养基之前被部分或完全水解。

[0246] 在一些实施方式中,可再生碳源(例如玉米秸秆)在添加到细胞培养基之前经历氨纤维膨胀(AFEX)预处理(参见例如,Farzaneh等人,Bioresource Technology 96(18):2014-2018,2005)。在AFEX预处理期间,可再生碳源在中等温度(例如约60至约100℃)和高压(例如约250至约300psi)下受无水液态氨处理约5分钟。然后快速释放压力。在这一过程中,木质素溶解、半纤维素水解、纤维素解晶作用的组合的化学和物理效应,以及增加的表面积使得纤维素和半纤维素几乎完全酶促转化成可发酵糖。AFEX预处理具有可以回收几乎全部的氨并再利用,同时将剩余物用作下游过程中的微生物的氮源的优点。此外,AFEX预处理不需要冲洗流。因此,在AFEX处理后的干物质回收基本上为100%。AFEX基本上是干-干工艺。经处理的可再生碳源是长期稳定的并且可以在酶促水解或发酵工艺中以极高固体负载来供料。纤维素和半纤维素在AFEX工艺中得到很好地保留,只有很少或没有降解。不需要在经历AFEX预处理的可再生碳源酶促水解之前进行中和。AFEX处理的碳源的酶促水解产生清洁的糖流用于随后的发酵。

[0247] 在一些实施方式中,碳源(例如可再生碳源)的浓度相当于至少或约0.1、0.5、1、1.5、2、3、4、5、10、15、20、30、40、或50%的葡萄糖(w/v)。可以使用标准HPLC方法,用葡萄糖作为参考来测量由碳源产生的葡萄糖的量,从而确定葡萄糖的当量。在一些实施方式中,碳源(例如可再生碳源)的浓度相当于约0.1和约20%之间的葡萄糖,例如约0.1和约10%之间的葡萄糖,约0.5和约10%之间的葡萄糖,约1和约10%之间的葡萄糖,约1和约5%之间的葡萄糖,或约1和约2%之间的葡萄糖。

[0248] 在一些实施方式中,碳源包括酵母提取物或者酵母提取物的一种或多种组分。在一些实施方式中,酵母提取物的浓度为至少每升培养液1克酵母提取物(g/L,其中培养液的体积包括细胞培养基的体积和细胞的体积),例如至少或约5、10、15、20、30、40、50、60、80、100、150、200、300或更多g/L。在一些实施方式中,酵母提取物的浓度是约1和约300g/L之间,例如约1和约200g/L之间,约5和约200g/L之间,约5和约100g/L之间,或约5和约60g/L之间。在一些实施方式中,浓度包括在培养宿主细胞之前和/或期间添加的酵母提取物的总量。在一些实施方式中,碳源包括酵母提取物(或其一种或多种组分)和另一碳源如葡萄糖。在一些实施方式中,酵母提取物和另一碳源的比率为约1:5,约1:10,或约1:20(w/w)。



[0249] 此外,碳源也可作为单碳底物,如二氧化碳或甲醇。来自单碳源(例如甲醇、甲醛或甲酸酯)的丙三醇生产已经报道于甲基营养酵母中(Yamada等人, *Agric. Biol. Chem.*, 53 (2) 541-543, 1989, 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于碳源)和细菌中(Hunter等人, *Biochemistry*, 24, 4148-4155, 1985, 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于碳源)。这些生物可以同化单碳化合物,氧化态从甲烷到甲酸酯改变,并产生丙三醇。碳同化的途径可以通过核酮糖单磷酸,通过丝氨酸或通过木酮糖单磷酸(Gottschalk, *Bacterial Metabolism*, 第二版, Springer-Verlag: New York, 1986, 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于碳源)。核酮糖单磷酸途径包括甲酸酯与核酮糖-5-磷酸缩合以形成六碳糖,该六碳糖变成果糖并最终变成三碳产物甘油醛-3-磷酸。同样地,丝氨酸途径通过亚甲基四氢叶酸将单碳化合物同化到糖酵解途径。

[0250] 除了一碳和二碳底物,也已知甲基营养生物利用许多含有其他含碳的化合物,如甲胺、葡糖胺以及多种氨基酸用于代谢活性。例如,已知甲基营养酵母利用来自甲胺的碳以形成海藻糖或丙三醇(Bellion等人, *Microb. Growth Cl Compd.*, [mt. Symp.], 第7版, 415-32. 编者: Murrell等人, 出版: Intercept, Andover, UK, 1993, 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于碳源)。类似地,众多假丝酵母(*Candida*)种代谢丙氨酸或油酸(Sulter等人, *Arch. Microbiol.* 153 (5), 485-9, 1990, 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于碳源)。

[0251] 在一些实施方式中,在含有生理盐和营养物的标准培养基中培养细胞(见例如, Pourquie, J. 等人, *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, Aubert等人编, Academic Press, pp. 71-86, 1988和 Ilmen等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1298-1306, 1997, 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于细胞培养基)。示例性的生长培养基是常规商业制备的培养基如Luria Bertani (LB) 培养液, Sabouraud Dextrose (SD) 培养液, 或酵母培养基(YM) 培养液。也可使用其他限定的或合成的生长培养基,并且用于特定宿主细胞生长的适当培养基是微生物或发酵科学领域技术人员已知的。

[0252] 除了适当的碳源,希望细胞培养基含有适当的矿物、盐、辅因子、缓冲液和本领域技术人员已知的适于培养物生长或增强异戊二烯生产的其他组分(参见例如, WO 2004/033646以及其中引用的文献和WO 96/35796以及其中引用的文献,其每篇都在此通过整体引用作为参考,特别是对于各自细胞培养基和细胞培养条件)。在异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径核酸处于诱导型启动子控制下的一些实施方式中,希望诱导剂(例如糖、金属盐或抗微生物剂)以对于诱导异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径多肽表达有效的浓度添加到培养基中。在一些实施方式中,细胞培养基具有抗生素(例如卡那霉素),其对应于具有一或多种DXS、IDI和/或MVA途径核酸的载体上的抗生素抗性核酸(例如卡那霉素抗性核酸)。

[0253] 示例性细胞培养条件

[0254] 适于维持并生长细菌培养物的材料和方法是本领域公知的。示例性的技术可见于Manual of Methods for General Bacteriology Gerhardt等人编, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994)或Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第二版, (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于细胞培养技术。在一些实施方式中,在允许表达由插入到宿主细胞的核酸所编码的异戊二烯合酶、DXS、IDI和/或MVA途径多肽中一种或多

种的条件下,在培养基中培养细胞。

[0255] 可以使用标准细胞培养条件来培养细胞(参见例如WO 2004/033646以及其中引用的文献,其每篇都在此通过整体引用作为参考,特别是对于细胞培养和发酵条件)。细胞在适当温度、气体混合物和pH(例如约20至约37℃,约6%至约84%CO<sub>2</sub>,以及约5至约9的pH)下生长并维持。在一些实施方式中,细胞在35℃下于适当的细胞培养基中生长。在一些实施方式中,例如,培养物在接近28℃下于适当培养基中在摇动培养或发酵罐中培养直到达到想要的异戊二烯生产。在一些实施方式中,用于发酵的pH范围为约pH 5.0至约pH 9.0之间(例如约pH 6.0至约pH 8.0之间或pH 6.5至约pH 7.0之间)。根据宿主细胞的要求,反应可在需氧、缺氧或厌氧的条件下进行。对于给定丝状真菌的示例性培养条件是本领领域已知的并且可见于科学文献和/或来自真菌源如美国典型培养物保藏中心和真菌遗传种源中心(Fungal Genetics Stock Center)。

[0256] 在多种实施方式中,使用任何已知的发酵模式,如分批、补料分批或连续发酵方法来培养细胞。在一些实施方式中,使用发酵的分批方法。经典的分批发酵是封闭系统,其中在发酵开始时设定培养基的组成并且该组成在发酵期间不进行人工改变。因此,在发酵开始时,用想要的宿主细胞接种细胞培养基并且允许发酵而不向系统添加任何物质。然而,通常,“分批”发酵是对于添加碳源而言的分批并且经常尝试控制诸如pH和氧浓度的因素。在分批系统中,系统的代谢物和生物量组成持续改变直到发酵停止时。在分批培养物中,细胞稳定地经过静态停滞期到高生长对数期并最终至生长率减小或停止的稳定期。在一些实施方式中,对数期的细胞负责大部分的异戊二烯生产。在一些实施方式中,稳定期的细胞生产异戊二烯。

[0257] 在一些实施方式中,使用标准分批系统的变型,例如补料分批(Fed-Batch)系统。补料分批发酵方法包括典型的分批系统,只是随着发酵进展而以增量添加碳源。当分解代谢产物阻遏倾向于抑制细胞代谢,以及想要细胞培养基中具有有限量的碳源时,补料分批系统是有用的。可以有限量或过量的碳源(例如葡萄糖)来进行补料分批发酵。对补料分批系统中实际碳源浓度的测量很难,并且因此基于可测因子如pH、溶氧和废气(如CO<sub>2</sub>)分压的改变来进行估算。分批以及补料分批发酵是本领域普遍且公知的,并且实例可见于Brock, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 第二版, (1989) Sinauer Associates, Inc., 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于细胞培养和发酵条件。

[0258] 在一些实施方式中,使用连续发酵方法。连续发酵是开放系统,其中向生物反应器中连续添加限定的发酵培养基并且同时除去等量的条件培养基用于处理。连续发酵通常使培养物维持在恒定的高密度,而细胞主要处于对数期生长。

[0259] 连续发酵允许调控影响细胞生长或异戊二烯生产的一个因素或任何数量的因素。例如,一种方法将限制营养物如碳源或氮水平维持在固定比率并且允许所有其他参数适度。在其他系统中,可以连续改变影响生长的许多因素同时保持细胞浓度(如培养基浑浊度所测量的浓度)恒定。连续系统致力于维持稳态生长条件。因此由于被丢掉的培养基,在发酵中,细胞损失相对于细胞生长速率保持平衡。调控用于连续发酵工艺的营养物和生长因子的方法以及使产物形成速率最大化的技术是工业微生物领域公知的并且多种方法详述于Brock, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 第二版, (1989) Sinauer Associates, Inc., 其在此通过整体引用作为参考,特别是对于细胞培养和发酵条

件。

[0260] 在一些实施方式中,细胞固定在基质上作为完整细胞催化剂并经历用于异戊二烯生产的发酵条件。

[0261] 在一些实施方式中,将多瓶液体培养物放置在摇床上以便将氧气引入液体并维持培养物的均一性。在一些实施方式中,使用培养箱来控制培养物生长的温度、湿度、摇速和/或其他条件。最简单的培养箱是具有可调加热器的保温箱,其通常高达~65℃。更精细的培养箱也可以包括降低温度的能力(通过冷冻),或控制湿度或CO<sub>2</sub>水平的能力。大多数培养箱包括计时器;一些也可以编程以通过不同的温度、湿度水平等来循环。培养箱可以从桌面的尺寸到小房间的尺寸来变化。

[0262] 如果需要,可以改变一部分或者所有细胞培养基以补充营养物和/或避免积累潜在的有害代谢副产物和死亡细胞。在悬浮培养的情形下,可以利用离心或过滤该悬浮培养物而从培养基分离细胞并且然后在新鲜培养基中重悬细胞。在贴壁培养的情形下,可以通过吸取和替代而直接除去培养基。在一些实施方式中,细胞培养基允许在连续培养(例如没有稀释的连续培养)中至少一部分细胞分开用于至少或约5、10、20、40、50、60、65或更多细胞分裂。

[0263] 在一些实施方式中,使用组成型或渗漏启动子(例如Trc启动子),并且不添加化合物(如IPTG)来诱导有效连接至启动子的异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸的表达。在一些实施方案中,添加化合物(如IPTG)来诱导有效连接至启动子的异戊二烯合酶、DXS、IDI或MVA途径核酸的表达。

[0264] 示例性异戊二烯生产

[0265] 在一些实施方式中,在允许细胞生产异戊二烯的条件下,于细胞培养基中培养细胞。“峰值绝对生产力”指在培养细胞特定时间段内(例如在特定发酵期间的细胞培养),在废气中异戊二烯的最大绝对量。“峰值绝对生产力时间点”指细胞培养的特定时间段内(例如在特定发酵期间的细胞培养),当废气中的异戊二烯的绝对量为最大值时的时间点。在一些实施方式中,异戊二烯量在峰值绝对生产力时间点处测量。在一些实施方式中,细胞的峰值绝对生产力约为任何在此所公开的任一异戊二烯量。

[0266] “峰值比生产力”指在细胞培养的特定时间段内(例如在特定发酵期间的细胞培养),每细胞生产的异戊二烯的最大量。“峰值比生产力时间点”指在细胞培养的特定时间段内(例如在特定发酵期间的细胞培养),当每细胞生产的异戊二烯的量为最大值时的时间点。峰值比生产力通过用总生产力除以细胞量来测定,如由在600nm处的光密度(OD<sub>600</sub>)来测定。在一些实施方式中,异戊二烯量在峰值比生产力时间点处测量。在一些实施方式中,细胞的峰值比生产力约为任何在此所公开的每细胞的异戊二烯量。

[0267] “峰值体积生产力”指在细胞培养的特定时间段内(例如,在特定发酵期间的细胞培养),每体积培养液生产的异戊二烯的最大量。“峰值比体积生产力时间点”指在细胞培养的特定时间段内(例如,在特定发酵期间的细胞培养),当每体积培养液生产的异戊二烯的量为最大值时的时间点。峰值比体积生产力通过将总生产力除以培养液体积和时间量来测定。在一些实施方式中,异戊二烯量在峰值比体积生产力时间点处测量。在一些实施方式中,细胞的峰值比体积生产力约为任何在此所公开的每体积每时间异戊二烯量。

[0268] “峰值浓度”指在细胞培养的特定时间段内(例如在特定发酵期间的细胞培养),生

产的异戊二烯的最大量。“峰值浓度时间点”指在细胞培养的特定时间段内(例如,在特定发酵期间的细胞培养),当每细胞所生产的异戊二烯的量为最大值时的时间点。在一些实施方式中,异戊二烯量在峰值浓度时间点处进行测量。在一些实施方式中,细胞的峰值浓度约为任何在此所公开的异戊二烯量。

[0269] “平均体积生产力”指在细胞培养的特定时间段内(例如在特定发酵期间的细胞培养),每体积培养液(包括细胞和细胞培养基的体积)所生产的异戊二烯的平均量。平均体积生产力通过将总生产力除以培养液体积和时间量来测定。在一些实施方式中,细胞的平均比体积生产力约为任何在此所公开的每体积每时间异戊二烯量。

[0270] “累积总生产力”指在细胞培养的特定时间段内(例如在特定发酵期间的细胞培养),生产的异戊二烯的累积总量。在一些实施方式中,测量异戊二烯的累计总量。在一些实施方式中,细胞的累计总生产力约为任何在此所公开的异戊二烯量。

[0271] 在一些实施方式中,培养的细胞以大于或约1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、12,500、20,000、30,000、40,000、50,000、75,000、100,000、125,000、150,000、188,000、或更多纳摩尔的异戊二烯/克细胞(细胞湿重)/小时(纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ )生产异戊二烯。在一些实施方式中,异戊二烯的量在约2至约200,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 之间,例如在约2至约100纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 之间、约100至约500纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约150至约500纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约500至约1,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约1,000至约2,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约2,000至约5,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约5,000至约10,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约10,000至约50,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约50,000至约100,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约100,000至约150,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、或约150,000至约200,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 之间。在一些实施方式中,异戊二烯的量在约20至约200,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 之间、约100至约5,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约200至约2,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约200至约1,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约300至约1,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约400至约1,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约1,000至约5,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约2,000至约20,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约5,000至约50,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约10,000至约100,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、约20,000至约150,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 、或约20,000至约200,000纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 。

[0272] 以纳摩尔/ $g_{wcm}/hr$ 为单位的异戊二烯的量可以按照美国专利号5,849,970所公开来测量,其在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯生产的测量。例如,使用标准气相色谱系统来分析2ml顶空(例如,来自培养物的顶空,该培养物如在32°C,在密封瓶中以200rpm摇动约3小时培养的2mL培养物)的异戊二烯,该系统为例如以正-辛烷/多孔硅胶C柱(Alitech Associates, Inc., Deerfield, Ill.)等温操作并且连接RGD2氧化汞还原气体检测器的系统(Trace Analytical, Menlo Park, CA)(参见例如,Greenberg等人,Atmos. Environ. 27A:2689-2692, 1993; Silver等人,Plant Physiol. 97:1588-1591, 1991, 其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯生产的测量)。气相色谱面积单位通过标准异戊二烯浓度校准曲线而转换成nmol异戊二烯。在一些实施方式中,以细胞湿重计,细胞克数值通过获得细胞培养物的样品的 $A_{600}$ 值,然后根据具有已知 $A_{600}$ 值的细胞培养物的湿重的校准曲线将 $A_{600}$ 值转换成细胞克数来计算。在一些实施方式中,通过假定1升具有 $A_{600}$ 值为1的培养液(包括细胞培养基和细胞)具有1克湿重细胞来估计细胞克数。该值也除以该培养物被孵育的小时数,如3小时。

[0273] 在一些实施方式中,培养细胞以大于或约1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、100,000,或更多ng的异戊二烯/克细胞(细胞湿重)/hr (ng/g<sub>wcm</sub>/h) 生产异戊二烯。在一些实施方式中,异戊二烯的量在约2至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h之间,例如约2至约100ng/g<sub>wcm</sub>/h之间,约100至约500ng/g<sub>wcm</sub>/h、约500至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约1,000至约2,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、或约2,000至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h。在一些实施方式中,异戊二烯的量在约20至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约100至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约200至约2,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约200至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约300至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、或约400至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h。以ng/g<sub>wcm</sub>/h计的异戊二烯的量可以通过将在上面讨论的以纳摩尔/g<sub>wcm</sub>/hr为单位的异戊二烯生产的值乘以68.1来计算(如下面等式5所述)。

[0274] 在一些实施方式中,培养细胞以大于或约1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000、或更多mg的异戊二烯/L培养液 (mg/L<sub>培养液</sub>,其中培养液的量包括细胞和细胞培养基的体积) 来生产累积滴定度(总量)的异戊二烯。在一些实施方式中,异戊二烯的量在约2至约5,000mg/L<sub>培养液</sub>之间,例如约2至约100mg/L<sub>培养液</sub>之间、约100至约500mg/L<sub>培养液</sub>、约500至约1,000mg/L<sub>培养液</sub>、约1,000至约2,000mg/L<sub>培养液</sub>、或约2,000至约5,000mg/L<sub>培养液</sub>。在一些实施方式中,异戊二烯的量在约20至约5,000mg/L<sub>培养液</sub>之间、约100至约5,000mg/L<sub>培养液</sub>、约200至约2,000mg/L<sub>培养液</sub>、约200至约1,000mg/L<sub>培养液</sub>、约300至约1,000mg/L<sub>培养液</sub>、或约400至约1,000mg/L<sub>培养液</sub>。

[0275] 来自摇瓶顶空或类似培养物的以mg异戊二烯/L计的异戊二烯的比生产力可以这样测量:在OD<sub>600</sub>值为约1.0下,从细胞培养物取1ml样品,将其至于20mL瓶中,孵育30分钟,然后测量顶空中异戊二烯的量(如例如,实施例I,第II部分所述)。如果OD<sub>600</sub>值不是1.0,那么可以通过除以OD<sub>600</sub>值而将测量归一为OD<sub>600</sub>值。mg异戊二烯/L顶空的值可以通过乘以因数38而转换成培养液的mg/L<sub>培养液</sub>/hr/OD<sub>600</sub>。以mg/L<sub>培养液</sub>/hr/OD<sub>600</sub>为单位的值可以乘以小时数以及OD<sub>600</sub>值以获得以mg异戊二烯/L培养液为单位的累积滴定度。

[0276] 在一些实施方式中,培养细胞具有异戊二烯的平均体积生产力为高于或约0.1、1.0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1,200、1300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500、或更高mg异戊二烯/L的培养液/hr (mg/L<sub>培养液</sub>/hr,其中培养液的体积包括细胞和细胞培养基的体积)。在一些实施方式中,异戊二烯的平均体积生产力在约0.1至约3,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr之间,例如在约0.1至约100mg/L<sub>培养液</sub>/hr之间、约100至约500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约500至约1,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约1,000至约1,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约1,500至约2,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约2,000至约2,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约2,500至约3,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、或约3,000至约3,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr。在一些实施方式中,异戊二烯的平均体积生产力在约10至约3,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr之间、约100至约3,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约200至约1,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约200至约1,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约1,000至约3,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、或约1,500至约3,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr。

[0277] 在一些实施方式中,培养细胞具有异戊二烯的峰值体积生产力高于或约0.5、1.0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1,

400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500、3,750、4,000、4,250、4,500、4,750、5,000、5,250、5,500、5,750、6,000、6,250、6,500、6,750、7,000、7,250、7,500、7,750、8,000、8,250、8,500、8,750、9,000、9,250、9,500、9,750、10,000、12,500、15,000,或更多mg异戊二烯/L的培养液/hr (mg/L<sub>培养液</sub>/hr,其中培养液的体积包括细胞和细胞培养基的体积)。在一些实施方式中,异戊二烯的峰值体积生产力在约0.5至约15,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr之间,例如约0.5至约10mg/L<sub>培养液</sub>/hr之间、约1.0至约100mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约100至约500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约500至约1,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约1,000至约1,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约1,500至约2,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约2,000至约2,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约2,500至约3,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约3,000至约3,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约3,500至约5,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约5,000至约7,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约7,500至约10,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约10,000至约12,500mg/L<sub>培养液</sub>/h、或约12,500至约15,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr。在一些实施方式中,异戊二烯的峰值体积生产力在约10至约15,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr之间、约100至约2,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约1,000至约5,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约2,500至约7,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约5,000至约10,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr、约7,500至约12,500mg/L<sub>培养液</sub>/hr、或约10,000至约15,000mg/L<sub>培养液</sub>/hr。

[0278] 可以通过对发酵罐废气取样品,按所述,如在实施例I,第II部分所述分析它的异戊二烯量(以例如mg异戊二烯/L<sub>气体</sub>为单位)并将这一值乘以废气流经每升培养液的速率(例如,以1vvm(空气体积/培养液体积/分钟)来测量发酵罐中以mg/L<sub>培养液</sub>/hr计的瞬间异戊二烯生产。因此,1mg/L<sub>气体</sub>的废气水平对应于在空气流速为1vvm时,60mg/L<sub>培养液</sub>/hr的瞬间生产力。如果需要,可以将以mg/L<sub>培养液</sub>/hr为单位的值除以OD<sub>600</sub>值以获得以mg/L<sub>培养液</sub>/hr/OD为单位的比速率。mg异戊二烯/L<sub>气体</sub>的平均值可以通过将这一平均废气异戊二烯浓度乘以发酵期间每升发酵培养液冒出的废气的总量而转换成总产物生产力(每升发酵培养液的异戊二烯克数,mg/L<sub>培养液</sub>)。因此,在1vvm时10小时内0.5mg/L<sub>培养液</sub>/hr的平均废气异戊二烯浓度对应于300mg异戊二烯/L<sub>培养液</sub>的总产物浓度。

[0279] 在一些实施方式中,培养细胞将细胞培养基中的大于或约0.0015、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.12、0.14、0.16、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、2.0、2.2、2.4、2.6、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0、15.0、16.0、17.0、18.0、19.0、20.0、21.0、22.0、23.0、23.2、23.4、23.6、23.8、24.0、25.0、30.0、31.0、32.0、33.0、35.0、37.5、40.0、45.0、47.5、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0、或90.0摩尔%的碳转化成异戊二烯。在一些实施方式中,碳转化成异戊二烯的百分数在约0.002至约90.0摩尔%之间,例如约0.002至约0.005%、约0.005至约0.01%、约0.01至约0.05%、约0.05至约0.15%、0.15至约0.2%、约0.2至约0.3%、约0.3至约0.5%、约0.5至约0.8%、约0.8至约1.0%、约1.0至约1.6%、约1.6至约3.0%、约3.0至约5.0%、约5.0至约8.0%、约8.0至约10.0%、约10.0至约15.0%、约15.0至约20.0%、约20.0至约25.0%、约25.0%至30.0%、约30.0%至35.0%、约35.0%至40.0%、约45.0%至50.0%、约50.0%至55.0%、约55.0%至60.0%、约60.0%至65.0%、约65.0%至70.0%、约75.0%至80.0%、约80.0%至85.0%、或约85.0%至90.0%。在一些实施方式中,碳转化成异戊二烯的百分数在约0.002至约0.4摩尔%,0.002至约0.16摩尔%,0.04至约0.16摩尔%、约0.005至约0.3摩尔%、约0.01至约0.3摩尔%、约0.05至约0.3摩尔%、约0.1至0.3摩尔%、约0.3

至约1.0摩尔%、约1.0至约5.0摩尔%、约2至约5.0摩尔%、约5.0至约10.0摩尔%、约7至约10.0摩尔%、约10.0至约20.0摩尔%、约12至约20.0摩尔%、约16至约20.0摩尔%、约18至约20.0摩尔%、约18至23.2摩尔%、约18至23.6摩尔%、约18至约23.8摩尔%、约18至约24.0摩尔%、约18至约25.0摩尔%、约20至约30.0摩尔%、约30至约40.0摩尔%、约30至约50.0摩尔%、约30至约60.0摩尔%、约30至约70.0摩尔%、约30至约80.0摩尔%、或约30至约90.0摩尔%。

[0280] 碳转化成异戊二烯的百分数(也称作%碳产量)可以通过将所生产的异戊二烯的摩尔碳除以碳源中的摩尔碳(例如在分批和补料葡萄糖和酵母提取物中的摩尔碳)而测量。这一数字乘以100%得到百分数值(如等式1所示)。

[0281] 等式1

[0282]  $\% \text{碳产量} = (\text{生产的异戊二烯中的摩尔碳}) / (\text{碳源中的摩尔碳}) * 100$

[0283] 对于这一计算,可以假定酵母提取物含有50%w/w碳。作为实例,对于实施例7,第III部分所述的500升,碳转化成异戊二烯的百分数可以按等式2所示来计算。

[0284] 等式2

[0285]  $\% \text{碳产量} = (39.1\text{g异戊二烯} * 1 / 68.1\text{mol/g} * 5\text{C/mol}) / [(181221\text{g葡萄糖} * 1 / 180\text{mol/g} * 6\text{C/mol}) + (17780\text{g酵母提取物} * 0.5 * 1 / 12\text{mol/g})] * 100 = 0.042\%$

[0286] 对于在此所述的两个500升发酵(实施例7,第VII和VIII部分),碳转化成异戊二烯的百分数在0.04-0.06%之间。使用在此所述的14升系统实现了0.11-0.16%碳产量。

[0287] 本领域熟练技术人员可以容易地将异戊二烯生产率或生产的异戊二烯的量转化成任何其它单位。示例性的等式列于下面用于在单位间的相互转换。

[0288] 异戊二烯生产率(总的和比生产率)的单位

[0289] 等式3

[0290]  $1\text{g异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr} = 14.7\text{mmol异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr}$  (总体积率)

[0291] 等式4

[0292]  $1\text{nmol异戊二烯}/\text{g}_{\text{wcm}}/\text{hr} = 1\text{nmol异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr}/\text{OD}_{600}$  (这一转换假定具有OD<sub>600</sub>值为1的1升培养液具有1克湿细胞重量)

[0293] 等式5

[0294]  $1\text{nmol异戊二烯}/\text{g}_{\text{wcm}}/\text{hr} = 68.1\text{ng异戊二烯}/\text{g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$  (鉴于异戊二烯的分子量)

[0295] 等式6

[0296]  $1\text{mmol异戊二烯}/\text{L}_{\text{气体O}_2}/\text{hr} = 90\text{nmol异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr}$  (以O<sub>2</sub>流速为90L/hr每升培养液)

[0297] 等式7

[0298]  $1\text{ug异戊二烯}/\text{L}_{\text{气体}}\text{废气中的异戊二烯} = 60\text{ug异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}/\text{hr}$ , 流速为每L培养液60L<sub>气体</sub>(1vvm)

[0299] 滴定度(总和比)单位

[0300] 等式8

[0301]  $1\text{nmol异戊二烯}/\text{mg细胞蛋白} = 150\text{nmol异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}/\text{OD}_{600}$  (这一转换假定具有OD<sub>600</sub>值为1的一升培养液具有约150mg的总细胞蛋白)(比生产力)

[0302] 等式9

[0303]  $1\text{g异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}=14.7\text{mmol异戊二烯}/\text{L}_{\text{培养液}}$  (总滴定度)

[0304] 如果需要,可以使用等式10将包括细胞湿重的任何单位转换成包括细胞干重的相应单位。

[0305] 等式10

[0306]  $\text{细胞干重}=\text{细胞湿重}/3.3$

[0307] 在本发明所包含的一些实施方式中,包括编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸的细胞生产异戊二烯的量为在基本上相同条件下,没有编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸时所生长的相应细胞产生的异戊二烯量的至少或约2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、400倍或更高。

[0308] 在本发明所包含的一些实施方式中,包含编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸以及编码DXS、IDI和/或MVA途径多肽的一或多种异源核酸的细胞生产异戊二烯的量为在基本上相同条件下,没有异源核酸时所生长的相应细胞产生的异戊二烯量的至少或约2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、400倍或更高。

[0309] 示例性异戊二烯纯化方法

[0310] 在一些实施方式中,在此所述的任何方法还包括回收异戊二烯。例如,可以使用标准技术来回收使用本发明组合物和方法所生产的异戊二烯。例如气提、分馏、吸附/解吸附、全蒸发、从固相热或真空解吸异戊二烯、或用溶剂提取固定化或吸附在固相上的异戊二烯(参见例如,美国专利号4,703,007和4,570,029,其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于异戊二烯回收和纯化方法)。在一些实施方式中,异戊二烯的回收涉及以液体形式分离异戊二烯(例如异戊二烯纯溶液或溶剂中的异戊二烯溶液)。气提涉及以连续方式从发酵废气流除去异戊二烯蒸汽。此种去除可以以多种不同方式实现,包括但不限于吸附至固相,分配到液相,或直接冷凝。在一些实施方式中,在蒸发露点以上,稀释异戊二烯蒸汽流的膜富集导致液体异戊二烯的冷凝。

[0311] 异戊二烯的回收可包括一步或多步。在一些实施方式中,从发酵废气除去异戊二烯蒸汽以及将异戊二烯转化成液相是同时进行的。例如,异戊二烯可以直接从废气流冷凝以形成液体。在一些实施方式中,从发酵废气除去异戊二烯蒸汽以及将异戊二烯转化成液相是顺序进行的。例如,可将异戊二烯吸附至固相然后用溶剂从固相提取。

[0312] 在一些实施方式中,在此所述的任何方法进一步包括纯化异戊二烯。例如,可以使用标准技术来纯化使用本发明组合物和方法所生产的异戊二烯。纯化指一种方法,通过该方法将异戊二烯与在生产异戊二烯时存在的一种或多种组分分离。在一些实施方式中,异戊二烯作为基本上纯的液体来获得。纯化方法的实例包括(i)以液体提取物从溶液蒸馏和(ii)色谱。如在此使用,“纯化的异戊二烯”指已经与在生产异戊二烯时存在的一种或多种组分分离的异戊二烯。在一些实施方式中,异戊二烯是按重量计,至少约20%不含有在生产异戊二烯时存在的其它组分。在多种实施方式中,异戊二烯是按重量计至少或约25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、或99%纯的。纯度可以通过任何适当的方法来检测,例如通过柱色谱、HPLC分析或GC-MS分析。

[0313] 在一些实施方式中,在此所述的任何方法还包括使异戊二烯聚合。例如,可以使用标准方法来聚合纯化的异戊二烯以形成顺式聚异戊二烯或使用标准方法形成其他下游产物。



[0314] 其它方法和组合物描述于2008年9月15日递交的美国临时专利申请号61/097,186,2008年9月15日递交的美国临时专利申请号61/097,189,2008年9月15日递交的美国临时专利申请号61/097,163,它们全部在此通过整体引用作为参考,特别是对于生产异戊二烯的组合物和方法。

## 实施例

[0315] 实施例也描述和详解了上面讨论的本发明的方面和实施方式,但是实施例旨在仅仅是本发明的示例并且因此不应以任何方式被认为是限定本发明。除非另有指明,否则温度是摄氏度而压力为大气压或近大气压。前面的实例和详细说明以说明的方式提供而非限制。所有在这一说明书中引用的出版物、专利申请和专利都在此通过引用作为参考,就如同每一出版物、专利申请或专利都具体且单独地引入本文作为参考。特别地,在此引用的所有出版物出于描述和公开可用于本发明的组合物和方法的目的而明确地通过引用作为参考。尽管出于清楚理解的目的,较详细地以说明方式描述了前面的发明,但是对于本领域熟练技术人员来讲显而易见的是,根据本发明的教导,可以进行某些改变和修改而不背离所附权利要求的精神或范围。

[0316] 实施例1、在表达重组野葛异戊二烯合成酶的大肠杆菌中的异戊二烯生产

[0317] I. 在大肠杆菌中表达野葛异戊二烯合酶的载体构建

[0318] 野葛(葛麻姆(*Pueraria montana*)异戊二烯合酶基因(IspS)的蛋白序列获自GenBank(AA084170)。对于大肠杆菌密码子使用进行优化的野葛异戊二烯合酶基因购自DNA2.0(SEQ ID NO:1)。通过用BspLU11I/PstI进行限制性内切核酸酶消化从供应的质粒取下异戊二烯合酶基因,凝胶纯化,并连接到已经用NcoI/PstI消化的pTrdHis2B(Invitrogen)。设计构建体以便异戊二烯合酶基因终止密码子在PstI位点的5'。结果是,当表达构建体时,His-Tag不连接异戊二烯合酶蛋白。对得到的质粒pTrcKudzu通过测序验证(图2和3)。

[0319] 也将异戊二烯合酶基因克隆到pET16b(Novagen)。这种情形下,异戊二烯合酶基因插入pET16b以便重组异戊二烯合酶蛋白含有N端His标签。通过PCR使用引物对pET-His-Kudzu-2F:5'-CGTGAGATCATATGTGTGCGACCTCTTCTCAATTTAC(SEQ ID NO:3)和pET-HisKudzu-R:5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG(SEQ ID NO:4)从pTrcKudzu扩增异戊二烯合酶基因。这些引物分别在基因5'端添加NdeI位点和在3'端添加BamHI位点。上述质粒pTrcKudzu用作模板DNA,根据生产商的指示,使用Herculase聚合酶(Stratagene),并且以10pMol的浓度添加引物。在25μl的总体积下进行PCR。PCR产物用NdeI/BamHI消化并且克隆到用相同酶消化的pET 16b中。将连接混合物转化到大肠杆菌Top 10(Invitrogen)并通过测序筛选正确克隆。将得到的质粒(其中从T7启动子表达野葛异戊二烯合酶基因)命名为pETNHisKudzu(图4和5)。

[0320] 也将野葛异戊二烯合酶基因克隆到低拷贝数质粒pCL1920中。使用引物来从上述pTrcKudzu扩增野葛异戊二烯合酶基因。正向引物向5'端添加HindIII位点和大肠杆菌共有序列RBS。PstI克隆位点已经存在于pTrcKudzu中,就在终止密码子3',因此构建反向引物以便最终PCR产物包括PstI位点。引物序列为:HindIII-rbs-Kudzu F:5'-CATATGAAAGCTTGATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACC(SEQ ID NO:6)和BamHI-Kudzu R:

[0321] 5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID NO:4)。使用Herculase聚合酶,以10pmol引物浓度引物和1ng模板DNA (pTrcKudzu) 扩增PCR产物。扩增方案包括30个循环的(95℃持续1分钟,60℃持续1分钟,72℃持续2分钟)。产物用HindIII和PstI消化并连接到也用HindIII和PstI消化的pCL 1920。连接混合物转化大肠杆菌Top 10。通过测序检测若干转化体。得到的质粒命名为pCL-lac-Kudzu (图6和7)。

[0322] II. 异戊二烯生产的测定

[0323] 对于摇瓶培养,将来自摇瓶的1ml培养物转入20ml CTC顶空瓶 (Agilent瓶目录# 51882753;盖目录/I 51882759)。拧紧盖并在相同温度下孵育瓶,以250rpm振荡。30分钟后,从培养箱中取出瓶并按下述分析(对于这一检测法的一些实验数值参见表1)。

[0324] 在测量了发酵罐中的异戊二烯生产的情形下,从发酵罐的废气取样并按下述直接进行分析(对于这一检测法的一些实验数值参见表2)。

[0325] 使用与CTC Analytics (Switzerland) CombiPAL自动进样器接口的Agilent 6890GC/MS系统,在顶空模式下进行分析。使用Agilent HP-5M5GC/MS柱 (30m x 0.25mm; 0.25μm膜厚) 分离分析物。设定取样器以注射500μL顶空气体。GC/MS法利用氦气作为载气,流速为1ml/分钟。注射口保持在250℃,分流比为50:1。在分析期间,烘箱温度保持在37℃持续2分钟。Agilent 5793N质量选择检测器在m/z 67,以单离子监测 (SIM) 模式允许。从1.4至1.7分钟,关掉监测器以允许洗脱永久气体。在这些条件下,观察到异戊二烯 (2-甲基-1,3-丁二烯) 在1.78分钟洗脱。使用校准表来量化异戊二烯绝对量并且发现在1μg/L至200μg/L为线性的。预计使用这一方法的检测极限为50至100ng/L。

[0326] III. 在含有表达重组异戊二烯合酶的大肠杆菌细胞的摇瓶中的异戊二烯生产

[0327] 将上述载体导入大肠杆菌菌株BL21 (Novagen) 以生产菌株BL21/ptrcKudzu、BL21/pCL-lac-Kudzu和BL21/pETHisKudzu。在LA (Luria琼脂) 和羧苄青霉素 (50μg/ml) 上涂布菌株用于分离并且在37℃过夜培养。将单菌落接种到含有20ml Luria Bertani培养基 (LB) 和羧苄青霉素 (100μg/ml) 的250ml带挡板的摇瓶中。培养物在20℃以200rpm振荡过夜生长。测量过夜培养物的OD<sub>600</sub>并将培养物稀释到含有30ml MagicMedia (Invitrogen) 和羧苄青霉素 (100μg/ml) 的250ml带挡板的摇瓶中至OD<sub>600</sub>~0.5。在30℃以200rpm振荡培养培养物。当OD<sub>600</sub>~0.5-0.8时,加入400μM IPTG并将细胞在30℃以200rpm振荡再培养6小时。在用IPTG诱导后0、2、4和6小时后,收集1ml培养物等分试样,测定OD<sub>600</sub>并且按上述测量生产的异戊二烯的量。结果如图8所示。

[0328] IV. 在14升发酵中从BL21/ptrcKudzu生产异戊二烯

[0329] 从补料分批培养测定由含有重组野葛异戊二烯合酶基因的大肠杆菌大规模生产异戊二烯。每升发酵培养基的发酵培养基 (TM2) 的配方如下:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>13.6g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>13.6g,MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 2g,一水合柠檬酸2g,柠檬酸铁铵0.3g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>3.2g,酵母提取物5g,1000X改良的微量金属溶液 (Modified Trace Metal Solution) 1ml。所有组分一起添加并溶解在diH<sub>2</sub>O中。用氢氧化钾 (KOH) 调节pH至6.8并定容至体积。终产物用0.22μ过滤器过滤灭菌 (只此,不高压灭菌)。1000X改良的微量金属溶液的配方如下:柠檬酸\*H<sub>2</sub>O 40g,MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 30g,NaCl 10g,FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g,CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1g,ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g,CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 100mg,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>100mg,NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 100mg。以每次在diH<sub>2</sub>O中溶解一种组分来溶解每一组分,用HCl/NaOH调节pH至3.0,然后定容至体积并用0.22μ过滤器过滤灭菌。

[0330] 这一实验在14L生物反应器中进行以监控在想要的发酵、pH 6.7和温度34℃下从葡萄糖形成的异戊二烯。在大豆脲-酵母提取物-葡萄糖培养基中制备取自冷冻瓶的大肠杆菌菌株BL21/ptrcKudzu的接种物。当接种物生长至OD<sub>550</sub>=0.6后,将2个600ml烧瓶离心并将内容物在70ml上清液中重悬浮以将细胞沉淀(70ml的OD<sub>3.1</sub>材料)转入生物反应器。接种后不同时间下,取出样品并按上述测定所生产的异戊二烯的量。结果如图9所示。

[0331] 实施例2、在表达重组杨异戊二烯合酶的大肠杆菌中的异戊二烯生产

[0332] 杨(银白杨x欧洲山杨)异戊二烯合酶的蛋白序列(Schnitzler,J-P等人,(2005) Flanta 222:777-786)获自GenBank (CAC35696)。对于大肠杆菌进行密码子优化的基因购自DNA2.0 (p9796-杨,图30和31)。通过用BspLU11I/PstI进行限制性内切核酸酶消化从供应的质粒取下异戊二烯合酶基因,凝胶纯化,并连接到已经用NcoI/PstI消化的pTrcHis2B (Invitrogen)。克隆构建体以便插入片段中的终止密码子在PstI位点之前,这得到His-Tag不连接异戊二烯合酶蛋白的构建体。对得到的质粒pTrcPoplar (图32和33)进行测序验证。

[0333] 实施例3、在表达重组野葛异戊二烯合酶的柠檬泛菌中的异戊二烯生产

[0334] 将在实施例1所述的pTrcKudzu和pCL-lac Kudzu质粒电穿孔到柠檬泛菌(美国专利号7,241,587)。在分别含有羧苄青霉素(200μg/ml)或壮观霉素(50μg/ml)的LA上选择转化体。按实施例1对于表达重组野葛异戊二烯合酶的大肠杆菌菌株所述进行从摇瓶生产异戊二烯并测定所生产的异戊二烯的量。结果如图10所示。

[0335] 实施例4、在表达重组野葛异戊二烯合酶的枯草杆菌中的异戊二烯生产

[0336] I. 用于表达野葛异戊二烯合酶的枯草杆菌复制质粒的构建

[0337] 使用在aprE启动子控制下的复制质粒(具有氯霉素抗性表达盒的pBS19),在枯草杆菌aprEnprE PxylcomK菌株(BG3594comK)中表达野葛异戊二烯合酶基因。使用PCR分别扩增异戊二烯合酶基因、aprE启动子和转录终止子并融合。然后将构建体克隆到pBS19中并转化到枯草杆菌。

[0338] a) aprE启动子的扩增

[0339] 使用下面的引物,从枯草杆菌的染色体DNA扩增aprE启动子:

[0340] CF 797 (+) 起始aprE启动子MfeI

[0341] 5' -GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC (SEQ ID NO:58)

[0342] CF 07-43 (-) 与野葛ispS融合的a prE启动子

[0343] 5' -ATTGAGAAGAGGTCGCACACTCTTTACCCTCTCCTTTTA (SEQ TD NO:59)

[0344] b) 异戊二烯合酶基因的扩增

[0345] 从质粒pTrcKudzu扩增野葛异戊二烯合酶基因 (SEQ ID NO:2)。该基因对于大肠杆菌进行了密码子优化并通过DNA 2.0合成。使用下面的引物:

[0346] CF 07-42 (+) 将aprE启动子与野葛异戊二烯合酶基因 (GTG起始密码子) 融合

[0347] 5' -TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCAAT (SEQ ID NO:60)

[0348] CF 07-45 (-) 将野葛异戊二烯合酶基因的3' 端与终止子融合

[0349] 5' -CCAAGGCCGGTTTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID NO:61)

[0350] c) 转录终止子的扩增

[0351] 使用下面的引物,从以前测序的质粒pJHPms382扩增解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyliquefaciens*) 的碱性丝氨酸蛋白酶的终止子:

- [0352] CF 07-44 (+) 将野葛异戊二烯合酶的3'端与终止子融合
- [0353] 5' -GATTAACCAGCTGATGTATGTCTAAAAAAACCGCCTTGG (SEQ ID NO:62)
- [0354] CF 07-46 (-) 解淀粉芽孢杆菌终止子的末端 (BamHI)
- [0355] 5' -GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0356] 使用下述引物进行PCR将野葛片段与终止子片段融合:
- [0357] CF 07-42 (+) 将aprE启动子与野葛异戊二烯合酶基因融合 (GTG起始密码子)
- [0358] 5' -TAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCAAT (SEQ ID NO:61)
- [0359] CF 07-46 (-) 解淀粉芽孢杆菌终止子的末端 (BamHI)
- [0360] 5' -GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0361] 使用下述引物进行PCR将野葛终止子片段与启动子片段融合:
- [0362] CF 797 (+) 起始aprE启动子MfeI
- [0363] 5' -GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC (SEQ ID NO:64)
- [0364] CF 07-46 (-) 解淀粉芽孢杆菌终止子的末端 (BamHI)
- [0365] 5' -GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0366] 使用Qiagen试剂盒纯化融合PCR片段并用限制性酶MfeI和BamHI消化。这一消化的DNA片段用Qiagen试剂盒进行凝胶纯化并连接至称作pBS19的载体,该载体已经用EcoRI和BamHI消化并进行了凝胶纯化。
- [0367] 将连接混合物转化到大肠杆菌Top 10细胞,并且在LA和50羧苄青霉素板上筛选菌落。选择总共6个菌落并在LB和50羧苄青霉素中过夜生长,然后用Qiagen试剂盒分离质粒。质粒用EcoRI和BamHI消化以检测插入片段并且将3个正确的质粒送去以下面的引物进行测序:
- [0368] CF 149 (+) aprE启动子的EcoRI起点
- [0369] 5' -GACATGAATTCCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:65)
- [0370] CF 847 (+) pXX 049的序列 (aprE启动子末端)
- [0371] 5' -AGGAGAGGGTAAAGAGTGAG (SEQ ID NO:66)
- [0372] CF 07-45 (-) 将野葛异戊二烯合酶的3'端与终止子融合
- [0373] 5' -CCAAGGCCGGTTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID NO:61)
- [0374] CF 07-48 (+) 野葛异戊二烯合酶的测序引物
- [0375] 5' -CTTTTCCATCACCCACCTGAAG (SEQ ID NO:67)
- [0376] CF 07-49 (+) 野葛异戊二烯合酶中的测序
- [0377] 5' -GGCGAAATGGTCCAACAACAAAATTATC (SEQ ID NO:68)
- [0378] 通过测序发现名为pBS Kudzu#2的质粒是正确的 (图52和12) 并且将它转化到枯草杆菌宿主菌株BG 3594comK。在LA和5个氯霉素板上进行筛选。选择转化体并且在LA和5个氯霉素上挑选单菌落,然后在LB和5氯霉素中生长至其达到OD<sub>600</sub>为1.5。在甘油存在下,将其冻存在-80℃的瓶中。得到的菌株命名为CF 443。
- [0379] II. 在含有表达重组异戊二烯合酶的枯草杆菌细胞的摇瓶中的异戊二烯生产
- [0380] 用来自LA和氯霉素 (Cm, 25μg/ml) 的CF 443单菌落接种过夜培养物。培养物在37℃下在LB和Cm中以200rpm摇动生长。使用这些过夜培养物 (1ml) 接种含有25ml Grants II培养基和终浓度为25μg/ml的氯霉素的250ml带挡板的摇瓶。Grants II培养基配方为10g大豆

胨, 3ml 1M  $K_2HPO_4$ , 75g 葡萄糖, 3.6g 尿素, 100ml 的 10x MOPS, 用  $H_2O$  定容至 1L, pH 7.2; 10X MOPS 配方为 83.72g MOPS, 7.17g tricine, 12g KOH 颗粒, 10ml 0.276M  $K_2SO_4$  溶液, 10ml 0.528M  $MgCl_2$  溶液, 29.22g NaCl, 100ml 的 100x 微量营养物, 用  $H_2O$  定容至 1L; 以及 100X 微量营养物的配方为 1.47g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.4g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.1g  $ZnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.05g  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.1g  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.1g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 用  $H_2O$  定容至 1L。在 37°C 孵育摇瓶并在 18、24 和 44 小时取样。在 18 小时时, 对 CF 443 和对照菌株顶空取样。这表示 18 小时异戊二烯累积。异戊二烯的量通过如实施例 1 所述的气相色谱来测定。通过表达重组异戊二烯合酶, 异戊二烯的生产显著增强 (图 11)。

[0381] III. 在 14L 发酵中由 CF443 生产异戊二烯

[0382] 由补料-分批培养测定由在复制质粒上含有重组野葛异戊二烯合酶基因的枯草杆菌进行的大规模异戊二烯生产。通过常规补料-分批发酵在含有大豆粉 (Cargill)、磷酸钠和磷酸钾、硫酸镁和柠檬酸、氯化铁和氯化镁溶液的营养培养基中培养表达野葛异戊二烯合酶基因的芽孢杆菌菌株 CF443 或不表达野葛异戊二烯合酶基因的对照菌株。在发酵之前, 使用包括纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶的酶混合物将培养基浸软 90 分钟 (参见 W095/04134)。向 14-L 分批发酵罐加料 60% wt/wt 葡萄糖 (Cargill DE99 葡萄糖, ADM Versadex greens 或 Danisco 转化糖) 和 99% wt/wt 油 (Western Family 豆油, 其中 99% wt/wt 是它加入细胞培养基之前的油浓度)。当检测不到批次中的葡萄糖时, 开始补料。补料速率在几小时内增加并且被调整以在相等的碳基础上添加油。使用 28% w/v 氢氧化铵将 pH 控制在 6.8-7.4。在起泡情形下, 向培养基中加入消泡剂。将发酵温度控制在 37°C 并且以 750rpm 搅拌发酵培养物。贯穿整个过程, 对诸如 pH、DO%、气流和压力的多种其它参数进行监控。DO% 保持高于 20。在 36 小时的时间进程中取样并分析细胞生长 ( $OD_{550}$ ) 和异戊二烯生产。这些实验的结果如图 53A 和 53B 所示。

[0383] IV. 在枯草杆菌中野葛异戊二烯合酶 (ispS) 的整合

[0384] 将野葛异戊二烯合酶基因克隆到在 aprE 启动子控制下的整合质粒 (pJH101-cmpR) 中。在检测条件下, 未检测到异戊二烯。

[0385] 实施例 5、在木霉中的异戊二烯生产

[0386] I. 在里氏木霉中表达野葛异戊二烯合酶的载体的构建

[0387] 通过 DNA 2.0 合成解脂耶氏酵母密码子优化的野葛 IS 基因 (SEQ ID NO:8) (图 13)。这一质粒用作下面 PCR 扩增反应的模板: 1μl 质粒模板 (20ng/μl), 1μl 引物 EL-945 (10uM) 5'-GCTTATGGATCCTCTAGACTATTACACGTACATCAATTGG (SEQ ID NO:9), 1μl 引物 EL-965 (10uM) 5'-CACCATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTTAC (SEQ ID NO:10), 1μl dNTP (10mM), 5μl 10x PfuUltra II 融合 HS DNA 聚合酶缓冲液, 1μl PfuUltra II 融合 HS DNA 聚合酶, 40μl 水, 总反应体积为 50μl。正向引物在 5' 端含有额外的 4 个核苷酸, 这 4 个核苷酸不与解脂耶氏酵母密码子优化的野葛异戊二烯合酶基因对应, 但为克隆到 pENTR/D-TOPO 载体所需的。反向引物在 5' 端含有额外的 21 个核苷酸, 这 21 个核苷酸不与解脂耶氏酵母密码子优化的野葛异戊二烯合酶基因对应, 但被插入以克隆到其它载体骨架。使用 MJ Research PTC-200 热循环仪, 按下面进行 PCR 反应: 95°C 持续 2 分钟 (仅仅是首个循环), 95°C 持续 30 秒, 55°C 持续 30 秒, 72°C 持续 30 秒 (重复 27 个循环), 最后一个循环后于 72°C 持续 1 分钟。在 1.2% E-gel 上分析 PCR 产物以确认解脂耶氏酵母密码子优化的野葛异戊二烯合酶基因的成功扩增。

[0388] 然后使用TOP0 pENTR/D-TOP0克隆试剂盒,按照生产商说明克隆PCR产物:1 $\mu$ l PCR反应物,1 $\mu$ l盐溶液,1 $\mu$ l TOP0 pENTR/D-TOP0载体和3 $\mu$ l水,总反应体积为6 $\mu$ l。在室温孵育反应物5分钟。将1微升TOP0反应物转化到TOP10化学感受态大肠杆菌细胞。在LA和50 $\mu$ g/ml卡那霉素板上筛选转化体。挑取若干菌落并且将每个接种到5ml含有LB和50 $\mu$ g/ml卡那霉素的试管中并在37 $^{\circ}$ C以200rpm振荡过夜生长。使用QIAprep Spin Miniprep Kit,按照生产商说明从过夜培养物管分离质粒。对若干质粒进行测序以验证DNA序列是正确的。

[0389] 编码解脂耶氏酵母密码子优化的野葛异戊二烯合酶基因的单个pENTR/D-TOP0质粒用于Gateway克隆到定制的pTrex3g载体。pTrex3g的构建描述于WO 2005/001036A2。按照制造商对于Gateway LR Clonase II Enzyme Mix Kit (Invitrogen)的说明进行反应:1 $\mu$ l解脂耶氏酵母密码子优化的野葛异戊二烯合酶基因pENTR/D-TOP0供体载体,1 $\mu$ l pTrex3g目的载体,6 $\mu$ l TE缓冲液,pH 8.0,总反应体积为8 $\mu$ l。反应物在室温孵育1小时然后加入1 $\mu$ l蛋白酶K溶液并继续在37 $^{\circ}$ C孵育10分钟。然后将1 $\mu$ l反应物转化到TOP10化学感受态大肠杆菌细胞。在LA和50 $\mu$ g/ml羧苄青霉素板上筛选转化体。挑取若干菌落并且将每个接种到5ml含有LB和50 $\mu$ g/ml羧苄青霉素的试管中并在37 $^{\circ}$ C以200rpm振荡过夜生长。使用QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc.),按照生产商说明从过夜培养物管分离质粒。对若干质粒进行测序以验证DNA序列是正确的。

[0390] 使用Biolistic PDS-1000/HE Particle Delivery System进行解脂耶氏酵母密码子优化的野葛异戊二烯合酶pTrex3g质粒(图14)向四缺失的里氏木霉的生物射弹转化(参见WO 2005/001036A2)。使用专利公开W02005/001036A2的实施例11所列方法进行稳定转化体的分离和摇瓶评估。

[0391] II. 在里氏木霉重组菌株中的异戊二烯生产

[0392] 将1ml上述异戊二烯合酶转化体的15和36小时龄培养物转入顶空瓶。密封瓶并在30 $^{\circ}$ C孵育5小时。测量顶空气体并且通过实施例1所述的方法鉴定异戊二烯。两个转化体显示出痕量异戊二烯。异戊二烯的量可通过14小时的孵育而增加。两个阳性样品在14小时的孵育后显示出异戊二烯水平为约0.5 $\mu$ g/L。未转化的对照没显示出可检测的异戊二烯水平。这一实验表明当提供外源异戊二烯合酶时,里氏木霉能够从内源前体生产异戊二烯。

[0393] 实施例6、在耶氏酵母中的异戊二烯生产

[0394] I. 用于在解脂耶氏酵母中表达野葛异戊二烯合酶的载体的构建

[0395] 用于在解脂耶氏酵母中表达野葛异戊二烯合酶基因的载体构建的起点是载体pSPZ1 (MAP29S<sub>pb</sub>)。这一载体的完整序列(SEQ ID No:11)如图15所示。

[0396] 使用解脂耶氏酵母菌株GICC 120285的染色体DNA作为模板,通过PCR扩增下面的片段:无启动子形式的URA3基因,18S核糖体RNA基因的片段,解脂耶氏酵母XPR2基因的转录终止子,以及含有XPR2和ICL1基因的启动子的两种DNA片段。使用下面的PCR引物:

[0397] ICL1 3

[0398] 5' -GGTGAATTCAGTCTACTGGGGATTCCCAAATCTATATATACTGCAGGTGAC (SEQ ID NO:69)

[0399] ICL1 5

[0400] 5' -GCAGGTGGGAAACTATGCACTCC (SEQ ID NO:70)

[0401] XPR 3

[0402] 5' -CCTGAATTCTGTTGGATTGGAGGATTGGATAGTGGG (SEQ ID NO:71)

- [0403] XPR 5
- [0404] 5' -GGTGTGACGTACGGTCGAGCTTATTGACC (SEQ ID NO:72)
- [0405] XPRT3
- [0406] 5' -GGTGGGCCCCGATTTTGCCACCTACAAGCCAG (SEQ ID NO:73)
- [0407] XPRT 5
- [0408] 5' -GGTGAATTCTAGAGGATCCCAACGCTGTTGCCTACAACGG (SEQ ID NO:74)
- [0409] Y18S3
- [0410] 5' -GGTGCGGCCGCTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCCG (SEQ ID NO:75)
- [0411] Y18S 5
- [0412] 5' -GGTGGGCCCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAG (SEQ ID NO:76)
- [0413] YURA3
- [0414] 5' -GGTGACCAGCAAGTCCATGGGTGGTTTGATCATGG (SEQ ID NO:77)
- [0415] YURA 50
- [0416] 5' -GGTGCGGCCGCTTTGGAGTACGACTCCAACATG (SEQ ID NO:78)
- [0417] YURA 51
- [0418] 5' -GCGGCCGCAGACTAAATTTATTTTCAGTCTCC (SEQ ID NO:79)

[0419] 对于PCR扩增,按照生产商的说明书,使用PfuUltraII聚合酶(Stratagene),生产商提供的缓冲液和dNTPs,2.5μM引物和所示的模板DNA。使用下面的循环进行扩增:95℃持续1min;34x(95℃持续30sec;55℃持续30sec;72℃持续3min)和72℃持续10min,随后4℃孵育。

[0420] 对于在耶氏酵母中表达进行密码子优化的编码野葛异戊二烯合酶基因的合成DNA分子得自DNA 2.0(图16;SEQ ID NO:12)。图18显示了携带分别在XPR2和ICL1启动子控制下的合成的野葛异戊二烯合酶基因的质粒pYLA(KZ1)和pYLI(KZ1)的构建方案的全部细节。也构建了对照质粒,其中插入交配因子基因(MAP29)代替异戊二烯合酶基因(图18E和18F)。

[0421] 类似的克隆方法可以用于表达杨(*Populus alba* x *Populus tremula*)异戊二烯合酶基因。杨异戊二烯的序列描述于Miller B.等人,(2001)Planta213,483-487并且示出于图17(SEQ ID NO:13)。图18A和B显示了产生携带分别在XPR2和ICL1启动子控制下的合成的杨异戊二烯合酶基因的质粒pYLA(POP1)和pYLI(POP1)的构建方案。

[0422] II. 由解脂耶氏酵母重组菌株生产异戊二烯

[0423] 载体pYLA(KZ 1)、pYLI(KZ1)、pYLA(MAP29)和pYLI(MAP29)用SacII消化并通过标准醋酸锂/聚乙二醇方法转化菌株解脂耶氏酵母CLIB122以得到尿苷原养型。简言之,酵母细胞在YEPD(1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖)中过夜生长,通过离心(4000rpm,10mm)收集,用无菌水冲洗并悬浮在0.1M醋酸锂,pH 6.0中。将200μl等份细胞悬浮液与线性化质粒DNA溶液(10-20μg)混合,室温孵育10分钟并与1ml在相同缓冲液中的50%的PEG 4000混合。进一步在室温孵育悬浮液1小时,随后在42℃热激2分钟。然后将细胞接种在SC his leu平板(0.67%酵母氮碱,2%葡萄糖,各100mg/L亮氨酸和组氨酸)上。在30℃孵育3-4天后出现转化体。

[0424] 将三个来自pYLA(KZ1)转化的分离菌,三个来自pYLI(KZ1)转化的分离菌,两个来自pYLA(MAP29)转化的分离菌以及两个来自pYLI(MAP29)转化的分离菌在30℃于YEP7培养

基(1%酵母提取物,2%蛋白胨,pH 7.0)中振荡生长24小时。通过离心收集来自10ml培养物的细胞,在3ml新鲜YEP7中重悬浮并放入15ml螺口盖瓶。将瓶在室温温和(60rpm)振荡过夜培养。通过气相色谱使用如实施例1所述的质谱检测器分析这些瓶的顶空中异戊二烯含量。以pYLA(KZ1)和pYLI(KZ1)获得的所有转化体产生可容易检测量的异戊二烯(0.5μg/L至1μg/L,图20)。在携带植酸酶基因而不是异戊二烯合酶基因的对照菌株的顶空中没有检测到异戊二烯。

[0425] 实施例7:在表达野葛异戊二烯合酶和idi、或dxs、或idi和dxs的大肠杆菌中生产异戊二烯

[0426] I. 构建编码野葛异戊二烯合酶和idi、或dxs、或idi和dxs用于在大肠杆菌中生产异戊二烯的载体

[0427] i) 构建pTrcKudzuKan

[0428] 用赋予卡那霉素抗性的基因代替pTrcKudzu(实施例1所述)的bla基因。为了除去bla基因,pTrcKudzu用BspHI消化,用虾碱性磷酸酶(SAP)处理,在65℃热处死,然后用Klenow片段和dNTPs末端填平。从琼脂糖凝胶纯化5kbp大片段并将它连接到kan<sup>r</sup>基因,其已经使用引物MCM225'-GATCAAGCTTAACCGAATTGCCAGCTG(SEQ ID NO:14)和MCM235'-GATCCGATCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC(SEQ ID NO:15)从pCR-Blunt-II-TOPO进行PCR扩增,用HindIII和PvuI消化并进行末端填充。在含有50μg/ml卡那霉素的LA上筛选携带有赋予卡那霉素抗性的质粒(pTrcKudzuKan)的转化体。

[0429] ii) 构建pTrcKudzu yIDI Kan

[0430] pTrcKudzuKan用PstI消化,用SAP处理,热处死并进行凝胶纯化。其通过合成RBS连接到编码来自酿酒酵母的idi的PCR产物。PCR的引物为NsiI-YIDI 1F5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAATGAC(SEQ ID NO:16)和PstIYIDI 1R 5'-CCTTCTGCAGGACGCGTTGTTATAGC(SEQ ID NO:17);以及模板是酿酒酵母基因组DNA。PCR产物用NsiI和PstI消化并在连接前进行凝胶纯化。连接混合物转化到化学感受态TOP10细胞并在含有50μg/ml卡那霉素的LA上筛选。分离若干转化体并测序,将得到的质粒称作pTrcKudzu-yIDI(kan)(图34和35)。

[0431] iii) 构建pTrcKudzu DXS Kan

[0432] 质粒pTrcKudzuKan用PstI消化,用SAP处理,热处死并进行凝胶纯化。其通过合成RBS连接到编码来自大肠杆菌的dxs的PCR产物。PCR的引物为MCM 135'-GATCATGCATTCGCCCCCTTAGGAGGTAAAAAACATGAGTTTTG ATATTGCCAAATACCCG(SEQ ID NO:18)和MCM145'-CATGCTGCAGTTATGCCAGCCAGGCCTTGAT(SEQ ID NO:19);以及模板是大肠杆菌基因组DNA。PCR产物用NsiI和PstI消化并在连接前进行凝胶纯化。将所得的转化反应物转化到TOP 10细胞并在含有50μg/ml卡那霉素的LA上筛选。分离若干转化体并测序,将得到的质粒称作pTrcKudzuDXS(kan)(图36和37)。

[0433] iv) 构建pTrcKudzu-yIDI-dxs(kan)

[0434] pTrcKudzu-yIDI(kan)用PstI消化,用SAP处理,热处死并进行凝胶纯化。其通过合成的RBS连接到编码大肠杆菌dxs的PCR产物(引物MCM13

[0435] 5'-GATCATGCATTCGCCCCCTTAGGAGGTAAAAAACATGAGTTTTG ATATTGCCAAATACCCG(SEQ ID NO:18)和MCM145'-CATGCTGCAGTTATGCCAGCCAGGCCTTGAT(SEQ ID NO:19),模板TOP 10细



胞),该产物以及用NsiI和PstI消化并凝胶纯化。最终质粒称作pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) (图21和22)。

[0436] v) 构建pCL PtrcKudzu

[0437] 使用SspI从pTrcKudzu消化来自上述实施例1的含有启动子、结构基因和终止子的DNA片段并凝胶纯化。其连接至已经用PvuII消化,用SAP处理以及热处死的pCL 1920。得到的连接混合物转化TOP 10细胞并在含有50 $\mu$ g/ml壮观霉素的LA中筛选。分离若干克隆并测序,选择两个克隆。pCL PtrcKudzu和pCL PtrcKudzu (A3) 具有相反方向的插入片段(图38-41)。

[0438] vi) pCL PtrcKudzu yIDI的构建

[0439] 来自上述(iii)的NsiI-PstI消化的,凝胶纯化的IDI PCR扩增子连接到已经用PstI消化,用SAP处理以及热处死的pCL PtrcKudzu。连接混合物转化到TOP 10细胞并在含有50 $\mu$ g/ml壮观霉素的LA中筛选。分离若干克隆并测序,得到的质粒称作pCL PtrcKudzu yIDI (图42和43)。

[0440] vii) pCL PtrcKudzu DXS的构建

[0441] 来自上述(iii)的NsiI-PstI消化的,凝胶纯化的DXS PCR扩增子连接到已经用PstI消化,用SAP处理以及热处死的pCL PtrcKudzu (A3)。连接混合物转化得TOP 10细胞并在含有50 $\mu$ g/ml壮观霉素的LA中筛选。分离若干克隆并测序,得到的质粒称作pCL PtrcKudzu DXS (图44和45)。

[0442] II. 在来自以不同拷贝数表达野葛异戊二烯合酶, idi, 和/或dxs的培养物的顶空中的异戊二烯测量

[0443] 在LB卡那霉素50 $\mu$ g/mL上生长之前转化有质粒pTrcKudzu (kan) (A)、pTrcKudzu-yIDI kan (B)、pTrcKudzu-DXS kan (C)、pTrcKudzu-yIDIDXS kan (D)的大肠杆菌BL21 ( $\lambda$ DE3)培养物。在LB壮观霉素50 $\mu$ g/mL上生长pCL PtrcKudzu (E)、pCL PtrcKudzu、pCL PtrcKudzu-yIDI (F) 和pCL PtrcKudzu-DXS (G) 的培养物。培养物在时间0用400 $\mu$ M IPTG诱导(OD<sub>600</sub>接近0.5)并且取样用于异戊二烯顶空测量(参见实施例1)。结果如图23A-23G所示。

[0444] 将质粒pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) 通过转化导入大肠杆菌菌株BL21。得到的菌株BL21/pTrc Kudzu IDI DXS在20 $^{\circ}$ C下于含有卡那霉素(50 $\mu$ g/ml)的LB中过夜生长并用于接种含1%葡萄糖的TM3 (13.6g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13.6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0g MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 2.0g一水合柠檬酸, 0.3g柠檬酸铁铵, 3.2g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2g酵母提取物, 1.0ml 1000x改良的微量金属溶液(Modified Trace Metal Solution), 调节至pH 6.8并用H<sub>2</sub>O定容, 并灭菌过滤)培养瓶。培养瓶在30 $^{\circ}$ C孵育直到OD<sub>600</sub>达到0.8, 然后用400 $\mu$ M IPTG诱导。在诱导后多个时间取样并按实施例1所述测量顶空中的异戊二烯的量。结果如图23H所示。

[0445] III. 在大肠杆菌/pTrcKudzu yIDI DXS中从生物量生产异戊二烯

[0446] 检测菌株BL21pTrcKudzuIDIDXS从三种类型的生物量: 甘蔗渣、玉米秸秆和软材木浆产生异戊二烯的能力, 以葡萄糖为对照。生物量的水解物由酶促水解来制备(Brown, L和Torget, R., 1996, NREL标准检测法Lap-009“Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass”)并且根据葡萄糖当量以稀释液使用。这一实例中, 葡萄糖当量等于1%葡萄糖。使用来自新鲜的转化细胞BL21 (DE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 的平板的单菌落来接种5ml的LB加卡那霉素(50 $\mu$ g/ml)。在25 $^{\circ}$ C过夜振荡孵育培养物。第二天, 将过夜

培养物在25ml的TM3和0.2%YE和1%原料中稀释至OD<sub>600</sub>为0.05。原料是玉米秸秆、甘蔗渣或软材木浆。葡萄糖用作阳性对照而没有葡萄糖用作阴性对照。在30℃以180rpm振荡孵育培养物。监测培养物的OD<sub>600</sub>并且当它达到OD<sub>600</sub>为~0.8时,在1和3小时按实施例1所述分析培养物的异戊二烯生产。培养物未被诱导。所有含有添加的原料的培养物产生的异戊二烯与由葡萄糖阳性对照所产生的异戊二烯相等。实验以一式两份进行并且示出于图46。

[0447] IV. 在大肠杆菌/pTrcKudzuIDIDXS中从转化糖生产异戊二烯

[0448] 使用来自新鲜的转化细胞BL21(λDE3)/pTrcKudzu yIDI DXS(kan)的平板的单菌落来接种5ml的LB和卡那霉素(50μg/ml)。在25℃过夜振荡孵育培养物。第二天,将过夜培养物在25ml的TM3和0.2%YE和1%原料中稀释至OD<sub>600</sub>为0.05。原料是葡萄糖、转化葡萄糖或玉米秸秆。转化糖原料(Danisco Invert Sugar)通过酶处理蔗糖糖浆来制备。AFEX玉米秸秆按下述(第V部分)制备。细胞在30℃生长并且当培养物达到OD<sub>600</sub>为~0.8-1.0(0小时)时,测量第一个样品。按由OD<sub>600</sub>所测来分析培养物的生长以及按照实施例1,在0、1和3小时分析异戊二烯生产。结果如图47所示。

[0449] V. 从AFEX预处理的玉米秸秆制备水解物

[0450] AFEX预处理的玉米秸秆获自Michigan Biotechnology Institute。预处理条件为60%湿度,1:1氨负载,以及90℃持续30分钟,然后风干。AFEX预处理的玉米秸秆的水分含量为21.27%。在AFEX预处理的玉米秸秆中的葡聚糖和木聚糖含量分别是31.7%和19.1%(基于干物质)。糖化工艺如下:将20g的AFEX预处理玉米秸秆与5ml的1M柠檬酸钠缓冲液,pH 4.8,2.25ml的Accellerase 1000,0.1ml的Grindamyl H121(来自用于面包制造工业的黑曲霉的Danisco木聚糖酶产物),以及72.65ml的DI水加入500ml培养瓶。将培养瓶放入定轨摇床并在50℃孵育96小时。从摇床取一个样品并使用HPLC分析。水解物含有38.5g/l的葡萄糖,21.8g/l的木糖,和10.3g/l的葡萄糖和/或木糖寡聚物。

[0451] VI. 酵母提取物对在补料分批培养中生长的大肠杆菌的异戊二烯生产的影响

[0452] 以14-L规模按前面所述,用含有上述pTrcKudzu yIDI DXS质粒的大肠杆菌细胞进行发酵。以指数速率喂饲酵母提取物(Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada)。在40小时发酵期间,送至发酵罐中的酵母提取物的总量在70-830之间变化。在550nm波长测量发酵液的光密度。发酵罐中的最终光密度与所添加的酵母提取物的量成比例(图48A)。按前述测定发酵罐的废气中的异戊二烯水平。异戊二烯滴定度随发酵进程增加(图48B)。所生产的异戊二烯的量与喂饲的酵母提取物的量成线性比例(图48C)。

[0453] VII. 在pTrcKudzu DXS yIDI的500-L发酵中生产异戊二烯

[0454] 使用具有野葛异戊二烯合酶、酿酒酵母IDI以及大肠杆菌DXS核酸(大肠杆菌BL21(λDE3)pTrc Kudzu dxs yidi)的大肠杆菌细胞的500升发酵来生产异戊二烯。异戊二烯的水平在15小时的时间段从50至300μg/L变化。在平均异戊二烯浓度的基础上,通过装置的平均流量以及异戊二烯漏出的程度,收集的异戊二烯的量被计算为接近17g。

[0455] VIII. 在补料分批培养中生长的大肠杆菌的500L发酵中的异戊二烯生产

[0456] 培养基配方(每升发酵培养基):

[0457] K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2g, 一水合柠檬酸2g, 柠檬酸铁铵0.3g, 酵母提取物0.5g, 1000X改良的微量金属溶液1ml。所有组分一起添加并溶解在dH<sub>2</sub>O中。对这一溶液高压灭菌。用氨气(NH<sub>3</sub>)调节pH至7.0并定容至体积。灭菌以及调节pH后,添加葡萄糖10g, 硫胺素\*

HCl 0.1g以及抗生素。

[0458] 1000X改良的微量金属溶液:

[0459] 柠檬酸\*H<sub>2</sub>O 40g, MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 30g, NaCl 10g, FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g, CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1g, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g, CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 100mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100mg, NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 100mg。以每次在DI H<sub>2</sub>O中溶解一种组分来溶解每一组分,用HCl/NaOH调节pH至3.0,然后定容至体积并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0460] 在500-L生物反应器中,用含有pTrcKudzu yIDI DXS质粒的大肠杆菌细胞进行发酵。进行这一实验来监控在期望的发酵pH 7.0以及温度30℃下从葡萄糖和酵母提取物形成的异戊二烯。在大豆脲-酵母提取物-葡萄糖培养基中制备取自冷冻瓶的大肠杆菌菌株的接种物。当接种物生长至在550nm处测量的OD为0.15后,使用20ml接种含有2.5-L大豆脲-酵母提取物-葡萄糖培养基的生物反应器。该2.5-L生物反应器在30℃下生长至OD 1.0并将2.0-L转入500-L生物反应器。

[0461] 以指数速率喂饲酵母提取物(Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada)和葡萄糖。在50小时发酵期间,送至生物反应器的葡萄糖和酵母提取物的总量分别为181.2kg和17.6kg。图49A显示了生物反应器中随着时间的密度。按前述测定生物反应器的废气中的异戊二烯水平。异戊二烯滴度随着发酵进程而增加(图49B)。在50小时发酵期间产生的异戊二烯总量为55.1g并且生产的时间进程如图49C所示。

[0462] 实施例8、在表达野葛异戊二烯合酶和重组甲羟戊酸途径基因的大肠杆菌中生产异戊二烯

[0463] I. 下游MVA途径的克隆

[0464] 克隆下游甲羟戊酸途径的策略如下。通过PCR从酿酒酵母染色体DNA扩增甲羟戊酸生物合成途径的四种基因;甲羟戊酸激酶(MVK),磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD)和异戊二烯二磷酸异构酶基因并且分别克隆到pCR BluntII TOPO质粒(Invitrogen)。在一些情形下,从大肠杆菌染色体DNA扩增idi基因。设计引物使得在5'端起始密码子上游8bp处插入大肠杆菌共有序列RBS(AGGAGGT(SEQ ID NO:80)或AAGGAGG(SEQ ID NO:81))以及在3'端添加PstI位点。然后一个接一个地将这些基因克隆到pTrcHis2B载体直到组装了整个途径。

[0465] 酿酒酵母S288C的染色体DNA获自ATCC(ATCC 204508D)。使用PfuTurbo按照生产商的说明书,用引物MVKF(5'-AGGAGGTAAAAACATGTCATTACCGTTCTTAAGTTCTGC,SEQ ID NO:21)和MVK-Pst1-R(5'-ATGGCTGCAGGCCTATCGCAAATTAGCTTATGAAGTCCATGG TAAATTCGTG,SEQ ID NO:22)从酿酒酵母染色体扩增MVK基因。通过1.2%E-gel(Invitrogen)电泳鉴定正确大小的PCR产物(1370bp)并将其克隆pZeroBLUNT TOPO。将得到的质粒称作pMVK1。用SacI和Taq I限制性内切核酸酶消化质粒pMVK1并对片段凝胶纯化并连接到用SacI和BsiBI消化的pTrcHis2B。将得到的质粒命名为pTrcMVK1。

[0466] 使用引物PstI-PMK1R(5'-GAATTCGCCCTTCTGCAGCTACC,SEQ ID NO:23)和BsiHXA I-PMK1F(5'-CGACTGGTGCACCCTTAAGGAGGAAAAACATGTCAG,SEQ ID NO:24),通过PCR扩增甲羟戊酸生物合成途径的第二种基因PMK。使用Pfu Turbo聚合酶(Stratagene)按照生产商的说明书进行PCR反应。将正确大小的产物(1387bp)用PstI和BsiHKA I消化并连接到用PstI消化了的pTrcMVK1中。将得到的质粒命名为pTrcKK。以相同方式克隆MVD和idi基因。使用引物

对PstI-MVD 1R (5'-GTGCTGGAATTCGCCCTTCTGCAGC, SEQ ID NO:25) 和NsiI-MVD 1F (5'-GATGATGCAGAAATTCGCCCTTAAGGAGG, SEQ ID NO:26) 进行PCR以扩增MVD基因,并且使用引物对PstI-YIDI1R (5'-CCTTCTGCAGGACGCGTTGTTATAGC, SEQ ID NO:27) 和NsiI-YIDI 1F (5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAATGAC, SEQ ID NO:28) 扩增yIDI基因。在一些情形下,使用来自大肠杆菌的IPP异构酶基因,idi。为了扩增来自大肠杆菌染色体DNA的idi,使用下面的引物对:PstI-CIDI 1R (5'-GTGTGATGGATATCTGCAGAAATTCG, SEQ ID NO:29) 和NsiI-CIDI 1F (5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAACATG, SEQ ID NO:30)。模板DNA是通过标准方法从大肠杆菌FM5分离的染色体DNA (WO 96/35796和WO 2004/033646,其各在此通过整体引用作为参考,特别是对于核酸的分离)。最终的质粒命名为pKKDIy用于编码酵母idi基因的构建体或者命名为pKKDIc用于编码大肠杆菌idi基因的构建体。将质粒转化到大肠杆菌宿主BL21用于随后分析。在一些情形下,将来自野葛的异戊二烯合酶克隆到pKKDIy,产生质粒pKKDIyIS。

[0467] 也将下游MVA途径克隆到含有卡那霉素抗生素抗性标记的pTrc。用限制性内切核酸酶ApaI和PstI消化质粒pTrcKKDIy,在1.2%琼脂糖E-gel上分离5930bp片段并使用Qiagen Gel Purification试剂盒按照制造商的说明书进行纯化。用限制性内切核酸酶ApaI和PstI消化在实施例7中描述的质粒pTrcKudzuKan,使用Qiagen Gel Purification试剂盒从1.2%E-凝胶纯化3338bp含有载体的片段。使用Roche Quick Ligation试剂盒连接该3338bp载体片段和5930bp下游MVA途径片段。将连接混合物转化到大肠杆菌TOP 10细胞并将转化体在37℃下过夜生长,用含有卡那霉素 (50μg/ml) 的LA筛选。转化体通过限制性酶消化验证并将1个冷冻作为原种。质粒命名为pTrcKanKKDIy。

[0468] II. 野葛异戊二烯合酶基因在pTrcKanKKDIy中的克隆

[0469] 使用引物MCM50 5'-GATCATGCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAAACATGTGTGCGACCTCTTCTCAATTTACT (SEQ ID NO:31) 和MCM535'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID NO:32),通过PCR从实施例1所述的pTrcKudzu扩增野葛异戊二烯合酶基因。将得到的PCR片段克隆到pCR2.1中并转化大肠杆菌TOP 10。这一片段含有野葛异戊二烯合酶的编码序列以及含有大肠杆菌RBS的上游区。转化体在37℃下过夜孵育,在含有卡那霉素 (50μg/ml) 的LA上筛选。通过测序验证正确的片段插入并将这一菌株命名为MCM93。

[0470] 用限制性内切核酸酶NsiI和PstI消化来自菌株MCM93的质粒以释放含有RBS和野葛异戊二烯合酶的1724bp插入片段。在1.2%琼脂糖E-gel上分离该1724bp片段并使用Qiagen Gel Purification试剂盒按照生产商的说明书进行纯化。用限制性内切核酸酶PstI消化质粒pTrcKanKKDIy,在37℃用SAP处理30分钟并使用Qiagen PCR纯化试剂盒进行纯化。使用Roche Quick Ligation试剂盒连接质粒和编码野葛异戊二烯合酶的DNA片段。将连接混合物转化到大肠杆菌TOP 10细胞并且将转化体在37℃下过夜生长,在含有50μg/ml卡那霉素的LA上筛选。通过限制性酶切验证正确的转化体并且将质粒命名为pTrcKKDyIkISKan (图24和25)。将这一质粒转化得BL21 (ΔDE3) 细胞 (Invitrogen)。

[0471] III. 在表达重组下游甲羟戊酸途径以及来自野葛的异戊二烯合酶的大肠杆菌中从甲羟戊酸生产异戊二烯

[0472] 在MOPS培养基中培养菌株BL21/pTrcKKDyIkISKan (Neidhardt等人, (1974) J. Bacteriology 119:736-747),调节至pH 7.1并补充0.5%葡萄糖和0.5%甲羟戊酸。使用

相同的条件只是不添加0.5%甲羟戊酸来建立对照培养。培养从用1%接种物的过夜种子培养物开始并且当培养物达到OD<sub>600</sub>为0.3至0.5时用500μM IPTG诱导。在30℃以250rpm振荡生长培养物。在使用实施例1所述的顶空测定法诱导3小时后分析异戊二烯生产。异戊二烯的最大产量为 $6.67 \times 10^4 \text{ nmol/L培养液/OD}_{600}/\text{hr}$ ，其中L<sub>培养液</sub>是培养液的体积并且包括细胞培养基的体积和细胞的体积。没有补充甲羟戊酸的对照培养物没有产生可测量的异戊二烯。

#### [0473] IV. 上游MVA途径的克隆

[0474] 从粪肠球菌克隆包括两个编码三种酶促活性的基因的上游甲羟戊酸生物合成途径。mvaE基因编码一种蛋白质，该蛋白质具有在该途径中的第一和第三蛋白质乙酰-CoA乙酰转移酶和3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA (HMG-CoA) 还原酶的酶促活性，并且mvaS基因编码该途径中第二种酶HMG-CoA合酶。使用下面的引物，从粪肠球菌基因组DNA (ATCC700802D-5) 扩增mvaE基因，该基因前面为大肠杆菌核糖体结合位点和间隔区。

[0475] CF 07-60 (+) mvaE w/RBS+ATG起始密码子SacI起点

[0476] 5' -GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAACATGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:34)

[0477] CF 07-62 (-) mvaE与mvaS融合，其间有RBS

[0478] 5' -TTTATCAATCCCAATTGTCATGTTTTTTTACCTCTTTATTGTTTTCTTAAATC (SEQ ID NO:35)

[0479] 使用下面的引物，从粪肠球菌基因组DNA (ATCC 700802D-5) 扩增mvaS基因，该基因前面为大肠杆菌RBS和间隔区：

[0480] CF 07-61 (+) mvaE与mvaS融合，其间有RBS

[0481] 5' -

[0482] GATTTAAGAAAACAATAAAGGAGGTAAAAAACATGACAATTGGGATTGATAAA (SEQ ID NO:36)

[0483] CF 07-102 (-) mvaS基因BglIII末端

[0484] 5' -GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:37)。

[0485] 使用下面的引物，用PCR将PCR片段融合在一起：

[0486] CF 07-60 (+) mvaE w/RBS+ATG起始密码子SacI的起点

[0487] 5' -GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAACATGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:34)

[0488] CF 07-102 (-) mvaS基因BglIII末端

[0489] 5' -GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:37)

[0490] 融合PCR片段用Qiagen试剂盒纯化并用限制性内切酶SacI和BglIII消化。使用Qiagen试剂盒对该消化的DNA片段进行凝胶纯化并将它连接到可商购的载体pTrcHis2A，该载体已经用SacI和BglIII消化以及凝胶纯化。

[0491] 将连接混合物转化大肠杆菌TOP 10细胞并且在LA和50μg/ml羧苄青霉素板上筛选菌落。选择总共6个菌落并在LB和50μg/ml羧苄青霉素中过夜生长并使用Qiagen试剂盒分离质粒。用SacI和BglIII消化质粒以检验插入片段并且用下面的引物对一个正确的质粒进行测序：

[0492] CF 07-58 (+) mvaE基因的起点

[0493] 5' -ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID NO:38)

[0494] CF 07-59 (-) mvaE基因的末端

[0495] 5' -ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAAATAGC (SEQ ID NO:39)

- [0496] CF 07-82 (+) mvaS基因起点  
[0497] 5' -ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID NO:40)  
[0498] CF 07-83 (-) mvaS基因末端  
[0499] 5' -TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:41)  
[0500] CF 07-86 (+) mvaE中的序列  
[0501] 5' -GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID NO:42)  
[0502] CF 07-87 (+) mvaE中的序列  
[0503] 5' -TTGCCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID NO:43)  
[0504] CF 07-88 (+) mvaE中的序列  
[0505] 5' -GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID NO:44)  
[0506] CF 07-89 (+) 序列mvaS  
[0507] 5' -GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID NO:45)

[0508] 通过测序确认命名为pTrcHis2AUpperPathway#1的质粒是正确的并将其转化到可商购的大肠杆菌菌株BL21中。在LA和50 $\mu$ g/ml羧苄青霉素上进行筛选。选择两个转化体并在LB和50 $\mu$ g/ml羧苄青霉素中生长至它们达到OD<sub>600</sub>为1.5。在甘油存在下,将两个菌株在-80℃下在瓶中冷冻。对于BL21中的pTrcHis2AUpperPathway#1,分离菌#1,将菌株命名为CF449,对于BL21中的pTrcHis2AUpperPathway#1,分离菌#2,命名为CF450。发现两个克隆在分析时表现相同。

[0509] V.UpperMVA途径在pCL1920中的克隆

[0510] 用限制性内切核酸酶SspI消化质粒pTrcHis2AUpperPathway以释放含有pTrc-mvaE-mvaS-(His-标签)-终止子的片段。在这一片段中,his-标签并未被翻译。使用Qiagen Gel Purification试剂盒从1.2%E-凝胶纯化这一平末端4.5kbp片段。通过用限制性内切核酸酶PvuII消化载体,用SAP处理并使用Qiagen Gel Purification试剂盒从1.2%E-凝胶纯化而从pCL1920制备去磷酸化的平末端4.2kbp片段。使用Roche Quick Ligation Kit连接两个片段并将它转化到TOP10化学感受态细胞。在含有壮观霉素(50 $\mu$ g/ml)的LA上筛选转化体。通过利用PCR筛选插入片段的存在来鉴定正确菌落。将质粒命名为pCLPtrcUpperPathway(图26和27)。

[0511] VI.表达组合的上和下游甲羟戊酸途径的菌株

[0512] 为了获得具有完整的甲羟戊酸途径加野葛异戊二烯合酶的菌株,将质粒pTrcKXDylkISkan和pCLPtrcUpperPathway都转化到BL21( $\lambda$ DE3)感受态细胞(Invitrogen)中并且在含有卡那霉素(50 $\mu$ g/ml)和壮观霉素(50 $\mu$ g/ml)的LA上筛选转化体。通过质粒制备来检查转化体以确保两种质粒都保留在宿主中。菌株命名为MCM127。

[0513] VII.在大肠杆菌/pUpperpathway中从葡萄糖生产甲羟戊酸

[0514] 将BL21/pTrcHis2A-mvaE/mvaS或FM5/p pTrcHis2A-mvaE/mvaS的单菌落接种到LB和羧苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)中并在37℃以200rpm振荡过夜生长。在250ml带挡板培养瓶中将这些培养物稀释到50ml培养基中至OD<sub>600</sub>为0.1。培养基为TM3,1或2%葡萄糖,羧苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)或者TM3,1%葡萄糖,水解豆油,和羧苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)或者TM3和生物量(制备的甘蔗渣、玉米秸秆或柳枝稷)。培养物在30℃以200rpm振荡生长约2-3小时至达到OD<sub>600</sub>为0.4。在该点,通过添加IPTG(400 $\mu$ M)来诱导从mvaE mvaS构建体的表达。进一步培育培养

物20或40小时,以2小时间隔取样至诱导后6小时,然后按需要在24、36和48小时取样。通过取出1ml培养物完成取样,测量OD<sub>600</sub>,在微量离心机中沉淀细胞,除去上清液并分析它的甲羟戊酸。

[0515] 用TM3培养基和2%葡萄糖作为细胞培养基,具有编码粪肠球菌AA-CoA硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶多肽的核酸的大肠杆菌细胞的14升发酵产生22克甲羟戊酸。用LB培养基和1%葡萄糖作为细胞培养基,这些细胞的摇瓶产生2-4克甲羟戊酸/升。这些菌株中的甲羟戊酸生产表明MVA途径在大肠杆菌中是有功能的。

[0516] VIII. 从含有上和下游MVA途径加野葛异戊二烯合酶的大肠杆菌BL21生产异戊二烯

[0517] 通过将含有上和下游MVA途径以及上述野葛异戊二烯合酶基因的质粒与含有实施例7所述的idi、dxs、和dxr以及异戊二烯合酶基因的质粒的多种组合来转化而产生下面的菌株。所用宿主细胞为化学感受态BL21 (λDE3) 并且通过标准方法进行转化。在含有卡那霉素(50μg/ml) 或卡那霉素加壮观霉素(浓度均为50μg/ml) 的L琼脂上筛选转化体。在37℃培养平板。得到的菌株按下面命名:

[0518] 在卡那霉素加壮观霉素(各50μg/ml) 上生长

[0519] MCM127-BL21 (λDE3) 中的pCL Upper MVA和pTrcKKDyIkIS (kan)

[0520] MCM131-BL21 (λDE3) 中的pCL 1920和pTrcKKDyIkIS (kan)

[0521] MCM125-BL21 (λDE3) 中的pCL Upper MVA和pTrcHis2B (kan)

[0522] 在卡那霉素(50μg/ml) 上生长

[0523] MCM64-BL21 (λDE3) 中的pTrcKudzu yIDI DXS (kan)

[0524] MCM50-BL21 (λDE3) 中的pTrcKudzu (kan)

[0525] MCM123-BL21 (λDE3) 中的pTrcKudzu yIDI DXS DXR (kan)

[0526] 上述菌株从冷冻母液在LA和适当抗生素上划线并在37℃过夜生长得到。每个板的单菌落用来接种摇瓶(25ml LB和适当抗生素)。将培养瓶在22℃以200rpm振荡过夜孵育。第二天早晨,将培养瓶转入37℃培养箱并以200rpm再振荡生长4.5小时。将25ml培养物离心以沉淀细胞并在5ml LB和适当抗生素中重悬细胞。将培养物稀释到25ml LB,%葡萄糖和适当抗生素中至OD<sub>600</sub>为0.1。每个菌株建立两个培养瓶,一套用IPTG(800μM) 诱导,另一套不诱导。在37℃以250rpm振荡孵育培养物。一套培养物在1.50小时后诱导(紧接着取样时间点1)。在每个取样时间点,测量OD<sub>600</sub>并按实施例1所述测定异戊二烯的量。结果如表3所示。所生成的异戊二烯的量以特定菌株的峰值生产量来表示。

[0527] 表3. 在大肠杆菌菌株中的异戊二烯生产

[0528]

<b>1. 菌株</b>	<b>2. 异戊二烯 (<math>\mu\text{g/L}</math> 培养液 /hr/OD)</b>
<b>3. MCM50</b>	<b>4. 23.8</b>
<b>5. MCM64</b>	<b>6. 289</b>
<b>7. MCM125</b>	<b>8. ND</b>
<b>9. MCM131</b>	<b>10. 痕量</b>
<b>11. MCM127</b>	<b>12. 874</b>

[0529] ND: 未检测到

[0530] 痕量: 存在峰值但不可积分。

[0531] IX. 甲羟戊酸的分析

[0532] 甲羟戊酸内酯 (1.0g, 7.7mmol) (CAS#503-48-0) 由Sigma-Aldrich (WI, USA) 提供, 其溶解在水 (7.7mL) 中作为浆液并用氢氧化钾 (7.7mmol) 处理以产生甲羟戊酸的钾盐。向甲羟戊酸的转化通过 $^1\text{H}$  NMR分析来确认。通过在14,000rpm下离心5分钟除去细胞, 随后向900  $\mu\text{l}$ 的 $\text{H}_2\text{O}$ 中添加300 $\mu\text{l}$ 等份上清液来制备用于HPLC分析的样品。然后添加高氯酸 (36 $\mu\text{l}$ 的70%溶液), 接着混合并在冰上冷却5分钟。然后再次离心样品 (14,000rpm, 5分钟) 并将上清液转入HPLC。以相同方式制备甲羟戊酸标准品 (20, 10, 5, 1和0.5g/L)。使用BioRad Aminex 87-H+柱 (300mm $\times$ 7.0mm) 通过HPLC进行甲羟戊酸 (20 $\mu\text{L}$ 注射体积) 的分析, 该柱用5mM硫酸以0.6mL/min洗脱, 以折射率 (RI) 检测。在这些条件下, 在18.5分钟时, 甲羟戊酸以内酯形式洗脱。

[0533] 实施例9、用于整合到枯草杆菌中的上和下游MVA途径的构建

[0534] I. 在枯草杆菌中上游MVA途径的构建

[0535] 来自粪肠球菌的上游途径整合到枯草杆菌中处于aprE启动子控制下。上游途径由两种基因组成: 编码AACT和HMGR的mvaE, 以及编码HMGS的mvaS。这两种基因融合在一起, 其间有终止密码子, RBS在mvaS前, 并且在aprE启动子控制下。终止子位于mvaE基因后。在mvaE基因后克隆氯霉素抗性标记并且使用同源性侧翼区进行双交换而在aprE基因座处整合该构建体。

[0536] 通过PCR扩增四个DNA片段以便它们含有使得它们通过PCR反应融合在一起的突出端序列。使用Herculase聚合酶按照生产商说明书进行PCR扩增。



- [0537] 1: PaprE
- [0538] CF 07-134 (+) aprE启动子PstI的起点
- [0539] 5' -GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:82)
- [0540] CF 07-94 (-) PaprE与mvaE融合
- [0541] 5' -CAATAATACTACTGTTTTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAA (SEQ ID NO:83)
- [0542] 模板: 枯草杆菌染色体DNA
- [0543] 2: mvaE
- [0544] CF 07-93 (+) mvaE与aprE启动子融合 (GTG起始密码子)
- [0545] 5' -TTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:84)
- [0546] CF 07-62 (-) mvaE与mvaS融合, 其间有RBS
- [0547] 5' -TTTATCAATCCCAATTGTCATGTTTTTTTACCTCCTTTATTGTTTTCTTAAATC (SEQ ID NO: 35)
- [0548] 模板: 粪肠杆菌染色体DNA (来自ATCC)
- [0549] 3. mvaS
- [0550] CF 07-61 (+) mvaE与mvaS融合, 其间有RBS
- [0551] 5' -
- [0552] GATTTAAGAAAACAATAAAGGAGGTAAAAAACATGACAATTGGGATTGATAAA (SEQ ID NO:36)
- [0553] CF 07-124 (-) mvaS末端与终止子融合
- [0554] 5' -CGGGGCCAAGGCCGTTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:85)
- [0555] 模板: 粪肠杆菌染色体DNA
- [0556] 4. 解淀粉芽孢杆菌碱性丝氨酸蛋白酶终止子
- [0557] CF 07-123 (+) mvaS末端与终止子融合
- [0558] 5' -ACCGTTCGTTCTTATCGAACTAAAAAACCGGCCTTGGCCCCG (SEQ ID NO:86)
- [0559] CF 07-46 (-) 解淀粉芽孢杆菌终止子BamHI末端
- [0560] 5' -GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0561] 模板: 解淀粉芽孢杆菌染色体DNA
- [0562] PCR融合反应
- [0563] 5. mvaE与mvaS融合
- [0564] CF 07-93 (+) mvaE与aprE启动子融合 (GTG起始密码子)
- [0565] 5' -TTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:84)
- [0566] CF 07-124 (-) mvaS末端与终止子融合
- [0567] 5' -CGGGGCCAAGGCCGTTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:85)
- [0568] 模板: 上述#2和3
- [0569] 6. mvaE-mvaS与aprE启动子融合
- [0570] CF 07-134 (+) aprE启动子PstI的起点
- [0571] 5' -GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:82)
- [0572] CF 07-124 (-) mvaS的末端与终止子融合
- [0573] 5' -CGGGGCCAAGGCCGTTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:85)
- [0574] 模板: 上述#1和#4

- [0575] 7.PaprE-mvaE-mvaS与终止子融合
- [0576] CF 07-134 (+) aprE启动子PstI的起点
- [0577] 5' -GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:82)
- [0578] CF 07-46 (-) 解淀粉芽孢杆菌终止子BamHI的末端
- [0579] 5' -GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0580] 模板:#4和#6
- [0581] 产物用限制性内切核酸酶PstI/BamHI消化并连接到用PstI/BamHI消化的pJM102 (Perego,M.1993.Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*,p.615-624.A.L.Sonenshein,J.A.Hoch,以及R.Losick(编),*Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria:biochemistry,physiology,and molecular genetics.American Society for Microbiology,Washington,D.C.)。连接物转化到大肠杆菌TOP 10化学感受态细胞并且在含有羧苄青霉素 (50μg/ml) 的LA上筛选转化体。通过测序鉴定正确质粒并命名为pJMUppperpathway2 (图50和51)。纯化后的质粒DNA转化到枯草杆菌aprEnprE Pxyl-comK并且在含有氯霉素 (50μg/ml) 的L琼脂上筛选转化体。选择正确菌落并且在含有氯霉素10、15和25μg/ml的L琼脂顺序平板接种以扩增含有上游途径的表达盒的拷贝数。
- [0582] 通过在含有1%葡萄糖的LB中生长来检测得到的菌株的甲羟戊酸生产。通过GC分析培养物的甲羟戊酸生产。
- [0583] 顺序使用这一菌株作为宿主用于下游甲羟戊酸途径的整合。
- [0584] 使用下面的引物来测序上面的多个构建体。
- [0585] 测序引物:
- [0586] CF 07-134 (-) aprE启动子PstI的起点
- [0587] 5' -GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:82)
- [0588] CF 07-58 (-) mvaE基因的起点
- [0589] 5' -ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID NO:38)
- [0590] CF 07-59 (-) mvaE基因的末端
- [0591] 5' -ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAAATAGC (SEQ ID NO:39)
- [0592] CF 07-82 (-) mvaS基因的起点
- [0593] 5' -ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID NO:40)
- [0594] CF 07-83 (-) mvaS基因的末端
- [0595] 5' -TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:41)
- [0596] CF 07-86 (-) mvaE中的序列
- [0597] 5' -GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID NO:42)
- [0598] CF 07-87 (-) mvaE中的序列
- [0599] 5' -TTGCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID NO:43)
- [0600] CF 07-88 (-) mvaE中的序列
- [0601] 5' -GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID NO:44)
- [0602] CF 07-89 (-) 序列mvaS
- [0603] 5' -GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID NO:45)

[0604] 在含有浓度为5 $\mu$ g/ml的氯霉素的LA上筛选转化体。通过测序确认一个菌落具有正确的整合,并将该菌落在若干天内平板接种在含有增加浓度至最终水平为25 $\mu$ g/ml的氯霉素的LA上。这导致含有目的基因的表达盒的扩增。得到的菌株命名为CF 455: pJMupperpathway#1 X *Bacillus subtilis* aprEnprE Pxyl comK (扩增以在含有氯霉素25 $\mu$ g/ml的LA上生长)。

[0605] II. 下游MVA途径在枯草杆菌中的构建

[0606] 由基因mvk1、pmk、mpd和idi组成的下游MVA途径组合在表达盒中,该表达盒由来自枯草杆菌染色体的nprE区域的侧翼DNA区域(整合位点)、aprE启动子、以及壮观霉素抗性标记组成(参见图28和29)。通过DNA 2.0合成这一表达盒并将它整合到含有在aprE基因座处整合上游MVA途径的枯草杆菌的染色体中。从实施例4所述的复制质粒表达野葛异戊二烯合酶基因并将它转化到整合有上和下游途径的菌株中。

[0607] 实施例10、在表达马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶和银白杨异戊二烯合酶的大肠杆菌中生产异戊二烯

[0608] I. 编码马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶(MVK)和银白杨异戊二烯合酶的载体和菌株的构建

[0609] (i) 菌株EWL201 (BL21, Cm-GI1.2-KKdyI) 的构建

[0610] 大肠杆菌BL21 (Novagen牌, EMD Biosciences, Inc.) 是转导有MCM331P1裂解物(根据Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. 所述的方法制备的裂解物)的受体菌株。通过将细胞涂布于L Agar和20 $\mu$ g/ $\mu$ l氯霉素上筛选转导子。将板在30 $^{\circ}$ C过夜孵育。对转导子的分析显示对照板(水+细胞对照板用于返回以及水和P1裂解物对照板用于裂解物污染)上没有菌落。

[0611] 挑取4个转导子并用于接种5mL L Broth和20 $\mu$ g/ $\mu$ l氯霉素。在30 $^{\circ}$ C以200rpm振荡过夜生长培养物。为了得到每个转导子的基因组DNA制备物用于PCR分析,将1.5mL过夜细胞培养物离心。用400 $\mu$ l重悬浮缓冲液(Resuspension Buffer) (20mM Tris, 1mM EDTA, 50mM NaCl, pH 7.5) 重悬细胞沉淀并加入4 $\mu$ l RNase, 无DNase (Roche)。试管在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,随后加入4 $\mu$ l 10% SDS和4 $\mu$ l的10mg/ml Proteinase K母液(Sigma-Aldrich)。试管在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。将细胞裂解物转入2ml Phase Lock Light Gel管(Eppendorf)并且加入各200 $\mu$ l饱和苯酚pH7.9 (Ambion Inc.) 和氯仿。充分混合试管并微量离心5分钟。用400 $\mu$ l氯仿进行第二次萃取并将含水层转入新的离心管中。通过加入1ml的100%乙醇沉淀基因组DNA并离心5分钟。用1ml 70%乙醇冲洗基因组DNA沉淀。除去乙醇并允许基因组DNA沉淀快速风干。将基因组DNA沉淀用200 $\mu$ l TE重悬浮。

[0612] 使用Pfu Ultra II DNA聚合酶(Stratagene)以及200ng/ $\mu$ l的基因组DNA作为模板,按照生产商的方法制备两套不同的PCR反应管。对于第1套,使用引物MCM 130和GB Cm-Rev (表4) 以保证转导子成功地整合到attTn7基因座中。第1套的PCR参数为95 $^{\circ}$ C持续2分钟(仅第一个循环), 95 $^{\circ}$ C持续25秒, 55 $^{\circ}$ C持续25秒, 72 $^{\circ}$ C持续25秒(重复步骤2-4持续28个循环), 72 $^{\circ}$ C持续1分钟。对于第2套,使用引物MVD For和MVD Rev (表4) 以确保正确整合gi1.2-KKdyI操纵子。第2套的PCR参数为95 $^{\circ}$ C持续2分钟(仅第一个循环), 95 $^{\circ}$ C持续25秒, 55 $^{\circ}$ C持续25秒, 72 $^{\circ}$ C持续10秒(重复步骤2-4持续28个循环), 72 $^{\circ}$ C持续1分钟。在1.2% E-gel (Invitrogen Corp.) 上的PCR扩增子的分析表明所有4个转导子都是正确的(挑取一个并命

名为菌株EWL201)。

[0613] ii) 菌株EWL204 (BL21, 环出序列-GI1.2-KKdyI) 的构建

[0614] 使用质粒pCP20按照Datsenko和Wanner (2000) (Datsenko等人, Proc Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000) 所述从菌株环出氯霉素标记。使用PCR产物在大肠杆菌K-12中进行染色体基因的一步失活 (Datsenko等人, PNAS, 97:6640-6645, 2000)。EWL201细胞在L Broth中生长至对数中期然后在冰预冷灭菌水中冲洗3次。将等份的50μl细胞悬浮液与1μl的pCP20混合并在2.5伏特和25uFd下使用Gene Pulser Electroporator (Bio-Rad Inc.) 在2mm杯 (Invitrogen Corp.) 中对细胞悬浮混合物进行电穿孔。立即向细胞中加入1ml的LB, 然后转入带金属盖的14ml聚丙烯管 (Sarstedt)。允许在30℃生长细胞1小时来回收它。在L Agar和20μg/μl氯霉素和50μg/μl羧苄青霉素上筛选转化体并在30℃过夜孵育。第二天, 于30℃下, 在10ml的L Broth和50μg/μl羧苄青霉素中生长单个克隆直到早对数期。然后将生长培养物的温度转至42℃持续2小时。进行一系列稀释, 然后将细胞涂布在LA板 (无抗生素筛选) 上并在30℃过夜孵育。第二天, 挑取20个菌落并接种到L Agar (无抗生素) 以及LA和20μg/μl氯霉素板上。然后在30℃过夜孵育平板。能够在LA板上生长, 但不能在LA和20μg/μl氯霉素板上生长的细胞被认为环出了氯霉素标记 (挑取一个并命名为菌株EWL204)。

[0615] iii) 质粒pEWL230 (pTrc P.alba) 的构建

[0616] 根据对大肠杆菌表达的密码子优化方法, 由DNA2.0 Inc. (Menlo Park, CA) 负责制备编码银白杨异戊二烯合酶 (银白杨HGS) 的合成基因。该合成基因被定制克隆到质粒pET24a (Novagen牌, EMD Biosciences, Inc.) 中并冻干递送 (图54、55A和55B)。

[0617] 按照生产商的方案, 使用pET24P.alba HGS作为模板, 引物MCM182和MCM 192, 以及Herculase II Fusion DNA聚合酶 (Stratagene), 进行PCR反应来扩增银白杨异戊二烯合酶 (银白杨HGS)。PCR条件如下: 95℃持续2分钟 (仅第一个循环), 95℃持续25秒, 55℃持续20秒, 72℃持续1分钟, 重复25个循环, 在72℃最终延伸3分钟。

[0618] 使用QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc.) 纯化银白杨异戊二烯合酶PCR产物

[0619] 然后在20μl含有1μl BspHI内切核酸酶 (New England Biolabs) 以及2μl 10x NEB缓冲液4的反应物中, 消化银白杨异戊二烯合酶PCR产物。反应物在37℃孵育2小时。然后使用QIAquick PCR Purification Kit纯化经消化的PCR片段。在20μl含有1μl PstI内切核酸酶 (Roche) 的反应物中, 用2μl 10x Buffer H进行第二次限制性消化。反应物在37℃孵育2小时。然后使用QIAquick PCR Purification Kit纯化经消化的PCR片段。在20μl含有1μl NcoI内切核酸酶 (Roche)、1μl PstI内切核酸酶和2μl 10x Buffer H的反应物中消化质粒pTrcHis2B (Invitrogen Corp.)。反应物在37℃孵育2小时。使用1.2%E-gel (Invitrogen Corp.) 凝胶纯化经消化的pTrcHis2B载体并使用QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 提取 (图56)。使用BspHI和NcoI位点的相容性粘性末端, 制备含有5μl银白杨异戊二烯合酶插入片段, 2μl pTrc载体, 1μl T4DNA连接酶 (New England Biolabs), 2μl 10X连接酶缓冲液和10μl ddH<sub>2</sub>O的20μl连接反应物。将连接混合物在室温孵育40分钟。通过使ddH<sub>2</sub>O流过培养皿中0.025μm硝酸纤维素滤膜 (Millipore) 并在室温下将连接混合物轻轻地放在硝酸纤维素滤膜上30分钟使连接混合物脱盐。MCM446细胞 (参见第II部分) 在LB中生长至对数中期

然后在冰冷灭菌水中冲洗3次。将等份的50 $\mu$ l细胞悬浮液与5 $\mu$ l脱盐pTrc银白杨HGS连接混合物混合。使用Gene Pulser Electroporator以2.5伏特和25 $\mu$ Fd在2mm杯中对细胞悬浮混合物进行电穿孔。立即向细胞中加入1ml的LB,然后转入带金属盖的14ml聚丙烯管(Sarstedt)。在30 $^{\circ}$ C生长细胞2小时来回收它。在L Agar和50 $\mu$ g/ $\mu$ l羧苄青霉素和10mM甲羟戊酸上筛选转化体并在30 $^{\circ}$ C孵育。第二天,挑取6个转化体并于30 $^{\circ}$ C下,在5ml的L Broth和50 $\mu$ g/ $\mu$ l羧苄青霉素试管中过夜生长。使用QIAquick Spin Miniprep Kit (Qiagen)对过夜培养物进行质粒制备。由于使用BL21细胞来繁殖质粒,对生产标准方法进行用PB Buffer 5X和PE Buffer 3X冲洗离心柱的修改以实现高质量的质粒DNA。在20 $\mu$ l反应物中用PstI消化质粒以确保正确大小的线性片段。所有6个质粒都是正确的大小并且送至Quintara Biosciences (Berkeley, CA),用引物MCM65、MCM66、EL 1000测序(表4)。DNA测序结果显示所有6个质粒都是正确的。挑取一个并命名质粒为EWL230(图57、58A和58B)。

[0620] iv) 质粒pEWL244(pTrc P.alba-mMVK)的构建

[0621] 按照生产商的方法,使用MCM376作为模板(见第v部分),引物MCM 165和MCM 177(见表4),以及Pfu Ultra II Fusion DNA聚合酶(Stratagene),进行PCR反应来扩增马氏甲烷八叠球菌MVK基因。PCR条件如下:95 $^{\circ}$ C持续2分钟(仅第一个循环),95 $^{\circ}$ C持续25秒,55 $^{\circ}$ C持续25秒,72 $^{\circ}$ C持续18秒,重复28个循环,在72 $^{\circ}$ C最终延伸1分钟。使用QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc.,)纯化马氏甲烷八叠球菌MVK PCR产物。

[0622] 然后在40 $\mu$ l含有8 $\mu$ l的PCR产物,2 $\mu$ l PmeI内切核酸酶(New England Biolabs),4 $\mu$ l 10x NEB缓冲液4,4 $\mu$ l 10x NEB BSA和22 $\mu$ l的ddH<sub>2</sub>O的反应物中,消化马氏甲烷八叠球菌MVK PCR产物。反应物在37 $^{\circ}$ C孵育3小时。然后使用QIAquick PCR Purification Kit纯化经消化的PCR片段。在47 $\mu$ l含有2 $\mu$ l NsiI内切核酸酶(Roche),4.7 $\mu$ l 10x缓冲液H和40 $\mu$ l的PmeI消化的马氏甲烷八叠球菌MVK片段的反应物中,进行第二次限制酶消化。反应物在37 $^{\circ}$ C孵育3小时。然后使用1.2%E-gel凝胶纯化经消化的PCR片段并使用QIAquick Gel Extraction Kit提取。在40 $\mu$ l含有10 $\mu$ l质粒,2 $\mu$ l PmeI内切核酸酶,4 $\mu$ l 10x NEB缓冲液4,4 $\mu$ l 10x NEB缓冲液4,4 $\mu$ l 10x NEB BSA和20 $\mu$ l的ddH<sub>2</sub>O的反应物中,消化质粒EWL230。反应物在37 $^{\circ}$ C孵育3小时。然后使用QIAquick PCR Purification Kit纯化经消化的PCR片段。在47 $\mu$ l含有2 $\mu$ l PstI内切核酸酶,4.7 $\mu$ l 10x缓冲液H和40 $\mu$ l的PmeI消化的EWL230线性片段的反应物中,进行第二次限制性消化。反应物在37 $^{\circ}$ C孵育3小时。然后使用1.2%E-gel凝胶纯化经消化的PCR片段并使用QIAquick Gel Extraction Kit提取(图59)。使用NsiI和PstI位点的相容性粘性末端,制备含有8 $\mu$ l马氏甲烷八叠球菌MVK插入片段,3 $\mu$ l EWL230质粒,1 $\mu$ l T4DNA连接酶,2 $\mu$ l 10X连接缓冲液和6 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O的20 $\mu$ l连接反应物。将连接混合物在16 $^{\circ}$ C过夜孵育。第二天,通过使ddH<sub>2</sub>O流过培养皿中0.025 $\mu$ m硝酸纤维素滤膜并在室温下将连接混合物轻轻地放在硝酸纤维素滤膜上面30分钟使连接混合物脱盐。MCM446细胞在LB中生长至对数中期然后在冰冷灭菌水中冲洗3次。将等份的50 $\mu$ l细胞悬浮液与5 $\mu$ l脱盐pTrc P.alba-mMVK连接混合物混合。使用Gene Pulser Electroporator以2.5伏特和25 $\mu$ Fd在2mm杯中对细胞悬浮混合物进行电穿孔。立即向细胞中加入1ml的LB,然后将细胞转入带金属盖的14ml聚丙烯管。在30 $^{\circ}$ C生长细胞2小时来回收它。在LA和50 $\mu$ g/ $\mu$ l羧苄青霉素和5mM甲羟戊酸板上筛选转化体并在30 $^{\circ}$ C孵育。第二天,挑取6个转化体并于30 $^{\circ}$ C下,在5ml的LB和50 $\mu$ g/ $\mu$ l羧苄青霉素试管中过夜生长。使用QIAquick Spin Miniprep Kit对过夜培养物进行质粒制备。

由于使用BL21细胞来繁殖质粒,向标准生产商方法中加入用PB缓冲液5X和PE缓冲液3X冲洗旋转柱的修改以实现高质量的质粒DNA。在20 $\mu$ l反应物中用PstI消化质粒以确保正确大小的线性片段。6个质粒中的3个是正确的大小并且送至Quintara Biosciences,以用引物MCM65、MCM66、EL 1000、EL 1003和EL 1006测序(表4)。DNA测序结果表明所有3个质粒都是正确的。取一个并命名为质粒为EWL244(图60和61A-B)。

[0623] v) 在pET200D中来自马氏甲烷八叠球菌古细菌Lower的质粒MCM376-MVK的构建

[0624] 使用Invitrogen Platinum HiFi PCR混合物,用引物MCM 161和MCM162(表4)对来自马氏甲烷八叠球菌古细菌Lower Pathway操纵子的MVK ORF(图73A-C)进行PCR扩增。将45 $\mu$ L的PCR混合物与1 $\mu$ L模板,1 $\mu$ L的10 $\mu$ M各引物,以及2 $\mu$ L水组合。反应循环如下:94 $^{\circ}$ C持续2:00分钟;94 $^{\circ}$ C持续0:30分钟,55 $^{\circ}$ C持续0:30分钟,和68 $^{\circ}$ C持续1:15分钟,30个循环;以及随后在72 $^{\circ}$ C持续7:00分钟,并置于4 $^{\circ}$ C至冷却。按照生产商的方法,将3 $\mu$ L的这一PCR反应物与Invitrogen pET200D质粒相连。将3 $\mu$ L这一连接物导入Invitrogen TOP 10细胞,然后在LA/kan50上筛选转化体。分离来自转化体的质粒并对插入片段测序,得到MCM376(图74A-C)。

[0625] vi) 菌株EWL251(BL21(DE3),Cm-GI1.2-KKdyI,pTrc P.alba-mMVK)的构建

[0626] 将MCM331细胞(含有编码酿酒酵母甲羟戊酸激酶、甲羟戊酸磷酸酶激酶、甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶、和IPP异构酶的染色体构建体gil.2KKdyI)在LB中生长至对数中期然后在冰冷灭菌水中冲洗3次。混合50 $\mu$ l的细胞悬浮物和1 $\mu$ l的质粒EWL244。使用Gene Pulser Electroporator以2.5伏特和25 $\mu$ Fd在2mm杯中对细胞悬浮混合物进行电穿孔。立即向细胞中加入1ml的LB,然后转入带金属盖的14ml聚丙烯管。在30 $^{\circ}$ C生长细胞2小时来回收它。在LA和50 $\mu$ g/ $\mu$ l羧苄青霉素和5mM甲羟戊酸板上筛选转化体并在37 $^{\circ}$ C孵育。选择一个菌落并命名为菌株EWL251。

[0627] vii) 菌株EWL256(BL21(DE3),Cm-GI1.2-KKdyI,pTrc P.alba-mMVK,pCL Upper MVA)的构建

[0628] 将EWL251细胞在LB中生长至对数中期然后在冰冷灭菌水中冲洗3次。混合50 $\mu$ l的细胞悬浮物和1 $\mu$ l的质粒MCM82(它是编码粪肠球菌mvaE和mvaS的pCL PtrcUpperPathway)。使用Gene Pulser Electroporator以2.5伏特和25 $\mu$ Fd在2mm杯中对细胞悬浮混合物进行电穿孔。立即向细胞中加入1ml的LB,然后转入带金属盖的14ml聚丙烯管。在30 $^{\circ}$ C生长细胞2小时来回收它。在LA和50 $\mu$ g/ $\mu$ l羧苄青霉素和50 $\mu$ g/ $\mu$ l壮观霉素板上筛选转化体并在37 $^{\circ}$ C孵育。挑取一个菌落并命名为EWL256。

[0629] 表4:引物序列

[0630]

引物名称	引物序列
MCM130	ACCAATTGCACCCGGCAGA (SEQ ID NO:94)
GB Cm Rev	GCTAAAGCGCATGCTCCAGAC (SEQ ID NO:95)
MVD	GACTGGCCTCAGATGAAAGC (SEQ ID NO:96)

[0631]

For	
MVD Rev	CAAACATGTGGCATGGAAAG (SEQ ID NO:97)
MCM182	GGGCCCCGTTTAAACTTTAACTAGACTCTGCAGTTAGCGTTCAAACGGCAGAA (SEQ ID NO:98)
MCM192	CGCATGCATGTCATGAGATGTAGCGTGTCCACCGAAAA (SEQ ID NO:99)
MCM65	ACAATTTACACAGGAAACAGC (SEQ ID NO:100)
MCM66	CCAGGCAAATTCTGTTTTATCAG (SEQ ID NO:101)
EL1000	GCACTGTCTTTCCGTCTGCTGC (SEQ ID NO:102)
MCM165	GCGAACGATGCATAAAGGAGGTAAAAAACATGGTATCCTGTTCTGCGCCGGG TAAGATTTACCTG (SEQ ID NO:103)
MCM177	GGGCCCCGTTTAAACTTTAACTAGACTTTAATCTACTTTCAGACCTTGC (SEQ ID NO:104)
EL1003	GATAGTAACGGCTGCGCTGCTACC (SEQ ID NO:105)
EL1006	GACAGCTTATCATCGACTGCACG (SEQ ID NO:106)
MCM161	CACCATGGTATCCTGTTCTGCG (SEQ ID NO:107)
MCM162	TTAATCTACTTTCAGACCTTGC (SEQ ID NO:108)

[0632] II. 构建具有FRT-cmR-FRT-gil.x-mKKDyI的MCM442-449:BL21和BL21 (DE3)

[0633] I) 重组模板的构建

[0634] 基于FRT-的重组盒,以及用于Red/ET-介导的整合的质粒以及抗生素标记环出序列获自Gene Bridges GmbH (Germany)。按照Gene Bridges方法进行使用这些材料的步骤。使用Stratagene Herculaase II Fusion试剂盒,按照生产商方法,使用引物MCM193和MCM195从FRT-gb2-Cm-FRT模板扩增抗性盒。50 $\mu$ l反应物循环如下:95 $^{\circ}$ C,2分钟;(95 $^{\circ}$ C,20秒,55 $^{\circ}$ C,20秒,72 $^{\circ}$ C,1分钟) $\times$ 5,(95 $^{\circ}$ C,20秒,60 $^{\circ}$ C,20秒,72 $^{\circ}$ C,1分钟) $\times$ 25;72 $^{\circ}$ C,3分钟,4 $^{\circ}$ C至冷却。通过Qiagen PCR柱,按照制造商方法纯化扩增子并在30 $\mu$ l EB (Elution Buffer) 中洗脱。在具有1x Roche H缓冲液和0.5 $\mu$ l BSA的20 $\mu$ l反应物中将DNA用NdeI和PciI消化。在各含有1 $\mu$ l的NdeI,NcoI,和Roche H缓冲液的10 $\mu$ l反应物中,消化质粒MCM376。在37 $^{\circ}$ C过夜进行反应,然后在Qiagen PCR柱上纯化切下的DNA并在30 $\mu$ l的EB中洗脱。在含有1 $\mu$ l载体,3 $\mu$ l PCR产物,1 $\mu$ l Roche Quick Ligase缓冲液2,5 $\mu$ l缓冲液1以及1 $\mu$ l连接酶的反应物中,将PCR产物连接到MCM376中。反应在室温进行3小时然后按照生产商的方法将5 $\mu$ l转化到Invitrogen TOP 10细胞。于37 $^{\circ}$ C在L琼脂(LA)和氯霉素(10 $\mu$ g/mL)上筛选转化体过夜。

[0635] 将转化体菌落铺到含氯霉素(30 $\mu$ g/mL)和卡那霉素(50 $\mu$ g/mL)的LA上用于储存并送至Quintara (Berkeley, CA) 测序。发现四个克隆具有对于插入的启动子的正确序列,该四个克隆中每个在引物MCM195的“N”处具有四个不同的核苷酸。克隆在5mL含有氯霉素(30 $\mu$ g/mL)和卡那霉素(50 $\mu$ g/mL)的LB中生长并用于制备质粒DNA。这一质粒再转化到TOP 10细胞并且冷冻菌株:

[0636] 表5:MCM484-487

[0637]

MCM484	cmR-gil.6-MVK (mazi) in pET (克隆A1-3,可变nt A)
--------	---

MCM485	cmR-gil.0-MVK (mzei) in pET (克隆B4-6, 可变nt C)
MCM486	cmR-gil.2-MVK (mzei) in pET (克隆C1-5, 可变nt G)
MCM487	cmR-gil.5-MVK (mzei) in pET (克隆C3-3, 可变nt T)

[0638] ii) 重组靶菌株MCM349和MCM441的产生

[0639] 使用质粒pGB706按照制造商的说明书从菌株MCM331环出氯霉素抗性 (cmR) 标记。MCM331细胞在LB中生长至对数中期然后在冰冷灭菌水中冲洗3次。将等份的1μl pGB706DNA加入50μl的细胞悬浮物中并在2.5伏特和25uFd下在2mm杯 (Invitrogen Corp.) 中对这一混合物进行电穿孔, 随后立即在30℃下在500μl的LB中回收1小时。于30℃下, 在含有四环素 (5ug/ml) 的LB中筛选转化体。第二天, 将一个克隆在30℃下在含有四环素 (5ug/ml) 的LB中生长直到可见的浑浊 (OD<sub>600</sub>~0.5-0.8)。将这一培养物划线到LB上并在37℃过夜生长。将不能在含有氯霉素 (10ug/mL) 的LB或含有四环素 (5ug/mL) 的LB上生长的克隆冷冻为MCM348。按上述对质粒MCM356 (pRedET羧苄青霉素; GeneBridges) 进行电穿孔并且在30℃下在含有羧苄青霉素 (50ug/mL) 的LB上筛选转化体。在30℃下在LB羧苄青霉素 (50ug/mL) 上生长克隆并冷冻为MCM349。

[0640] 通过按上述将质粒MCM356电转化到EWL204中产生菌株MCM441。

[0641] iii) FRT-cmR-FRT-gil.x-mMVK向MCM349和MCM441中的重组

[0642] 按照生产商方法, 使用质粒MCM484-487作为模板, 以引物MCM 120和MCM 196和Herculase II Fusion试剂盒进行PCR扩增。每个模板以0、1、或3uL DMSO进行三个反应。50μl反应循环如下: 95℃, 2分钟; (95℃, 20秒, 55℃, 20秒, 72℃, 1.5分钟) 进行5个循环; (95℃, 20秒, 60℃, 20秒, 72℃, 1.5分钟) 进行25个循环; 72℃, 3分钟, 4℃过夜。合并来自给定模板的三个反应物并在Qiagen PCR柱上纯化以及在60℃下用30uL的EB洗脱。在37℃用1uL在1x Roche Buffer A中的DpnI消化5uL DNA 3小时。然后对过量水微透析这一DNA 30分钟。

[0643] 来自新划线的菌株在5mL含有羧苄青霉素 (50ug/mL) 的LB中于30℃生长至OD<sub>600</sub>为~0.5。加入40mM的L-阿拉伯糖并在37℃孵育培养物1.5小时。收集细胞并用3uL上述透析的扩增子进行电穿孔, 然后在37℃下在500uL SOC中回收1.5-3小时。在37℃下, 在含有氯霉素 (5ug/mL) 的LB板上筛选转化体。

[0644] 通过PCR筛选卡那霉素抗性克隆的扩增子插入。对来自阳性克隆的PCR产物测序以验证插入的DNA的序列。扩增子与在MCM441attTn7处FRT-gil.2-yKKDyI一致并且348个被FRT-cmR-FRT-gil.x-mKKDyI代替 (yK和mK指分别来自酿酒酵母和马氏甲烷八叠球菌的甲羟戊酸激酶)。

[0645] 表6A: 下列菌株在含氯霉素 (5ug/mL) 的LB中生长并冷冻

[0646]

菌株ID	名称	亲本	重组扩增子模板
MCM442	BL21(DE3) cmR-gil.6mKKDyI A1, clone37 (A)	MCM349	MCM484



[0647]

MCM443	BL21(DE3) cmR-gi1.0mKKDyI B4, clone27 (C)	MCM349	MCM485
MCM444	BL21(DE3) cmR-gi1.2mKKDyI C1, clone16 (G)	MCM349	MCM486
MCM445	BL21(DE3) cmR-gi1.5mKKDyI C3, clone7 (T)	MCM349	MCM487
MCM446	BL21 cmR-gi1.6mKKDyI A1-3 (A)	MCM441	MCM484
MCM447	BL21 cmR-gi1.0mKKDyI B4-6 (C)	MCM441	MCM485
MCM448	BL21 cmR-gi1.2mKKDyI C1-5 (G)	MCM441	MCM486
MCM449	BL21 cmR-gi1.5mKKDyI C3-3 (T)	MCM441	MCM487

[0648] 表6B: 引物

[0649]

MCM120	AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTACATGGAGTTGGCAGGAT GTTTGATTAAAAGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGCGG (SEQ ID NO:109)
MCM193	GATATACATATGAATTAACCCCTCACTAAAGG (SEQ ID NO:110)
MCM195	GCATGCATGACATGTTTTTTTACCTCCTTTGTTATCCGCTCACAAT TAGTGGTTGAATTATTTGCTCAGGATGTGGCATNGTCAAGGGCG CGGCCGCGATCTAATACGACTCACTATAGGGCTCG (SEQ ID NO:111)
MCM196	AGGCTCTCAACTCTGACATGTTTTTTTCCTCCTTAAGGGTGCAGG CCTATCGCAAATTAGCTTAATCTACTTTCAGACCTTGCTCGG (SEQ ID NO:112)

[0650] III. 酵母提取物对表达来自甲羟戊酸途径的基因并且以15-L规模在补料-分批培养中生长的大肠杆菌中异戊二烯生产的影响

[0651] 培养基配方 (每升发酵培养基):

[0652]  $K_2HPO_4$  7.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2g, 一水合柠檬酸2g, 柠檬酸铁铵0.3g, 酵母提取物0.5g, 1000X改良的微量金属溶液1ml。所有组分一起添加并溶解在 $diH_2O$ 中。对这一溶液高压灭菌。用氢氧化铵 (30%) 调节pH至7.0并定容至体积。灭菌以及调整pH后, 添加葡萄糖10g, 硫酸素\*HC10.1g以及抗生素。

[0653] 1000X改良的微量金属溶液:

[0654] 柠檬酸\* $H_2O$  40g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  30g, NaCl 10g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  100mg,  $H_3BO_3$  100mg,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  100mg。以每次在 $diH_2O$ 中溶解一种来溶解每一组分, 用HCl/NaOH调节pH至3.0, 然后定容至体积并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0655] 在15-L生物反应器中, 用含有上游甲羟戊酸 (MVA) 途径 (pCL Upper), 整合的下游MVA途径 (gi1.2KXDyI) 和高表达的来自马氏甲烷八叠球菌的甲羟戊酸激酶以及来自银白杨 (pTrcAlba-mMVK) 的异戊二烯合酶的BL21 (DE3) 大肠杆菌细胞进行发酵。进行这一实验来监控在期望的发酵pH 7.0以及温度30℃下从葡萄糖形成的异戊二烯。解冻冷冻瓶的大肠杆菌菌株并接种到大豆胨-酵母提取物培养基中。当接种物生长至在550nm处测量的OD为1.0后, 使用500ml接种15-L生物反应器, 使初始体积达到5-L。

[0656] i) 在没有酵母提取物加料的补料-分批培养中生长的大肠杆菌细胞 (EL256) 的异戊二烯生产

[0657] 以指数速率供料葡萄糖直到细胞达到稳定期。这一时间后, 葡萄糖加料减少以满足代谢要求。在67小时发酵期间, 送至生物反应器的葡萄糖总量为3.9kg。通过添加异丙基-β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 完成诱导。当在550nm的光密度 (OD<sub>550</sub>) 达到数值9时, IPTG

浓度达到102uM。当OD<sub>550</sub>达到140时，IPTG浓度升至192uM。图67A显示了生物反应器中随着时间的OD<sub>550</sub>谱。使用Hiden质谱仪测定生物反应器的废气中的异戊二烯水平。异戊二烯的滴定度随着发酵进程增加至终值为35.6g/L(图67B)。在67小时发酵期间所产生的异戊二烯的总量为320.6g而生产的时间进程如图67C所示。如TCER所测量的代谢活性谱如图67D所示。在发酵期间进入到生产异戊二烯所利用碳的摩尔产率为17.9%。来自葡萄糖的异戊二烯的质量百分产率为8.1%。

[0658] 在具有酵母提取物加料的补料-分批培养中生长的大肠杆菌细胞(EL256)中的异戊二烯生产

[0659] 以指数速率供料葡萄糖直到细胞达到稳定期。这一时间后，葡萄糖加料减少以满足代谢要求。在68小时发酵期间，送至生物反应器的葡萄糖总量为7.1kg。发酵期间也加料总计1.06kg的酵母提取物。通过添加IPTG完成诱导。当在550nm的光密度(OD<sub>550</sub>)达到数值7时，IPTG浓度达到208uM。当OD<sub>550</sub>达到180时，IPTG浓度升至193uM。图68A显示了生物反应器中随着时间的OD<sub>550</sub>谱。使用Hiden质谱仪测定生物反应器的废气中的异戊二烯水平。异戊二烯的滴定度随着发酵进程增加至最大值为32.2g/L(图68B)。在68小时发酵期间所产生的异戊二烯的总量为395.5g而生产的时间进程如图68C所示。图68D示出体积生产率的时间进程并且示出在23和63小时之间，维持平均速率为1.1g/L/hr。如CER所测量的代谢活性谱如图68E所示。在发酵期间进入到生产异戊二烯所利用碳的摩尔产率为10.3%。来自葡萄糖的异戊二烯的质量百分产率为5.2%。

[0660] IV. 在含有甲羟戊酸(MVA)途径和异戊二烯合酶(EWL256)的大肠杆菌中从不同碳源生产异戊二烯

[0661] 培养基配方(每升发酵培养基)：

[0662] K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>13.6g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>13.6g, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 2g, 一水合柠檬酸2g, 柠檬酸铁铵0.3g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>3.2g, 酵母提取物0.2g, 1000X改良的微量金属溶液1ml。所有组分顺序溶解在diH<sub>2</sub>O中。用氢氧化铵(30%)调节pH至6.8并定容至体积。用0.22微米过滤器过滤灭菌培养基。添加碳源至终浓度为1%。在灭菌以及调整pH后，添加所需的抗生素。

[0663] 1000X改良的微量金属溶液：

[0664] 柠檬酸\*H<sub>2</sub>O 40g, MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 30g, NaCl 10g, FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g, CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1g, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g, CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 100mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>100mg, NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 100mg。以每次在di H<sub>2</sub>O中溶解一种来溶解每一组分，用HCl/NaOH调节pH至3.0，然后定容至体积并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0665] i) AFEX生物量水解物的制备

[0666] 水解AFEX预处理玉米秸秆来制备含有木糖、葡萄糖和乙酸的生物量水解物。

[0667] 使用获自Michigan Biotechnology Institute的AFEX预处理玉米秸秆。预处理条件为60%湿度，1:1氨负载，以及90℃持续30分钟，然后风干。AFEX预处理玉米秸秆的水分含量为21.27%。在AFEX预处理玉米秸秆中的葡聚糖和木聚糖含量分别是31.7%和19.1%(基于干物质)。所用酶为Accellerase 1000, Grindamyl H121(来自用于面包制造工业的黑曲霉的Danisco木聚糖酶产物)。

[0668] 对于糖化，将20g的AFEX预处理玉米秸秆与5ml的1M柠檬酸钠缓冲液，pH 4.8，2.25ml的Accellerase 1000，0.1ml的Grindamyl H121，以及72.65ml的DI水加入500ml培养瓶。将培养瓶放入定轨摇床并在50℃孵育96小时。

[0669] 为了分析,从摇床取一个样品并使用HPLC分析。水解物含有37.2g/L的葡萄糖,24.3g/L的木糖,和7.6g/L葡萄糖和/或木糖的寡聚物。此外,水解物也含有1.17g/L乙酸盐。

#### [0670] ii) 实验方法

[0671] 含有MVA途径和异戊二烯合酶的大肠杆菌菌株EWL256的接种物取自冷冻瓶并划线到含有壮观霉素(50ug/mL)和羧苄青霉素(50ug/mL)的LB液体培养基琼脂板上并在30℃过夜培养。将单菌落接种到含有葡萄糖、木糖、丙三醇、乙酸盐或生物量作为唯一碳源的TM3培养基中并在30℃过夜生长。在乙酸盐上生长的细胞达到了明显更低的光密度。将在葡萄糖、丙三醇、生物量水解物或乙酸盐上生长的细胞稀释成20mL含有各自碳源的TM3培养基以达到在600nm处测量的光密度为0.1之间。从葡萄糖过夜培养物来制备不含有任何碳源的阴性对照。用葡萄糖和木糖进行单独的实验,其中培养物都稀释到光密度为0.05。所有培养条件(除了乙酸盐和丙三醇)都一式两份检测并且呈现的结果是这些培养物之间的平均值。从实验开始,由200μM IPTG诱导异戊二烯的生产。培养瓶在定轨摇床(200rpm)中在30℃孵育并生长,随后测量光密度。当葡萄糖供料培养物达到光密度接近0.4后,对所有检测的碳源每小时分析样品的异戊二烯生产,持续3小时。将100μL样品一式两份转入2mL玻璃瓶中,密封并在30℃孵育30min。然后通过80℃孵育8分钟来热处死细菌。使用GC-MS测量产生的异戊二烯的量并计算比生产率(μg/L\*hr)。

#### [0672] iii) 结果

[0673] 在所有检测碳源上生长期间,可以阐明显著的异戊二烯生产。这些碳源是含有5或6个碳单元(C5或C6)的常用醇、有机酸、糖,以及生物量水解物的实例。

[0674] 在生物量水解物上的初始生长速率与在葡萄糖上的生长速率是相当的(图69A)。生物量水解物上生长期间的初始比生产率明显比在葡萄糖上生长期间的要高。这证明生物量水解物可以用作有效的碳源来生产异戊二烯。在生长255分钟后,在生物量水解物上的比生产率下降(图69B)。相比于葡萄糖,以木糖作为唯一碳源的细菌具有较低的生长速率(图69C),但是测量到明显的比异戊二烯生产力(图69D)。这表明可以利用C5和C6糖来通过甲羟戊酸途径生产异戊二烯。

[0675] 出人意料地,在乙酸盐作为唯一碳源上生长的细菌的异戊二烯比生产率为在葡萄糖上生长期间的约两倍高(图69A)。当相比于葡萄糖,在乙酸盐上的细菌生长较慢(图69B),但是所进行的实验表明乙酸盐也可以用作碳源来生产异戊二烯。如由HPLC所测量,乙酸盐也存在于生物量水解物中。

[0676] 以丙三醇作为唯一碳源的细菌生长良好(图69A)并且示出了显著的异戊二烯生产(图69B)。这表明常用醇也可用作碳源来通过甲羟戊酸途径生产异戊二烯。

[0677] 实施例11、来自植物的异戊二烯合酶在链霉菌属中的表达

[0678] 异戊二烯合酶Kudzu的基因获自质粒pJ201:19813。质粒pJ201:19813编码来自葛(*Pueraria lobata*) (葛植物)的异戊二烯合酶并且是对于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、金红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)和棒杆菌(*Corynebacterium*)进行密码子优化的(图9A-79C (SEQ ID NO:123))。用限制性内切核酸酶NdeI和BamHI对质粒pJ201:19813的消化释放了基因iso19813,它连接到链霉菌-大肠杆菌穿梭载体pUWL201PW(Doumith等,Mol.Gen.Genet.264:477-485,2000;图71)以产生pUWL201\_iso。通过对pUWL201\_iso的限制性分析来验证成功的克隆。异戊二烯

合酶iso19813的表达在erm-启动子控制下,该启动子允许在链霉菌种中的组成型表达而不在大肠杆菌中表达。

[0679] 通过如Hopwood等人,The John innes foundation,Norwich,1985所述的原生质体转化将PUWL201PW(无插入片段)和pUWL201\_iso导入白色链霉菌(*Streptomyces albus*) J1074(Sanchez等人,Chem.Biol.9:519-531,2002)。

[0680] 用1.9 $\mu$ g pUWL201PW或2.9 $\mu$ g pUWL201\_iso转化200 $\mu$ l等份原生质体悬液。在非选择性R5-琼脂板上于28 $^{\circ}$ C过夜孵育后,通过进一步在含有硫链丝菌肽(250 $\mu$ g/ml)的覆盖R3的琼脂中孵育4天来筛选阳性转化体。使用Plasmid Mini Kit(Qiagen)通过质粒制备来检验硫链丝菌肽抗性转化体中pUWL-质粒的存在。将制备的质粒再导入大肠杆菌DH5 $\alpha$ 以产生足量待通过限制性分析来分析的质粒DNA。在含有氨苄青霉素的L-琼脂板上筛选阳性转化体并通过由Nde I和BamHI内切核酸酶消化质粒DNA来进行插入片段的分析。在阳性pUWL201iso克隆中鉴定的异戊二烯合酶为1.7kb片段,而在对照菌株(pUWL201PW)中,没有观察到此片段。

[0681] 分析白色链霉菌野生型菌株和含有对照质粒pUWL201PW或异戊二烯合酶编码pUWL201\_iso的转化体的异戊二烯形成。在硫链丝菌肽(200 $\mu$ g/ml)存在或不存在下,在固体培养基(胰蛋白胨大豆肉汤琼脂,TSB;2.5ml)上一式两份培养菌株并在28 $^{\circ}$ C下在密封顶空瓶(总体积20ml)中孵育4天。通过GC-MS以SIM-模式分析500 $\mu$ l顶空样品(终点测量)并根据参考保留时间和分子量(67m/z)来鉴定异戊二烯。通过之前产生的校准曲线来量化存在于顶空样品中的异戊二烯。虽然野生型白色链霉菌和带有pUWL201PW的对照菌株产生的异戊二烯的浓度略高于检测极限(0.04-0.07ppm),但是带有pUWL201\_iso的白色链霉菌产生的异戊二烯相比于对照(0.75ppm;图72)超出至少10倍。结果表明植物来源的异戊二烯合酶在放线菌组中的原核生物中成功表达。

[0682] 实施例12、在含有上游或上和下游甲羟戊酸途径加野葛异戊二烯合酶的大肠杆菌fadR atoC LS5218中从脂肪酸或棕榈油生产异戊二烯或甲羟戊酸

[0683] 大肠杆菌fadR atoC菌株LS5218(#6966)获自Coli Genetic Stock Center.FadR编码转录抑制物,该转录抑制物负调控编码脂肪酸降解酶的基因的表达(Campbell等人,J.Bacteriol.183:5982-5990,2001)。AtoC是双组分调控系统中的应答调控子,而AtoS调控乙酰乳酸代谢.fadR atoC菌株允许脂肪酸降解基因的组成型表达并且将长链脂肪酸掺入长链长度的多羟基链烷酸。当将棕榈油用作碳源来生产甲羟戊酸或异戊二烯时,棕榈油转化成丙三醇加脂肪酸。用于此的方法是本领域公知的,并且它可以通过由脂肪酶(例如猪胰脂肪酶、皱褶假丝酵母脂肪酶或其他类似脂肪酶)孵育来酶促完成或这通过用诸如氢氧化钠的碱来皂化而化学完成。

[0684] i) 表达上游甲羟戊酸途径的大肠杆菌fadR atoC菌株

[0685] 使用标准方法(Sambrooke等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2ed.,Cold Spring Harbor,1989)将pCLPtrcUpperPathway电穿孔到LS5218来产生菌株WW4。通过在补充有C12脂肪酸(FA)或棕榈油作为碳源的TM3培养基中培养细胞时甲羟戊酸(MVA)的生产来证明质粒的掺入。为了证明由WWC从脂肪酸生产MVA,将来自过夜培养物的细胞在5mL补充有0.25% C12FA(Sigma目录号#L9755)的改良TM3培养基(没有酵母提取物的TM3)中稀释1至100倍。在30 $^{\circ}$ C过夜孵育IPTG诱导的培养物后,MVA生产的第一个标志(24mg/

L) 是明显的。生产在3天的时间内增加,产生的MVA的最终水平为194mg/L。为了证明WW4从油生产MVA,将来自过夜培养物的细胞在改良TM3培养基中稀释1至100倍,该TM3培养基每5mL补充有200mg经消化的棕榈油。在30℃过夜孵育IPTG诱导的培养物后,MVA生产的第一个标志(50mg/L)是明显的。生产在3天的时间内增加,生产的MVA的最终水平为500mg/L。

[0686] ii) 表达上和下甲羟戊酸途径加野葛异戊二烯合酶的大肠杆菌fadR atoC菌株

[0687] 用pMCM 118[pTrcKKDyIkIS]转化大肠杆菌菌株WW4(LS5218fadR atoC pCLPtrcUpperPathway)以得到WW10。当菌株在TM3和葡萄糖中培养并用IPTG(100,300或900uM)诱导时产生异戊二烯的证据证明了质粒的掺入。菌株对于IPTG是相对敏感的并且即使在100uM IPTG时都显示了明显的生长缺陷。这些结果如图70A所示。

[0688] 为了检测从十二烷酸的异戊二烯生产,于37℃在含有壮观霉素(50ug/ml)和卡那霉素(50ug/ml)的L液体培养基中以200rpm振荡过夜培养WW10。通过离心用改良的TM3培养基冲洗细胞并用这一培养基以它们的原始培养体积重悬细胞。将来自这一初始培养物的经冲洗和重悬的细胞以1:100和1:10稀释到5mL含有0.125%C12FA(Sigma目录号#L9755)的改良TM3培养基中。

[0689] 为了阐明来自棕榈油的甲羟戊酸的生产,将油在37℃和250rpm用脂肪酶预消化若干天以释放脂肪酸(水解证据由振荡试管时形成的泡沫来判断)。

[0690] 此外,通过将冲洗过的细胞在具有棕榈油的检测管中所含的改良TM3培养基中稀释10倍来建立培养物。通过向冲洗过的细胞的剩余物(2.5mL)加入0.125%C12FA而不进一步稀释(生物转化)而建立又一个管。在30℃以250rpm振荡生长3.75小时后,通过添加50uM IPTG来诱导所有培养物。继续孵育4小时,此后,用改良的顶空检测法(在30℃以500rpm振荡下的1小时累积)检测200uL每种培养基的异戊二烯累积。在GCMS分析前,通过12小时孵育测定玻璃组(assay glass block)来进行其它异戊二烯检测法。继续对该诱导的培养物的过夜孵育并且于第二天早晨,再次对200uL等份试样进行异戊二烯生产的测定(1小时,30摄氏度,500rpm Shel-Lab摇床)。这些培养物的分析显示出显著水平的异戊二烯生产。在过夜起始培养物经孵育并过夜诱导后,将它以1/10稀释接种,在培养物中观察到最高水平的异戊二烯。这一结果表明这一培养物继续生长并且细胞密度增加。这些结果示出于图70B。由于脂肪酸悬液具有浑浊的外观,因而不能直接测量细胞密度。因此通过将等份培养物铺板来测定这一培养物的细胞密度,并且显示为 $8 \times 10^7$ 个菌落形成单位。这几乎对应于OD<sub>600</sub>为0.1。然而,这一培养物提供了显著的异戊二烯生产;在没有这一实例中所述途径的类似菌株中没有观察到异戊二烯。

[0691] 实施例13、通过ybhE在大肠杆菌中的组成型表达改善异戊二烯生产

[0692] 这一实例示出相比于具有野生型ybhE的对照菌株,在组成型表达ybhE(pg1)的菌株中的异戊二烯生产。基因ybhE(pg1)编码6-磷酸葡萄糖酸内酯酶,该酶抑制异源表达的蛋白的翻译后葡萄糖酸化并提高产物可溶性和产量,同时也提高通过磷酸戊糖途径的生物量产量和流量(Aon等人,Applied and Environmental Microbiology,74(4):950-958,2008)。

[0693] 用ybhE基因在复制质粒pBBR1MCS5(Gentamycin)(获自Dr.K.Peterson,Louisiana State University)上的组成型表达来构建产生异戊二烯的大肠杆菌BL21菌株(EWL256)。

[0694] 基于FRT-的重组表达盒,以及用于Red/ET-介导的整合的质粒以及抗生素标记环出序列获自Gene Bridges GmbH(Germany)。按照Gene Bridges方法进行使用这些材料的步

骤。使用Stratagene Herculanase II Fusion试剂盒,按照生产商方法,使用引物Pgl-F和PglGI1.5-R从FRT-gb2-Cm-FRT模板扩增抗性盒。PCR反应物(50uL终体积)包括:5uL缓冲液,1uL模板DNA(来自Gene Bridges的FRT-gb2-Cm-F),10pmol每种引物和1.5uL 25mM dNTP混合物,以dH<sub>2</sub>O制成50uL。反应循环如下:1x 2分钟,95℃,然后30个循环(95℃,30秒,63℃,30秒,72℃,3分钟)。

[0695] 使用QiaQuick PCR纯化试剂盒(Qiagen)对得到的PCR产物进行纯化并将其如下电穿孔到携带含pRed-ET重组酶的质粒的电感受态MG1655细胞。通过在30℃生长于5mL的L液体培养基中至OD<sub>600</sub>~0.6而制备细胞。通过向细胞加入4%阿拉伯糖并允许在30℃生长30分钟随后在37℃生长30分钟来诱导重组酶表达。在冰预冷dH<sub>2</sub>O中将等份的1.5mL细胞冲洗3-4次。将最终的细胞沉淀在40uL的冰预冷dH<sub>2</sub>O中重悬浮并加入2-5uL的PCR产物。在Gene Pulser Electroporator (Bio-Rad Inc.)中以1.3kV在1-mm通道杯中进行电穿孔。在30℃回收细胞1-2小时并在含有氯霉素(5ug/mL)的L琼脂上铺板。通过PCR分析5个转化体并使用整合位点侧翼的引物来测序(2个引物对:pgl和49rev以及3' EcoRV-pglstop;Bottom Pgb2和Top GB's CMP(946))。筛选正确的转化体并将这一菌株命名为MG1655GI1.5-pgl::CMP。

[0696] 将MG1655GI1.5-pgl::CMP的染色体DNA用作模板来产生含有FRT-CMP-FRT-GI1.5-ybhE构建体的PCR片段。如下将这一构建体克隆到pBBR1MCS5(Gentamycin)中。该片段,在此称作CMPGI1.5-pgl,是使用5' 引物Pglconfirm-F和3' 引物3' EcoRV-pglstop来扩增的。使用Invitrogen TOPO-Blunt克隆试剂盒,按照生产商的建议,将得到的片段克隆到质粒载体pCR-Blunt II-TOPO。将含有CMP-GI1.5-pgl片段的NsiI片段克隆到pBBR1MCS5(Gentamycin)的PstI位点。制备20μl连接反应物,其包含5μl CMP-GI1.5-pgl插入片段,2μl pBBR1MCS5(Gentamycin)载体,1μl T4DNA连接酶(New England Biolabs),2μl 10x连接酶缓冲液,和10μl ddH<sub>2</sub>O。室温孵育连接混合物40分钟然后使用上面公开的参数将2-4uL电穿孔到电感受态Top 10细胞(Invitrogen)。在含有10ug/ml氯霉素和5ug/ml庆大霉素的L琼脂上筛选转化体。使用上述多个引物以及由Sequetech,CA提供的内部T3和反向引物,测定所筛选克隆的序列。这一质粒命名为pBBRCMPGI1.5-pgl(图77A-B和SEQ ID NO:122)。

[0697] 按上面在实施例10中所述,将质粒pBBRCMPGI1.5-pgl电穿孔到EWL256并且将转化体在含有氯霉素(10ug/mL)、庆大霉素(5ug/mL)、壮观霉素(50ug/mL)和羧苄青霉素(50ug/mL)的L琼脂上铺板。筛选一个转化体并命名为RM11608-2。

[0698] 引物:

[0699] Pgl-F

[0700] 5' -

[0701] ACCGCCAAAAGCGACTAATTTTAGCTGTTACAGTCAGTTGAATTAACCCTCACTAAAGGGCGGCCGC-3' (SEQ ID NO:115)

[0702] PglGI1.5-R

[0703] 5' -

[0704] GCTGGCGATATAAACTGTTGCTTCATGAATGCTCCTTTGGGTTACCTCCGGGAAACGCGGTTGATTTGTTTAGTGGTTGAATTATTGCTCAGGATGTGGCATAGTCAAGGGCGTGACGGCTCGCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAG-3' (SEQ ID NO:116)

[0705] 3'EcoRV-pglstop:

[0706] 5'-CTT GAT ATC TTA GTG TGC GTT AAC CAC CAC (SEQ ID NO:117)

[0707] pgl+49rev:CGTGAATTTGCTGGCTCTCAG (SEQ ID NO:118)

[0708] Bottom Pgb2:GGTTTAGTTCCTCACCTTGTC (SEQ ID NO:119)

[0709] Top GB's CMP (946):ACTGAAACGTTTTTCATCGCTC (SEQ ID NO:120)

[0710] Pglconfirm-F

[0711] 5'-ACCGCCAAAAGCGACTAATTTTAGCT-3' (SEQ ID NO:121)

[0712] i) 小规模分析

[0713] 培养基配方 (每升发酵培养基):

[0714]  $K_2HPO_4$  13.6g,  $KH_2PO_4$  13.6g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2g, 一水合柠檬酸 2g, 柠檬酸铁铵 0.3g,  $(NH_4)_2SO_4$  3.2g, 酵母提取物 1g, 1000X 微量金属溶液 1ml。所有组分一起添加并溶解在  $diH_2O$  中。用氢氧化铵 (30%) 调节 pH 至 6.8 并定容至体积。用 0.22 微米过滤器过滤灭菌培养基。在灭菌以及调整 pH 后, 添加葡萄糖 5.0g 和抗生素。

[0715] 1000X 微量金属溶液:

[0716] 柠檬酸  $\cdot H_2O$  40g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  30g, NaCl 10g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  100mg,  $H_3BO_3$  100mg,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  100mg。以每次在  $diH_2O$  中溶解一种组分来溶解每一组分, 用 HCl/NaOH 调节 pH 至 3.0, 然后定容至体积并用 0.22 微米过滤器过滤灭菌。

[0717] a) 实验步骤

[0718] 通过在来自 MicroReactor Technologies, Inc. 的 Cellerator™ 中生长菌株来分析异戊二烯生产。24 孔中每孔的工作体积为 4.5mL。温度维持在 30℃, pH 设定为 7.0, 氧气流设定为 20sccm 并且搅拌速率为 800rpm。将取自冷冻瓶的大肠杆菌菌株接种物划线到 LB 液体培养基琼脂板上 (具有抗生素) 并在 30℃ 培养。将单菌落接种到含有抗生素的培养基并过夜生长。将细菌稀释到 4.5mL 的带抗生素的培养基中至达到在 550nm 处测量的光密度为 0.05。

[0719] 使用气相色谱-质谱仪 (GC-MS) (Agilent) 顶空检测法进行异戊二烯的废气分析。如下制备样品: 将 100μL 的整个液体培养基至于密封 GC 瓶中并在 30℃ 孵育固定时间 30 分钟。在由 70℃ 温育 5 分钟的热处死步骤后, 将样品装载到 GC。

[0720] 在运行期间, 使用微板读数器获得在 550nm 波长下的光密度 (OD)。通过将异戊二烯浓度 (μg/L) 除以 OD 读数和 时间 (小时) 来获得比生产力。

[0721] 在 200 和 400μM IPTG 诱导水平下评估两菌株 EWL256 和 RM11608-2。在诱导后 1、2.5、4.75 和 8 小时分析样品的异戊二烯生产和细胞生长 (OD<sub>550</sub>)。样品一式两份进行。

[0722] b) 结果

[0723] 实验表明在 2 种不同 IPTG 浓度下, 表达 ybhE (pgl) 的菌株相比于对照菌株的异戊二烯比生产率显著增加了 2-3 倍。

[0724] ii) 来自表达马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、银白杨异戊二烯合酶和 pgl 过表达 (RHM 111608-2) 并且在 15-L 规模下于补料分批培养中生长的大肠杆菌的异戊二烯发酵

[0725] 培养基配方 (每升发酵培养基):

[0726]  $K_2HPO_4$  7.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2g, 一水合柠檬酸 2g, 柠檬酸铁铵 0.3g, 酵母提取物 0.5g, 1000X 改良的微量金属溶液 1ml。所有组分一起添加并溶解在  $diH_2O$  中。对这一溶液高压灭

菌。用氢氧化铵(30%)调节pH至7.0并定容至体积。灭菌以及调整pH后,添加葡萄糖10g,硫胺素\*HC10.1g以及抗生素。

[0727] 1000X改良的微量金属溶液:

[0728] 柠檬酸\*H<sub>2</sub>O 40g, MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 30g, NaCl 10g, FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g, CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1g, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g, CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 100mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>100mg, NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 100mg。以每次在Di H<sub>2</sub>O中溶解一种组分来溶解每一组分,用HCl/NaOH调节pH至3.0,然后定容至体积并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0729] 在15-L生物反应器中用含有上游甲羟戊酸(MVA)途径(pCL Upper),整合的下游MVA途径(gil.2KXDyI),高表达的来自马氏甲烷八叠球菌的甲羟戊酸激酶以及来自银白杨(pTrcAlba-mMVK)的异戊二烯合酶以及高表达pgl(pBBR-pgl)的BL21(DE3)大肠杆菌细胞进行发酵。进行这一实验来监测在期望的发酵pH 7.0以及温度34℃下从葡萄糖形成的异戊二烯。解冻冷冻瓶的大肠杆菌菌株并接种到大豆脲-酵母提取物培养基中。在接种物生长至在550nm处测量的OD为1.0后,使用500mL接种15-L生物反应器,使初始体积达到5-L。

[0730] 以指数速率供料葡萄糖直到细胞达到稳定期。这一时间后,葡萄糖加料减少以满足代谢要求。在40小时(59小时)发酵期间,送至生物反应器的葡萄糖总量为3.1kg(在59小时为4.2kg)。通过添加IPTG完成诱导。当在550nm的光密度(OD<sub>550</sub>)达到数值4时,IPTG浓度达到110uM。当OD<sub>550</sub>达到150时,IPTG浓度升至192uM。图78A显示了生物反应器中随着时间的OD<sub>550</sub>谱。使用Hiden质谱仪测定生物反应器的废气中的异戊二烯水平。异戊二烯的滴定度随着发酵进程增加至在40小时的最大值为33.2g/L(在59小时为48.6g/L)(图78B)。异戊二烯的滴定度随着发酵进程增加至在40小时的最大值为40.0g/L(在59小时为60.5g/L)(图78C)。在40小时(59小时)发酵期间所产生的异戊二烯的总量为281.3g(在59小时为451.0g),生产的时间进程如图78D所示。体积生产力的时间进程如图78E所示并且示出在0和40小时之间维持平均速率在1.0g/L/hr(在19和59小时之间为1.4g/L/hr)。如通过CER所测量的代谢活性谱如图78F所示。在40小时发酵期间进入到生产异戊二烯的所利用碳的摩尔产率为19.6%(在59小时为23.6%)。在40小时来自葡萄糖的异戊二烯的重量百分产率为8.9%(在59小时为10.7%)。

[0731] 除非另有说明,否则在此使用的所有科技术语的含义是本发明所属领域的技术人员通常所理解的。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,第二版,John Wiley和Sons,New York(1994),以及Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology,Harper Perennial,N.Y.(1991)为熟练技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的一般词典。应理解的是,本发明不限于所述的具体方法学、方案和试剂,因为它们可以改变。本领域熟练技术人员也将理解,也可以将与在此所述的任何方法和材料相似或等同的那些用于实施或测试本发明。

[0732] 在此提供的标题不限于本发明多个方面或实施方式,可以通过参考作为整体的说明书来得到它们。

[0733] 对于在此所使用,除非另有明确指示,否则术语“一个”或类似术语的使用指一个或多个。

[0734] 在此所指的“约”某数值或参数包括(并且描述了)涉及该数值或参数本身的实施方式。例如,涉及“约X”的描述包括对“X”的描述。数字范围包括定义该范围的数字。



[0735] 应理解的是,在此所述的本发明的方面和实施方式包括“包括”该方面和实施方式、“由该方面和实施方式组成”和“基本上由该方面和实施方式组成”。

[0736] 附录1

[0737] 示例性1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶核酸和多肽

[0738] ATH:AT3G21500 (DXPS1) AT4G15560 (CLA1) AT5G11380 (DXPS3)

[0739] OSA:433876843400904342614

[0740] CME:CMF089C

[0741] PFA:MAL13P1.186

[0742] TAN:TA20470

[0743] TPV:TP01\_0516

[0744] ECO:b0420 (dxs)

[0745] ECJ:JW0410 (dxs)

[0746] ECE:Z0523 (dxs)

[0747] ECS:ECs0474

[0748] ECC:c0531 (dxs)

[0749] ECI:UTI89\_C0443 (dxs)

[0750] ECP:ECP\_0479

[0751] ECV:APEC01\_1590 (dxs)

[0752] ECW:EcE24377A\_0451 (dxs)

[0753] ECX:EcHS\_A0491

[0754] STY:STY0461 (dxs)

[0755] STT:t2441 (dxs)

[0756] SPT:SPA2301 (dxs)

[0757] SEC:SC0463 (dxs)

[0758] STM:STM0422 (dxs)

[0759] YPE:YPO3177 (dxs)

[0760] YPK:y1008 (dxs)

[0761] YPM:YP\_0754 (dxs)

[0762] YPA:YPA\_2671

[0763] YPN:YPN\_0911

[0764] YPP:YPDSF\_2812

[0765] YPS:YPTB0939 (dxs)

[0766] YPI:YpsIP31758\_3112 (dxs)

[0767] SFL:SF0357 (dxs)

[0768] SFX:S0365 (dxs)

[0769] SFV:SFV\_0385 (dxs)

[0770] SSN:SSON\_0397 (dxs)

[0771] SBO:SBO\_0314 (dxs)

[0772] SDY:SDY\_0310 (dxs)

[0773] ECA:ECA1131 (dxs)  
[0774] PLU:plu3887 (dxs)  
[0775] BUC:BU464 (dxs)  
[0776] BAS:BUsg448 (dxs)  
[0777] WBR:WGLp144 (dxs)  
[0778] SGL:SG0656  
[0779] KPN:KPN\_00372 (dxs)  
[0780] BFL:Bf1238 (dxs)  
[0781] BPN:BPEN\_244 (dxs)  
[0782] HIN:HI1439 (dxs)  
[0783] HIT:NTHI1691 (dxs)  
[0784] HIP:CGSHiEE\_04795  
[0785] HIQ:CGSHiGG\_01080  
[0786] HDU:HD0441 (dxs)  
[0787] HSO:HS\_0905 (dxs)  
[0788] PMU:PM0532 (dxs)  
[0789] MSU:MS1059 (dxs)  
[0790] APL:APL\_0207 (dxs)  
[0791] XFA:XF2249  
[0792] XFT:PD1293 (dxs)  
[0793] XCC:XCC2434 (dxs)  
[0794] XCB:XC\_1678  
[0795] XCV:XCV2764 (dxs)  
[0796] XAC:XAC2565 (dxs)  
[0797] X00:X002017 (dxs)  
[0798] XOM:X00\_1900 (X001900)  
[0799] VCH:VC0889  
[0800] VVU:VV1\_0315  
[0801] VVY:VV0868  
[0802] VPA:VP0686  
[0803] VFI:VF0711  
[0804] PPR:PBPR0805  
[0805] PAE:PA4044 (dxs)  
[0806] PAU:PA14\_11550 (dxs)  
[0807] PAP:PSPA7\_1057 (dxs)  
[0808] PPU:PP\_0527 (dxs)  
[0809] PST:PSPT0\_0698 (dxs)  
[0810] PSB:Psyr\_0604  
[0811] PSP:PSPPH\_0599 (dxs)

[0812] PFL:PFL\_5510 (dxs)  
[0813] PF0:Pf1\_5007  
[0814] PEN:PSEEN0600 (dxs)  
[0815] PMY:Pmen\_3844  
[0816] PAR:Psyc\_0221 (dxs)  
[0817] PCR:Pcryo\_0245  
[0818] ACI:ACIAD3247 (dxs)  
[0819] SON:SO\_1525 (dxs)  
[0820] SDN:Sden\_2571  
[0821] SFR:Sfri\_2790  
[0822] SAZ:Sama\_2436  
[0823] SBL:Sbal\_1357  
[0824] SLO:Shew\_2771  
[0825] SHE:Shewmr4\_2731  
[0826] SHM:Shewmr7\_2804  
[0827] SHN:Shewana3\_2901  
[0828] SHW:Sputw3181\_2831  
[0829] ILO:IL2138 (dxs)  
[0830] CPS:CPS\_1088 (dxs)  
[0831] PHA:PSHAa2366 (dxs)  
[0832] PAT:Pat1\_1319  
[0833] SDE:Sde\_3381  
[0834] PIN:Ping\_2240  
[0835] MAQ:Maqu\_2438  
[0836] MCA:MCA0817 (dxs)  
[0837] FTU:FTT1018c (dxs)  
[0838] FTF:FTF1018c (dxs)  
[0839] FTW:FTW\_0925 (dxs)  
[0840] FTL:FTL\_1072  
[0841] FTH:FTH\_1047 (dxs)  
[0842] FTA:FTA\_1131 (dxs)  
[0843] FTN:FTN\_0896 (dxs)  
[0844] NOC:Noc\_1743  
[0845] AEH:Mlg\_1381  
[0846] HCH:HCH\_05866 (dxs)  
[0847] CSA:Csa1\_0099  
[0848] ABO:ABO\_2166 (dxs)  
[0849] AHA:AHA\_3321 (dxs)  
[0850] BCI:BCI\_0275 (dxs)

[0851] RMA:Rmag\_0386  
[0852] VOK:COZY\_0360 (dxs)  
[0853] NME:NMB1867  
[0854] NMA:NMA0589 (dxs)  
[0855] NMC:NMC0352 (dxs)  
[0856] NGO:NG00036  
[0857] CVI:CV\_2692 (dxs)  
[0858] RSO:RSc2221 (dxs)  
[0859] REU:Reut\_A0882  
[0860] REH:H16\_A2732 (dxs)  
[0861] RME:Rmet\_2615  
[0862] BMA:BMAA0330 (dxs)  
[0863] BMV:BMASAVP1\_1512 (dxs)  
[0864] BML:BMA10299\_1706 (dxs)  
[0865] BMN:BMA10247\_A0364 (dxs)  
[0866] BXE:Bxe\_B2827  
[0867] BUR:Bcep18194\_B2211  
[0868] BCN:Bcen\_4486  
[0869] BCH:Bcen2424\_3879  
[0870] BAM:Bamb\_3250  
[0871] BPS:BPSS1762 (dxs)  
[0872] BPM:BURPS1710b\_A0842 (dxs)  
[0873] BPL:BURPS1106A\_A2392 (dxs)  
[0874] BPD:BURPS668\_A2534 (dxs)  
[0875] BTE:BTH\_II0614 (dxs)  
[0876] BPE:BP2798 (dxs)  
[0877] BPA:BPP2464 (dxs)  
[0878] BBR:BB1912 (dxs)  
[0879] RFR:Rfer\_2875  
[0880] POL:Bpro\_1747  
[0881] PNA:Pnap\_1501  
[0882] AJS:Ajs\_1038  
[0883] MPT:Mpe\_A2631  
[0884] HAR:HEAR0279 (dxs)  
[0885] MMS:mma\_0331  
[0886] NEU:NE1161 (dxs)  
[0887] NET:Neut\_1501  
[0888] NMU:Nmul\_A0236  
[0889] EBA:ebA4439 (dxs)

[0890] AZO:azo1198 (dxs)  
[0891] DAR:Daro\_3061  
[0892] TBD:Tbd\_0879  
[0893] MFA:Mfla\_2133  
[0894] HPY:HP0354 (dxs)  
[0895] HPJ:jhp0328 (dxs)  
[0896] HPA:HPAG1\_0349  
[0897] HHE:HH0608 (dxs)  
[0898] HAC:Hac\_0968 (dxs)  
[0899] WSU:WS1996  
[0900] TDN:Tmden\_0475  
[0901] CJE:Cj0321 (dxs)  
[0902] CJR:CJE0366 (dxs)  
[0903] CJJ:CJJ81176\_0343 (dxs)  
[0904] CJU:C8J\_0298 (dxs)  
[0905] CJD:JJD26997\_1642 (dxs)  
[0906] CFF:CFF8240\_0264 (dxs)  
[0907] CCV:CCV52592\_1671 (dxs) CCV52592\_1722  
[0908] CHA:CHAB381\_1297 (dxs)  
[0909] CCO:CCC13826\_1594 (dxs)  
[0910] ABU:Abu\_2139 (dxs)  
[0911] NIS:NIS\_0391 (dxs)  
[0912] SUN:SUN\_2055 (dxs)  
[0913] GSU:GSU0686 (dxs-1) GSU1764 (dxs-2)  
[0914] GME:Gmet\_1934 Gmet\_2822  
[0915] PCA:Pcar\_1667  
[0916] PPD:Ppro\_1191 Ppro\_2403  
[0917] DVU:DVU1350 (dxs)  
[0918] DVL:Dvu1\_1718  
[0919] DDE:Dde\_2200  
[0920] LIP:LI0408 (dsx)  
[0921] DPS:DP2700  
[0922] ADE:Adeh\_1097  
[0923] MXA:MXAN\_4643 (dxs)  
[0924] SAT:SYN\_02456  
[0925] SFU:Sfum\_1418  
[0926] PUB:SAR11\_0611 (dxs)  
[0927] MLO:mlr7474  
[0928] MES:Meso\_0735

[0929] SME:SMc00972 (dxs)  
[0930] ATU:Atu0745 (dxs)  
[0931] ATC:AGR\_C\_1351  
[0932] RET:RHE\_CH00913 (dxs)  
[0933] RLE:RL0973 (dxs)  
[0934] BME:BMEI1498  
[0935] BMF:BAB1\_0462 (dxs)  
[0936] BMS:BR0436 (dxs)  
[0937] BMB:BruAb1\_0458 (dxs)  
[0938] BOV:BOV\_0443 (dxs)  
[0939] BJA:b112651 (dxs)  
[0940] BRA:BRAD02161 (dxs)  
[0941] BBT:BBta\_2479 (dxs)  
[0942] RPA:RPA0952 (dxs)  
[0943] RPB:RPB\_4460  
[0944] RPC:RPC\_1149  
[0945] RPD:RPD\_4305  
[0946] RPE:RPE\_1067  
[0947] NWI:Nwi\_0633  
[0948] NHA:Nham\_0778  
[0949] BHE:BH04350 (dxs)  
[0950] BQU:BQ03540 (dxs)  
[0951] BBK:BARBAKC583\_0400 (dxs)  
[0952] CCR:CC\_2068  
[0953] SIL:SP00247 (dxs)  
[0954] SIT:TM1040\_2920  
[0955] RSP:RSP\_0254 (dxsA) RSP\_1134 (dxs)  
[0956] JAN:Jann\_0088 Jann\_0170  
[0957] RDE:RD1\_0101 (dxs) RD1\_0548 (dxs)  
[0958] MMR:Mmar10\_0849  
[0959] HNE:HNE\_1838 (dxs)  
[0960] ZMO:ZM01234 (dxs) ZM01598 (dxs)  
[0961] NAR:Saro\_0161  
[0962] SAL:Sala\_2354  
[0963] ELI:ELI\_12520  
[0964] GOX:GOX0252  
[0965] GBE:GbCGDNIH1\_0221 GbCGDNIH1\_2404  
[0966] RRU:Rru\_A0054 Rru\_A2619  
[0967] MAG:amb2904

[0968] MGM:Mmc1\_1048  
[0969] SUS:Acid\_1783  
[0970] BSU:BG11715 (dxs)  
[0971] BHA:BH2779  
[0972] BAN:BA4400 (dxs)  
[0973] BAR:GBAA4400 (dxs)  
[0974] BAA:BA\_4853  
[0975] BAT:BAS4081  
[0976] BCE:BC4176 (dxs)  
[0977] BCA:BCE\_4249 (dxs)  
[0978] BCZ:BCZK3930 (dxs)  
[0979] BTK:BT9727\_3919 (dxs)  
[0980] BTL:BALH\_3785 (dxs)  
[0981] BLI:BL01523 (dxs)  
[0982] BLD:BLi02598 (dxs)  
[0983] BCL:ABC2462 (dxs)  
[0984] BAY:RBAM\_022600  
[0985] BPU:BPUM\_2159  
[0986] GKA:GK2392  
[0987] GTN:GTNG\_2322  
[0988] LMO:lmo1365 (tkkB)  
[0989] LMF:LMOf2365\_1382 (dxs)  
[0990] LIN:lin1402 (tkkB)  
[0991] LWE:lwe1380 (tkkB)  
[0992] LLA:L108911 (dxsA) L123365 (dxsB)  
[0993] LLC:LACR\_1572 LACR\_1843  
[0994] LLM:llmg\_0749 (dxsB)  
[0995] SAK:SAK\_0263  
[0996] LPL:lp\_2610 (dxs)  
[0997] LJ0:LJ0406  
[0998] LAC:LBA0356  
[0999] LSL:LSL\_0209 (dxs)  
[1000] LGA:LGAS\_0350  
[1001] STH:STH1842  
[1002] CAC:CAC2077 CA\_P0106 (dxs)  
[1003] CPE:CPE1819  
[1004] CPF:CPF\_2073 (dxs)  
[1005] CPR:CPR\_1787 (dxs)  
[1006] CTC:CTC01575

- [1007] CNO:NT01CX\_1983
- [1008] CTH:Cthe\_0828
- [1009] CDF:CD1207 (dxs)
- [1010] CB0:CB01881 (dxs)
- [1011] CBA:CLB\_1818 (dxs)
- [1012] CBH:CLC\_1825 (dxs)
- [1013] CBF:CLI\_1945 (dxs)
- [1014] CKL:CKL\_1231 (dxs)
- [1015] CHY:CHY\_1985 (dxs)
- [1016] DSY:DSY2348
- [1017] DRM:Dred\_1078
- [1018] PTH:PTH\_1196 (dxs)
- [1019] SWO:Swol\_0582
- [1020] CSC:Csac\_1853
- [1021] TTE:TTE1298 (dxs)
- [1022] MTA:Moth\_1511
- [1023] MPE:MYPE730
- [1024] MGA:MGA\_1268 (dxs)
- [1025] MTU:Rv2682c (dxs1) Rv3379c (dxs2)
- [1026] MTC:MT2756 (dxs)
- [1027] MB0:Mb2701c (dxs1) Mb3413c (dxs2)
- [1028] MLE:ML1038 (dxs)
- [1029] MPA:MAP2803c (dxs)
- [1030] MAV:MAV\_3577 (dxs)
- [1031] MSM:MSMEG\_2776 (dxs)
- [1032] MMC:Mmcs\_2208
- [1033] CGL:NCgl11827 (cgl11902)
- [1034] CGB:cg2083 (dxs)
- [1035] CEF:CE1796
- [1036] CDI:DIP1397 (dxs)
- [1037] CJK:jk1078 (dxs)
- [1038] NFA:nfa37410 (dxs)
- [1039] RHA:RHA1\_ro06843
- [1040] SCO:SC06013 (SC1C3.01) SC06768 (SC6A5.17)
- [1041] SMA:SAV1646 (dxs1) SAV2244 (dxs2)
- [1042] TWH:TWT484
- [1043] TWS:TW280 (Dxs)
- [1044] LXX:Lxx10450 (dxs)
- [1045] CMI:CMM\_1660 (dxsA)



[1046] AAU:AAur\_1790 (dxs)  
[1047] PAC:PPA1062  
[1048] TFU:Tfu\_1917  
[1049] FRA:Franci3\_1326  
[1050] FAL:FRAAL2088 (dxs)  
[1051] ACE:Ace1\_1393  
[1052] SEN:SACE\_1815 (dxs) SACE\_4351  
[1053] BLO:BL1132 (dxs)  
[1054] BAD:BAD\_0513 (dxs)  
[1055] FNU:FN1208 FN1464  
[1056] RBA:RB2143 (dxs)  
[1057] CTR:CT331 (dxs)  
[1058] CTA:CTA\_0359 (dxs)  
[1059] CMU:TC0608  
[1060] CPN:CPn1060 (tktB\_2)  
[1061] CPA:CP0790  
[1062] CPJ:CPj1060 (tktB\_2)  
[1063] CPT:CpB1102  
[1064] CCA:CCA00304 (dxs)  
[1065] CAB:CAB301 (dxs)  
[1066] CFE:CF0699 (dxs)  
[1067] PCU:pc0619 (dxs)  
[1068] TPA:TP0824  
[1069] TDE:TDE1910 (dxs)  
[1070] LIL:LA3285 (dxs)  
[1071] LIC:LIC10863 (dxs)  
[1072] LBJ:LBJ\_0917 (dxs)  
[1073] LBL:LBL\_0932 (dxs)  
[1074] SYN:s111945 (dxs)  
[1075] SYW:SYNW1292 (Dxs)  
[1076] SYC:syc1087\_c (dxs)  
[1077] SYF:Synpcc7942\_0430  
[1078] SYD:Syncc9605\_1430  
[1079] SYE:Syncc9902\_1069  
[1080] SYG:sync\_1410 (dxs)  
[1081] SYR:SynRCC307\_1390 (dxs)  
[1082] SYX:SynWH7803\_1223 (dxs)  
[1083] CYA:CYA\_1701 (dxs)  
[1084] CYB:CYB\_1983 (dxs)

- [1085] TEL:t110623
- [1086] GVI:g110194
- [1087] ANA:alr0599
- [1088] AVA:Ava\_4532
- [1089] PMA:Pro0928 (dxs)
- [1090] PMM:PMM0907 (Dxs)
- [1091] PMT:PMT0685 (dxs)
- [1092] PMN:PMN2A\_0300
- [1093] PMI:PMT9312\_0893
- [1094] PMB:A9601\_09541 (dxs)
- [1095] PMC:P9515\_09901 (dxs)
- [1096] PMF:P9303\_15371 (dxs)
- [1097] PMG:P9301\_09521 (dxs)
- [1098] PMH:P9215\_09851
- [1099] PMJ:P9211\_08521
- [1100] PME:NATL1\_09721 (dxs)
- [1101] TER:Tery\_3042
- [1102] BTH:BT\_1403 BT\_4099
- [1103] BFR:BF0873 BF4306
- [1104] BFS:BF0796 (dxs) BF4114
- [1105] PGI:PG2217 (dxs)
- [1106] CHU:CHU\_3643 (dxs)
- [1107] GFO:GFO\_3470 (dxs)
- [1108] FPS:FP0279 (dxs)
- [1109] CTE:CT0337 (dxs)
- [1110] CPH:Cpha266\_0671
- [1111] PVI:Cvib\_0498
- [1112] PLT:Plut\_0450
- [1113] DET:DET0745 (dxs)
- [1114] DEH:cbdb\_A720 (dxs)
- [1115] DRA:DR\_1475
- [1116] DGE:Dgeo\_0994
- [1117] TTH:TTC1614
- [1118] TTJ:TTHA0006
- [1119] AAE:aq\_881
- [1120] TMA:TM1770
- [1121] PMO:Pmob\_1001
- [1122] 示例性乙酰-CoA乙酰转移酶核酸和多肽
- [1123] HSA:38 (ACAT1) 39 (ACAT2)

- [1124] PTR:451528 (ACAT1)  
[1125] MCC:707653 (ACAT1) 708750 (ACAT2)  
[1126] MMU:110446 (Acat1) 110460 (Acat2)  
[1127] RNO:25014 (Acat1)  
[1128] CFA:484063 (ACAT2) 489421 (ACAT1)  
[1129] GGA:418968 (ACAT1) 421587 (RCJMB04\_34i5)  
[1130] XLA:379569 (MGC69098) 414622 (MGC81403) 414639 (MGC81256) 444457 (MGC83664)  
[1131] XTR:394562 (acat2)  
[1132] DRE:30643 (acat2)  
[1133] SPU:759502 (LOC759502)  
[1134] DME:Dmel\_CG10932 Dmel\_CG9149  
[1135] CEL:T02G5.4 T02G5.7 T02G5.8 (kat-1)  
[1136] ATH:AT5G48230 (ACAT2/EMB1276)  
[1137] OSA:43261364346520  
[1138] CME:CMA042C CME087C  
[1139] SCE:YPL028W (ERG10)  
[1140] AGO:AGOS\_ADR165C  
[1141] PIC:PICST\_31707 (ERG10)  
[1142] CAL:Ca019.1591 (erg10)  
[1143] CGR:CAGL0L12364g  
[1144] SPO:SPBC215.09c  
[1145] MGR:MGG\_01755 MGG\_13499  
[1146] ANI:AN1409.2  
[1147] AFM:AFUA\_6G14200 AFUA\_8G04000  
[1148] AOR:A0090103000012 A0090103000406  
[1149] CNE:CNC05280  
[1150] UMA:UM03571.1  
[1151] DDI:DDB\_0231621  
[1152] PFA:PF14\_0484  
[1153] TET:THERM\_00091590 THERM\_00277470 THERM\_00926980  
[1154] TCR:511003.60  
[1155] ECO:b2224 (atoB)  
[1156] ECJ:JW2218 (atoB) JW5453 (yqeF)  
[1157] ECE:Z4164 (yqeF)  
[1158] ECS:ECs3701  
[1159] ECC:c2767 (atoB) c3441 (yqeF)  
[1160] ECI:UTI89\_C2506 (atoB) UTI89\_C3247 (yqeF)  
[1161] ECP:ECP\_2268 ECP\_2857  
[1162] ECV:APEC01\_3662 (yqeF) APEC01\_4335 (atoB) APEC01\_43352 (atoB)

- [1163] ECX:EcHS\_A2365  
[1164] STY:STY3164 (yqeF)  
[1165] STT:t2929 (yqeF)  
[1166] SPT:SPA2886 (yqeF)  
[1167] SEC:SC2958 (yqeF)  
[1168] STM:STM3019 (yqeF)  
[1169] SFL:SF2854 (yqeF)  
[1170] SFX:S3052 (yqeF)  
[1171] SFV:SFV\_2922 (yqeF)  
[1172] SSN:SSON\_2283 (atoB) SSON\_3004 (yqeF)  
[1173] SBO:SBO\_2736 (yqeF)  
[1174] ECA:ECA1282 (atoB)  
[1175] ENT:Ent638\_3299  
[1176] SPE:Spro\_0592  
[1177] HIT:NTHI0932 (atoB)  
[1178] XCC:XCC1297 (atoB)  
[1179] XCB:XC\_2943  
[1180] XCV:XCV1401 (thlA)  
[1181] XAC:XAC1348 (atoB)  
[1182] X00:X001881 (atoB)  
[1183] XOM:X00\_1778 (X001778)  
[1184] VCH:VCA0690  
[1185] VCO:VC0395\_0630  
[1186] VVU:VV2\_0494 VV2\_0741  
[1187] VVY:VVA1043 VVA1210  
[1188] VPA:VPA0620 VPA1123 VPA1204  
[1189] PPR:PBPRB1112 PBPRB1840  
[1190] PAE:PA2001 (atoB) PA2553 PA3454 PA3589 PA3925  
[1191] PAU:PA14\_38630 (atoB)  
[1192] PPU:PP\_2051 (atoB) PP\_2215 (fadAx) PP\_3754 PP\_4636  
[1193] PPF:Pput\_2009 Pput\_2403 Pput\_3523 Pput\_4498  
[1194] PST:PSPT0\_0957 (phbA-1) PSPT0\_3164 (phbA-2)  
[1195] PSB:Psyr\_0824 Psyr\_3031  
[1196] PSP:PSPPH\_0850 (phbA1) PSPPH\_2209 (phbA2)  
[1197] PFL:PFL\_1478 (atoB-2) PFL\_2321 PFL\_3066 PFL\_4330 (atoB-2) PFL\_5283  
[1198] PFO:Pf1\_1269 Pf1\_1739 Pf1\_2074 Pf1\_2868  
[1199] PEN:PSEEN3197 PSEEN3547 (fadAx) PSEEN4635 (phbA)  
[1200] PMY:Pmen\_1138 Pmen\_2036 Pmen\_3597 Pmen\_3662 Pmen\_3820  
[1201] PAR:Psyc\_0252 Psyc\_1169

- [1202] PCR:Pcryo\_0278 Pcryo\_1236 Pcryo\_1260
- [1203] PRW:PsycPRwf\_2011
- [1204] ACI:ACIAD0694 ACIAD1612 ACIAD2516 (atoB)
- [1205] SON:SO\_1677 (atoB)
- [1206] SDN:Sden\_1943
- [1207] SFR:Sfri\_1338 Sfri\_2063
- [1208] SAZ:Sama\_1375
- [1209] SBL:Sbal\_1495
- [1210] SBM:Shew185\_1489
- [1211] SBN:Sbal195\_1525
- [1212] SLO:Shew\_1667 Shew\_2858
- [1213] SPC:Sputcn32\_1397
- [1214] SSE:Ssed\_1473 Ssed\_3533
- [1215] SPL:Spea\_2783
- [1216] SHE:Shewmr4\_2597
- [1217] SHM:Shewmr7\_2664
- [1218] SHN:Shewana3\_2771
- [1219] SHW:Sputw3181\_2704
- [1220] ILO:IL0872
- [1221] CPS:CPS\_1605 CPS\_2626
- [1222] PHA:PSHAa0908 PSHAa1454 (atoB) PSHAa1586 (atoB)
- [1223] PAT:Pat1\_2923
- [1224] SDE:Sde\_3149
- [1225] PIN:Ping\_0659 Ping\_2401
- [1226] MAQ:Maqu\_2117 Maqu\_2489 Maqu\_2696 Maqu\_3162
- [1227] CBU:CBU\_0974
- [1228] LPN:lpg1825 (atoB)
- [1229] LPF:lp11789
- [1230] LPP:lp1788
- [1231] NOC:Noc\_1891
- [1232] AEH:Mlg\_0688 Mlg\_2706
- [1233] HHA:Hha1\_1685
- [1234] HCH:HCH\_05299
- [1235] CSA:Csa1\_0301 Csa1\_3068
- [1236] ABO:ABO\_0648 (fadAx)
- [1237] MMW:Mmwy11\_0073 Mmwy11\_3021 Mmwy11\_3053 Mmwy11\_3097 Mmwy11\_4182
- [1238] AHA:AHA\_2143 (atoB)
- [1239] CVI:CV\_2088 (atoB) CV\_2790 (phaA)
- [1240] RSO:RSc0276 (atoB) RSc1632 (phbA) RSc1637 (bktB) RSc1761 (RS02948)

- [1241] REU:Reut\_A0138 Reut\_A1348 Reut\_A1353 Reut\_B4561 Reut\_B4738  
[1242] Reut\_B5587 Reut\_C5943 Reut\_C6062  
[1243] REH:H16\_A0170 H16\_A0867 H16\_A0868 H16\_A0872 H16\_A1297  
[1244] H16\_A1438 (phaA) H16\_A1445 (bktB) H16\_A1528 H16\_A1713 H16\_A1720  
[1245] H16\_A1887 H16\_A2148 H16\_B0380 H16\_B0381 H16\_B0406 H16\_B0662  
[1246] H16\_B0668 H16\_B0759 H16\_B1369 H16\_B1771  
[1247] RME:Rmet\_0106 Rmet\_1357 Rmet\_1362 Rmet\_5156  
[1248] BMA:BMA1316 BMA1321 (phbA) BMA1436  
[1249] BMV:BMASAVP1\_A1805 (bktB) BMASAVP1\_A1810 (phbA)  
[1250] BML:BMA10299\_A0086 (phbA) BMA10299\_A0091  
[1251] BMN:BMA10247\_1076 (bktB) BMA10247\_1081 (phbA)  
[1252] BXE:Bxe\_A2273 Bxe\_A2335 Bxe\_A2342 Bxe\_A4255 Bxe\_B0377 Bxe\_B0739  
[1253] Bxe\_C0332 Bxe\_C0574 Bxe\_C0915  
[1254] BVI:Bcep1808\_0519 Bcep1808\_1717 Bcep1808\_2877 Bcep1808\_3594  
[1255] Bcep1808\_4015 Bcep1808\_5507 Bcep1808\_5644  
[1256] BUR:Bcep18194\_A3629 Bcep18194\_A5080 Bcep18194\_A5091  
[1257] Bcep18194\_A6102 Bcep18194\_B0263 Bcep18194\_B1439  
[1258] Bcep18194\_C6652 Bcep18194\_C6802 Bcep18194\_C6874  
[1259] Bcep18194\_C7118 Bcep18194\_C7151 Bcep18194\_C7332  
[1260] BCN:Bcen\_1553 Bcen\_1599 Bcen\_2158 Bcen\_2563 Bcen\_2998 Bcen\_6289  
[1261] BCH:Bcen2424\_0542 Bcen2424\_1790 Bcen2424\_2772 Bcen2424\_5368  
[1262] Bcen2424\_6232 Bcen2424\_6276  
[1263] BAM:Bamb\_0447 Bamb\_1728 Bamb\_2824 Bamb\_4717 Bamb\_5771 Bamb\_5969  
[1264] BPS:BPSL1426 BPSL1535 (phbA) BPSL1540  
[1265] BPM:BURPS1710b\_2325 (bktB) BURPS1710b\_2330 (phbA)  
[1266] BURPS1710b\_2453 (atoB-2)  
[1267] BPL:BURPS1106A\_2197 (bktB) BURPS1106A\_2202 (phbA)  
[1268] BPD:BURPS668\_2160 (bktB) BURPS668\_2165 (phbA)  
[1269] BTE:BTH\_I2144 BTH\_I2256 BTH\_I2261  
[1270] PNU:Pnuc\_0927  
[1271] BPE:BP0447 BP0668 BP2059  
[1272] BPA:BPP0608 BPP1744 BPP3805 BPP4216 BPP4361  
[1273] BBR:BB0614 BB3364 BB4250 BB4804 BB4947  
[1274] RFR:Rfer\_0272 Rfer\_1000 Rfer\_1871 Rfer\_2273 Rfer\_2561 Rfer\_2594Rfer\_3839  
[1275] POL:Bpro\_1577 Bpro\_2140 Bpro\_3113 Bpro\_4187  
[1276] PNA:Pnap\_0060 Pnap\_0458 Pnap\_0867 Pnap\_1159 Pnap\_2136 Pnap\_2804  
[1277] AAV:Aave\_0031 Aave\_2478 Aave\_3944 Aave\_4368  
[1278] AJS:Ajs\_0014 Ajs\_0124 Ajs\_1931 Ajs\_2073 Ajs\_2317 Ajs\_3548

- [1279] Ajs\_3738 Ajs\_3776
- [1280] VEI:Veis\_1331 Veis\_3818 Veis\_4193
- [1281] DAC:Daci\_0025 Daci\_0192 Daci\_3601 Daci\_5988
- [1282] MPT:Mpe\_A1536 Mpe\_A1776 Mpe\_A1869 Mpe\_A3367
- [1283] HAR:HEAR0577 (phbA)
- [1284] MMS:mma\_0555
- [1285] NEU:NE2262 (bktB)
- [1286] NET:Neut\_0610
- [1287] EBA:ebA5202 p2A409 (tioL)
- [1288] AZO:azo0464 (fadA1) azo0469 (fadA2) azo2172 (thlA)
- [1289] DAR:Daro\_0098 Daro\_3022
- [1290] HPA:HPAG1\_0675
- [1291] HAC:Hac\_0958 (atoB)
- [1292] GME:Gmet\_1719 Gmet\_2074 Gmet\_2213 Gmet\_2268 Gmet\_3302
- [1293] GUR:Gura\_3043
- [1294] BBA:Bd0404 (atoB) Bd2095
- [1295] DOL:Dole\_0671 Dole\_1778 Dole\_2160 Dole\_2187
- [1296] ADE:Adeh\_0062 Adeh\_2365
- [1297] AFW:Anae109\_0064 Anae109\_1504
- [1298] MXA:MXAN\_3791
- [1299] SAT:SYN\_02642
- [1300] SFU:Sfum\_2280 Sfum\_3582
- [1301] RPR:RP737
- [1302] RCO:RC1134 RC1135
- [1303] RFE:RF\_0163 (paaJ)
- [1304] RBE:RBE\_0139 (paaJ)
- [1305] RAK:A1C\_05820
- [1306] RBO:A1I\_07215
- [1307] RCM:A1E\_04760
- [1308] PUB:SAR11\_0428 (thlA)
- [1309] MLO:mlr3847
- [1310] MES:Meso\_3374
- [1311] PLA:Plav\_1573 Plav\_2783
- [1312] SME:SMA1450 SMC03879 (phbA)
- [1313] SMD:Smed\_0499 Smed\_3117 Smed\_5094 Smed\_5096
- [1314] ATU:Atu2769 (atoB) Atu3475
- [1315] ATC:AGR\_C\_5022 (phbA) AGR\_L\_2713
- [1316] RET:RHE\_CH04018 (phbA<sub>ch</sub>) RHE\_PC00068 (ypc00040) RHE\_PF00014 (phbA<sub>f</sub>)
- [1317] RLE:RL4621 (phaA) pRL100301 pRL120369

- [1318] BME:BMEI0274 BMEII0817
- [1319] BMF:BAB1\_1783 (phbA-1) BAB2\_0790 (phbA-2)
- [1320] BMS:BR1772 (phbA-1) BRA0448 (phbA-2)
- [1321] BMB:BruAb1\_1756 (phbA-1) BruAb2\_0774 (phbA-2)
- [1322] BOV:BOV\_1707 (phbA-1)
- [1323] OAN:Oant\_1130 Oant\_3107 Oant\_3718 Oant\_4020
- [1324] BJA:bl10226 (atoB) bl13949 bl17400 bl17819 blr3724 (phbA)
- [1325] BRA:BRAD00562 (phbA) BRAD00983 (pimB) BRAD03110 BRAD03134 (atoB)
- [1326] BBT:BBta\_3558 BBta\_3575 (atoB) BBta\_5147 (pimB) BBta\_7072 (pimB) BBta\_7614 (phbA)
- [1327] RPA:RPA0513 (pcaF) RPA0531 RPA3715 (pimB)
- [1328] RPB:RPB\_0509 RPB\_0525 RPB\_1748
- [1329] RPC:RPC\_0504 RPC\_0636 RPC\_0641 RPC\_0832 RPC\_1050 RPC\_2005RPC\_2194 RPC\_2228
- [1330] RPD:RPD\_0306 RPD\_0320 RPD\_3105 RPD\_3306
- [1331] RPE:RPE\_0168 RPE\_0248 RPE\_3827
- [1332] NWI:Nwi\_3060
- [1333] XAU:Xaut\_3108 Xaut\_4665
- [1334] CCR:CC\_0510 CC\_0894 CC\_3462
- [1335] SIL:SP00142 (bktB) SP00326 (phbA) SP00773 SP03408
- [1336] SIT:TM1040\_0067 TM1040\_2790 TM1040\_3026 TM1040\_3735
- [1337] RSP:RSP\_0745 RSP\_1354 RSP\_3184
- [1338] RSH:Rsph17029\_0022 Rsph17029\_2401 Rsph17029\_3179 Rsph17029\_3921
- [1339] RSQ:Rsph17025\_0012 Rsph17025\_2466 Rsph17025\_2833
- [1340] JAN:Jann\_0262 Jann\_0493 Jann\_4050
- [1341] RDE:RD1\_0025 RD1\_0201 (bktB) RD1\_3394 (phbA)
- [1342] PDE:Pden\_2026 Pden\_2663 Pden\_2870 Pden\_2907 Pden\_4811 Pden\_5022
- [1343] DSH:Dshi\_0074 Dshi\_3066 Dshi\_3331
- [1344] MMR:Mmar10\_0697
- [1345] HNE:HNE\_2706 HNE\_3065 HNE\_3133
- [1346] NAR:Saro\_0809 Saro\_1069 Saro\_1222 Saro\_2306 Saro\_2349
- [1347] SAL:Sala\_0781 Sala\_1244 Sala\_2896 Sala\_3158
- [1348] SWI:Swit\_0632 Swit\_0752 Swit\_2893 Swit\_3602 Swit\_4887 Swit\_5019 Swit\_5309
- [1349] ELI:ELI\_01475 ELI\_06705 ELI\_12035
- [1350] GBE:GbCGDNIH1\_0447
- [1351] ACR:Acry\_1847 Acry\_2256
- [1352] RRU:Rru\_A0274 Rru\_A1380 Rru\_A1469 Rru\_A1946 Rru\_A3387
- [1353] MAG:amb0842



- [1354] MGM:Mmc1\_1165
- [1355] ABA:Acid345\_3239
- [1356] BSU:BG11319 (mmgA) BG13063 (yhfS)
- [1357] BHA:BH1997 BH2029 BH3801 (mmgA)
- [1358] BAN:BA3687 BA4240 BA5589
- [1359] BAR:GBAA3687 GBAA4240 GBAA5589
- [1360] BAA:BA\_0445 BA\_4172 BA\_4700
- [1361] BAT:BAS3418 BAS3932 BAS5193
- [1362] BCE:BC3627 BC4023 BC5344
- [1363] BCA:BCE\_3646 BCE\_4076 BCE\_5475
- [1364] BCZ:BCZK3329 (mmgA) BCZK3780 (thl) BCZK5044 (atoB)
- [1365] BCY:Bcer98\_2722 Bcer98\_3865
- [1366] BTK:BT9727\_3379 (mmgA) BT9727\_3765 (thl) BT9727\_5028 (atoB)
- [1367] BTL:BALH\_3262 (mmgA) BALH\_3642 (fadA) BALH\_4843 (atoB)
- [1368] BLI:BL03925 (mmgA)
- [1369] BLD:BLi03968 (mmgA)
- [1370] BCL:ABC0345 ABC2989 ABC3617 ABC3891 (mmgA)
- [1371] BAY:RBAM\_022450
- [1372] BPU:BPUM\_2374 (yhfS) BPUM\_2941 BPUM\_3373
- [1373] OIH:OB0676 OB0689 OB2632 OB3013
- [1374] GKA:GK1658 GK3397
- [1375] SAU:SA0342 SA0534 (vraB)
- [1376] SAV:SAV0354 SAV0576 (vraB)
- [1377] SAM:MW0330 MW0531 (vraB)
- [1378] SAR:SAR0351 (thl) SAR0581
- [1379] SAS:SAS0330 SAS0534
- [1380] SAC:SACOL0426 SACOL0622 (atoB)
- [1381] SAB:SAB0304 (thl) SAB0526
- [1382] SAA:SAUSA300\_0355 SAUSA300\_0560 (vraB)
- [1383] SAO:SAOUHSC\_00336 SAOUHSC\_00558
- [1384] SAJ:SaurJH9\_0402
- [1385] SAH:SaurJH1\_0412
- [1386] SEP:SE0346 SE2384
- [1387] SER:SERP0032 SERP0220
- [1388] SHA:SH0510 (mvaC) SH2417
- [1389] SSP:SSP0325 SSP2145
- [1390] LMO:lmo1414
- [1391] LMF:LMOF2365\_1433
- [1392] LIN:lin1453

- [1393]   LWE:lwe1431
- [1394]   LLA:L11745 (thiL) L25946 (fadA)
- [1395]   LLC:LACR\_1665 LACR\_1956
- [1396]   LLM:llmg\_0930 (thiL)
- [1397]   SPY:SPy\_0140 SPy\_1637 (atoB)
- [1398]   SPZ:M5005\_Spy\_0119 M5005\_Spy\_0432 M5005\_Spy\_1344 (atoB)
- [1399]   SPM:spyM18\_0136 spyM18\_1645 (atoB)
- [1400]   SPG:SpyM3\_0108 SpyM3\_1378 (atoB)
- [1401]   SPS:SPs0110 SPs0484
- [1402]   SPH:MGAS10270\_Spy0121 MGAS10270\_Spy0433 MGAS10270\_Spy1461 (atoB)
- [1403]   SPI:MGAS10750\_Spy0124 MGAS10750\_Spy0452 MGAS10750\_Spy1453 (atoB)
- [1404]   SPJ:MGAS2096\_Spy0123 MGAS2096\_Spy0451 MGAS2096\_Spy1365 (atoB)
- [1405]   SPK:MGAS9429\_Spy0121 MGAS9429\_Spy0431 MGAS9429\_Spy1339 (atoB)
- [1406]   SPF:SpyM50447 (atoB2)
- [1407]   SPA:M6\_Spy0166 M6\_Spy0466 M6\_Spy1390
- [1408]   SPB:M28\_Spy0117 M28\_Spy0420 M28\_Spy1385 (atoB)
- [1409]   SAK:SAK\_0568
- [1410]   LJO:LJ1609
- [1411]   LAC:LBA0626 (thiL)
- [1412]   LSA:LSA1486
- [1413]   LDB:Ldb0879
- [1414]   LBU:LBUL\_0804
- [1415]   LBR:LVIS\_2218
- [1416]   LCA:LSEI\_1787
- [1417]   LGA:LGAS\_1374
- [1418]   LRE:Lreu\_0052
- [1419]   EFA:EF1364
- [1420]   OOE:OE0E\_0529
- [1421]   STH:STH2913 STH725 STH804
- [1422]   CAC:CAC2873 CA\_P0078 (thiL)
- [1423]   CPE:CPE2195 (atoB)
- [1424]   CPF:CPF\_2460
- [1425]   CPR:CPR\_2170
- [1426]   CTC:CTC00312
- [1427]   CNO:NT01CX\_0538 NT01CX\_0603
- [1428]   CDF:CD1059 (thlA1) CD2676 (thlA2)
- [1429]   CBO:CB03200 (thl)
- [1430]   CBE:Cbei\_0411 Cbei\_3630
- [1431]   CKL:CKL\_3696 (thlA1) CKL\_3697 (thlA2) CKL\_3698 (thlA3)

- [1432] AMT:Amet\_4630
- [1433] AOE:Clos\_0084 Clos\_0258
- [1434] CHY:CHY\_1288 CHY\_1355 (atoB) CHY\_1604 CHY\_1738
- [1435] DSY:DSY0632 DSY0639 DSY1567 DSY1710 DSY2402 DSY3302
- [1436] DRM:Dred\_0400 Dred\_1491 Dred\_1784 Dred\_1892
- [1437] SWO:Swol\_0308 Swol\_0675 Swol\_0789 Swol\_1486 Swol\_1934 Swol\_2051
- [1438] TTE:TTE0549 (paaJ)
- [1439] MTA:Moth\_1260
- [1440] MTU:Rv1135A Rv1323 (fadA4) Rv3546 (fadA5)
- [1441] MTC:MT1365 (phbA)
- [1442] MBO:Mb1167 Mb1358 (fadA4) Mb3576 (fadA5) Mb3586c (fadA6)
- [1443] MBB:BCG\_1197 BCG\_1385 (fadA4) BCG\_3610 (fadA5) BCG\_3620c (fadA6)
- [1444] MLE:ML1158 (fadA4)
- [1445] MPA:MAP2407c (fadA3) MAP2436c (fadA4)
- [1446] MAV:MAV\_1544 MAV\_1573 MAV\_1863 MAV\_5081
- [1447] MSM:MSMEG\_2224 MSMEG\_4920
- [1448] MUL:MUL\_0357
- [1449] MVA:Mvan\_1976 Mvan\_1988 Mvan\_4305 Mvan\_4677 Mvan\_4891
- [1450] MGI:Mflv\_1347 Mflv\_1484 Mflv\_2040 Mflv\_2340 Mflv\_4356 Mflv\_4368
- [1451] MMC:Mmcs\_1758 Mmcs\_1769 Mmcs\_3796 Mmcs\_3864
- [1452] MKM:Mkms\_0251 Mkms\_1540 Mkms\_1805 Mkms\_1816 Mkms\_2836 Mkms\_3159
- [1453] Mkms\_3286 Mkms\_3869 Mkms\_3938 Mkms\_4227 Mkms\_4411 Mkms\_4580
- [1454] Mkms\_4724 Mkms\_4764 Mkms\_4776
- [1455] MJL:Mjls\_0231 Mjls\_1739 Mjls\_1750 Mjls\_2819 Mjls\_3119 Mjls\_3235
- [1456] Mjls\_3800 Mjls\_3850 Mjls\_4110 Mjls\_4383 Mjls\_4705 Mjls\_4876
- [1457] Mjls\_5018 Mjls\_5063 Mjls\_5075
- [1458] CGL:NCgl2309 (cgl2392)
- [1459] CGB:cg2625 (pcaF)
- [1460] CEF:CE0731 CE2295
- [1461] CJK:jk1543 (fadA3)
- [1462] NFA:nfa10750 (fadA4)
- [1463] RHA:RHA1\_ro01455 RHA1\_ro01623 RHA1\_ro01876 RHA1\_ro02517 (catF)
- [1464] RHA1\_ro03022 RHA1\_ro03024 RHA1\_ro03391 RHA1\_ro03892
- [1465] RHA1\_ro04599 RHA1\_ro05257 RHA1\_ro08871
- [1466] SCO:SC05399 (SC8F4.03)
- [1467] SMA:SAV1384 (fadA5) SAV2856 (fadA1)
- [1468] ART:Arth\_1160 Arth\_2986 Arth\_3268 Arth\_4073
- [1469] NCA:Noca\_1371 Noca\_1797 Noca\_1828 Noca\_2764 Noca\_4142
- [1470] TFU:Tfu\_1520 Tfu\_2394

- [1471] FRA:Franci3\_3687
- [1472] FRE:Franean1\_1044 Franean1\_2711 Franean1\_2726 Franean1\_3929 Franean1\_4037 Franean1\_4577
- [1473] FAL:FRAAL2514 FRAAL2618 FRAAL5910 (atoB)
- [1474] ACE:Ace1\_0626 Ace1\_0672
- [1475] SEN:SACE\_1192 (mmgA) SACE\_2736 (fadA6) SACE\_4011 (catF)
- [1476] SACE\_6236 (fadA4)
- [1477] STP:Strop\_3610
- [1478] SAQ:Sare\_1316 Sare\_3991
- [1479] RXY:Rxy1\_1582 Rxy1\_1842 Rxy1\_2389 Rxy1\_2530
- [1480] FNU:FN0495
- [1481] BGA:BG0110 (fadA)
- [1482] BAF:BAPKO\_0110 (fadA)
- [1483] LIL:LA0457 (thiL1) LA0828 (thiL2) LA4139 (fadA)
- [1484] LIC:LIC10396 (phbA)
- [1485] LBJ:LBJ\_2862 (paaJ-4)
- [1486] LBL:LBL\_0209 (paaJ-4)
- [1487] SYN:slr1993 (phaA)
- [1488] SRU:SRU\_1211 (atoB) SRU\_1547
- [1489] CHU:CHU\_1910 (atoB)
- [1490] GFO:GFO\_1507 (atoB)
- [1491] FJO:Fjoh\_4612
- [1492] FPS:FP0770 FP1586 FP1725
- [1493] RRS:RoseRS\_3911 RoseRS\_4348
- [1494] RCA:Rcas\_0702 Rcas\_3206
- [1495] HAU:Haur\_0522
- [1496] DRA:DR\_1072 DR\_1428 DR\_1960 DR\_2480 DR\_A0053
- [1497] DGE:Dgeo\_0755 Dgeo\_1305 Dgeo\_1441 Dgeo\_1883
- [1498] TTH:TTC0191 TTC0330
- [1499] TTJ:TTHA0559
- [1500] TME:Tme1\_1134
- [1501] FNO:Fnod\_0314
- [1502] PMO:Pmob\_0515
- [1503] HMA:rrnAC0896 (acaB3) rrnAC2815 (aca2) rrnAC3497 (yqeF)
- [1504] rrnB0240 (aca1) rrnB0242 (acaB2) rrnB0309 (acaB1)
- [1505] TAC:Ta0582
- [1506] TVO:TVN0649
- [1507] PTO:PT01505
- [1508] APE:APE\_2108

- [1509] SS0:SS02377 (acaB-4)
- [1510] ST0:ST0514
- [1511] SAI:Saci\_0963Saci\_1361 (acaB1)
- [1512] MSE:Msed\_0656
- [1513] PAI:PAE1220
- [1514] PIS:Pisl\_0029Pisl\_1301
- [1515] PCL:Pcal\_0781
- [1516] PAS:Pars\_0309Pars\_1071
- [1517] CMA:Cmaq\_1941
- [1518] 示例性HMG-CoA合酶核酸和多肽
- [1519] HSA:3157 (HMGCS1) 3158 (HMGCS2)
- [1520] PTR:457169 (HMGCS2) 461892 (HMGCS1)
- [1521] MCC:702553 (HMGCS1) 713541 (HMGCS2)
- [1522] MMU:15360 (Hmgcs2) 208715 (Hmgcs1)
- [1523] RNO:24450 (Hmgcs2) 29637 (Hmgcs1)
- [1524] CFA:479344 (HMGCS1) 607923 (HMGCS2)
- [1525] BTA:407767 (HMGCS1)
- [1526] SSC:397673 (CH242-38B5.1)
- [1527] GGA:396379 (HMGCS1)
- [1528] XLA:380091 (hmgcs1) 447204 (MGC80816)
- [1529] DRE:394060 (hmgcs1)
- [1530] SPU:578259 (LOC578259)
- [1531] DME:Dme1\_CG4311 (Hmgs)
- [1532] CEL:F25B4.6
- [1533] ATH:AT4G11820 (BAP1)
- [1534] OSA:43314184347614
- [1535] CME:CMM189C
- [1536] SCE:YML126C (ERG13)
- [1537] AGO:AGOS\_ADL356C
- [1538] PIC:PICST\_83020
- [1539] CAL:Ca019\_7312 (Ca019.7312)
- [1540] CGR:CAGL0H04081g
- [1541] SPO:SPAC4F8.14c (hcs)
- [1542] MGR:MGG\_01026
- [1543] ANI:AN4923.2
- [1544] AFM:AFUA\_3G10660 AFUA\_8G07210
- [1545] AOR:A0090003000611 A0090010000487
- [1546] CNE:CNC05080 CNG02670
- [1547] UMA:UM05362.1

- [1548] ECU:ECU10\_0510
- [1549] DDI:DDBDRAFT\_0217522 DDB\_0219924 (hgsA)
- [1550] TET:THERM\_00691190
- [1551] TBR:Tb927.8.6110
- [1552] YPE:YP01457
- [1553] YPK:y2712 (pksG)
- [1554] YPM:YP\_1349 (pksG)
- [1555] YPA:YPA\_0750
- [1556] YPN:YPN\_2521
- [1557] YPP:YPDSF\_1517
- [1558] YPS:YPTB1475
- [1559] CBD:COXBU7E912\_1931
- [1560] TCX:Tcr\_1719
- [1561] DNO:DNO\_0799
- [1562] BMA:BMAA1212
- [1563] BPS:BPSS1002
- [1564] BPM:BURPS1710b\_A2613
- [1565] BPL:BURPS1106A\_A1384
- [1566] BPD:BURPS668\_A1470
- [1567] BTE:BTH\_II1670
- [1568] MXA:MXAN\_3948 (tac) MXAN\_4267 (mvaS)
- [1569] BSU:BG10926 (pksG)
- [1570] OIH:OB2248
- [1571] SAU:SA2334 (mvaS)
- [1572] SAV:SAV2546 (mvaS)
- [1573] SAM:MW2467 (mvaS)
- [1574] SAR:SAR2626 (mvaS)
- [1575] SAS:SAS2432
- [1576] SAC:SACOL2561
- [1577] SAB:SAB2420 (mvaS)
- [1578] SAA:SAUSA300\_2484
- [1579] SAO:SAOUHSC\_02860
- [1580] SAJ:SaurJH9\_2569
- [1581] SAH:SaurJH1\_2622
- [1582] SEP:SE2110
- [1583] SER:SERP2122
- [1584] SHA:SH0508 (mvaS)
- [1585] SSP:SSP0324
- [1586] LMO:lmo1415

[1587] LMF:LMOf2365\_1434 (mvaS)  
[1588] LIN:lin1454  
[1589] LWE:lwe1432 (mvaS)  
[1590] LLA:L13187 (hmcM)  
[1591] LLC:LACR\_1666  
[1592] LLM:llmg\_0929 (hmcM)  
[1593] SPY:SPy\_0881 (mvaS.2)  
[1594] SPZ:M5005\_Spy\_0687 (mvaS.1)  
[1595] SPM:spyM18\_0942 (mvaS2)  
[1596] SPG:SpyM3\_0600 (mvaS.2)  
[1597] SPS:SPs1253  
[1598] SPH:MGAS10270\_Spy0745 (mvaS1)  
[1599] SPI:MGAS10750\_Spy0779 (mvaS1)  
[1600] SPJ:MGAS2096\_Spy0759 (mvaS1)  
[1601] SPK:MGAS9429\_Spy0743 (mvaS1)  
[1602] SPF:SpyM51121 (mvaS)  
[1603] SPA:M6\_Spy0704  
[1604] SPB:M28\_Spy0667 (mvaS.1)  
[1605] SPN:SP\_1727  
[1606] SPR:spr1571 (mvaS)  
[1607] SPD:SPD\_1537 (mvaS)  
[1608] SAG:SAG1316  
[1609] SAN:gsb1386  
[1610] SAK:SAK\_1347  
[1611] SMU:SMU.943c  
[1612] STC:str0577 (mvaS)  
[1613] STL:stu0577 (mvaS)  
[1614] STE:STER\_0621  
[1615] SSA:SSA\_0338 (mvaS)  
[1616] SSU:SSU05\_1641  
[1617] SSV:SSU98\_1652  
[1618] SGO:SGO\_0244  
[1619] LPL:lp\_2067 (mvaS)  
[1620] LJO:LJ1607  
[1621] LAC:LBA0628 (hmcS)  
[1622] LSA:LSA1484 (mvaS)  
[1623] LSL:LSL\_0526  
[1624] LDB:Ldb0881 (mvaS)  
[1625] LBU:LBUL\_0806

- [1626] LBR:LVIS\_1363
- [1627] LCA:LSEI\_1785
- [1628] LGA:LGAS\_1372
- [1629] LRE:Lreu\_0676
- [1630] PPE:PEPE\_0868
- [1631] EFA:EF1363
- [1632] OOE:OE0E\_0968
- [1633] LME:LEUM\_1184
- [1634] NFA:nfa22120
- [1635] SEN:SACE\_4570 (pksG)
- [1636] BBU:BB0683
- [1637] BGA:BG0706
- [1638] BAF:BAPKO\_0727
- [1639] FJO:Fjoh\_0678
- [1640] HAL:VNG1615G (mvaB)
- [1641] HMA:rrnAC1740 (mvaS)
- [1642] HWA:HQ2868A (mvaB)
- [1643] NPH:NP2608A (mvaB\_1) NP4836A (mvaB\_2)
- [1644] 示例性羟甲基戊二酰-CoA还原酶核酸和多肽
- [1645] HSA:3156 (HMGCR)
- [1646] PTR:471516 (HMGCR)
- [1647] MCC:705479 (HMGCR)
- [1648] MMU:15357 (Hmgcr)
- [1649] RNO:25675 (Hmgcr)
- [1650] CFA:479182 (HMGCR)
- [1651] BTA:407159 (HMGCR)
- [1652] GGA:395145 (RCJMB04\_14m24)
- [1653] SPU:373355 (LOC373355)
- [1654] DME:Dme1\_CG10367 (Hmgcr)
- [1655] CEL:F08F8.2
- [1656] OSA:4347443
- [1657] SCE:YLR450W (HMG2) YML075C (HMG1)
- [1658] AGO:AGOS\_AER152W
- [1659] CGR:CAGL0L11506g
- [1660] SPO:SPCC162.09c (hmg1)
- [1661] ANI:AN3817.2
- [1662] AFM:AFUA\_1G11230AFUA\_2G03700
- [1663] AOR:A0090103000311A0090120000217
- [1664] CNE:CNF04830



[1665] UMA:UM03014.1  
[1666] ECU:ECU10\_1720  
[1667] DDI:DDB\_0191125 (hmgA) DDB\_0215357 (hmgB)  
[1668] TBR:Tb927.6.4540  
[1669] TCR:506831.40509167.20  
[1670] LMA:LmjF30.3190  
[1671] VCH:VCA0723  
[1672] VCO:VC0395\_0662  
[1673] VVU:VV2\_0117  
[1674] VVY:VVA0625  
[1675] VPA:VPA0968  
[1676] VFI:VFA0841  
[1677] PAT:Pat1\_0427  
[1678] CBU:CBU\_0030 CBU\_0610  
[1679] CBD:COXBU7E912\_0151 COXBU7E912\_0622 (hmgA)  
[1680] TCX:Tcr\_1717  
[1681] DNO:DNO\_0797  
[1682] CVI:CV\_1806  
[1683] SUS:Acid\_5728 Acid\_6132  
[1684] SAU:SA2333 (mvaA)  
[1685] SAV:SAV2545 (mvaA)  
[1686] SAM:MW2466 (mvaA)  
[1687] SAB:SAB2419c (mvaA)  
[1688] SEP:SE2109  
[1689] LWE:lwe0819 (mvaA)  
[1690] LLA:L10433 (mvaA)  
[1691] LLC:LACR\_1664  
[1692] LLM:llmg\_0931 (mvaA)  
[1693] SPY:SPy\_0880 (mvaS.1)  
[1694] SPM:spyM18\_0941 (mvaS1)  
[1695] SPG:SpyM3\_0599 (mvaS.1)  
[1696] SPS:SPs1254  
[1697] SPH:MGAS10270\_Spy0744  
[1698] SPI:MGAS10750\_Spy0778  
[1699] SPJ:MGAS2096\_Spy0758  
[1700] SPK:MGAS9429\_Spy0742  
[1701] SPA:M6\_Spy0703  
[1702] SPN:SP\_1726  
[1703] SAG:SAG1317

- [1704] SAN:gbs1387
- [1705] STC:str0576 (mvaA)
- [1706] STL:stu0576 (mvaA)
- [1707] STE:STER\_0620
- [1708] SSA:SSA\_0337 (mvaA)
- [1709] LPL:lp\_0447 (mvaA)
- [1710] LJ0:LJ1608
- [1711] LSL:LSL\_0224
- [1712] LBR:LVIS\_0450
- [1713] LGA:LGAS\_1373
- [1714] EFA:EF1364
- [1715] NFA:nfa22110
- [1716] BGA:BG0708 (mvaA)
- [1717] SRU:SRU\_2422
- [1718] FPS:FP2341
- [1719] MMP:MMP0087 (hmgA)
- [1720] MMQ:MmarC5\_1589
- [1721] MAC:MA3073 (hmgA)
- [1722] MBA:Mbar\_A1972
- [1723] MMA:MM\_0335
- [1724] MBU:Mbur\_1098
- [1725] MHU:Mhun\_3004
- [1726] MEM:Memar\_2365
- [1727] MBN:Mboo\_0137
- [1728] MTH:MTH562
- [1729] MST:Msp\_0584 (hmgA)
- [1730] MSI:Msm\_0227
- [1731] MKA:MK0355 (HMG1)
- [1732] AFU:AF1736 (mvaA)
- [1733] HAL:VNG1875G (mvaA)
- [1734] HMA:rrnAC3412 (mvaA)
- [1735] HWA:HQ3215A (hmgR)
- [1736] NPH:NP0368A (mvaA\_2) NP2422A (mvaA\_1)
- [1737] TAC:Ta0406m
- [1738] TVO:TVN1168
- [1739] PTO:PT01143
- [1740] PAB:PAB2106 (mvaA)
- [1741] PFU:PF1848
- [1742] TKO:TK0914

- [1743] RCI:RCIX1027 (hmgA) RCIX376 (hmgA)
- [1744] APE:APE\_1869
- [1745] IHO:Igni\_0476
- [1746] HBU:Hbut\_1531
- [1747] SS0:SS00531
- [1748] ST0:ST1352
- [1749] SAI:Saci\_1359
- [1750] PAI:PAE2182
- [1751] PIS:Pisl\_0814
- [1752] PCL:Pcal\_1085
- [1753] PAS:Pars\_0796
- [1754] 示例性甲羟戊酸激酶核酸和多肽
- [1755] HSA:4598 (MVK)
- [1756] MCC:707645 (MVK)
- [1757] MMU:17855 (Mvk)
- [1758] RNO:81727 (Mvk)
- [1759] CFA:486309 (MVK)
- [1760] BTA:505792 (MVK)
- [1761] GGA:768555 (MVK)
- [1762] DRE:492477 (zgc:103473)
- [1763] SPU:585785 (LOC585785)
- [1764] DME:Dme1\_CG33671
- [1765] OSA:4348331
- [1766] SCE:YMR208W (ERG12)
- [1767] AGO:AGOS\_AER335W
- [1768] PIC:PICST\_40742 (ERG12)
- [1769] CGR:CAGL0F03861g
- [1770] SP0:SPAC13G6.11c
- [1771] MGR:MGG\_06946
- [1772] ANI:AN3869.2
- [1773] AFM:AFUA\_4G07780
- [1774] AOR:A0090023000793
- [1775] CNE:CNK01740
- [1776] ECU:ECU09\_1780
- [1777] DDI:DDBDRAFT\_0168621
- [1778] TET:THERM\_00637680
- [1779] TBR:Tb927.4.4070
- [1780] TCR:436521.9509237.10
- [1781] LMA:LmjF31.0560

[1782] CBU:CBU\_0608 CBU\_0609  
[1783] CBD:COXBU7E912\_0620 (mvk)  
[1784] LPN:lpn2039  
[1785] LPF:lpf2017  
[1786] LPP:lpn2022  
[1787] BBA:Bd1027 (lmbP) Bd1630 (mvk)  
[1788] MXA:MXAN\_5019 (mvk)  
[1789] OIH:OB0225  
[1790] SAU:SA0547 (mvaK1)  
[1791] SAV:SAV0590 (mvaK1)  
[1792] SAM:MW0545 (mvaK1)  
[1793] SAR:SAR0596 (mvaK1)  
[1794] SAS:SAS0549  
[1795] SAC:SACOL0636 (mvk)  
[1796] SAB:SAB0540 (mvaK1)  
[1797] SAA:SAUSA300\_0572 (mvk)  
[1798] SAO:SAOUHSC\_00577  
[1799] SEP:SE0361  
[1800] SER:SERP0238 (mvk)  
[1801] SHA:SH2402 (mvaK1)  
[1802] SSP:SSP2122  
[1803] LMO:lmo0010  
[1804] LMF:LMOf2365\_0011  
[1805] LIN:lin0010  
[1806] LWE:lwe0011 (mvk)  
[1807] LLA:L7866 (yeaG)  
[1808] LLC:LACR\_0454  
[1809] LLM:llmg\_0425 (mvk)  
[1810] SPY:SPy\_0876 (mvaK1)  
[1811] SPZ:M5005\_Spy\_0682 (mvaK1)  
[1812] SPM:spyM18\_0937 (mvaK1)  
[1813] SPG:SpyM3\_0595 (mvaK1)  
[1814] SPS:SPs1258  
[1815] SPH:MGAS10270\_Spy0740 (mvaK1)  
[1816] SPI:MGAS10750\_Spy0774 (mvaK1)  
[1817] SPJ:MGAS2096\_Spy0753 (mvaK1)  
[1818] SPK:MGAS9429\_Spy0737 (mvaK1)  
[1819] SPF:SpyM51126 (mvaK1)  
[1820] SPA:M6\_Spy0699

[1821] SPB:M28\_Spy0662 (mvaK1)  
[1822] SPN:SP\_0381  
[1823] SPR:spr0338 (mvk)  
[1824] SPD:SPD\_0346 (mvk)  
[1825] SAG:SAG1326  
[1826] SAN:gsb1396  
[1827] SAK:SAK\_1357 (mvk)  
[1828] SMU:SMU.181  
[1829] STC:str0559 (mvaK1)  
[1830] STL:stu0559 (mvaK1)  
[1831] STE:STER\_0598  
[1832] SSA:SSA\_0333 (mvaK1)  
[1833] SSU:SSU05\_0289  
[1834] SSV:SSU98\_0285  
[1835] SGO:SGO\_0239 (mvk)  
[1836] LPL:lp\_1735 (mvaK1)  
[1837] LJO:LJ1205  
[1838] LAC:LBA1167 (mvaK)  
[1839] LSA:LSA0908 (mvaK1)  
[1840] LSL:LSL\_0685 (eRG)  
[1841] LDB:Ldb0999 (mvk)  
[1842] LBU:LBUL\_0906  
[1843] LBR:LVIS\_0858  
[1844] LCA:LSEI\_1491  
[1845] LGA:LGAS\_1033  
[1846] LRE:Lreu\_0915  
[1847] PPE:PEPE\_0927  
[1848] EFA:EF0904 (mvk)  
[1849] OOE:OE0E\_1100  
[1850] LME:LEUM\_1385  
[1851] NFA:nfa22070  
[1852] BGA:BG0711  
[1853] BAF:BAPKO\_0732  
[1854] FPS:FP0313  
[1855] MMP:MMP1335  
[1856] MAE:Maeo\_0775  
[1857] MAC:MA0602 (mvk)  
[1858] MBA:Mbar\_A1421  
[1859] MMA:MM\_1762

- [1860] MBU:Mbur\_2395
- [1861] MHU:Mhun\_2890
- [1862] MEM:Memar\_1812
- [1863] MBN:Mboo\_2213
- [1864] MST:Msp\_0858 (mvk)
- [1865] MSI:Msm\_1439
- [1866] MKA:MK0993 (ERG12)
- [1867] HAL:VNG1145G (mvk)
- [1868] HMA:rrnAC0077 (mvk)
- [1869] HWA:HQ2925A (mvk)
- [1870] NPH:NP2850A (mvk)
- [1871] PTO:PT01352
- [1872] PHO:PH1625
- [1873] PAB:PAB0372 (mvk)
- [1874] PFU:PF1637 (mvk)
- [1875] TKO:TK1474
- [1876] RCI:LRC399 (mvk)
- [1877] APE:APE\_2439
- [1878] HBU:Hbut\_0877
- [1879] SS0:SS00383
- [1880] ST0:ST2185
- [1881] SAI:Saci\_2365 (mvk)
- [1882] MSE:Msed\_1602
- [1883] PAI:PAE3108
- [1884] PIS:Pisl\_0467
- [1885] PCL:Pcal\_1835
- [1886] 示例性磷酸甲羟戊酸激酶核酸和多肽
- [1887] HSA:10654 (PMVK)
- [1888] PTR:457350 (PMVK)
- [1889] MCC:717014 (PMVK)
- [1890] MMU:68603 (Pmvk)
- [1891] CFA:612251 (PMVK)
- [1892] BTA:513533 (PMVK)
- [1893] DME:Dmel\_CG10268
- [1894] ATH:AT1G31910
- [1895] OSA:4332275
- [1896] SCE:YMR220W (ERG8)
- [1897] AGO:AGOS\_AER354W
- [1898] PIC:PICST\_52257 (ERG8)

[1899] CGR:CAGL0F03993g  
[1900] SPO:SPAC343.01c  
[1901] MGR:MGG\_05812  
[1902] ANI:AN2311.2  
[1903] AFM:AFUA\_5G10680  
[1904] AOR:A0090010000471  
[1905] CNE:CNM00100  
[1906] UMA:UM00760.1  
[1907] DDI:DDBDRAFT\_0184512  
[1908] TBR:Tb09.160.3690  
[1909] TCR:507913.20508277.140  
[1910] LMA:LmjF15.1460  
[1911] MXA:MXAN\_5017  
[1912] OIH:OB0227  
[1913] SAU:SA0549 (mvaK2)  
[1914] SAV:SAV0592 (mvaK2)  
[1915] SAM:MW0547 (mvaK2)  
[1916] SAR:SAR0598 (mvaK2)  
[1917] SAS:SAS0551  
[1918] SAC:SACOL0638  
[1919] SAB:SAB0542 (mvaK2)  
[1920] SAA:SAUSA300\_0574  
[1921] SAO:SA0UHSC\_00579  
[1922] SAJ:SaurJH9\_0615  
[1923] SEP:SE0363  
[1924] SER:SERP0240  
[1925] SHA:SH2400 (mvaK2)  
[1926] SSP:SSP2120  
[1927] LMO:lmo0012  
[1928] LMF:LMOf2365\_0013  
[1929] LIN:lin0012  
[1930] LWE:lwe0013  
[1931] LLA:L10014 (yebA)  
[1932] LLC:LACR\_0456  
[1933] LLM:llmg\_0427  
[1934] SPY:SPy\_0878 (mvaK2)  
[1935] SPZ:M5005\_Spy\_0684 (mvaK2)  
[1936] SPM:spyM18\_0939  
[1937] SPG:SpyM3\_0597 (mvaK2)

[1938] SPS:SPs1256  
[1939] SPH:MGAS10270\_Spy0742 (mvaK2)  
[1940] SPI:MGAS10750\_Spy0776 (mvaK2)  
[1941] SPJ:MGAS2096\_Spy0755 (mvaK2)  
[1942] SPK:MGAS9429\_Spy0739 (mvaK2)  
[1943] SPF:SpyM51124 (mvaK2)  
[1944] SPA:M6\_Spy0701  
[1945] SPB:M28\_Spy0664 (mvaK2)  
[1946] SPN:SP\_0383  
[1947] SPR:spr0340 (mvaK2)  
[1948] SPD:SPD\_0348 (mvaK2)  
[1949] SAG:SAG1324  
[1950] SAN:gs1394  
[1951] SAK:SAK\_1355  
[1952] SMU:SMU.938  
[1953] STC:str0561 (mvaK2)  
[1954] STL:stu0561 (mvaK2)  
[1955] STE:STER\_0600  
[1956] SSA:SSA\_0335 (mvaK2)  
[1957] SSU:SSU05\_0291  
[1958] SSV:SSU98\_0287  
[1959] SGO:SGO\_0241  
[1960] LPL:lp\_1733 (mvaK2)  
[1961] LJO:LJ1207  
[1962] LAC:LBA1169  
[1963] LSA:LSA0906 (mvaK2)  
[1964] LSL:LSL\_0683  
[1965] LDB:Ldb0997 (mvaK)  
[1966] LBU:LBUL\_0904  
[1967] LBR:LVIS\_0860  
[1968] LCA:LSEI\_1092  
[1969] LGA:LGAS\_1035  
[1970] LRE:Lreu\_0913  
[1971] PPE:PEPE\_0925  
[1972] EFA:EF0902  
[1973] NFA:nfa22090  
[1974] BGA:BG0710  
[1975] BAF:BAPKO\_0731  
[1976] NPH:NP2852A



- [1977] SS0:SS02988
- [1978] ST0:ST0978
- [1979] SAI:Saci\_1244
- [1980] 示例性二磷酸甲羟戊酸脱羧酶核酸和多肽
- [1981] HSA:4597 (MVD)
- [1982] PTR:468069 (MVD)
- [1983] MCC:696865 (MVD)
- [1984] MMU:192156 (Mvd)
- [1985] RNO:81726 (Mvd)
- [1986] CFA:489663 (MVD)
- [1987] GGA:425359 (MVD)
- [1988] DME:Dme1\_CG8239
- [1989] SCE:YNR043W (MVD1)
- [1990] AGO:AGOS\_AGL232C
- [1991] PIC:PICST\_90752
- [1992] CGR:CAGLOC03630g
- [1993] SPO:SPAC24C9.03
- [1994] MGR:MGG\_09750
- [1995] ANI:AN4414.2
- [1996] AFM:AFUA\_4G07130
- [1997] AOR:A0090023000862
- [1998] CNE:CNL04950
- [1999] UMA:UM05179.1
- [2000] DDI:DDBDRAFT\_0218058
- [2001] TET:THERM\_00849200
- [2002] TBR:Tb10.05.0010 Tb10.61.2745
- [2003] TCR:507993.330511281.40
- [2004] LMA:LmjF18.0020
- [2005] CBU:CBU\_0607 (mvaD)
- [2006] CBD:COXBU7E912\_0619 (mvaD)
- [2007] LPN:lpG2040
- [2008] LPF:lp12018
- [2009] LPP:lpP2023
- [2010] TCX:Tcr\_1734
- [2011] DNO:DNO\_0504 (mvaD)
- [2012] BBA:Bd1629
- [2013] MXA:MXAN\_5018 (mvaD)
- [2014] OIH:OB0226
- [2015] SAU:SA0548 (mvaD)

[2016] SAV:SAV0591 (mvaD)  
[2017] SAM:MW0546 (mvaD)  
[2018] SAR:SAR0597 (mvaD)  
[2019] SAS:SAS0550  
[2020] SAC:SACOL0637 (mvaD)  
[2021] SAB:SAB0541 (mvaD)  
[2022] SAA:SAUSA300\_0573 (mvaD)  
[2023] SAO:SAOUHSC\_00578  
[2024] SAJ:SaurJH9\_0614  
[2025] SAH:SaurJH1\_0629  
[2026] SEP:SE0362  
[2027] SER:SERP0239 (mvaD)  
[2028] SHA:SH2401 (mvaD)  
[2029] SSP:SSP2121  
[2030] LMO:lmo0011  
[2031] LMF:LMOf2365\_0012 (mvaD)  
[2032] LIN:lin0011  
[2033] LWE:lwe0012 (mvaD)  
[2034] LLA:L9089 (yeaH)  
[2035] LLC:LACR\_0455  
[2036] LLM:llmg\_0426 (mvaD)  
[2037] SPY:SPy\_0877 (mvaD)  
[2038] SPZ:M5005\_Spy\_0683 (mvaD)  
[2039] SPM:spyM18\_0938 (mvd)  
[2040] SPG:SpyM3\_0596 (mvaD)  
[2041] SPS:SPs1257  
[2042] SPH:MGAS10270\_Spy0741 (mvaD)  
[2043] SPI:MGAS10750\_Spy0775 (mvaD)  
[2044] SPJ:MGAS2096\_Spy0754 (mvaD)  
[2045] SPK:MGAS9429\_Spy0738 (mvaD)  
[2046] SPF:SpyM51125 (mvaD)  
[2047] SPA:M6\_Spy0700  
[2048] SPB:M28\_Spy0663 (mvaD)  
[2049] SPN:SP\_0382  
[2050] SPR:spr0339 (mvd1)  
[2051] SPD:SPD\_0347 (mvaD)  
[2052] SAG:SAG1325 (mvaD)  
[2053] SAN:gsb1395  
[2054] SAK:SAK\_1356 (mvaD)

- [2055] SMU:SMU.937
- [2056] STC:str0560 (mvaD)
- [2057] STL:stu0560 (mvaD)
- [2058] STE:STER\_0599
- [2059] SSA:SSA\_0334 (mvaD)
- [2060] SSU:SSU05\_0290
- [2061] SSV:SSU98\_0286
- [2062] SGO:SGO\_0240 (mvaD)
- [2063] LPL:lp\_1734 (mvaD)
- [2064] LJO:LJ1206
- [2065] LAC:LBA1168 (mvaD)
- [2066] LSA:LSA0907 (mvaD)
- [2067] LSL:LSL\_0684
- [2068] LDB:Ldb0998 (mvaD)
- [2069] LBU:LBUL\_0905
- [2070] LBR:LVIS\_0859
- [2071] LCA:LSEI\_1492
- [2072] LGA:LGAS\_1034
- [2073] LRE:Lreu\_0914
- [2074] PPE:PEPE\_0926
- [2075] EFA:EF0903 (mvaD)
- [2076] LME:LEUM\_1386
- [2077] NFA:nfa22080
- [2078] BBU:BB0686
- [2079] BGA:BG0709
- [2080] BAF:BAPKO\_0730
- [2081] GFO:GFO\_3632
- [2082] FPS:FP0310 (mvaD)
- [2083] HAU:Haur\_1612
- [2084] HAL:VNG0593G (dmd)
- [2085] HMA:rrnAC1489 (dmd)
- [2086] HWA:HQ1525A (mvaD)
- [2087] NPH:NP1580A (mvaD)
- [2088] PTO:PT00478PT01356
- [2089] SSO:SS02989
- [2090] STO:ST0977
- [2091] SAI:Saci\_1245 (mvd)
- [2092] MSE:Msed\_1576
- [2093] 示例性异戊烯磷酸激酶 (IPK) 核酸和多肽

- [2094] Methanobacterium thermoautotrophicum gi|2621082  
[2095] Methanococcus jannaschii DSM 2661gi|1590842;  
[2096] Methanocaldococcus jannaschii gi|1590842  
[2097] Methanothermobacter thermautotrophicus gi|2621082  
[2098] Picrophilus torridus DSM9790 (IG-57) gi|48477569  
[2099] Pyrococcus abyssi gi|14520758  
[2100] Pyrococcus horikoshii OT3gi|3258052  
[2101] Archaeoglobus fulgidus DSM4304gi|2648231  
[2102] 示例性异戊烯基二磷酸 $\delta$ 异构酶 (IDI) 核酸和多肽  
[2103] HSA:3422 (IDI1) 91734 (IDI2)  
[2104] PTR:450262 (IDI2) 450263 (IDI1)  
[2105] MCC:710052 (LOC710052) 721730 (LOC721730)  
[2106] MMU:319554 (Idi1)  
[2107] RNO:89784 (Idi1)  
[2108] GGA:420459 (IDI1)  
[2109] XLA:494671 (LOC494671)  
[2110] XTR:496783 (idi2)  
[2111] SPU:586184 (LOC586184)  
[2112] CEL:K06H7.9 (idi-1)  
[2113] ATH:AT3G02780 (IPP2)  
[2114] OSA:43387914343523  
[2115] CME:CMB062C  
[2116] SCE:YPL117C (IDI1)  
[2117] AGO:AGOS\_ADL268C  
[2118] PIC:PICST\_68990 (IDI1)  
[2119] CGR:CAGL0J06952g  
[2120] SPO:SPBC106.15 (idi1)  
[2121] ANI:AN0579.2  
[2122] AFM:AFUA\_6G11160  
[2123] AOR:A0090023000500  
[2124] CNE:CNA02550  
[2125] UMA:UM04838.1  
[2126] ECU:ECU02\_0230  
[2127] DDI:DDB\_0191342 (ipi)  
[2128] TET:THERM\_00237280 THERM\_00438860  
[2129] TBR:Tb09.211.0700  
[2130] TCR:408799.19510431.10  
[2131] LMA:LmjF35.5330  
[2132] EHI:46.t00025

[2133] ECO:b2889 (idi)  
[2134] ECJ:JW2857 (idi)  
[2135] ECE:Z4227  
[2136] ECS:ECs3761  
[2137] ECC:c3467  
[2138] ECI:UTI89\_C3274  
[2139] ECP:ECP\_2882  
[2140] ECV:APEC01\_3638  
[2141] ECW:EcE24377A\_3215 (idi)  
[2142] ECX:EcHS\_A3048  
[2143] STY:STY3195  
[2144] STT:t2957  
[2145] SPT:SPA2907 (idi)  
[2146] SEC:SC2979 (idi)  
[2147] STM:STM3039 (idi)  
[2148] SFL:SF2875 (idi)  
[2149] SFX:S3074  
[2150] SFV:SFV\_2937  
[2151] SSN:SSON\_3042 SSON\_3489 (yhfK)  
[2152] SBO:SBO\_3103  
[2153] SDY:SDY\_3193  
[2154] ECA:ECA2789  
[2155] PLU:plu3987  
[2156] ENT:Ent638\_3307  
[2157] SPE:Spro\_2201  
[2158] VPA:VPA0278  
[2159] VFI:VF0403  
[2160] PPR:PBPR0469 (mvaD)  
[2161] PEN:PSEEN4850  
[2162] CBU:CBU\_0607 (mvaD)  
[2163] CBD:COXBU7E912\_0619 (mvaD)  
[2164] LPN:lp2051  
[2165] LPF:lp12029  
[2166] LPP:lp2034  
[2167] TCX:Tcr\_1718  
[2168] HHA:Hha1\_1623  
[2169] DNO:DNO\_0798  
[2170] EBA:ebA5678 p2A143  
[2171] DVU:DVU1679 (idi)

[2172] DDE:Dde\_1991  
[2173] LIP:LI1134  
[2174] BBA:Bd1626  
[2175] AFW:Anae109\_4082  
[2176] MXA:MXAN\_5021 (fni)  
[2177] RPR:RP452  
[2178] RTY:RT0439 (idi)  
[2179] RCO:RC0744  
[2180] RFE:RF\_0785 (fni)  
[2181] RBE:RBE\_0731 (fni)  
[2182] RAK:A1C\_04190  
[2183] RBO:A1I\_04755  
[2184] RCM:A1E\_02555  
[2185] RRI:A1G\_04195  
[2186] MLO:mlr6371  
[2187] RET:RHE\_PD00245 (ypd00046)  
[2188] XAU:Xaut\_4134  
[2189] SIL:SP00131  
[2190] SIT:TM1040\_3442  
[2191] RSP:RSP\_0276  
[2192] RSH:Rsph17029\_1919  
[2193] RSQ:Rsph17025\_1019  
[2194] JAN:Jann\_0168  
[2195] RDE:RD1\_0147 (idi)  
[2196] DSH:Dshi\_3527  
[2197] BSU:BG11440 (ypgA)  
[2198] BAN:BA1520  
[2199] BAR:GBAA1520  
[2200] BAA:BA\_2041  
[2201] BAT:BAS1409  
[2202] BCE:BC1499  
[2203] BCA:BCE\_1626  
[2204] BCZ:BCZK1380 (fni)  
[2205] BCY:Bcer98\_1222  
[2206] BTK:BT9727\_1381 (fni)  
[2207] BTL:BALH\_1354  
[2208] BLI:BL02217 (fni)  
[2209] BLD:BLi02426  
[2210] BAY:RBAM\_021020 (fni)

[2211] BPU:BPUM\_2020 (fni)  
[2212] OIH:OB0537  
[2213] SAU:SA2136 (fni)  
[2214] SAV:SAV2346 (fni)  
[2215] SAM:MW2267 (fni)  
[2216] SAR:SAR2431 (fni)  
[2217] SAS:SAS2237  
[2218] SAC:SACOL2341 (fni)  
[2219] SAB:SAB2225c (fni)  
[2220] SAA:SAUSA300\_2292 (fni)  
[2221] SAO:SAOUHSC\_02623  
[2222] SEP:SE1925  
[2223] SER:SERP1937 (fni-2)  
[2224] SHA:SH0712 (fni)  
[2225] SSP:SSP0556  
[2226] LMO:lmo1383  
[2227] LMF:LMOf2365\_1402 (fni)  
[2228] LIN:lin1420  
[2229] LWE:lwe1399 (fni)  
[2230] LLA:L11083 (yebB)  
[2231] LLC:LACR\_0457  
[2232] LLM:llmg\_0428 (fni)  
[2233] SPY:SPy\_0879  
[2234] SPZ:M5005\_Spy\_0685  
[2235] SPM:spyM18\_0940  
[2236] SPG:SpyM3\_0598  
[2237] SPS:SPs1255  
[2238] SPH:MGAS10270\_Spy0743  
[2239] SPI:MGAS10750\_Spy0777  
[2240] SPJ:MGAS2096\_Spy0756  
[2241] SPK:MGAS9429\_Spy0740  
[2242] SPF:SpyM51123 (fni)  
[2243] SPA:M6\_Spy0702  
[2244] SPB:M28\_Spy0665  
[2245] SPN:SP\_0384  
[2246] SPR:spr0341 (fni)  
[2247] SPD:SPD\_0349 (fni)  
[2248] SAG:SAG1323  
[2249] SAN:gsb1393

[2250] SAK:SAK\_1354 (fni)  
[2251] SMU:SMU.939  
[2252] STC:str0562 (idi)  
[2253] STL:stu0562 (idi)  
[2254] STE:STER\_0601  
[2255] SSA:SSA\_0336  
[2256] SGO:SGO\_0242  
[2257] LPL:lp\_1732 (idi1)  
[2258] LJ0:LJ1208  
[2259] LAC:LBA1171  
[2260] LSA:LSA0905 (idi)  
[2261] LSL:LSL\_0682  
[2262] LDB:Ldb0996 (fni)  
[2263] LBU:LBUL\_0903  
[2264] LBR:LVIS\_0861  
[2265] LCA:LSEI\_1493  
[2266] LGA:LGAS\_1036  
[2267] LRE:Lreu\_0912  
[2268] EFA:EF0901  
[2269] OOE:OE0E\_1103  
[2270] STH:STH1674  
[2271] CBE:Cbei\_3081  
[2272] DRM:Dred\_0474  
[2273] SWO:Swol\_1341  
[2274] MTA:Moth\_1328  
[2275] MTU:Rv1745c (idi)  
[2276] MTC:MT1787 (idi)  
[2277] MB0:Mb1774c (idi)  
[2278] MBB:BCG\_1784c (idi)  
[2279] MPA:MAP3079c  
[2280] MAV:MAV\_3894 (fni)  
[2281] MSM:MSMEG\_1057 (fni) MSMEG\_2337 (fni)  
[2282] MUL:MUL\_0380 (idi2)  
[2283] MVA:Mvan\_1582 Mvan\_2176  
[2284] MGI:Mflv\_1842 Mflv\_4187  
[2285] MMC:Mmcs\_1954  
[2286] MKM:Mkms\_2000  
[2287] MJL:Mjls\_1934  
[2288] CGL:NCg12223 (cg12305)



[2289] CGB:cg2531 (idi)  
[2290] CEF:CE2207  
[2291] CDI:DIP1730 (idi)  
[2292] NFA:nfa19790 nfa22100  
[2293] RHA:RHA1\_ro00239  
[2294] SCO:SC06750 (SC5F2A.33c)  
[2295] SMA:SAV1663 (idi)  
[2296] LXX:Lxx23810 (idi)  
[2297] CMI:CMM\_2889 (idiA)  
[2298] AAU:AAur\_0321 (idi)  
[2299] PAC:PPA2115  
[2300] FRA:Francci3\_4188  
[2301] FRE:Franean1\_5570  
[2302] FAL:FRAAL6504 (idi)  
[2303] KRA:Krad\_3991  
[2304] SEN:SACE\_2627 (idiB\_2) SACE\_5210 (idi)  
[2305] STP:Strop\_4438  
[2306] SAQ:Sare\_4564 Sare\_4928  
[2307] RXY:Rxl\_0400  
[2308] BBU:BB0684  
[2309] BGA:BG0707  
[2310] SYN:s111556  
[2311] SYC:syc2161\_c  
[2312] SYF:Synpcc7942\_1933  
[2313] CYA:CYA\_2395 (fni)  
[2314] CYB:CYB\_2691 (fni)  
[2315] TEL:t111403  
[2316] ANA:all4591  
[2317] AVA:Ava\_2461 Ava\_B0346  
[2318] TER:Tery\_1589  
[2319] SRU:SRU\_1900 (idi)  
[2320] CHU:CHU\_0674 (idi)  
[2321] GFO:GFO\_2363 (idi)  
[2322] FJO:Fjoh\_0269  
[2323] FPS:FP1792 (idi)  
[2324] CTE:CT0257  
[2325] CCH:Cag\_1445  
[2326] CPH:Cpha266\_0385  
[2327] PVI:Cvib\_1545

- [2328] PLT:Plut\_1764
- [2329] RRS:RoseRS\_2437
- [2330] RCA:Rcas\_2215
- [2331] HAU:Haur\_4687
- [2332] DRA:DR\_1087
- [2333] DGE:Dgeo\_1381
- [2334] TTH:TT\_P0067
- [2335] TTJ:TTHB110
- [2336] MJA:MJ0862
- [2337] MMP:MMP0043
- [2338] MMQ:MmarC5\_1637
- [2339] MMX:MmarC6\_0906
- [2340] MMZ:MmarC7\_1040
- [2341] MAE:Maeo\_1184
- [2342] MVN:Mevan\_1058
- [2343] MAC:MA0604 (idi)
- [2344] MBA:Mbar\_A1419
- [2345] MMA:MM\_1764
- [2346] MBU:Mbur\_2397
- [2347] MTP:Mthe\_0474
- [2348] MHU:Mhun\_2888
- [2349] MLA:Mlab\_1665
- [2350] MEM:Memar\_1814
- [2351] MBN:Mboo\_2211
- [2352] MTH:MTH48
- [2353] MST:Msp\_0856 (fni)
- [2354] MSI:Msm\_1441
- [2355] MKA:MK0776 (1ldD)
- [2356] AFU:AF2287
- [2357] HAL:VNG1818G (idi) VNG6081G (crt\_1) VNG6445G (crt\_2) VNG7060 VNG7149
- [2358] HMA:rrnAC3484 (idi)
- [2359] HWA:HQ2772A (idiA) HQ2847A (idiB)
- [2360] NPH:NP0360A (idiB\_1) NP4826A (idiA) NP5124A (idiB\_2)
- [2361] TAC:Ta0102
- [2362] TVO:TVN0179
- [2363] PTO:PT00496
- [2364] PHO:PH1202
- [2365] PAB:PAB1662
- [2366] PFU:PF0856

- [2367] TKO:TK1470
- [2368] RCI:LRC397 (fni)
- [2369] APE:APE\_1765.1
- [2370] SMR:Smar\_0822
- [2371] IH0:Igni\_0804
- [2372] HBU:Hbut\_0539
- [2373] SS0:SS00063
- [2374] ST0:ST2059
- [2375] SAI:Saci\_0091
- [2376] MSE:Msed\_2136
- [2377] PAI:PAE0801
- [2378] PIS:Pisl\_1093
- [2379] PCL:Pcal\_0017
- [2380] PAS:Pars\_0051
- [2381] TPE:Tpen\_0272
- [2382] 示例性异戊二烯合酶核酸和多肽
- [2383] Genbank登录号
- [2384] AY341431
- [2385] AY316691
- [2386] AY279379
- [2387] AJ457070
- [2388] AY182241

1-

atgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgctcggtccgcaaact  
 atcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaa  
 gctggaggagaaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgtgcatgatcaaccgtgtagacacc  
 cagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgctgggtctgacctacaaatttg  
 aaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaaacaaaagaacaaatc  
 tgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgagggtttctcag  
 gatgtttttgagcgtttcaaggataaagaagggtggtttcagcgggtgaactgaaagggtgacgtcc  
 aaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaaacctgctggagga  
 ggcgctaccttttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaagggtt  
 gcagaacaagtgagccacgccttggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcac  
 gttgggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaa  
 gctggatttttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgtgggtgg  
 accgagatgggcctggctagcaaaactggattttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttct  
 gggcactgggtatggcgccagaccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatggtt  
 tggctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactg  
 ttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaac  
 tgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaagagaaagg  
 tcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagag  
 gcgaaatgggtccaacaacaaaattatcccggtttctccaagtacctggaaaacgccagcgttt  
 cctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacat  
 ctccgaccacgcgctgcttccctgaccgaactccatgggtctggtgcgttctagctgcgttatc  
 ttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcgagctggaacgtggcgagactaccaatt  
 ctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcaagaactgcg  
 taaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccacctgctg  
 cctaaagcgttcatggaaatcgagttaacatggcacgtgtttccactgcacctaccagtatg  
 gcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcacaaactgctgctgattgaccc  
 tttcccgatttaaccagctgatgtatgtc

**taactgcag**

(SEQ ID NO:1)

图1

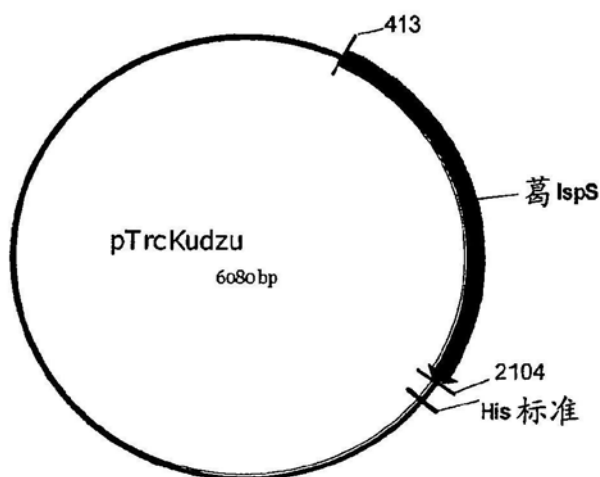


图2

1-

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcaactccc  
gttctggataatgttttttgcgcgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt  
gtggggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaat  
gtatcgattaataaaggagggaataaacc**ATG**tggtgcgacctcttctcaatttactcagattacc  
gagcataattcccgtcggtccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaat  
ccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagt  
tcgctgcatgatcaaccgtgtagacaccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg  
cagcgctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgta  
tgctggacgaaaaacaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgct  
gcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcggtttcaaggataaagaaggtggt  
ttcagcgggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg  
gtttcgaggggtgagaacctgctggaggaggcgctacotttttccatcacccacctgaagaacaa  
cctgaaagaaggcattataaccaaggttgagaacaagtgaagccacgacctggaaactgccatat  
caccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgc  
atcacccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagacctgcaccagaa  
agagctgcaagatctgtcccgtgggtggaccgagatgggcctggctagcaaaactggattttgta  
cgcgaccgcctgatggaagtttattttctgggcactgggtatggcgccagaccgcagtttggtg  
aatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt  
ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgct  
attaacaccctgcccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgaca  
cgctcctattctattctgaaagagaaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg  
tgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatgggtccaacaacaaaattatcccggctttc  
tccaagtacctggaaaacgcagcggtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttact  
tttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcggttccctgaccgacttcca  
tggtctggtgcttctagctgcgttatcttccgctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg  
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtacca  
gcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcg  
tgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcggttcatggaaatcgagtttaacatggca  
cgtgtttccactgcacctaccagtatggcgatgggtctgggtcgccagactacgcgactgaaa  
accgcatcaaactgctgctgattgacctttcccgattaaaccagctgatgtatgtc**TAA**ctgca  
gctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaa  
tagcgccgctcgaccatcatcatcatcattgagtttaaaccggtctccagcttggtctgtttg  
gcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggctctgataaa  
acagaatttgctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtg  
aaacgcctgtagcgccgatggtagtgtgggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcat  
caaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcggttttatctgttgtttgtcggtga  
acgctctcctgagtaggacaaatccgcccggagcggatttgaacggttgcaagcaacggcccg

图3A

aggggtggcgggcaggacgcccgcataaaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctg  
acggatggcctttttgcgtttctacaaactccttttgtttatttttctaaatacattcaaatat  
gtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatg  
agtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttg  
ctcaccacagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggtta  
catcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttcca  
atgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccggtgttgacgccgggcaag  
agcaactcggtcgcccgcatacactattctcagaatgacttgggttgagtactcaccagtcacaga  
aaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctatgagtgat  
aacactgcgggcaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgc  
acaacatgggggatcatgtaactcgcttgatcggttggaaccggagctgaatgaagccataacc  
aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaact  
ggcgaactacttactctagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcgataaagttg  
caggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgg  
tgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgta  
gttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagatag  
gtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattga  
tttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccctttttgataatctcatgacc  
aaaatcccttaacgtgagttttcggtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggat  
cttcttgagatcccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaacaccgctacc  
agcgggtgggtttgtttgccggatcaagagctaccaactccttttccgaaggtaactggctcagc  
agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact  
ctgtagcacccgctacatacctcgctctgctaactcctgttaccagtggctgctgccagtggcga  
taagtcgtgtcttacogggttggaactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggc  
tgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacc  
tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggt  
aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaacgcctggtatcct  
tatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggg  
ggcggagcctatggaaaaacgcagcaacgcggcctttttacgggttcctggccttttgcgtggcc  
ttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccttgattctgtggataaccgtattaccgccttt  
gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgacccgagcgcagcagtcagtgagcgaggaag  
cggaagagcgcctgatgcggatttttctccttacgcatctgtgcgggtattttcacaccgcatatg  
gtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagtttaagccagtatacactccgctatcgc  
tacgtgactgggtcatggctgcgccccgcaccccgcacaaccccgtgacgcgccctgacgggc  
ttgtctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag  
aggtttttaccgctcatcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcggaaggcgaagc  
ggcatgcattttacgttgacaccatcgaatgggtgcaaacctttcgcggtatggcatgatagcgc  
ccggaagagagtcaattcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagt  
atgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa  
aacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcaciaa  
caactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtcctggccctgcacgcgc  
cgtcgcaaatgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtgtc  
gatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgc  
gtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcct

图3B

Gcactaatgttccggcggttattttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttt  
 ctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatac  
 gcgctgttagcgggcccattaagtctgtctcggcgcgctctgcgtctggctggctggcataaat  
 atctcactcgcaatcaaattcagccgatagcgggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgg  
 ttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcggtcccactgcgatgctggttgccaac  
 gatcagatggcgctgggcgcaatgocgcgccattaccgagtcggggctgcgcgttggtgaggata  
 tctcggtagtgggatacgcagataaccgaagacagctcatgttatatcccgcgctcaaccacat  
 caaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc  
 caggcgggtgaagggcaatcagctggtgccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgc  
 ccaatacgcgaaccgcctctccccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcacgacaggt  
 tttccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgaattaatgtgaggttagcgcgaattgatctg  
 (SEQ ID NO:2)

图3C

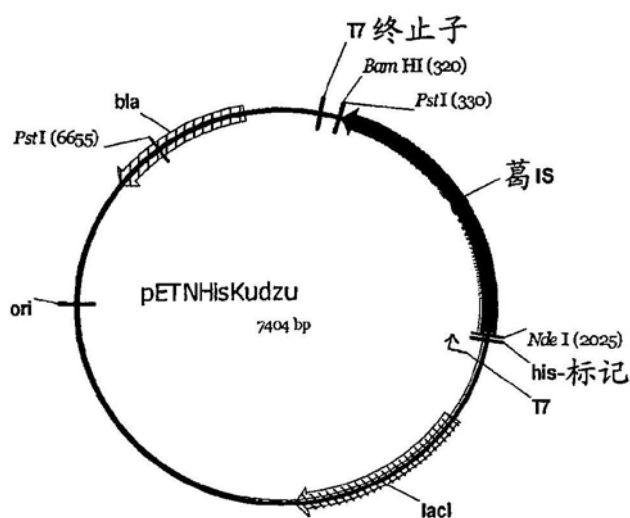


图4

1-

ttctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgc  
taacgcagtcaggcaccgtgtatgaaatctaacaatgcgtcatcgatcctcggcaccgtca  
ccctggatgctgtaggcataggcttggttatgccggtactgccggcctcttgccgggatccg  
gatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagaccgcttagaggccccaaggggttatg  
ctagttattgctcagcgggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggctttgttagcagccgg  
atccctgcagttagacatacatcagctggttaatcgggaaggggtcaatcagcagcagtttgat  
gcggttttcagtcgcgtagtcctgggcgacccagaccatcgccatactggtaggtgcagtgga  
acacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcaggggtggagtcgctaacgc  
gttcacgattcatctttttccattcggcgctcgatcagtttacgcagttcttcgcgggcctgttc  
ctcgctggtaccatcgttttcgtgcatgtagctaataatgataagaattgtagtctcgccacgttcc  
agctccgccgcagaggtggccagatcgttgacagggcggaagataacgcagctagaacgcacca  
gaccatggaagtcggtcagggaaacgcagcgcgtggctcgagatgtcttcctgctgctggcatac  
ggaaaagtaagacggcgccagcagcgtacaccggaggaggaaaacgctggcggttttcagggtac  
ttggagaaaagccgggataattttgttggtggaccatttcgcctcttgcaaaaaggtttgcaca  
gttcacgccagcttttcgtcagataggacaggttggttatgacctttctcttcagaatagaata  
ggacgtgtcggttaacggtgttgtagcagtgccaggaaacacagtttcataatagtcgggcaggggtg  
ttaatagcgttaacgtcccagcgtctacagcatcgggtgaacagttgcagttcgtccagagtg  
cataaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagaccaaacaattttagtaaacagctttgcg  
acattcaccaaactgcgggtctggcgccataaccagtgcccagaaaataaacttccatcaggcgg  
tcgctgtaaaaatccagtttgctagccaggcccatctcggtccaccagcgggacagatcttgca  
gctctttctgggtgcaggggtctgtaccatgttaaaatccagcttcgccagctccagcagcagctg  
gtgatgcggttctttcggttcgtatttatccaggaaaccaacgtgcctccagacgggtgcagacgc  
tggtgatattggcagttccagggcgtggctcacttggtctgcaaccttggtattaatgccttctt  
tcaggttggtcttcaggtgggtgatggaaaaggtacgcgcctcctccagcaggttctcacccctc  
gaaacccaggttaagacgcttcatacaggctcagcaggccttgagcgtcacctttcagttcacccg  
ctgaaaccaccttctttatccttgaaacgctcaaaaacatcctgagaaacctcgaaaccgtgct  
gacgcagcagacggaaagacagagcgggtgcgtgcaggtcagatttggtctttttgttttcgtc  
cagcagtagcatgttttcagggttttaatgatgtctttttcaaatttgtaggtcagaccagc  
cgctgcacatcgtcgatcagctccagcagggacagcggctgggtgtctaacgggtgatcatgc  
agcgaacttcttcctccagtttggtcgtttctcctccagcttttccactttcaggtcgttctc  
cagggttgagggaattcgaaattccacaggtttggctgatagtttgcggaacgacgggaatta  
tgctcggtaatctgagtaaatgagaagaggtcgcacacatatgacgaccttcgatatggccgc  
tgctgtgatgatgatgatgatgatgatgatggcccatggtatatctccttcttaaggttaa  
acaaaattattttctagaggggaattgttatccgctcacaattcccctatagtgagtcgtattaa  
tttcgcgggatcgagatctcgatcctctacgccggacgcacatcggtggccggcatcaccggcgcca  
caggtgcggttgctggcgccctatatcgccgacatcaccgatggggaagatcgggctcgccactt  
cgggctcatgagcgttggttcggcgtgggtatgggtggcaggccccgtggccgggggactgttg  
ggcgccatctccttgcatgcaccattccttgccggcggtgctcaacggcctcaacctactac  
tggtgctgcttctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgagatcccggaacaccatcgaat  
ggcgcaaaaacctttcgcggtatggcatgatagcggccggaagagagtcattcaggggtggtgaa  
tgtgaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcc  
cgctgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggagcggcgatgg  
cggagctgaattacattcccaaccgctggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgat  
tggcggtgccacctccagtcctggccctgcacgcgcgtcgcaaatgtcgcggcgattaaatct

图5A



cgcgcgatcaactgggtgccagctggtggtgcgatggtagaaacgaagcgctcgaagcct  
gtaaagcggcggtgcacaactctctcgcgcacacgctcagtgaggctgatcattaaactaacgct  
ggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgectgcactaatgttccggcggtattttcttgat  
gtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacggtaacgcgactgggcg  
tggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaactcgcgctgttagcggggcccattaagttctgt  
ctcggcgcgctctgcgtctggctggctggcataaatactcactcgcaatcaaattcagccgata  
gcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgggtttcaacaaacctatgcaaattgctgaatg  
agggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcg  
cattaccgagtccgggctgcgcggttggtgcggatatctcggtagtgggatacgcagataccgaa  
gacagctcatgttatatcccgcggttaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaa  
ccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcc  
cgtctcactgggtgaaaagaaaaaccacctggcgcccaataacgcaaaccgcctctccccgcgcg  
ttggccgattcattaatgcagctggcacgcaggtttcccgactggaaagcgggacgtgagcgc  
aacgcaattaatgtaagttagctcactcattaggcaccgggatctcgaccgatgcccttgagag  
ccttcaaccagtcagctccttcgggtgggcgcggggcatgactatcgtcgcgcgacttatgac  
tgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgcctctgggtcattttcggcgag  
gaccgctttcgcgtggagcgcgacgatgatcggcctgtcgtttgcggtatttcggaatcttgacg  
ccctcgcctcaagccttcgtcactggtcccgcaccaaactgttcggcgagaagcaggccattat  
cgccggcatggcgggccgacgcgctgggctacgtcttgctggcggttcgcgacgcgaggctggatg  
gccttccccattatgattcttctcgccttcggcgggcatcgggatgccgcggttgacggccatgc  
tgtccaggcaggtagatgacgaccatcagggaacagcttcaaggatcgctcgcggctcttaccag  
cctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatgccgcctcggcgagcacatgg  
aacgggttggcatggattgtaggcgccgcctataccttgtctgcctccccgcggttgcgctcgcg  
gtgcatggagccgggcccacctcgacctgaatggaagccggcgggcacctcgctaacggattcacc  
actccaagaattggagccaatcaattcttgcggaactgtgaatgcgcaaaccaaccttggc  
agaacatatccatcgcgtccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcgggcagcgttgg  
gtcctggccacgggtgcgcgatgatcgtgctcctgtcgttgaggaccggctaggctggcggggt  
tgcttactggttagcagaatgaatcacgcgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgca  
aaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggctctcgggttccggtgttctgtaaagtctgga  
aacgcgggaagtgcgcgcctgcaccattatgttccggatctgcacgcaggatgctgctggcta  
ccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgtggcattgacctgagtattttctct  
ggtcccgcgcgatccataccgccagttgtttaccctcacaacggtccagtaaccgggcatgttc  
atcatcagtaaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattacccccatgaac  
agaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaacgcaccttaacatggccc  
gctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaaactcaacgagctggacgcggatgaaca  
ggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcgt  
ttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttgtctgt  
aagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttgcggggtgtcgggg  
cgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcag  
agcagattgtactgagagtgcaccatatatgcgggtgtgaaataaccgcacagatgcgtaaggaga  
aaataccgcacacaggcgctcttccgcttctcgcctcactgactcgctgcgctcggctcgttcggc  
tgcgggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaatacgggttatccacagaatcaggggataa  
cgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaaccgtaaaaaaggccgcgttg  
ctggcggtttttccataggctccgcggccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcaga

图5B

gggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggtttcccccctggaagctccctcgtgcg  
ctctcctggttccgacctgcccgttaccggataacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtg  
gcgctttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgtaggtcggtcgtccaagctgg  
gctgtgtgcacgaaccccccggttcagcccagccgctgcgcccttatccggttaactatcgtcttga  
gtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcaga  
gcgaggatgttaggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaa  
ggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctc  
ttgatccggcacaacaaaccacgctggtagcgggtggttttttgtttgcaagcagcagattacg  
cgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacgggggtctgacgctcagtggg  
acgaaaactcacgttaagggattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcct  
tttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagt  
taccatgcttaatacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcacccatagttg  
cctgactccccgctcgtgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgc  
aatgataccgcgagacccacgctcacccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccgga  
agggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattggtgcc  
gggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacggtggtgccattgctgcagg  
catcgtggtgtcacgctcgtcggttggtatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaagg  
cgagttacatgatccccatggtgtgcaaaaaagcgggttagctccttcgggtcctccgatcgttg  
tcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttac  
tgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaa  
tagtgatgcggcgaccgagttgctcttgccggcggtcaacacgggataataccgcgccacata  
gcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacggtcttccggggcgaaaactctcaaggatctt  
accgctggtgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttt  
actttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataa  
gggcgacacggaaatggtgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatca  
gggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatataggggtt  
ccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaa  
cctataaaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcaagaa

(SEQ ID NO:5)

图5C

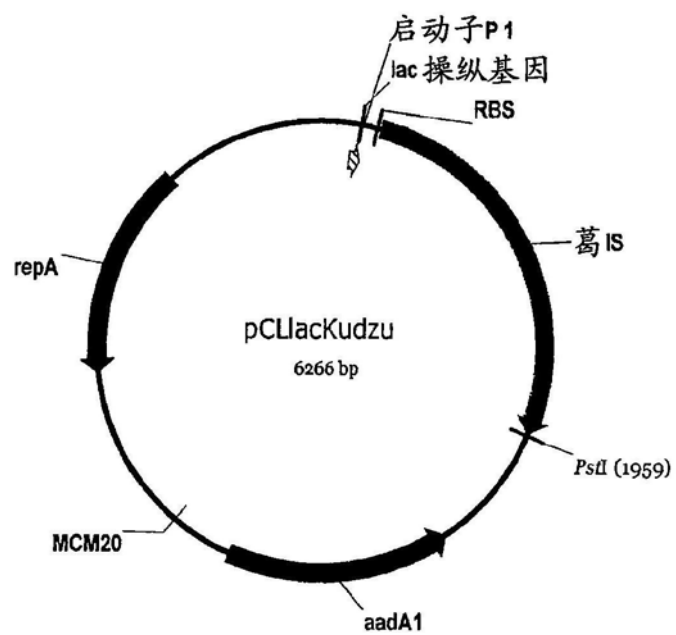


图6

1-

cccgtcttactgtcggaattcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcc  
cgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcacc  
caggctttacactttatgcttccggtcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttc  
acacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcttgtatcgattaaataaggaggaataaa  
ccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaa  
ctatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaa  
aagctggaggagaaagcgaccaaactggagggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagaca  
cccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgccctgggtctgacctacaaatt  
tgaaaaagacatcattaagccctggaaacatcgactgctggacgaaaacaaaaagaacaaa  
tctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctc  
aggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtgggtttcagcgggtgaactgaaaggtgacgt  
ccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgaggggtgagaacctgctggag  
gaggcgctaccttttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaagg  
ttgcagaacaagtgcacacgacctggaactgccatatcaccagcgtctgcacctgtggaggc  
acgttgggttccctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcg  
aagctggattttaacatggtacagacctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgctgggt  
ggaccgagatgggcctggctagcaaacctggattttgtacgcgacccgctgatggaagtttattt  
ctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttgggtgaatgtcgaaagctgttactaaaatg  
tttgggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaac  
tgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgctattaacacctgcccgaactatatgaa  
actgtgtttcctggcactgtacaacacctgtaacgacacgtcctatttctattctgaaagagaaa  
ggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcggtgaactgtgcaaagcctttctgcaag  
aggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgt  
ttcctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagac  
atctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcttctagctgcgtta  
tcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactacca  
ttctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactg  
cgtaaacctgatcgacgcgcaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccacctgc  
tgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttccactgcacctaccagta  
tggcgatggtctgggtcgccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaacctgctgctgattgac  
cctttcccgatataaccagctgatgtatgtctaactgcaggtcgactctagaggatccccgggt  
ccgagctcgaatttcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcggttacc  
aacttaatcgcttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggccgcac  
cgatcgcccttccaacagttgcgcagcctgaatggcgcaatggcgccctgatgcggtattttctc  
cttacgcactctgtgcggtattttcacaccgcatatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatg  
ccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaaagccctcgc  
tagatttttaatgcggatggttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcc  
tttcatgatatacttccaatttgtgtagggttattatgcacgcttaaaaaataataaaagcag  
acttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagc  
cgcgccgcgaagcggcgctggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtga  
tctcgccctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttc  
ttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggcccggcagggc  
tccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgattttgcccgttactgcgtgtaccaaa  
tgccgggacaacgtaagcactacatttgcgtcatcgccagccagtcgggcggcgagttccatag

图7A

cgттаaggттtcатттtagcgctcaaатagatcctgттcaggaaccggatcaaagagттcctcc  
gccgctggacctaccaaggcaacgctatgттtctcttgctттtgtcagcaagatagccagatcaa  
tgctgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattg  
cagттcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgactттc  
acagcgcggaatctcgtctctccaggggaagccgaagттtccaaaaggtcgттgatcaaag  
ctcgccgcttgттtcatcaagccttacggtcacggtaaccagcaaатcaатatcactgtgtgg  
cttcaggccgcatccactgcggaagcgtacaaатgtacggccagcaacgtcgттcagatgg  
cgctcgatgacgccaaactacctctgatagттgagtcgatacttcggcgatcacgcgttcctca  
tgatgттtaaactттgттtagggcgactgccctgctgcgtaacatcgттgctgctccataacat  
caaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggtgcccaggcatagactgtacccca  
aaaaaacagtataacaagccatgaaaaccgccactgcgcggttaccaccgctgcgттcggtca  
aggттctggaccagттgcgtgagcgcatacgtacttgcattacagcttacgaaccgaacaggc  
ttatgtccactgggттcgtgccttcacгттccacgggtgtgcgtcacccggcaaccttgggc  
agcagcgaagtgcaggcattттctgtcctggctggcgaacgagcgcgaagттtcggtctccacgc  
atcgtcaggcattggcggccttgctgттctctacggcaagggtgctgtgcacggatctgcctg  
gcttcaggagatcggaagacctcgccgctgcgcggcgttgccgggtggtgctgacccggatgaa  
gtgгттcgcatcctcgгттттctggaaggcgagcatcgттtgттcgccagctттctgtatggaa  
ggggcatgcggatcagtgaggгттtgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcac  
gatcatcgtgcgggaggгgaaggгtccaaggatcgggccttgatgттacccgagagcttgгca  
cccagcctgcgcgagcaggгgaattaaттccacggгттtgctgcccgcaaaccgggctgттct  
gggtgттgctagттtgттatcagaatcgcatatccggcttcagccgгттgcccgctgaaagcgc  
tattттctccagaattgccatgattттттccccacgggaggcgctcactggctcccgtgттgtcg  
gcagctттgattcgataagcagcatcgctgттtcaggctgtctatgtgtgactgттgagctgt  
aacaagtgtctcagggtгттcaattтcatgtтctagттgctттgtттtactgгттcacctgтт  
ctattagggtgttacatgctgtтcatctgttacattgtcgtatctgtтcatgggtgaacagctттga  
atgcaccaaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatctттттtacaccgтттcatctgtgca  
tatggacagттттccctттgatatgtaacgggtgaacagттgtтctactттtgттgттtagtctт  
gatgctтcactgatagatacaagagccataagaacctcagatcctтccgtatttagccagtatg  
ттctctagtgtgгттcgттgттттtgctgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttac  
ттtgcatgtcactcaaaaattттgcctcaaaactggtgagctgaattттtgagttaaagcatc  
gtgtagtгттттcttagtcgгттatgtaggtaggaatctgatgtaatgгттgттggtattттg  
tcaccattcattттттatctgгттgtтctcaagtтcgгttacgagatccattттgtctatctagтт  
caacttggaaaатcaacgtatcagtcgggгgcctcgcttatcaaccaccaattтcatattgct  
gtaagtгттtaaатctттacttattgгттtcaaaaccattgгttaagcctттtaaactcatgg  
tagттattттcaagcattaaatgaacttaaattcatcaaggctaатctctatatttgctтgt  
gagттттctттtgттtagттctттtaataaccactcataaатcctcatagagtatttgттtc  
aaaagacttaacatgттccagattataттттatgaattттттtaactggaaaagataaggcaat  
atctctтcactaaaaactaattтtaattттtgcttgagaacttgгcatagттtgтccactgga  
aaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgattтccacagттctcgtcatcagctctctggt  
tgctттtagctaatacaccataagcattттccctactgatгтcatcatctgagcgtattgгtta  
taagtgaacgataaccgtccgттctттccttgtagggттттcaatcgтgggгtgagtagtgcca  
cacagcataaaатtagcttgгттcatgctcgгttaagtcatagcgactaatcgctagттcatt  
tgctттgaaaacaactaattcagacatacatctcaattgгtctaggtgattттaatcactatac  
caattgagatgggctagtcattgataattactagtcctттtctттgagттgtgggтatctgta

图7B

Aattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctag  
acctttgtgtgtttttttgtttatattcaagtgggtataattttatagaataaagaagaataa  
aaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactacttttagtcagttccgcagt  
attacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaagg  
cttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattccttttgtctccgaccatcag  
gcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgat  
gggggtaaatggcactacaggcgcttttatggattcatgcaaggaaactaccataatacaag  
aaaagcccgctcacgggcttctcagggcgcttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgact  
ttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtcctgaccacttcggattatcccgatga  
caggtcattcagactggctaatagcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
(SEQ ID NO:7)

图7C

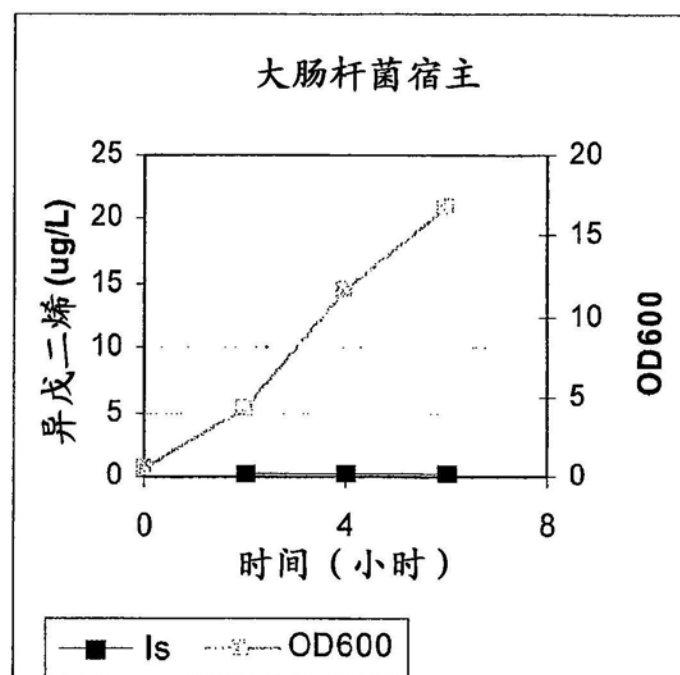


图8A

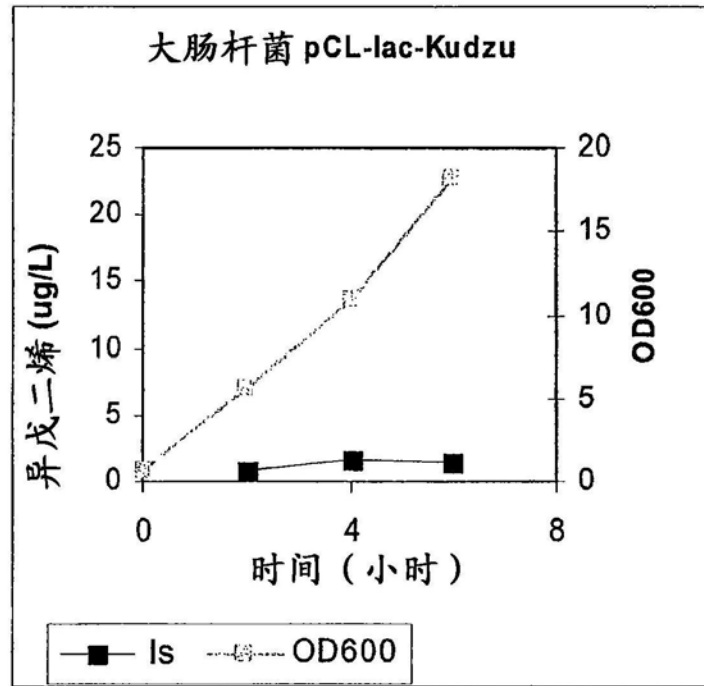


图8B

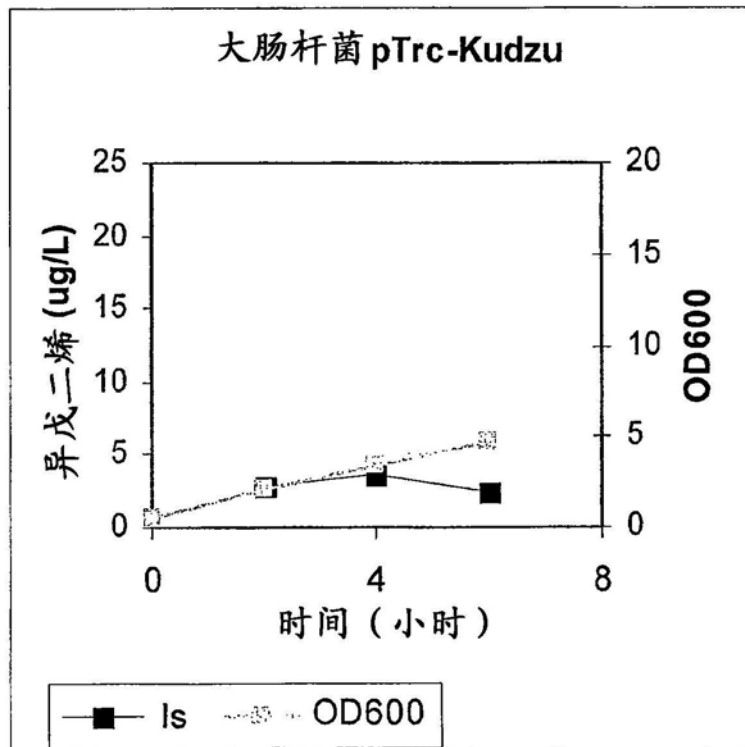


图8C

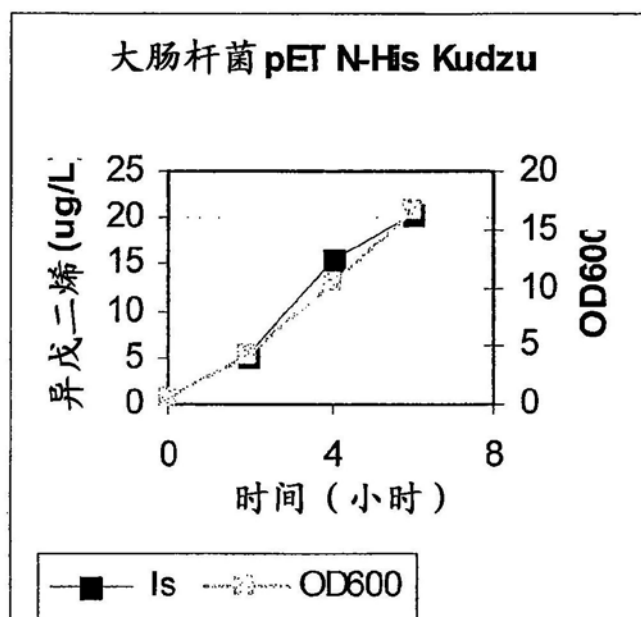
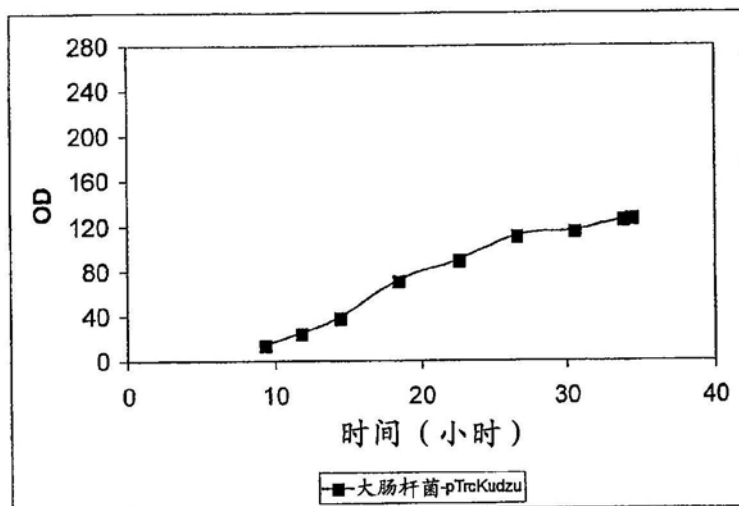


图8D



A.



B.

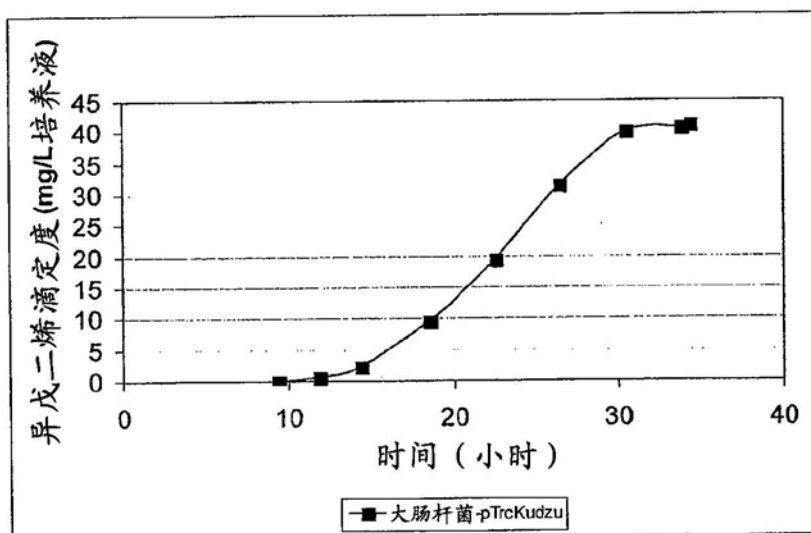


图9

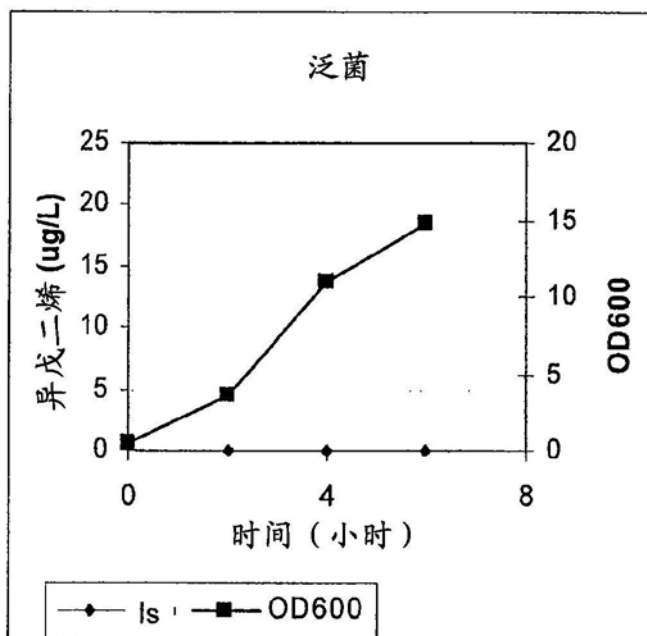


图10A

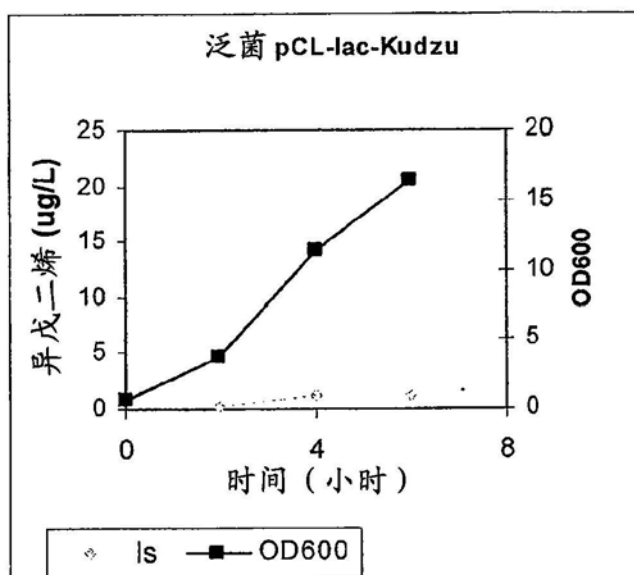


图10B

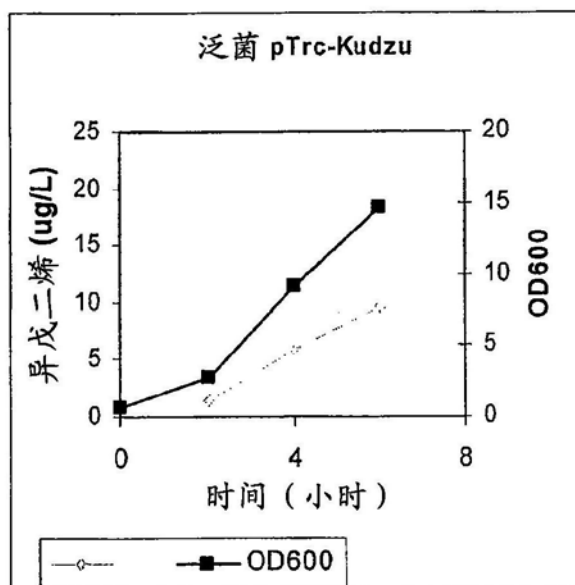


图10C

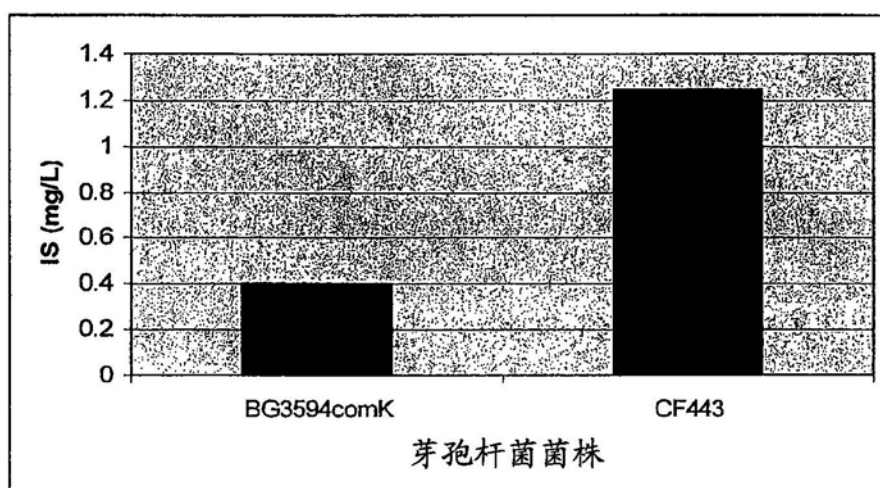


图11

1-

gaattgctccattttcttctgctatcaaaataacagactcgtgattttccaaacgagctttcaa  
aaaagcctctgccccttgcaaactcggtgctgtctataaaattcccgatattgggttaaacagc  
ggcgcaatggcgccgcacatctgatgtcttctgcttggcgaaatgttcacatcttattttcttccct  
ctcaataattttttcattctatcccttttctgtaaagtttatttttcagaatacttttatcatc  
atgctttgaaaaaatatcacgataatatccattgttctcacggaagcacacgcaggtcatttga  
acgaattttttcgacaggaatttgccgggactcaggagcatttaacctaaaaaagcatgacatt  
tcagcataatgaacatttactcatgtctattttcggttcttttctgtatgaaaatagttatttcg  
agtctctacggaaatagcgagagatgatataacctaaatagagataaaatcatctcaaaaaaatg  
ggtctactaaaatattattccatctattacaataaattcacagaatagtcttttaagtaagtct  
actctgaatttttttaaaaggagagggttaaagagtgtgtgcgacctcttctcaatttactcaga  
ttaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaattttcgaattcct  
gcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaacctggaggaa  
gaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacaccagccgctgtccctgctggagctgatcgacg  
atgtgcagcgccctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacat  
cgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgt  
ctgctgcgtcagcacggtttcgagggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaag  
gtggtttcagcgggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtctta  
cctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgctaccttttccatcacccacctgaag  
aacaacctgaaagaaggcatttaataccaagggtgcagaacaagtgagccacgcctggaactgc  
catatcaccagcgtctgcacctctggaggcacgttggttccctggataaaatcgaaccgaaaga  
accgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagaccctgcac  
cagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaacctggatt  
ttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcaactgggtatggcgccagaccgcagtt  
tggtgaatgtcgaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtat  
gacgtttatggcaactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgtta  
acgtatattaacacctgcccgaactatatgaaactgtgtttcctggcaactgtacaacacctgtaa  
cgacacgtcctatttctatttctgaaagagaaagggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagc  
tggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggccaacaacaaaattatcccg  
ctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtc  
ttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgac  
ttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctg  
cggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatgg  
taccagcgaggaacaggcccggaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatg  
aatcgtgaacgcgttagcgactccacctgctgcctaaagcgttcattggaaatcgagttaaca  
tggaacgtgtttcccaactgcacctaccagtatggcgatgggtctgggtcgcccagactacgcgac  
tgaaaacccgcatcaaacgtgctgctgattgacctttcccgatttaaccagctgatgtatgtctaa  
aaaaaacccgccttggtccccgcgggtttttattatttttcttccctccgcatgttcaatccgct  
ccataatcgacggatggctccctctgaaaattttaacgagaaacggcggttgaccggctcag  
tcccgtaacggccaagtccctgaaacgtctcaatcgccgttcccggtttccggctcagctcaatg  
ccgtaacggctcggcggcgttttccctgataccgggagacggcattcgtaatcgatcctctagag  
tcgacctgcaggcatgcaagctttgcctcgcgcttccggtgatgacgggtgaaaacctctgaca  
catgcagctcccgagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagccgt  
cagggcgctcagcgggtgttggcgggtgtcgggcgagccatgaccagtcacgtagcgata

图12A

g c g g a g t g t a t a c t g g c t t a a c t a t g c g g c a t c a g a g c a g a t t g t a c t g a g a g t g c c a c c a t a t g  
c g g t g t g a a a t a c c g c a c a g a t g c g t a g g g a g a a a t a c c g c a t c a g g c g a g c t t c c g c t t c c t  
c g c t c a c t g a c t c g c t g c g c t c g g t c g t t c g g c t g c g g c g a g c g g t a t c a g c t c a c t c a a a g g c  
g g t a a t a c g g t t a t c c a c a g a a t c a g g g g a t a a c g c a g g a a a g a a c a t g t g a g c a a a a g g c c a g  
c a a a a g g c c a g g a a c c g t a a a a a g g c c g c g t t g c t g g c g t t t t t c c a t a g g c t c c g c c c c c c t g  
a c g a g c a t c a c a a a a t c g a c g e t c a a g t c a g a g g t g g c g a a a c c c g a c a g g a c t a t a a a g a t a  
c c a g g c g t t t c c c c c t g g a a g c t c c c t c g t g c g c t c t c c t g t t c c g a c c c t g c c g t t a c c g g a  
t a c c t g t c c g c c t t t t c t c c c t t c g g g a a g c g t g g c g c t t t t c t c a a t g c t c a c g c t g t a g g t a t  
t c a g t t c g g t g t a g g t c g t t c g c t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a a c c c c c c g t t c a g c c c g a  
c c g c t g c g c c t t a t c c g g t a a c t a t c g t c t t g a g t c c a a c c c g g t a a g a c a c g a c t t a t c g c c a  
c t g g c a g c a g c c a c t g g t a a c a g g a t t a g c a g a g c g a g g t a t g t a g g c g g t g c t a c a g a g t t c t  
t g a a g t g g t g g c c t a a c t a c g g c t a c a c t a g a a g g a c a g t a t t t g g t a t c t g c g c t c t g c t g a a  
g c c a g t t a c c t t c g g a a a a a g a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c a a a c c a c c g c t g g t a g  
g g t g g t t t t t t g t t f g a a g c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a a g g a t c t c a a g a a g a t c c t t  
t g a t c t t t t c t a c g g g g t c t g a c g c t c a g t g g a a c g a a a a c t c a c g t t a a g g g a t t t t g g t c a t  
g a g a t t a t c a a a a a g g a t c g a a g t c g g t t c a g a a a a g a a g g a t a t g g a t c t g g a g c t g t a a t a  
t a a a a a c c t t c t t c a a c t a a c g g g g c a g g t t a g t g a c a t t a g a a a a c c g a c t g t a a a a g t a c a  
g t c g g c a t t a t c t c a t a t t a t a a a a g c c a g t c a t t a g g c c t a t c t g a c a a t t c c t g a a t a g a g t  
t c a t a a a c a a t c c t g c a t g a t a a c c a t c a c a a c a g a a t g a t g t a c c t g t a a a g a t a g c g g t a a  
a t a t a t t g a a t t a c c t t t a t t a a t g a a t t t t c c t g c t g t a a t a a t g g g t a g a a g g t a a t t a c t a  
t t a t t a t t g a t a t t t a a g t t a a a c c c a g t a a a t g a a g t c c a t g g a a t a a t a g a a g a g a a a a a g  
c a t t t t c a g g t a t a g g t g t t t t g g g a a c a a t t t a a a g a a c c a t t a t a t t t t c t c a c a t c a g a  
a a g g t a t a a a t c a t a a a a c t c t t t g a a g t c a t t c t t t a c a g g a g t c c a a a t a c c a g a g a a t g t t  
t t a g a t a c a c c a t c a a a a a t t g t a t a a a g t g g c t c t a a c t t a t c c c a a t a a c c t a a c t c t c c g t  
c g c t a t t g t a a c c a g t t c t a a a a g c t g t a t t t g a g t t t a t c a c c c t t g t c a c t a a g a a a a t a a a  
t g c a g g g t a a a a t t t a t a t c c t t c t t g t t t t a t g t t c g g t a t a a a c a c t a a t a t c a a t t t c t  
g t g g t t a t a c t a a a a g t c g t t t g t t g g t t c a a a t a a t g a t t a a a t a t c t c t t t t c t c t t c c a a t  
t g t c t a a a t c a a t t t t a t t a a a g t t c a t t t g a t a t g c c t c c t a a a t t t t t a t c t a a a g t g a a t t  
t a g g a g g c t t a c t t g t c t g c t t t c t t c a t t a g a a t c a a t c c t t t t t a a a g t c a a t a t t a c t g t  
a a c a t a a a t a t a t a t t t t a a a a t a t c c c a c t t t a t c c a a t t t t c g t t t g t t g a a c t a a t g g g t  
g c t t t a g t t g a a g a a t a a a g a c c a c a t t a a a a a t g t g g t c t t t t g t g t t t t t t a a a g g a t t  
g a g c g t a c g c g a a a a a t c c t t t t c t t t c t t t a t c t t g a t a a t a a g g g t a a c t a t t g c c g g t  
t g t c c a t t c a t g g c t g a a c t c t g c t t c c t c t g t t g a c a t g a c a c a c a t c a t c t c a a t a t c c g a a  
t a g g g c c c a t c a g t c t g a c g a c c a a g a g a g c c a t a a a c a c c a a t a g c c t t a a c a t c a t c c c c a t  
a t t t a t c c a a t a t t c g t t c c t t a a t t t c a t g a a c a a t c t t c a t t c t t t c t t c t a g t c a t t a t  
t a t t g g t c c a t t c a c t a t t c t c a t t c c c t t t t c a g a t a a t t t a g a t t t g c t t t t c t a a a t a a g  
a a t a t t t g g a g a g c a c c g t t c t t a t t c a g c t a t t a a t a a c t c g t c t t c c t a a g c a t c c t t c a a t  
c c t t t t a a t a a c a a t t a t a g c a t c t a a t c t t c a c a a a a c t g g c c c g t t t g t t g a a c t a c t c t t  
a a t a a a a t a a t t t t t c c g t t c c c a a t t c c a c a t t g c a a t a a t a g a a a t c c a t c t t c a t c g g c t  
t t t t c g t c a t c a t c t g t a t g a a t c a a a t c g c c t t c t t c t g t g t c a t c a a g g t t a a t t t t t t a t  
g t a t t t c t t t t a a c a a a c c a c c a t a g g a g a t t a a c c t t t t a c g g t g t a a a c c t t c c t c c a a a t c  
a g a c a a a c g t t t c a a a t t c t t t t c t t c a t c a t c g g t c a t a a a a t c g t a t c c t t t a c a g g a t a t  
t t t g c a g t t t c g t c a a t t g c c g a t t g t a t a t c c g a t t t a t a t t t a t t t t t t c g g t c g a a t c a t t  
g a a c t t t t a c a t t t g g a t c a t a g t c t a a t t t c a t t g c c t t t t t c c a a a a t t g a a t c c a t t g t t

图12B

ttgattcacgtagtttttctgttatttctaaaataagttgggtccacacataccattacatgcatg  
tgctgattataagaattatctttatttatttattgtcacatccgttgacgcataaaaccaacaa  
gatttttattaattttttttatattgcatcattcggcgaaatccttgagccatatctgtcaaact  
cttatttaattcttcgccatcataaacatttttaactgttaatgtgagaaacaaccaacgaact  
gttggtctttgttttaataacttcagcaacaaccttttgtgactgaatgccatgtttcattgctc  
tcctccagttgcacattggacaaaagcctggatttgcaaaaccacactcgataccacttttctttc  
gcctgtttcacgattttgtttatactctaataatttcagcacaaatcttttactctttcagccttt  
ttaaattcaagaatatgcagaagttcaaagtaataacattagcgattttcttttctctccatg  
gtctcacttttccactttttgtcttgtccactaaaacccttgatttttcatctgaataaatgct  
actattaggacacataatattaaaagaaacccccatctatttagttatttgttttagtcacttat  
aactttaacagatgggggtttttctgtgcaaccaatttttaagggttttcaatactttaaaacaca  
tacataccaacacttcaacgcacctttcagcaactaaaataaaaatgacgttatttctatatgt  
atcaagataagaagaacaagttcaaaacctcaaaaaaagacaccttttcaggtgcttttttt  
attttataaactcattccctgatctcagacttcgttctttttttacctctcggttatgagttagt  
tcaaattcgttcttttttaggttctaaatcggtgtttttcttggaattgtgctgttttatccttta  
ccttgtctacaaaccccttaaaaacgtttttaagggttttaagccgtctgtacgttccttaag

(SEQ ID NO:57)

图12C

ATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTTACTCAGATTACCGAGCATAATTCTCGACGATCTGCTAACT  
ACCAGCCGAACCTTTGGAACCTTTGAGTTTCTCCAGTCTCTCGAAAATGACCTGAAGGTGGAAAA  
GCTCGAGGAGAAGGCGACCAAACCTCGAGGAGGAGGTGCGATGTATGATCAACAGAGTTGACACC  
CAACCCCTGTCTTTGCTGGAGCTGATCGACGATGTGCAGCGGTTGGGTTTGACTTATAAATTCG  
AGAAGGACATTATCAAGGCACTGGAGAACATTGTGCTCCTCGACGAGAACAAGAACAAGTC  
TGATCTTCACGCTACCGCTCTCTCTTTCCGACTTCTTCGACAACACGGCTTCGAGGTGTCGCAG  
GACGTCTTCGAGAGATTTAAGGACAAGGAGGGAGGATTTAGCGGCGAGCTGAAGGGAGACGTTT  
AGGGTCTTCTCTCCTTGACGAGGCGTCTACCTGGGATTTCGAGGGAGAGAACCTCCTGGAGGA  
AGCTCGTACATTTTCCATCACTCACCTTAAGAATAACCTTAAGGAGGGAATTAACACCAAGGTG  
GCCGAGCAGGTTTCTCACGCCCTGGAGCTCCCCTACCACCAACGGCTCCATAGACTGGAGGCTC  
GTTGGTTTCTGGACAAATATGAGCCAAAGGAGCCTCATCATCAGTTGCTGTTGGAGTTGGCCAA  
GCTGGACTTCAATATGGTTTCAGACGCTGCACCAAAGGAGTTGCAGGACCTGTCTCGATGGTGG  
ACCGAGATGGGATTGGCCTCGAAGCTGGATTTTGTCCGTGACCGACTTATGGAGGTCTATTTTT  
GGGCCCTTGGAAATGGCGCCTGACCCCAAGTTTCGGAGAGTGCCGGAAGGCGGTGACGAAGATGTT  
CGGTCTTGTGACTATCATCGACGACGTCTACGATGTCTACGGCACACTCGACGAGTTGCAGCTG  
TTCAGTGACGCCGTGAGCGATGGGATGTGAACGCCATTAATACTCTCCCTGACTATATGAAGC  
TGTGCTTCTGGCTCTGTACAACACTGTCAACGATACCTCGTACTCTATCCTCAAGGAGAAGGG  
ACACAACAATCTCTCCTACTTGACCAAATCCTGGCGAGAACTGTGCAAGGCTTTTCTGCAGGAG  
GCTAAATGGTCCAAATAACAAGATCATTCTGCTTTTTCTAAATACCTGGAAAATGCCTCGGTGT  
CGAGCTCTGGCGTCGCCCTTCTGGCCCCCTTCTACTTCTCCGTCTGCCAGCAGCAGGAGGATAT  
TTCCGATCATGCTCTTAGATCGCTGACCGATTTTCACGGCCTCGTGCGATCTTCTGCGTGATT  
TTTCGGTTGTGTAATGACCTTGCGACCTCTGCTGCTGAGCTGGAACGAGGCGAGACTACAAATT  
CCATTATTTCTTACATGCACGAAAACGATGGAACATCTGAAGAACAGGCTAGAGAGGAACTGCG  
AAAGTTGATCGACGCCGAGTGGAAGAAGATGAACAGAGAGCGGGTGTCCGACTCTACCCTGCTT  
CCCAAGGCCTTCATGGAGATCGCCGTGAACATGGCTCGAGTTTCCCATTGTACTTACCAGTACG  
GTGACGGCCTGGGTGCTCCGGACTACGCTACAGAGAACCGAATCAAGCTGCTGCTCATCGACCC  
CTTCCCTATCAACCAATTGATGTACGTGTAA

(SEQ ID NO:8)

图13

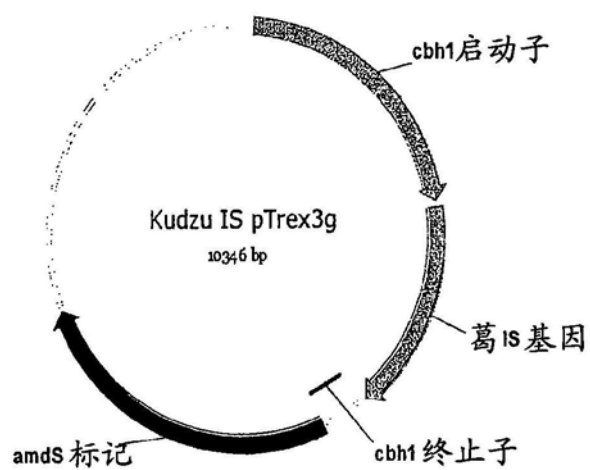


图14

```
1 TCGACCGGTG AGAAGAACAG CATCGGGACA AGGGAAGGAA GAACAAAGAC AAAGAAAACA
61 AAAGAAAGCA ATTGAAAACA AAACAAAACA ATTTTCATTC CTTCTCTTAT CATTCCTTTT
121 CTTTTCTTTT CTCTCATTCA ACGCACTCCA TCGTATCCGT ATTCCTCTTA TTTTTCTCT
181 TTCTCTATAT CCATTTCTTT CTCTCTAGGT GTGTCCTCTC TCTCTCTTCA ATTTCTCTAC
241 TCCGCATTCC AACGCATCCT TCCCCAACCC TCCCATTTCC TCCTTACGGC CCGATAGCGA
301 TCGTCTTTCC CTCGCTATCA CTCGCTACCG GCCCTCCTC TGCACCGTAA CCTCCTACGT
361 ATTTACCATA TCATAAAGTT TTTTCCGACG CTTATCGCTG ACCCCCTGTC GCCCTCCTAT
421 TGGCTTCCGG ATTATCTTCT TGTCCATAAG GTGATCCATG CTTCTCTGAAG ATTCCCGAAA
481 TGTGTCCACT TTGGCGGGGA ATCATTCCAT CCACTTCTTT CTCTCTCGCT TTCTCTATTC
541 GCGCTCCCCC TTCGCGTCTT CATTGGTCTT CCGCTCCGTT TTTGCTTTGC CGATGTACTT
601 TGGGAGAGAG TGGGATAATC CTTTCGCAAA AACTCGGTTT GACGCTCCC ATGGTATAAA
661 TAGTGGGTGG TGGACAGGTG CCTTCGCTTT TCTTTAAGCA AGAGAATCCC ATTGTCTTGA
721 CTATCACGAA TTCACATACA TTATGAAGAT CACCGCTGTC ATTGCCCTTT TATTCTCACT
781 TGCTGCTGCC TCACCTATTC CAGTTGCCGA TCCTGGTGTG GTTTCAGTTA GCAAGTCATA
841 TGCTGATTTT CTTCTGTGTT ACCAAAGTTG GAACACTTTT GCTAATCCTG ATAGACCCAA
901 CCTTAAGAAG AGAAATGATA CACCTGCAAG TGGATATCAA GTTGAAAAAG TCGTAATTTT
961 GTCACGTAC GGTGTTAGGG CCCCTACAAA AATGACTCAA ACCATGCGTG ATGTCACTCC
1021 TAATACATGG CCAGAATGGC CCGTTAAATT AGGATATATT ACACCAAGAG GTGAACACTT
1081 GATATCACTT ATGGGCGGTT TTTACCGTCA AAAATTCCAG CAACAAGGAA TCCTTTCTCA
1141 GGGCTCCTGT CCTACTCCTA ACTCCATATA TGTCTGGGCT GACGTCGATC AGCGTACTTT
1201 AAAAAGTGGT GAAGCATTCC TTGCTGGTTT GGCACCACAA TGTGGCTTGA CAATTCATCA
1261 CCAACAAAT CTGAGAAAG CTGATCCTCT TTTTCATCCC GTTAAAGCTG GAACCTGCTC
1321 TATGGATAAA ACTCAAGTTC AACAAAGCTG TGAGAAGGAG GCACAACTC CTATAGATAA
1381 TTTGGAATCAA CATTACATCC CCTTTTACG TTTAATGAAT ACAACATTAA ATTTTAGTAC
1441 TTCTGCCTGG TGCCAAAAAC ACTCTGCTGA TAAATCCTGT GACCTAGGTT TATCCATGCC
1501 TTCTAAATTG TCCATAAAAG ATAATGGTAA CAAGGTCGCA TTGGATGGAG CTATTGGTCT
1561 ATCCTCTACT TTGGCCGAGA TTTTCTTCT TGAATATGCT CAAGGCATGC CTCAGCTGC
1621 TTGGGGTAAC ATCCACTCAG AGCAAGAGTG GGCTTCCTTG CTAAAGTTGC ATAATGTCA
1681 ATTCGATTTG ATGGCCCGAA CACCTTATAT TGCTCGACAT AACGGTACTC CTTTATTGCA
1741 AGCTATATCA AATGCCCTTA ATCCCAACGC CACTGAATCA AAATCTCCAG ATATTTCACC
1801 TGATAACAAA ATATTGTTCA TTGCAGGTCA TGACACAAAT ATTGCTAATA TAGCCGGCAT
1861 GTTAAATATG CGTTGGACAT TACCAGGTCA ACCAGATAAT ACTCCTCCAG GTGGTGCCCT
1921 AGTATTTGAA CGTCTTGCTG ATAAAAGTGG AAAACAATAT GTTCTGTAT CTATGGTTTA
1981 TCAAACACTA GAACAACTTC GATCACAGAC TCCCCTTTCT CTAAATCAGC CTGCCGATC
2041 TGTTCAACTT AAAATTCCAG GTTGCAATGA TCAAACAGCC GAGGGTTACT GTCCTCTTTC
2101 CACTTTTACA AGAGTTGTTT CCCAATCTGT TGAACCTGGA TGCCAACTTC AATAATGAGG
2161 ATCCAAGTAA GGAATGAGA ATGTGATCCA CTTTAAATTC CTAATGAATA CATGCCTATA
2221 GTTCTTTTCT TTTGTTCTTT ATGTCGTTT TCGATGGTAC GGCCGTTGTC AATCTCAGTT
2281 TGTGTGCTTG GTTGCAGCTT GGTTCCAAAT CTGTTTCTCT CATGAATCTT TTACCATTTC
2341 ACCACACGTT TATACCATT TCTCATAGAA TCTTCATCAA ACCATCTCGG GGTTAGAGTG
2401 GAAAGAAAGT CTTGTTCTTT TATTTCCTTT TTTCCATCTT CAAGGCTTTT CTTTTCTTCC
2461 TCCTCCTCGT TCATCTTGAG GTTTGACGTG TCTGTTTGA ATTTTGAGCT GTTGCAGCAT
2521 CTTATTTTTT GTTTTGCAG AACGAAGCGC TTTACTCTCT TCATCAGTTG GACGATTGTA
2581 CCTTTGAAAA CCAACTACTT TTGCATGTT TGTATAGAAA TCAATGATAT TAGAATCCCA
2641 TCCTTTAATT TCTTTCAAAG TAGTTGAGCT ATAGTTAAGT GTAAGGGCCC TACTGCGAAA
2701 GCATTTGCCA AGGATGTTTT CATTAATCAA GAACGAAAGT TAGGGGATCG AAGACGATCA
2761 GATACCGTCG TAGTCTTAAC CATAAACTAT GCCGACTAGG GATCGGGCAA TGTTCATTT
2821 ATCGACTTGC TCGGCACCTT ACGAGAAATC AAAGTCTTTG GGTTCCGGGG GGAGTATGGT
2881 CGCAAGGCTG AAACCTAAAG GAATTGACGG AAGGGCACCA CAATGGAGTG GAGCCTGCGG
2941 CTTAATTTGA CTCAACACGG GGAACCTCAC CAGGTCCAGA CATAGTAAGG ATTGACAGAT
3001 TGAGAGCTCT TTCTTGATTC TATGGGTGGT GGTGCATGGC CGTTCTTAGT TGGTGGAGTG
3061 ATTTGTCTGC TTAATTGCGA TAACGAACGA GACCTTAACC TGCTAAATAG CTGGATCAGC
3121 CATTTTGGCT GATCATTAGC TTCTTAGAGG GACTATTGGC ATAAAGCCAA TGGAGTTTG
3181 AGGCAATAAC AGGTCTGTGA TGCCCTTAGA TGTCTGGGC CGCACGCGCG CTACACTGAC
3241 GGAGCCAACG AGTTGAAAAA AATCTTTTGA TTTTATATCC TTGGCCGGAA GGTCTGGGTA
3301 ATCTTGTATA ACTCCGTCGT GCTGGGGATA GAGCATTGCA ATTATTGCGG CCGCTCCTCA
3361 ATTCGATGTT GCAGATTTTA CAAGTTTTTA AAATGTATTT CATTATTACT TTTTATATGC
3421 CTAATAAAAA AGCCATAGTT TAATCTATAG ATAACTTTTT TTCCAGTGCA CTAACGGACG
```

图15A



3481 TTACATTCCC ATACAAAAC TCGTAGTTAA AGCTAAGGAA AAGTTAATAT CATGTTAATT  
3541 AAATACGCTA TTTACAATAA GACATTGAAC TCATTTATAT CGTTGAATAT GAATAACCAA  
3601 TTTCAGCGAA TTTTAAACAA ACATCGTTCA CCTCGTTTAA GGATATCTTG TGTATGGGGT  
3661 GTTGACTTGC TTTATCGAAT AATTACCGTA CCTGTAATTG GCTTGCTGGA TATAGCGGTA  
3721 GTCTAATATC TAGCAAAAAT CTTTGGGTG AAAAGGCTTG CAATTTCACG ACACCGAACT  
3781 A'TTTGTCATT TTTTAATAAG GAAGTTTTCC ATAAATTCCT GTAATTCTCG GTTGATCTAA  
3841 TTGAAAAGAG TAGTTTTGCA TCACGATGAG GAGGGCTTTT GTAGAAAGAA ATACCAACGA  
3901 AACGAAAATC AGCGTTGCCA TCGCTTTGGA CAAAGCTCCC TTACCTGAAG AGTCGAATTT  
3961 TATTGATGAA CTTATAACTT CCAAGCATGC AAACCAAAG GGAGAACAAG TAATCCAAGT  
4021 AGACACGGGA ATTGGATTCT TGGATCACAT GTATCATGCA CTGGCTAAAC ATGCAGGCTG  
4081 GAGCTTACGA CTTTACTCAA GAGGTGATTT AATCATCGAT GATCATCACA CTGCAGAAGA  
4141 TACTGCTATT GCACTTGGTA TTGCATTCAA GCAGGCTATG GGTAACCTTG CCGGCGTTAA  
4201 AAGATTTGGA CATGCTTAT GTCCACTTGA CGAAGCTCTT TCTAGAAGCG TAGTTGACTT  
4261 GTCGGGACGG CCCTATGCTG TTATCGATT GGGATTAAAG CGTGAAGAGG TTGGGGAATT  
4321 GTCTGTGAA ATGATCCCTC ACTTACTATA TTCCTTTTCG GTAGCAGCTG GAATTACTTT  
4381 GCATGTTACC TGCTTATATG GTAGTAATGA CCATCATCGT GCTGAAAGCG CTTTTAAATC  
4441 TCTGGCTGTT GCCATGCGCG CGGCTACTAG TCTTACTGGA AGTTCTGAAG TCCCAAGCAC  
4501 GAAGGGAGTG TTGTAAAGAT GAAT'GGATT ATGTCAGGAA AAGAACGACA ATTTTGCATC  
4561 CAAATTGTCT AAATTTTAGA GTTGCTTGAA AACAATAGAA CCTTACTTGC TTTATAATTA  
4621 CGTTAATTAG AAGCGTTATC TCGTGAAGGA ATATAGTACG TAGCCGTATA AATTGAATTG  
4681 AATGTTTCAGC TTATAGAATA GAGACACTTT GCTGTTCAAT GCGTCGTCAC TTACCATACT  
4741 CACTTTATTA TACGACTTTA AGTATAAACT CCGCGGTTAT GGTAAGAAATTA ATGATGCACA  
4801 AACGTCCGAT TCCATATGGG TACACTACAA TTAATACTT TTAAGCTGAT CCCCCACACA  
4861 CCATAGCTTC AAAATGTTTC TACTCCTTTT TTA'CTCTTC AGATTTTCTC GGACTCCGGC  
4921 CATCGCCGTA CCACTTCAAA ACACCAAGC ACAGCATACT AAATTTTCCC TCTTCTCTCC  
4981 TCTAGGGTGT CGTTAATTAC CCGTACTAAA GGT'TTGGAAG AGAAAAAGA GACCGCCTCG  
5041 TTTCTTTTTC TTCGTCGAAA AAGGCAATAA AAATTTTAT CACGTTTCTT TTTCTTGAAA  
5101 TCTTTT'TTT TAGT'TTTTTC CTCTTTCAGT GACCTCCATT GATATTAAAG TTAATAAACG  
5161 GTCTTCAATT TCTCAAGTTT CAGTTTCATT TTTCTTGTTT TATTACAAC TTTTTTACTT  
5221 CTTGTTCAAT AGAAAGAAAG CATAGCAATC TAATCTAAGG GCGGTGTTGA CAATTAAATCA  
5281 TCGGCATAGT ATATCGGCAT AGTATAATAC GACAAGGTGA GGAAC'ATAAC CATGGCCAAG  
5341 TTGACCAGTG CCGTTCGGT GCTCACC'CG CGCGACGTC CCGGAGCGGT CGAGTTCTGG  
5401 ACCGACCGGC TCGGTTTCTC CCGGACTTCC GTGGAGGACG ACTTCGCCGG TGTGGTCCGG  
5461 GACGACGTGA CCCTGTTTAT CAGCGCGGTC CAGGACCAGG TGGTGCCGGA CAACACCCTG  
5521 GCCTGGGTGT GGTGCGCGCG CCTGGACGAG CTGTACGCGG AGTGGTCGGA GGTGCTGTCC  
5581 ACGAACTTCC GGGACGCTC CCGGCGCGGC ATGACCGAGA TCGGCGAGCA GCCGTGGGGG  
5641 CCGGAGTTTC CCTGCGCGCA CCGGCGCGGC AACTGCGTGC ACTTCGTGGC CGAGGAGCAG  
5701 GACTGACACG TCCGACGGCG GCCACGGGT CCCAGGCCTC GGAGATCCGT CCCCCTTTTC  
5761 CTTTGTCGAT ATCATGTAAT TAGTTATGTC ACGCTTACAT TCACGCGCTC CCCCACATC  
5821 CGCTCTAACC GAAAAGGAAG GAGTTAGACA ACCTGAAGTC TAGGTCCCTA TTTATTTTTT  
5881 TATAGTTATG TTAGTATTAA GAACGTATT TATATTTCAA ATTTTCTTT TTTTCTGTA  
5941 CAGACGCGAG CTTCCAGTA AATGTGCCAT CTCGTAGGCA GAAAACGGTT CCCCCTAGG  
6001 GTCTCTCTCT TGGCCTCCTT TCTAGGTCGG GCTGATTGCT CTTGAAGCTC TCTAGGGGGG  
6061 CTCACACCAT AGGCAGATAA CGTTCCCCAC CGGCTCGCCT CGTAAGCGCA CAAGGACTGC  
6121 TCCCAAAGAT CCTAGGCGGG ATTTTGCCGA TTTCGGCCTA AAGGAACCGG AACACGTAGA  
6181 AAGCCAGTCC GCAGAAACGG TGCTGACCCC GGATGAATGT CAGCTACTGG GCTATCTGGA  
6241 CAAGGGAAAA CGCAAGCGCA AAGAGAAAGC AGGTAGCTTG CAGTGGGCTT ACATGGCGAT  
6301 AGCTAGACTG GCGGTTTTTA TGGACAGCAA GCGAACCGGA ATTGCCAGCT GGGGCGCCCT  
6361 CTGGTAAGGT TGGGAAGCCC TGCAAAGTAA ACTGGATGGC TTTCTTGCCG CCAAGGATCT  
6421 GATGGCGCAG GGGATCAAGA TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTTT CGCATGATTG  
6481 AACAAGATGG ATTGCACGCA GGTCTCCGG CCGCTTGGGT GGAGAGGCTA TTCGGCTATG  
6541 ACTGGGCACA ACAGACAATC GGCTGCTCTG ATGCCGCGGT GTTCCGGCTG TCAGCGCAGG  
6601 GCGGCGCGGT TCTTTTGTG AAGACCGACC TGTCGGGTGC CCTGAATGAA CTGCAGGACG  
6661 AGGACGCGCG GCTATCGTGG CTGGCCACGA CCGGCGTTCC TTGCGCAGCT GTGCTCGACG  
6721 TTGTCACTGA AGCGGGAAG GACTGGCTGC TATTGGGCGA AGTGCCGGG CAGGATCTCC  
6781 TGTCATCTCG CTTGCTCCT GCCAGAAAG TATCCATCAT GGCTGATGCA ATGCGGCGGC  
6841 TGCATACGCT TGATCCGGCT ACCTGCCCAT TCGACCACCA AGCGAAACAT CGCATCGAGC  
6901 GAGCACGTAC TCGGATGGAA GCCGCTCTTG TCGATCAGGA TGATCTGGAC GAAGAGCATC  
6961 AGGGGCTCGC GCCAGCCGAA CTGTTCCGCA GGCTCAAGGC GCGCATGCCC GACGGCGAGG

图15B

```

7021 ATCTCGTCGT GATCCATGGC GATGCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATGGCCGCT
7081 TTTCTGGATT CAACGACTGT GGCCGGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT
7141 TGGATACCCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG GCGGCGAATG GGCTGACCGC TTCTCTGTGC
7201 TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTCGCAGC GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTGACGAGT
7261 TCTTCTGAAT TGA AAAAGGT ACCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAACT
7321 TCATTTTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA TGACCAAAT
7381 CCCTAACGT GAGTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAGA TCAAAGGATC
7441 TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGCGCGTAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT
7501 ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAACCTG
7561 CTTACAGAGA GCGCAGATAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA
7621 CTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC
7681 TGCTGCCAGT GCGGATAAGT CGTGCTTAC CGGGTTGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA
7741 TAAGGCGCAG CGGTCGGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA CAGCCAGCT TGGAGCGAAC
7801 GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA
7861 AGGGAGAAAG GCGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG
7921 GGAGCTTCCA GGGGGAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT GTCGGGTTTC GCCACCTCTG
7981 ACTTGAGCGT CGATTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGCGG AGCCTATGGA AAAACGCCAG
8041 CAACGCGGCC TTTTACGGT TCCTGGCCTT TTGCTGGCCT TTTGCTCACA TGTTCTTTCC
8101 TCGGTTATCC CCTGATTCTG TGGATAACCG TATTACCGCC TTTGAGTGAG CTGATACCGC
8161 TCGCCGCAGC CGAACGACCG AGCGCAGCGA G

```

(SEQ ID NO:11)

图15C

```

1 GAATTCAAAA CAAAATGTGT GCAACCTCCT CCCAGTTTAC TCAGATTACC GAGCATAATT
61 CTCGACGATC TGCTAACTAC CAGCCGAACC TTTGGAAGTT TGAGTTTCTC CAGTCTCTCG
121 AAAATGACCT GAAGGTGGAA AAGCTCGAGG AGAAGCGCAC CAAACTCGAG GAGGAGTGTC
181 GATGTATGAT CAACAGAGTT GACACCCAAC CCCTGTCTTT GCTGGAGCTG ATCGACGATG
241 TGAGCGGTT GGGTTTGAAT TATAAATTCG AGAAGGACAT TATCAAGGCA CTGGAGAAC
301 TTGTGCTCCT CGACGAGAAC AAGAAGAACA AGTCTGATCT TCACGCTACC GCTCTCTCTT
361 TCCGACTTCT TCGACAACAC GGCTTCGAGG TGTGCGAGGA CGTCTTCGAG AGATTTAAGG
421 ACAAGGAGGG AGGATTTAGC GCGGAGCTGA AGGGAGACGT TCAGGGTCTT CTCTCCTTGT
481 ACGAGGCGTC CTACCTGGGA TTCGAGGGAG AGAACCTCCT GGAGGAAGCT CGTACATTTT
541 CCATCACTCA CCTTAAGAAT AACCTTAAGG AGGGAATTAA CACCAAGGTG GCCGAGCAGG
601 TTTCTCACGC CCTGGAGCTC CCCTACCACC AACGGCTCCA TAGACTGGAG GCTCGTTGGT
661 TCCTGGACAA ATATGAGCCA AAGGAGCCTC ATCATCAGTT GCTGTTGGAG TTGGCCAAGC
721 TGGAATTCAA TATGGTTCAG ACGCTGCACC AAAAGGAGTT GCAGGACCTG TCTCGATGGT
781 GGACCGAGAT GGGATTGGCC TCGAAGCTGG ATTTTGTCCG TGACCGACTT ATGGAGGTCT
841 ATTTTGGGC CCTTGGAAAT GCGCCTGACC CCCAGTTCGG AGAGTGCCGG AAGGCGGTGA
901 CGAAGATGTT CGGTCTTGTG ACTATCATCG ACGAGCTCTA CGATGTCTAC GGCACACTCG
961 ACGAGTTGCA GCTGTTCACT GACGCCGTCG AGCGATGGGA TGTGAACGCC ATTAATACTC
1021 TCCCTGACTA TATGAAGCTG TGCTTCCTGG CTCTGTACAA CACTGTCAAC GATACCTCGT
1081 ACTCTATCCT CAAGGAGAAG GGACACAACA ATCTCTCCTA CTTGACCAA TCCTGGCGAG
1141 AACTGTGCAA GGCTTTTCTG CAGGAGGCTA AATGGTCCAA TAACAAGATC ATTCCTGCTT
1201 TTTCTAAATA CCTGGAAAT GCCTCGGTGT CGAGCTCTGG CGTCGCCCTT CTGGCCCTT
1261 CTTACTTCTC CGTCTGCCAG CAGCAGGAGG ATATTTCGA TCATGCTCTT AGATCGCTGA
1321 CCATTTTCA CGGCTCTGTG CGATCTTCCT GCGTGATTTT TCGGTTGTGT AATGACCTG
1381 CGACCTCTGC TGCTGAGCTG GAACGAGGCG AGACTACAA TTCCATTATT TCTTACATGC
1441 ACGAAAACGA TGAACAATCT GAAGAACAGG CTAGAGAGGA ACTGCGAAAG TTGATCGACG
1501 CCGAGTGGAA GAAGATGAAC AGAGAGCGGG TGTCCGACTC TACCCTGCTT CCCAAGGCCT
1561 TCATGGAGAT CGCCGTGAAC ATGGCTCGAG TTTCCCATTT TACTTACCAG TACGGTGACG
1621 GCCTGSGTCG TCCGACTAC GCTACAGAGA ACCGAATCAA GCTGCTGCTC ATCGACCCCT
1681 TCCCTATCAA CCAATTGATG TACGTGTAAT AGTCTAGAGG ATCC

```

(SEQ ID NO:12)

图16

```
1 GAATTCACCA AAAATGTGCT CTGTTTCCAC TGAGAACGTG TCCTTTACTG AGACTGAGAC
61 TGAAGCACGT AGAAGCGCCA ACTACGAACC CAACTCCTGG GATTATGACT TTCTGCTGTC
121 TTCTGACACC GACGAGTCGA TCGAGGTTTA TAAGGATAAG GCCAAGAAAC TTGAGGCCGA
181 GGTCAGACGA GAGATTAACA ACGAGAAGGC CGAGTTCCTG ACCCTTCTTG AGCTGATCGA
241 CAACGTTCAA CGACTTGGTC TTGGTTACCG TTTCGAATCC GATATCCGAC GTGCATTGGA
301 TCGATTTGTC TCGTCCGGAG GTTTCGATGG TGTGACTAAG ACGTCGCTGC ACGCCACAGC
361 TCTTTCCTTC AGACTGTTGC GGCAGCATGG ATTTGAGGTT TCCCAGGAAG CCTTTTCTGG
421 TTTCAAGGAT CAGAACGGAA ACTTTTGGGA GAATCTCAAG GAGGACACCA AGGCCATCCT
481 GTCGTGTGAT GAGGCCTCGT TCCTGGCTCT TGAGGGCGAG AATATTCTGG ATGAGGCTCG
541 GGTTTTTCGCT ATTTCGCACC TGAAGGAGTT GTCGGAGGAA AAGATCGGAA AGGAACCTGGC
601 CGAGCAGGTC AACCATGCAC TTGAACTTCC CCTGCATCGA CGTACCCAGC GACTGGAGGC
661 CGTGTGGAGC ATCGAGGCGT ACAGAAAAAA GGAGGATGCT AATCAGGTTT TGCTCGAACT
721 CGCTATCCTC GACTATAACA TGATTTCAGAG CGTGTACCAG CGTGACTTGC GAGAGACAAG
781 CCGGTGGTGG CGACGGGTGG GACTGGCCAC GAAGCTCCAC TTTGCTAAAG ATCGATTGAT
841 TGAGTCGTTT TACTGGGCAG TGGGTGTGGC CTTTGAGCCT CAGTACTCCG ACTGCCGAAA
901 CTCCGTTGCA AAGATGTTTT CTTTTGTCAC TATCATCGAC GACATCTACG ATGTTTACGG
961 CACTCTCGAT GAACTCGAAC TCCTCACGGA CGCTGTGCGA CGATGGGATG TGAATGCCAT
1021 TAATGATCTG CCAGATTATA TGAAGTTGTG TTTCTTGGCG CTCTACAACA CAATTAATGA
1081 AATTGCCTAC GACAACCTCA AGGACAAGGG AGAGAACATT CTGCCCTACC TTAATAAGC
1141 CTGGGCCGAC CTGTGTAACG CCTTTTGGCA GGAAGCCAAG TGGCTCTATA ACAAATCTAC
1201 TCCTACATTT GATGACTACT TCGGCAACGC TTGGAAGTCT TCCAGCGGCC CTCTCCAGTT
1261 GATCTTCGCT TACTTTGCAG TGGTCCAGAA CATCAAGAAA GAGGAGATTG AGAACCTCCA
1321 GAAGTATCAC GACATCATCT CCCGACCTTC GCACATCTTT CGACTGTGCA ATGACCTTGC
1381 CTCCGCATCC GCTGAGATTG CCCGAGGAGA AACAGCCAAT TCTGTGTCGT GTTACATGCG
1441 TACAAAGGGC ATCTCCGAGG AGCTGGCTAC CGAGTCTGTG ATGAACCTGA TCGATGAAAC
1501 CTGTAAGAAG ATGAACAAAG AGAAACTGGG CGGTTCTCTG TTCGCCAAAC CATTTGTGTA
1561 AACCGCGATC AATCTGGCTC GTCAGTCTCA TTGTACTTAC CATAACGGTG ACGCGCACAC
1621 TTCGCCGGAC GAATTGACCC GTAAGCGTGT GCTTTCGGTG ATTACCGAGC CGATCCTGCC
1681 GTTCGAAGA TAATAGGATC C
(SEQ ID NO:13)
```

图17



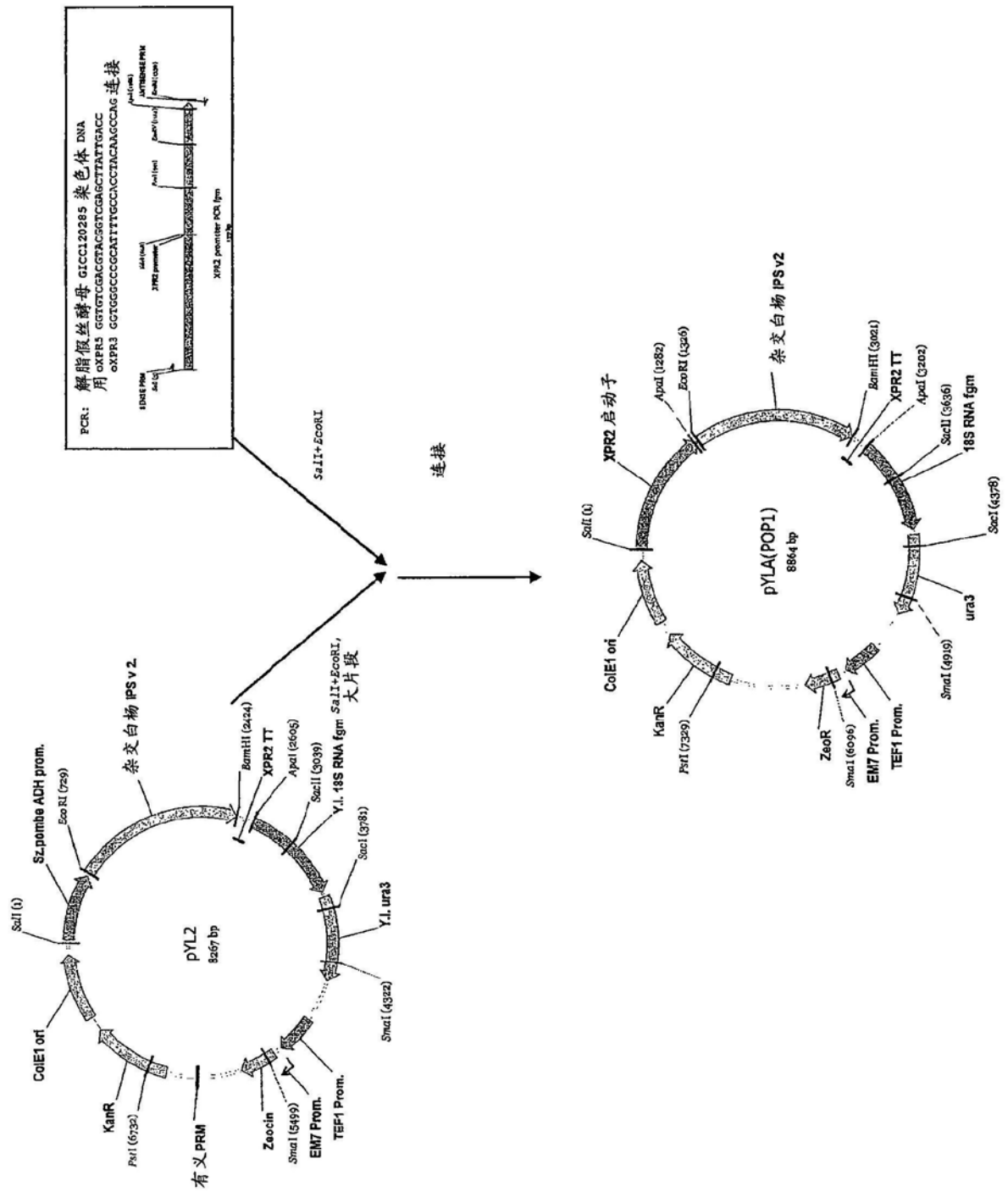


图18B





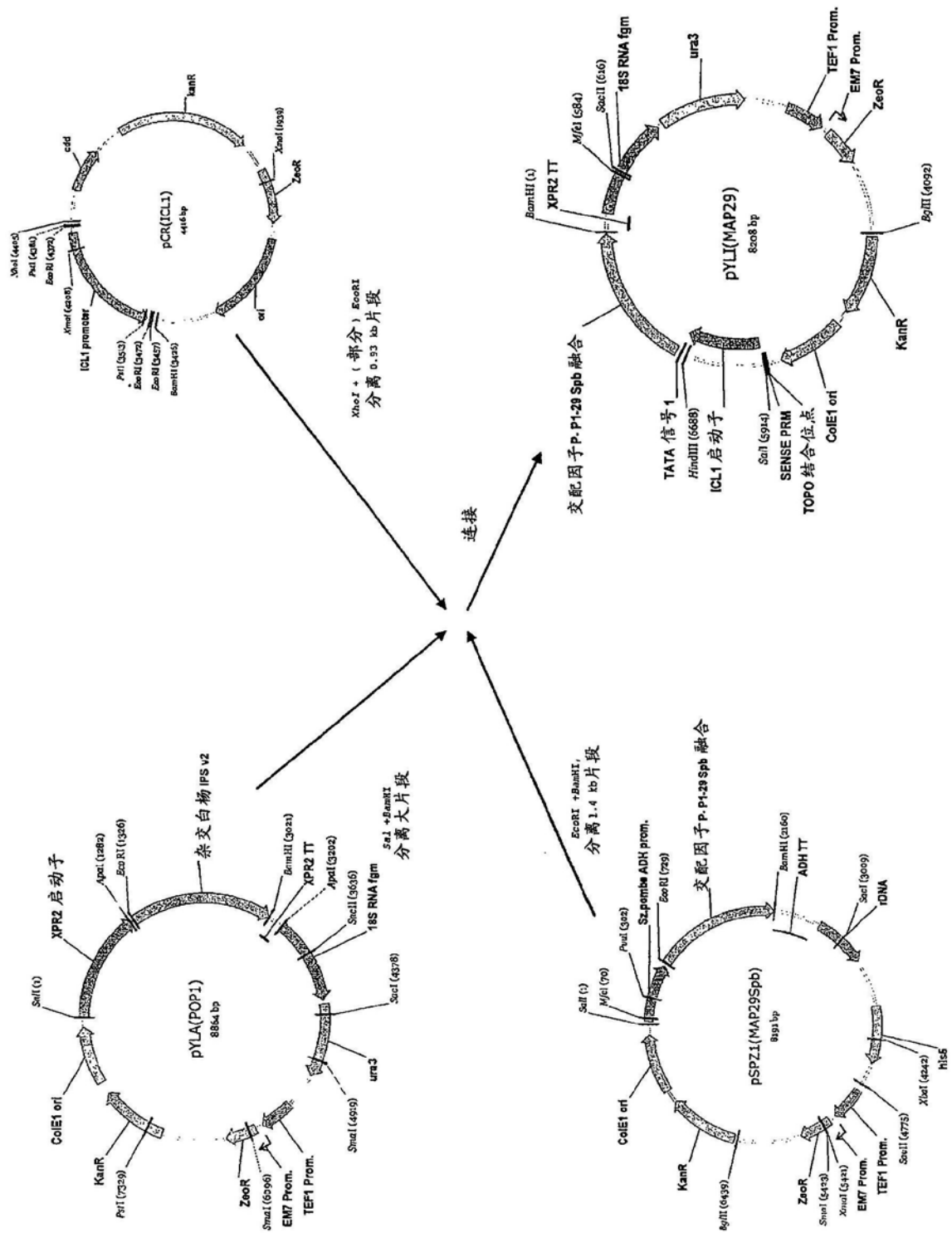


图18E







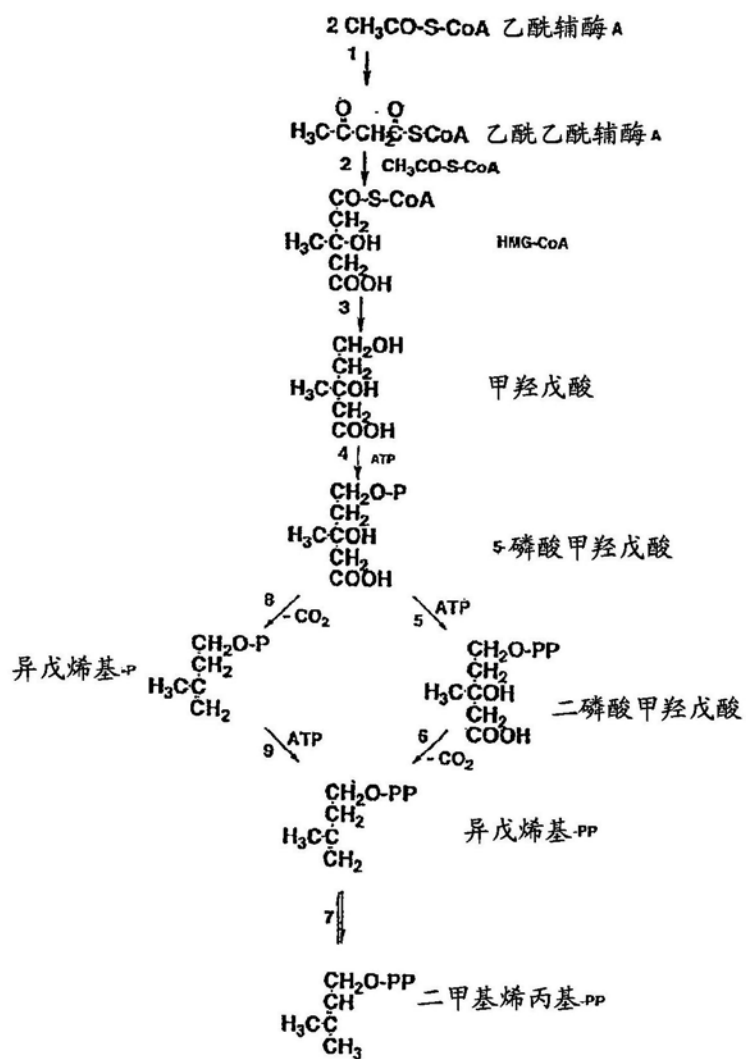


图19B

解脂耶氏酵母CLIB122:: pYLA(MAP29)解脂耶氏酵母CLIB122:: pYLA(KZ1)

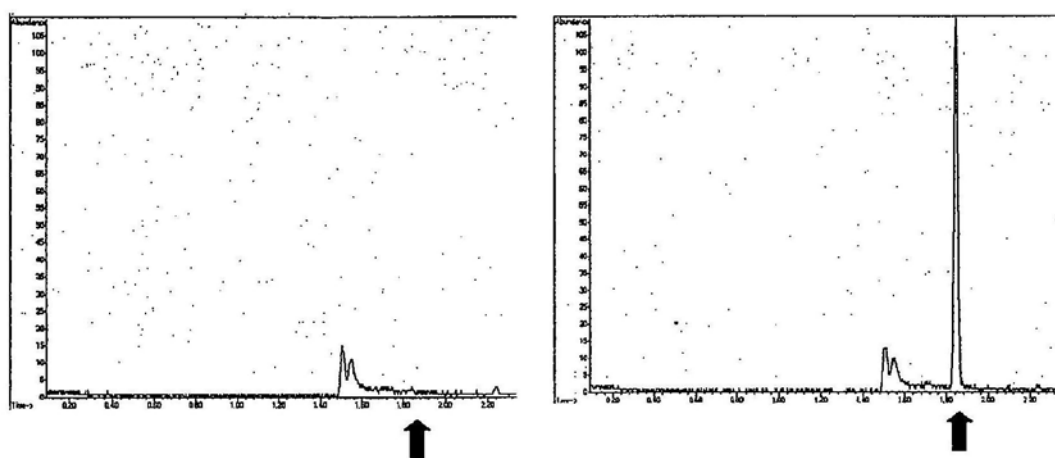


图20

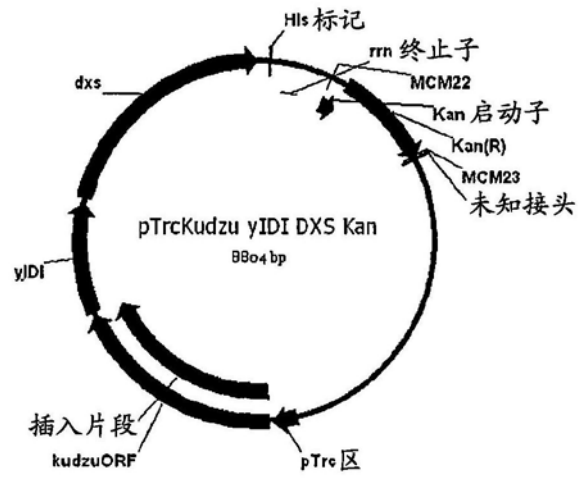


图21

1-

gctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaa  
tagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacgggtctccagcttggtggttttg  
gcggatgagagaagatttttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcgggtctgataaa  
acagaatttgccctggcggcagtagcgcggtggtccacctgaccccatgccgaactcagaagt  
aaacgccgtagcgccgatggtagtgtgggtctcccatgcgagagtagggaactgccaggcat  
caaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttggttgctgggtga  
acgctctcctgagtaggacaaatccgcggggagcggatttgaacggtgcgaagcaacggcccg  
aggggtggcgggcaggacgcccgcataaaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctg  
acggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatcttaatacattcaaatat  
gtatccgcttaaccggaattgccagctggggcgccctctggttaagggtgggaagccctgcaaag  
taaactggatggcctttctcgccgccaaggatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaaga  
gacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgct  
tgggtggagaggctattcggctatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatgccgccc  
tgttccggctgtcagcgagggggcgcccggttctttttgtcaagacccagcctgtccggtgcct  
gaatgaactgcaagacgaggcagcgcggtctatcggtggtggccacgagggcggttcccttgccga  
gctgtgctcgacgttgctcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgcgggggc  
aggatctcctgtcatctcaccttgcctcctgcgagaaaagtatccatcatggtgatgcaatgcg  
gcggctgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgag  
cgagcacgtactcggtatggaagccggtcttgctcgatcaggatgatctggacgaagagcatcagg  
ggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgagggcgaggatctcgt  
cgtgacctatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattc  
atcgactgtggccggctgggtgtggcgaccgctatcaggacatagcgttggtaccctgata  
ttgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacggatcgccgctcc  
cgattcgagcgcatcgccctctatcgccctcttgacgagttcttctgacatgacccaaatccc  
ttaacgtgagttttcggtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttga  
gatccctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgg  
tttgtttgcccgatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgca  
gataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagca  
ccgcctacatacctcgctctgctaactcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtctg  
gtcttaccgggttggaactcaagacgatagttaccggataaggcgagcgggtcgggctgaacggg  
gggttcgtgcacacagcccagcttggaagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgt  
gagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggatccggtaagcggca  
gggtcggaacaggagagcgacagggagcttccagggggaaacgcctgglatctttatagtcc  
tgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggggcggagc  
ctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctc  
acatgttctttcctgcttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgage  
tgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagag  
cgctgatgcggatattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactc  
tcagtacaatctgctctgatgcgcgatagtttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgac  
tgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgcctgacgggcttgctgc  
tcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttc  
accgtcatcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcggaaggcgaagcggcatgca  
tttacgttgacaccatcgaatggtgcaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaaga

图22A

gagtcaattcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacggttatacgaatgtcgagagtatgccggt  
gtctcttatcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccacggtttctgcgaaaacgcggg  
aaaaagtggaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggc  
gggcaaacagtcggttgcgtgattggcgttgccacctccagctctggccctgcacgcgcgtcgcaa  
attgtcgcggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtag  
aacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgg  
gctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaat  
gttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatg  
aagacggtacgcgactgggctggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatacgcgtgtt  
agcggggcccatataagttctgtctcggcgctctgcgtctggctggctggcataaatatctcact  
cgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaac  
aaaccatgcaaattgctgaatgagggcatcggtcccaactgcgatgctggttgccaacgatcagat  
ggcgctggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggctgcgcgttggtgcggatatctcggtg  
gtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacagg  
attttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcgggt  
gaagggaatcagctgttgcccgctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgc  
caaaccgcctctccccgcgcgttgcccgattcattaatgcagctggcagcagaggtttcccgac  
tggaagcgggagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctggtttgaca  
gcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgctcaggcagccatcggaagctgtggt  
atggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgactcccggttctgga  
taatgttttttgcgcgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaat  
taatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagc  
gccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctcttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcac  
tcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgat  
taaataaggaggaataaaccatgtgtgcgcacctcttctcaatttactcagattaccgagcataa  
ttcccgctcggtccgcaaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggag  
aacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgca  
tgatcaaccgctgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgct  
gggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaagccctggaaaacatcgactgctggac  
gaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtcttccgctctgctgcgtcagc  
acggttttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcgg  
tgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgag  
ggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcacccacctgaagaacaacctgaaag  
aaggcattaataccaaggttgagaacaagtgaagccagccctggaactgccatatcaccagcg  
tctgcaccgtctggaggcacgttggttccctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccag  
ctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagacctgcaccagaaagagctgc  
aagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaaactggattttgtacgcgaccg  
cctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagaccgcagtttggtgaatgtcgc  
aaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggca  
ctctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgctattaacac  
cctgcccggactatatgaaactgtgttctcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctat  
tctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaaactgt  
gcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaattatcccggtttctccaagta  
cctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtcttacttttccgta

图22B

tgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctgg  
tgcggttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcgggcgagctgga  
acgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaa  
caggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcg  
ttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgacagttaacatggcacgtgtttc  
ccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcac  
aaactgctgctgattgaccctttcccgattaccagctgatgtatgtctaactgcatcgccctt  
aggaggtaaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacg  
ccaaattagtgcaaaaccaaacacctgaagacatttttggaagaggttccctgaaattattccatt  
acaacaaagacctaatacccgatctagtgcagacgtcaaataacgaaagcggaacatgtttt  
tctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggttgggacg  
ataatgctatttggtgccggtaccaagaaagtgtgtcatttaattgaaaatattgaaaaggttt  
actacatcgtgcattctccgtctttattttcaatgaacaaggtgaattacttttacaacaaaga  
gccactgaaaaaataactttccctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgta  
ttgatgacgaattagggttggaagggtgaagctagacgataagattaaggggcgtattactgcggc  
ggtgagaaaactagatcatgaattagggtattccagaagatgaaactaagacaagggtgaagttt  
cacttttttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaacctgggggtgaacatgaaattg  
attacatcctattttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatga  
agtttagagacttcaaattgggtttcaccaaattgatttgaaaactatgtttgctgaccaagttac  
aagtttacgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattag  
atgacctttctgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataacaacgcgtcctgca  
ttcgcccttaggaggtaaaaaaacatgagttttgatattgcaaatacccgaccctggcactgg  
tcgactccaccaggagttacgactggtgccgaaagagagtttacgaaactctgcgacgaact  
gcgcgcgtattttactcgacagcgtgagccgttccagcgggcacttcgcctccgggctgggcacg  
gtcgaactgaccgtggcgctgcactatgtctacaacaccccggttgaccaattgatttgggatg  
tggggcatcaggcttatccgcataaaattttgaccggacgcgcgcgacaaaatcggcaccatccg  
tcagaaaggcggtctgcaccgcgttcccggtggcgcgcggaagcgaatatgacgtattaagcgtc  
gggcattcatcaacctccatcagtgccggaattggtattgcggttgctgccgaaaaagaaggca  
aaaatcgccgcaccgtctgtgtcattggcgatggcgcgattaccgcaggcatggcgtttgaagc  
gatgaatcacgcggggcgatatccgtcctgatatgctggtgattctcaacgacaatgaaatgtcg  
atttccgaaaatgtcggcgcgtcaacaacctctggcacagctgctttccggtaagctttact  
cttcaactgcgcgaaggcgggaaaaaagttttctctggcgtgcgcgcaattaaagagctgctcaa  
acgcacccgaagaacataattaagggcatggtagtgcctggcacgttggttgaaagagctgggcttt  
aactacatcgggcccggtggacggtcacgatgtgctggggcttatcaccacgctaaagaacatgc  
gcgacctgaaaggcccgacgttccctgcatatcatgacaaaaaagggtcgtggttatgaaccggc  
agaaaaagaccgatcactttccacgcgtgcctaaatttgatccctccagcgggtgtttgccc  
aaaagtagcgggcggtttgccgagctattcaaaaatctttggcgactggttgtgcgaaacggcag  
cgaaagacaacaagctgatggcgattactccggcgatgcgtgaagggtccggcatggtcgagtt  
ttcacgtaaattcccgatcgctacttcgacgtggcaattgcgagcaaacgcgggtgaccttt  
gctgcgggtctggcgattggtgggtacaaacccattgtcgcgatttactccactttcctgcaac  
gcgcctatgatcaggtgctgcatgacgtggcgatgcataaagcttccgggtcctgttcgccatcga  
ccgcgcgggcattgttggtgctgacggtcaaaccatcagggtgcttttgatctctcttacctg  
cgctgcataccggaaatggtcattatgaccccgagcgatgaaaacgaatgtcgccagatgctct  
ataccggctatcactataacgatggcccgtcagcgggtgcgctacccgcgtggcaacgcggctcg

图22C

cgtggaactgacgccgctggaaaaactaccaattggcaaaggcattgtgaagcgtcgtggcgag  
 aaactggcgatccttaactttggtacgctgatgccagaagcggcgaaagtcgccgaatcgctga  
 acgccacgctggtcgatatgcgttttgtgaaaccgcttgatgaagcgtaattctggaaatggc  
 cgccagccatgaagcgtggtcaccgtagaagaaaacgccattatgggcggcgagcagcggc  
 gtgaacgaagtgctgatggcccatcgtaaaccagtacccgtgctgaacattggcctgccggact  
 tctttattccgcaaggaactcaggaagaaatgcgcgccgaactcggcctcgatgccgctggtat  
 ggaagccaaaatcaaggcctggctggcataactgca  
 (SEQ ID NO:20)

图22D

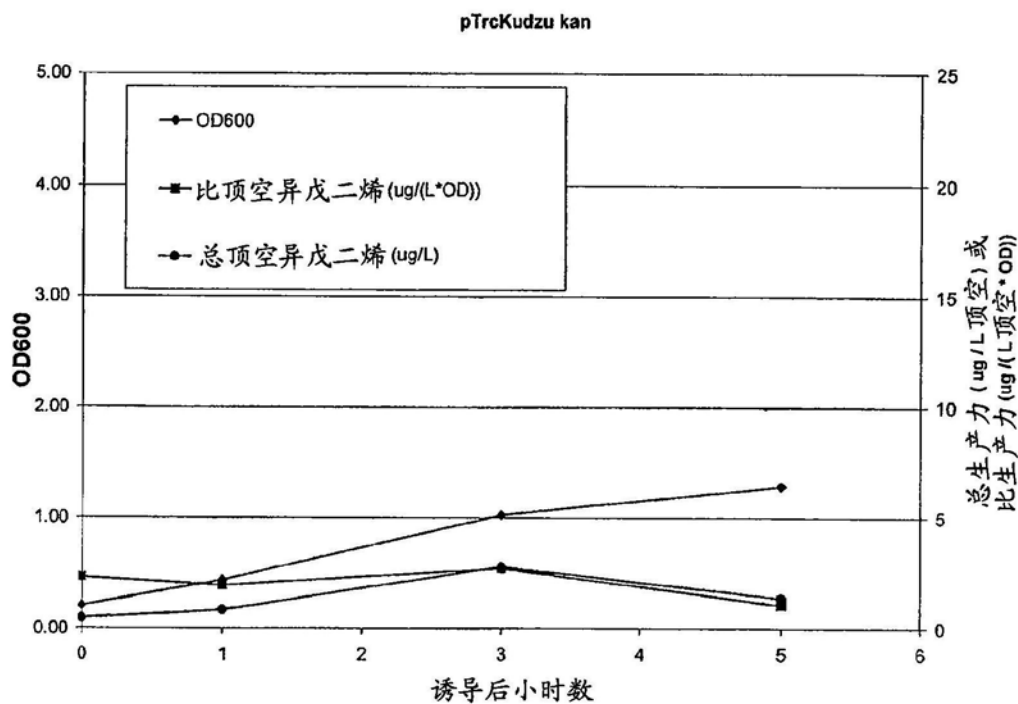


图23A



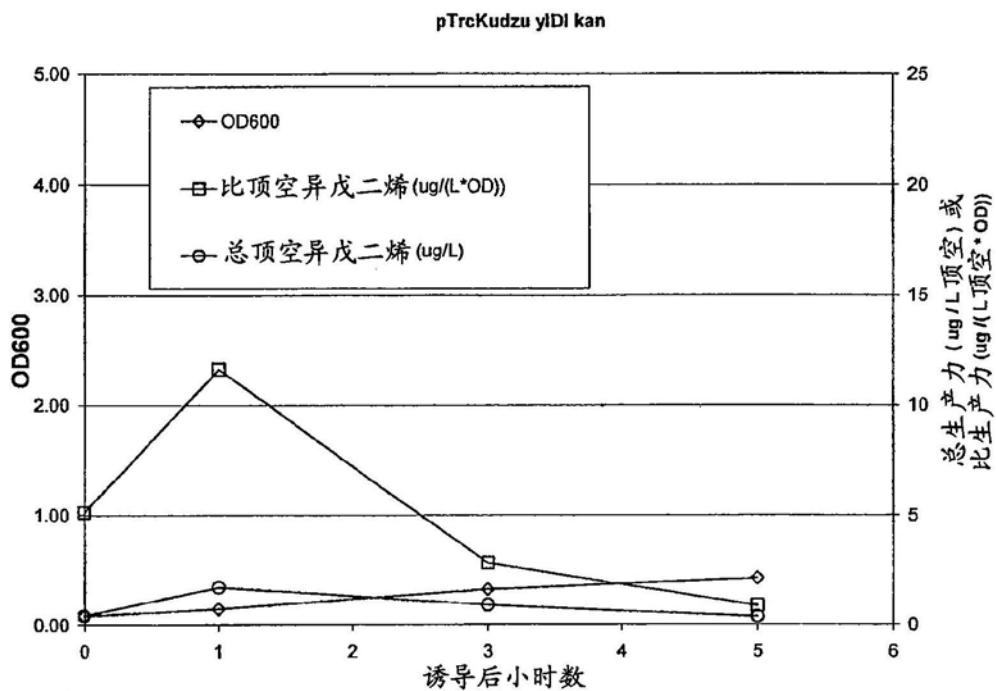


图23B

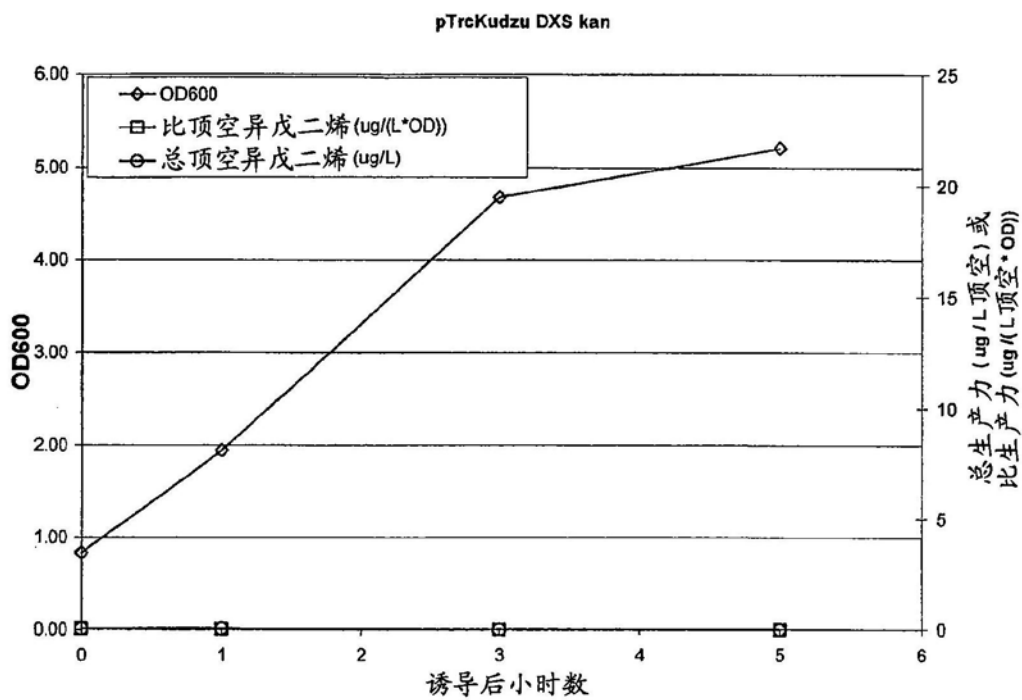


图23C

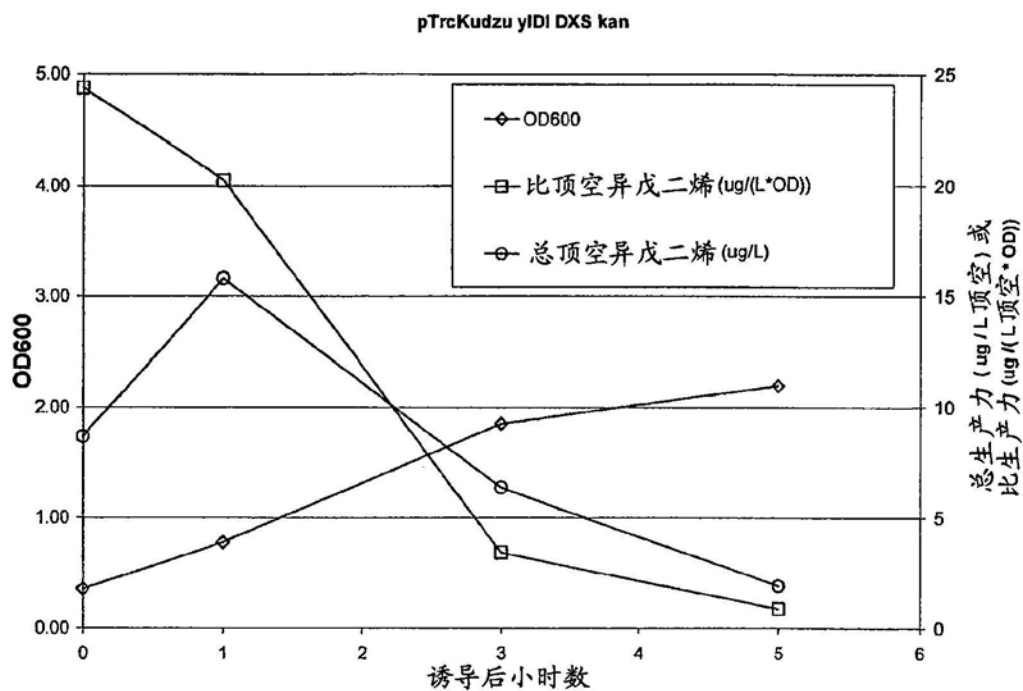


图23D

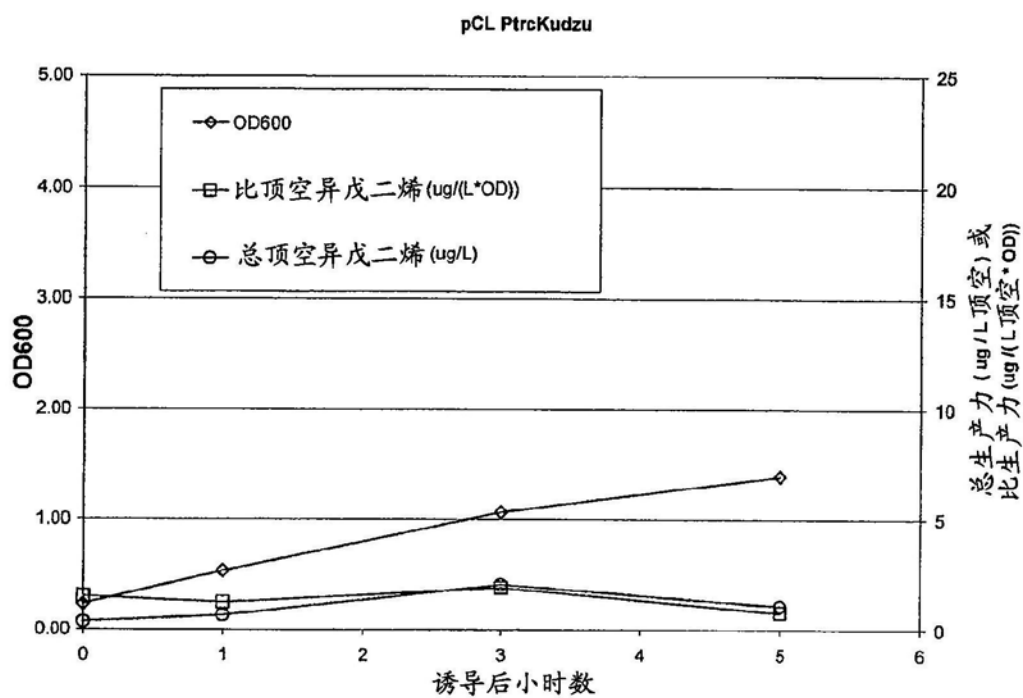


图23E

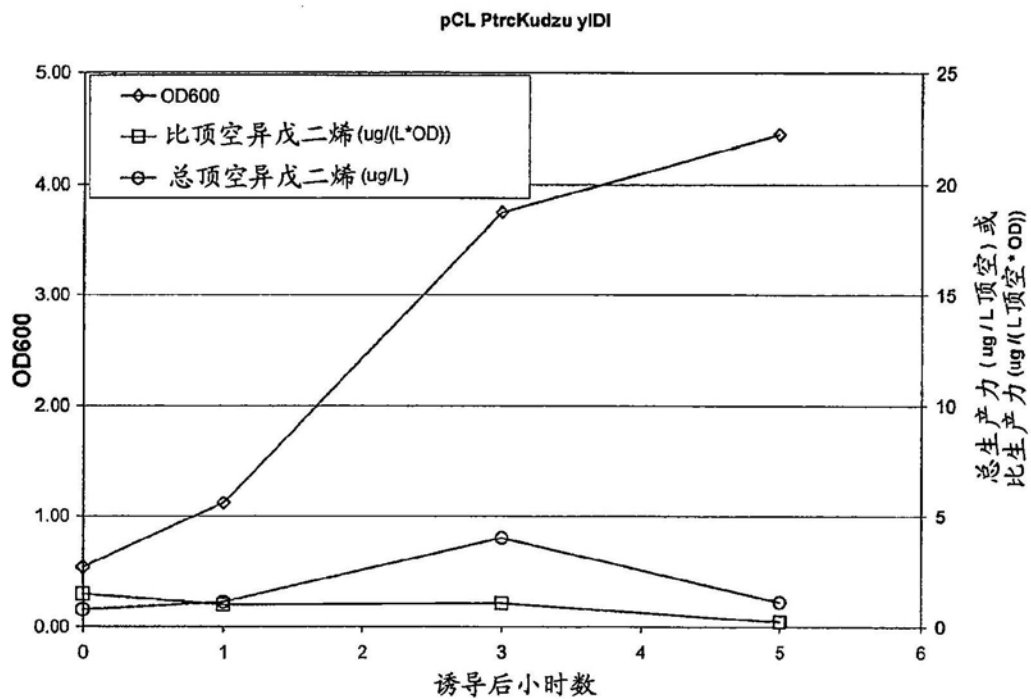


图23F

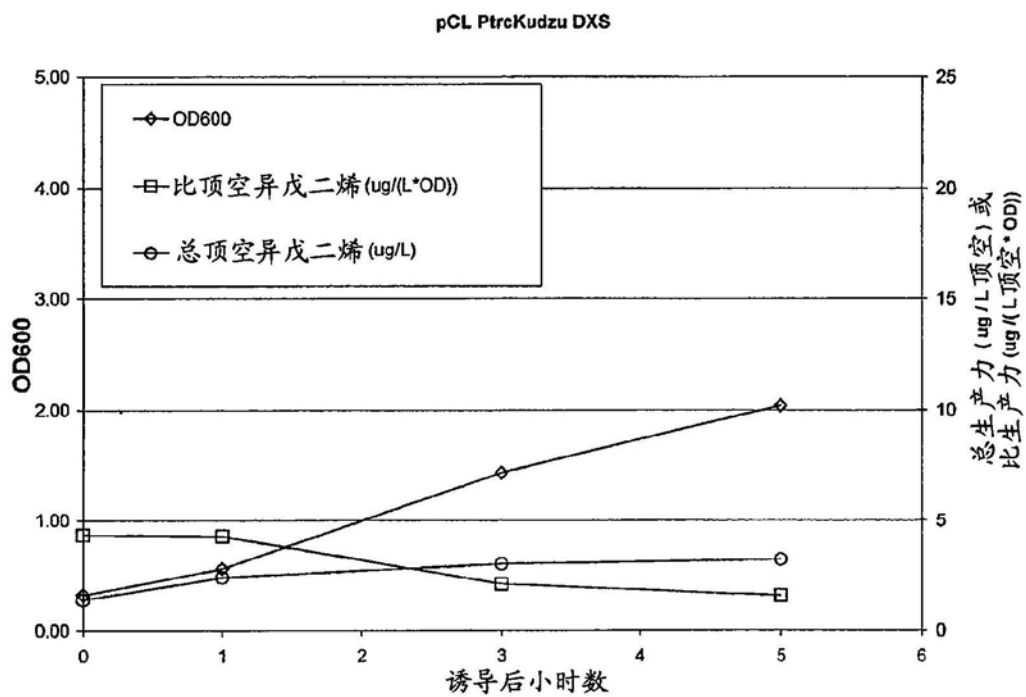


图23G

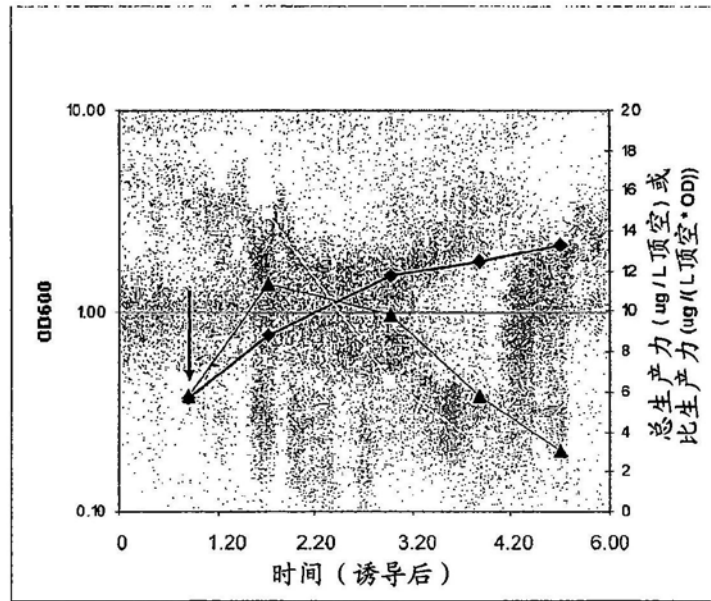


图23H

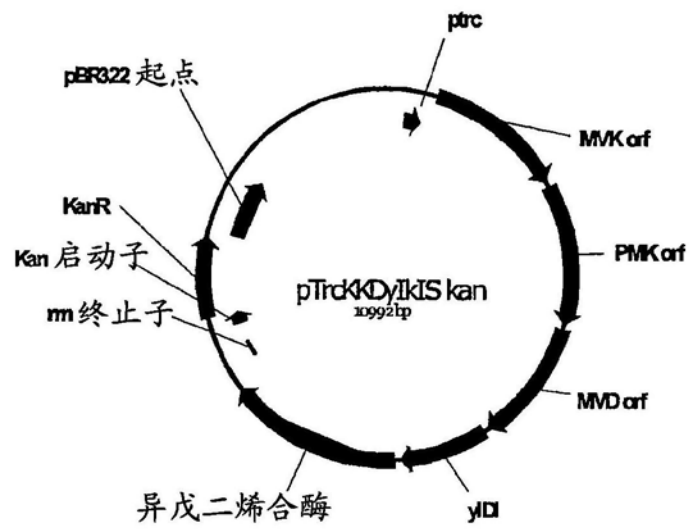


图24

5' -  
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatacactgcataattcggtgcgtcaaggcgcactccc  
gttctggataatgttttttgcgcgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt  
gtgggcactcgaccggaattatcgattaaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaat  
gtatcgattaaataaggaggaataaaccatggatccgagctcggatccactagtaacggccgcc  
agtgtgctggaattcgcccttaggaggtaaaaaaacatgtcattaccgttcttaacttctgcac  
cgggaaagggttattatttttgggtgaacactctgctgtgtacaacaagcctgcgctcgtgctag  
tgtgtctgcgttgagaacctacctgctaataagcagagtcctctgcaccagatactattgaattg  
gacttcccgacattagctttaatcataagtggtccatcaatgatttcaatgccatcaccgagg  
atcaagtaaaactcccaaaaattggccaaggctcaacaagccacgcatggcttgtctcaggaact  
cgtttagtcttttggatccgttggttagctcaactatccgaatccttccactaccatgcagcggtt  
tgtttctgtatatgtttgtttgctatgcccccatgccagaatattaagttttctttaaagt  
ctactttacccatcggtgctgggttgggctcaagcgctctatttctgtatcactggccttagc  
tatggcctacttgggggggttaataggatctaatagacttggaaaagctgtcagaaaacgataag  
catatagtgaatcaatgggccttcataagtgaaaagtgtattcacggtacccttcaggaatag  
ataacgctgtggccacttatggtaatgcctgctatttgaaaaagactcacataatggaacaat  
aaacacaaaacaattttaagtcttagatgatttcccagccattccaatgatcctaacctatact  
agaattccaagggtctacaaaagatcttggtgctcgcggtcgtgtgttggtcaccgagaaaatttc  
ctgaagttatgaagccaattctagatgccatgggtgaatgtgcctacaaggcttagagatcat  
gactaagttaagtaaatgtaaaggcaccgatgacgaggctgtagaaactaataatgaactgtat  
gaacaactattggaattgataagaataaatcatggactgcttgtctcaatcggtgtttctcctc  
ctggattagaacttattaaaaatctgagcgatgatttgagaattgggtccacaaaacttaccgg  
tgctgggtggcgcggttgctctttgactttgttacgaagagacattactcaagagcaaattgac  
agcttcaaaaagaaattgcaagatgatttttagttacgagacatttgaaaacagacttgggtggga  
ctggctgctgtttgttaagcgcaaaaaatttgataaagatcttaaaatcaaatccctagtatt  
ccaattatttgaaaataaaactaccacaaaagcaaaaattgacgatctattattgccaggaaac  
acgaattttaccatggacttcataagctaatttgcatagggcctgcacccttaaggaggaaaaa  
acatgtcagagttgagagccttcagtgcgccagggaaagcgttactagctggtggatatttagt  
tttagatacaaaaatatgaagcatttgtagtcggattatcggcaagaatgcagctgtagcccat  
ccttacggttcatttgcaagggtctgataagtttgaaagtgcgtgtgaaaagtaacaatttaaag  
atggggagtggtgtacatatataagtcctaaaagtggcttcattcctgtttcgataggcggatc  
taagaaccctttcattgaaaaagtatatcgctaacgtatttagctactttaaacctaacatggac  
gactactgcaatagaaaacttggttcgttattgatattttctctgatgatgcctaccattctcagg  
aggatagcgttacccaacatcggtggcaacagaagattgagttttcattcgacagaattgaaga  
agttcccaaaacaggggtgggctcctcggcaggttttagtcacagttttaactacagctttggcc  
tccttttttgtatcggaacctggaaaataatgtagacaaatatagagaagttattcataatttag  
cacaagttgctcattgtcaagctcagggtaaaattggaagcgggtttgatgtagcggcggcagc  
atatggatctatcagatatagaagattccaccccgcattaatctctaatttgccagatattgga  
agtgtacttacggcagtaaaactggcgcatttgggtgatgaagaagactggaatattacgatta  
aaagtaaccattttaccttcgggattaactttatggatgggcgatattaagaatggttcagaaac  
agtaaaactgggtccagaaggtaaaaaattgggtatgattcgcatatgccagaagccttgaaaata

图25A

tatacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatcgcttac  
acgagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtctcttgagaggaatgactgtacctg  
tcaaaagtatcctgaaatcacagaagttagagatgcagttgccacaattagacgttcctttaga  
aaaataactaaagaatctggtgccgatatcgaacctcccgtacaaactagcttattggatgatt  
gccagaacttaaaaggagttcttacttgcttaataacctggtgctggtggttatgacgccattgc  
agtgattactaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaatagacaaaagattttctaag  
gttcaatggctggatgtaactcaggctgactggggtggttaggaaagaaaaagatccggaactt  
atcttgataaataacttaaggtagctgcatgcagaattcgcccttaaggaggaaaaaaaatga  
ccgtttacacagcatccgttaccgcacccgtcaacatcgcaacccttaagtattgggggaaaag  
ggacacgaagtgaatctgccaccaattcgtccatatcagtgaacttatcgcaagatgacctc  
agaacgttgacctctgcggtactgcacctgagttgaaacgcgacactttgtggttaaatggag  
aaccacacagcatcgacaatgaaagaactcaaaattgtctgcgcgacctacgccaattaagaaa  
ggaaatggaatcgaaggacgcctcattgccacattatctcaatggaaactccacattgtctcc  
gaaaataactttctacagcagctggttttagcttctcctcgctgctggtttgtgcatgtgtct  
ctgcaattgctaagttataccaattaccacagtcaacttcagaaatatctagaatagcaagaaa  
ggggtctggttcagcttgttagatcggttggttgccggatagctggcctgggaaatgggaaaagct  
gaagatggtcatgattccatggcagtaaaaatcgacagacagctctgactggcctcagatgaaag  
cttggtgctctagttgtcagcgatattaaaaaggatgtgagttccactcagggtatgcaattgac  
cgtggcaacctccgaactatttaagaaaagaattgaacatgtcgtaccaaagagatttgaagtc  
atgcgtaaaagccattgttgaaaaagatttcgcacactttgcaaaggaaacaatgatggattcca  
actctttccatgccacatgtttggactctttccctccaatattctacatgaatgacacttccaa  
gcgtatcatcagttggtgccacaccattaatcagttttacggagaaacaatcgttgcatacacg  
tttgatgcaggtccaatgctgtgttgactacttagctgaaaatgagtcgaaactctttgcat  
ttatctataaattgtttggctctgttccctggatgggacaagaaatttactactgagcagcttga  
ggctttcaaccatcaatttgaatcatctaactttactgcacgtgaattggatcttgagttgcaa  
aaggatgttgccagagtgattttaactcaagtcggttcaggcccaagaaacaaacgaatctt  
tgattgacgcaaagactggtctaccaaaaggaataagatcaattcgctgcatcgcccttaggagg  
taaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacgccaaat  
tagtgcaaaaccaaacacctgaagacattttggaagagtttctgaaattattccattacaaca  
aagacctaataccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgtttttctggt  
catgatgaggagcaaatgaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggttgggacgataatg  
ctattggtgccggtaccaagaaagtttgtcatttaattgaaaatattgaaaagggtttactaca  
tcgtgcattctccgtctttattttcaatgaacaagggtgaattacttttacaacaaagagccact  
gaaaaaataactttccctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatg  
acgaattaggtttgaagggttaagctagacgataagattaagggcgctattactgcccgggtgag  
aaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaaggggtaagtttcaacttt  
ttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaacatggggtgaacatgaaattgattaca  
tcctatttttataagatcaacgctaagaaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttag  
agacttcaaatgggtttcaccaaattgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagttt  
acgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgacc  
tttctgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataacaacgcgtcctgcattcgcc  
cttaggaggtaaaaaacatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataatt  
cccgctcgttccgcaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaa  
cgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatg

图25B

atcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgccctgg  
gtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgctactgctggacga  
aaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcac  
ggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcgggtg  
aactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgaggg  
tgagaacctgctggaggaggcgctaccttttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaa  
ggcattaataccaaggttgagaacaagtgaagccacgcccctggaactgccatatcaccagcgtc  
tgcaccgtctggaggcacgttggttccctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagct  
gctgctggagctggcgaaagctggattttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaa  
gatctgtcccgtgggtggaccgagatgggcctggctagcaaaactggattttgtacgcgacccgc  
tgatggaagtttatttctgggcaactgggtatggcgccagaccgcagtttggtgaatgtcgcaa  
agctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcact  
ctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgctattaacaccc  
tgccggactatatgaaactgtgtttccctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattc  
tattctgaaagagaaaggctcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcggtgaactgtgc  
aaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaattatcccggctttctccaagtacc  
tggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtcttacttttccgtatg  
ccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggctcgggtg  
cgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcgagctggaac  
gtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcaggaaca  
ggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgcgcaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgtt  
agcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgagttacatggcacgtgtttccc  
actgcacctaccagtatggcgatgggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaa  
actgctgctgattgacctttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgcagctggtacca  
tatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtc  
gaccatcatcatcatcattgagtttaaacgggtctccagcttggctgttttgccggatgaga  
gaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcgggtctgataaaacagaatttg  
cctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgccgta  
gcgcgatggtagtgtgggtctcccctgagagagtagggaactgccaggcatcaataaaac  
gaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcct  
gagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaaagcttgcaagcaacggcccgagggtggcg  
gcaggacgcccgcataaaactgccaggcatcaattaagcagaaggccatcctgacggatggcc  
tttttgcgttttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctt  
aaccggaattgccagctggggcgccctctggttaaggttggaagccctgcaaagtaaaactggat  
ggctttctcgccgccaaggatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaagagacaggatga  
ggatcgtttctcgatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggaga  
ggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggtgctctgatgccgcccgtgttccggct  
gtcagcgagggggcgcccgggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactg  
caagacgaggcagcgcggtatctgtggctggccacgacggcggttccctgagcagctgtgctcg  
acgttgtcactgaagcggggaaggactggctgctattgggcgaagtgcgggggcaggatctcct  
gtcatctcaccttgtcctgcccagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcat  
acgcttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgta  
ctcggtggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgcc  
agccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacctat

图25C

ggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtg  
gcccgtgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccgctgatattgctgaaga  
gcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccattcgag  
cgcatcgcttctatcgcttcttgacgagttcttctgacgcatgacaaaaatcccttaacgtg  
agttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttt  
ttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgtttg  
ccgatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaa  
atactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctac  
atacctcgctctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttacc  
gggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggttcgt  
gcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatg  
agaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggggtcgga  
acaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggt  
ttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggaggagcctatggaa  
aaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttctgctggccttttctcacatgttc  
tttctgcttctatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccg  
ctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcaggtcagtgagcaggaagcgggaagagcgcctgat  
gcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatgggtgcaactctcagtaca  
atctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcat  
ggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccgga  
tccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggttttcaccgtcat  
caccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcggaaggcgaagcggcatgcatttacgtt  
gacaccatcgaatggtgcaaaaccttctcgcggtatggcatgatagcggccggaagagagtcatt  
tcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgtatgtcgcagagtatgcgggtgtctctta  
tcagaccgtttcccgctgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagt  
gaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaac  
agtctgtgctgattggcgttgccacctccagctctggcctgcacgcgcgtcgcaaatgtctgc  
ggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtgctgatggtagaacgaagc  
ggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatca  
ttaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgctgcaactaatgttcgggc  
gttattttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacgggt  
acgcgactggcggtggagcatctggctgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcggggcc  
cattaagtctgtctcggcgcgtctgctctggctggctggcataaatatctcactcgcaatca  
aattcagccgatagcggaaacgggaaggcgaactggagtgccatgtccggttttcaacaacccatg  
caaatgctgaatgagggcatcggtccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgg  
gcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggtgcgcgttgggtgcggatatctcggtagtgggata  
cgacgataccgaagacagctcatgttatatccgcggtcaaccaccatcaaacaggattttcgc  
ctgctggggcaaacagcgtggaccgcttctgcaactctctcagggccaggcgggtgaaggga  
atcagctgttgccgctctcactgggtgaaaagaaaaaccacctggcgccaatacgcgaaccgc  
ctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagc  
gggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagtttagcgcgaattgatctg  
(SEQ ID NO:33)

图25D



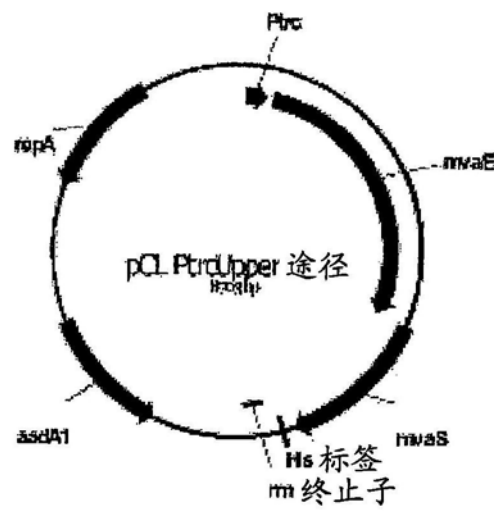


图26

5' -

cccgctcttactgtcgggaattcgcggttgccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgtt  
gacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacagga  
aacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgt  
gggcaactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgt  
atcgattaataaaggaggaataaaccatggatccgagctcaggaggtaaaaaacatgaaaaca  
gtagttattattgatgcattacgaacaccaattggaaaatataaaggcagcttaagtcaagtaa  
gtgccgtagacttaggaacacatgttacaacacaacttttaaaaagacattccactattttctga  
agaaattgatcaagtaatctttggaaatgttttacaagctggaaatggccaaaatcccgacga  
caaatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaattcccgcaatgacggttaatgaggtctgcg  
gatcaggaatgaaggccggttattttggcgaaacaattgattcaattaggagaagcgggaagtttt  
aattgctggcgggattgagaatatgtcccaagcacctaataacacggttttaattacgaaaca  
gaaagctacgatgcgcctttttctagtatgatgtatgatggattaacggatgcctttagtggtc  
aggcaatgggcttaactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaaga  
tcaattttctgtacattcacaattaaaagcagctcaagcacaagcagaagggatattcgctgac  
gaaatagccccattagaagtatcaggaacgcttgtggagaaagatgaagggattcgccctaatt  
cgagcgttgagaagctaggaacgcttaaaacagtttttaagaagacgggtactgtaacagcagg  
gaatgcatcaaccattaatgatggggcttctgctttgattattgcttcacaagaatatgccgaa  
gcacacggtcttcttattttagctattattcgagacagtggtggaagtcggtattgatccagcct  
atatgggaatttcgccgattaaagccattcaaaaaactgttagcgcgcaatcaacttactacgga  
agaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgcagcaacttcaatcgtgggtccaaagagaa  
ctggctttaccagaggaaaaggtcaacattttatgggtggcggattttcattaggtcatgcgattg  
gtgccacaggtgctcgtttattaacgagtttaagtattcaattaaatcaaaaagaaaagaaata  
tgagtggtgcttctttatgtatcggcgggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcag  
caaaaaaaaaacagccgattttatcaaatgagtcctgaggaacgcctggcttctcttcttaatg  
aaggccagattttctgctgatacaaaaaagaatttgaaaatacggctttatcttcgcagattgc  
caatcatatgattgaaaatcaaatcagtgaacagaagtgccgatggcggttggttacattta  
acagtgagcgaactgattatttggtagcaatggcgacagaagagccctcagttattgcggtt  
tgagtaatggtgcaaaaatagcacaaggatttaaaacagtgaaatcaacaacgcttaatgcgtgg  
acaaatcgttttttacgatgttgagatcccgagtcattgattgataaactacaagtaagagaa  
gcggaagtttttcaacaagcagagtttaagttatccatctatcgttaaacggggcggtggttaa  
gagatttgcaatatcgtacttttgatgaatcatttgtatctgtcgacttttttagtagatgttaa  
ggatgcaatgggggcaaatatcgttaacgctatgttggaaggtgtggccgagttgttccgtgaa  
tggtttgcggagcaaaaagattttattcagtttttaagtaattatgccacggagtcggttggtta  
cgatgaaaacggctattccagtttcacgcttaagtaaggggagcaatggccgggaaattgctga  
aaaaattgttttagcttcacgctatgcttcattagatccttatcgggcagtcacgcataaaaa  
ggaatcatgaatggcattgaagctgtagtttttagctacaggaaatgatacacgcgctgttagcg  
cttcttgtcatgcttttgcggtgaaggaaggtcgctaccaaggcttgactagttggacgctgga  
tggcgaacaactaattgggtgaaatttcagttccgcttgctttagccacggttggcgggtgccaca  
aaagtcttacctaataatctcaagcagctgctgatttgttagcagtgacggatgcaaaagaactaa  
gtcgagtagtagcggctgttggtttggcacaataatttagcggcggttacgggccttagtctctga  
aggaattcaaaaaggacacatggctctacaagcacgcttctttagcgatgacggtcggagctact  
ggtaaagaagttgaggcagtcgctcaacaattaaaacgtcaaaaacgatgaaccaagaccgag  
ccatggctatttttaaatgatttaagaaaacaataaaggaggtaaaaaacatgacaattgggat

图27A

tgataaaattagtttttttgtgcccccttattatattgatatgacggcactggctgaagccaga  
aatgtagaccctggaaaatttcatttgggtattgggcaagaccaaattggcgggtgaacccaatca  
gccaaagatattgtgacatttgcagccaatgccgcagaagcgatcttgaccaagaagataaaga  
ggccattgatatggtgattgtcgggactgagtcagatcgatgagtcaaaagcggccgcagtt  
gtcttacatcgtttaaatggggattcaacctttcgctcgctctttcgaaatcaaggaagcttgtt  
acggagcaacagcaggcttacagttagctaagaatcacgtagccttacatccagataaaaaagt  
cttggctgtagcggcgagatattgcaaaatatggcttaaattctggcgggtgagcctacacaagga  
gctggggcgggttgcaatgtagttgctagtgaaccgcgcattttggctttaaaagaggataatg  
tgatgctgacgcaagatatctatgacttttggcgctccaacaggccaccgctatcctatggctga  
tggtcctttgtcaaacgaaacctacatccaatcttttgcceaagtctgggatgaacataaaaaa  
cgaaccggctcttgattttgcagattatgatgcttttagcgttccatattccttacacaaaaatgg  
gcaaaaaagccttattagcaaaaaatctccgaccaaactgaagcagaacaggaacgaatttttagc  
ccgttatgaagaaagtatcgctctatagtcgctcgctaggaacttgatatacgggttcactttat  
ctgggactcatttcccttttagaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatcaaattgggtttat  
tcagttatgggtctggtgctgctgctgaatttttcaactggtgaattagtagctgggttatcaaaa  
tcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaactttctatcgctgaa  
tatgaagccatgtttgcagaaacttttagacacagacattgatcaaacggttagaagatgaattaa  
aatatagttttctgctattaataataaccgttcgttcttatcgaaactaagagatctgcagctg  
gtaccatatgggaattcgaagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaata  
gcgcgctcgaccatcatcatcatcattgagtttaaaccggtctccagcttggctgttttggc  
ggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcgggtctgataaaac  
agaatttgctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtga  
acgcgctagcgcgatggtagtggtggttctcccatgagagagtagggaactgccaggcatca  
aataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcgggtgaac  
gctctcctgagtaggacaaatccgcgggagcggatttgaaacggtgcgaagcaacggcccgag  
ggtggcgggaggaacgcccgcataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgac  
ggatggcctttttcgctttctacaaactcttttggttatttttctaaatacattcaaatatgt  
atccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatctggcgtaatagcgaagaggcc  
cgacccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggtatt  
ttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcaactctcagtacaatctgctc  
tgatgccgcatagtttaagccagccccgacaccgcgaacaccgctgacgagcttagtaaagcc  
ctcgctagattttaatgcggatggtgagattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagc  
cagcctttcatgatataatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaaataaaaa  
agcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaaccgcttgagt  
taagccgcgcgcggaagcggcgtcggttgaacgaattgttagacattatttgccgactacctt  
ggtgatctcgcttttoacgtagtggaacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcga  
tcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggcccggca  
ggcgtccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgattttgccggttactgcgctgta  
ccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcccgcagttc  
catagcggttaaggtttcatttagcgctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagtt  
cctccgcgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgccttttgcagcaagatagccag  
atcaatgtcgatcggtggctggaagataacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctcca  
aattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgctcgtcacaacaatggtga  
cttctacagcgcggagaatctcgctctctccaggggaagccgaagtttccaaaaggctcgttgat

图27B

caaagctcgccgcgttggttcatcaagccttacgggtaccgtaaccagcaaatcaatatcactg  
tgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcga  
gatggcgctcgatgacgccaaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttc  
cctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgcctgctgcgtaacatcggttgctgctccat  
aacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggtatgcccaggcatagactgta  
ccccaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgcggttaccaccgctgcgttc  
ggtaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgattacagcttacgaaccgaa  
caggcttatgtccactgggttcgtgccttcacggttccacgggtgtgcgtcaccgggcaacct  
tgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctc  
cacgcatcgtcaggcattggcgcccttgctgttctctacggcaaggtgctgtgcacggatctg  
ccctggcttcaggagatcggaagacctcgccgctcgccgcttgccggtggtgctgaccccg  
atgaagtgggttcgcatcctcggtttctggaaggcgagcatcggttggttcgccagcttctgta  
tggaacgggcatgaggatcagtgagggttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcac  
ggcacgatcatcgctgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttaccgagagct  
tggcaccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacgggttttgctgcccgcaaacgggt  
gttctgggtgttgctagttgttatcagaatcgagatccggcttcagccggtttgcgggtgaa  
agcgctatttctccagaattgccatgatttttcccacgggaggcgctactggctcccggtgt  
tgtcggcagctttgattcgataagcagcatcgctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttga  
gctgtaacaagttgtctcagggtgttcaatttcagttctagttgctttgtttactggttcac  
ctgttctattaggtgttacatgctgttcacatctgttacattgtcgatctgttcaggtgaacagc  
tttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccggtttcatct  
gtgcatatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaacagttgttctactttgtttgta  
gtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttcggtatttagcca  
gtatgttctctagtgtggttcggtgtttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcata  
cttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaaactggtgagctgaatttttgagttaaa  
gcatcgtgtagtgtttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttggttgta  
ttttgtcaccattcatttttatctggttggttctcaagttcggttacgagatccatttgctatc  
tagttcaacttgaaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcata  
ttgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaaaccattgggttaagccttttaaact  
catggtagttattttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaattctctatatttgc  
cttgtaggttttcttttggttagttcttttaataaccactcataaatcctcatagagtatttg  
ttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataag  
gcaatatctcttactaaaaactaattctaattttgcgttgagaacttgcatagtttgcca  
ctggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgatcagctct  
ctggttgcttttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcacatctgagcgtatt  
ggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtaggggttttcaatcggtgggttgagtag  
tgccacacagcataaaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagt  
tcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattgggtctaggtgattttaatcac  
tataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttctttgagttgtgggtat  
ctgtaaatctctgctagacctttgctggaaaacttgtaaatctgctagaccctctgtaaatcc  
gctagacctttgtgtgtttttttgttttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaag  
aataaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactacttttagtcagttcc  
gcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaacct  
aaaggcttaagtagcacccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattcctttgtctccgacc

图27C

Atcaggcacctgagtcgctgtcttttttcgtgacattcagttcgctgctcaccggctctggcag  
tgaatgggggtaaatggcactacaggcgcccttttatggattcatgcaaggaaactaccataat  
acaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcggttttatggcggtctgctatgtggtgctatc  
tgactttttgctgttcagcagttcctgcccctctgattttccagtctgaccacttcggattatcc  
cgtgacaggtcattcagactggctaatagcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
(SEQ ID NO:46)

图27D

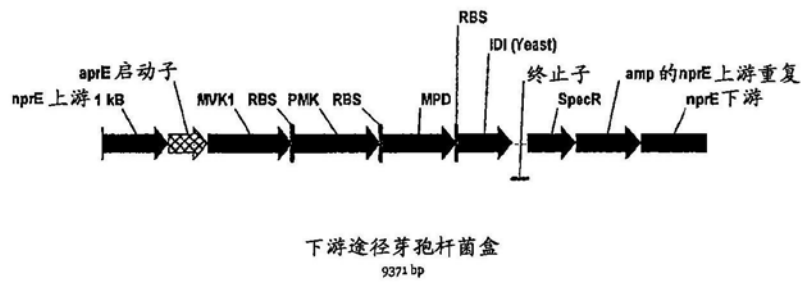


图28

5' -

tgtaaccttttgctttcaaatgagtagaataatgcacatccatggttgatcgtgcaataaag  
tgtttcatccgtaggaaaaaatgacttttagtatctgttccgctttttctgatgaaatgtgctcc  
ccgacaaaattgaatgaatcatggacatttgctggctttgatcacagcgaaagcagccgttccta  
tgttatatatcggatttaacagcaggacaaaaaacacatgacagccatcgtcaccacttatt  
cacacgcacataaacctttcctgacttttggaacagatgatagctcatcaaaaatcccgccatt  
gccaaataaatcgtatatggcattactgcaccataatcttttgagatttgattgggatatggcg  
caagcagcaagacaagcagtcgataatcagcgtataaaaataagcctagtaagatcttatccgt  
tctccaatacagcttgaaaaacactacattcaacgcaatgggaagagtgatgatgaaaaacaga  
aacacgaatgcaatcggctccatcccatccgggtattccttccaatacgaagaaactaaaaa  
tcatttgtagcatcggcaaaactgacaacagcaaggctgaacgtataaaaacttaccctttccgcc  
atgatcacgcggcatcagcatatagtgaagccgtcagcagcacatatccgtataacaaaaa  
tgacgagcggcagcagttcttttccgtcctctcttaagtaagcgtggtgaagtttggtgatt  
gcacctggtgaataagttcaacagacactcccgcagcagcaccaatccgcaatataacaccgc  
caagaacattgtgcgtgccggtttattttgggatgatgcacaaaagatatagcccgccaga  
acaacaattgaccattgaatcagcaggggtgctttgtctgcttaataataaaaataacggtcgaat  
gcaatacataatgactgaataactccaacacgaacaacaactccattttcttctgctatcaaaa  
taacagactcgtgattttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgcccttgcaaatcggatgc  
ctgtctataaaaattcccgatattgggttaaacagcggcgcaatggcgccgcgcatctgatgtctt  
gcttgccgaatgttcatcttatttcttctcctctcaataattttttcattctatcccttttc  
tgtaaagtttatttttcagaatacttttatcatcatgctttgaaaaaatatcacgataatatcc  
attgttctcacggaagcacacgcaggtcatttgaacgaattttttcgacaggaatttgccggga  
ctcaggagcattttaacctaaaaaagcatgacatttcagcataatgaacatttactcatgtctat  
tttctgttcttttctgtatgaaaatagttatttctgagtcctctacggaaatagcgagagatgat  
acctaaatagagataaaatcatctcaaaaaaatgggtctactaaaatattattccatctattac  
aataaattcacagaatagtcttttaagtaagtctactctgaatttttttaaaaggagagggttaa  
agagtgtcattaccgttcttaacttctgcaccgggaaagggttattatttttgggtgaacactctg  
ctgtgtacaacaagcctgcgctcgtgctagtgtgtctgcgttgagaacctacctgctaataag  
cgagtcactctgcaccagatactattgaattggacttcccgacattagctttaatcataagtg  
tccatcaatgatttcaatgccatcaccgaggatcaagtaaaactcccaaaaattggccaaggctc  
aacaagccaccgatggcttgtctcaggaactcgttagcttttggatccgttggttagctcaact  
atccgaatccttccactaccatgcagcgttttggttctgtatatgtttggttgccatgcccc  
catgccaagaatatattaagttttctttaaagtctactttacccatcgggtgctgggttgccctcaa  
ggcctctattttctgtatcactggccttagctatggcctacttggggggggttaataggatctaa  
tgacttggaagagctgtcagaaaacgataagcatatagtgaatcaatgggccttcataggtgaa  
aagtgtattcacggtaccccttcaggaatagataacgctgtggccacttatggtaatgcctgc  
tatttgaaaaagactcacataatggaacaataaacacaaaacaattttaagttcttagatgatt  
cccagccattccaatgatcctaacctatactagaattccaaggtctacaaaagatcttggtgct  
cgcgttcgtgtgttggtcaccgagaaaatttctgaagttatgaagccaattctagatgccatgg  
gtgaatgtgcctacaaggcttagagatcatgactaagttaagtaaatgtaaaggcaccgatga  
cgaggctgtagaaactaataatgaactgtatgaacaactattggaattgataagaataaatcat  
ggactgcttgtctcaatcgggtgtttctcatcctggattagaacttattaaaaatctgagcgatg  
atttgagaattggctccacaaaacttaccgggtgctgggtggcgcggttgctctttgactttgtt  
acgaagagacattactcaagagcaaattgacagcttcaaaaagaaattgcaagatgatttttagt

图29A



tacgagacattttgaaacagacttggtgggactggctgctgtttgttaagcgcaaaaaatttga  
ataaagatcttaaaatcaaatccctagtagttccaattatttgaaaataaaactaccacaaagca  
acaaattgacgatctattattgccaggaaacacgaatttaccatggacttcataaaaggagagg  
gtgtcagagttgagagccttcagtgtcccagggaagcggttactagctgggtggatatttagttt  
tagatacaaaaatgaagcattttagtagtcggattatcggcaagaatgcatgctgtagcccatcc  
ttacgggttcattgcaagggtctgataagtttgaagtgcgtgtgaaaagtaacaatttaaagat  
ggggagtggctgtaccatataagtcctaaaagtggcttcattcctgtttcgataggcggatcta  
agaaccctttcattgaaaaagttatcgctaacgtatttagctactttaaacctaacatggacga  
ctactgcaatagaaaacttggttcggttattgatattttctctgatgatgcctaccattctcaggag  
gatagcgttaccgaacatcgtggcaacagaagattgagttttcattcgcacagaattgaagaag  
ttcccaaaacagggctgggctcctcggcaggttttagtcacagttttaactacagctttggcctc  
cttttttgtatcggacctggaaaataatgtagacaaatatagagaagttattcataatttagca  
caagttgctcattgtcaagctcagggtaaaattggaagcgggttgatgtagcggcggcagcat  
atggatctatcagatatagaagattcccaccgcattaatctctaatttgccagatattggaag  
tgctacttacggcagtaaaactggcgcatttgggtgatgaagaagactggaatattacgattaaa  
agtaaccattttaccttcgggattaaactttatggatggcgatattaagaatgggttcagaaacag  
taaaactgggtccagaaggtaaaaaattgggtatgattcgcatatgccagaaagcttgaaaatata  
tacagaactcgatcatgcaaattctagattttatggatggactatctaaactagatcgcttacac  
gagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtcctcttgagaggaatgactgtacctgtc  
aaaagtatcctgaaatcacagaagttagagatgcagttgccacaattagacgttcctttagaaa  
aataactaaagaatctgggtgcgatatcgaacctcccgtaaaaactagcttattggatgattgc  
cagaccttaaaaggagttcttacttgcttaataacctgggtgctgggtggttatgacgccattgcag  
tgattactaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaatagacaaaagattttctaagggt  
tcaatggctggatgtaactcaggctgactggggtgttaggaaagaaaaagatccggaaacttat  
cttgataaataaaaggagaggggtgaccgtttacacagcatccgttaccgcacccgtcaacatcg  
caacccttaagtattgggggaaaaggacacgaagttgaatctgccaccaattcgtccatctc  
agtgaactttatcgcaagatgacctcagaacgttgacctctgcggctactgcacctgagtttgaa  
cgcgacactttgtggttaaatggagaaccacacagcatcgacaatgaaagaactcaaaattgtc  
tgcgcgacctacgccaattaagaaaggaaatggaatcgaaggacgcctcattgccacattatc  
tcaatggaaactccacattgtctccgaaaataactttcctacagcagctgggttagcttcctcc  
gctgctggctttgctgcattgggtctctgcaattgctaagttataccaattaccacagtcactt  
cagaaatatctagaatagcaagaaaggggtctgggtcagctttagatcgttggttgccggata  
cgtggcctgggaaatgggaaaagctgaagatgggtcatgattccatggcagtaacaaatcgagac  
agctctgactggcctcagatgaaagcttggtgctcctagttgtcagcgatattaaaaaggatgtga  
gttccactcaggggtatgcaattgaccgtggcaacctccgaactatttaagaaagaattgaaca  
tgtcgtaccaaagagatttgaagtcagtcgttaaagccattgttgaaaaagatttcgccaccttt  
gcaaaggaaacaatgatggattccaactctttccatgccacatgtttggactctttccctccaa  
tattctacatgaatgacacttccaagcgtatcatcagttgggtgccacaccattaatcagtttta  
cggagaaacaatcgttgcatacacgtttgatgcaggtccaaatgctgtgttgtagtacttagct  
gaaaatgagtcgaaactctttgcatttatctataaattgtttggctctgttcctggatgggaca  
agaaatttactactgagcagcttgaggctttcaaccatcaatttgatcatctaactttactgc  
acgtgaattggatcttgagttgcaaaaggatgttgccagagtgattttaactcaagtcgggttca  
ggcccacaagaacaaacgaatctttgattgacgcaagactggcttaccaaaggaataaaagg  
agaggggtgactgccgacaacaatagtagtccccatgggtgcagtatctagttacgccaattagt

图29B

gcaaaaccaaaccacctgaagacatttttgaagagtttctgaaattattccattacaacaaaga  
cctaatacccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgtttttctggatg  
atgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacgataatgctat  
tggtgccggtaccaagaaagtttgtcatttaattggaaaatattgaaaagggtttactacatcgt  
gcattctccgtcttttattttcaatgaacaaggtgaattacttttacaacaaagagccactgaaa  
aaataactttccctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatgacga  
attaggtttgaagggttaagctagacgataagattaaggcgctattactgcggcgggtgagaaaa  
ctagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagggttaagtttcaactttttaa  
acagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatggggtgaacatgaaattgattacatcct  
attttataagatcaacgctaagaaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagagac  
ttcaaattgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgc  
cttgggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactgggtgggagcaattagatgaccttc  
tgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataaaaaaacggccttggtcccgccg  
gttttttatfatttttcttccctccgcatgttcaatccgctccataatcgacggatgggtccctc  
tgaaaattttaacgagaaacggcgggttgacccggctcagtcocgtaacggccaagtcctgaaa  
cgtctcaatcgccgcttcccggtttccggctcagctcaatgccgtaacggtcggcggcgttttcc  
tgataccgggagacggcattcgtaatttgaatacatacgaacaaattaataaagtgaaaaaaat  
acttcggaaacattttaaaaaataaccttatttggtacttacatgtttggatcaggagttgagagt  
ggactaaaaccaaatagtgatcttgactttttagtcgtcgtatctgaaccattgacagatcaaa  
gtaaagaaatacttatacaaaaaatttagacctatttcaaaaaaataaggagataaaagcaactt  
acgatataattgaattaacaattattattcagcaagaaatggtaccgtggaatcatcctccaaa  
caagaattttatttatggagaatggttacaagagctttatgaacaaggatacattcctcagaagg  
aattaaattcagatttaaccataatgctttaccaagcaaaacgaaaaataaaagaatatacgg  
aaattatgacttagaggaattactacctgatattccattttctgatgtgagaagagccattatg  
gattcgtcagaggaattaatagataattatcaggatgatgaaaccaactctataattaactttat  
gccgtatgattttaactatggacacgggtaaaatcataccaaaagatattgcgggaaatgcagt  
ggctgaatcttctccattagaacataggagagaattttgttagcagttcgtagtattcttgga  
gagaattattgaatggactaatgaaaatgtaaatttaactataaactatttaaataacagattaa  
aaaaattataatgtaacctttgctttcaaatgagtagaaataatgcacatccatgtttgtatcg  
tgcaataaaagtgtttcatccgtaggaaaaaatgactttagtatctgttccgctttttctgatg  
aatgtgctcccôgacaaaattgaatgaatcatggacatttgctggctttgatacagcgaagc  
agccgttcctatgtttatatatcggaatttaacagcaggacaaaaaacaccatgacagccatcgtc  
accacttattcacacgcacataaacctttcctgacttttggaacagatgatagctcatcaaaa  
atcccggcattgcaaaataaatcgtatatggcattactgcaccataatcttttgagatttgatt  
gggatatggcgcaagcagcaagacaagcagtcggataatcagcgtataaaaataagcctagtaag  
atcttatccgttctccaatacagcttgaaaaacactacattcaacgcaatgggaagagtgatga  
tgaaaaacagaaacacgaatgcaatcggtccatcccatccgggtattccttccaatacgaaaa  
gaaactaaaaatcatttgtacgatcggcaaaactgacaacagcaaggtcgaacgtataaaaactta  
ccctttccgcatgatcagcggcatcagcatatagtgaagccgtcagcagcacatatccgt  
ataacaaaaaatgcagcagcggcagcagttcttttccgtcctctcttaagtaagcgtggtgaa  
gtttgttgattgcacctggtgaataagttcaacagacactcccggcagcagcacaatccgcaat  
ataacaccggccaagaacattgtgctgctgccggtttattttgggatgatgcacaaaagatata  
agccggccagaacaacaattgaccattgaatcagcagggtgctttgtctgcttaataaaaata  
acgttcgaaatgcaatacataatgactgaataactccaacacgaacaacaaaagtgcgcatttt

图29C



Aataaagctaattgattcagtcacacataattgatagacgaattctgctacaggtcacgtggctat  
 gtgaaggatcgcgcggtccagttaagagcaaaaacattgacaaaaaatttattttatgctaaaat  
 ttactattaatatatttgtatgtataataagattctcctggccaggggaatcttattttttgtg  
 gaggatcatttcatgaggaaaaatgagtcacagcttaacgtctctaatcttccagcttttgcctgtg  
 catatcacagccgatatgacacacctcttattttttgatgattttatcgcaaaagatctcattaa  
 cgaaaaagagtttatcgacatcagtaaaaatatgattcaagaaatatcgtttttcaacaaagag  
 atcgccgaacgtcttcaaaatgatcctgaaaaaatattaaaatgggttgcacaaatccagctgt  
 ctccaacgcccctagcacgtgcttcttatttgtgaaaaagtcttgcacaaacgaattaatcctggg  
 ggcaaaacagtatgtcattcttggagcgggactggatactttctgctttcggcatccagaatta  
 gaaaacagcttacaggttttcgaggttgatcatccggccacacagcaattgaaaaaaaataagc  
 tgaaggatgcaaacttgacaattccgggtcatcttcattttgttcctatggatttcaccaaacc  
 gttttcgtatgatcctctcttagatgaaggatttaaaaacacaaaaacattcttcagccttctc  
 ggagtgtcttattatgtaacacgggaagaaaatgcaagcttgatcagcaatttattttctcatg  
 tccgcctggaagctctattgtttttgattatgctggacgaaacactttttacagcaaaaggac  
 gtcgaatcgagttgaacatatggtgaagatggctgccgcaagcggggaaccgatgaaatcatgt  
 ttcacttatcaagagattgaacatctg  
 (SEQ ID NO:47)

图29D

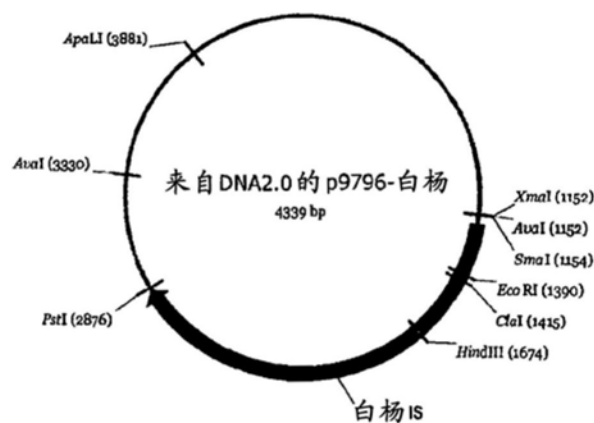


图30

5' -

tagaaaaactcatcgagcatcaaataaaactgcaattttattcatatcaggattatcaataccat  
atTTTTgaaaaagccgtttctgtaataagaggagaaaactcacccgagggcagttccataggatggc  
aagatcctgggtatcggtctgcgattccgactcgtccaatcaatacaacctattaattttcccc  
tcgtcaaaaataagggttatcaagtgagaaatcacccatgagtgacgactgaatccggtgagaatg  
gcaaaagtttatgcattttctttccagacttggttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaa  
atcactcgcacatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgctgagcgaggcgaaatacgcga  
tcgctgttaaaaggacaattacaacaggaatcgagtgcaaccggcgaggaacactgccagcg  
catcaacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaataacctggaacgctgtttttccggg  
gatcgagtggtgagtaaccatgcacatcaggagtagcgataaaatgcttgatggcgggaagt  
ggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctac  
ctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttccatacaagcgaatagattgtcgc  
acctgattgcccgcacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttgaa  
tttaatcgcgccctcgacgtttcccggtgaatatggctcatattcttctttttcaatattatt  
gaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataa  
acaaataggggtcagtggtacaaccaattaaccaattctgaacattatcgcgagcccatttata  
cctgaatatggctcataacacccttgtttgcctggcgagtagcgcggtgggtccacctgac  
cccatgccgaactcagaagtgaacgcgtagcgccgatggtagtggtgggactcccatgcga  
gagtagggaactgccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgcc  
cggttaattaggggtgtcgcccttagtcgctgaacatgtgctctgtttctaccgagaacgt  
ttccttactgagacggaaccgagggcagtcgtagcggaactacgagccgaatagctgggac  
tacgatttctgctgtcttccgatactgacgaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaga  
aactggaggctgaagtgcgcgcgaaattaacaacgagaaagctgaattcctgactctgctgga  
gctgatcgataacgtacagcgccctgggtctgggttaccgcttcgaatctgatatccgtcgcgca  
ctggatcgtttcgtaagcagcgccggtttcgatggcgtgacaaaacgagcctgcacgctaccg  
cgctgtccttccgtctgctgcgtcagcacggcttcgaagtcttctcaggaagcatttccgggtt  
caaagatcaaaacggtaacttccctggaaaacctgaaagaagacactaaggcgatcctgagcctg  
tatgaggcaagctttctggccctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgctattcgcca  
tctcccatctgaaagagctgtctgaagagaaaatcggttaaggaaactggcagagcaggttaatca  
cgactggaactgccgctgcacgtcgtacccagcgtctggaggcggtttgggtccatcgaagcg  
taccgcaaaaaggaggatgctaaccaggttctgctggaactggccatcctggactacaacatga  
tccagtcggtttaccagcgtgatctgcgtgaaacctccggttggtggcgccgtgtgggctggc  
gacaaaactgcacttcgctaaggaccgctgattgagtccttttactgggcagtcggcggttgcg  
ttcgaaacctcagttattctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactatta  
tcgacgacatctacgacgtttacggtagctctggacgagctggaactgtttaccgacgctgtcga  
acgttgggatgttaacgccatcaacgatctgcctgactacatgaaactgtgcttccctggcactg  
tataacacgatcaacgaaattgcatacgacaacctgaaagacaaagggtgaaaacatcctgccgt  
acctgactaaagcgtgggcggtatctgtgtaacgcttttctgcaagaagcgaaatggctgtataa  
caaatccactccgacctttgacgattatttcggcaatgcctggaaatccagctctggcccgctg  
caactgatcttcgcttatttttgcggttggtccaaaacatcaaaaaggaggaaattgaaaacctgc  
aaaaataaccagatattcattagccgtccttctcatatctttcgccgttgcaacgacctggcaag  
cgctccgcagagatcgacgtggcgaaaccgctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaag  
ggcatttccgaagagctggcaaccgagagcgtaatgaatctgatcgacgaaacctgtaagaaaa  
tgaacaaagaaaaactgggtggctccctgttcgctaaaccgttcgtagagactgctattaacct

图31A

ggcacgtcagagccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagcccggatgaactgact  
cgtaaacgtgtactgtctgttatcaccgaaccgattctgccgttcgaacgttaactgcagcgtc  
aatcgaaagggcgacacaaaatttattctaaatgcataataaatactgataacatcttatagtt  
tgtattatattttgtattatcggtgacatgtataattttgatatcaaaaactgattttcccttt  
attattttcgagattttattttcttaattctctttaacaaactagaaatattgtatatacaaaaa  
atcataaataatagatgaatagtttaattataggtgttcacatcgaaaaagcaacgtatctt  
atttaaagtgcgttgctttttctcatttataaggttaaataattctcatatatcaagcaaagt  
gacaggcgcccttaaatattctgacaaatgctctttccctaaactccccccataaaaaaacccg  
ccgaagcgggtttttacgttattttgcggttaacgattactcgttatcagaaccgcccaggggg  
cccagccttaagactggcgcgtcgttttacaacacagaaagagtttgtagaaacgcaaaaaggcc  
atccgtcaggggcttctgcttagtttgatgcctggcagttccctactctcgccctccgcttcc  
tcgctcactgactcgctgcgctcggtcggtcggtgcggcgagcggtatcagctcactcaaagg  
cggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggcca  
gcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggtttttccataggctccgccccct  
gacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtgcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagat  
accaggcggtttccccctggaagctccctcgctgcgctctcctgttccgaccctgccgcttacgg  
atacctgtccgcttttctcccttcgggaagcgtggcgcttttctcatagctcacgctgtaggtat  
ctcagttcgggtgtaggtcggtcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccggttcagccg  
accgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgcc  
actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttc  
ttgaagtgggtgggctaactacggctacactagaagaacagtatgttggtatctgcgctctgctga  
agccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctggtag  
cggtgggtttttttggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcct  
ttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgacgcgcgtaactcacgttaagggat  
tttggatcatgagcttgccgcgtcccgtcaagtcagcgtaatgctctgcttt  
(SEQ ID NO:48)

图31B

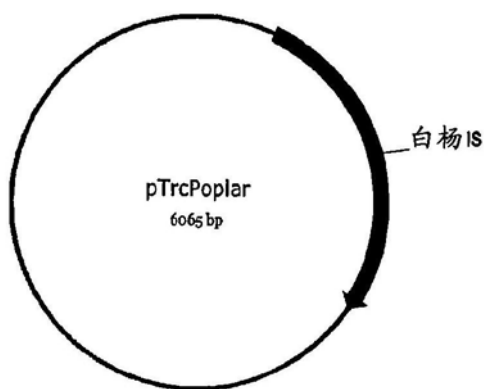


图32

5' -

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcgga  
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgactccc  
gttctggataatgttttttgcgcgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
gaaacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt  
gtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaat  
gtatcgattaataaaggaggaataaaccatgtgctctgtttctaccgagaacgtttccttact  
gagacggaaaccgaggcacgtcgttagcgcgaactacgagccgaatagctgggactacgatttcc  
tgctgtcttccgatactgacgaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaagaaactggaggc  
tgaagtgcgcgcgcaaatcaaacagagaaagctgaattcctgactctgctggagctgatcgat  
aacgtacagcgcctgggtctgggttaccgcttcgaatctgatatccgtcgcgcactggatcggt  
tcgtaagcagcggcggtttcgatggcgtgacaaaacgagcctgcacgctaccgcgctgtcctt  
ccgtctgctgctcagcacggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggtttcaaagatcaa  
aacggtaacttcttgaaaaacctgaaagaagacactaaggcgatcctgagcctgtatgaggcaa  
gctttctggccctggaggggtgagaacatcctggatgaggcgcgcgtattcgccatctcccatct  
gaaagagctgtctgaagagaaaatcggttaagggaactggcagagcaggttaatcacgcactggaa  
ctgccgctgcacgtcgtaccagcgtctggaggcggtttgggtccatcgaagcgtaccgcaaaa  
aggaggatgctaaccagggttctgctggaactggccatcctggactacaacatgatccagtccgt  
ttaccagcgtgatctgctgaaacctccggttgggtggcgcgcgtgtgggcctggcgaccaaactg  
cacttcgctaaggaccgcctgattgagcttttttactgggcagtcggcggttgcgttcgaacctc  
agtattctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactattatcgacgacat  
ctacgacgtttacggtactctggacgagctggaactgtttaccgacgctgtcgaacgttgggat  
gttaacgccatcaacgatctgcctgactacatgaaactgtgcttctggcactgtataaacacga  
tcaacgaaattgcatacgacaacctgaaagacaaaggtgaaaacatcctgccgtacctgactaa  
agcgtgggcggatctgtgtaacgcttttctgcaagaagcgaaatggctgtataacaaatccact  
ccgacctttgacgattatttcggcaatgcctggaaatccagctctggcccgctgcaactgatct  
tcgcttattttgcggttgtccaaaacatcaaaaaggaggaaattgaaaacctgcaaaaatacca  
cgatatcatttagccgtccttctcatatctttcgctgtgcaacgacctggcaagcgcgtccgca  
gagatcgacgtggcgaaaccgctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaagggcatttccg  
aagagctggcaaccgagagcgtaatgaatctgatcgacgaaacctgtaagaaaatgaacaaaga  
aaaactgggtggctccctgttcgctaaccggttcgtagagactgctattaacctggcacgtcag  
agccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagcccgatgaactgactcgtaaacgtg  
tactgtctgttatcaccgaaccgattctgccgttcgaacgttaactgcagctggtaccatatgg  
gaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgacca  
tcatcatcatcatcattgagtttaaagggtctccagcttggctgttttggcggtatgagagaaga  
ttttcagcctgatacagattaaatcagaacgcgagaagcggcttgataaaaacagaatttgcctgg  
cggcagtagcgcggtgggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgcc  
gatggtagtgtgggtctcccatgcgagagttagggaactgccaggcatcaataaaaacgaaag  
gctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgttgcggtgaacgctctcctgagta  
ggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccgagggtggcgggcagg  
acgcccgcataaaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggccttttt  
gcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgag  
acaataaccttgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttc

图33A

cgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcaccagaaacgc  
tggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatct  
caacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttt  
aaagttctgctatgtggcgcggtattatcccggtgttgacgcgggcaagagcaactcggtcgcc  
gcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacgga  
tggtcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacccatgagtataacactgcggccaac  
ttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatc  
atgtaactcgccttgatcggtgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtga  
caccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttact  
ctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgc  
gctcggcccttccggctggctgggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcg  
cggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagttatctacacgacg  
gggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgatta  
agcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcattt  
ttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaactcccttaacgt  
gagttttcggtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctt  
tttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccacgcgtaccagcgggtggtttgtt  
gccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacca  
aatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgccta  
catacctcgctctgctaactctgttaccagtggtgctgccagtgggcgataagtcgtgtcttac  
cgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgagcggctcgggctgaacggggggttcg  
tgacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctat  
gagaaagcgccacgcttccgaagggaagaaaggcgagcaggtatccggtgaagcggcagggtcgg  
aacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcggg  
tttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatgga  
aaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcttgcccttttgcgtggccttttgcacatggt  
ctttcctgcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgaactgatacc  
gctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcgaaggaagcgggaagagcgcctga  
tgcggtatttttctccttacgcactctgtgcggtatttcacaccgcataatggtgcactctcagtac  
aatctgctctgatgcgcgatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtca  
tggtgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgcctgaacgggcttgtctgctccggc  
atccgcttacagacaagctgtgaccgctctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtca  
tcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgt  
tgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcggccggaagagagtc  
ttcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagtatgccggtgtctctt  
atcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagt  
ggaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaa  
cagtcgttgcgtgattggcggtgccacctccagtcctggccctgcacgcgcgctcgcaaatgtcg  
cggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaag  
cggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatc  
attaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttcggg  
cgttattttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacgg  
tacgcgactggcggtggagcatctggtcgattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggc  
ccattaagttctgtctcggcgcgctctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatc

图33B

aaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaacccat  
gcaaatgctgaatgagggcatcggtccactgcatgctggttccaacgatcagatggcgctg  
ggcgcaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggat  
acgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgcggtcaaccaccatcaaacaggattttcg  
cctgctggggcaaacccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcgggtgaagggc  
aatcagctgttgcccgctctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgc aaaccg  
cctctcccgcgcgcttgccgattcattaatgcagctggcacgacagggtttcccgactggaaag  
cgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagtttagcggaattgatctg  
(SEQ ID NO:49)

图33C

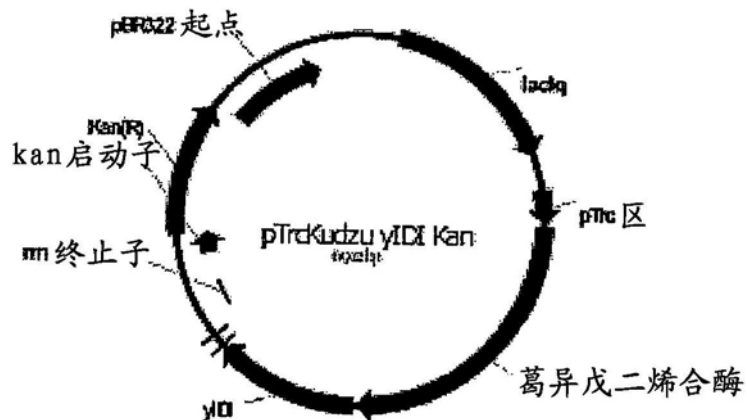


图34



5' -

ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag  
aggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc  
ggcatgcatttacgttgacaccatcgaatgggtgcaaacctttcgcggatggcatgatagcgc  
ccggaagagagtcattcagggtgggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgtatgtcgcagagt  
atgccgggtgtctcttatcagaccgtttcccgctgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa  
aacgcgggaaaaagtggagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcaca  
caactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtcctggccctgcacgcgc  
cgtcgcgaattgtcgcggcgattaaatctcgcgcgcgatacaactgggtgccagcgtgggtgtc  
gatggtagaagcgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgc  
gtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcct  
gcactaatgttccggcggttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagttattttt  
ctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatc  
gcgctgttagcgggcccattaagtctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaat  
atctcactcgcgaatcaaattcagccgatagcggaaacgggaaggcgaactggagtccatgtccgg  
ttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactgcgatgctgggtgccaac  
gatcagatggcgtggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggctgcgcgttggtgcggata  
tctcggtagtgggatacgcgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccacat  
caaacaggattttcgcctgctggggcaaacaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc  
caggcgggtgaagggcaatcagctgttgcccgctctcactggtgaaaagaaaaaccacctggcgc  
ccaatacgcgaaccgcctctccccgcgcgttgcccgattcattaatgcagctggcacgacaggt  
ttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg  
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgcctcaaggcgcactccc  
gttctggataatgttttttgcgcgcgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
gaaacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt  
gtgggcactcgcaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggatatattaat  
gtatcgattaataaggagggaataaacatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacc  
gagcataattcccgctcgttccgcaaacatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaat  
ccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaaagcgaccaaactggaggagaagt  
tcgctgcattgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg  
cagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtac  
tgctggacgaaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgct  
gcgtcagcacggttttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggt  
ttcagcgggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg  
gttttcgaggggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcaccacctgaagaacaa  
cctgaaagaaggcattaataccaagggtgcagaacaagtgagccacgccttggaactgccatat  
caccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttccctggataaaatcgaaccgaaagaacgc  
atcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagacctgcaccagaa  
agagctgcaagatctgtcccgctgggtggaccgagatgggcctggctagcaaacctggattttgta  
cgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagaccgcagtttggtg  
aatgtcgcgaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt

图35A

ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgct  
attaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgaca  
cgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg  
tgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatgggtccaacaacaaaattatcccggccttc  
tccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttact  
tttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttcca  
tggctctgggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg  
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtacca  
gcgaggaacaggcccggaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcg  
tgaacgcgttagcgactccacctgctgcctaaagcggttcattggaaatcgagtttaacatggca  
cgtgtttccactgcacctaccagtatggcgatgggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaa  
accgcatcaaactgctgctgattgaccttttcccgatttaaccagctgatgtatgtctaactgca  
tcgcccttaggaggtaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatgggtgcagtatc  
tagttacgccaatttagtgcaaaaacaaacacctgaagacattttggaagagtttccctgaaatt  
attccattacaacaaagacctaatacccgatctagtgcacgtcaaatagcgaaagcgagaaa  
catgtttttctggctcatgatgaggagcaaatgaattaatgaatgaaaattgtattgttttggga  
ttgggacgataatgctattgggtgccggtaccaagaaagtttgcatttaattgaaaatattgaa  
aagggtttactacatcgtgcattctccgtctttattttcaatgaacaaggtgaattacttttac  
aacaagagccactgaaaaaataactttccctgatctttggactaacacatgctgctctcatcc  
actatgtattgatgacgaattaggtttgaagggttaagctagacgataagattaaggggcgctatt  
actgcggcggtgagaaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaaggg  
gtaagtttcaactttttaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaacctgggggtgaaca  
tgaaattgattacatcctattttataagatcaacgctaagaaaaacttgactgtcaacccaaac  
gtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacc  
caagttacaagtttacgccttgggttaagattatttgcgagaattacttattcaactgggtggga  
gcaattagatgacctttctgaagtggaaaatgacaggcaaatcatagaatgctataacaacgc  
gtcctgcagctggtaccatattgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagag  
gatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaacgggtctccagcttgg  
ctgttttggcggtatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggt  
ctgataaaacagaattttgcctggcggcagtagcgcggtgggtcccacctgaccccatgccgaact  
cagaagtgaacgcgctagcgccgatggtagtgtgggtctccccatgcgagagtaggggaactg  
ccaggcatcaaataaaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttttatctgttggtt  
gtcgggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcggggagcggtttgaacgttgcaagcaa  
cggcccggaggggtggcgggcaggacgcccgcataaaactgccaggcatcaaattaagcagaagg  
ccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacat  
tcaaataatgtatccgcttaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagcc  
ctgcaaagtaaaactggatggctttctcgccgccaaggatctgatggcgaggggatcaagctct  
gatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctc  
cggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggtgctctga  
tgccgccgtgttcgggtgtcagcgagggggcgccgggtctttttgtcaagaccgacctgtcc  
gggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggtatcggtggctggccacgacgggcgttc  
cttgcgagctgtgctcgacgttgctactgaagcggaagggaactggctgctattgggcgaagt  
gccggggcgaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgat

图35B



gcaatgcgggcggtgcatacgcttgatccgggtacctgccattcgaccaccaagcgaaacatc  
 gcatcgagcgagcacgtactcggtatggaagccgggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaaga  
 gcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggtcaaggcgagcatgcccgacggcgag  
 gatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgcgaatatcatgggtggaaaatggccgctttt  
 ctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctac  
 ccgtgatattgctgaagagcttggcgggcaatggggtgaccgcttcctcgtgctttacgggtatc  
 gccgctcccgattcgcagcgcacgccttctatcgcccttcttgacgagttcttctgacatgacc  
 aaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggat  
 cttcttgagatccttttttctgocgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctacc  
 agcgggtgggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagc  
 agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact  
 ctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtctaactcgtgtaccagtggctgctgccagtggcga  
 taagtctgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcgggtcgggc  
 tgaaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacc  
 tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaggagaaaggcggacaggtatccggt  
 aagcggcaggggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctt  
 tatagtccgtgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggg  
 ggccgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgggttcctggccttttgcggcc  
 ttttgcctcacatgttctttcctgcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgccttt  
 gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaag  
 cggaagagcgcctgatgcgggtattttctccttacgcacgtgtgcgggtatttcacaccgcatacg  
 gtgcaactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgc  
 tacgtgactgggtcatggctgcgccccgcaccccgccaacaccgcgtgacgcgccttgacgggc  
 (SEQ ID NO:50)

图35C

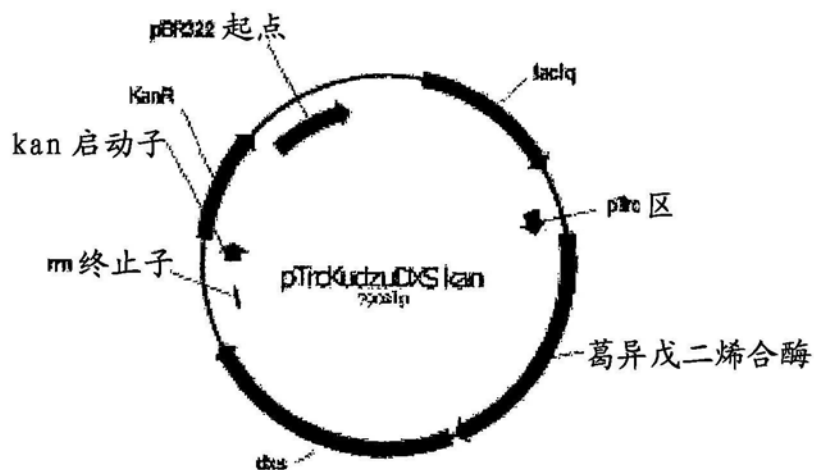


图36

5'-

ttgtctgctcccgccatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag  
aggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc  
ggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgc  
ccggaagagagtcaattcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatagatgtcgcagagt  
atgcgggtgtctcttatcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa  
aacgcgggaaaaaagtgggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacia  
caactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcggttgccacctccagtcctggccctgcacgcgc  
cgtcgcaaatgtgcgcgcgattaaatctcgcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtc  
gatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgc  
gtcagtggtgtgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcct  
gcactaatgttccggcggtacgcgactggcgctggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatc  
ctcccatgaagacgggtacgcgactggcgctggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatc  
gcgctgttagcgggcccattaagtctgtctcggcgctctgcgtctggctggctggcataaat  
atctcactcgcaatcaaatcagccgatagcggaaacgggaaggcgcactggagtgccatgtccgg  
ttttcaacaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactgcgatgctggttgccaac  
gatcagatggcgtctggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggtgcgcgttggtgcggata  
tctcggtagtgggatacgcgataaccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccat  
caaacaggattttcgcctgctggggcaaacagcgtggaccgcttgcgtgcaactctctcagggc  
caggcgggtgaagggaatcagctgttgccgctctcactggtgaaaagaaaaaccacctggcgc  
ccaatacgcgaaccgcctctccccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcagcagaggt  
ttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg  
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgtcaaggcgcactccc  
gttctggataatgttttttgcgcgcgacatcataacgggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
gaaacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt  
gtgggcactcgaccggaattatcgattaaactttattatataaaattaaagaggtatatattaat  
gtatcgattaaataaggaggaataaaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacc  
gagcataattcccgtcgttccgcaaacctatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaat  
ccctggagaacgcactgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagt  
tcgctgcatgatcaaccgtgtagacaccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg  
cagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtac  
tgctggacgaaaaacaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgct  
gcgtcagcagcgttttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggt  
ttcagcgggtgaaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg  
gtttcagagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcaccacctgaagaacaa  
cctgaaagaaggcattaataccaaggttgagaacaagtgagccacgcctggaactgccatat  
caccagcgtctgcaccgtctggaggcagcttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgc  
atcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagaccctgcaccagaa  
agagctgcaagatctgtcccgtggtggaccgagatgggcctggctagcaaacctggattttgta  
cgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggactgggtatggcgccagaccgcagtttggtg  
aatgtcgcaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt  
ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgct

图37A

attaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacacogttaacgaca  
cgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg  
tgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatgggtccaacaacaaaattatcccggtttc  
tccaagtacctggaaaacgccagcggtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttact  
tttcggtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcggttccctgacgcgacttcca  
tggctctgggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg  
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtacca  
gcgaggaacaggcccgcaagaactgcgtaaactgatcgacgcgcaatggaaaaagatgaatcg  
tgaacgcgttagcgactccacctgctgcctaaagcggtcatggaaatcgagtttaacatggca  
cgtgtttccactgcacctaccagtatggcgatgggtctgggtcgccagactacgcgactgaaa  
accgcatcaaactgctgctgattgacctttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgca  
ttcgcccttaggaggtaaaaaacatgagttttgatattgcaaatacccgacctggcactgg  
tcgactccaccaggagttacgactgttgccgaaagagagtttaccgaaactctgcgacgaact  
gcgcgcgtatttactcgacagcgtgagccgttccagcgggcacttcgcctccgggctgggcag  
gtcgaactgaccgtggcgctgcaactatgtctacaacaccccggttgaccaattgatttgggatg  
tggggcatcaggcttatccgcataaaattttgaccggacgcgcgacaaaatcggcaccatccg  
tcagaaaggcggtctgcaccggttcccggtggcgcggaagcgaatatgacgtattaagcgctc  
gggcattcatcaacctccatcagtgccggaattgggtattgcggttgcgcgaaaaagaaggca  
aaaatcgccgcacgctctgtgtcattggcgatggcgcgattaccgcaggcatggcggttgaagc  
gatgaatcacgcggggcgatatccgctcctgatatgctggtgattctcaacgacaatgaaatgtcg  
atttccgaaaatgtcggcgcgctcaacaacctctggcacagctgctttccggtaagctttact  
cttcaactgcgcgaaggcgggaaaaaagttttctctggcggtgccgcaattaaagagctgtcaa  
acgcaccgaagaacatattaaaggcatggtagtgcctggcacgttggttgaaagagctgggcttt  
aactacatcgcccggtggacggtcacgatgtgctggggcttatcaccacgctaaagaacatgc  
gcgacctgaaaggcccgagttcctgcataatcatgaccaaaaaaggctcggttatgaaccggc  
agaaaaagaccgatcactttccacgcggtgcctaaatttgatccctccagcggttggttgccg  
aaaagtagcgggcggtttgcccagctattcaaaaatctttggcgactggttgctgcgaaacggcag  
cgaaagacaacaagctgatggcgattactccggcgatgcgtgaaggttccggcatggtcgagtt  
ttcacgtaaattcccggtcgctacttcgacgtggcaattgccgagcaacacgcgggtgaccttt  
gctgcgggtctggcgattggtgggtacaaacccattgtcgcgatttactccactttcctgcaac  
gcgcctatgatcagggtgctgcatgacgtggcgattcaaaagcttccgggtcctggtcgccatcga  
ccgcgcgggcatgttggtgctgacggtcaaaccatcagggtgcttttgatctctcttacctg  
cgctgcataccggaaatgggtcattatgaccccgagcgatgaaaacgaatgtcgccagatgctct  
ataccggctatcactataacgatggcccgtcagcggtgcgctaccgcggtggcaacgcggtcgg  
cgtggaactgacgccgctggaaaaactaccaattggcaaaggcattgtgaagcgtcggtggcgag  
aaactggcgatccttaactttggtacgctgatgccagaagcggcgaaagtcgccgaatcgctga  
acgccacgctggtcgatatgcgtttttgtgaaaccgcttgatgaagcgttaattctggaaatggc  
cgccagccatgaagcgtggtcacctagaagaaaacgccattatgggcggcgaggcagcggc  
gtgaacgaagtgtgatggcccatcgtaaacagctaccggtgctgaacattggcctgcggact  
tctttattccgcaaggaaactcaggaagaaatgcgcgcggaactcggcctcgatgcgcgtggtat  
ggaagccaaaatcaaggcctggctggcataactgcagctggtaccatatgggaattcgaagctt  
tctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcgctcgaccatcatcatcatcat  
cattgagtttaaacggtctccagcttggtgttttggcggtgagagaagattttcagcctgat  
acagattaaatcagaacgcagaagcgggtctgataaaacagaatttgctggcggcagtagcgcg

图37B

gtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgccgtagcgccgatggtagtggtg  
ggtctccccatgcgagagtagggaaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaag  
actgggccttttcgttttatctgttgtttgtcgggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcc  
gggagcggattttgaacgttgccaagcaacggcccgagggtggcgggcaggacgcccgcataa  
actgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgctttctacaaa  
ctctttttgtttatttttctaaatacattcaaataatgtatccgcttaacgggaattgccagctg  
ggcgccctctggtaagggtgggaagccctgcaaagtaaaactggatggctttctcgccgccaaag  
gatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgatt  
gaacaagatggattgcacgcagggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgact  
gggcacaacagacaatcggtctgctctgatgccgcgctgttccggctgtcagcgcagggggcgccc  
ggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcg  
ctatcgtggctggccacgacggcggttcccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgg  
gaagggactggctgctattgggcgaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcc  
tgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgttgatccggctacc  
tgcccattecgaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggaaggacgggtc  
ttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggtcgcgccagccgaactgttcgccag  
gctcaaggcgagcatgccgcagggcaggatctcgtcgtgacctatggcgatgctgtctgccg  
aatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcg  
accgctatcaggacatagcgttggctaccgctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggc  
tgaccgcttcctcgtgctttacgggtatcgccgctcccgattcgcagcgcacgccttctatcgc  
cttcttgacgagttcttctgacgcacatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgag  
cgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctg  
ctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctacca  
actctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaataactgtccttctagtg  
agccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgcta  
cctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacga  
tagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgg  
agcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcc  
cgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaacaggagagcgacaggg  
gagcttcagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttg  
agcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggc  
ctttttacggttcctggccttttctgtggccttttctcacatgttcttctcgttatccct  
gatctctgtgataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacga  
ccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcgggaagagcgccctgatgcggtattttctccttac  
gcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtaaatctgctctgatgccgca  
tagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccc  
gccaacaccgctgacgcgcctgacgggc  
(SEQ ID NO:51)

图37C

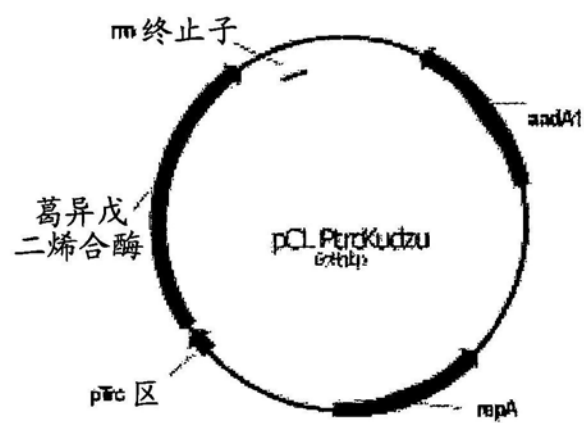


图38

5' -

ctggcgtaatagcgaagaggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatggc  
gaatggcgccctgatgcggtatcttctccttacgcacatctgtgcggtatctcacaccgcatatggc  
gcactctcagtagcaatctgctctgatgcccagatagttaagccagccccgacaccgccaacacc  
cgctgacgagcttagtaaaagccctcgctagatcttaatgaggatgttgcgattacttcgccaac  
tattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatactcccaatttggtgtagggcttatt  
atgcacgcttaaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggtgtgagcaattatgtgc  
ttagtgcatctaacgcttgagtttaagccgcccgcgaagcggcgctcggttgaaacgaattgtta  
gacattatttgccgactaccttggtgatctcgcccttcacgtagtggaacaaattcttccaactg  
atctgcgcccagggccaagcgatcttcttcttgccaagataagcctgtctagcttcaagtatg  
acgggctgatactgggcccgcaggcgctccattgccagtcggcagcgacatccttcggcgcgga  
ttttgcccgttactgcgctgtaccaaagtcggggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgcc  
agcccagtcgggcccgcaggttccatagcggttaagggttctatttagcgccctcaaatagatcctgt  
tcaggaaccggatcaaagagttcctccgcccgtggacctaccaaggcaacgctatgttctcttg  
cttttgctcagcaagatagccagatcaatgtcgatcggtggctcgaagatacctgcaagaat  
gtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatg  
tcgtcgctgcacaacaatgggtgacttctacagcgcggaatctcgctctctccaggggaagccg  
aagtttccaaaaggctcggtgatcaaagctcgccgctgtgttctcatcaagccttacggctaccgt  
aaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgcatccactgaggagccgtacaaatgt  
acggccagcaacgctcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcg  
atacttcggcgatcacgccttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgcctgctg  
cgtaacatcggttgctgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttg  
gatgcccagggcatagactgtacccccaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgcccactg  
cgccgttaccaccgctgcgttcggtcaagggttctggaccagttgctgagcgcatagcgtactt  
gcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcacccgtttccac  
gggtgtcgctcaccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcga  
acgagcgcaagggttcggtctccacgcacgtcaggcattggcgcccttgctgttctctacgg  
caagggtgctgtgcacggatctgcctggcttcaggagatcggaagacctcgccgctcgcgccgc  
ttgcccgttggtgctgaccccgatgaagtggttcgcacctcggttttctggaaggcgagcatc  
gtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgaggatcagtgagggtttgcaactgcgggt  
caaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgctgcccggagggaagggtccaaggatcgg  
gccttgatgttacccgagagcttggcaccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacggg  
ttttgctgcccgaacagggtgttctggtgttgctagttgttatcagaatcgagatccggc  
ttcagccggtttgcccgtgaaagcgctatttctccagaattgccatgatttttccccacgg  
gaggcgtcactggctcccggtgttgctggcagctttgattcgataagcagcatcgctgtttcag  
gctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagggtgttcaatttcattgttctagt  
tgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgt  
cgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctat  
cttttttacaccgttttcatctgtgcataatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaaca  
gttggttctactttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacct  
cagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggttcgttggttttgctgagccatg  
agaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaaactggt  
gagctgaatttttgagttaaagcatcggtgtagtgtttttcttagtccgttatgtaggtaggaa  
tctgatgtaatggttggttggtatcttctcaccattcatttttatctgggtgttctcaagttcgg

图39A



ttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcgccctcg  
cttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacc  
cattgggttaagccttttaaactcatggtagttattttcaagcattaacatgaacttaaatcat  
caaggctaattctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttcttttaataaccactc  
ataaatcctcatagagtatttgttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaat  
ttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcaactaaaaactaattctaatttttcgcttg  
agaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaggattcctgatttc  
cacagttctcgtcatcagctctctggttgccttagctaatacaccataagcattttccctactg  
atgttcatcatctgagcgtattgggtataagtgaacgataaccgtccgttctttccttgtaggg  
tttcaatcgtggggttgagtagtccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaa  
gtcatagcgactaatcgctagttcatttgccttgaaaacaactaattcagacatacatctcaat  
tggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtc  
ttttcctttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagaccttgcctggaaaacttgtaaatc  
tgctagacctctgtaaattccgctagaccttgcctgtgtttttttgttttatattcaagtgggt  
ataatttatagaataaagaaagataaaaaagataaaaaagaatagatcccgccctgtgtata  
actcactacttttagtcagttccgcagattacaaaaggatgtcgaaacgctgtttgctcctct  
acaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctg  
aatattccttttgcctccgacctcaggcacctgagtcgctgtcttttgcgtgacattcagttc  
gctgcgtcgcaggtctggcagtgaaatgggggtaaatggcactacaggcgccctttatggattc  
atgcaaggaaaactaccataatacaagaaaagccgctcacgggcttctcaggcgcttttatggc  
gggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgcccctctgattttcca  
gtctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatagcaccagtaaggca  
gcggtatcatcaacaggcttaccgctcttactgtcgggaattcgcttggccgattcattaatg  
cagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagc  
ggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctcttaac  
aatattatcagacaatctgtgtgggcaactcgaccggaattatcgattaaactttattattaaaaat  
taaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgctgacctctc  
tcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaaactatcagccaaacctgtgg  
aatttcgaattcctgcaatccctgggaaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcga  
ccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacaccagccgctgtccctgct  
ggagctgacgacgatgtgcagcgccctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaa  
gccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccg  
ctctgtctttccgtctgctgctgcagcaggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcggtt  
caaggataaagaaggtgggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctg  
tatgaagcgtcttacctgggtttcgaggggtgagaacctgctggaggaggcgctaccttttcca  
tcaccacactgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaagggtgcagaacaagtgagcca  
cgccctggaactgccatataccagcgtctgcacctctggaggcacgttggttccctggataaa  
tacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatgg  
tacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgtggtggaccgagatgggcctggc  
tagcaaaactggattttgtacgcgaccgcctgatggaagtttattttctgggcaactgggtatggcg  
ccagaccgcagtttgggtgaatgtcgaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatca  
tcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtaga  
gcgctgggacgttaacgctattaacaccctgcccgaactatatgaaactgtgtttcctggcactg  
tacaacaccgttaacgacacgtcctattctatttctgaaagagaaaaggtcataacaacctgtcct

图39B

atctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaa  
 caaaattatcccggcttttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccgggtgtagcg  
 ctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgc  
 gttccctgaccgacttccatggtctggtgcggttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacga  
 tctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatg  
 cacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgagaactgcgtaaaactgatcgacgccc  
 aatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcggttcattgga  
 aatcgacgttaacatggcacgtgtttccactgcacotaccagtatggcgatggtctgggtcgc  
 ccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgaccctttcccgattaaccagc  
 tgatgtatgtctaactgcagctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactca  
 tctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggt  
 ctccagcttggctgttttggcgatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaac  
 gcagaagcggctctgataaaacagaatttgccctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccc  
 catgccgaactcagaagtgaacgcgcgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgaga  
 gtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttt  
 atctgttgtttgtcgggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcggggagcggatttgaacg  
 ttgcgaagcaacggcccgagggtggcgggcaggacgcccgcataaaactgccaggcatcaaat  
 taagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttat  
 tctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataat  
 (SEQ ID NO:52)

图39C

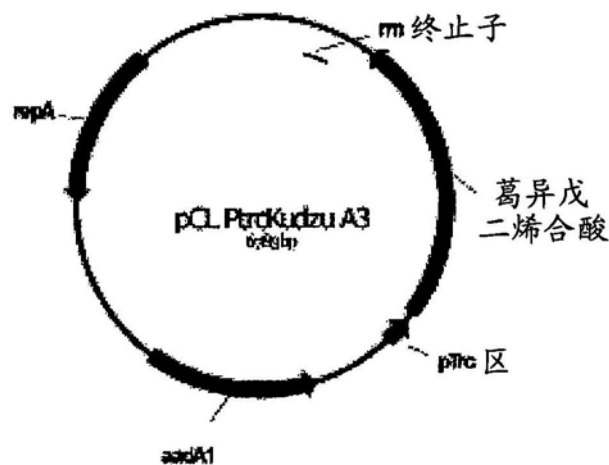


图40



5' -

cccgctcttactgtcggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattattgaagcatttatc  
agggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaacaaagagtt  
tgtagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgottaatttgatgcctggcagttt  
atggcgggctcctgcccgccacctccgggccgttgcttcgcaacggttcaaaccgctcccgg  
cggatttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacgaaaggcccagttc  
ttcgactgagcctttcgttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcatggggagacccc  
acactaccatcggcgctacggcggtttcacttctgagttcggcatggggtcagggtgggaccaccg  
cgctactgccgcccaggcaaatctgttttatcagaccgcttctgcgttctgatttaattctgtat  
caggctgaaaatcttctctcatccgcaaaaacagccaagctggagaccgtttaaactcaatgat  
gatgatgatgatggtcgacggcgctattcagatcctcttctgagatgagtttttgttctagaaa  
gcttcgaattcccataatggtaccagctgcagtttagacatacatcagctgggttaatcgggaaagg  
gtcaatcagcagcagtttgatgcgggttttcagtcgcgtagtctgggcgaccagaccatcgcca  
tactggtaggtgcagtgaggaaacacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggca  
gcagggtggagtcgctaacgcgttcacgattcatcttttccattcggcgctcgatcagtttacg  
cagttcttcgcgggcctgttctcgtggtaccatcggttttcgtgcagtgatgataatgatagaa  
ttggtagtctcgccacgttccagctccgcgcagaggtggccagatcgttgacagggcggaaga  
taacgcagctagaacgcaccagaccatggaagtgcgtcagggaaacgcagcgcggtggtcggagat  
gtcttctcgtgctggcatacggaaaagtaagacggcgccagcagcgctacaccggaggaggaa  
acgctggcggttttccaggtaacttgagaaagccgggataattttgttgttgaccatttcgcct  
cttgcaaaaaggctttgcacagttcacgccagcttttcgtcagataggacaggttggttatgacc  
tttctctttcagaatagaataggacgtgtcggttaacgggtgttgtagcagtgccaggaaacacagt  
ttcatatagtcggcgagggtgttaatagcgttaacgtcccagcgctctacagcatcggtgaaca  
gttgtagttcgtccagagtgccataaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagacccaaa  
catttttagtaacagctttgcgacattcacaaaactgcgggtctggcgccatacccagtgcccag  
aaataaaacttccatcaggcggtcgcgtacaaaatccagtttgctagccaggcccacatctcggtcc  
accagcgggacagatcttgagctctttctggtgcaggggtctgtaccatgttaaaatccagctt  
cgccagctccagcagcagctggtgatgcgggtcttttcggttcgtatttatccaggaaaccaacgt  
gcctccagacgggtgcagacgctggtgatatggcagttccaggggcgtgggtcacttgttctgcaa  
ccttggtattaatgccttctttcagggtgttcttcagggtgggtgatggaaaaggtagcgccctc  
ctccagcagggttctcaccctcgaaacccaggtaagacgcttcatacaggctcagcaggccttg  
acgtcacctttcagttcacccgctgaaaccaccttctttatccttgaaacgctcaaaaacatcct  
gagaaacctcgaaaccgtgctgacgcagcagacggaaagacagagcgggtgcggtgcaggtcaga  
tttgttctttttgttttcgtccagcagtagatgttttccagggtttaatgatgtctttttca  
aatttgtaggtcagaccagggcgtgcacatcgctcgatcagctccagcagggacagcggctggg  
tgtctacacgggtgatcatgcagcgaacttcttccctccagtttggtcgctttctcctccagctt  
ttccactttcaggctcgttctccagggttgagggaattcgaaattccacaggtttggctgatag  
tttgcggaacgacgggaattatgctcggtaatctgagtaaattgagaagaggtcgcacacatgg  
tttattcctccttatttaatcgatacattaatatatacctctttaatttttaataataaagtta  
atcgataattccggctcgagtgccacacagattgtctgataaattgttaagagcagtgccgct  
tcgctttttctcagcggcgctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacatt  
atacgagccggatgattaattgtcaacagctcatttcagaatctggcgtaatagcgaagaggcc  
cgacccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggattt  
ttctccttacgcatctgtgcgggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctc

图41A

tgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaaagcc  
ctcgctagatttttaatgcggtggttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagc  
cagcctttcatgatataatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaaataataaa  
agcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagt  
taagccgcgcgcgaagcggcgctcggttgaacgaattgtagacattatgtgccgactacctt  
ggtgatctcgcccttcacgtagtggaacaaattcttccaactgatctgcgcgcgagggccaagcga  
tcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggcccggca  
ggcgctccattgccagtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgcgggttactgcgctgta  
ccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttc  
catagcgttaagggttcatcttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagtt  
cctccgcccgtggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgccttttgcagcaagatagccag  
atcaatgtcgatcggtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctcca  
aattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtga  
cttctacagcgcggagaatctcgctctctccagggggaagccgaagtctccaaaaggctcggtgat  
caaagctcgccgctgttttcatcaagccttacggtcacccgtaaccagcaaatcaatatcactg  
tgtggcttcaggccgcatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgctcggttcga  
gatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcacccgcttc  
cctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcggttgcgtccat  
aacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgcgttggatgcccgaggcatagactgta  
ccccaaaaaacagtcataaacaagccatgaaaaccgcccactgcgcgcttaccaccgctgcgttc  
ggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgcctacttgcattacagcttacgaaccgaa  
caggcttatgtccactgggttcgctgccttcacccgtttccacgggtgtgcgtcacccggcaacct  
tgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgaaggtttcggtctc  
cacgcacgtcaggcatttggcggccttgcgtgttctctacggcaaggtgctgtgcacggatctg  
ccctggcttcaggagatcggaagacctcgcccgctcgccggcgttgcgggtggtgtgaccccg  
atgaagtgggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcggttgcgtccagcctctgta  
tggaaacgggcatgcggatcagtgagggttgcgaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcac  
ggcacgatcatcgctgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttaccgcgagagct  
tggcaccacgctgcgcgagcaggggaatttaattcccacgggttttgcgtcccgcgaacgggct  
gttctgggtgttgctagtttgttatcagaatcgagatccggcttcagccggttgcgggtgaa  
agcgctatcttccagaattgccatgatttttcccacgggagggcgtcactggctcccgtgt  
tgtcggcagctttgattcgataagcagcatcgccctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttga  
gctgtaacaagttgtctcagggtgttcaatttcacgttctagttgctttgttttactggttcac  
ctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagc  
tttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccggtttcatct  
gtgcatatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaacagttgttctacttttgtttgtta  
gtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatcttagcca  
gtatgttctctagtggttgcgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcata  
cttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaa  
gcatcggtgtagtgttttcttagtcggttatgtaggttaggaatctgatgtaatggttgttggt  
ttttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatc  
tagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcata  
ttgctgtaagtgtttaaatcttacttattggtttcaaaaccattgggttaagccttttaact  
catggtagttatcttcaagcattaacatgaacttaaatcatcaaggctaattctctatatttgc

图41B

cttgtgagttttcttttgtgttagttcttttaataaccactcataaatccatagagtatttg  
 ttttcaaaagacttaacatggtccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataag  
 gcaatatctcttcaactaaaaactaattctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtcca  
 ctggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctct  
 ctggttgcttttagctaatacaccataagcattttccctaactgatgttcacatctgagcgtatt  
 ggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggttttcaatcgtggggttgagtag  
 tgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagt  
 tcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattgggtctaggtgattttaatcac  
 tataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttcttttgagttgtgggtat  
 ctgtaaattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattctgctagacctctgtaaattcc  
 gctagacctttgtgtgtttttttgtttatattcaagtgggttataattttatagaataaagaaag  
 aataaaaaaagataaaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactactttagtcagttcc  
 gcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccct  
 aaaggcttaagtagcacctctgcaagctcgggcaaactcgtgaatattccttttgtctccgacc  
 atcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgtgcgctcacggctctggcag  
 tgaatgggggtaaatggcactacaggcgcttttatggattcatgcaaggaaactaccataat  
 acaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcggttttatggcggtctgctatgtggtgctatc  
 tgactttttgctgttcagcagttcctgcctctgattttccagtcctgaccacttcggattatcc  
 cgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
 (SEQ ID NO:53)

图41C

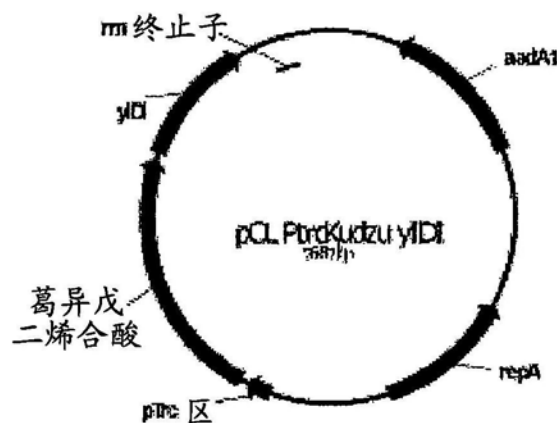


图42

5' -

ctggcgtaatagcgaagaggccccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatggc  
gaatggcgccctgatgcggtatcttctccttacgcacatctgtgcggtatctcacaccgcatatggt  
gcaactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagtttaagccagccccgacacccgccaacacc  
cgctgacgagcttagtaaagccctcgctagatctttaaagcggtatgtgagcttacttcgccaac  
tattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatactcccaatttgtgtagggcttatt  
atgcacgcttaaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggtgtgagcaattatgtgc  
ttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccggaagcggtcggttgaacgaattgtta  
gacattatcttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggaacaaattcttccaactg  
atctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatg  
acgggctgatactgggcccggcaggcgctccattgccagtcggcagcgacatccttcggcgcgga  
ttttgcccgttactgcgctgtaccaaagtcggggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgcc  
agcccagtcggggcgcgagttccatagcggttaaggtttcatttagcgctcaaatagatcctgt  
tcaggaaccggatcaaagagttcctccgcccgtggacctaccaaggcaacgctatgttctcttg  
cttttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcggtggtcggtcgaagatacctgaagaat  
gtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatg  
tcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggaagaatctcgctctctccagggaagccg  
aagtttccaaaaggctcgttgatcaaagctcgccggtgttttcatcaagccttacgggtcacggt  
aaccagcaaatcaatatcactgtgtggttccaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgt  
acggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaaactacctctgatagttgagtcg  
atacttcggcgatcacccgcttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctg  
cgtaacatcggttgcgtgctccataacatcaaacatcgaccacggcgtaacgcgcttgctgcttg  
gatgcccagggcatagactgtacccccaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgcccactg  
cgccgttaccaccgctgcgttcgggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctactt  
gcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccac  
ggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatcttctgtcctggctggcgga  
acgagcgcaaggtttcggtctccacgcacgtcaggcattggcggccttgcgtgttcttctacgg  
caaggtgctgtgcacggatctgcctggcttcaggagatcggaagacctcgcccgctcgcggcgc  
ttgcccgtggtgctgaccccggtgaagtggttcgcacctcctcggttttctggaaggcgagcatc  
gtttgttcgccagcttctgtatggaacgggcacggtcagtgaggggttgcaactgcgggt  
caaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcggtgcgggagggcaagggtccaaggatcgg  
gccttgatgttacccgagagcttggcaccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacggg  
ttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgagatccggc  
ttcagccggtttgcccggctgaaagcgctatcttctccagaattgccatgatttttcccccaggg  
gaggcgctcactggctcccgtgttgctcggcagctttgattcgataagcagcatcgctgtttcag  
gctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagt  
tgctttgttttactgggttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgt  
cgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcacccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctat  
cttttttacaccggttttcatctgtgcataatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaaca  
gttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcaactgatagatacaagagccataagaacct  
cagatccttccgtatcttagccagtatgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatg  
agaacgaaccattgagatcatacttactttgcagtgcactcaaaaattttgcctcaaaaactggt  
gagctgaatttttgcagttaaagcatcggtgtagtgttttcttagtccgttatgtaggttaggaa  
tctgatgtaatgggtgttggtatcttgcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcgg

图43A

ttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcgccctcg  
cttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacc  
cattgggttaagccttttaaactcatggtagttattttcaagcattaacatgaacttaaatcat  
caaggctaattctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttcttttaataaccactc  
ataaatcctcatagagtatttgttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaat  
ttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcaactaaaaactaattctaatttttcgcttg  
agaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaggattcctgatttc  
cacagttctcgtcatcagctctctggttgcttttagctaatacaccataagcattttccctactg  
atgttcatcatctgagcgtattgggtataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtaggg  
tttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttgggttcatgctccgttaa  
gtcatagcgactaatcgtagttcatttgccttgaaaacaactaattcagacatacatctcaat  
tgggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtcc  
ttttcctttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagaccttgcgtggaaaacttgtaaattc  
tgctagacctctgtaaattccgctagaccttgcgtgtttttttgtttatattcaagtgggt  
ataatttatagaataaagaaagaataaaaaagataaaaaagaatagatcccagccctgtgtata  
actcactacttttagtcagttccgcagattatacaaaaggatgtcgaaacgctgtttgctcctct  
acaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcacctcgcaagctcgggcaaatcgctg  
aatattccttttgcctccgacctcaggcacctgagtcgctgtcttttgcgtgacattcagttc  
gctgcgctcacggctctggcagtgaaatgggggtaaatggcactacaggcgcttttatggattc  
atgcaaggaaactaccataatacaagaaaagccgtcacgggcttctcaggcggttttatggc  
gggtctgctatgtggtgctatctgacttttgcgtgttcagcagttcctgccctctgattttcca  
gtctgaccacttcggattatcccgtagcaggtcattcagactggctaatgcaccagtaaggca  
gcggtatcatcaacaggcttaccgctcttactgtcgggaattcgcggttgccgattcattaatg  
cagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagc  
ggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggaactgctctttaac  
aatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaat  
taaagaggatatattaatgtatcgattaataaaggaggaataaaaccatgtgtgcgacctcttc  
tcaatttactcagattaccgagcataattcccgctcgttccgcaaaactatcagccaaacctgtgg  
aatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcga  
ccaaactggaggaagaagttcgtgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgct  
ggagctgatcgacgatgtgcagcgccctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaa  
gccctggaaaacatcgtagtctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccg  
ctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttccgaggtttctcaggatgtttttgagcggtt  
caaggataaagaaggtggtttcagcggtgaaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctg  
tatgaagcgtcttacctgggtttcagaggtgagaacctgctggaggaggcgcgctaccttttcca  
tccccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaagggtgcagaacaagtgcgca  
cgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcacctgctggaggcacgttgggtcctggataaa  
tacgaaccgaaagaaccgcatcaccagcgtgctgctggagctggcgaagctggattttaacatgg  
tacagacctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgctgggtggaccgagatgggcctggc  
tagcaaaactggattttgtacgcgacctgatggaagtttatttctgggcaactgggtatggcg  
ccagaccccgagtttgggtgaatgtcgaaagctgttactaaaatgtttgggtctggtgacgatca  
tcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtaga  
gcgctgggacgttaacgctattaacacctgcgggactatatgaaactgtgtttcctggcactg  
tacaacaccgttaacgacacgtcctatttctatttctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcct

图43B



atctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatgggtccaacaa  
caaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccgggtgtagcg  
ctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgc  
gttccctgaccgacttccatgggtctgggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacga  
tctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatg  
cacgaaaacgatggtaccagcaggaacaggcccgcggaagaactgcgtaaactgatcgacgccg  
aatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatgga  
aatcgagtttaacatggcacgtgtttccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgc  
ccgactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacctttcccgattaaccage  
tgatgtatgtctaactgcatcgcccttaggaggtaaaaaaaatgactgccgacaacaatagta  
tgccccatggtgcagtatctagttacgccaatttagtgcaaaaccaaacacctgaagacatttt  
ggaagagtttctgaaattattccattacaacaaagacctaatacccgatctagtgcagcgtca  
aatgacgaaagcggagaaacatgttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaaatgaatg  
aaaattgtattgttttggttgggacgataatgctattgggtgccggtaccaagaaagtttgta  
tttaatggaaaatattgaaaaggggttactacatcgtgcattctccgtctttattttcaatgaa  
caaggtgaattacttttacaacaaagagccactgaaaaaataactttccctgatctttggacta  
acacatgctgctctcatccactatgtattgatgacgaattagggttgaagggtgaagctagacga  
taagattaaggcgctattactgcggcgggtgagaaaactagatcatgaattaggatttccagaa  
gatgaaactaagacaaggggtaagtttctactttttaacagaatccattacatggcaccaagca  
atgaaccatggggtgaacatgaaattgattacatcctattttataagatcaacgctaaagaaaa  
cttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagagacttcaaattgggtttcaccaaattgatttg  
aaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgccttgggtttaagattatttgcgagaatt  
acttattcaactggtgggagcaattagatgaccttctgaagtggaaaatgacaggcaaattca  
tagaatgctataacgacgcgtcctgcagctggtaccatattgggaattcgaagctttctagaacg  
aaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtt  
taaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaa  
atcagaacgcagaagcggctctgataaaacagaatttgctggcggcagtagcgcggtgggtccca  
cctgacccccatgccgaactcagaagtgaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctcccc  
atgcgagagttagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcct  
ttcggttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcccgggagcgga  
tttgaacgttgcgaagcaacggcccgagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccagg  
catcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttg  
tttattttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctt  
caataat  
(SEQ ID NO:54)

图43C

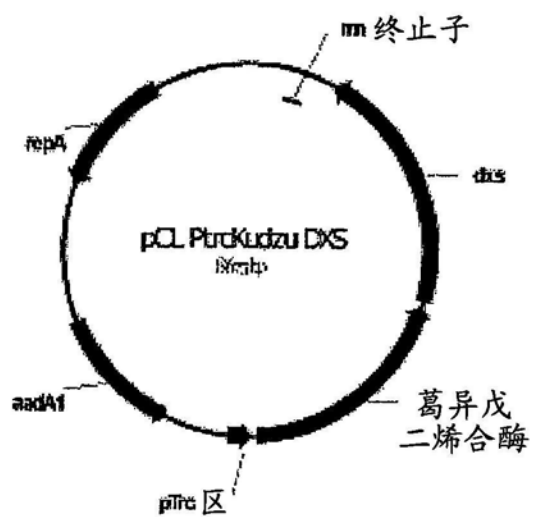


图44

5' -

cccgctcttactgtcgggaattcgcggttgccgattcattaatgcagattattgaagcatttatc  
agggttattgtctcatgagcggatcacatatttgatgtatttagaaaaataaacaagaggtt  
tgtagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgcttaatttgatgcctggcagttt  
atggcggggcgtcctgcccgccaccctccgggcccgttgcttcgcaacggttcaaaccgctcccg  
cggatttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacgaaaggcccagttc  
ttcgactgagcctttcgttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcatggggagacccc  
acactaccatcggcgctacggcggtttcacttctgagttcggcatggggtcaggtgggaccaccg  
cgctactgccgccaggcaaatctgttttatcagaccgcttctgcgttctgatttaactctgtat  
caggctgaaaatcttctctcatccgccaaaacagccaagctggagaccggttaaactcaatgat  
gatgatgatgatggtcgacggcgctattcagatcctctctgagatgagttttgttctagaaa  
gcttcgaattcccatatggtaccagctgcagttatgccagccaggccttgattttggcttccat  
accagcggcatcaggcggcaggttcggcgcgcatcttctcctgagttccttgcggaataaagaag  
tccggcaggccaatgttcagcacgggtactggtttacgatgggccatcagcacttcgttcacgc  
cgtgcctgcgcgcgccataatggcggttttcttctacgggtgaccagcgcttcatggctggcggc  
catttccagaattaacgcttcatcaagcggtttcacaaaacgcatatcgaccagcggtggcgttc  
agcgattcggcgactttcgcgcgttctggcatcagcgctaccaaagttaaggatcgccagtttct  
cgccacgacgcttcacaatgcctttgccaatggtagtttttccagcggcgctcagttccacgcc  
gaccggttgccacgcgggtagcgcaccgctgacgggccatcggtatagtgatagccggtatag  
agcatctggcgacattcgttttcatcgctcggggtcataatgaacatttccgggtatgcagcgca  
ggtaagagagatcaaaagcaccctgatgggtttgaccgtcagcaccaacaatgcccgcgcggtc  
gatggcgaaacaggaccggaagcttttgaatcgccacgtcatgcagcacctgatcataggcggt  
tgcaggaaagtggagtaaatcgcgacaatgggtttgtaccaccaatcgccagaccgcgagcaa  
aggtcaccgctgttgctcggcaattgccacgtcgaagtagcgatccgggaatttacgtgaaaa  
ctcgaccatgcgggaaccttcacgcacgcggagtaatcgccatcagcttgttgccttctcgt  
gccgtttcgcacaccagtcgccaaagatttttgaatagctcgcaaacgcgcgtacttttcg  
gcaacaaccgctggagggtatcaaattaggcacggcggtgaaagtgatcggggtctttttctgc  
cggttcataaccacgacctttttgggtcatgatatgcaggaaactgcgggcctttcaggtcgcgc  
atgttcttttagcgtggtgataagccccagcacatcgtagccgtccaccgggcccgatgtagttaa  
agcccagctcttcaacaacgtgccaggcactaccatgcctttaatatgttcttcggtgcgttt  
gagcagctctttaattggcggcacgccagagaaaactttttccgccttcgcgcagtgaaag  
taaagcttaccggaaagcagctgtgccagatgggtgttgagcgcgcccagacattttcggaaatcg  
acatttcattgtcgttgagaatcaccagcatatcaggacggatatcgcccgcgtgattcatcgc  
ttcaaacgccatgcctgcggtaatcgcgccatcgccaatgacacagacgggtgcggcgatttttg  
ccttcttttttcggcagcaaccgcaataaccaattccggcactgatggaggttgatgaatgccga  
cgcttaatacgtcatattcgttttcgcgcgcgccacgggaacgggtgcagaccgcctttctgacg  
gatggtgccgattttgtcgcggcgctccgggtcaaaattttatgcggataagcctgatgccccaca  
tcccaaatcaattggtcaaacggggtgttgtagacatagtcagcgcgccacggtcagttcgaccg  
tgcccagcccggaggcgaagtgcgcgtggaacgggtcacgctgtcgagtaaatagcggcgag  
ttcgtcgcagagtttcggtaaaactctcttccggcaacagtcgtaactcctgggtggagtcgacc  
agtgccagggtcgggtatttggaatatcaaaactcatgttttttacctcctaagggcggaatg  
cagttagacatacatcagctgggttaatcgggaaagggtcaatcagcagcagtttgatgcgggtt  
tcagtcgcgtagtctgggcgaccagaccatcgccatactggtaggtgcagtgggaaacacgtg  
ccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcaggggtggagtcgctaaccgcttcacg

图45A



atccatctttttccattcggcgtcgatcagtttacgcagttcttcgcgggcctgttcctcgctg  
gtaccatcgttttcgtgcatgtagctaagtagaattggtagtctcgccacgttccagctccg  
ccgcagaggtggccagatcggtgcacaggcggaaagataacgcagctagaacgcaccagaccatg  
gaagtcgggtcagggaacgcagcgcgtgggtcgagatgtcttcctgctgctggcatacggaaaag  
taagacgggcgcagcagcgtacaccggaggaggaaacgctggcgttttccaggtacttgga  
aagccgggataattttgttgttgaccatttcgcctcttgcaaaaggctttgcacagttcacg  
ccagcttttcgtcagataggacaggttgttatgacctttcttttcagaatagaataggacgtg  
tcgttaacgggtgttgtacagtgccaggaaacacagtttcatatagtccggcaggggtgttaatag  
cgtaaacgtcccagcgtctacagcatcggtgaacagttgcagttcggtccagagtgccataaac  
gtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagaccaaacattttagtaacagctttgcgacattca  
ccaaactgcgggtctggcgccatacccagtgcccagaaataaacttccatcaggcgggtcgcgta  
caaaatccagtttgcagccaggcccatctcggtccaccagcgggacagatcttgacagctcttt  
ctgggtgcagggctctgtaccatgttaaaatccagcttcgcccagctccagcagcagctgggtgatgc  
ggttctttcggttcgtatttatccaggaaccaacgtgcctccagacgggtgcagacgctgggtgat  
atggcagttccaggggcgtgggtcacttgttctgcaaccttggtattaatgccttctttcaggtt  
gttcttcaggtgggtgatggaaaaggtagcgcctcctccagcaggttctcacctcgaaaccc  
aggtaagacgcttcatacaggtcagcaggccttggacgtcacctttcagttcacccgtgaaac  
caccttctttatccttgaaaacgtcaaaaacatcctgagaaacctcgaaacgctgctgacgcag  
cagacggaaagacagagcgggtgcgtgcaggtcagatttgttctttttgttttcgtccagcagt  
acgatgttttccagggtttaatgatgtctttttcaaatgttaggtcagaccagggcgtgca  
catcgtcgatcagctccagcagggacagcggctgggtgtctacacggttgatcatgcagcgaac  
ttcttctccagtttgggtcgcttttctcctccagcttttccactttcaggtcgttctccagggtat  
tgcaggaattcgaaattccacaggttgggtgatagtttgcggaacgacgggaattatgctcgg  
taatctgagtaaatgagaagaggtcgcacacatgggttattcctccttatttaatcgatacat  
taatatatacctccttaatttttaataataaagttaatcgataattccggtcgagtgccacac  
agattgtctgataaattgttaaagagcagtgccgcttcgctttttctcagcggcgctgttctcct  
gtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacattatacagagccggtatgattaattgtcaaca  
gctcatttcagaatctggcgtaatagcgaagaggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgc  
gcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttc  
acaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgcgcgatagttaagccagccccga  
cacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcg  
attacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatataatctcccaattt  
gtgtagggttattatgcacgcttaaaaataataaaaagcagacttgacctgatagtttggctgt  
gagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagtttaagccgcgcgcggaagcggcgtcggct  
tgaacgaattgttagacattatgtgccgactaccttggtgatctcgctttcacgtagtggaca  
aattcttccaactgatctgcgcgcgagggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtc  
tagcttcaagtagacgggtgatactggcgccgagggcgtccattgccagtcggcagcgac  
atccttcggcgcgattttgcgggttactgcgctgtaccaaagtcgggacaacgtaagcactaca  
tttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcattagcgct  
caaatagatcctgttcaggaacccgatcaaagagttcctccgcccgtggacctaccaaggcaac  
gctatgttctcttgcgttttgcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaag  
atacctgcaagaatgtcattgcgctgccatttctccaaattgcagttcgcgcttagctggataac  
gccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatgggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctc  
tccaggggaagccgaagtttccaaaagggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagc

图45B

cttacgggtcacgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgagg  
agccgtacaaatgtacggccagcaacgtcgggttcgagatggcgctcgatgacgccaaactacctc  
tgatagttgagtcgatacttcggcgatcacgcgttcacctcatgatgtttaactttgttttaggg  
cgactgccctgctgcgtaacatcggttgcgtgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaac  
gcgcttgctgcttggtatgcccaggcatagactgtacccccaaaaaacagtcataacaagccat  
gaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcgggtcaaggttctggaccagttgcgtgag  
cgcatacgctacttgattacagcttacgaaccgaacaggccttatgtccactgggttcgtgcct  
tcacccgtttccacgggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtgcaggcatttct  
gtcctgggtggcgaacgagcgcaaggtttcgggtctccacgcacgtcaggcattggcgcccttg  
ctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaagacctc  
ggcgtcgcgccgcttgccggtggtgctgaccccgatgaagtgggttcgcatcctcggttttct  
ggaaggcgagcatcggttgctgcggcagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggt  
ttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtgcgggagggaagg  
gctccaaggatcgggccttgatgttaaccgagagcttggaacccagcctgcgcgagcaggggaa  
ttaattccacgggttttgctgcccgaacgggctgttctgggtgttgctagtttggtatcaga  
atcgcatcggttcagccggttgccgggtgaaagcgctatttctccagaattgccatga  
tttttcccccacgggaggcgctactggctcccggtgttgctgcgcagctttgattcgataagcagc  
atcgctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagggtgttcaa  
tttcatgttctagttgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttc  
atctgttacattgtcgatctgttcattggtgaacagctttgaatgcacccaaaaactcgtaaaagc  
tctgatgtatctatcttttttacaccggtttcatctgtgcatatggacagttttccctttgata  
tgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaag  
agccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtgggttcggtgttt  
ttgctgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcagtcactcaaaaatttt  
gcctcaaaactggtagctgaattttgcagttaaagcatcggtgtagtgttttcttagtccgt  
tatgtaggtaggaatctgatgtaatgggtgttggtattttgtcaccattcatttttatctggtt  
gttctcaagttcggttacgagatccatttgctctatctagtccaacttggaatcaacgtatca  
gtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcataattgctgtaagtgtttaaatctttactta  
ttggtttcaaaacccattgggttaagccttttaaaactcatggtagttattttcaagcattaacat  
gaacttaaattcatcaaggctaattctctatatttgcttgtagttttcttttggttagttct  
tttaataaccactcataaatcctcatagagtatgttttcaaaagacttaacatgttccagat  
tatattttatgaatttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcaactaaaaactaattc  
taatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaa  
ggattcctgatttccacagttctcgctcatcagctctctgggttgctttagctaatcaccataag  
cattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattgggtataagtgaacgataccgtccgttc  
tttccctgtaggggttttcaatcggtgggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtt  
tcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcag  
acatacatctcaattgggtctaggtgatttttaactactataccaattgagatgggctagtcaatg  
ataattactagtccttttcccttgagttgtgggtatctgtaaatctgctagacctttgctgga  
aaacttgtaaatctgctagacctctgtaaatccgctagacctttgtgtgtttttttgttt  
atattcaagtgggtataatttatagaataaagaaagataaaaaaagataaaaaagaatagatcc  
cagccctgtgtataactcactactttagtcagttccgcagttattacaaaaggatgtcgcaaacg  
ctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcacctcgcaagct  
cgggcaaatcgctgaatatctctttgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtcttttct

图45C

Gtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgaaatgggggtaaattggcactacaggcg  
ccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctca  
gggcgttttatggcggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgc  
cctctgattttccagttctgaccaattcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaag  
caccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
(SEQ ID NO:55)

图45D

A.

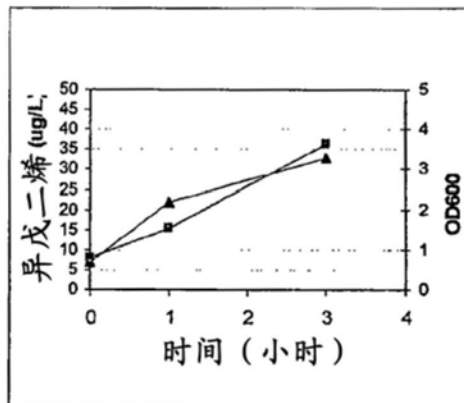


图46A

B.

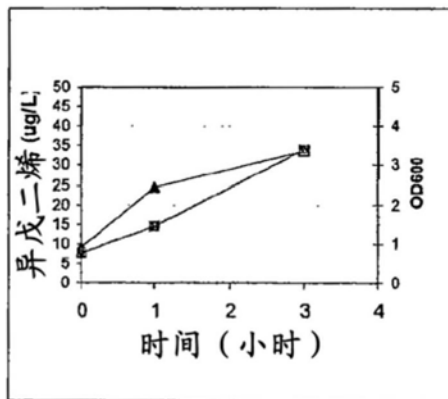


图46B

C.

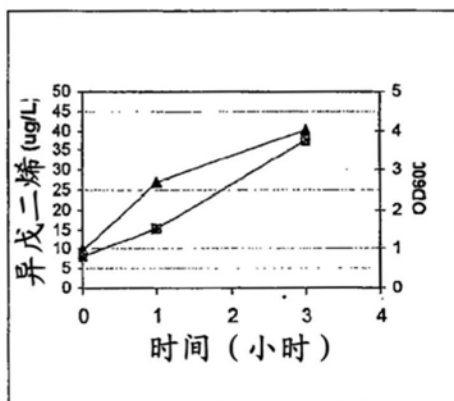


图46C

D.

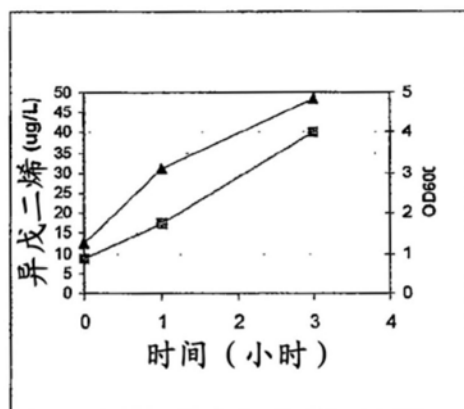


图46D

E.

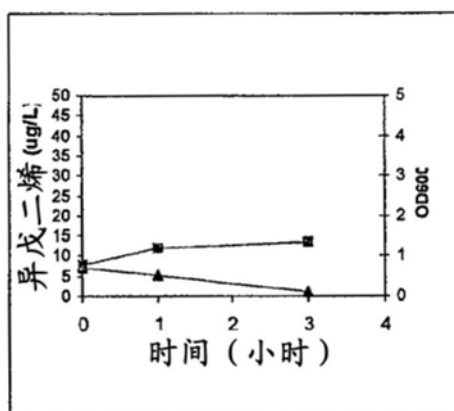


图46E

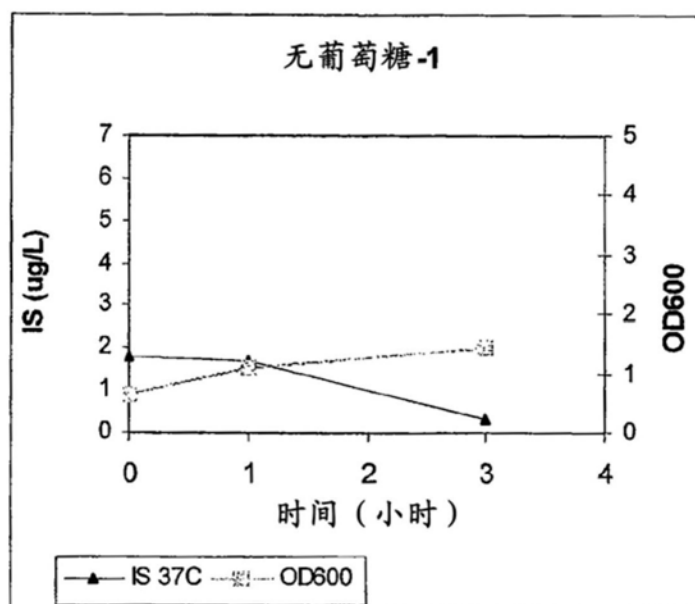


图47A

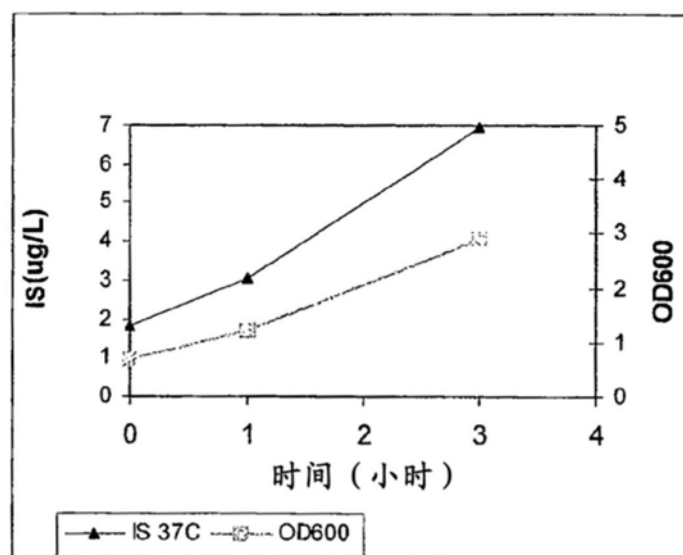


图47B

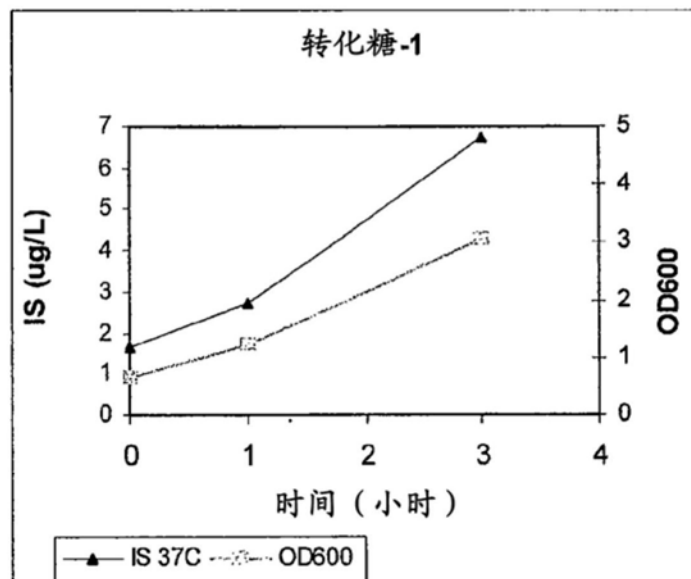


图47C

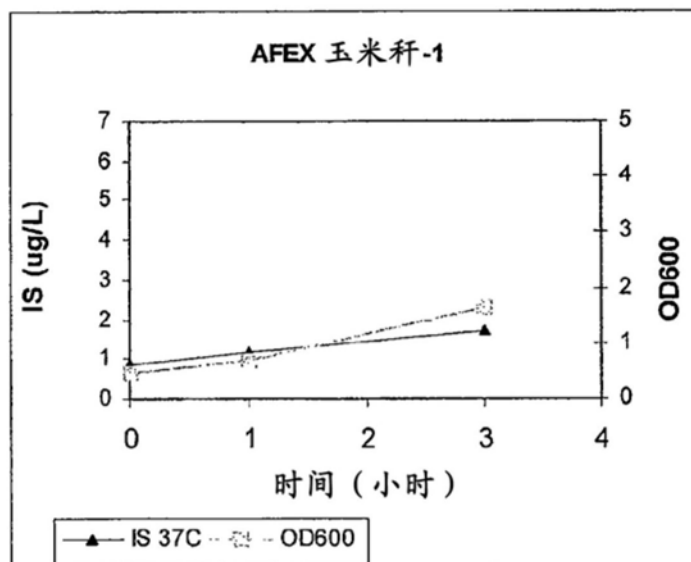


图47D

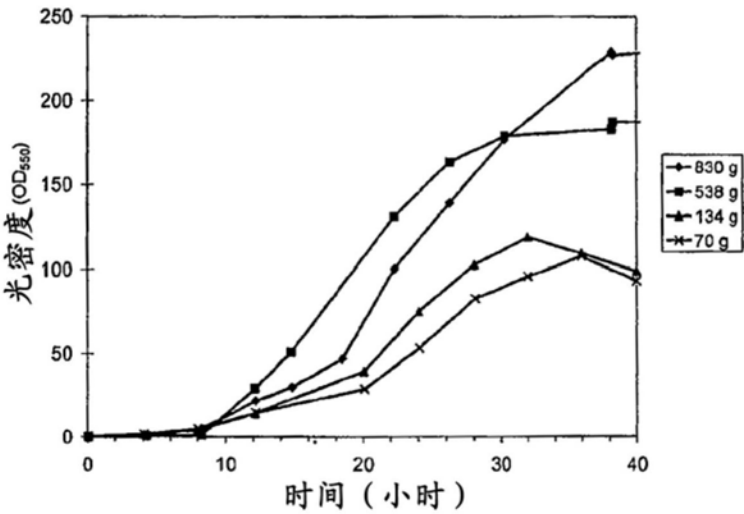


图48A

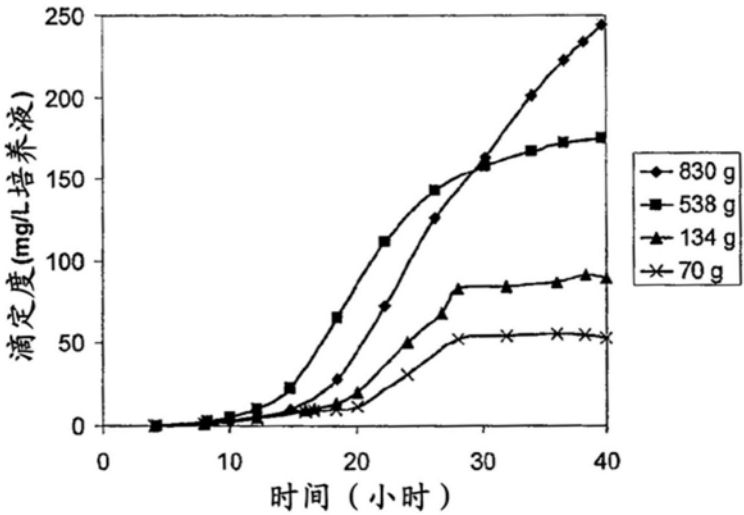


图48B

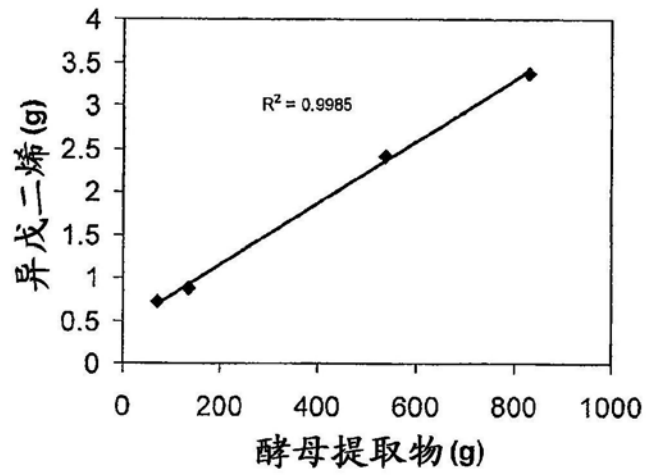


图48C

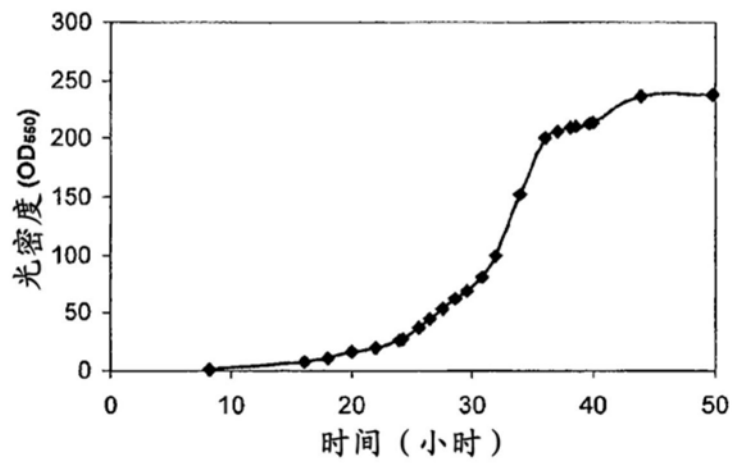


图49A

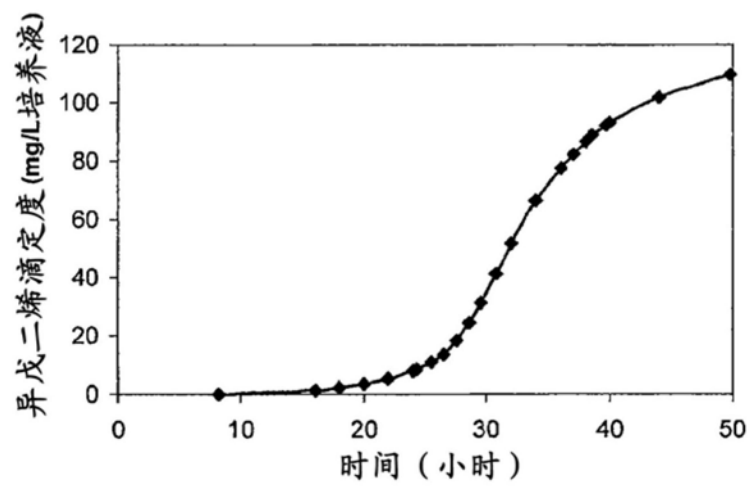


图49B



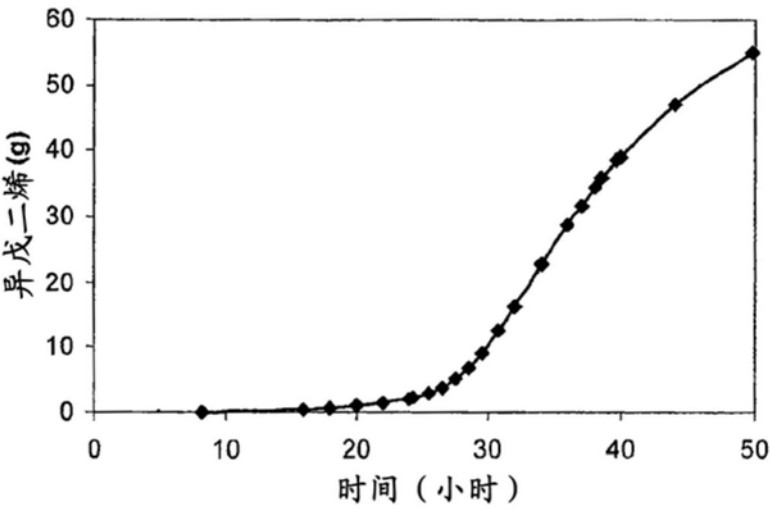


图49C

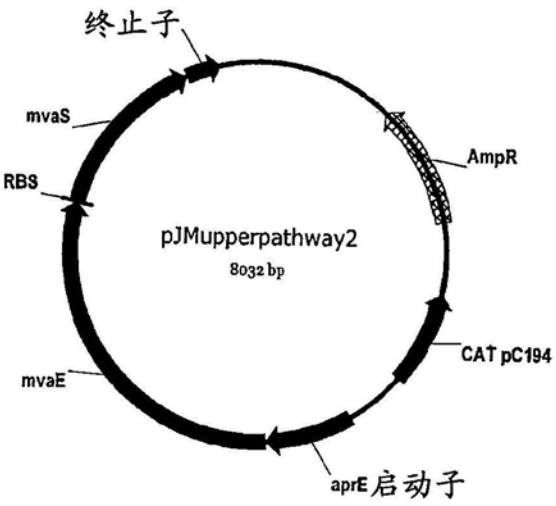


图50

5' -  
tcgctgcgctcggtcggttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggttaatacggg  
tatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccag  
gaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggtttttccataggctccgccccctgacgagcatcac  
aaaaatcgacgctcaagtacagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggttc  
cccctggaagctccctcgctgcgctctcctgttccgaccctgccgcttacgggatacctgtccgc  
ctttctcccttcgggaagcggtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtg  
taggtcggttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgcct  
tatccggtaactatcgctcttgagttccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc  
cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtagg  
cctaactacggctacactagaagaacagtatgttggtatctgcgctctgctgaagccagttacct  
tcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccacgctggtagcggtgggttttt  
tggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttct  
acggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggtttttggtcatgagattatcaa  
aaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttttaataatctaaagtataata  
tgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgt  
ctatctcggtcatccatagttgcctgactccccgctgctgtagataactacgatacgggagggt  
taccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatc  
agcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgcctcc  
atccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgccga  
acgttggttgccattgctacaggcatcggtggtgcacgctcgctcggttggtatggcttcattcag  
ctccgggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccattgttggtgcaaaaaagcggttagc  
tccttcgggtcctccgatcggtgtcagaagtaagttggccgcagtggttatcactcatggttatgg  
cagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagta  
ctcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggtcgaata  
cgggataataaccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcgg  
ggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacc  
caactgatcttcagcatcttttaactttcaccagcggtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaa  
aatgcccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttgaaatactcatactcttcctttttc  
aatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatatttgaaatgtattta  
gaaaaataaacaatataggggttcgcgcacattttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaa  
accattattatcatgacattaacctataaaaaataggcggtatcacgaggccctttcgtctcgcg  
gtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggtcacagcttgctct  
gtaagcgggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgttgccgggtgtcgg  
ggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatagatctggagctg  
taatataaaaaccttcttcaactaacggggcaggttagtgacattagaaaaccgactgtaaaaa  
gtacagtcggcattatctcatattataaaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaat  
agagttcataaacaatcctgcatgataacctcacaaacagaatgatgtacctgtaaagatagc  
ggtaaatatattgaattacctttattaatgaattttcctgctgtaataatgggtagaaggtaat  
tactattattattgatatttaagttaaaccagtaaatgaagtccatggaataatagaaagaga  
aaaagcattttcaggtataggtgttttgggaaacaattttccccgaaccattatatttctctaca  
tcagaaagggtataaatcataaaactctttgaagtcattctttacaggagtcctaaataaccagaga  
atgttttagatacaccatcaaaaattgtataaagtggctctaacttatcccaataacctaacctc  
tccgtcgctattgttaaccagttctaaaagctgtattttgagtttatcaccctgtcactaagaaa  
ataaatgcagggtaaaatttatatccttctgttttatgtttc

图51A

ggtataaaacactaatatcaatttctgtggttataactaaaagtcgtttgttggttcaaataatg  
attaaatatctcttttctcttccaattgtctaaatcaattttattaaagttcatttgatatgcc  
tcctaaatttttatctaaagtgaatttaggaggcttacttgtctgctttcttcattagaatcaa  
tccttttttaaaagtcaatattactgttaacataaatatataatttttaaaaatatcccactttatc  
caattttcgtttgttgaactaatgggtgctttagttgaagaataaaagacctatgcggtgtgaa  
ataccgcacagatgcgttaaggagaaaaataccgcacagcgccattcgccattcaggctgcgca  
actgttggaaggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatg  
tgctgcaaggcgattaaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacg  
gccagtgccaaagcttgcatgcctgcactccattttcttctgctatcaaaataacagactcgtga  
ttttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgccccttgcaaatcggtatgcctgtctataaaatt  
cccgatatgtggttaaacagcgggcgcaatggcgggccgcacatctgatgtctttgcttgcgcaatgtt  
catcttattttcttccctctcaataattttttcattctatcccttttctgtaaagtttattt  
ttcagaatacttttatcatcatgctttgaaaaaatatcacgataatatccattgttctcacgga  
agcacacgcaggtcatttgaacgaatttttcgacaggatattgcccgggactcaggagcattta  
acctaaaaaagcatgacatttcagcataatgaacatttactcatgtctattttcgttcttttct  
gtatgaaaatagttattttcgagtctctacggaaatagcgagagatgatatacctaaatagagat  
aaaatcatctcaaaaaaatgggtctactaaaatattattccatctattacaataaattcacaga  
atagtccttttaagtaagtcactctgaatttttttaaaaggagagggttaaagagtgaaaacagt  
agttattattgatgcattacgaacaccaattggaaaaatataaaaggcagcttaagtcaagtaagt  
gccgtagacttaggaacacatgttacaacacaacttttaaaaagacattccactatttctgaag  
aaattgatcaagtaatctttgaaatgttttacaagctggaaatggccaaaatcccgcacgaca  
aatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaattcccgcacatgacggttaatgaggtctgcgga  
tcaggaatgaaggccgttattttggcgaaacaattgattcaattaggagaagcggaagtttta  
ttgctggcggtattgagaatatgtcccaagcacctaaattacaacgttttaattacgaaacaga  
aagctacgatgcgcctttttctagtatgatgtatgatggattaacggatgcctttagtggtcag  
gcaatgggcttaactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaagatc  
aattttctgtacattcacatttaaaagcagctcaagcacaagcagaaggatattcgctgacga  
aatagccccattagaagtatcaggaacgcttggtggagaaagatgaagggttcgcccataattcg  
agcgttgagaagctaggaacgctttaaacagtttttaaaagaagacggtactgtaacagcagggga  
atgcatcaaccattaatgatggggccttctgctttgattattgcttcacaagaatatgccgaagc  
acacggtcttcttatttagctattattcgagacagtggtgaagtcggtattgatccagcctat  
atgggaatttcgccgattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaacttactacggaag  
aaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgacgaacttcaatcgtgggtccaaagagaact  
ggctttaccagaggaaggaaggtcaacatttatgggtggcggtattttcattaggtcatgcattggg  
gccacaggtgctcgtttattaacgagtttaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaatag  
gagtggcttctttatgtatcgggcgttggttaggactcgctatgctactagagagacctcagca  
aaaaaaaaaacagccgattttatcaaatgagtcctgaggaacgcctggcttctcttctaatgaa  
ggccagattttctgctgatacaaaaaagaatttgaaaatacggctttatcttcgcagattgcca  
atcatatgattgaaaatcaaatcagtgaaacagaagtgccgatgggcgttggttacatttaac  
agtggacgaaactgattatttggtagcaatggcgacagaagagccctcagttattgcggtttg  
agtaatgggtgcaaaaatagcacaaggatttaaaacagtgatcaacaacgcttaatgcgtggac  
aaatcgttttttacgatgttgagatcccaggtcattgattgataaactacaagtaagagaagc  
ggaagtttttcaacaagcagagtttaagttatccatctatcgttaaacggggcgggcgttaaga  
gatttgcaatatcgtaacttttgatgaatcatttgtatctgtcgactttttagtagatgttaagg  
atgcaatgggggcaaatatcgttaacgctatgttggaaggtgtg

图51B

gccgagttgttcggtgaatggtttgcggagcaaaagattttattcagtattttaagtaattatg  
ccacggagtcggttggttacgatgaaaacggctattccagtttcacgtttaagtaaggggagcaa  
tggccggggaattgctgaaaaaattgttttagcttcacgctatgcttcattagatccttatcgg  
gcagtcacgcataacaaaggaatcatgaatggcattgaagctgtagtttttagctacaggaatg  
atacacgcgctgttagcgcttcttgtcatgcttttgcggtgaaggaaggctcgctaccaaggctt  
gactagttggacgctggatggcgaacaactaattgggtgaaatttcagttccgcttgctttagcc  
acggttggcgggtgccacaaaagtcttacctaatactcaagcagctgctgatttggtagcagtga  
cggatgcaaaagaactaagtgcagtagtagcggctgttggtttggcacaaaatttagcggcggtt  
acgggcttagtctctgaaggaattcaaaaaggacacatggctctacaagcacgttcttttagcg  
atgacggtcggagctactggtaaagaagttgaggcagtcgctcaacaattaaaacgtcaaaaaa  
cgatgaaccaagaccgagccatggctattttaaattgatttaagaaaacaataaaaaggagaggggt  
gacaattgggattgataaaattagtttttttgtgcccccttatttatattgatatgacggcactg  
gctgaagccagaaatgtagaccctggaaaatttcataattggtattgggcaagaccaaatggcgg  
tgaacccaatcagccaagatattgtgacatttgcagccaatgccgcagaagcgatcttgacca  
agaagataaagaggccattgatattggtgattgtcgggactgagtcagtatcgatgagtcaaaa  
gcggccgcagttgtcttacatcgtttaattggggattcaacctttcgctcgctctttcgaaatca  
aggaagcttggttacggagcaacagcaggcttacagtttagctaagaatcacgtagccttacatcc  
agataaaaaagtcttggtcgtagcggcagatattgcaaaatatggcttaaattctggcgggtgag  
cctacacaaggagctggggcgggttgcaatgttagttgctagtgaaccgcgcattttggctttaa  
aagaggataatgtgatgctgacgcaagatatctatgacttttggcgtccaacaggccaccgcta  
tcttatggtcgatggctcttttgtcaaacgaaacctacatccaatcttttgcccaagtctgggat  
gaacataaaaaacgaaccggtcttgattttgcagattatgatgcttttagcgttccatattcctt  
acacaaaaatgggcaaaaaagccttattagcaaaaatctccgaccaaaactgaagcagaacagga  
acgaatttttagcccggttatgaagaaagtatcgctctatagtcgctcgctaggaacttgatatacg  
ggttcactttatctgggactcatttcccttttagaaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatc  
aaattggtttattcagttatggttctggtgctgctgctgaatttttcactggtgaattagtagc  
tggttatcaaaatcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaactt  
tctatcgctgaatatgaagccatggttgcaaaaactttagacacagacattgatcaaacggttag  
aagatgaattaaaatatagtatcttctgctattaataataaccggttcggttcttatcgaaactaaaa  
aaaaccggccttgccccgcgggttttttattatttttcttccctccgcatgttcaatccgctcc  
ataatcgacggatggctccctctgaaaattttaacgagaaaacggcggttgacccggctcagtc  
ccgtaacggccaagtccctgaaacgtctcaatcgccgcttcccgggttccgggtcagctcaatgcc  
gtaacggtcggcggtgttttctgataccgggagacggcattcgtaatcgggatccccgggtac  
cgagctcgaattcgtaatcatgtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaatt  
ccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaattgagtgagctaac  
tcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgca  
ttaatgaatcggccaacgcgcggggagagggcggtttgcgtattggggcgctcttccgcttccctcg  
ctcactgac  
(SEQ ID NO:56)

图51C

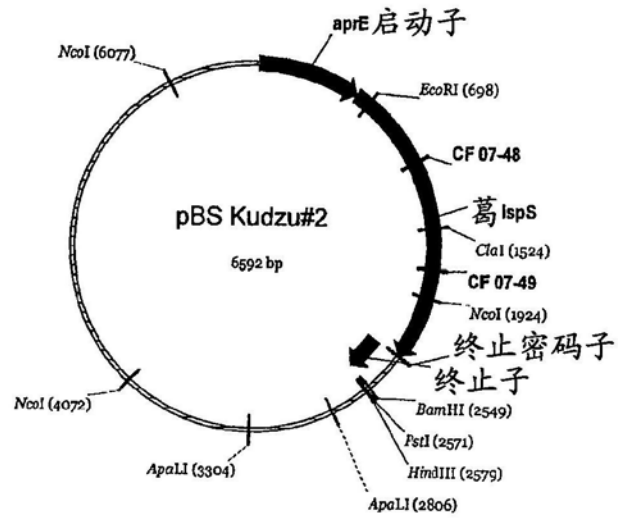


图52

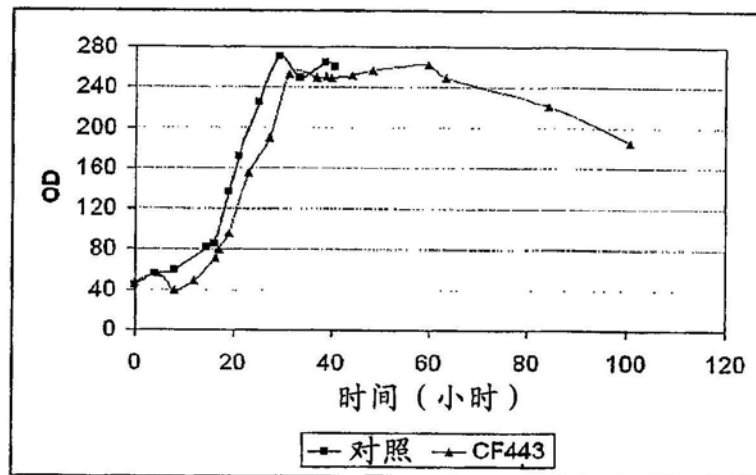


图53A

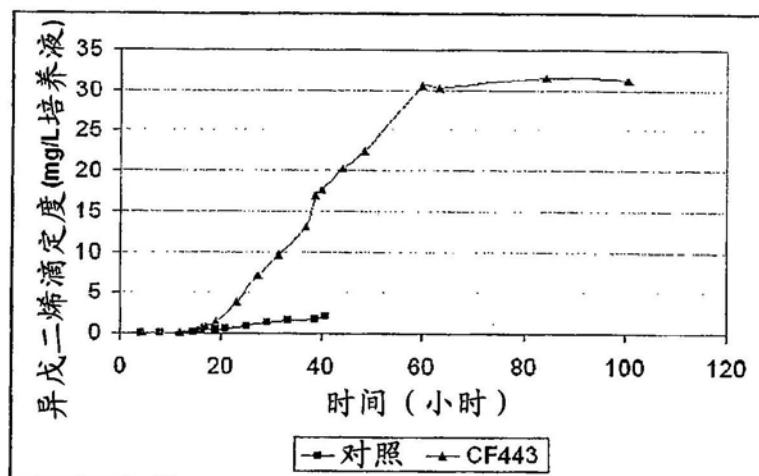


图53B

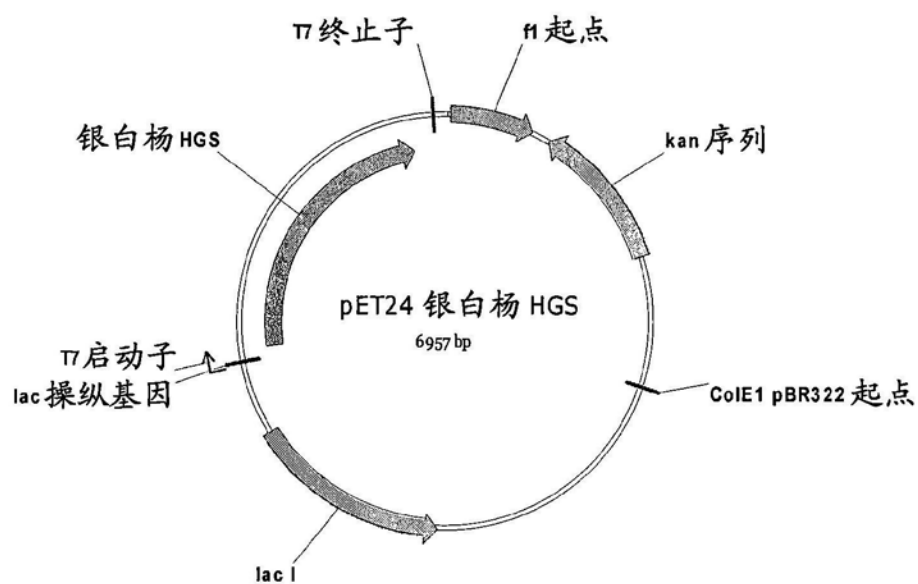


图54

1.

tggcgaatgggacgcgccctgtagcgcgcatlaagcggcggggtgtggtgtgttacgcgcagcgtgaccgtacactgtccagcgcgcc  
tagcgcgccgcctcttctgcttcttcccttcttctcgcacgttcgcgcgttcccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttttaggggtcc  
gatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattagggtgatgttcacgtagtgggccatcgccctgatagacggttttcgcc  
tttgacgttgagtcacgttcttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaacccatctcggctattctttgatttataagggat  
ttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatataacgcgaatttaacaaaatattaacgtttacaatttcagggtggca  
ctttcgggggaaatgtgcgcgggaaccctattgtttatttttctaaatacatcaaatatgtatccgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcg  
agcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaactcaccgag  
gcagtccataggaatggcaagatcctggatcggctcgcgattccgactcgtcccaacatcaatacaacctatttaattccctcgtcaaaaata  
ggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccgggtgagaatggcaaaagtatatgatttcttccagactgttcaacaggcca  
gccattacgctcgtcatcaaaaactcgcgcatcaaccaaacgggtattcattcgtgattgcgcctgagcgcgagacgaatacgcgatcgtgtta  
aaaggacaattacaacagggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcacatacaaatatttcacctgaatcaggatattcttc  
taatacctgggaatgctgttttcccggggacgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagag  
gcataaattccgtacgccagtttagtctgacctctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgttccagaacaactctggcgcat  
cgggcttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgcgagccatttataccataataatcagcatccatgttgga  
ttaatcgcggcctagagcaagacgttcccggtgaatatggctcataacacccctgtattactgttatgtagcagacagtttattgttcatga  
ccaaaalcccctaacgtgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaagatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaa  
tctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtgttgcggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggct  
cagcagagcgcgagataccaaatactgtccttctagtgtgacggttagtgccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgc  
tctgctaactcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgatagttaccggataaggcgca  
gcggctcgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctat  
gagaaagcggcacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcgaacaggagagcgcacgagggga  
cttccaggggggaaacgctggatctttatagtcctgtcgggttccaccctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgcagggggg  
cggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttctggccttttgcctggccttttgcacatgttcttctcgttatccct  
gattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcgacccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgcgag  
gaagcgggaagagcgcctgatgcggtattttctcttacgcacatctgtgcggtatttcacaccgcataatgtgtgactctcagtacaatctgctct  
gatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgtacgtgactgggtcatgtgctgcgcgcccgacaccgccaaacaccgcgtgacgc  
gcccctgacgggctgtctgtcccggcaltccgcllacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcagtgtgcagaggtttaccgctatc  
accgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaaagctcatcagcgtggctggaagcgattcacagatgtctgcctgttcacccgctccagctcg  
ttgagtttccagaagcggttaatgtctggcttctgataaagcgggcatgttaaggcggttttctctgtttggctactgatgcctccggtgaag  
ggggatttctgttcattgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgtcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttactg  
gaacgttgtgagggtaaacactggcggtatggatgcggcggggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgttccgttaataca  
gatgtagggtgttccacaggggtagccagcagcatctcgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgctgacttccgcgtttccagac  
tttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgtgtcaggtcgcagacgttttcagcagcagctcgttcacgttcgctcgcgtatcg  
gtgattcattctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggggcc  
gccatgcggcgataatggcctgttctcgcggaacgttgggtggcgggaccagtgacgaaggcgtgagcgcagggcggtgcaagattccg  
aataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgtccagcgaaagcggtcctcgcggaatatgaccagagcgtgcgggcacctgtc  
ctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagtcacgtccccgcgccaccggaaggagctgactgggtgaag  
gctctcaagggcacgcgtcgagatcccggtgcctaatagtgagctaaactacattaattgcgttcgctcactgccgcttccagtcggga  
aacctgtcgtgccagctgcatiaatgaatcgcccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggcgccagggtgttttctttcacca  
gtgagacgggcaacagctgattgcccttaccgccttgccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgctggtttgccccagcaggcga  
aatcctgtttgatgtgtggttaacggcgggatataacatgagctgtctcgggtatcgtctatccactaccgagatatccgcaccaacgcgc  
agcccggaactcggtaatggcgcgcattgcgccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgagtggaacgatgccctcattcagc  
atttgcagtggttgttgaaaacggacatggcactccagtcgccttccgttccgctatcgcgtgaatttgattgcgagtgagatatttatgccag

图55A



ccagccagacgcagacgcgcgagacagaactaatgggcccgtacacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccac  
gcccagtcgcgtaccgtctcatgggagaaaataatactgttgatgggtgctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgc  
aggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttatgatcagcccactgacgcgttgccgcgagaagattgtgcaccgc  
cgctttacaggcttcgacgccgcttcttaccatcgacaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagattaatcgccgcgacaa  
tttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgccacgcggttg  
gaatgtaattcagctccgccatcgccgttccacttttcccgcttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggct  
gataagagacaccggcatactctgcgacatcgataacgttactggtttcacattcaccacctgaattgactcttccgggctatcatgc  
cataccgcgaaagggttttgcgcattcgatgggtgctccggatctcgacgcttcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagta  
gggtgaggccgttgagcaccgcccgcaaggaaatgggtgatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgcca  
ccataccacgccgaaacaagcgtcatgagccgaagtggcgagcccgatcttcccatcggtgatgctggcgatataggcgccagca  
accgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctgatcccgcgaaattaatacgaactacta  
taggggaattgtgagcggataacaattccctctagaaataattttgttaactttaagaaggagatatacatatgcgttgtagcgtgtccaccg  
aaaatgtgtcttaccgaaactgaaaccgaagctcgtctgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgtgtctccga  
cacggacgagtcctcgaagtatacaagacaaagcgaagagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaagcagaat  
ttctgacctgtgtgaactgattgacaacgtccagcgcctgggctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtggtgcgtggtatcgcttctgt  
ttctccggcggttcgatgcggttaaccaagacttccctgcacggtaggcactgtcttccgtctgctgcgtcaacacgggtttgaggttctc  
aggaagcgttcagcggcttcaagacaaaacggcaacttctggagaacctgaaggagatatcaagctatcctgagcctgtacgagg  
ccagcttctggtctggaaggcgaacatcctggacgaggcgaagggttttcgaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatc  
ggtaaagagctggcagaacagggtgaacctgactggaactgccactgcctgactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgag  
gcctaccgtaaaaaggagacgcgaatcagggtctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagctctgtataccagcgtgatct  
gcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgacaaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactggccg  
tgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcaaaaatgtttcttctgaaccattatcgacgatatctacgatgat  
acggcaccttgagcgaactggagctgttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggattacatgaaact  
gtgcttctggctctgtataacactattaacgaaatcgctacgacaacctgaaagataaagggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagc  
ctgggctgacctgtgcaacgcttctcgaagaagccaagtggctgtacaacaaatctactccgacctttgacgactacttcggcaacgcatg  
gaaatcctctctggcccgtgcaactgggtgctgcttacttgcgtgctgctgcagaacattaaaaaggagagatcgaaaacctgcaaaaata  
ccatgacaccatctctcgtcttccatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctcgggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaat  
agcgttctgttacatgcgcactaaaggatatccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgaacctggaaaaagatg  
aacaaggaaaaactgggtggttagcctgttcgcgaaccggttcgtggaaaccgcgataacacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataa  
cggcgacgcgcatacctctccggtgatgagctgacctgcgaacgcgttctgtctgtaatcactgaaccgattctgccgtttgaacgctaaggat  
ccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgtaacaaagcccga  
ggaagctgagttggctgctgccaccgtgagcaataactagcataacccctggggcctctaaacgggtcttgaggggtttttgctgaaag  
gaggaactatatccggat (SEQ ID NO:87)

图55B



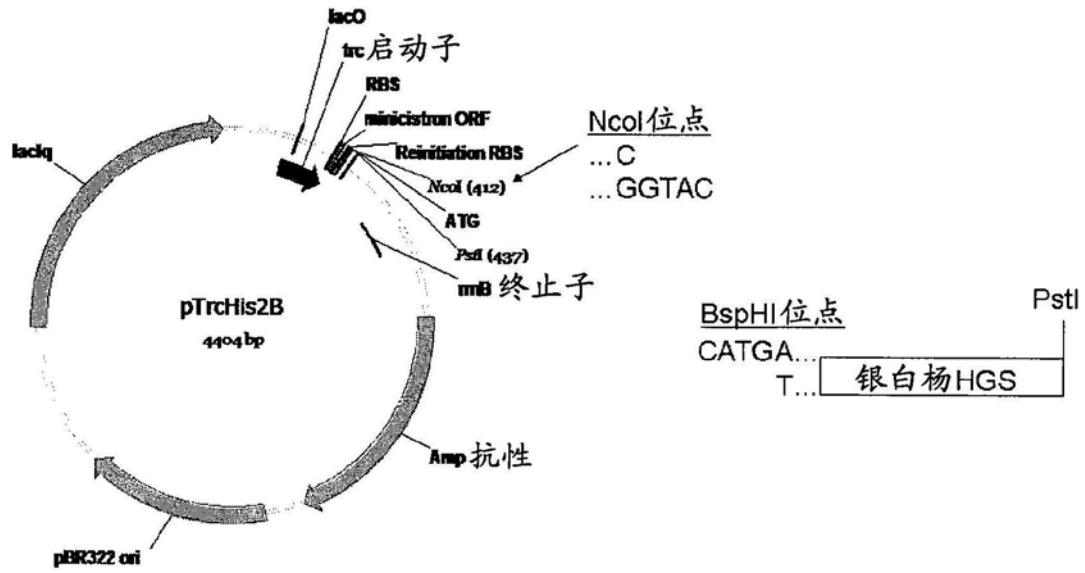


图56

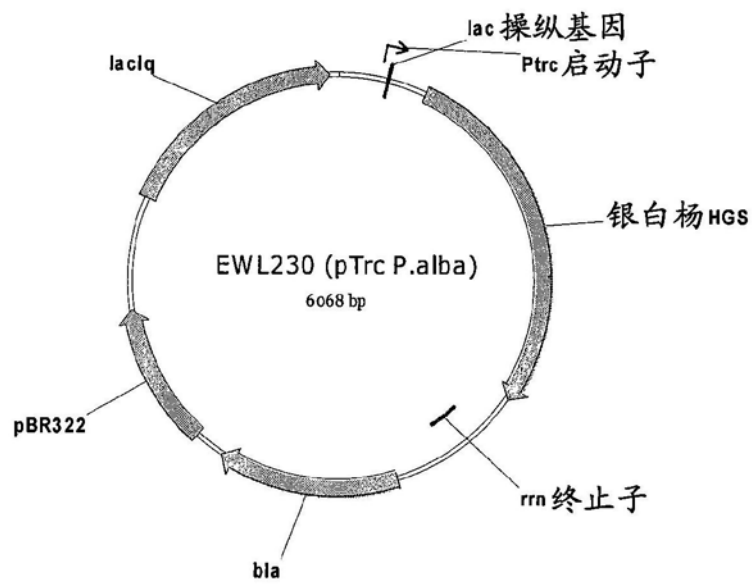


图57

1-

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaat  
cactgcataattcgtgtcgtcaaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcgccgacatcataacgggtctggcaaatattctgaaatgag  
ctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacaggaacacgcccgtgagaaaaagcg  
aagcggcactgctcttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattataaaaaatfaagagggtat  
attaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgagatgtagcgtgtccaccgaaaatgtgtcttcaccgaaactgaaaccgaagctcg  
tcgttctcggaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgtgtcctccgacacggacgagtcctcgaagtatacaaaagacaaag  
cgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgacctgtggaactgattgacaacgtccagcg  
cctgggcttggttaccgtttcgagtcgtatccgtgggtgcgtggtatcgttctcctccggcggttcgatgcgtaaccaagacttcc  
ctgcacggttacggcactgtcttccgtctgtcgtcaacacgggtttgaggtttctcaggaagcgttcagcggttcaagaccaaagcggc  
aacttctggagaacctgaaggagatacaagctatctgagcctgtacgagccagcttctggtctggaagcgaaaaacatcctgg  
acgagggcgaaggttttgcgaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggttaaagagctggcagaacaggtgaacctgcact  
ggaactgccactgcacgccttactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctg  
ctggagctggcaattctggaattacaacatgatccagctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctg  
gcgacaaactgcactttgtcgtgaccgctgattgagagcttctactggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccg  
taactccgtcgcaaaaatgttttcttctgaaccattatcgacgatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgc  
agttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggattacatgaactgtgttcttggctctgtataacactatttaacgaaatcgcc  
tacgacaacctgaaagataaagggtgagaacatcctgccgtatctgacaaagcctgggctgacctgtgcaacgcttccctgcaagaagcca  
agtggctgtacaacaaatctactccgaccttggactacttccgcaacgcatggaatcctcttctggcccgtgcaactggtgttcgctta  
cttcgtctgtcgtcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaataccatgacaccatctctcgtccttcccatatcttccgtctg  
tgcaatgacctggctagcgcgtctcgggaaattgcgctggtgaaaccgcaaatagcgttcttctgtacatgcgcactaaaggatctccgaa  
gaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaacctggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaa  
ccgttcgtggaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccc  
gcaaacgcgttctgtctgtaactactgaaccgattctgccgttgaacgctaactgcagctggtaccatatgggaattcgaagcttctagaac  
aaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcctcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcg  
gatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcgggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggt  
ggtccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgcgcgtagcgcgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaact  
gccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactggcccttctgtttatctgttgttgcggtgaacgctctcctgagtaggacaa  
atccgcccgggagcggattgaacgttgcgaagcaacggcccgagggtggcgggcaggacgcccgcataaactgccaggcatcaaat  
taagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgttctacaaactcttttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaga  
caataacctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgtcgccttattccctttttgcggcattttg  
ccttctgttttgtcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatgaactggatctc  
aacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccg  
tgttgacgcgggcaagagcaactcggctgcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttac  
ggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacctgagtataactgcggccaacttacttctgacaacgaicggagga  
ccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaa  
cgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaaactggcgaactacttacttagcttcccggaac  
aattaatagactggatggagcgggataaagttgcaggaccacttctgcgtcggcccttccggctggctgttattgtctgataaatctggag  
ccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtc  
ggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagtttactcatatata  
ctttgattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctagggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgt  
ccactgagcgtcagacccgtagaaaaagatcaaaagatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgtcgttgcacaaaaaaaacca  
ccgctaccagcgggtgttgttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatact  
gtccttctagtgtagccgtaggttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaactcgttaccagtggctgc

图58A

tgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgagcggtcgggctgaacggggggttc  
gtgcacacagcccagcttgagcgaaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcttcccgaag  
ggagaaaggcgagaggtatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgacaggggagcttcagggggaaacgcctggtat  
ctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcaggggggcgagcctatggaaaaacgccagca  
acgcggcctttttacgggttcttgcccttttctggccttttctgcacatgttcttctcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcct  
ttgagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaaagcggaagagcgctgatgcgggt  
attttctcttacgcatctgtcgggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacact  
ccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcccgtacgggcttctgtctcccggca  
tccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggtttaccgctcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatca  
attcgcgcgcgaaggcggaagcggcatgcatctacgttgacaccatcgaaatggtgcaaaaccttctcgggtatggcatgatagcggcgaa  
gagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgtttatcagatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgttcccgcgtg  
gtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtgaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggc  
acaacaactggcggggcaaacagtcgttgcgtgattggcggtgccacctccagtcgtggcctgcacgcgccgtcgcaaatgtcgcggcgatt  
aaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgctgatggtagaacgaagcggcgctgaagcctgtaaagcggcggtgcacaa  
tcttctcgcgaacgcgtcagtggtggtgatcattaactatccgctggtgaccaggatgccattgctgtggaagctgctgactaatgttccg  
gcgttatttctgatgtctctgaccagacacctcaacagtattattttctccatgaagacgggtacgcgactggcggtggagcatctggtcgc  
attgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcggggccattagttctgtctcggcgctgtcgtctggtcgtggcgtgataaatatctcactcg  
caatcaattcagccgatagcgggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggtttcaacaaccatgcaaatgctgaatgagggcac  
gttcccactgcgatgtggttccaacgatcagatggcgctggcgcaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttggtgcggat  
atctcggtagtggtgatacagcagataccgaagacagctcatgttatatccgcgcgtcaaccacatcaaacaggatttgcctgctgggca  
aaccagcgtggaccgcttgcgaactctcagggccaggcggtgaagggaatcagctgttggcgcgtcactggtgaaaagaaaaac  
caccctggcgcccaatcagcaaacgcctctcccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcacgacagggttcccactggaagc  
gggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg (SEQ ID NO:88)

图58B

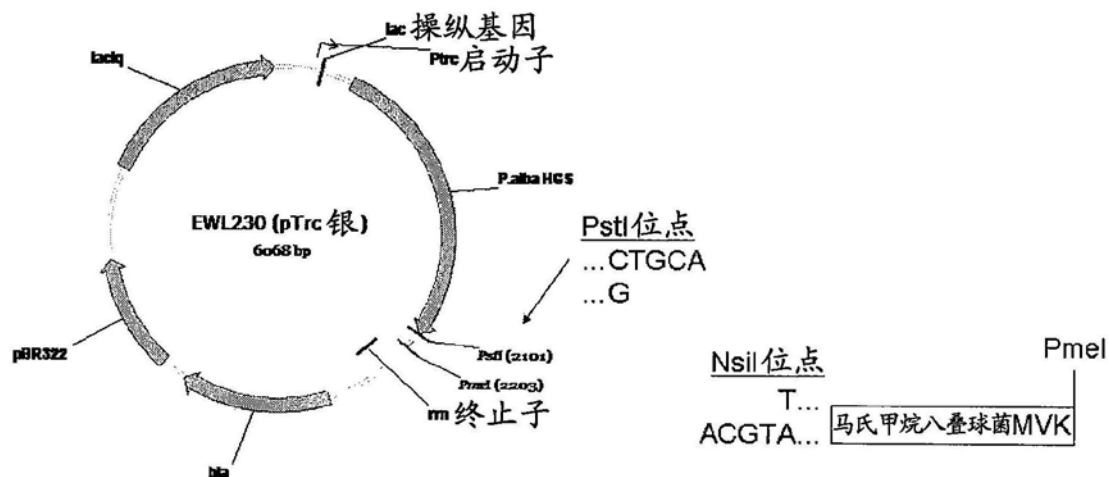


图59

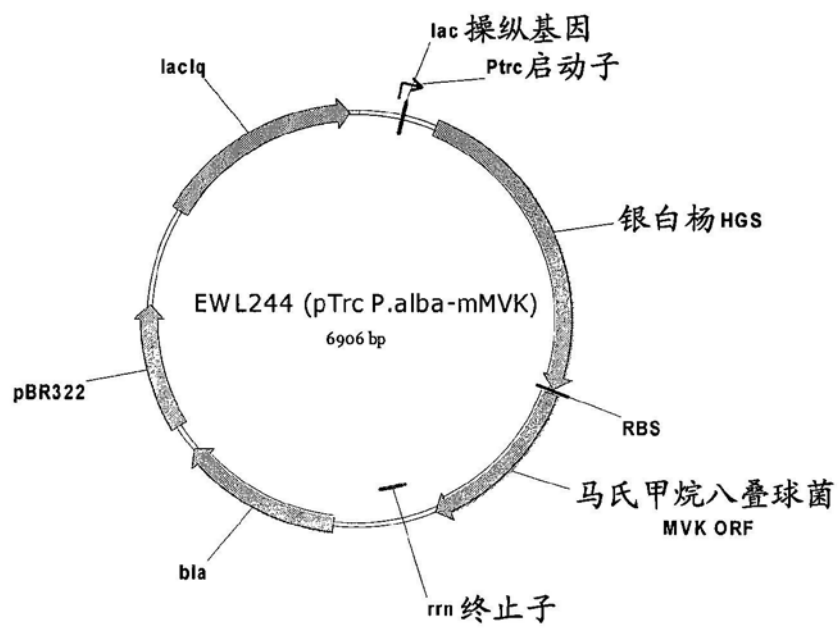


图60

1-

gtttgacagcttatcatcgactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaat  
cactgcataattcgtgtcgtcaaggcgcaactcccgttctggataatgtttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaatgag  
ctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcgggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcg  
aagcggcactgctctttaacaattatcagacaatctgtgtgggcactcgcaccggaattatcgattaactttattataaaaattaaagaggtatat  
attaatglatcgattaaataaggaggaataaaccatgagatgtagcgtgtccaccgaaaatgtgtcttcaccgaaactgaaaccgaagctcg  
tcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgtgtctccgacacggacgagtcctcgaagtatacaagacaaag  
cgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaattttctgacctgctggaactgattgacaactgccagcg  
cctgggcccgtgggttacgtttcgtgctgataatcgtgggtgcgtggatcgcttcgtttcctccggcggttcgatgcggtaaccaagacttcc  
ctgcacgggtacggcactgtcttccgtctgtcgtcaacacgggtttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaagacaaaaacggc  
aacttctggagaacctgaaggaaagatatcaaaactatcctgagcctgtacgagggcagcttctggctctggaaggcgaaaacatcctgg  
acgagcgcaagggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagctggcagaacaggtgaacctgact  
ggaaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatgtgtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctg  
ctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtcgtlataccagcgtgatctcgtgaaacgtccgttggtggcgctgtgtgggtctg  
gcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagcttactggtggcgtgggtgtgacatcgaaaccgcaatactccgactgccg  
taactccgtcgcaaaaatgttttcttcgttaaccattatcgacgatatctacgatgtatcggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgc  
agttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgcgggattacatgaaactgtgttctggctctgtataacactattaacgaaatgcc  
tacgacaacctgaaagataaagggtgagaacatcctgccgtatcgacaaagcctgggctgacctgtcaacgcttctcgaagaagcca  
agtggctgtacaacaaatctactccgacctttgacgactacttggcaacgcagtggaatcctcttctggcccgtgcaactggtgttcgctta  
cttcgtgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaataccatgacaccatctctcgtccttcccatatcttccgtctg  
tgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgctgtgtgaacccgcaaatagcgtttctgttacatgcgcactaaaggatctccgaa  
gaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgaacctggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaa  
ccgttctgtgaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcataacctctccggtgatgagctgaccc  
gcaaacgcgttctgtctgtaactcactgaaccgattctgccgtttgaacgctaactgcataaaggaggtaaaaaacatggtatcctgttctgcg  
ccgggtaagatttacctgttcgggtgaacacgccgtagttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaaactgcgtaccctgttcgcgcg  
gaactcaatgactctatcactattcagagccagatcgccgcaccggctgtgatttcgaaaagcacccttatgtgtctgcggtaattgagaaa  
atgcgcaaatctattctattaacgggtgttttctgaccgtcgattccgacatcccggtgggtctcgggtctgggtagcagcgagccgttactat  
cgcgtctattgtgcgtgaacgagctgttcggctttggcctcagcctgcaagaaatcgctaaactgggccacgaaatcgaattaaagtac  
agggtgcgcgtcccaaccgatacgtatgtttctaccttggcgcggtgtgtaccatcccgaaacgtcgcaactgaaactccggactg  
cggcattgtgattggcgataccggcggttttctcctccaccaagagtttagtagtaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccggatttgat  
cgaaccgtgatgacctctattggcaaaatctctcgtatcggcgaaactggttctgtctggcgactacgcacatccatcgccgcctgatgaa  
cgtaaccagggtctcctggacgccctggcggttaacatcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgttggcg  
ctaaaatcacgggcgtggtggcggtgtgtatggttgcgtgaccgctccgaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcagggc  
gctggcggtaaagtactatcactaaaccgaccgagcaaggctgtaaaagttagtaaaagtctagttaaagttaaacgggtctccagcttggt  
gttttggcggtatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggtcagt  
agcgcggtgggtccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgccgtagcgccgatggtagtgtgggtctcccatgcgagagt  
agggaactgccaggtcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaagactgggccttctgtttatctgtgtttgtcgggtgaacgctctcctgag  
taggacaaatccgcccggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggccggagggtggcgggcaggacggccgataaactgccag  
gcatcaaatgaagcagaaggccatcctgacggtggccttttgcgtttctacaaactcttttgttttttctaaatataatglatccg  
ctcatgagacaataacctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtatgattcaacatttccgtgtcgccttattccctttttg  
cggcattttgccttctgttttgcacccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcga  
actggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggccgaagaacgttttcaatgatgagcacttttaaagttctgtatgtggcgcg  
gtattatcccgtgttgacggcgggcaagagcaactcggtcggcgatacactatttcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaa  
aagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtcgcataacctgagtgataaactcgggccaacttacttctgacaacg

图61A

atcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaag  
ccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttacttagct  
tcccggaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctggtttattgctgat  
aaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctccgtagctagttatctacacgac  
ggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagt  
actcatatatacttttagattgatttaaaacttcattttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgt  
gagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaca  
aaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggctcagcagagcgcagat  
accaaatactgtccttctagtgtagccgtagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaactctgttac  
cagtggctgctgccagtggcgataagtcgtcttaccgggttgactcaagacgatattaccggataaggcgcagcggctgggctgaa  
cgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccac  
gttcccgaaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggggagctccagggggaa  
acgcctggtatctttatagtcctgctcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatggaaa  
aacgccagcaacgcggcctttttacggttctgacctttgtgacctttgtcacatgttcttctcgcttatccctgattctgttgataacc  
gtattaccgctttgagtgaactgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgagtgagcaggaagcggaaagagcg  
cctgatcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttccaccgcatatggtgcactctcagtaaatctgctctgatgcccatagttaag  
ccagtatacacccgctatcgtactgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggctgtg  
ctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgacctctccgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctatcaccgaaacgcgcga  
ggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaccttccggtatggcatga  
tagcggccgggaagagagtaattcagggtggtgaatgtgaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatccgggtgtctcttatcagac  
cgtttcccgctggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtgaagcggcagatggcgggagctgaattacattcc  
caaccgctggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgcgtgattggcgttgcacctccagcttgccctgcacgcgcctgcgcaatt  
gtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgctgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcg  
gcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggtgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctg  
cactaatgttccggcgttatttctgatgtcttgaccagacacccatcaacagtatttttctcccatgaagacgggtacgcgactggcggtgg  
agcatctggctgcattgggtcaccagcaaatcgcgcgtgtagcggggccattaaagtctgtctcggcgctctgcgtctggctggctggcata  
aatactcactcgaatcaaatcagccgatagcgggaacgggaaggcgactggagtccatgtccgggtttcaacaaccatgcaaatgctg  
aatgagggcacgttccactgcgatgctggttccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgc  
gttgggtcgggatatctcggtagtgggatacgcgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccacatcaaacaggatttccg  
ctgctggggcaaacaccgctggaccgcttctgcaactctctcaggccaggcgggtgaagggcaatcagctgttcccgtctcactggtg  
aaaagaaaaaccacctggcgcccaatacgaaccgcctctcccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttccc  
gactggaaagcgggcagtgagcgaacgaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg (SEQ ID NO:89)

图61B

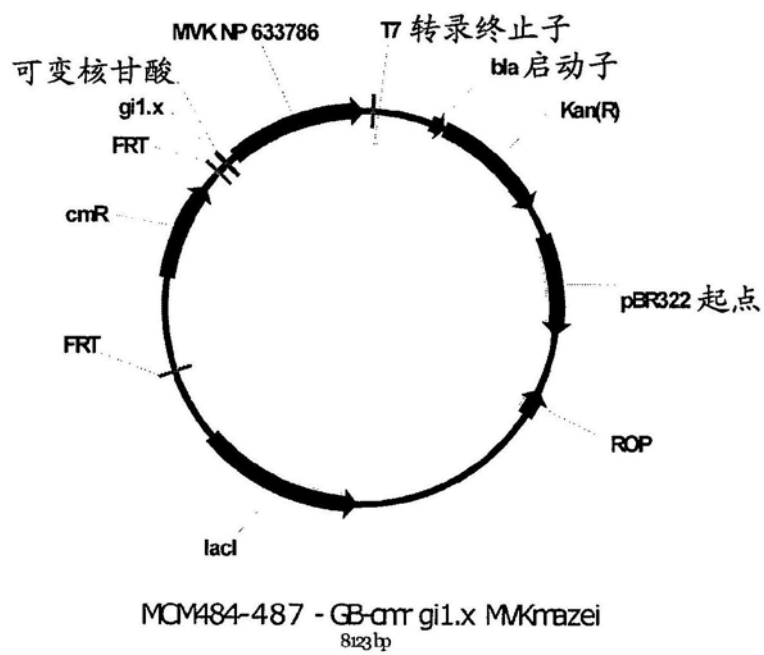


图62



1-

aaggcgagctcaacgatccggctgctaacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataacc  
ccttggggccctctaaacgggtcttgaggagtttttctgaaaggagggaactatccggatatcccgaagaggccggcagtagccggcat  
aaccaagcctatgcctacagcatccagggtgacgggtccgaggatgacgatgagcgattgtagattcatacagggtcctgactgcgtt  
agcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaacatgagaattaattctgaagacgaaaggccctctg  
atacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctattgtt  
attttctaaatacattcaataatgtatccgctcatgagacaataacccgtataaatgctcaataatattgaaaaagggaagagtatgattgaacaa  
gatggattgcacgcagggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaactgacaatcggctgctctgatgccg  
ccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttctcaagaccgacctgtccgggtccctgaatgaactgcaggacgaggcagc  
gcggctatcgtggctggccacgacggcggttcttgcgcagctgtgctcgactgttgcactgaagcgggaagggaactggctgctattggg  
cgaagtgcggggcaggatctctgtcatctacctgtcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcgggggctgcatacgc  
ttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgggcacgtactcggatggaagccggtctgtcgatcagga  
tgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcgatcccgcaggcgaggatctcgtc  
gtgacacatggcgatgcctgttgcgaatatcatggtgaaaatggcgcctttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcgga  
ccgctatcaggacatagcgttggctaccgtgatattgtgaagagcttggcgccgaatggctgaccgcttctctgtgtttacgggtatcgc  
cgctcccgaattcgagcgcacgccttctatcgcttcttagcaggttcttctgagcgggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcgac  
gcctaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttattttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatct  
catgacaaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaagatcttcttgatcctttttctgcg  
cgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgttgggttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaact  
ggcttcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatac  
ctcgcctcgtcaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataag  
gcgcagcggctcgggtgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtg  
agctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacg  
agggagcttcagggggaaacgcctggtatctttagtctgtcgggttccgacctgtacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagg  
ggggcgagcctatggaanaacgccagcaacgcggccttttaccgggttctggttcttgccttttgccttttgcacatgttcttctgcgttat  
ccctgattctgtggataaccgtattaccgctttagtgagctgataccgctcggccagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagttag  
cgaggaagcgggaagagcgcctgtatgcgggtatttctcttaccatctgtgcgggtatttcacaccgcaatgggtgcactctcagtacaatctgct  
ctgatccgcatagttaagccagtatatactccgctatcgtacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgac  
gcgccctgacgggcttctgtctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgttcagagggtttaccgctc  
atcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaagctcatcagcgtggctgtgaagcgattcacagatgtctgctgttcatccgcgtccagc  
tcgttgagtttctcagaagcggttaattgtctggtcttgataaagcgggcatgtaaggcggtttttctgtttgtcactgatgctcctgtgt  
aagggggatttctgttcatgggggtaattgataccgatgaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgccgggta  
ctggaacgttgtgagggttaaacactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgttcgttaat  
acagatgtaggtgtccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatgggtgcaggcgctgacttccgcgtttcca  
gactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttctcaggtcgcagacgtttgcagcagcagtcgttccagctcgcgtc  
tcggtgattcattctgtaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcagatcatgcgacccggtggcc  
aggaccaacgctgcccagatgcgcgcgtgcggctgctggagatggcgagcgcgatggatatgttctccaagggttgggttgcgc  
tcacagtctccgcaagaattgattggctccaattcttgagtggtgaatccgttagcgagggtgccgcccgttccattcaggtcgagggtggc  
ccggctccatgcaccgcgacgcaacgcggggaggcagacaaggtataggcgggcctacaatccatgcaacccgttccatgtgctc  
gccgaggcggcataaatccggtgacgatcagcgggtccaatgatcgaagttaggtgtgtaagagccgcgagcagatcctgaagctgtccc  
tgatggtcgtcatctacgtcctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgccgcccgaagcgagaagaatcataatggggaa  
ggccatccagcctcgcgtcgcgaacgccagcaagacgtagccagcgcgtcggccgcatgccgagcagataatggcctgttctcgcg  
aaacgttgggtggcgggaccagtgacgaaggctgagcagggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatctcgc  
gtccagcgaaagcggtcctcgcgaaaatgaccagagcgtgcggcacctgtctacgagttgcatgataaagaagacagtcataag

图63A



tgcggcgacgatagtcatgccccgcgccaccgggaaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgagatccccggtgcct  
aatgagtgagctaacctacatlaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagctcgggaaacctgtcggtgccagctgcattaatgaatcgcca  
acgcgcggggagaggcggtttgcgtattggcgccagggtggtttttttaccagtgagacggggcaacagctgattgcccttcaccggcc  
tggccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaaacctgtttgatggttggttaacggcgggatataac  
atgagctgtcttcggtatcgctgatatccactaccgagatataccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcatggcgcccag  
cgccatctgatcggttggcaaccagcatcgagtggaacgatgccctcattcagcatttgcattggtttgtgaaaaccggacatggcactcca  
gtcgcttcccgttccgctatcggtgaattgattgcgagtgagatattatgccagccagccagacgcagacgcgcggagacagaactta  
atgggcccgtctaacagcgcgatttctgtgtgacccaatgcgaccagatgtccacgcccagtcgctgaccgttctatgggagaaaaataa  
actgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaataacgccgggaacattagtgcaggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatcca  
gcggatagttaatgatcagccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgtttacagggttcgacgccgcttcgttctaccatc  
gacaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagattaatcgccgcgacaatttgcgacggcgcggtgcagggccagactggaggt  
ggcaacgccaatcagcaacgactgtttcccggcagttgtgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccacttt  
ttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggttccaccacgcgggaaacgggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgata  
acgttactggtttacattcaccacctgaattgactctctccgggcgctatcatgccataccgcgaaagggttttgcgccattcgatggtgtcc  
gggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccggttgagcaccgccgcgcaaggaa  
ggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccataccacgccgaaacaagcgctcatgagcccg  
aagtggcgagcccgatctccccatcggtgatgtcgcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatccggccacgat  
gcgtccggcgtagaggatcgagatctgatcccgcaaatataacgactactatagggggaattgtgagcggataacaattccccttaga  
aataatttgttaactttaagaaggagatatacatatgaattaaccctactaaaggcgccgcggaagtctctattctagaaagtataggaa  
cttactctaccgggtaggggagggcgcttttcccaaggcagctctggagcatgcgcttttagcagccccgtgggcacttggcgctacacaagt  
ggcctctggcctcgacacattccacatccaccggtaggcgcaaccggctccgttctttgggtggcccccttcgcgccaccttccactctcc  
cctagtcaggaaagtcccccccgcccgagctcgctcggtgcagggacgtgacaaatggaagtagcacgtctcactagtctcgtagcatg  
gacagcaccgctgagcaatggaagcgggttaggccttggggcagcgcccaatagcagcttgcctctcgcttctgggctcagagggtg  
ggaaagggtgggtccggggggcgggctcagggggcggggtcagggggcggggcggcgcccgaaggctctccggaggcccgccattct  
gcacgcttcaaaagcgcacgtctgccgcgtgttctctcttctcatctccgggcttctgacctgcagcagcacgtgtgacaattaatcat  
cggcatagtatacggcatagtataatacacaaggtgaggaaataaaccatggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacc  
caatggcatcgtaaagaacaattttgaggcatttcagtcagttgtctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaag  
accgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttgcggcctgatgaatgtcatccggaattccgtatggcaatgaa  
agacgggtgagctggtgatattggatagtggttacacctgtttccatgagcaaacgaaactgtttcatcgctctggagtgaatacc  
acgacgatttccggcagttctacacatatattcgcaagatgtggcggtgttacgggtgaaaacctggcctatttccctaaaggggttattgagaat  
atgttttctgtctcagccaatccctgggtgagtttaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttaccatgg  
gcaaatattatatacgaaggcgacaaggtgctgatccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgc  
ttaatgaattacaacagtactcgatgagtggtgagggcgggggcgtaagcgggactctggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtct  
gagagctccctggcgaattcggtagcaataaaagagctttattttcatgatctgtgtgtgtttgtgtgctggcgcggaagtcttattcttag  
aaagtataggaacttctcagccctatagttagtcgtattagatcgggccgcgcccgttgcacatcccatcctgagcaataaattcaacc  
actaattgtgagcgggataacaaaaggaggtaaaaaaacatgtatcctgttctgcggcggggtaagatttacctgttcgggtgaacacgccgtagt  
ttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaactgcgtaccggtgttcgcgcggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcgg  
ccgcaccgggtctggatttcgaaaagcaccttatgtgtctgcggttaattgagaaaatgcgcaaatctattctattaacgggtgtttcttgaccgt  
cgattccgacatcccggttgggtcgggtctgggttagcagcgcgacccgttactatcgcgtctattgggtgcgtgaacgagctgttcggcttg  
gctcagcctgcaagaaatcgtaaaactgggccacgaaatgaaatfaagtacagggtgcgcgtcccccaaccgatacgtatgtttctacc  
ttggcgggcggtgttaccatcccgaacgtcgcaaaactgaaaactccggactcgggcattgtgattggcgataccggcggttttctctccac  
caaagagttagtagctaactgtacgtcagctgcgcgaaagctaccgggatttgatgaaccgctgatgacctatttggcaaatctctcgat  
cggcgaaacaactggttctgtctgtggcgactacgcattcatcgcccgctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctggcggttaac  
atcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaaatcacggcgcgctggcgcgcggtggtgtatggt

图63B

tgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactatcactaaaccgaccgag  
caaggtctgaaagtagattaa (SEQ ID NO:90)

图63C

1-

aaggcgagctcaacgatccggctgctaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataacc  
ccttggggcctctaaacgggtcttgaggagtttttctgaaaggaggaactatataccggataatcccgaagaggcccgagtagccgcat  
aaccaagcctatgctacagcatccagggtagcgggtccgaggatgacgatgagcgattgttagatttcataacagggtgctgactgcgt  
agcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaaacatgagaattaattctgaagacgaaaggcctcgtg  
atacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaaccctatttgtt  
attttttaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgattgaacaa  
gatggattgcacgcagggttctccggccgttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaactgacaatcggtgctctgatgccg  
ccgtgttcgggtgtcagcgcagggggcgccgggtcttttctgaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagc  
gcggtctatcgtgggtggccacgacgggcgttccctgcgcagctgtgctgcacgtgtcactgaagcgggaagggaactggctgctattggg  
cgaagtgcgggggagggatcctgtcatctcacctgtcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgaatcgggcggtgcatacgc  
ttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcacgcagcgggcacgtactcggatggaagccggtctgtcgtatcagga  
tgatctggacgaagagcatcaggggtcgcgcagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcacatgccgacggcgaggatctcgtc  
gtgacacatggcgatgctgcttgcgaatatcatggtggaatatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcgga  
ccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgtgaagagcttggcggaatgggctgaccgcttctcgtgctttacgggtatcgc  
cgctcccgattcgcagcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttctctgagcgggactctggggttcgaatgaccgaccaagcgac  
gcctaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcattttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatct  
catgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgatcctttttctgcg  
cgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttcttccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaact  
ggcttcagcagagcgcagatacacaatactgtccttctagttagcgttagtgccaccacticaagaactctgtagcaccgctacatac  
ctcgtctgtctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagctgtgttaccgggttgactcaagacgatagtaccggataag  
gcgacgcggctggggtgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtg  
agctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcgacaggtatccgtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacg  
agggagcttcagggggaaacgctgtgtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgaattttgtgatgctcgtcagg  
ggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggttctggccttttctgctcacatgttcttctcgttct  
cccctgattctgttgataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgag  
cgaggaaagcggaagagcgctgtatgcgggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcaatggtgactctcagtacaatctgct  
ctgatccgcatagttaaagccagtatacactccgctatcgtacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgac  
gcgcccgtacgggtgtgtgtcctccggcatccgttacagacaagctgtgacgctcctgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctc  
atcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggttaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgctgttcatccgcgtccagc  
tcgttgagtttccagaagcgtaatatgtctggttctgataaagcgggcatgttaaggcggtttttctgttggctactgatgctcctcgtgt  
aagggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgccgggta  
ctggaacgttgtgagggtaaacactggcggtatggatcgggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgcttcgtta  
acagatgtaggtgttccacagggttagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcaggggcgtgacttccgcgtttcca  
gactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgtgtgtcaggtcgcagacgttttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgta  
tcggtgattcattctgtaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggcc  
aggaccaacgctgcccagatgcgcccgtgcggctgctggagatggcgagcgcgatggatattctgccaagggttggttgcgcat  
tcacagttctccgaagaattgattggctccaattcttgagtggtgaatccgttagcgaggtgccggcggttccattcagggtcaggtggc  
ccggctccatgcaccgcgacgcaacgcggggaggcagacaaggtataggcgcgccctacaatccatgcaacccgttccatgtgtc  
gcccaggcggcataaatcgcgtgacgatcagcgggtccaatgatcgaagttaggctggtaagagccgcgagcgatcctgaagctgtccc  
tgatggtcgtcatctacctgcctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatccgcccgaagcgagaagaatcataatggggaa  
ggccatccagcctcgcgtcgcgaacgccagcaagacgtagcccagcgcgtcggccgcatgccggcgataatggcctgcttctcgcg  
aaacgttgggtggcgggaccagtgcgaaggcttgagcgagggcggtcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgc  
gtccagcgaaagcggtcctcgcgaaaatgacccagagcgctgcgggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataag

图64A

tgcggcgacgatagtcacgccccgcgccaccggaaggagctgactgggttgaggctctcaaggcatcggtcgagatcccgtgcct  
aatgagtgaactaacattacattgctgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtctgccagctgcattaatgaatcgcca  
acgcgcggggagagggcggtttgcgtatggcgccagggtggtttttttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttaccgcc  
tggccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgttgatggttgtaacggcgggatataac  
atgagctgtctcggatcgtcgtatccactaccgagataccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgattgcgccag  
cgccatctgatcgttgcaaccagcatcgagtggaacgatgccctcattcagcatttgcgtgttgtaaaccggacatggcactcca  
gtcgccttcccgttccgtatcggtgaatttgatgcgagtgagataattatgccagccagacgcagacgcgcggagacagaactta  
atggggccgctaacagcgcgatttgcgtgacccaatgcgaccagatgtccacgccagtcgctaccgtctcatgggagaaaataat  
actgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatcca  
gggtagtgaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgtttacaggcttcgacgccgttcgttctaccatc  
gacaccaccagctggcaccagttgatcggcgagatataatcgcgcgacaatttgcgacggcgctgcagggccagactggaggt  
ggcaacgccaatcagcaacgactgtttgccgccagttgttgccacgcggttggaatgaattcagctccgccatcgccgcttccacttt  
ttcccgcgttttcgagaaacgtggctggcctggttaccacgcgggaaacggctctgataagagacaccggcactactctgcgacatcgata  
acgttactggttccacattcaccacctgaattgactcttctccggcgctatcatgccataccgcgaaagggtttgcgccattcgatggttcc  
gggatctgcagcctctcccttatgcgactcctgcaataggaagcagcccagtagtaggtgagggcgttgagcaccgccgccgaaggat  
ggtgatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccataccacgccgaaacaagcgtcatgagcccg  
aagtggcgagcccgatcttcccatcggtgatgicggcgatagggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgat  
gcgtccggcgtagaggatcgagatctcgtatcccgcaaatatcagactactatagggaattgtgagcgggataacaattccccttaga  
aataatttgttaactttaagaaggagatatacatatgaattaacctcactaaaggcgccgcggaagtctctatctagaaagtataaggaa  
cttcattctaccgggtaggggagggcgttttccaaggcagctctggagcatgcgctttagcagccccgtgggcacttggcgctacacaagt  
ggcctctggcctcgacacattccacatccaccggtaggcgccaaccggctccgttcttgggtggcccccttcgcgccaccttccactcctcc  
cctagtccaggaagtcccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaatggaagtagcacgtctactagtctcgtgcagatg  
gacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagcttctccttcgcttctgggtcagaggctg  
ggaaaggggtgggtccggggcggggtcagggcggggtcagggcgggcgggcgcccgaaggctcctccgaggcccgccgactct  
gcacgcttcaaaagcgcagctcgcgcgtgttctccttctcctcactcctgggccttctgacctgcagcagcagctgttgacaattaatcat  
cggcatagtatcggcatagtataatcagacaaggtgaggaactaaaccatggagaaaaaatcactggatataccaccggtgatatatcc  
caatggcatcgtaaagaacattttagggcattcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaaag  
accgtaaaagaaaaataagcacaaagtttatccggcctttattcacattcttcccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaa  
agacgggtgagctggtgatatgggatagtgttacccttgttacaccgttttccatgagcaaatgaaacgttttcatcgtctggagtgaatacc  
acgacgatttccggcagttttacacataatcgaagatgtggcggtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggttattgagaat  
atgttttctcagccaatccctgggtgagttcaccagttttgatttaaactggccaatatggacaacttcttcgccccgttttaccatgg  
gcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatccgctggcgattcaggttcacatgcggtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgc  
ttaatgaattacaacagctactgcgatgagtgagggcgggcggtgaagcgggactctggggtcgaataaagaccgaccaagcgacgtct  
gagagctccctggcgaaattcggtaccaataaaagagctttatttcatgatctgtgtgtgtttgtgtgcggcgcggaagttcctattcttag  
aaagtataggaaacttctcgagccctatagttagtcgtattagatcgccggcgcccttgacctgccacatcctgagcaataattcaacc  
actaattgtgagcgggataacaaaggaggtaaaaaacatggtatcctgttctgcgccgggtaagatttacctgttcgggtgaacacgccgtagt  
ttatggcgaaactgcaattgcgtgtcgggtggaactgcgtaccgtgttcgcgggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcgg  
ccgcaccggctgtgatttcgaaaagcacccttatgtgtcgtcggttaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacgggttttcttaccgt  
cgattccgacatccgggtgggtcctgggttagcagcgcagccgttactatcgctctattggtgcgtgaacgagctgttcggctttg  
gcctcagcctgcaagaaatcgctaaactgggccacgaaatcgaataaagtacagggtgccgcgtcccccaaccgatacgtatgtttctacc  
ttcggcgggcgtgttaccatcccgaacgtcgaaactgaaaactcgggactcggcattgtgattggcgataccggcggttttctcctccac  
caaagagtttagtgaactacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccggatgtgatgaaccgctgatgacctatttggcaaatctctcgtat  
cggcgaaacactggttctgtctggcgactacgcatccatcgccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgcccggcggttaac  
atcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacggcgctggcgcggtggtgtatggt

图64B

tgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactatcactaaaccgaccgag  
caaggtctgaaagtagattaa (SEQ ID NO:91)

图64C



1-

aaggcgagctcaacgatccggctgctaacaagcccgaaggagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataacc  
ccttggggcctctaaacgggcttgaggagtttttgcgtgaaaggaggactatatccggatatcccgaaggggccgagtgaccggcat  
aaccaagcctatgctacagcatccagggtaggggtgacgggtgacgatgacgatgagcgattgttagatttatacaggtgctgactgcgtt  
agcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaaactatgagaattaattcttgaagacgaaagggcctctg  
atagcctattttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcagggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctattgtt  
attttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtattgaacaa  
gatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggtatgactgggcacaactgacaatcggtgctctgatgccg  
ccgtgttccggctgtcagcgcagggggcgccgggtcttttgcagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagc  
gcggtctatctggtggtggccacgacggcggtccttgcgcagctgtgctcagcttgcactgaagcgggaagggactggctgctattggg  
cgaagtgcggggcaggtatctctgtcatctaccttgcctctgccgagaaagtatccatcatggtgatgcaatgcggcggtgcatacgc  
ttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgatcgagcgggcacgtactcggatggaagccgggtcttgcgatcagga  
tgatctggacgaagagcatcaggggtcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgatgccgacggcgaggatctcgtc  
gtgacacatggcgatgctgcttgcgaatatcatggtggaatatggccgttttctggatcatgactgtggccggctgggtgtggcgga  
ccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcgggcaatgggctgaccgcttctcgtgctttacgggtatcgc  
cgctcccattcgcagcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggctcgaatgaccgaccaagcgac  
gcctaactgtcagaccaagttaactatatacttttagattgatttaaaacttcaatttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatct  
catgacaaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcctttttctgcg  
cgtaatctgctgcttgcgaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaact  
ggcttcagcagagcgcagataccaataactgtcctctagtgtagccgtagttagccaccactcaagaactctgtagaccgcctacatac  
ctcgtctgtctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataag  
gcgacgcgggtcgggtgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtg  
agctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcgaggtatccggtgaagcggcagggctcggaacaggagagcgcacg  
agggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttgcacacctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagg  
ggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttaccgggtcctggccttttctggtccttttgcacatgttcttctgcgttat  
cccgtgattctgtggataaccgtattaccgctttagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagttag  
cgaggaaagcgaagagcgcctgatgcgggtatttctccttacgactgtgctgggtatttcacaccgcaatggtgcactctcagtacaatctgt  
ctgatccgcatagttaagccagtataactccgctatcgctacgtgactgggtcatggtcgcgccccgacaccgcccaacaccgctgac  
gcgccctgacgggcttctgtctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcatgtgtcagagggtttaccgtc  
atcaccgaaacgcgcgagggcagctgctgtaagctcatcagcgtggctgtgaagcgattcacagatgtctgctgttcatccgctccagc  
tcgttgagtttccagaagcgttaatgtctggttctgataaagcgggcatgtaaggcggttttttctgttggctactgatgctccgtgt  
aagggggatttctgttcatggggtaatgataccgatgaacgagagaggtatgctacgatacgggttactgatgataacatgccgggta  
ctggaacgttgtgagggtaaacactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgttctgtaat  
acagatgtaggtgttccacagggttagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgtgacttccgcgtttcca  
gactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttgcaggtcgcagacgtttgcagcagcagtcgttccagttcgtcgcgtgta  
tcgggtgattcattctgtaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgacccgtggcc  
aggaccaacgctgccgagatgcgccgctgctgggtgctggagatggcgagcgcgatggatgttctgccaagggttgggttgcgat  
tcacagttctccgaagaattgattggctccaattcttggagtgtgtaatccgttagcagaggtgccggcggttccattcaggtcagagtggc  
ccggctcatgcaccgcgacgcaacgcggggagggcagacaaggatagggcggcctacaatccatgccaacccgttccatgtgtc  
gccgaggcgccataaatcccgtagcatcagcgggtccaatgatcgaagttaggtggttaagagccgcgagcagatcctgaagctgtccc  
tgatggtcgtcatctacctgctggacagcatggcctgaacgcgggcatcccgatgccgccggaagcgagaagaataataatggggaa  
ggccatccagcctcgcgtcgcgaacgccagcaagacgtagcccagcgcgtcggcccgatccggcgataatggcctgcttctcgcg  
aaacgtttggtggcgggaccagtgcgaaggcttagcgagggcggtgaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgc  
gctccagcgaagcggtctcgcgaaaatgaccagagcgtcggcgacgtgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataag

图65A

tgcggcgacgatagtcatgccccgcgccaccgggaaggagctgactgggttgaaggctctcaaggggcatcggctgagatccccggctgcct  
aatgagtgagctaaacttacatatttgcgttgcgctcactgcccgtttccagctcgggaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcca  
acgcgcggggagaggcgggttgcgtattggcgccagggtggtttttttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccggcc  
tggccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggatataac  
atgagctgtcttcggtatcgtcgtatcccactaccgagatataccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaattggcgcgcaattgcgccag  
cgccatctgatcgttggcaaccagcatcgagtggaacgatgccctcaltcagcatttgcgtggtttgtgaaaaccggacatggcactcca  
gtcgccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatattatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacagaactta  
atgggcccgctaacagcgcgatttgcgtgtgacctaatgcgaccagatgtccacgcccagtcgcgtaccgcttcatgggagaaaaataa  
actgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccgggaacattagtgcaggcagcttccacagcaatggcactcctggtatcca  
gcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagatttgcaccgcccgtttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatc  
gacaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttgcgacggcgcggtgcaggggccagactggaggt  
ggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgtgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccacttt  
tccccggttttcgcagaaacgtggctggttcaccacgcgggaaacggctctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtata  
acgttactggtttacattcaccacccctgaattgactctctccggggcgctatcatgccataccgcgaaagggttttgcgccattcgtatggtgtcc  
ggggtatcgcagctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccggttgagcaccgcccgcgcaagggaat  
ggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccg  
aagtggcgagcccgatctccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatccggccacgat  
gcgtccggcgtagaggatcgagatctgatcccgcaaaataatacgaactactatagggaattgtgagcggataacaattccccttaga  
aataattttttaactttaagaaggagatatacatatgaaitaacccctactaaaggcgggcgccgcgaagtccctattcttagaaagtataggaa  
cttacttaccgggtaggggagggcgcttttcccaaggcagctctggagcatgcgcttttagcagccccgctgggcacttggcgctacacaagt  
ggcctctggcctcgcacattccacatccaccggtaggcgccaaccggctccgcttttgggtggcccccttcgcgccaccttccactctcc  
cctagtcagggaagtcccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaatggaagtagcacgtctactagtctcgtgcagatg  
gacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagcttctgctccttcgcttctgggctcagagggtg  
ggaaagggtgggtccggggggcggggtcagggggcggggtcagggggcggggcggggcgcccgaaggctcctccggaggcccggcattct  
gcacgcttcaaaagcgcacgtctgccgcgtgttctccttctctcatctccgggcttctcagctgcagcagcacgtgtgacaattaatcat  
cggcatagtatatacggcatagtataatacacaaggtgaggaaactaaaccatggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacc  
caatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaag  
accgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttgcccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaa  
agacgggtgagctggtgatatgggatagtggttcaccctgttacaccgtttccatgagcaaacgaaactgtttcatcgctctggagtgaatacc  
acgacgatttccggcagttctacacatatattcgcaagatgtggcggtgttacgggtgaaaacctggcctatttccctaaaggggttattgagaat  
atgttttctgtctcagccaatccctgggtgagtttaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgccccggttttaccatgg  
gcaaatattatatacgaaggcgacaaggtgctgatcccgctggcgatcagggttcatcatgccgtttgtgatggttccatgtcggcagaatgc  
ttaatgaattacaacagctactgcgatgagtggtggcagggcgggggcgtaagcgggactctgggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtct  
gagagctccctggcgaattcgttaccataaaaagagctttattttcatgatctgtgtgttgggtttgtgtgcggcgcggaagtcttatttctag  
aaagtataggaaacttctcagccctatagttagtcgtatttagatcgggccgcgccccttgacgatccacatcctgagcaataaattcaacc  
actaattgtgagcgggataacaaaggaggtaaaaaaacatggtatcctgttctgcggcggggtaagatttacctgttcgggtgaacacgccgtagt  
ttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcgggtggaactgcgtaccggtgttcgcgcgggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcgg  
ccgcaccgggtctggatttcgaaaagcaccccttatgtgtcgtcggttaattgagaaaatcgcaaatctattcctattaaacggtgttttcttgaccgt  
cgattccgacatcccggtgggtcgcggtcgggttagcagcgcgacccgttactatcgcgtctatttgggtgcgtgaacgagctgttcggcttg  
gcctcagcctgcaagaaatcgtaaaactgggccacgaaatcgaataaagtacagggtgccgcgtcccccaaccgatacgtatgtttctacc  
ttcggcgggcgtggttaccatcccggaacgtcgcaaaactgaaaactccggactcgggcattgtgtattggcgataccggcggttttctcctccac  
caaagagttagtagtaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccgggatttgatcgaaaccgctgatgacctatttggcaaaatctctcgtat  
cggcgaaacaactggttctgtctgtggcgactacgcattcatcgcccgctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctggggcgtaaac  
atcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcgaggtgcgtttggcgctaaaatcacggcgcgctgcggcgcggtgcgtgtatggt

图65B

tgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactatcactaaaccgaccgag  
caaggctgaaagtagattaa (SEQ ID NO:92)

图65C



1-

aaggcgagctcaacgatccggctgctaacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataacc  
ccttggggcctctaaacgggtcttgaggagtttttctgaaaggaggaaactatatccggatatcccgaagaggccggcagtagccgcat  
aaccaagcctatgcctacagcatccagggtgacgggtccgaggatgacgatgagcgattgttagatttcatacagggtcctgactgcgtt  
agcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaacatgagaatttaattctgaagacgaaaggccctcgtg  
atacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcagggtggcactttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtt  
attttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggagagtatgattgaacaa  
gatggattgcacgcagggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaactgacaatcggctgctctgatccg  
ccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttctcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagc  
gcggctatcgtggctggccacgacgggcgttcttgcgcagctgtgctcagctgtgactgaagcgggaagggaactggctgctattggg  
cgaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcacctgtcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcgggtgcatacgc  
ttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgggcacgtactcggatggaagccggtctgtcgtatcagga  
tgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatcccgcaggcaggatctcgtc  
gtgacacatggcgatgcctgcttgcgaatatcatggtggaataggccgttttctggatcactgactgtggccggctgggtgtggcgga  
ccgctatcaggacatagcgttggctaccggtgatattgtgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgtttacggatcgc  
cgctcccgaattcgagcgcctcgccttctatcgccttctgacgagttcttctgagcgggactctggggtcgaatgaccgaccaagcgac  
gcctaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcttttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatc  
catgacaaaaatccctaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcg  
cgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgttgggttccggatcaagagctaccaactcctttccgaaggtaact  
ggcttcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatac  
ctcgcctgctgataatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataag  
gcgcagcggctgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtg  
agctatgagaaagcggcagcgttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtgaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacg  
agggagcttcagggggaaacgcctggtatcttatagtcctgtcgggttccgacctctgacttgagcgtcgatttttctgatgctcgtcagg  
ggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttctggccttttctggccttttctcacatgttcttctcgttctat  
ccccgtattctgttgataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagttag  
cgaggaagcgggaagagcgcctgatgcggatcttctccttacgactctgtcgggtatttcacaccgcaatggtgcactctcagtacaatctgct  
ctgatccgcatagttaagccagatacactccgctatcgtacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgac  
gcgcccgtacgggctgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctc  
atcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggctgtgaagcattcacagatgtctgctgttcatccgcgtccagc  
tcgttgagtttctcagaagcgttaatgtctggtcttgataaagcgggcatgttaaggcggttttctggttggctactgatcctccgtgt  
aagggggatttctgttcatggggtaatgataccgatgaacgagagaggatgctcacgalacgggtactgatgatgaacatgccgggtta  
ctggaacgttgtgagggtaaacaactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgcagcgttcgttaat  
acagatgtaggtgtccacagggttagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaaacataatggtgcaggcgctgacttccgcgtttcca  
gactttacgaacacggaacccaagaccattcatgttgttctcaggtcgcagacgttttcagcagcagtcgttccagcttgcctcgcgt  
tcggtgattcattctgtaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgacccggtggcc  
aggaccaacgctgcccagatgcgcgcgtgcggctgctggagatggcgagcgcgatggatatgttctgccaagggttgggttgcgat  
tcacagtctccgcaagaattgattggctccaattcttgagtggtgaatccgttagcgaggtgcccggcgttccattcaggtcgaggtggc  
ccggtccatgcaccgcgacgcaacgcggggaggcagacaaggatataggcgggcctacaatccatgcaacccgttccatgtgtc  
gccgagggcgcataaatcgccgtgacgatcagcgggtccatgatcgaagttaggtgtgtaagagccgcgagcgtatcctgaagctgtccc  
tgatggtcgtcatctacctgctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatccgcccgaagcgagaagaatcataatggggaa  
ggccatccagcctcgcgtcgcgaacgccagcaagacgtagcccagcgcgtcggccgcatgcccggcgataatggcctgcttctcgcg  
aaacgttgggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcgagggtgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgc  
gctccagcgaaagcggctcctgccgaaaatgaccagagcgtgcggcacctgtctacgagttgcatgataaagaagacagtcataag

图66A

tgcggcgacgatagtcacgccccgcggccaccggaaggagctgactgggtgaaggctctcaagggcacggtcgagatcccgggtgcct  
aatgagtgaagtaacttacattaattgcgttcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcca  
acggcggggagagggcggtttcggtatggcgccagggtggtttttttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccggc  
tggccctgagagagttgagcaacgggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgttgatgggtgtaacggcgggatataac  
atgagctgtcttcggtatcgtcgtatccactaccgagataccgcaccaacgcgcagccggactcggtaatggcgcgattgcgccag  
cgccatctgatcgttgcaaccagcatcgagtggaacgatgccctcattcagcatttgcattggtttgtgaaaaccggacatggcactcca  
gtcgcctcccggttcgctatcggtgaatttgatgcgagtgagatattatgccagccagccagacgcagacgcgcggagacagaactta  
atggggcccgtaacagcgcgatttgcgtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgctgaccgtcttcatgggagaaaaataat  
actgttgatgggtgtcgtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttcacagcaatggcatcctggtcatcca  
gcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttcgcgagaagattgtgcaccgcccgtttacaggcltcgacgccgcttcgttctaccatc  
gacaccaccagctggcaccagttgatcggcgagatthaatcgccgcgacaatttgcgacggcgctgcagggccagactggaggt  
ggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgtgtgccacgcggttggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccacttt  
ttcccgcgttttcgagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacgggtctgataagagacaccggcactactctgcgacatcgata  
acgttactggttcacattcaccacctgaattgactcttccggcgctatcatgccataccgcgaaagggttttgcgcattcgtggtgtcc  
gggatctcgacgtctcccttatgcgactcctgacttaggaagcagcccagtaggttagggcgttgagcaccgcgcgcaaggaat  
ggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgcaccataccacgccgaacaagcgtcatgagccg  
aagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatagggcgccagcaaccgcacgtgtggcgccggtgatggcgccacgat  
gcgtccggcgtagaggatcgagatctgatcccgcgaaattaacgactactatagggaattgtgagcgggataacaattcccctctaga  
aataattttgttaactttaagaaggagatatacatatgaattaacccctactaaaggcgccgcggaagtcttattcttagaaagtataggaa  
cttcattctaccgggtaggggaggcgcttttccaaggcagctctggagcatgcgttttagcagccccgtgggcaattggcgctacacaagt  
ggcctctggcctcgacacattccacatccaccggtaggcgccaaccggctcgttcttgggtggcccccttcgcgccaccttccactcctcc  
cctagtgcaggaagtcccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaatggaagtagcacgtctcactagtctcgtgcagatg  
gacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgcttttgggctcagaggctg  
ggaaggggtgggtccggggggcggtcagggggcggtcagggggcggggcggcgcccgaaggctcctcggaggccccggcattct  
gcacgctcaaaagcgacgtctgcgcgtgttctccttctcctatctccgggctttcgacctgcagcagcagctgttgacaattaatcat  
cggcatagtatatcgcatagatataatcagaaaggtgaggaactaaaccatggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatcc  
caatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaag  
accgtaaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacatttgcgccctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaa  
agacgggtgagctggtgataggggatagttaccctgttacaccgtttccatgagcaaacgaaacgttttcatcgctctggagtgaatacc  
acgacgatttccggcagtttctacatatattcgcaagatgtggcggtgttacgggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaat  
atgttttctgtcagccaatccctgggtgagttaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttaccatgg  
gcaaatattatagcgaaggcgacaaggtgctgatccgctggcgattcaggttcacatcatgcccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgc  
ttaatgaattacaacagctactgcgatgagtgagggcgggcggtgaagcgggactctggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtct  
gagagctccctggcgaattcggtaccaataaaagagcttattttcatgatctgtgtgtgtttgtgtgctggcgcggaagttcctattcttag  
aaagtataggaaattcctcgagccctatagttagtcglatlagatcgggcgccgttgactatgccacatcctgagcaataattcaacc  
actaattgtgagcgggataacaaggaggtaaaaaacatggtatcctgttctgcggcggttaagatttacctgttcgggtgaacacgccgtagt  
ttatggcgaaactgcaattgcgtgtcgggtggaactgcgtaccgtgttcgcgggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcgg  
ccgacccggtctggaattcgaaaagcacccttatgtgtcgtcggttaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacgggtgtttcttaccgt  
cgattccgacatcccgggtgggtcctgggttagcagcgcagccgttactatcgcgtctattggtgcgtgaacgagctgttcggctttg  
gcctcagcctgcaagaaatcgctaaactgggccacgaaatcgaattaaagtacagggtgccgcgtcccaaccgatacgtatgttclacc  
ttcggcgggcgtggttaccatccgggaacgtcgaaactgaaaactccggactgcggcattgtgattggcgataccggcgttttctcctccac  
caaagagtttagtactaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccggattgtatgaaccgctgatgacctattggcaaatctctcgat  
cggcgaaacactggttctgtcgtcggcactacgcatccatcgccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctggcggttaac  
atctagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacggcgctggcgcggtggctgtatggt

图66B

tgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactatcactaaaccgaccgag  
caaggtctgaaagtagattaa (SEQ ID NO:93)

图66C

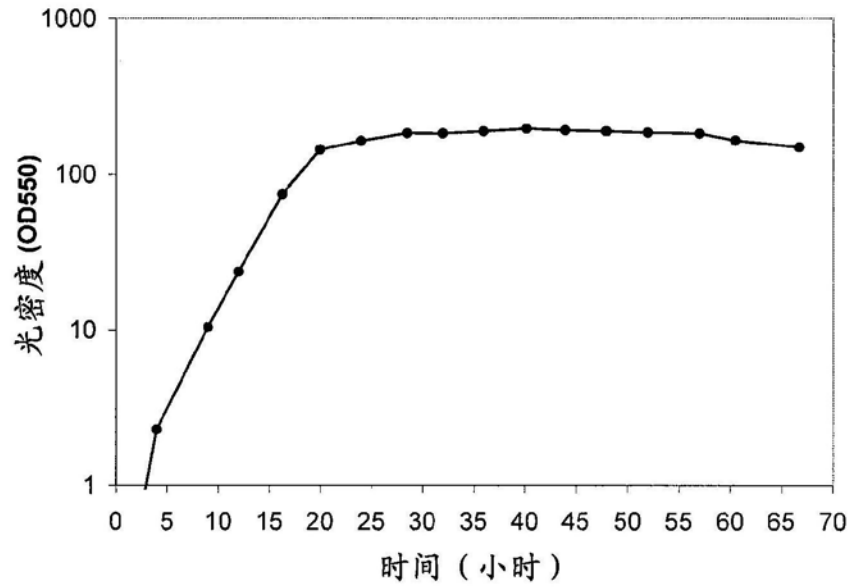


图67A

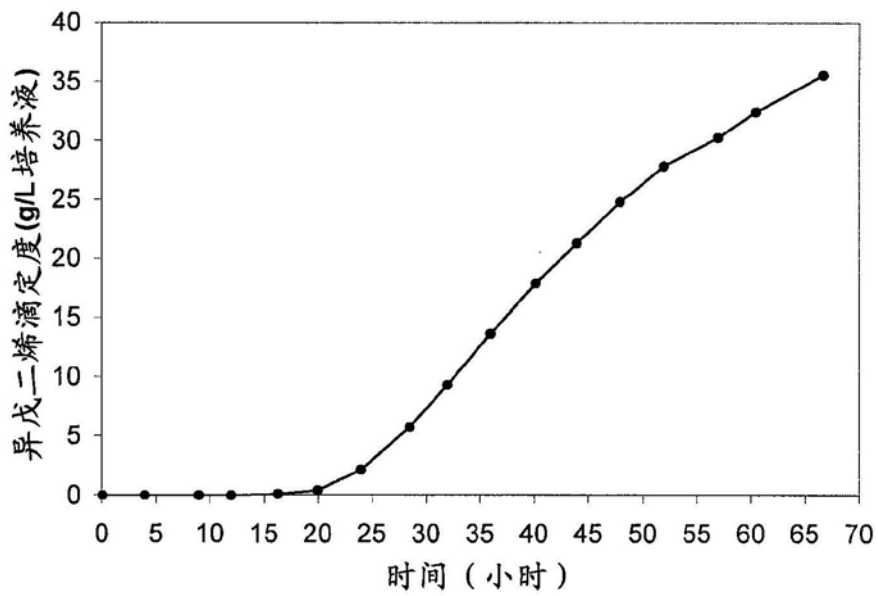


图67B

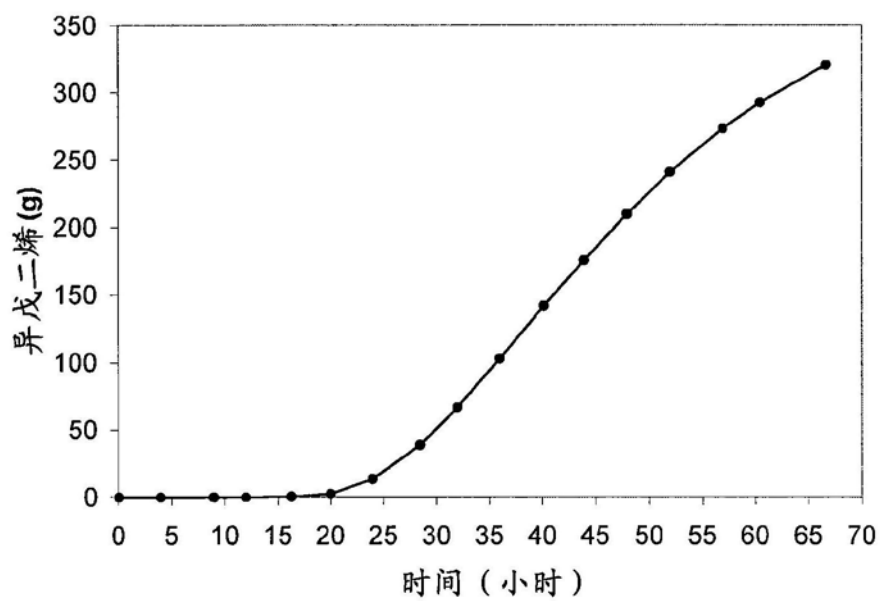


图67C

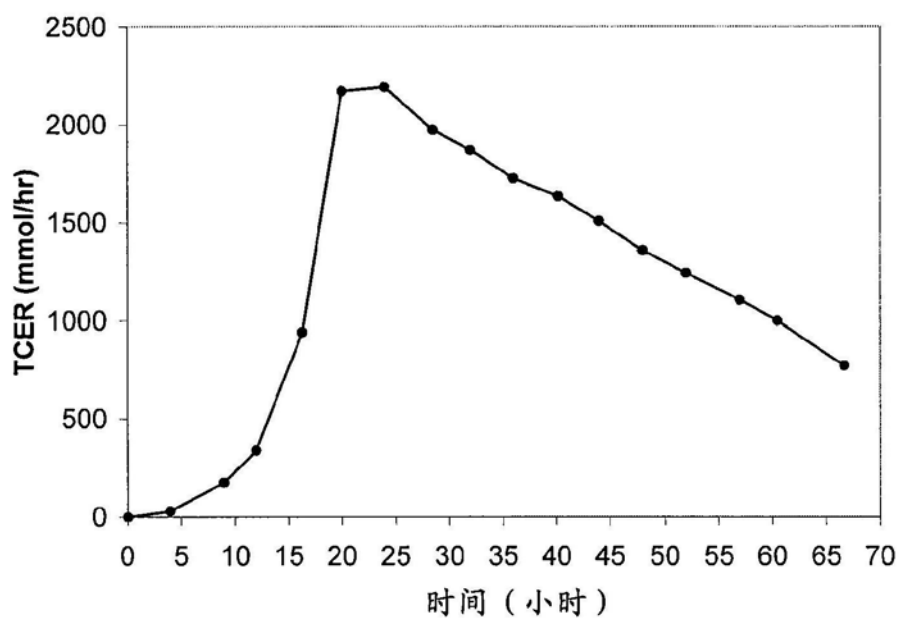


图67D

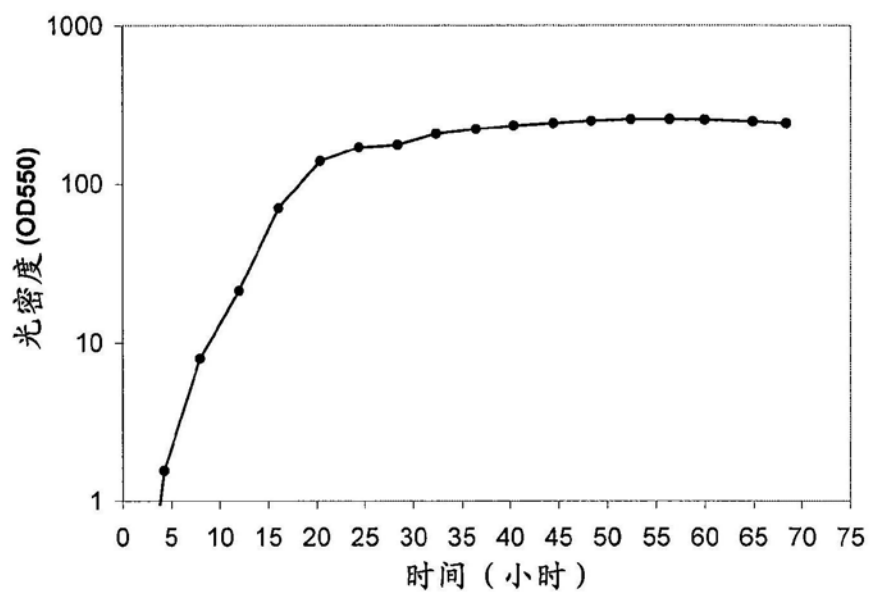


图68A

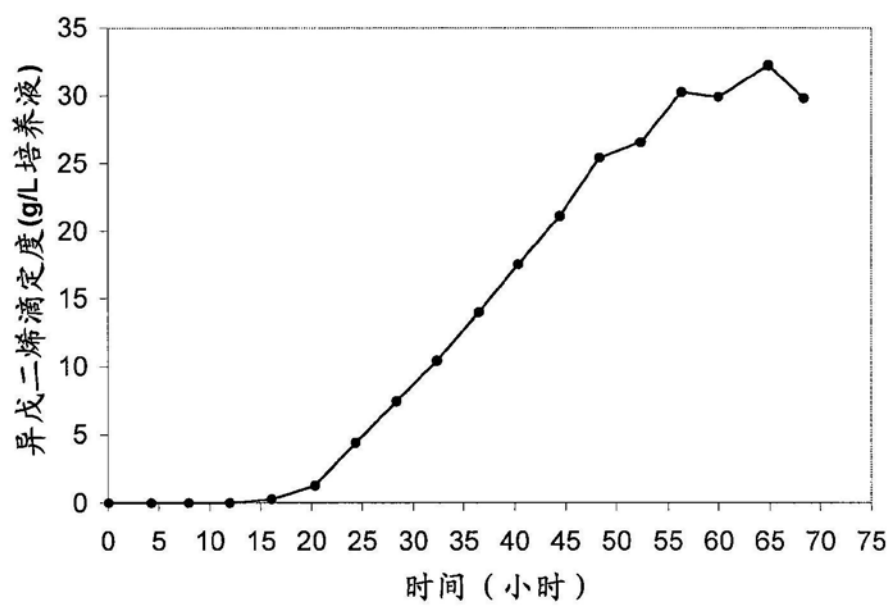


图68B

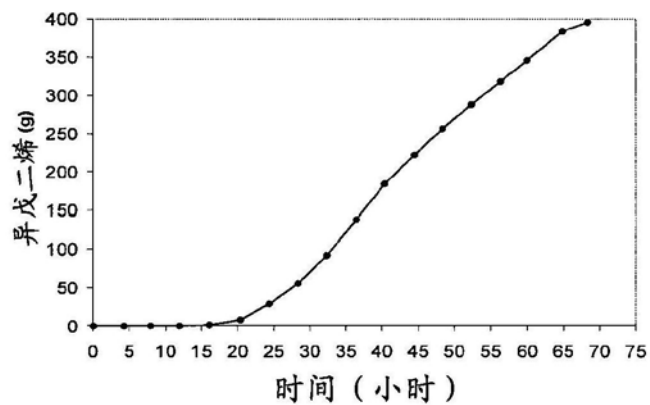


图68C

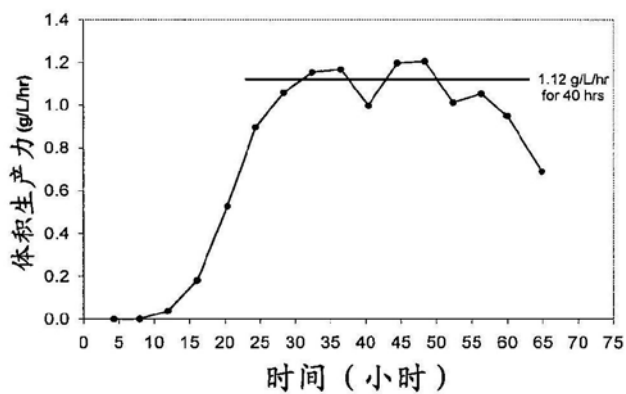


图68D

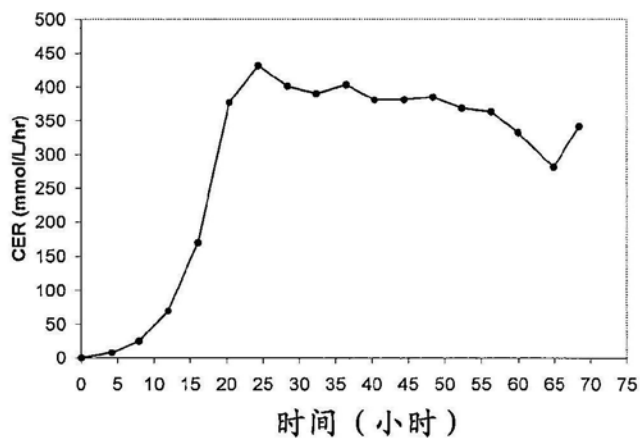


图68E

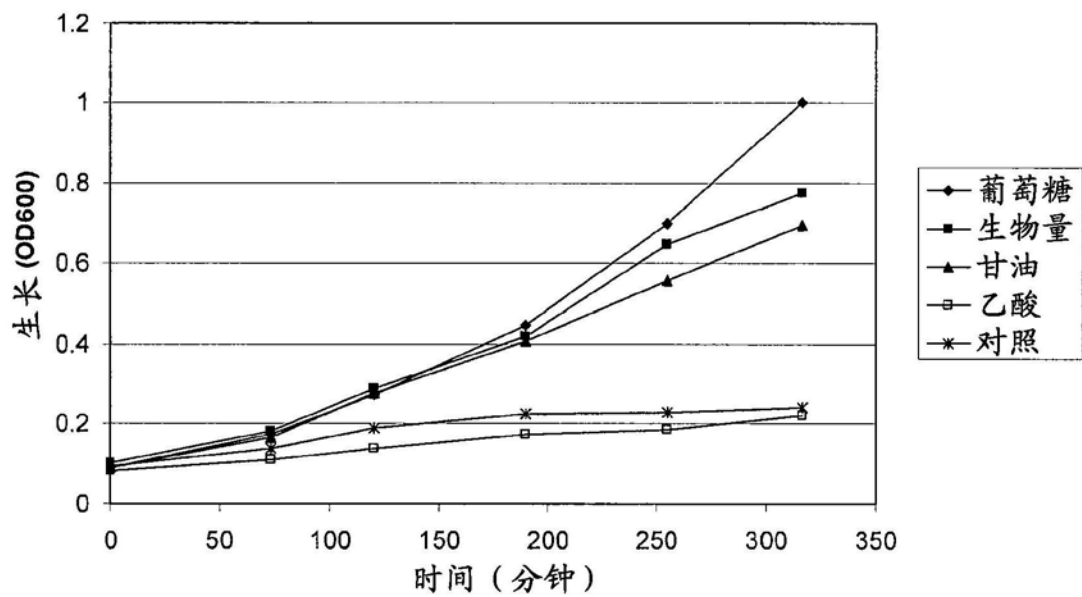


图69A

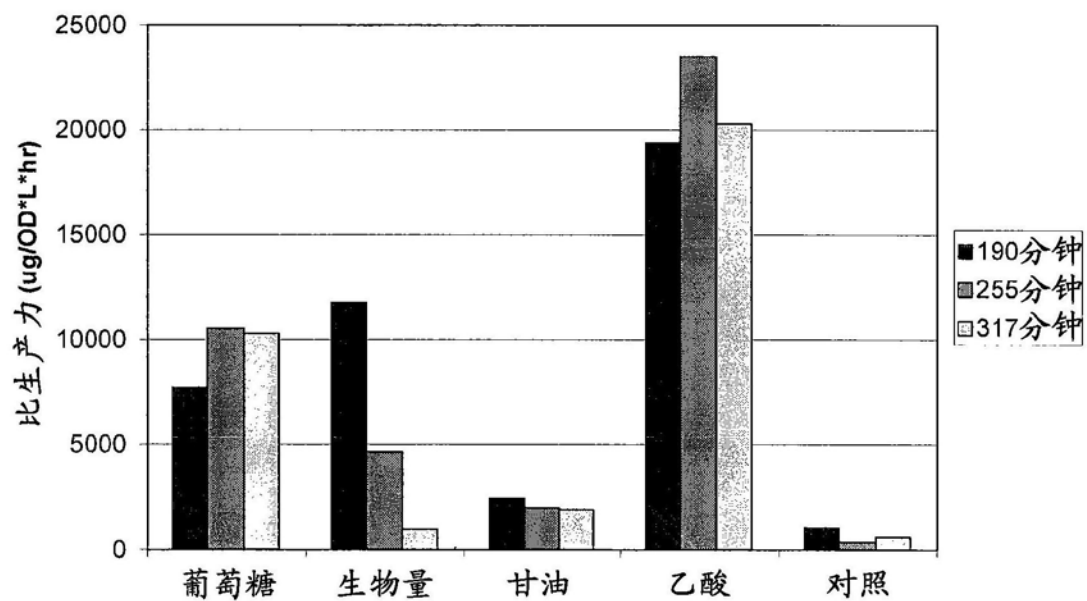


图69B

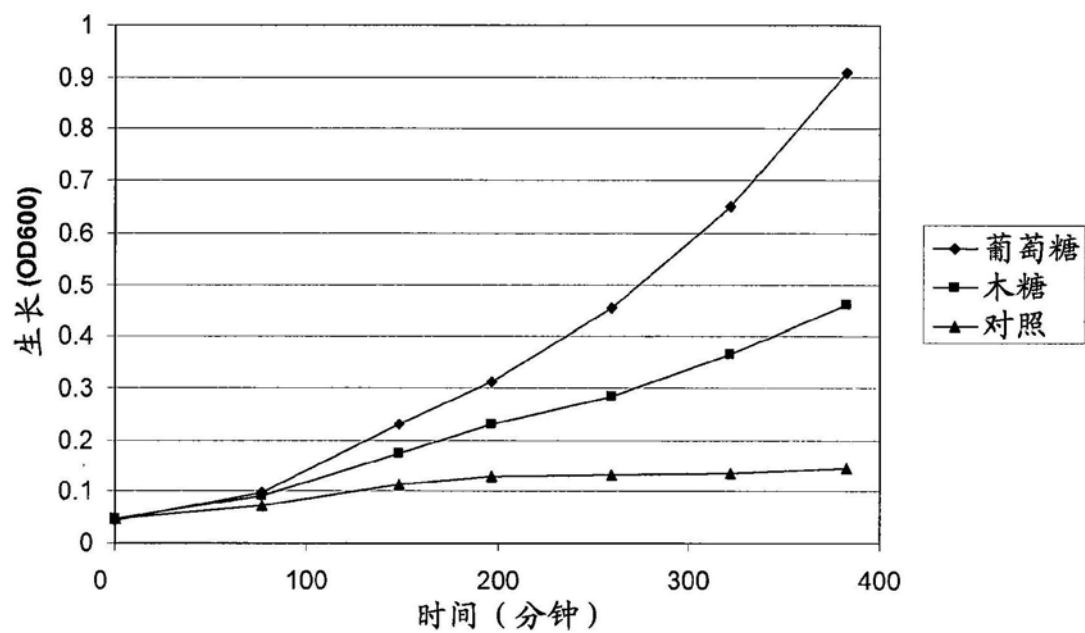


图69C

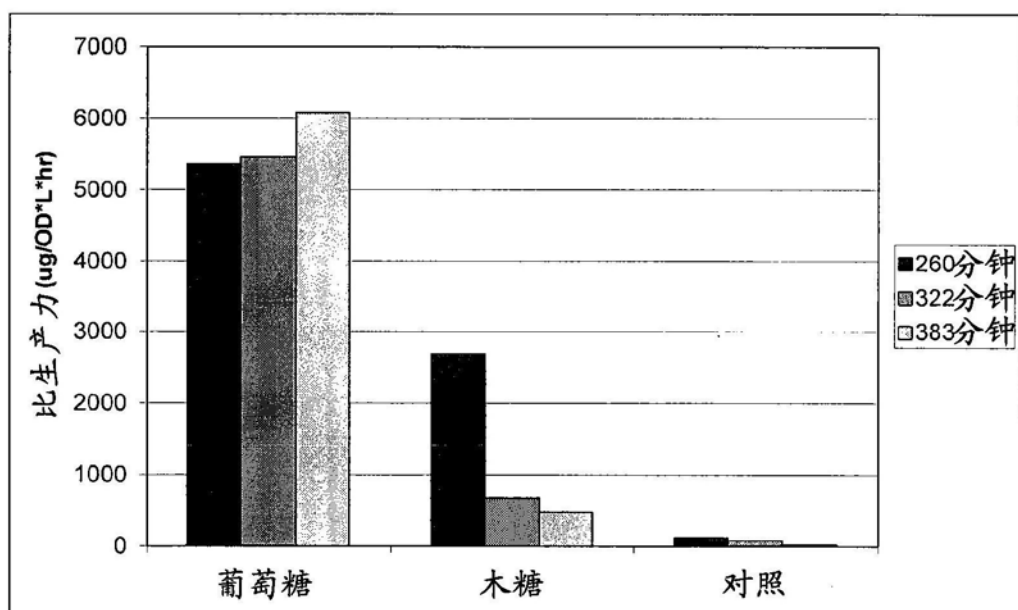


图69D



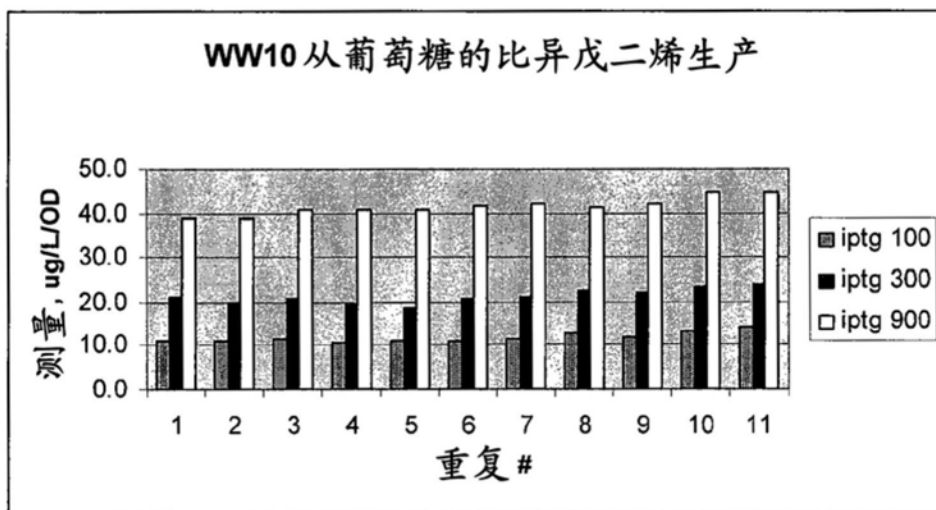


图70A

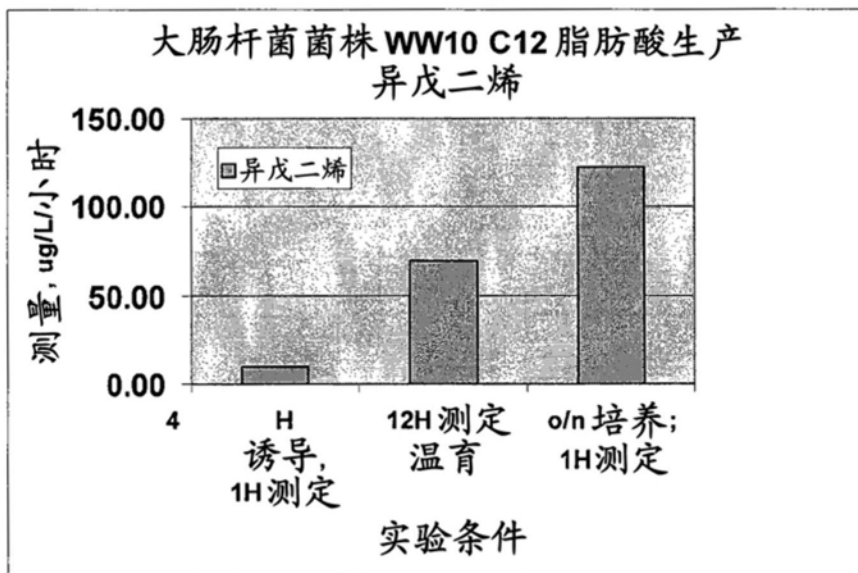


图70B

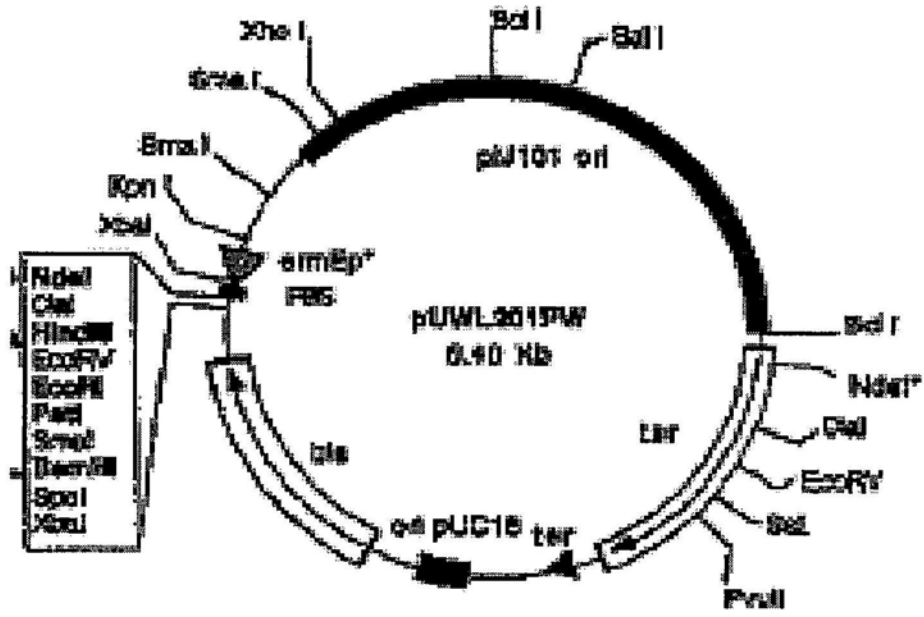


图71

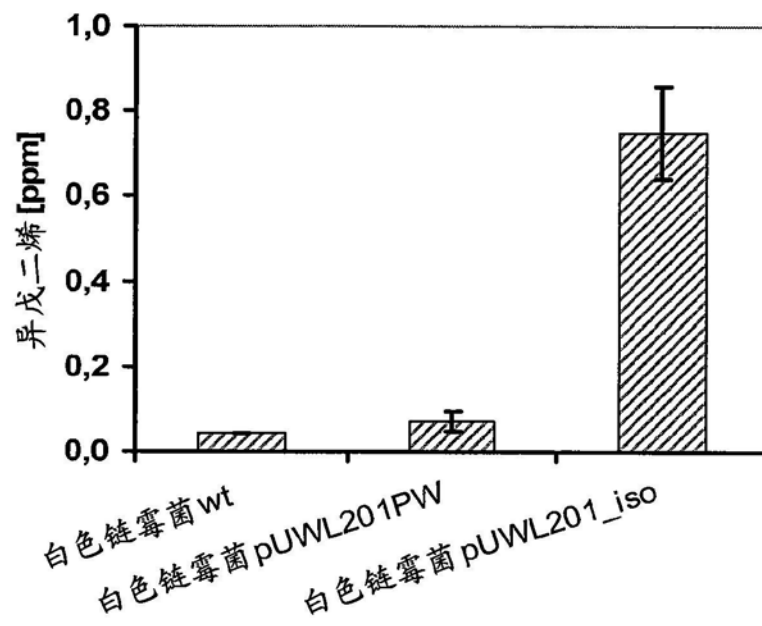


图72

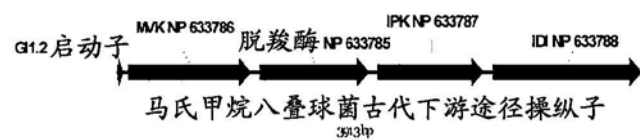


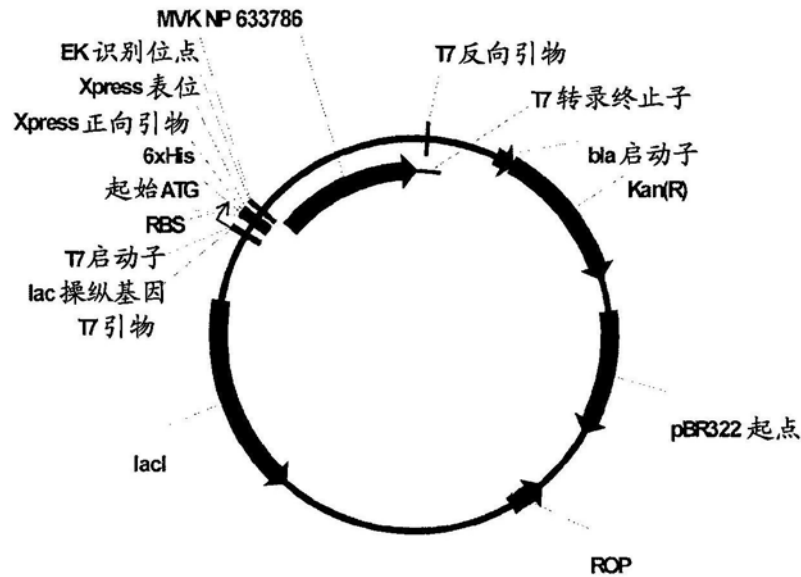
图73A

gcgccgcgcccttgacgatgccacatcctgagcaataattcaaccactaattgtgagcggataacacaaggaggaaacagc  
catggtatcctgttctgcgccgggtaagatttacctgttcgggtgaacacgccgtagttatggcgaactgcaattgcgtgtgcggt  
ggaactgcgtaccctgttctgcgcgggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcgccgcaccggctctggatttcgaa  
aagcacccttatgtgtctgcggtaattgagaaaaatgcgcaaatctattcctattaacgggtgtttcttgaccgtcgattccgacatccc  
ggtgggtcctcggtctgggttagcagcgcagccgttactatcgcgtctattggtgcgtgaacgagctgttcggctttggcctcagc  
ctgcaagaaatcgtaaaactggccacgaaatcgaaattaaagtacaggggtgccgcgtcccaaccgatacgtatgtttctacct  
tcggcggcgtggttaccatcccgaacgtcgaaactgaaactccggactgcggcattgtgattggcgataccggcggtttctc  
ctccaccaaaagagtttagtagtaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccggatttgatcgaaccgctgatgaccttattggc  
aaaatctctcgtatcggcgaacaactggttctgtctggcgactacgcatccatcgccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcct  
ggacgccctgggcgttaacatcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaatcacg  
ggcgtggtggcggtggtgtatggtgcgtgaccgtccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcagcgct  
ggcggtaaatgactatcactaaaccgaccgagcaaggctgaaagttagattaagccttgacttaatagctgcttatttcgccctta  
tggtacctagtaggaggaaaaaacatggaaatgcgtcaaccggctgtcgcaggtcaattctaccactcgcttgcgagaacct  
ggaaaacgaactgaaacgctgttcgaaggcctggagatccgcgaacaagaagtgtggcgagctctgtccgcacgccggt  
tatatgtactctgcaaggttgcggcgacgtctatgccactctgcggaaagctgatacctacgtaattcttcggccgaaccacac  
cggctacggttagcctgtctgtgagcgtgaaacttgaagaccccggtggcaaatcgaatgttgacctggaactggcgga  
cggcttctgggttccatcgtatagtggtgaactcgggtcacaatacgaacactctatcgaagttagctgccgtttctgcaata  
ccgtttgaacgcgattcaaaattctgccaatctgcatgggtatgcaagacgaagaaccgcggctgaagtaggtaacctgctg  
gcggtatctgacgcgagtcggtaaacgtgtgtgacatcgcaagctctgattcaccactatgagacggctgaacgtcca  
aagaatcgattccgaagtattgattctatcctgaactttgacatctctggcatgtacgategcctgtatcgccgtaacgcctctgtt  
gcggttacggccgatcaccgctatgctgacggcaagcaaaaagctggggcggtctcgtgcgactttgctgaatacgcgaac  
agcgggtgacgttccgggtataaagacgctgtgggtgggtlacgcccatcatcgttgagtaagctgattaaaggtgaacagat  
aggatttcgtcatggtacctacaaggaggaaaaaacatgaatgcttctaataagaccgggtgattctgaaactgggtggtctgcta  
ttaccgacaaaggtgcctacgaaggcgtagttaaggaagctgatttgcgtcgcacaggaagtagcgggttccgtggca  
agatgatcgtggttatggtgctggttagcttggccatacgtacgcgaagaatacggcctggaccgtaccttcgaccagagg  
gcgcaattgtactcatgaatctgttaaaaagctgcctccaaagtgttaggtgctctgaatagcttcggcgtgcgtgctatcgcg  
tgatcctatggactgcgcagtatgccgtaacggtcgtatcgaaacgatgtatctggactccatcaagttatgtcgaaaaaggt  
ctgggtccgggttctgcacggcgacgtcgcaatggatattgaactgggcactgtatcctgtccgggtatcaaatgttcttacctg  
gccaaagaactgggtatctccgcctcgccgtggcgagcgagaggatgggtgtgctggatattggagggcaaacctgtaccgg  
aaatcacccagaaacttccgaagagtccgccactgcacgtgtgttctgttctactgatgaaccgggtgcatgctgggcaaa  
gtgctggaacttctggaattgagcaaaaattctccattactagctacattttcaacgctggtaaagcagacaacatctaccgcttct  
gaatggtgagtccatcggcactcgcacagcccgacaagcgtgttaagctagtattaaacctaaatgcttaaacagttatga  
gctctacaaggaggaaaaaacatgattaacactaccagccgccgcaaaattgaacacctgaaactctgcgcagaatccccgg  
ttgaagcgcgtcaggtatctgccggcttgaagacgttactctgatccaccgcgtttaccggagctgaacatggatgaactgga  
cctcagcgttgatttctgggtaaaacgcacaaagcgcgttctgattgcgtctatcacgggtggtcaccagataccatccgg  
ttaacgtcgcgtggcagctgctgctgaggagctgggtgttgcatcggttggtctcagcgcgcggccattgatgatccga  
gccaggaagacagcttccgtgtagtgcgtgatgaagccccagatgcgtttgttatggcaacgtcgccgcagcacagatccgtc  
agtatggtgttgaaggtgttgaaaaactgatcgaatgattgacgcagatgccttggcaatccacctgaactttctgcaagaagcg  
gtccaaccgggaaggtgaccgcgacgcgaccgggttcctggacatgattaccgaaattgtctcagattaaaactccggtaatcg  
tgaaagaaccgggtgcaggcattagccgtgaagatgcgattctgtccagaaagctggcgtgagcgaatcagcttggcggc  
gcgggcggcacctcctgggtggtgcgtcagggtctaccgtgctaaagaaagccgtgactctgttagcgagcgtttaggtgagct  
gttttgggatttcggcattccgacggttagcttctgattgaatcccgcttcttgcgtgatcgaaccggcggtatccgtaac  
ggtctggacattgctaaaagcattgctctggcgcaagcgtgccagcgccgctctgccgttcgttggtccgtccctggagggc  
aaagaatccgtgtgacgtgtgctgagctgcacgtggaagaatttaagcagcaatgttttgcgggtgcggcaacatcaaga

图73B

cctgcacaactctccagtagtggtgtaactgggtggacccgcgaatacctggagcagcgcggttttaacgttaaggacctctccctg  
 ccgggcaacgctctgtaagcttcaacgcgtctacaaataaaaaaggcacgtcagatgacgtgcctttttctgtctaga  
 (SEQ ID NO:113)

图73C



MMK376 - MMK from *M. mazei* archeal Lowerin pET200D  
 6647 bp

图74A

aaggcgagctcaacgatccggctgctaacaagccccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactag  
cataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggagtttttctgaaaggagggaactatatccggatatcccgcaagaggccc  
ggcagtagccggcataaccaagcctatgcctacagcatccagggtgacggcgaggtatgacgatgagcgcatgttagatttc  
atacacgggtgcctgactgcgttagcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgatgataagctgtcaaacatgagaa  
ttaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggca  
cttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttttttctaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgat  
aatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagag  
gtatttcggctatgactgggcacaactgacaatcggctgctctgatgccggcgtgttccggctgtcagcgcagggggcgccgggt  
tcttttgcagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcaggacgagggcagcgcggtatcggtggctggccacgacgg  
gcgttccctgcgcagctgtgctcagctgtgactgaagcgggaaggagctggctgtattgggcgaagtgcggggcgaggtat  
ctcctgtcatctcacctgtcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgttgatccggctac  
ctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgggcacgtactcggatggaagccggcttctgcatcaggatgatct  
ggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccagggtcaaggcgcgcatgcccacggcgaggatctcgt  
cgtgacacatggcgatgcctgcttgcgaatatcatggtggaaaatggcgcttttctggattcatcactgttggccggctgggtg  
tggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccctgatattgtgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgt  
gctttacggtatccgctcctccgattcgcagcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttc  
gaaatgaccgaccaagcgacgcctaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattttaatttaaaa  
ggatctaggtgaagatccttttataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtaga  
aaagatcaaaggatcttctgagatcccttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtt  
tggttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagacacaaatactgtccttctagtgt  
agccgtagttagggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtctaatctgttaccagtggctgctgcc  
agtggcgataagctgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgagcggtcgggctgaacggggg  
gttctgtcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccac  
gcttcccgaaggagaaaggcgagaggtatccgtaagcgaggggtcgaacaggagagcgacgagggagcttcca  
gggggaaacgcctggtatcttatagtcctgtcgggttccgccacctctgactgagcgtcgatttttctgagctcgtcagggggg  
cggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggttccctggccttttctggccttttctcactgttcttctcgtt  
atccctgattctgttgataaccgttattaccgctttagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcga  
gtcagtgagcgaggaagcggaagagcgctgatgcggtattttctccttaccgcatctgtgcggtatttccacccgcaatggtgca  
ctctcagtacaatctgctctgatccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgtacgtgactgggtcatggctgcgcccc  
gacacccgccaacacccgctgacgcgcctgacgggcttctgtctcccgcatccgcttaccagacaagctgtgaccgtctcc  
gggagctgcatgtgtcagagggtttaccgctcaccgaaacgcgcgagggcagctgcggtaagctcatcagcgtgtcgtg  
aagcgattcacagatgtctgctgttcacccgctccagctcgttgaatttctccagaagcgtaatgtctggcttctgataaagcgg  
gccatgttaaggcggttttttctgttggctactgatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatga  
aacgagagaggatgtcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttactggaacgttgtgagggtaaacaactggcg  
gtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgcttcgttaatacagatgtaggtgttccacagggt  
agccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgctgacttccgcgttccagactttacgaaacagg  
aaaccgaagaccattcatgttgtgtcaggtcgcagacgttttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcgggtattca  
ttctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgaccccggtggccagg  
accaacgctgcccagatgcgcccgtgctgggtgctggagatggcgacgcgatggatatgttctgccaagggttgggttgc  
gcattcacagttctccgaagaattgattggctccaattcttggagtgtgaatccgttagcgaggtgccggcgcttccattcagg  
tcgaggtggcccggtccatgcaccgcgacgcaacgcggggagggcagacaaggtataggcgggcgccataatccatgcc  
aaccggttccatgtgtcgcggaggcgccataatcgccgtgacgatcagcggtccaatgatcgaagttaggtgtgaagagc  
cgcgagcgatccttgaagctgtccctgatggctgtcatctacctgcctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgcc  
ccgggaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgtcgcgaacgccagcaagacgtagcccagcgct

图74B

cggccgccatgccggcgataatggcctgctctcgccgaaacgttgggtggcgggaccagtgcgaaggcttgagcgagggc  
gtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatgctcgctccagcgaaagcggtcctcgccgaaatgaccag  
agcgtgcccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagacagtcataagtgccggcgacgatagtcacccccgcccc  
ccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaaggcgatcggtcgagatcccggtgcctaagtgtagtaacttacattaat  
gcgttgcgtcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagagg  
cggttgcgtattggcgccagggtggttttctttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgctggccctga  
gagagttgcagcaagcgggtccacgtggttggccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggataatacat  
gagctgtcttcggtatcgctgatatccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcatg  
cccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgagtggaacgatgccctcattcagcatttgcattggtttgtaaaccgg  
acatggcactccagtcgcttcccgttccgctatcggtgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcaga  
cgcgccgagacagaacttaatgggcccgcataacagcgcgatttgcgtggtgacccaatgcgaccagatgctccacgccagtcg  
cgtaccgtctcatgggagaaaataactgttgatgggtgctggtgcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcag  
gcagctccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagtaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgc  
accgccgtttacaggcttcgacgccgttcttaccatcgacaccaccagctggcaccagttgatcggcgcgagatttaa  
tcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgttgcgccgca  
ttgtgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgttccacttttccgcgttttcgcgaaaacgtggctggc  
ctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcactctgcgacatctataacgttactggtttcacattcacca  
ccctgaattgactctctccgggcgtatcatgccataccgcgaaagggtttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgtct  
cccttatgcgactctgcattaggaagcagcccagtagtaggttagggcgttgagcaccgccgccgcaaggaaatggtgcag  
caaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgtcatgagccga  
agtggcgagcccgatcttcccatcgggtgatgcggcgatafaggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgcggc  
cacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgcactactataggggaattgtgagcggataac  
aattcccctctagaataattttgtttaaactttaagaaggagatatacatatcgggggtctcatcatcatcatcatggtatggcta  
gcatgactgggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatcatcccttcaccatggtatcctgttgc  
gccgggtaagatttacctgttcggtgaacacgccgtagtttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcgggtggaactgcgtaccgt  
gttcgcgcggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcgccgcaccgggtctgatttcgaaaagcacccttatgttc  
tgcggttaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacgggtgtttcttgaccgtcgattccgacatcccgggtgggtccggtctg  
gtagcagcgcagccgttactatcgctctattggtgcgtgaacgagctgttcggctttggcctcagcctgcaagaaatcgcta  
aactgggccacgaaatcgaaattaaagtacagggtgccgcgtccccaaccgatacgtatgtttctaccttcggcgccgtggttac  
catcccgggaacgtcgcaaaactgaaaactccggactcgggcattgtgattggcgataccggcggtttctctccaccaaagagtta  
gtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccggatttgatcgaaccgctgatgacctctattggcaaaatctctctatcgg  
cgaacaactggttctgtctggcgactacgcacatccggccgctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctggcggt  
taacatcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacgggcgtgcgcgcggt  
ggctgtatggttgcgtgaccgtccgggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgtgcgcggttaaagtactat  
cactaaaccgaccgagcaaggctgaaagtagattaa  
(SEQ ID NO:114)

图74C

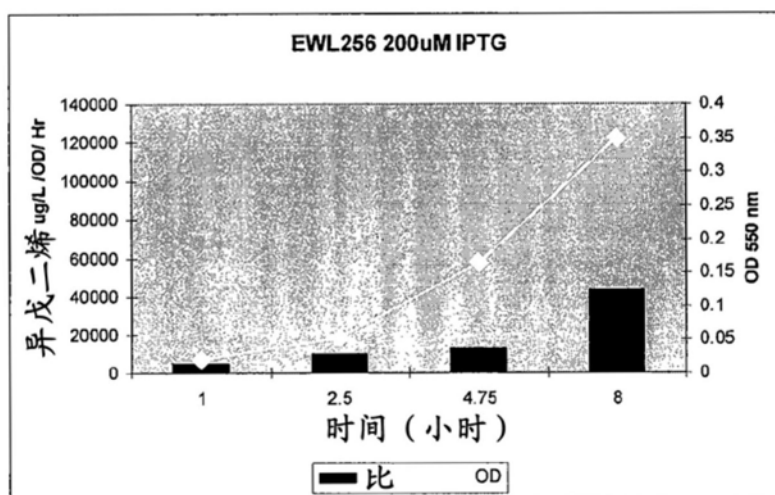


图75A

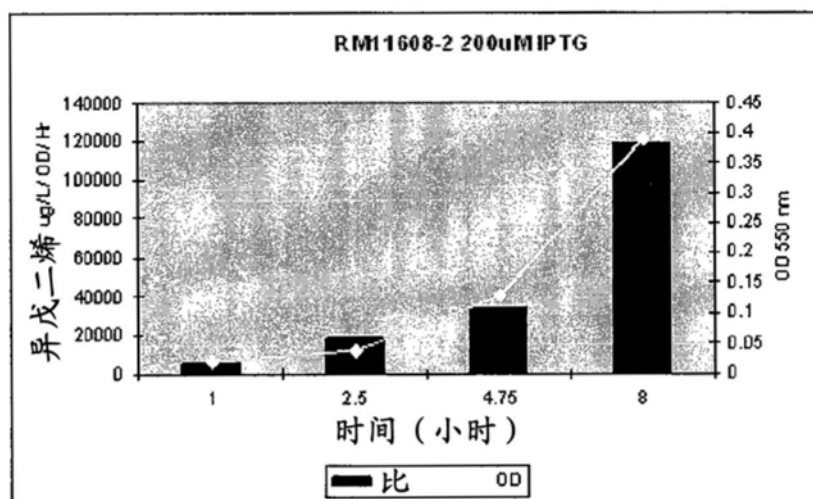


图75B



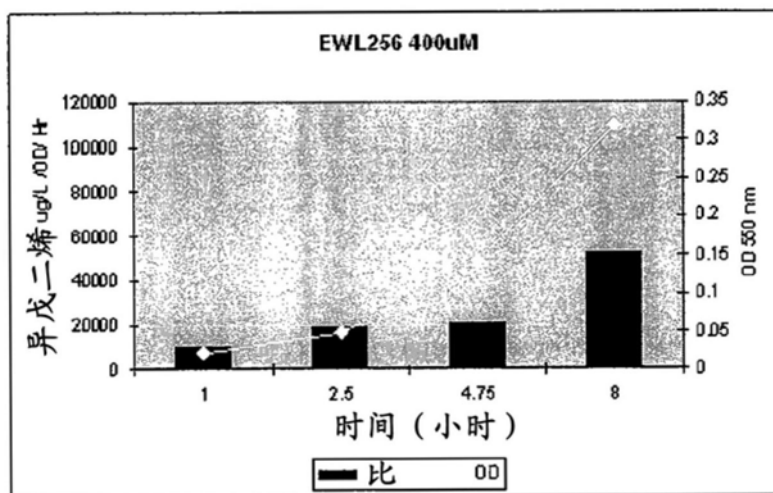


图75C

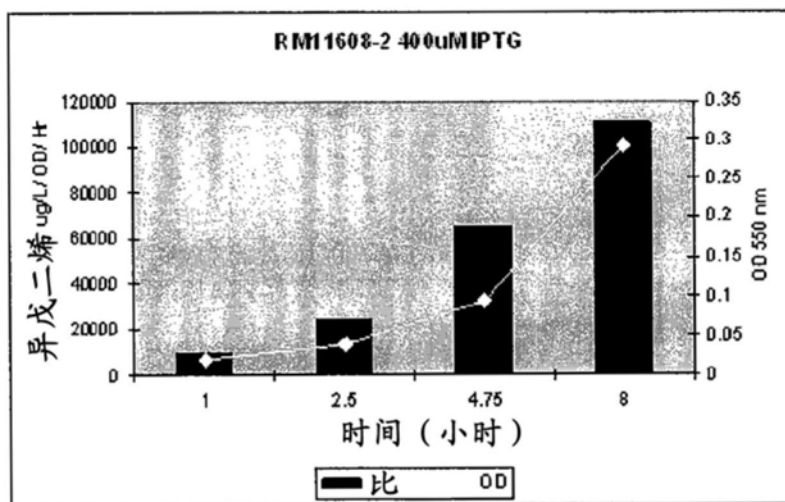
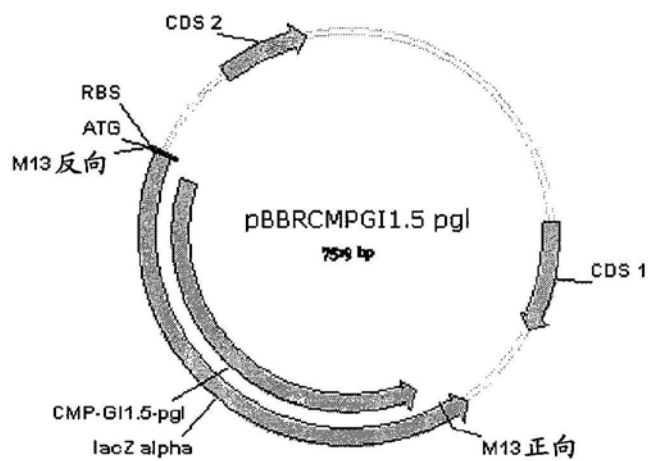


图75D





CDS 2: 庆大霉素抗性基因 ; CDS1: 大肠杆菌复制蛋白

图76

1-

ctcgggcccgtctcttgggcttgatcgccctcttgcgcatctcacgcgtcctcggcgccctgtagggcaggtcataccctgccgaacc  
gcttttgcagccgggtcgccacggcttcggcgctcaacgcgtttgagattccagcttttcggccaatccctgcgggtgataggcgct  
ggctcgaccgcttgccgggtgatgggtgacgtggccactgggtgccgctccaggccctcgtagaacgcctgaatgcgctgtgacgtgc  
cttgctgccctcgatgccccgttgacgccctagatcgccacagcgccgcaaacgtggtctggtcgcggtcatctgcgctttgttgcga  
tgaactcctfgccgacagcctgccgtcctgcgtcagcgccaccacgaacgcgggtcatgtcggggtggttctgcacgggtggatgctggc  
cgtcacgatgcatcgccccgtacttgcggccagccacttgcgccttctgaagaacgcgcctgctgttcttggctggccgacttcca  
ccattccgggctggcgtcatgacgtactcgaaccgcaacacagcgtccttgcgcgcttcttggcagcaactcgcgcagtcggcccatc  
gttcatcggtgctgctggccgcccagtgctcgttcttgcgctcctgctggcgctcagcgttggcgctcgcgcctcgcggttaggcgtgctt  
gagactggccgcccaggtgcccatttgcgcagcttcttgcacgcgtatgcgctatgccgcatgcttccccctcccttttgggtccaacc  
ggctcgacgggggagcgcaaggcggtgctcctggcggggccaactcaatgcttgagtatactactagactttgcttcgaaaagtcgtgac  
cgctacggcggtgctggcgccctacgggcttgcctcggggttcgcctgcgcggtcgtgcgctcccttgcagcccgtggatattgt  
gacgatggcgcgagcgggccaccggctggctcgttgcctcggccgtggacaaccctgctggacaagctgatggacaggctgcgct  
ggccacgagcttgaccacagggttgcacccggctaccagccttcgaccacataccaccggctccaactgcgcggcctgcggcctt  
gccccatcaatttttaatttctctgggaaaagcctcggcctcggcctgcgcgcttgcgttgcgggttggacaccaagtgggaaggcg  
gtcaaggctcgcgcagcgaccgcgcagcggttggccttgacgcgcttgaacgaccaagcctatgcgagtgggggcagtcgaagg  
cgaagcccggcgctgcccccgagcctcacggcggtgagtgccgggttccaagggggagcgccaccttgggcaaggccgaag  
ggcgcgagtcgatcaacaagccccggaggggccacttttgcggagggggagccgcgcgaaggcggtgggggaacccgcaggg  
gtgccccttcttgggaccaaagaactagatagggcgaaatgcgaagacttaaaaaaacttaaaaaaggggggtacgcaacag  
ctcatttgcggcaccggcgcaatagctcattgctgtaggttaaagaaaatctgtaattgactgccacttttacgcaacgcataattgttgcgcg  
tgccgaaaagtgcagctgattgcgcgtggtgccgaaccgtgcgggacccctaccgcatggagataagcatggccacgcagtcagaga  
aatcggtattcaagccaagaacaagccccgtcactgggtgcaaacggaacgcaaagcgatgagcggtggccgggcttattgcgagg  
aaaccacggcggaatgtgctgcacacctcgtggcgagatggggccaccagaacgcggtggtggtcagccagaagacacttccaa  
gtcatcggacgttcttgcggacgggtccaatcgcagtcaggacttgggtggcgagcgtgcatcctcgtgtaagctaacggcccc  
ggcaccgtgctggcctacgttggtcaatgaccgctggcggtggggccagccccgcgaccagtgcgcctgctggtgttgcagtcggcct  
ggtggtgatcagcagcagcaggaatcgtgttggggcatggcgacctgcgcgcacccgacctgtatccggcgagcagcaac  
taccgaccggccccggcgaggagccgcccagccggcattccgggcatggaaccagacctgccagccttgaccgaaacggag  
gaatgggaacggcgggcgagcagcgctgccgatgccgatagccgtgtttctggacgatggcgagccgttgagcccgccgacac  
gggtcacgctgccgcggcggttagcacttgggtgcgcagcaaccgtaagtgcgctgttccagactatcggctgtagccgctcgcgcc  
ctatacctgtctgctccccgcgttgcgtcgcggtgcatggagccgggcccactcgcacctgaatggaagccggcgccacctcgtacg  
gattaccgtttttatcaggctctgggaggcagaataaatgatcatatcgtcaattattacctccacggggagagcctgagcaaaactggcctca  
ggcatttgagaagcacacgggtcacactgctccggtagtcaataaacggtaaacagcaatagacataagcggctatttaacgacctgcc  
ctgaaccgacgaccgggtcgaatttgccttgcatttgccttattatcacttattcaggcgtagcaccaggcggttaaggga  
ccaataactgccttaaaaaaattacgccccgcctgccactatcgcagtcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaattaac  
gcgaatttaacaaaatattaacgcttacaatttccattcgcattcaggtgcgcaactgttgggaaggcgatcggtgcgggcctcttcgct  
attacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagtgggtaacgccaggggtttccagtcacgacgttgtaaacgacg  
gccagtgagcgcgctaatacgaactatagggcgaaattggagctccaccgcggtggtggcgccgctctagaactagtgatccccgg  
gctgcatgctcgagcgccgcccagtgatgatgatctgcagaattcgccttcttgatcttagtgctgtaaccaccaccacattggtc  
cctgcccagccgatagcgcccttttcatgcatgagccctgctcgcaacaattcgtataccgagatgtggtgagattttgccggcg  
caatcagatacttgcgctgtgatcaacattgaagccgcgcggtgggttccgttggctggaagccttcttactcaacacgctgccatctc  
cgaaacgctgaaaacggtaatcaggctggcggttacggtcgaggcgataaatggcgaccatccggggtgatgaatatcagccgcc  
aacgggtgtcggagaagtgttccggcatatatccagcgtctggacacattcgatattaccgtgcgggtcttccagtccagacatccactga  
gctgttaactcattgacgcaatcgcattgttctgttggatggaataccatagacgcggggccgccccctcaacgggtggtcacttccgca  
gggtcctgcgccagagatgacctatcgcgtgaccgtaaacaggcaaatgcgacccctgcttaattgccggaaccacagcgtacgggtgt

图77A

ccggtgagatattggcggaatggcaaccgtccagccctcgaccacatcgacgacgcccactggcaggccatctccagacgcgttacgc  
tcacgttaccgcattgtaagaacctacaaagacaaactgcccctggtgatcggtggaaatatgcgtcgactaccggcagcgagactc  
tgccgcaaaggtcagtgcccatcgctcggggcgatagatagccaggacgcgaactcaggggcaacaccaatagagataacgt  
ttgtccggggtgaccaccatcggtgcacgtccccggcacatcgacaacctgtgtcagcgtcagtgccgttcatgattcagattccagac  
gtgaatttgctggctctcagggtggtgatataaactgtttgcttcatgaatgtctcttgggttacctccgggaaacgcggttgattgttagtg  
gtgaattatttgctcaggatgtggcatagtcaaggcggtgacggctcgtaatacaactcactatagggtcgaggaaagttcctatactttcta  
gagaataggaaactccgcgcgcacacaaaaaccaacacagatcatgaaataaagctcttttattggtaccgaattcgccaggagct  
ctcagacgtcgcttgggtgcttttattcgaacccagagtcccgcttacgccccgcctgcccactcatgcagactgttgaattcattaagc  
attctgcccagatggaagccatcacaaacggcatgatgaacctgaatcgccagcggtacagcaccttgcgccttgctataatatttccc  
atggtgaaaacggggcggaaggtgtccatattggccacgtttaaactaaaactggtgaaactcaccagggttggtgagacgaaaa  
acatattctcaataaaccttttagggaaataggccaggtttaccgtaacacgccacatcttgcgaatataatgttagaaactcgccgaaatc  
gtcgtggtattcactccagagcgatgaaaacgtttagttgtctatggaaaacgggtgtaacaagggtgaacactatcccatatcaccagctc  
accgtcttcatlgtccalacggaatlcggatgagcattcatcaggcgggcaagaatgtgaataaaggccggataaaactgtgcttattttct  
ttacggtctttaaaggccgttaatatccagctgaacggtctggttataggtacattgagcaactgactgaaatgcctcaaaatgttcttacgat  
gccattgggatatataacggtgttatatccagtgtttttctccatggttttagttctcacttgcgtattatactatccgatatatactatgccg  
atgattaattgtcaacacgtgctgctcaggtcgaaaggccggagatgaggaaggagaacagcgccggcagacgtgcgttttgaag  
cgtgcagaatgccgggctccggaggaccttcggggcgccgccccgcccctgagccgccccgagccgccccggaccacccctt  
cccagcctctgagccagaaagcgaaggagcaagctgtattggcgctgccccaaaggcctaccgcttccattgctcagcggtgctg  
tccatctgcacgagactagttagacgtgctacttccattgtcacgtctgcacgacgcgagctgcggggcgggggggaacttctgacta  
ggggaggagtggaagtggtgcggaaggggccaccaagaacggagccggttgccgctaccgggtggtatgtggaatgtgtgcgagggc  
cagaggccacttgtgtagcgccaagtcccagcgggggtgctaaagcgcatgctccagactgccttgggaaaagcgctccccaccg  
gtagaatgaagttcctatactttctagagaataggaaacttcgcgccgccccttagtgagggttaattcaactgactgtaacagctaaatagt  
cgcttttggcgtaaggcggaattccagcacactggcgccggttactagtggatccgagctcggtagcaagctgtgatcggaattcgatat  
caagcttatcgataaccgtcgacctcgaggggggcccggtaccagctttgttccctttagtgagggttaattgcgcgttggcgtaatacatg  
gtcatagctgttctgtgtgaaattgttaccgtcacaaattccacacaacatacagccggaagcataaagtglaaagcctgggggtcctaa  
tgagttagctaaactacattaattgcgttgcgtcactgcccgttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcccaac  
gcgcgggggagagcggttgcgtattggcgcatgataaaaactgttgaattcattaagcattctgccgacatggaagccatcacaaacg  
gcatgatgaacctgaatcgccagcggtcagcaccttgcgttgcgtataatattgcccatggacgcacaccgtggaacgggatgaa  
ggcacgaaccaggttgacataagcctgttcggttcgtaaactgtaagtagcgtatgcgtcacgcaactggtccagaaccttgaccg  
aacgcagcggtggttaacggcgagtggtggttttcatggcttgtatgactgtttttgtacagtctatgcctcgggcatccaagcagcaagc  
gcgttacgccgtgggtcgtatgttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcagcaacgatgttacgcagcaggcgagtcgccctaa  
aacaagttaggtggctcaagtatggcattcgcacatgtaggctcgccctgaccaagtcaaatccatgcggggtgctcttgatcttttc  
ggctgtgagttcgagacgtagccactactcccaacatcagccggactccgattacctgggaactgtctccgtagtaagacattcatgcg  
gcttgcgtccttcgaccaagaagcggttgttggcgctctcgcggttacgttctgccaggtttagcagccggtagtgagatctatatctat  
gatctgcagctcggcgagcaccggagggcagggcattgccaccgcgtcatcaatctcctcaagcatgaggccaacgcgttggtgct  
tatgtgatctacgtgcaagcagattacgggtgacgatcccagtggtctctatacaagttgggcatacgggaagaagtgtgactttgat  
atcgaccaagtaccgccacctaacaattcgttcaagccgagatcggttcccggccggagttgttcggtaaattgtcacaacgccgcc  
agggtggcacttttcggggaaatgtgcgcgcccgcgttctgtggcgctgggcctgttctggcgctggacttcccgtgttccgtcagcag  
cttttcgccacggccttgatgatcgcgcgcccttggtctgcatatcccgattcaacggccccaggcgctccagaacgggttcaggcg  
tcccgaaggt (SEQ ID NO:122).

图77B

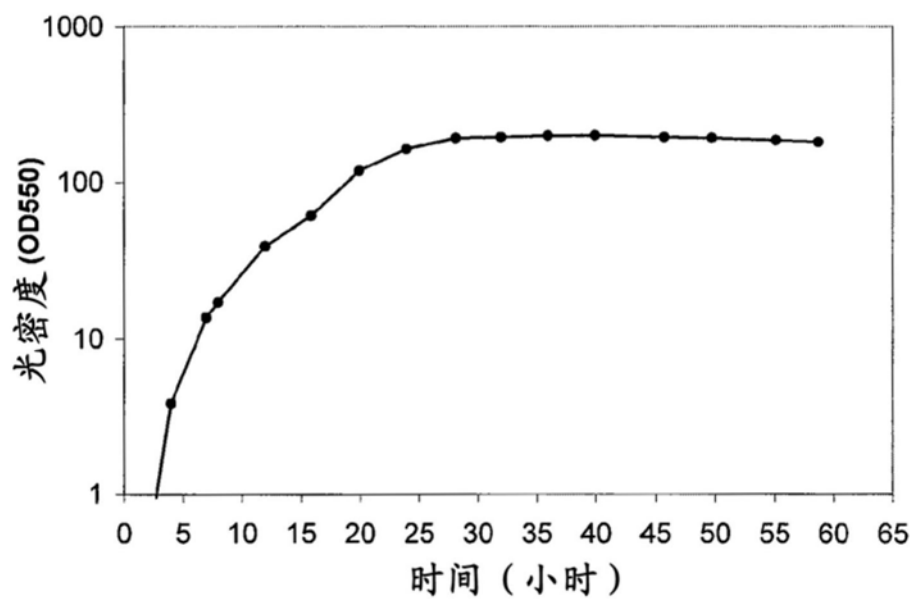


图78A

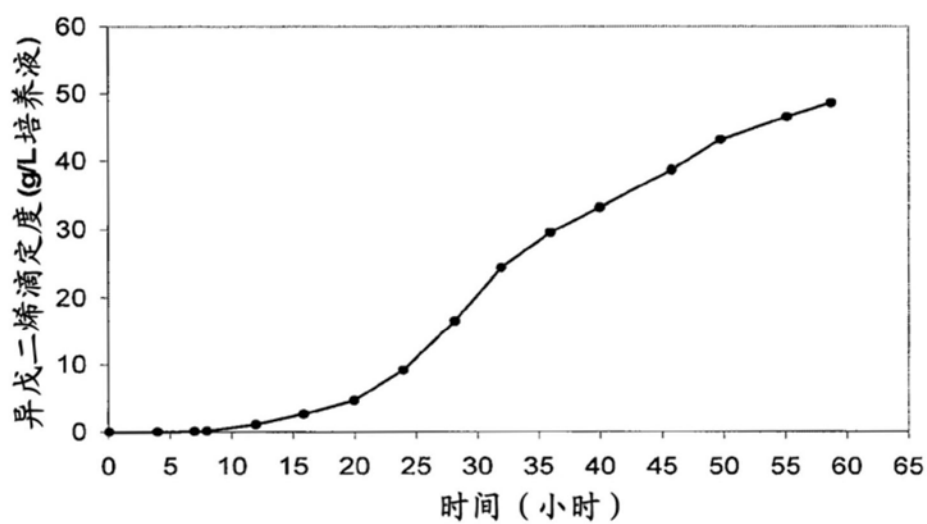


图78B

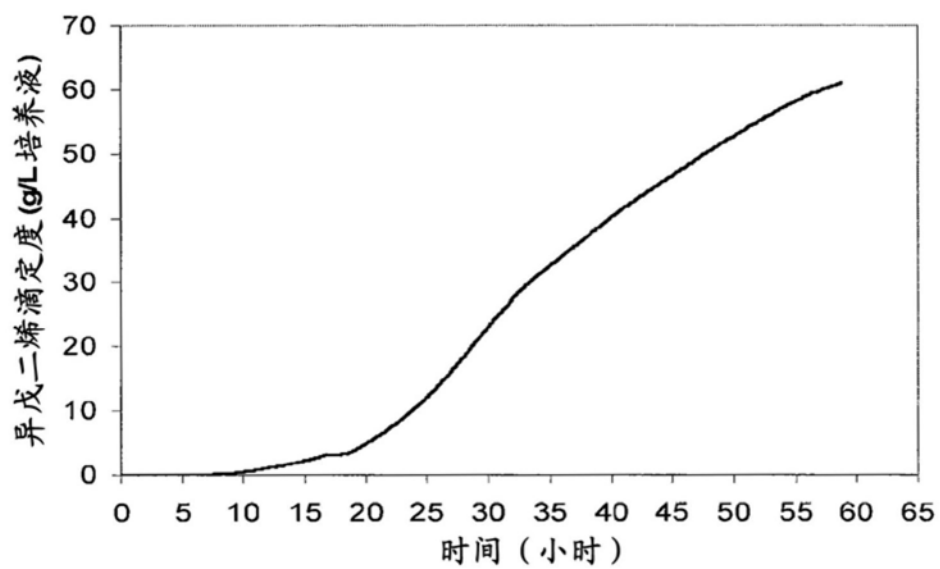


图78C

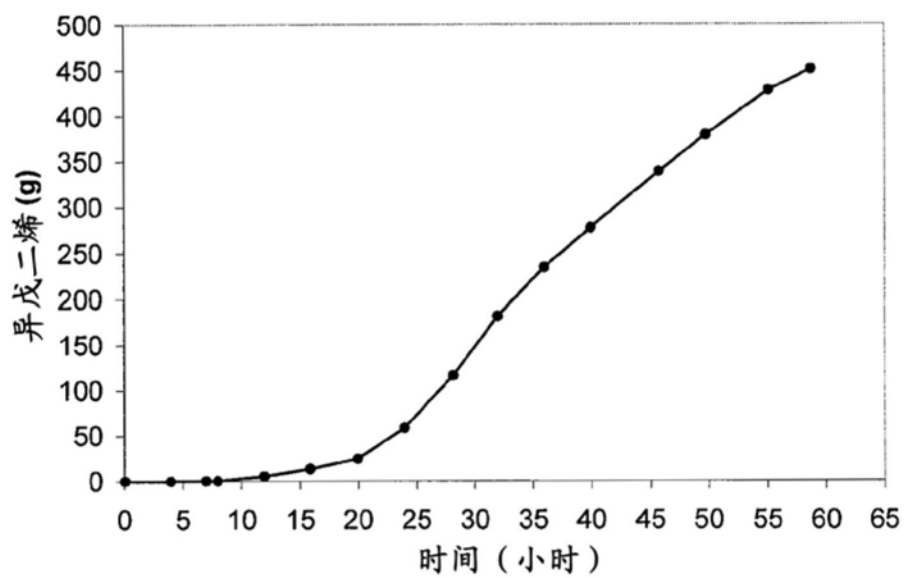


图78D

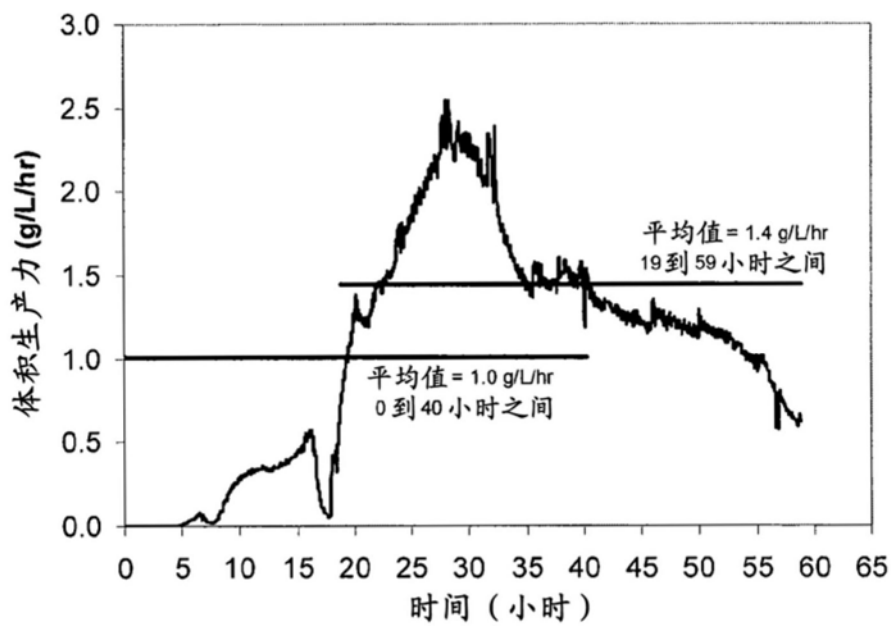


图78E

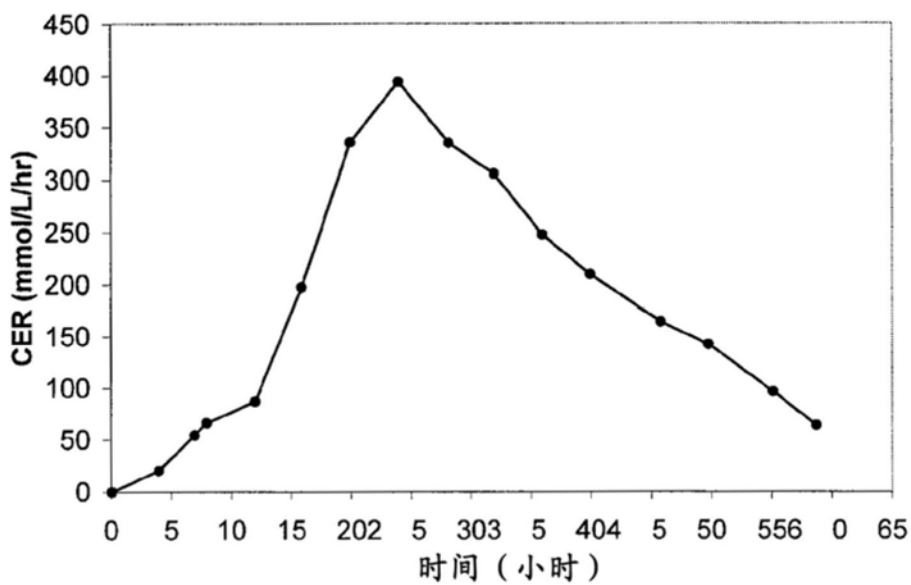


图78F

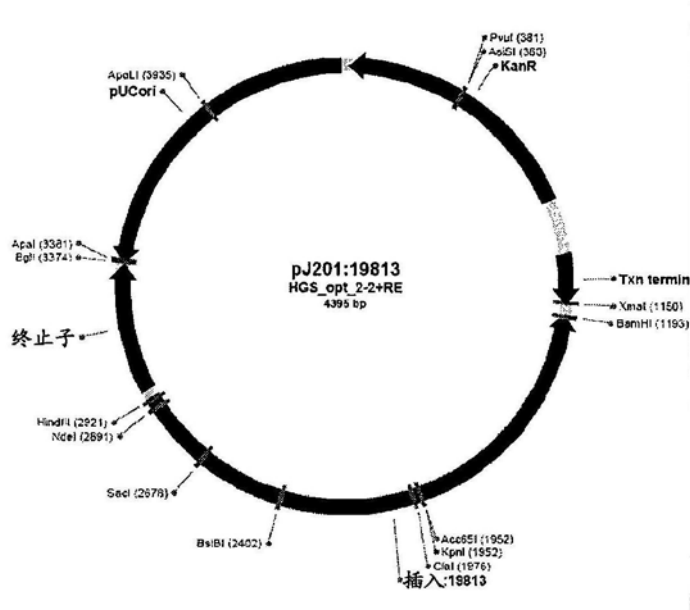


图79A

5'-

tagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaattattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaataagga  
gaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggtatcggctcgcgattccgactcgtccaacatcaataacattatcc  
cctcgtcaaaaataagggtatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagtattgcatcttccagac  
ttgtcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcataccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgaggcgaaat  
acgcgatcgtgttaaaaggacaattacaacaggaaatcagtgcaaccggcgaggaacactgccagcgcatacaaatattttacactg  
aatcaggatattcttaatactggaacgctgttttccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtagcgataaaatgctt  
gatggtcggaagtggcataaattccgctcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctaccttgcctggttcagaa  
acaactctggcgcacgggcttccatacaagcgatagattgtcgcacctgattgcccacattatcgcgagccattataccatataaatc  
agcatccatgttggaattaatcgcggcctcgacgttcccggtgaatatggctcatattcttcttttcaatattatgaagcattatcagggtat  
tgtctcatgagcggatacatatttgaaatgtatttagaaaaataacaaataggggtcagtggtacaaccaattaaccaattctgaacattatcgcg  
agccattatcactgaatatggctcataacacccctgtttgcctggcgagtagcgcggtgtccacctgaccccatgccgaactcaga  
agtgaacgccgtagcgccgatgtagtggtgggactccccatcgagagtagggaaactgccaggcatcaataaaaacgaaaggctcag  
tcgaaagactgggcttccgcccgggtaattagggggtgtcgccttcgattgacggttacggatcctcacagtacatcagctggtgat  
ggggaacgggtcgatgagcagcagcttgatcggttctcggtggcgtaatccggcgccagcccagcccatattgtaggtgcagtg  
gtcacgcgggcatgttcacggcgatcctgaacgccttcggcagcagggtgtgtccgacacgcgtcgcggttcattttcttccact  
cggcgctgatcagcttgcgcagcttctcgggcctgttctcgtcgtgcccgttctcgtgcatgtagctgatgatgctgttggtggttccg  
ccgcttgcagttccgcccggaggtcgccagatcgttcacagccgaaagatcacgcaggacgagcgaccaggccgttggaagtcgg  
tcaggagcgggagggcggtggtccgagatattctcgtcgtgagaccgagaagtagctcggcgccagcagcgcgaccccgctgga  
ggacacgctggcgttccaggtactgtctgaaggcggggatgatctgttattgtccacttggcttcttcaggaaggccttcacagttcg  
cgccagcttttggtcagatagctcaggtattgtggcccttctcctcaggtaggtaggacgtgtcgttcacgggtgtgtacaggccagga  
agcacagctcatatagtcgggcagcgtgtgatggcgttcacgtccagcgttccaccgcgtcgttggaagagctgcagttcgtccagggtg  
ccgtacacgtcatagacgtcatcgataatggtgaccagaccgaacatcttggtgacggccttgcggcattcgcgaactcggggtccggcg  
ccatgccagcggccagaagtacacttccatcaggcggtcccgacgaaatccagcttgcgtggcgaggcccatctcgttccaccaccgg  
ctcaggtctcgcagctcttttgggtcaggggtcgtgaccatgttgaaatcagtttggccagttccagcagcagctggtgatcggtccttgg  
gttctgacttgcagaaaccaccgcgctccaggcggtgcaggcgttgatgatacggcagctccagcgcgtgggacacctgctcggcca  
ccttctgttgatcccccttctgaggtgttcttcagatgggtgatgtgaaggtagggcctcctccagcagatttccgctcgaaccgaga  
tagctggcctcgtacaggtcagcagggcctgcacgtcaccctcagttccccggagaagcccccttcttgccttgaaagcgctgaacac  
gtcctggctcacctcaaagccatgctgcgcagcagggcggaagctcagggcggtcgcgtgcagatcgtttgttcttattctcgtccag  
caggacgatgttctccagcgccttgatgatatcttctcaaatgttaggtcagggccagcgctgcagctcgtgatgagctccagcaggt  
caggggctgggtgtccaccgggtgatcatgaacgcacctcctcctcagcttgggtggccttctcttcgagcttccaccttcaggtcgttt  
ccaggctcgcaggaactcgaagtccacaggttgggctggttagttcgcggaccgacggctattatgctcgggtatctgggtgaactggctg  
ctggtggcgcacatatgtatatctccttctaaagttaaacaagcttaagatgttcagcgacaaggcgacacaaaattattctaaatgcataat  
aaatactgataacatcttatagttgtattatatttgtattatcgttgacatgtataatttgatatcaaaaactgatttcccttattatttcgagattta  
tttcttaattctttaaacaactagaataattgtatatacaaaaaatcataataatagatgaatagtttaattataggtgttcatcaatcgaanaag  
caacgtatcttatttaaagtgcgtgttcttctcattataagggttaaataattctcatatatcaagcaaatgacagcgcccttaaatattctga  
caaatgctcttccctaaactccccataaaaaaccgccgaagcgggttttacgttatttgcggaftaacgattactcgttatcagaaccg  
cccagggggcccagcttaagactggcgtcgtttacaacacagaaagagttgtagaaacgaaaaaggccatccgtcaggggcttct  
gcttagttgatcctggcagttccctactctcgccttcgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggctgttcggctgcggcgagcggtat  
cagctcactcaaaaggcggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggc  
caggaaccgtaaaaaggcgcgttgcgtggcgttttccataggctcgcggccctgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtacagag  
gtggcgaaaccggacaggactataagataaccaggcgttccccctggaagctcctcgtcgcgtcctcgttccgacctgccgttaccg  
gatacctgtccgcttctccttcgggaagcgtggcgttctcctatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgtccaag  
ctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgactt

图79B



atgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctgaagtgggtgggctaactac  
ggctacactagaagaacagtatttggatatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagtggtagctcttgatccggcaaaaa  
accaccgctggtagcgggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacgg  
ggtctgacgctcagtgggaacgacgcgcgtaactcacgtaagggaatttggatcatgagcttgcgccgtcccgtaagtcagcgtaatgct  
ctgcttt (SEQ ID NO:123)

图79C