



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115552016 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 30

(21) 申请号 202080094328.8

(22) 申请日 2020.11.24

(30) 优先权数据

62/940510 2019.11.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.07.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/062109 2020.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/108464 EN 2021.06.03

(71) 申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·齐 Q·Q·朱 J·Y·王

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 权陆军 林毅斌

(51) Int.Cl.

C12N 15/81 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

C07K 14/395 (2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表9页

(54) 发明名称

通过过表达MIG多肽的酵母来降低乙酸生产

(57) 摘要

描述了涉及过表达MIG转录调节因子多肽的经修饰的酵母的组合物和方法。与亲本细胞相比,该酵母生产降低量的乙酸。这种酵母对从淀粉底物大规模生产乙醇是特别有用的,其中乙酸是不希望的终产物。

1. 一种衍生自亲本酵母细胞的经修饰的酵母细胞,所述经修饰的细胞包含遗传改变,所述遗传改变引起所述经修饰的细胞与其他方面相同的亲本细胞相比在发酵期间生产增加量的MIG转录调节因子多肽,其中在相同发酵条件下与所述其他方面相同的亲本细胞生产的乙酸量相比,所述经修饰的细胞在发酵期间生产减少量的乙酸。

2. 如权利要求1所述的经修饰的细胞,其中所述遗传改变包括将核酸引入所述亲本细胞中,所述核酸能够指导MIG转录调节因子多肽以高于等同条件下生长的所述亲本细胞的水平表达。

3. 如权利要求1所述的经修饰的细胞,其中所述遗传改变包括引入用于表达MIG转录调节因子多肽的新启动子。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述细胞进一步包含磷酸转酮酶途径的一个或多个基因。

5. 如权利要求4所述的经修饰的细胞,其中所述磷酸转酮酶途径的基因选自以下组成的组:磷酸转酮酶、磷酸转乙酰酶、和乙酰化乙酰基脱氢酶。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的经修饰的细胞,其中与在相同条件下生长的亲本细胞生产的MIG转录调节因子多肽的量相比,所述MIG转录调节因子多肽的表达量增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少70%、至少100%、至少150%、至少200%、至少500%、至少1,000%、至少2,000%或更多。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的经修饰的细胞,其中与在等同条件下生长的所述亲本细胞中的水平相比,编码所述MIG转录调节因子多肽的mRNA的生产量增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍或更多。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述细胞进一步包含编码碳水化合物加工酶的外源基因。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的经修饰的细胞,其进一步包含甘油途径和/或乙酰辅酶A途径中的改变。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的经修饰的细胞,其进一步包含用于制备乙醇的替代途径。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述细胞属于酵母属(*Saccharomyces*)物种。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述MIG转录调节因子多肽是MIG1、MIG2、MIG3或其组合。

13. 一种用于减少生长于碳水化合物底物上的酵母细胞的乙酸生产的方法,所述方法包括:向亲本酵母细胞中引入与所述亲本细胞生产的量相比使MIG转录调节因子多肽的生产增加的遗传改变。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述具有引入的遗传改变的细胞是经修饰的细胞,所述经修饰的细胞是如权利要求1-12中任一项所述的细胞。

15. 如权利要求13或14所述的方法,其中乙酸生产的减少是至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%或更多。

16. 如权利要求13-15中任一项所述的方法,其中与在相同条件下生长的其他方面相同的亲本细胞生产的MIG转录调节因子多肽的量相比,MIG转录调节因子多肽过表达至少

20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少70%、至少100%、至少150%、至少200%、至少500%、至少1,000%、至少2,000%或更多。

17. 如权利要求13-16中任一项所述的方法,其中与在等同条件下生长的所述亲本细胞中生产的量相比,MIG转录调节因子mRNA过表达至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍或更多。

通过过表达MIG多肽的酵母来降低乙酸生产

技术领域

[0001] 本发明的组合物和方法涉及过表达MIG转录调节因子多肽的经修饰的酵母。与亲本细胞相比,该酵母生产降低量的乙酸。这种酵母对从淀粉底物中大规模生产乙醇是特别有用的,其中乙酸是不希望的副产物。

背景技术

[0002] 第一代基于酵母的乙醇生产将糖转化为燃料乙醇。全世界酵母的年度燃料乙醇生产为约900亿升(Gombert,A.K.和van Maris.A.J. (2015) Curr.Opin.Biotechnol.[生物技术新见]33:81-86)。据估计,乙醇生产成本的约70%是原料。因为生产量如此之大,所以甚至小的产率提高也会对整个行业产生巨大的经济影响。

[0003] 在具有异源磷酸转酮酶(PKL)途径的工程化的酵母细胞中的乙醇生产高于在不具有PKL途径的亲本菌株中的乙醇生产(参见,例如Miasnikov等人,WO 2015148272)。PKL途径由磷酸转酮酶(PKL)和磷酸转乙酰酶(PTA)组成,以使碳通量远离甘油途径并且朝向乙酰辅酶A的合成。两种支持酶,即乙醛脱氢酶(AADH)和乙酰辅酶A合酶(ACS)可有助于使PKL途径更加有效。

[0004] 不幸的是,这些工程化的菌株也比亲本酵母生产更多乙酸。乙酸是不希望的副产物,因为乙酸对酵母生长和发酵具有负面影响。此外,乙酸降低来自发酵和蒸馏的剩余水(称为逆流)的pH,其典型地再利用用于随后批次的底物的液化。结果是,乙醇生产者必需调节逆流(或液化物)的pH或增加用于液化的新鲜水的量。

[0005] 存在控制通过酵母(特别是倾向于生产增加量的乙酸的工程化的酵母)生产的乙酸的量的需要。

发明内容

[0006] 本发明的组合物和方法涉及过表达MIG转录调节因子多肽的经修饰的酵母。这些组合物和方法的各方面和实施例描述于以下独立编号的段落中。

[0007] 1.在一方面,提供了一种衍生自亲本酵母细胞的经修饰的酵母细胞,这些经修饰的细胞包含遗传改变,该遗传改变引起这些经修饰的细胞与其他方面相同的亲本细胞相比在发酵期间生产增加量的MIG转录调节因子多肽,其中在相同发酵条件下与这些其他方面相同的亲本细胞生产的乙酸量相比,这些经修饰的细胞在发酵期间生产减少量的乙酸。

[0008] 2.在如段落1所述的经修饰的细胞的一些实施例中,该遗传改变包括将核酸引入这些亲本细胞中,该核酸能够指导MIG转录调节因子多肽以高于等同条件下生长的该亲本细胞的水平表达。

[0009] 3.在如段落1所述的经修饰的细胞的一些实施例中,该遗传改变包括引入用于表达MIG转录调节因子多肽的新启动子。

[0010] 4.在如段落1-3中任一项所述的经修饰的细胞的一些实施例中,这些细胞进一步包含磷酸转酮酶途径的一个或多个基因。

[0011] 5. 在如段落4所述的经修饰的细胞的一些实施例中,这些磷酸转酮酶途径的基因选自自由以下组成的组:磷酸转酮酶、磷酸转乙酰酶、和乙酰化乙酰基脱氢酶。

[0012] 6. 在如段落1-5中任一项所述的经修饰的细胞的一些实施例中,与在相同条件下生长的亲本细胞生产的MIG转录调节因子多肽的量相比,该MIG转录调节因子多肽的表达量增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少70%、至少100%、至少150%、至少200%、至少500%、至少1,000%、至少2,000%或更多。

[0013] 7. 在如段落1-5中任一项所述的经修饰的细胞的一些实施例中,与在等同条件下生长的这些亲本细胞中的水平相比,编码该MIG转录调节因子多肽的mRNA的生产量增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍或更多。

[0014] 8. 在如段落1-7中任一项所述的经修饰的细胞的一些实施例中,这些细胞进一步包含编码碳水化合物加工酶的外源基因。

[0015] 9. 在一些实施例中,如段落1-8中任一项所述的经修饰的细胞进一步包含甘油途径和/或乙酰辅酶A途径中的改变。

[0016] 10. 在一些实施例中,如段落1-9中任一项所述的经修饰的细胞进一步包含用于制备乙醇的替代途径(alternative pathway)。

[0017] 11. 在如段落1-10中任一项所述的经修饰的细胞的一些实施例中,这些细胞属于酵母属(Saccharomyces)物种。

[0018] 12. 在如段落1-11中任一项所述的经修饰的细胞的一些实施例中,该MIG转录调节因子多肽是MIG1、MIG2、MIG3或其组合。

[0019] 13. 在另一方面,提供了一种用于减少生长于碳水化合物底物上的酵母细胞的乙酸生产的方法,该方法包括:向亲本酵母细胞中引入与这些亲本细胞生产的量相比使MIG转录调节因子多肽的生产增加的遗传改变。

[0020] 14. 在如段落13所述的方法的一些实施例中,这些具有引入的遗传改变的细胞是经修饰的细胞,这些经修饰的细胞是如段落1-12中任一项所述的细胞。

[0021] 15. 在如段落13或14所述的方法的一些实施例中,乙酸生产的减少是至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%或更多。

[0022] 16. 在如段落13-15中任一项所述的方法的一些实施例中,与在相同条件下生长的其他方面相同的亲本细胞生产的MIG转录调节因子多肽的量相比,MIG转录调节因子多肽过表达至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少70%、至少100%、至少150%、至少200%、至少500%、至少1,000%、至少2,000%或更多。

[0023] 17. 在如段落13-16中任一项所述的方法的一些实施例中,与在等同条件下生长的这些亲本细胞中生产的量相比,MIG转录调节因子mRNA过表达至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍或更多。

[0024] 根据包括任何附图/图的说明书,本发明的经修饰的细胞和方法的这些和其他方面以及实施例将是清楚的。

具体实施方式

[0025] I. 定义

[0026] 在详细地描述本发明的酵母和方法之前,为了清楚起见定义以下术语。未定义的术语应当符合如在相关领域中所使用的常规含义。

[0027] 如本文所使用的,术语“醇”是指其中羟基官能团(-OH)与饱和碳原子键合的有机化合物。

[0028] 如本文所使用的,术语“酵母细胞”、“酵母菌株”、或简称“酵母”是指来自子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)的生物。示例性酵母是来自酵母目(Saccharomycetales)的芽殖酵母。酵母的特定实例是酵母属物种,包括但不限于酿酒酵母(*S.cerevisiae*)。酵母包括用于生产燃料醇的生物以及用于生产可饮用醇的生物,包括用于制备独特味道的啤酒、葡萄酒和其他发酵饮料的特种和专有酵母菌株。

[0029] 如本文所使用的,短语“工程化的酵母细胞”、“变体酵母细胞”、“经修饰的酵母细胞”、或相似短语是指包括本文所述的遗传修饰和特征的酵母。变体/经修饰的酵母不包括天然存在的酵母。

[0030] 如本文所使用的,术语“多肽”和“蛋白质”(以及它们各自的复数形式)可互换地使用,是指包含通过肽键连接的氨基酸残基的任何长度的聚合物。本文使用氨基酸残基的常规一字母或三字母代码,并且所有序列均从N末端到C末端方向进行呈现。聚合物可以包含经修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖天然地修饰的或通过干预(例如,通过二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,如与标记组分缀合)而修饰的氨基酸聚合物。这些定义内还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。

[0031] 如本文所使用的,功能上和/或结构上相似的蛋白质被认为是“相关蛋白”或“同源物”。这样的蛋白质可以衍生自不同属和/或物种的生物,或不同纲的生物(例如,细菌和真菌),或者是人工设计的蛋白质。相关蛋白还涵盖通过一级序列分析确定的、通过二级或三级结构分析确定的、或者通过免疫交叉反应性确定的、或通过他们的功能确定的同源物。

[0032] 如本文所使用的,术语“同源蛋白”是指与参考蛋白具有相似活性和/或结构的蛋白。这并不旨在意味着同源物必定是进化上相关的。因此,该术语旨在涵盖从不同生物获得的相同、相似、或相应(即,在结构和功能方面)的一种或多种酶。在一些实施例中,希望鉴定与参考蛋白具有相似的四级、三级和/或一级结构的同源物。在一些实施例中,同源蛋白作为参考蛋白诱导相似的一种或多种免疫应答。在一些实施例中,同源蛋白经过工程化以产生具有一种或多种所希望的活性的酶。

[0033] 序列之间的同源性程度可以使用本领域已知的任何合适的方法确定(参见,例如,Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.[应用数学进展]2:482;Needleman和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],48:443;Pearson和Lipman(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]85:2444;威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)(遗传学计算机组公司(Genetics Computer Group),威斯康星州麦迪逊(Madison,WI))中的程序,如GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA;以及Devereux等人(1984)Nucleic Acids Res.[核酸研究]12:387-95)。

[0034] 例如,PILEUP是确定序列同源性水平的有用程序。PILEUP使用渐进的、两两比对创建了来自一组相关序列的多重序列比对。它还可以绘制显示用于创建该比对的聚类关系的一个树。PILEUP使用Feng和Doolittle的渐进比对方法的简化(Feng和Doolittle(1987)

J.Mol.Evol.[分子进化杂志]35:351-60)。该方法类似于Higgins和Sharp描述的方法((1989)CABIOS[计算机在生物学中的应用]5:151-53)。有用的PILEUP参数包括为3.00的默认空位权重,为0.10的默认空位长度权重,以及加权的末端空位。有用算法的另一个实例是BLAST算法,由以下描述:Altschul等人((1990)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-10)和Karlin等人((1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:5873-87)。一个特别有用的BLAST程序是WU-BLAST-2程序(参见,例如,Altschul等人,(1996)Meth.Enzymol.[酶学方法]266:460-80)。参数“W”、“T”、以及“X”确定了该比对的灵敏度与速度。该BLAST程序使用字长(W)为11、BLOSUM62得分矩阵(参见,例如,Henikoff和Henikoff(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:10915)比对(B)为50、期望值(E)为10、M'5、N-4、以及两条链的比较作为默认值。

[0035] 如本文所使用的,在至少两个核酸或多肽的上下文中,短语“基本上相似”和“基本上相同”典型地意指多核苷酸或多肽包含与参考(即,野生型)序列相比具有至少约70%同一性、至少约75%同一性、至少约80%同一性、至少约85%同一性、至少约90%同一性、至少约91%同一性、至少约92%同一性、至少约93%同一性、至少约94%同一性、至少约95%同一性、至少约96%同一性、至少约97%同一性、至少约98%同一性、或甚至至少约99%同一性、或更高同一性的序列。使用具有默认参数的CLUSTAL W算法计算序列同一性百分比。参见Thompson等人(1994)Nucleic Acids Res.[核酸研究]22:4673-4680。CLUSTAL W算法的默认参数是:

空位开放罚分: 10.0

[0036] 空位延伸罚分: 0.05

蛋白质权重矩阵: BLOSUM 系列

DNA 权重矩阵: IUB

延迟发散序列%: 40

空位分隔距离: 8

DNA 转换权重: 0.50

[0037] 列表亲水残基: GPSNDQEKR

使用负性矩阵: 关

切换特殊残基罚分: 开

切换亲水罚分: 开

切换结束空位分隔罚分 关

[0038] 两种多肽基本上相同的另一个指示是第一多肽与第二多肽具有免疫交叉反应性。典型地,相差保守氨基酸取代的多肽具有免疫交叉反应性。因此,多肽与第二多肽基本上相同,例如,其中两个肽的区别仅在于保守取代。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子在严格条件下(例如,在中等至高严格性的范围内)彼此杂交。

[0039] 如本文所使用的,术语“基因”与术语“等位基因”同义,是指编码和指导蛋白质或

RNA表达的核酸。丝状真菌的营养体形式通常是单倍体,因此指定基因的单拷贝(即单个等位基因)足以赋予指定表型。当生物含有多于一个相似基因时,术语“等位基因”通常是优选的,在这种情况下,每个不同的相似基因被称为不同的“等位基因”。

[0040] 如本文所使用的,“组成型”表达是指在基本上所有典型生长条件下,由特定基因编码的多肽的产生,而不是“条件”表达,该“条件”表达需要特定的底物的存在、温度等来诱导或激活表达。

[0041] 如本文所使用的,术语“表达多肽”和相似术语是指使用细胞的翻译机器(例如,核糖体)产生多肽的细胞过程。

[0042] 如本文所使用的,“过表达多肽”、“增加多肽的表达”和相似术语是指与不包括指定遗传修饰的亲本或“野生型”细胞所观察到的相比,以高于正常水平的水平表达多肽。

[0043] 如本文所使用的,“表达盒”是指包括启动子、和氨基酸编码区以及终止子(即,启动子::氨基酸编码区::终止子)以及允许该编码多肽在细胞中生产所需的其他核酸序列的DNA片段。表达盒可以是外源的(即,引入细胞中)或内源的(即,存在于细胞中)。

[0044] 如本文所使用的,关于两个DNA片段的术语“融合的”和“融合”(例如启动子和多肽的编码区)是指致使两个DNA片段变成单个分子的物理键合。

[0045] 如本文所使用的,术语“野生型”和“天然”可互换地使用,并且是指在自然界中发现的基因、蛋白质或菌株,或者不是为了目前所述酵母的优势而有意修饰的基因、蛋白质或菌株。

[0046] 如本文所使用的,术语“目的蛋白”是指希望在经修饰的酵母中表达的多肽。这种蛋白质可以是酶、底物结合蛋白、表面活性蛋白、结构蛋白、可选择标记等,并且能被表达。目的蛋白由相对于亲本菌株的内源基因或异源基因(即,目的基因)编码。目的蛋白可以在细胞内表达或作为分泌的蛋白表达。

[0047] 如本文所使用的,“基因的破坏”泛指任何基本上阻止细胞在宿主细胞中产生功能性基因产物(例如,蛋白质)的遗传的或化学的操作(即,突变)。示例性破坏方法包括基因的任何部分(包括多肽编码序列、启动子、增强子或另一个调节元件)的完全或部分缺失、或其诱变,其中诱变涵盖取代、插入、缺失、倒位、及其组合和变化,任何这些突变基本上阻止功能基因产物的产生。也可以使用CRISPR、RNAi、反义、或任何其他消除基因表达的方法破坏基因。可以通过非相邻控制元件的缺失或遗传操作来破坏基因。如本文所使用的,“基因缺失”是指该基因从宿主细胞的基因组中除去。当基因包括与基因编码序列不紧邻的控制元件(例如,增强子元件)时,基因缺失是指编码序列、以及任选地相邻增强子元件(例如,包括但不限于启动子和/或终止子序列)的缺失,但未要求非相邻控制元件的缺失。基因缺失也指编码序列的一部分、或与编码序列紧邻或不紧邻的启动子的一部分的缺失,其中工程化的细胞中不存在目的基因的功能活性。

[0048] 如本文所使用的,术语“遗传操作”、“遗传改变”、“遗传工程化”以及相似术语可互换地使用,并且是指核酸序列的改变/变化。改变可包括但不限于核酸序列中至少一种核酸的取代、缺失、插入或化学修饰。

[0049] 如本文所使用的,“功能性多肽/蛋白”是具有活性(例如酶活性、结合活性、表面活性特性等)的蛋白质,并且其未被诱变、截短、或以其他方式修饰以消除或降低此活性。如所指出的,功能性多肽可以是热稳定的或不耐热的。

[0050] 如本文所使用的,“功能性基因”是能够被细胞组分用于产生活性基因产物(典型地是蛋白质)的基因。功能性基因是破坏的基因的对立体,这些破坏的基因被修饰使得它们不能被细胞组分用于产生活性基因产物,或者具有降低的被细胞组分用于产生活性基因产物的能力。

[0051] 如本文所使用的,如果已对酵母细胞进行遗传或化学改变以防止产生呈现出野生型蛋白的活性特征的功能性蛋白/多肽,则对这些酵母细胞已经进行了“修饰以防止产生指定蛋白”。此类修饰包括但不限于编码蛋白质(如本文所述)的基因的缺失或破坏、使得编码的多肽缺乏前述活性的基因的修饰、影响翻译后加工或稳定性的基因的修饰、及其组合。

[0052] 如本文所使用的,“途径的减弱”或“通过途径的通量的减弱”(即,生物化学途径)泛指通过代谢途径降低或完全阻止生物化学底物或中间体的通量的任何遗传的或化学的操作。可以通过各种众所周知的方法实现途径的减弱。这样的方法包括,但不限于:完全或部分缺失一个或多个基因、用编码具有降低的催化活性或增加的 K_m 值的酶的突变体形式替代这些基因的野生型等位基因、修饰启动子或控制一个或多个基因表达的其他调节元件、针对减少的稳定性工程化这些酶或编码这些酶的mRNA、将酶错误指导进不太可能与底物和中间体相互作用的细胞区室、使用干扰RNA等。

[0053] 如本文所使用的,“需氧发酵”是指在氧存在下的生长以及生产过程。

[0054] 如本文所使用的,“厌氧发酵”是指在不存在氧的情况下的生长以及生产。

[0055] 如本文所使用的,表述“发酵结束”是指就固定和可变成本而言,当连续发酵产生少量另外的醇的经济优势被连续发酵的成本超过时的发酵阶段。在更一般的意义上,“发酵结束”是指发酵将不再产生大量另外的醇,即不超过约1%的另外醇的点。

[0056] 如本文所使用的,表达“碳通量”是指碳分子通过代谢途径的周转率。碳通量是由代谢途径(如葡萄糖代谢途径和麦芽糖代谢途径)中涉及的酶调节的。

[0057] 如本文所使用的,单数冠词“一个/一种(a/an)”以及“该/所述(the)”涵盖复数个指示物,除非上下文中另外明确指明。本文引用的所有参考文献均通过援引以其全文特此并入。除非另外说明,否则以下缩写/首字母缩略词具有以下含义:

[0058] 除非另外说明,以下含义:

[0059]	°C	摄氏度
[0060]	AA	α -淀粉酶
[0061]	AADH	乙醛脱氢酶
[0062]	bp	碱基对
[0063]	DNA	脱氧核糖核酸
[0064]	ds或DS	干固体
[0065]	EC	酶学委员会
[0066]	EtOH	乙醇
[0067]	g或gm	克
[0068]	g/L	克/升
[0069]	GA	葡糖淀粉酶
[0070]	H ₂ O	水
[0071]	HPLC	高效液相色谱法

[0072]	hr或h	小时
[0073]	kg	千克
[0074]	M	摩尔
[0075]	mg	毫克
[0076]	min	分钟
[0077]	mL或ml	毫升
[0078]	mM	毫摩尔
[0079]	N	当量浓度
[0080]	nm	内米
[0081]	PCR	聚合酶链式反应
[0082]	PKL	磷酸转酮酶
[0083]	ppm	百万分率
[0084]	PTA	磷酸转乙酰酶
[0085]	Δ	与缺失有关
[0086]	μg	微克
[0087]	μL和μl	微升
[0088]	μM	微摩尔

[0089] II. 具有增加的MIG表达的经修饰的酵母细胞

[0090] 描述了涉及遗传改变的经修饰的酵母和方法,该遗传改变导致与相应的(即,其他方面相同的)亲本细胞相比生产增加量的MIG转录调节因子多肽。MIG转录调节因子多肽(或简称MIG转录调节因子)是Cys₂His₂锌指蛋白的家族。MIG1的长度为504个氨基酸。MIG2的长度为383个氨基酸,MIG3的长度为395个氨基酸。在这些转录因子中,整体氨基酸序列同一性小于30%,但是它们在其DNA结合结构域中具有>70%的序列同一性。

[0091] MIG1和MIG2在参与糖异生、需氧呼吸和替代性碳源利用的基因的葡萄糖反应性阻遏中发挥了定义明确的作用。关于MIG3的功能,所知更少。最近的一项研究表明,在一些菌株中,MIG3在分解代谢物阻遏中发挥作用,并且在暴露于乙醇时发挥另外的调节作用(Lewis, J.A. 和 Gasch, A.P. (2012) G3 2:1607-12)。然而,在此以前,在用于乙醇生产的酵母发酵中MIG过表达与降低的乙酸生产之间的关联还没建立。

[0092] 申请人已经发现,与其他方面相同的亲本细胞相比,过表达MIG1、MIG2和MIG3转录调节因子多肽的酵母细胞在发酵期间生产减少量的乙酸。所希望的是乙酸减少,因为乙酸不利地影响酵母生长和发酵并且额外地导致逆流,该逆流具有比希望的更低的pH,需要调节pH、或使用更新鲜的水以稀释逆流。

[0093] 在一些实施例中,与在相同条件下生长的亲本细胞生产的MIG多肽的量相比,经修饰的细胞生产的MIG多肽的量增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少70%、至少100%、至少150%、至少200%、至少500%、至少1,000%、至少2,000%或更多。

[0094] 在一些实施例中,与在相同条件下生长的亲本细胞生产的MIG mRNA的量相比,经修饰的细胞生产的MIG mRNA的量增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍或更多。

[0095] 在一些实施例中,与控制MIG表达的天然启动子的强度相比,用于控制由经修饰的

细胞生产的MIG多肽的表达的启动子的强度(基于生产的mRNA的量)增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、或更多。

[0096] 在一些实施例中,与在相同条件下生长的亲本细胞生产的乙酸的量相比,经修饰的细胞的乙酸生产减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%或更多。

[0097] 优选地,通过使用序列特异性分子生物学技术的遗传操作实现了MIG表达的增加,该遗传操作与化学诱变相反,化学诱变通常不靶向特定核酸序列。然而,不排除化学诱变作为制备经修饰的酵母细胞的方法。

[0098] 在一些实施例中,本发明的组合物和方法涉及向酵母细胞中引入能够指导MIG多肽过表达或表达增加的核酸。具体方法包括但不限于(i)将用于产生该多肽的外源表达盒引入宿主细胞中,任选地加之内源表达盒,(ii)用允许产生增加量的多肽的内源盒取代外源表达盒,(iii)修饰内源表达盒的启动子以增加表达,和/或(iv)修饰宿主细胞的任何方面以增加该多肽在宿主细胞中的半衰期。

[0099] 在一些实施例中,经修饰的亲本细胞已经包括目的基因,如编码可选择标记、碳水化合物加工酶或其他多肽的基因。在一些实施例中,随后将引入的基因引入经修饰的细胞中。

[0100] 示例性酿酒酵母MIG1多肽的氨基酸序列如以下SEQ ID NO:5所示:

MQSPYPMTQVSNVDDGSLLEKESKSKSKVAAKSEAPRPHACPICHRAFHRLEHQTRHMRIH
TG
EKPHACDFPGCVKRFRSDELTRHRRIHNTSHPRGKRGRKKKVVGSPINSASSATSIPDLN
TANFSPPLPQQHLSPLIPIAIAPKENSRRSSTRKGRKTKFEIGESGGNDPVMVSSPKTMAKI
PVSVKPPPSLALNNMNYQTSSASTALSSLSNSHSGSRLKLNALSSLQMMTPFIASSAPRTVFI
[0101] DGPEQKQLQQQNSLSPRYSNVTIVLPRPRSLTDFQGLNNANPNNGSLRAQTQSSVQLKRPS
SVLSLNDLLVGQRNTNESDSDFTTGGEDDEDGLKDPSNSSIDNLEQDYLQEQSRKKSKTSTP
TTMLSRSTSGTNLHTLGVMNQNLHFFSSSPDFQKELNNRLNLNVQQQQEQHTLLQSQNTS
NQSQNQNQNQMMASSSSLSTTPLLSPRVNMINTAISTQQTPIQSQSDSQVQELETLPPIRSL
PLPFPHMD

[0102] 示例性酿酒酵母MIG2多肽的氨基酸序列如以下SEQ ID NO:7所示:

MPKKQTNFPVDNENRPFRCDTCHRGFHRLEHKKRHLRTHTGKPHHCAFPGCGKSFSRDEL
KRHMRTHTGQSQRRLKKASVQKQEFLLTVSGIPTIASGVMIHQPIQVLPANMAINVQAVNGG
NIIHAPNAVHPMVIPIMAQPAPIHASAASFQPATSPMPISTYTPVPSQSFTSFQSSIGSIQS
[0103] NSDVSSIFSNMNRVNTPRSVPNPNDGYLHQHQPQQYQHQTASPSVAKQQKTFHAHSLASA
LSTLQKRTPVSAPSTTIESPSSPSDSSHTSASSAISLPFSNAPSQLAVAKELESVYLDNR
YTTKTRRERAKFEIPEEQEEDTNSSSGSNEEEEHESLDHESSKSRKKLSGVKLPPVRNLLKQ
IDVFNGPKRV

[0104] 示例性酿酒酵母MIG3多肽的氨基酸序列如以下SEQ ID NO:1所示:

MNYLRDRFPDNDQRPFRCEICSRGFHRLEHKKRHVRTHTGKPKHCTVQGCPKSFSSRDEL
KRHLRTHTKGVQRRRIKSKGSRKTVVNTATAAPTTFNENTGVSLTGIGQSKVPPILISVAQN
CDDVNIRNTGNNNGIVETQAPAILVPVINIPNDPHPIPSSLSTTSITSIASVYPSTSPFQYL
[0105] KSGFPEDPASTPYVHSSGSSLALGELSSNSSIFSKSRRNLAAMSGPDSLSSSKNQSSASLLS
QTSHPSKSFSPPTDLSPLRRIMPSVNTGDMEISRVSVSSSSSSSLTSVTYDDTAAKDMGMG
IFFDRPPVTQKACRSNHKYKVNAVSRGRQHERAQFHISGDDSDSNVHRQESRASNTSPNVSL
PPIKSILRQIDNFNSAPSYFSK

[0106] NCBI数据库包括许多酿酒酵母MIG多肽。虽然MIG1、MIG2和MIG3之间的氨基酸序列同一性在DNA结合结构域中是最高的,但是预期遍及氨基酸序列MIG1、MIG2和MIG3中的天然差异不会影响它们的功能。此外,显而易见的是示例性酿酒酵母MIG1、MIG2和MIG3多肽与来自其他生物的多肽具有序列同一性,并且预期功能上和/或结构上相似的蛋白质、同源蛋白和/或基本上相似或相同的蛋白质的过表达会产生相似的有益结果。

[0107] 在本发明的组合物和方法的特定实施例中,在经修饰的酵母细胞中过表达的MIG1、MIG2和/或MIG3多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:1分别具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或甚至至少约99%同一性。

[0108] III.具有与外源PKL途径的基因组合的增加的MIG转录调节因子表达的经修饰的酵母细胞

[0109] MIG转录调节因子的增加的表达可以与PKL途径中的基因的表达组合,以降低乙酸提高量的生产,其与向酵母中引入外源PKL途径相关。

[0110] WO 2015148272中先前已经描述了具有异源PKL途径的工程化的酵母细胞(Miasnikov等人)。这些细胞表达异源磷酸转酮酶(PKL)、磷酸转乙酰酶(PTA)、和乙酰化乙酰基脱氢酶(AADH),任选地具有其他酶,以使碳通量远离甘油途径并且朝向乙酰辅酶A的合成,然后该乙酰辅酶A转化为乙醇。与在其他方面相同的亲本酵母细胞相比,这样的经修饰的细胞能够在发酵过程中增加乙醇生产。

[0111] IV.增加的MIG转录调节因子生产与影响醇生产的其他突变的组合

[0112] 在一些实施例中,除了表达增加量的MIG多肽任选地与异源PKL途径组合之外,本发明的经修饰的酵母细胞包括另外的有益修饰。

[0113] 经修饰的细胞可以进一步包括导致天然甘油生物合成途径和/或再利用甘油途径减弱的突变,已知这些突变可增加醇生产。用于减弱酵母中甘油生物合成途径的方法是已知的,并包括例如通过破坏基因GPD1、GPD2、GPP1和/或GPP2中的一个或多个来降低或消除内源性NAD依赖性甘油3-磷酸脱氢酶(GPD)或磷酸甘油磷酸酶(GPP)活性。参见例如美国专利号9,175,270(Elke等人)、8,795,998(Pronk等人)以及8,956,851(Argyros等人)。Methods to enhance the reuse glycerol pathway by over expression of glycerol dehydrogenase (GCV1) and dihydroxyacetone kinase (DAK1) to convert glycerol to dihydroxyacetone phosphate[通过过表达甘油脱氢酶(GCV1)和二羟基丙酮激酶(DAK1)将甘油转化为磷酸二羟基丙酮以增强再利用甘油途径的方法](Zhang等人(2013) J.Ind.Microbiol.Biotechnol.[工业微生物学和生物技术杂志]40:1153-60)。

[0114] 经修饰的酵母的特征可以进一步在于增加的乙酰辅酶A合酶(也称为乙酰辅酶A连接酶)活性(EC 6.2.1.1)以清除(即捕获)通过化学或酶水解乙酰-磷酸产生(或出于任何其他原因存在于酵母的培养基中)的乙酸并将其转化为乙酰辅酶A。这部分地降低了乙酸对酵母细胞生长的不希望的影响,并且可以进一步有助于醇产率的提高。增加乙酰辅酶A合酶活性可以通过将异源乙酰辅酶A合酶基因引入细胞、增加内源乙酰辅酶A合酶基因的表达等来实现。

[0115] 在一些实施例中,经修饰的细胞可进一步包括编码具有NAD⁺依赖性乙酰化乙醛脱氢酶活性的蛋白质的异源基因和/或编码丙酮酸甲酸裂解酶的异源基因。例如,在美国专利号8,795,998(Pronk等人)中描述了与甘油途径减弱进行组合的这样的基因的引入。在本发明的组合物和方法的一些实施例中,酵母特意缺乏编码乙酰化乙醛脱氢酶、丙酮酸甲酸裂解酶或两者的一种或多种异源基因。

[0116] 在一些实施例中,本发明的经修饰的酵母细胞可进一步过表达糖转运体样(STL1)多肽以增加甘油的摄取(参见,例如,Ferreira等人(2005)Mol.Biol.Cell.[细胞分子生物学]16:2068-76;Dusková等人(2015)Mol.Microbiol.[分子微生物学]97:541-59以及W02015023989 A1)以增加乙醇生产并降低乙酸。

[0117] 在一些实施例中,本发明的经修饰的酵母细胞进一步包括丁醇生物合成途径。在一些实施例中,丁醇生物合成途径是异丁醇生物合成途径。在一些实施例中,异丁醇生物合成途径包含编码如下多肽的多核苷酸,该多肽催化选自以下组成的组的底物至产物的转化:(a) 丙酮酸至乙酰乳酸;(b) 乙酰乳酸至2,3-二羟基异戊酸盐;(c) 2,3-二羟基异戊酸盐至2-酮异戊酸盐;(d) 2-酮异戊酸盐至异丁醛;和(e) 异丁醛至异丁醇。在一些实施例中,异丁醇生物合成途径包含编码具有乙酰乳酸合酶、酮酸还原异构酶、二羟酸脱水酶、酮异戊酸盐脱羧酶、和醇脱氢酶活性的多肽的多核苷酸。

[0118] 在一些实施例中,包含丁醇生物合成途径的经修饰的酵母细胞进一步包含编码具有丙酮酸脱羧酶活性的多肽的多核苷酸中的修饰。在一些实施例中,酵母细胞在编码具有丙酮酸脱羧酶活性的多肽的内源多核苷酸中包含缺失、突变和/或取代。在一些实施例中,具有丙酮酸脱羧酶活性的多肽选自以下组成的组:PDC1、PDC5、PDC6、及其组合。在一些实施例中,酵母细胞在一个或多个内源多核苷酸中进一步包含缺失、突变、过表达和/或取代,这些内源多核苷酸编码FRA2、ALD6、ADH1、GPD2、BDH1、DLS1、DPB3、CPR1、MAL23C、MNN4、PAB1、TMN2、HAC1、PTC1、PTC2、OSM1、GIS1、CRZ1、HUG1、GDS1、CYB2P、SFC1、MVB12、LDB10、C5SD、GIC1、GIC2和/或YMR226C。

[0119] V.增加的MIG转录调节因子表达与其他有益突变的组合

[0120] 在一些实施例中,除了表达增加的MIG多肽任选地与有益于醇生产的其他基因修饰组合之外,本发明的经修饰的酵母细胞进一步包含任何数量的额外的编码目的蛋白的目的基因。可以在遗传操作之前、期间或之后引入额外的目的基因,这些遗传操作导致活性MIG多肽的生产增加。目的蛋白包括可选择标记、碳水化合物加工酶以及其他商业上相关的多肽,包括但不限于选自以下组成的组的酶:脱氢酶、转酮醇酶、磷酸转酮酶、转醛醇酶、差向异构酶、植酸酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、磷酸酶、蛋白酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡糖淀粉酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、纤维素酶、海藻糖酶、脂肪酶、果胶酶、聚酯酶、角质酶、氧化酶、转移酶、还原酶、半纤维素酶、甘露聚糖酶、酯酶、异构酶、果胶酶、乳糖酶、过氧化物酶和

漆酶。目的蛋白可以被分泌、糖基化并以其他方式修饰。

[0121] VI. 经修饰的酵母用于增加醇生产的用途

[0122] 本发明的组合物和方法包括在发酵反应中用于增加醇生产和/或降低甘油生产的方法。这样的方法不限于特定的发酵工艺。预期本发明的工程化的酵母是任何醇发酵设施中常规酵母的“普适性(drop-in)”替代品。虽然主要用于燃料醇生产,但本发明的酵母还可用于生产可饮用醇,包括葡萄酒和啤酒。

[0123] VII. 适合修饰的酵母细胞

[0124] 酵母是被归类为真菌界成员的单细胞真核微生物,并且包括来自子囊菌门和担子菌门的生物。可以用于醇生产的酵母包括但不限于酵母属物种,包括酿酒酵母、以及克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、拉茜斯酵母属(*Lachancea*)和裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)物种。许多酵母菌株是可商购的,其中许多已被选择或基因工程化以获得所需的特征,诸如高醇生产、快速生长速率等。一些酵母已经被基因工程化以生产异源酶,例如葡糖淀粉酶或 α -淀粉酶。

[0125] VIII. 底物和产物

[0126] 从许多碳水化合物底物(包括但不限于玉米淀粉、甘蔗、木薯和糖蜜)中生产醇是众所周知的,正如酶条件和化学条件以及机械方法的无数变化和改善也是众所周知的。据信本发明的组合物和方法与这样的底物和条件完全相容。

[0127] 醇发酵产物包括具有与碳原子键合的羟基官能团(-OH)的有机化合物。示例性醇包括但不限于甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、正戊醇、2-戊醇、异戊醇、和高级醇。最常制备的燃料醇是乙醇和丁醇。

[0128] 鉴于本说明书,本发明的酵母菌株和方法的这些和其他方面以及实施例对于技术人员是清楚的。以下实例旨在进一步说明但不限制这些组合物和方法。

[0129] 实例

[0130] 实例1

[0131] 材料与方法

[0132] 液化物制备:

[0133] 液化物(玉米醪浆料)通过添加600ppm尿素、0.124SAPU/g ds酸性真菌蛋白酶、0.33GAU/g ds变体里氏木霉(*Trichoderma reesei*) 葡糖淀粉酶以及1.46SSCU/g ds白曲霉(*Aspergillus kawachii*) α -淀粉酶,用硫酸调节至pH 4.8来制备。

[0134] 血清瓶测定:

[0135] 向在24孔板中的2mL YPD接种酵母细胞,并且使培养物生长过夜以至25-30之间的OD。将2.5mL液化物转移至血清瓶(Chemglass公司,目录号:CG-4904-01),并将酵母添加至每个小瓶中至最终OD为约0.4-0.6。安装小瓶的盖并用针(BD公司,目录号305111)刺穿以用于通风(以释放CO₂),然后在200RPM振荡下在32℃孵育65小时。

[0136] AnKom测定:

[0137] 将300 μ L浓缩的酵母过夜培养物添加到填充有50g制备的液化物(参见上述)的多个ANKOM瓶中的每个,以达到0.3的最终OD。然后将这些瓶伴随150RPM振荡在32℃孵育65小时。

[0138] HPLC分析:

[0139] 通过在14,000RPM下离心12分钟在Eppendorf管中采集来自血清瓶和AnKom测定的培养物的样品。将上清液用0.2 μ M PTFE过滤器过滤,并且然后在以下条件下用于HPLC(安捷伦科技公司(Agilent Technologies)1200系列)分析:Bio-Rad Aminex HPX-87H柱,运行温度为55 $^{\circ}$ C。0.6ml/min等度流速,0.01N H₂SO₄,2.5 μ l注射体积。使用校准标准物用于定量乙酸、乙醇、甘油、葡萄糖和其他分子。所有值以g/L报告。

[0140] RNA-Seq分析:

[0141] 根据TRIzol法(生命技术公司(Life-Tech),罗克韦尔(Rockville),马里兰州(MD))从单个样品中制备RNA。然后使用Qiagen RNeasy迷你试剂盒(凯杰公司(Qiagen),日耳曼敦(Germantown),马里兰州)清洁RNA。使用应用生物系统公司(Applied Biosystems)的大容量cDNA逆转录试剂盒(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),威明顿市(Wilmington),特拉华州(Delaware))从单个样品的总mRNA中生成cDNA。使用鸟枪法(shotgun method)对制备的每个样品的cDNA进行测序,然后相对于单个基因进行定量。结果报告为每千碱基千万转录物的读数(RPK10M),并用于对样品中每个转录物的量进行定量。

[0142] 实例2

[0143] 酵母中MIG的表达

[0144] 为了理解在酵母中MIG的调节,在酿酒酵母菌株FERMAXTM Gold(玛翠公司(Martrex Inc.)),明尼苏达州,美国;本文中缩写为“FG”) (其是用于乙醇生产的标准菌株)上进行了RNA-Seq分析。如实例1所述进行了RNA-Seq并且结果总结于表1中。表达水平表示为每千碱基千万转录物的读数(RPK10M)。

[0145] 表1. 在发酵期间FG中MIG表达的RNA-Seq分析

基因	时间				
	6 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr
MIG1	353	472	468	241	293
MIG2	214	359	618	238	282
MIG3	375	450	561	309	305

[0147] 结果表明,在FG菌株中,在发酵期间MIG1、MIG2和MIG3以低水平表达。相对而言,在发酵期间,MIG3在大约24hr时以最高水平表达。

[0148] 实例3

[0149] 用于增加MIG3表达的启动子选择

[0150] 如表2所示,在FG菌株中,在发酵期间,翻译延伸因子1 β (EFB1) 在大约6hr时以最高水平表达,然后在剩余的发酵过程中,维持高水平表达。因此,选择EFB1启动子来驱动MIG3的过表达。

[0151] 表2. 在发酵期间MIG3和EFB1的转录概况

[0152]		时间				
	基因	6 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr
	MIG3	375	450	561	309	305
	EFB1	34191	16459	10007	10917	13214

[0153] 实例4

[0154] 酵母中MIG3的过表达

[0155] 为了过表达MIG3,在FG亲本中,将内源性MIG3的启动子与EFB1启动子交换。PCR证实了EFB1启动子对MIG3启动子的预期替代。MIG3多肽的氨基酸序列如以下SEQ ID NO:1所示:

MNYLRDRFPPDNDQRPFRCEICSRGFHRLEHKKRHVRTHTGKPHKCTVQGCPKSFSRSDEL
 KRHLRTHTKGVQRRRIKSKGSRKTVVNTATAAPTTFNENTGVSLTGIGQSKVPPILISVAQN
 CDDVNIRNTGNNNGIVETQAPAILVPVINIPNDPHPI PSSLSTTSITSIASVYPSTSFPQYL
 [0156] KSGFPEDPASTPYVHSSGSSLALGELSSNSSIFSKSRRNLAAMSGPDSLSSSKNQSSASLLS
 QTSHPSKSFSRPPTDLSPLRRIMPSVNTGDMEISR TVSVSSSSSSSLTSVTYDDTA AKDMGMG
 IFFDRPPVTQKACRSNHKYKVNAVSRGRQHERAQFHISGDDEDSNVHRQESRASNTSPNVSL
 PPIKSILRQIDNFNSAPSYFSK

[0157] MIG3编码区的DNA序列如以下SEQ ID NO:2所示:

[0158]

ATGAATTACCTGCGAGATAGATTTCTCCGATAATGACCAAAGACCCTTTAGATGTGAAAT
TTGTTACGAGGTTTCCACAGACTTGAACATAAAAAAAGGCACGTAAGAACGCACACTGGCG
AGAAGCCTCACAAATGTACCGTTCAGGGCTGTCCGAAAAGCTTCAGCCGAAGCGATGAACTA
AAAAGACATTTGAGGACACATACTAAAGGCGTCCAAAGGCGCAGAATAAAATCCAAGGGCTC
GCGAAAAACCGTTGTGAATACTGCTACCGCCGCCCTACCACCTTCAATGAAAACACTGGTG
TTTCGCTCACGGGGATAGGTCAATCTAAAGTGCCACCTATTCTTATCTCCGTTGCTCAGAAT
TGCGATGACGTGAATATACGAAATACTGGAAATAATAATGGCATTGTGGAGACACAGGCACC
TGCAATTTTAGTGCTGTGATAAATATTCCAAATGACCCTCATCCGATTCCAAGTAGCCTCT
CCACTACTTCTATCACCTCCATTGCATCAGTATATCCCTCTACTTCTCCATTCCAGTACCTG
AAAAGCGGGTTTCTGAAGATCCTGCATCTACACCGTATGTACATTTCGTCCGGAAGTTCTTT
AGCCCTGGGTGAATTGTCTTCAAACCTCTATATTTTCGAAATCTAGGAGGAATTTGGCCG
CCATGAGTGGTCCTGATTCTTTGAGTAGTTCTAAAAACCAATCCAGTGCTTCGCTTCTTTCT
CAAACCTTCACATCCATCAAAGAGCTTTTCAAGACCGCCAACAGACTTAAGTCCTCTGCGAAG
AATCATGCCTTCTGTAAACACAGGAGACATGGAAATTTCAAGGACAGTATCCGTTTTCGAGCA
GTTTCATCATCACTCACTTCTGTTACGTATGATGACACCGCGGCTAAAGACATGGGCATGGGA
ATATTTTTTTGATAGGCCACCTGTAAACACAGAAAGCTTGCAGGAGCAATCATAAGTACAAGGT
TAATGCTGTTAGCAGAGGGAGACAACATGAAAGGGCACAATTTTCATATATCTGGAGATGATG
AGGACAGTAACGTTACCGCCAAGAATCAAGAGCATCCAACACAAGTCCCAATGTATCATTG
CCTCCGATAAAGAGCATTTTGCGACAAATTGATAAATTTCAACAGTGCTCCTTCTTACTTCAG
TAAATAA

[0159] EFB1启动子的DNA序列如以下SEQ ID NO:3所示:

GCAACACACGAGTATGTTGTACCTAAATCAATACCGACAGCTTTTGACATATTATCTGTTAT
TTACTTGAATTTTTGTTTCTTGTAATACTTGATTACTTTTTCTTTTGATGTGCTTATCTTACA
AATAGAGAAAAATAAAACAACCTTAAGTAAGAATTGGGAAACGAACTACAACCTCAATCCCTTC
TCGAAGATACATCAATCCACCCCTTATATAACCTTGAAGTCCTCGAAACGATCAGCTAATCT
AAATGGCCCCCTTCTTTTTGGGTTCCTTCTCTCCCTTTTGCCGCCGATGGAACGTTCTGGA
AAAAGAAGATAATTTAATTACTTTCTCAACTAAAATCTGGAGAAAAACGCAAATGACAGC
TTCTAAACGTTCCGTGTGCTTTCTTTCTAGAATGTTCTGGAAAGTTTACAACAATCCACAAG
AACGAAAATGCCGTTGACAATGATGAAACCATCATCCACACACCGCGCACACGTGCTTTATT
TCTTTTTCTGAATTTTTTTTTTCCGCCATTTTCAACCAAGGAAATTTTTTTTCTTAGGGCTC
AGAACCTGCAGGTGAAGAAGCGCTTTAGAAATCAAAGCACAACGTAACAATTTGTGACAAC
CGAGCCTTTGAAGAAAAAATTTTTACATTGTGCGCTCTAAATAAATAGTTTAAGGTTATCT
ACCCACTATATTTAGTTGGTTCTTTTTTTTTTCTTCTACTCTTTATCTTTTTTACCTCATGC
TTTCTACCTTTCAGCACTGAAGAGTCCAACCGAATATATACACACATA

[0161] 实例5

[0162] 使用过表达MIG3的酵母的醇生产

[0163] 如实例1所述,在含有5.6g液化物的小瓶测定中,测试过表达MIG3的酵母菌株 (FG-

MIG3) 及其相应的亲本菌株 (FG)。在32℃进行发酵55小时。通过HPLC分析发酵结束的样品。结果总结于表3中。

[0164] 表3. 来自小瓶测定的HPLC结果

菌株	甘油(g/L)	乙酸(g/L)	葡萄糖(g/L)	乙醇(g/L)	乙酸降低(%)
FG	13.89	1.29	0.86	145.35	-0-
FG-MIG3	13.71	0.98	1.39	145.58	约 24%

[0166] MIG3的过表达导致乙酸生产减少约24%，而对乙醇生产没有负面影响。这些结果证明，在用于乙醇生产的酵母发酵期间，MIG3的过表达有益于乙酸降低。

[0167] 实例6

[0168] 另外的用于增加MIG1和MIG2表达的启动子选择

[0169] 受过表达MIG3的细胞中乙酸显著降低的鼓舞，进行了另外的实验以确定使用比EFB1 (表2) 弱的启动子是否可以通过过表达MIG1和MIG2产生相似的乙酸降低。与实例2类似，使用过表达MIG1、MIG2或SUI3 (其编码真核起始因子2 (eIF-2) 的β亚基) 的FERMAX™ Gold酵母进行RNA-Seq分析。RNA-Seq分析结果总结于表4中。如上，将水平表示为每千碱基千万转录物的读数 (RPK10M)。数据证实，在FERMAX™ Gold菌株中，在发酵期间MIG1和MIG2以低水平表达。

[0170] 表4. 在发酵期间，FERMAX™ Gold中MIG1、MIG2和SUI3的RNA-Seq分析

时间	FG 菌株		
	MIG1	MIG2	SUI3
12 hr	473	359	3325
24 hr	468	618	2761
36 hr	242	238	4144
48 hr	294	282	3370

[0172] 与MIG1和MIG2的非常弱的表达相反，在整个发酵过程中，SUI3的表达水平比MIG1或MIG2高约5至20倍。因此，选择SUI3启动子来驱动MIG1和MIG2的过表达。

[0173] 实例7

[0174] MIG1和MIG2表达盒的制备

[0175] 对酿酒酵母的MIG1基因 (YGL035C) 和MIG2基因 (YGL209W) 进行密码子优化，然后合成以分别生成MIG1s (SEQ ID:4和5) 和MIG2s (SEQ ID:6和7)。将SUI3启动子 (YPL237W基因座; SEQ ID NO:8) 与MIG1或MIG2单独连接，再与GPD1终止子 (YDL022W基因座; SEQ ID NO:9) 连接，从而生成SUI3Pro::MIG1s::Gpd1Ter和SUI3pro::MIG2s::Gpd1Ter表达盒。将这两个表达盒分别在RPA190基因座 (YOR341W) 下游引入FERMAX™ Gold酵母中。在亲本菌株中的MIG1s和MIG2s表达盒的预期插入是通过PCR证实的。

[0176] 密码子优化的MIG1编码区 (MIG1s) 的DNA序列如以下SEQ ID NO:4所示：

- ATGCAATCTCCATACCCAATGACTCAAGTTTCCAACGTTGACGATGGTTCTTTGTTGAAGGA
ATCCAAGAGCAAATCCAAGGTTGCTGCCAAGTCTGAAGCTCCAAGACCTCACGCTTGTCCAA
TCTGTACAGAGCTTTTCACAGATTGGAACACCAAACCAGACACATGCGTATTCACACTGGT
GAAAAGCCACATGCTTGTGACTTTCCAGGTTGTGTCAAGAGATTTTCCAGAAGCGACGAATT
GACCAGACACAGGCGTATTCACACCAACTCTCACCCAAGAGGCAAGAGAGGCAGAAAGAAGA
AAGTCGTTGGTTCTCCAATCAACAGTGCTAGCTCCTCTGCTACCTCTATTCCAGACTTGAAT
ACTGCCAACTTTTCTCCTCCATTGCCACAGCAACACTTGTCTCCATTGATTCCAATCGCCAT
TGCTCCCAAGGAAAACCTCCAGTCGTTCTTCCACCAGAAAGGGTCGTAAGACCAAATTCGAGA
TTGGCGAATCTGGTGGCAACGATCCATACATGGTCTCCTCTCCAAGACTATGGCCAAGATT
CCAGTTTCTGTCAAGCCTCCACCCTCTTTGGCTCTAAACAATATGAACTACCAAACCTTCATC
TGCTTCCACTGCCTTATCTTCATTGTCCAACAGTCACCTCTGGTTCCAGATTGAAGCTGAACG
CTTTGTCTTCTTACAAATGATGACTCCAATTGCCAGCTCTGCTCCAAGAACCGTCTTCATC
[0177] GATGGTCCAGAACAAAAGCAGTTGCAACAACAGCAAAACTCCTTGTCTCCAAGATACTCCAA
CACCGTCATTCTACCAAGACCACGTTCTTGACCGACTTTCAAGGTTTGAACAATGCCAACC
CAAACAACAATGGTTCTTTGAGGGCTCAAACCTCAAAGTTCCGTTCAATTGAAGAGACCATCC
TCTGTCTTATCCTTGAACGACCTATTGGTTGGTCAAAGAAACACCAACGAATCCGATTCTGA
CTTTACCACTGGTGGCGAAGACGAGGAAGACGGTTTGAAGGATCCATCCAACCTCTAGCATCG
ACAACCTTGAACAAGACTACTTGCAAGAACAGTCCAGAAAGAAATCCAAGACTTCTACTCCA
ACCACTATGTTGTCCAGATCTACATCTGGTACCAACTTACACACTTTGGGCTACGTCATGAA
CCAGAACCACCTTGCACTTTTCTCTTCAAGTCCAGACTTTTCAAGGAATGAACAATAGAC
TATTGAACGTTCAACAACAGCAACAGGAACAACATACCTTGCTACAATCTCAAAACACTTCC
AACCAATCTCAAAATCAAAACCAGAATCAAATGATGGCTTCATCCAGTTCTTTGTCCACCAC
TCCATTGTTACTATCTCCAAGAGTCAACATGATCAACACTGCTATTTCTACCCAACAGACTC
CAATTTCTCAATCCGATTCTCAAGTTCAAGAGTTGGAAACCTTGCCACCTATCAGATCTTTA
CCATTGCCCTTTCCACACATGGACTAA
[0178] MIG1多肽的氨基酸序列如以下SEQ ID NO:5所示:
MQSPYPMTQVSNVDDGSLLEKESKSKVAAKSEAPRPHACPICHRAFHRLEHQTRHMR IHTG
EKPHACDFPGCVKRFSRDELTRHRR IHTNSHPRGKRGRKKKVVGSPINSASSATSIPDLN
TANFSPPLPQQHLSPLIPIAIAPKENS SRSSSTRKGRKTKFEIGESGGNDP YMVSSPKTMAKI
PVSVKPPPSLALNNMNYQTSSASTALSSLSNSHSGSRLKLNALSSLQMMTP IASSAPRTVFI
[0179] DGPEQKQLQQQNSLSPRYSNTVILPRPRSLTDFQGLNNANPNNNGSLRAQTQSSVQLKRPS
SVLSLNDLLVGQRNTNESDSDFTTGGEDEEDGLKDPSNSSIDNLEQDYLQEQSRKSKTSTP
TTMLSRSTSGTNLHTLGYVMNQNH LHFSSSSPDFQKELNNRLLNVQQQQEQHTLLQSQNTS
NQSQNQNQNQMMASSSSLSSTPLLLSPRVNMINTAISTQQTPI SQSDSQVQELETLPPIRSL
PLPFPHMD
[0180] 密码子优化的MIG2编码区 (MIG2s) 的DNA序列如以下SEQ ID NO:6所示:

- ATGCCAAAGAAGCAAACCAACTTTCCAGTTGACAACGAAAACAGACCATTTCAGATGTGATAC
CTGTCACAGAGGTTTTTCACAGATTGGAACACAAGAAACGTCACCTTGAGAACTCATACAGGTG
AAAAGCCACACCATTGTGCCTTTCCAGGTTGTGGCAAGAGCTTTTCCAGATCTGACGAATTG
AAGAGACATATGAGAACTCACACTGGTCAATCTCAAAGGCGTTTGAAAAAGGCTTCCGTTC
AAAGCAGGAGTTCTTGACCGTCTCTGGCATTCCAACCATTTGCTTCTGGTGTATGATCCACC
AACCAATTCCACAAGTCTTGCCAGCCAACATGGCTATCAACGTTCAAGCCGTCAATGGTGGC
AACATCATTACGCTCCCAACGCTGTTTCATCCAATGGTCATTCCAATCATGGCTCAACCAGC
TCCTATTACGCTTCTGCTGCCTCCTTTCAACCAGCTACCTCTCCTATGCCAATCTCTACAT
ACACTCCAGTTCCATCTCAATCCTTTACCTCTTTTCAATCCTCTATTGGTTCCATCCAATCC
[0181] AACAGTGATGTCTCTTCCATCTTCTCAAACATGAATGTCAGAGTCAACACTCCAAGATCTGT
TCCAAACTCACCCAACGACGGTTACTTACACCAACAGCACATTCCACAACAGTACCAACACC
AAACTGCTTCTCCATCTGTTGCCAAGCAACAGAAGACCTTTGCTCACTCCTTGGCTTCTGCC
TTGTCCACCTTACAAAAGAGAACTCCAGTCAGTGCTCCTTCTACCACTATCGAATCTCCATC
CTCTCCAAGTGACTCCAGTCACACTTCTGCTTCCAGCAGTGCTATCTCTTTGCCATTCTCCA
ATGCTCCATCTCAACTAGCTGTTGCCAAGGAGTTGGAATCCGTTTACTTGGATTCCAACAGA
TACACTACCAAGACTCGTAGAGAAAGAGCCAAGTTCGAAATTCCAGAAGAGCAAGAAGAAGA
CACCAACAATTCTTCCTCAGGTTCCAACGAAGAAGAGCACGAATCTCTAGATCACGAATCTT
CCAAGAGCAGAAAGAACTATCTGGTGTCAAGTTGCCACCTGTCAGAACTTATTGAAGCAA
ATCGACGTTTTCAACGGTCCAAAGAGAGTTTAA
- [0182] MIG2多肽的氨基酸序列如以下SEQ ID NO:7所示：
MPKKQTNFPVDNENRPFRCDTCHRGFHRLEHKKRHLRTHTGKPHHCAFPGCGKSFSRSE
KRHMRTHTGQSQRRLKKASVQKQEFLLTVSGIPTIASGVMIHQPI PQVLPANMAINVQAVNGG
NIIHAPNAVHMPVIPIMAQPAPIHASAASFQPATSPMPISTYTPVPSQSFTSFQSSIGSIQS
- [0183] NSDVSSIFSNMNRVNTPRSVPNPNDGYLHQHQPQQYQHQTASPSVAKQQKTFHAHSLASA
LSTLQKRTPVSAPSTTIESPSSPSDSSHTSASSSAISLPFSNAPSQLAVAKELESVYLDNR
YTTKTRRERAKFEIPEEQEEDTNNSSSGSNEEEHESLDHESSKSRKKLSGVKLPPVRNLLKQ
IDVFNGPKRV
- [0184] SUI3启动子的DNA序列如以下SEQ ID NO:8所示：

CTTTTGTTAATGAGGTGAACAAAACAGGCAACACGGCTTTACATTGGGCGTCGTTGAATGGC
 AAATTAGACGTGGTCAAGCTACTGTGTGATGAATATGAGGCAGACCCCTTTATTAGAAACAA
 ATTCGGCCACGATGCTATCTTTGAGGCCGAGAACAGCGGGAAGGAAGAAGTGGAAACATACT
 TTTTGAAGAAGTATGATGTCGAACCTGAAGATGATGAAGAAGACACACAACTGAGGGCAAG
 AATTCGGTCCAAATCACAAAGGGTACAGAAATTGAACAAGTCACCAAGGAAGCCACCGAGGC
 TTTAAGAGAAGAAACCGAGAACTGAATATAAATAAAGACTAAAGTAAAGAGCTTGTTTCT
 [0185] TCGTGGAATAAAAGCCGTAATATCCATTGAGCATGATATTTTATTTCTTGGTACCGGAGAAG
 ATAAAAGGATGGAACCAGCAGAAATGCATTAATAAATACAAAAAATTTAGAAAAGAGTTACA
 GTAATAATGTATATTTCTCTCACAACTAAGTAACCGCTTCAAAGCGTATATTTTGAATGC
 ATTGAACTTTCCATTTTCATTACCCGCAGAGCCGGAGTCCTCATCAACGACGGAGTGAAAAAT
 TTTGTAATTGCGAGAAAAAGTGAAATTGATGGAAAAAAGAAAAAGAAAGTAGAAGAAGACA
 TTATAAGAGAGACTAGGAACTTCTTGACATCAACCGAAAAGCGCTAGGCAACCAGTCAT
 ATAATAAGCACGCACGAG

[0186] GPD1终止子区的DNA序列如以下SEQ ID NO:9所示:

ATTTATTGGAGAAAGATAACATATCATACTTTCCCCACTTTTTTCGAGGCTCTTCTATATC
 ATATTCATAAATTAGCATTATGTCATTTCTCATACTACTTTATCACGTTAGAAATTACTTA
 TTATTATTAAATTAATACAAAATTTAGTAACCAAATAAATATAAATAAATATGTATATTTGA
 ATTTTAAAAAAAATCCTATAGAGCAAAAGGATTTTCCATTATAATATTAGCTGTACACCT
 CTTCCGCATTTTTTTGAGGGTGGTTACAACCACTCATTTCAGAGGCTGTGCGCACAGTTGCT
 TCTAGCATCTGGCGTCCGTATGTATGGGTGTATTTTAAATAA

[0187] 实例8

[0188] MIG1或MIG2过表达酵母的乙醇和乙酸生产

[0189] 如实例1所述,在Ankom测定中测试如下菌株:PCR证实的、在SUI1启动子的控制下过表达MIG1或MIG2的菌株中的每一个菌种,以及FG亲本菌株。在32℃进行发酵55小时。通过HPLC分析,分析了发酵结束的样品。结果总结于表5中。

[0190] 表5.FG和具有SUI3启动子的过表达MIG1或MIG2的FG的HPLC结果

菌株	葡萄糖 (g/L)	甘油(g/L)	乙酸 (g/L)	乙醇 (g/L)	乙酸降低	甘油降低
[0191] FG-MIG1	1.56	14.15	1.02	141.25	15%	3.8%
FG-MIG2	3.92	13.83	0.76	141.25	36.4%	6.0%
FG 亲本	1.56	14.72	1.20	141.30		

[0192] 结果证明,在具有SUI3启动子的情况下,MIG1或MIG2的过表达分别导致乙酸降低约15%或36%,以及甘油降低约3.8%或6%;对乙醇产率没有负面影响。

序列表

- <110> 美国丹尼斯科公司(Danisco US Inc.)
 <120> 通过过表达MIG多肽的酵母来降低乙酸生产
 <130> NB41746
 <140> US 62/940510
 <141> 2019-11-26
 <160> 9
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)
 <400> 1

```

Met Asn Tyr Leu Arg Asp Arg Phe Pro Pro Asp Asn Asp Gln Arg Pro
1          5          10          15
Phe Arg Cys Glu Ile Cys Ser Arg Gly Phe His Arg Leu Glu His Lys
          20          25          30
Lys Arg His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro His Lys Cys Thr
          35          40          45
Val Gln Gly Cys Pro Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Lys Arg
          50          55          60
His Leu Arg Thr His Thr Lys Gly Val Gln Arg Arg Arg Ile Lys Ser
65          70          75          80
Lys Gly Ser Arg Lys Thr Val Val Asn Thr Ala Thr Ala Ala Pro Thr
          85          90          95
Thr Phe Asn Glu Asn Thr Gly Val Ser Leu Thr Gly Ile Gly Gln Ser
          100          105          110
Lys Val Pro Pro Ile Leu Ile Ser Val Ala Gln Asn Cys Asp Asp Val
          115          120          125
Asn Ile Arg Asn Thr Gly Asn Asn Asn Gly Ile Val Glu Thr Gln Ala
          130          135          140
Pro Ala Ile Leu Val Pro Val Ile Asn Ile Pro Asn Asp Pro His Pro
145          150          155          160
Ile Pro Ser Ser Leu Ser Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Ala Ser Val
          165          170          175
Tyr Pro Ser Thr Ser Pro Phe Gln Tyr Leu Lys Ser Gly Phe Pro Glu
          180          185          190
Asp Pro Ala Ser Thr Pro Tyr Val His Ser Ser Gly Ser Ser Leu Ala

```

195	200	205
Leu Gly Glu Leu Ser Ser Asn Ser Ser Ile Phe Ser Lys Ser Arg Arg		
210	215	220
Asn Leu Ala Ala Met Ser Gly Pro Asp Ser Leu Ser Ser Ser Lys Asn		
225	230	235
Gln Ser Ser Ala Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ser His Pro Ser Lys Ser		
245	250	255
Phe Ser Arg Pro Pro Thr Asp Leu Ser Pro Leu Arg Arg Ile Met Pro		
260	265	270
Ser Val Asn Thr Gly Asp Met Glu Ile Ser Arg Thr Val Ser Val Ser		
275	280	285
Ser Ser Ser Ser Ser Leu Thr Ser Val Thr Tyr Asp Asp Thr Ala Ala		
290	295	300
Lys Asp Met Gly Met Gly Ile Phe Phe Asp Arg Pro Pro Val Thr Gln		
305	310	315
Lys Ala Cys Arg Ser Asn His Lys Tyr Lys Val Asn Ala Val Ser Arg		
325	330	335
Gly Arg Gln His Glu Arg Ala Gln Phe His Ile Ser Gly Asp Asp Glu		
340	345	350
Asp Ser Asn Val His Arg Gln Glu Ser Arg Ala Ser Asn Thr Ser Pro		
355	360	365
Asn Val Ser Leu Pro Pro Ile Lys Ser Ile Leu Arg Gln Ile Asp Asn		
370	375	380
Phe Asn Ser Ala Pro Ser Tyr Phe Ser Lys		
385	390	

<210> 2

<211> 1185

<212> DNA

<213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)

<400> 2

atgaattacc tgcgagatag atttctccg gataatgacc aaagaccctt tagatgtgaa	60
atttggtcac gaggtttcca cagacttgaa cataaaaaaa ggcacgtaag aacgcacact	120
ggcgagaagc ctcacaaatg tacggttcag ggctgtccga aaagcttcag ccgaagcgat	180
gaactaaaaa gacatttgag gacacatact aaaggcgtcc aaaggcgcag aataaaatcc	240
aagggctcgc gaaaaaccgt tgtgaatact gctaccgccg cccctaccac cttcaatgaa	300
aacactgggtg tttcgctcac ggggataggt caatctaaag tgccacctat tcttatctcc	360
gttgctcaga attgcatga cgtgaatata cgaaatactg gaaataataa tggcattgtg	420
gagacacagg cacctgcaat tttagtgcct gtgataaata ttccaaatga ccctcatccg	480
attccaagta gcctctccac tacttctatc acctccattg catcagtata tcctctact	540

tctccattcc agtacctgaa aagcgggttt cctgaagatc ctgcatctac accgtatgta	600
cattcgtccg gaagtctttt agccctgggt gaattgtctt caaactcctc tatattttcg	660
aaatctagga ggaatttggc cgccatgagt ggtcctgatt ctttgagtag ttctaaaaac	720
caatccagtg cttcgtctct ttctcaaact tcacatccat caaagagctt ttcaagaccg	780
ccaacagact taagtcctct gcgaagaatc atgccttctg taaacacagg agacatggaa	840
atttcaagga cagtatccgt ttcgagcagt tcatcatcac tcacttctgt tacgtatgat	900
gacaccgcgg ctaaagacat gggcatggga atatTTTTTg ataggccacc tgtaacacag	960
aaagcttgca ggagcaatca taagtacaag gttaatgctg ttagcagagg gagacaacat	1020
gaaagggcac aatttcatat atctggagat gatgaggaca gtaacgttca ccgccaagaa	1080
tcaagagcat ccaacacaag tcccaatgta tcattgcctc cgataaagag cattttgcga	1140
caaattgata atttcaacag tgctccttct tacttcagta aataa	1185

<210> 3

<211> 792

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成DNA

<400> 3

gcaacacacg agtatgttgt acctaaatca ataccgacag cttttgacat attatctgtt	60
atttacttga atttttgttt cttgtaatac ttgattactt ttcttttgat gtgcttatct	120
tacaaataga gaaaataaaa caacttaagt aagaattggg aaacgaaact acaactcaat	180
cccttctcga agatacatca atccaccctt tatataacct tgaagtcctc gaaacgatca	240
gctaatactaa atggccccc ttctttttgg gttctttctc tcccttttgc cgccgatgga	300
acgttctgga aaaagaagaa taatttaatt actttctcaa ctaaaatctg gagaaaaaac	360
gcaaatgaca gcttctaaac gttccgtgtg ctttctttct agaatgttct ggaaagttaa	420
caacaatcca caagaacgaa aatgccgttg acaatgatga aaccatcatc cacacaccgc	480
gcacacgtgc tttatttctt tttctgaatt ttttttttcc gccattttca accaaggaaa	540
ttttttttct tagggctcag aacctgcagg tgaagaagcg ctttagaaat caaagcacia	600
cgtaacaatt tgtcgacaac cgagcctttg aagaaaaaat ttttcacatt gtcgcctcta	660
aataaatagt ttaaggttat ctaccacta tatttagttg gttctttttt ttttccttct	720
actctttatc tttttacctc atgctttcta ctttcagca ctgaagagtc caaccgaata	780
tatacacaca ta	792

<210> 4

<211> 1515

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成DNA

<400> 4

```

atgcaatctc catacccaat gactcaagtt tccaacggtg acgatggttc tttggtgaag      60
gaatccaaga gcaaattcaa ggttgctgcc aagtctgaag ctccaagacc tcacgcttgt      120
ccaatctgtc acagagcttt tcacagattg gaacaccaaa ccagacacat gcgtattcac      180
actggtgaaa agccacatgc ttgtgacttt ccagggtgtg tcaagagatt ttccagaagc      240
gacgaattga ccagacacag gcgtattcac accaactctc acccaagagg caagagaggc      300
agaaagaaga aagtcggttg ttctccaatc aacagtgcta gtcctctgc tacctctatt      360
ccgacttga atactgcaa cttttctcct ccattgccac agcaacactt gtctccattg      420
attccaatcg ccattgctcc caaggaaaac tccagtcgtt cttccaccag aaagggtcgt      480
aagaccaaat tcgagattgg cgaatctggt ggcaacgac catacatggt ctctctcca      540
aagactatgg ccaagattcc agtttctgtc aagcctccac cctctttggc tctaaacaat      600
atgaactacc aaacttcac tgettccact gccttatctt cattgtccaa cagtactct      660
ggttccagat tgaagctgaa cgtttgtct tcttataaa tgatgactcc aattgccagc      720
tctgtccaa gaaccgtctt catcgatggt ccagaacaaa agcagttgca acaacagcaa      780
aactccttgt ctccaagata ctccaacacc gtcattctac caagaccacg ttcttgacc      840
gactttcaag gtttgaacaa tgccaacca aacaacaatg gttctttgag ggctcaaact      900
caaagttccg ttcaattgaa gagaccatcc tctgtcttat cttgaacga cctattggtt      960
ggtcaaagaa acaccaacga atccgattct gactttacca ctggtggcga agacgaggaa     1020
gacggtttga aggatccatc caactctagc atcgacaact tggaacaaga ctacttgcaa     1080
gaacagtcca gaaagaaatc caagacttct actccaacca ctatgttgtc cagatctaca     1140
tctggtacca acttacacac tttgggtac gtcatgaacc agaaccactt gcacttttcc     1200
tcttcaagtc cagactttca gaaggaattg aacaatagac tattgaacgt tcaacaacag     1260
caacaggaac aacatacctt gctacaatct caaaacactt ccaaccaatc tcaaaatcaa     1320
aaccagaatc aaatgatggc ttcattcagt tctttgtcca cactccatt gttactatct     1380
ccaagagtca acatgatcaa cactgctatt tctaccaac agactccaat ttctcaatcc     1440
gattctcaag ttcaagagtt ggaaaccttg ccacctatca gatctttacc attgcccttt     1500
ccacacatgg actaa

```

<210> 5

<211> 504

<212> PRT

<213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)

<400> 5

Met Gln Ser Pro Tyr Pro Met Thr Gln Val Ser Asn Val Asp Asp Gly

1 5 10 15

Ser Leu Leu Lys Glu Ser Lys Ser Lys Ser Lys Val Ala Ala Lys Ser

20 25 30

Glu Ala Pro Arg Pro His Ala Cys Pro Ile Cys His Arg Ala Phe His

35 40 45

Arg Leu Glu His Gln Thr Arg His Met Arg Ile His Thr Gly Glu Lys

50 55 60

Pro	His	Ala	Cys	Asp	Phe	Pro	Gly	Cys	Val	Lys	Arg	Phe	Ser	Arg	Ser
65					70					75					80
Asp	Glu	Leu	Thr	Arg	His	Arg	Arg	Ile	His	Thr	Asn	Ser	His	Pro	Arg
				85						90					95
Gly	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Pro	Ile	Asn	Ser
			100					105					110		
Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Ser	Ile	Pro	Asp	Leu	Asn	Thr	Ala	Asn	Phe
			115					120					125		
Ser	Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Gln	His	Leu	Ser	Pro	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala
			130				135					140			
Ile	Ala	Pro	Lys	Glu	Asn	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Lys	Gly	Arg
145					150					155					160
Lys	Thr	Lys	Phe	Glu	Ile	Gly	Glu	Ser	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Tyr	Met
				165						170					175
Val	Ser	Ser	Pro	Lys	Thr	Met	Ala	Lys	Ile	Pro	Val	Ser	Val	Lys	Pro
			180						185					190	
Pro	Pro	Ser	Leu	Ala	Leu	Asn	Asn	Met	Asn	Tyr	Gln	Thr	Ser	Ser	Ala
			195					200						205	
Ser	Thr	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Asn	Ser	His	Ser	Gly	Ser	Arg	Leu
			210					215						220	
Lys	Leu	Asn	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Met	Met	Thr	Pro	Ile	Ala	Ser
225							230				235				240
Ser	Ala	Pro	Arg	Thr	Val	Phe	Ile	Asp	Gly	Pro	Glu	Gln	Lys	Gln	Leu
				245						250					255
Gln	Gln	Gln	Gln	Asn	Ser	Leu	Ser	Pro	Arg	Tyr	Ser	Asn	Thr	Val	Ile
				260					265					270	
Leu	Pro	Arg	Pro	Arg	Ser	Leu	Thr	Asp	Phe	Gln	Gly	Leu	Asn	Asn	Ala
			275					280					285		
Asn	Pro	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Gln	Thr	Gln	Ser	Ser	Val
			290				295					300			
Gln	Leu	Lys	Arg	Pro	Ser	Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val
305					310					315					320
Gly	Gln	Arg	Asn	Thr	Asn	Glu	Ser	Asp	Ser	Asp	Phe	Thr	Thr	Gly	Gly
				325						330					335
Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Gly	Leu	Lys	Asp	Pro	Ser	Asn	Ser	Ser	Ile	Asp
				340					345					350	
Asn	Leu	Glu	Gln	Asp	Tyr	Leu	Gln	Glu	Gln	Ser	Arg	Lys	Lys	Ser	Lys
				355				360						365	
Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Met	Leu	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Gly	Thr	Asn

370	375	380
Leu His Thr Leu Gly Tyr Val Met Asn Gln Asn His Leu His Phe Ser		
385	390	395
Ser Ser Ser Pro Asp Phe Gln Lys Glu Leu Asn Asn Arg Leu Leu Asn		400
	405	410
Val Gln Gln Gln Gln Gln Glu Gln His Thr Leu Leu Gln Ser Gln Asn		415
	420	425
Thr Ser Asn Gln Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Gln Met Met Ala Ser		430
	435	440
Ser Ser Ser Leu Ser Thr Thr Pro Leu Leu Leu Ser Pro Arg Val Asn		445
	450	455
Met Ile Asn Thr Ala Ile Ser Thr Gln Gln Thr Pro Ile Ser Gln Ser		460
465	470	475
Asp Ser Gln Val Gln Glu Leu Glu Thr Leu Pro Pro Ile Arg Ser Leu		480
	485	490
Pro Leu Pro Phe Pro His Met Asp		495
	500	

<210> 6

<211> 1149

<212> DNA

<213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

<400> 6

atgccaaaga agcaaaccac ctttccagtt gacaacgaaa acagaccatt cagatgtgat	60
acctgtcaca gaggttttca cagattggaa cacaagaaac gtcacttgag aactcatata	120
ggtgaaaagc cacaccattg tgcctttcca ggttgtggca agagcttttc cagatctgac	180
gaattgaaga gacatatgag aactcacact ggtcaatctc aaaggcggtt gaaaaaggct	240
tccgttcaaa agcaggagtt cttgaccgtc tctggcattc caaccattgc ttctggtgtt	300
atgatccacc aaccaattcc acaagtcttg ccagccaaca tggctatcaa cgttcaagcc	360
gtcaatgggtg gcaacatcat tcacgtccc aacgtgttc atccaatgggt cattccaatc	420
atggctcaac cagctcctat tcacgtttct gctgctcct ttcaaccagc tacctctcct	480
atgccaatct ctacatacac tccagttcca tctcaatcct ttacctctt tcaatcctct	540
attggttcca tccaatccaa cagtgatgtc ttttccatct tctcaaacaat gaatgtcaga	600
gtcaaacactc caagatctgt tccaaactca cccaacgacg gttacttaca ccaacagcac	660
attccacaac agtaccaaca ccaaactgtc tctccatctg ttgccaagca acagaagacc	720
tttgetcact ccttggttc tgccttgctc accttataaa agagaactcc agtcagtgt	780
ccttctacca ctatcgaatc tccatcctct ccaagtgtc ccagtcacac ttctgcttcc	840
agcagtgtta tctctttgcc attctccaat gctccatctc aactagctgt tgccaaggag	900
ttggaatccg ttacttggga ttccaacaga tacactacca agactcgtag agaaagagcc	960
aagttcgaaa ttccagaaga gcaagaagaa gacaccaaca attcttctc aggttccaac	1020

gaagaagagc acgaatctct agatcacgaa tcttccaaga gcagaaagaa actatctggt	1080
gtcaagttgc cacctgtcag aaacttattg aagcaaatcg acgttttcaa cggtcctaaag	1140
agagtttaa	1149
<210> 7	
<211> 382	
<212> PRT	
<213> 酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
<400> 7	
Met Pro Lys Lys Gln Thr Asn Phe Pro Val Asp Asn Glu Asn Arg Pro	
1 5 10 15	
Phe Arg Cys Asp Thr Cys His Arg Gly Phe His Arg Leu Glu His Lys	
20 25 30	
Lys Arg His Leu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro His His Cys Ala	
35 40 45	
Phe Pro Gly Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Lys Arg	
50 55 60	
His Met Arg Thr His Thr Gly Gln Ser Gln Arg Arg Leu Lys Lys Ala	
65 70 75 80	
Ser Val Gln Lys Gln Glu Phe Leu Thr Val Ser Gly Ile Pro Thr Ile	
85 90 95	
Ala Ser Gly Val Met Ile His Gln Pro Ile Pro Gln Val Leu Pro Ala	
100 105 110	
Asn Met Ala Ile Asn Val Gln Ala Val Asn Gly Gly Asn Ile Ile His	
115 120 125	
Ala Pro Asn Ala Val His Pro Met Val Ile Pro Ile Met Ala Gln Pro	
130 135 140	
Ala Pro Ile His Ala Ser Ala Ala Ser Phe Gln Pro Ala Thr Ser Pro	
145 150 155 160	
Met Pro Ile Ser Thr Tyr Thr Pro Val Pro Ser Gln Ser Phe Thr Ser	
165 170 175	
Phe Gln Ser Ser Ile Gly Ser Ile Gln Ser Asn Ser Asp Val Ser Ser	
180 185 190	
Ile Phe Ser Asn Met Asn Val Arg Val Asn Thr Pro Arg Ser Val Pro	
195 200 205	
Asn Ser Pro Asn Asp Gly Tyr Leu His Gln Gln His Ile Pro Gln Gln	
210 215 220	
Tyr Gln His Gln Thr Ala Ser Pro Ser Val Ala Lys Gln Gln Lys Thr	
225 230 235 240	
Phe Ala His Ser Leu Ala Ser Ala Leu Ser Thr Leu Gln Lys Arg Thr	

	245	250	255
Pro Val Ser Ala	Pro Ser Thr Thr Ile Glu Ser	Pro Ser Ser Pro Ser	
260	265	270	
Asp Ser Ser His Thr Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ile Ser Leu Pro Phe			
275	280	285	
Ser Asn Ala Pro Ser Gln Leu Ala Val Ala Lys Glu Leu Glu Ser Val			
290	295	300	
Tyr Leu Asp Ser Asn Arg Tyr Thr Thr Lys Thr Arg Arg Glu Arg Ala			
305	310	315	320
Lys Phe Glu Ile Pro Glu Glu Gln Glu Glu Asp Thr Asn Asn Ser Ser			
325	330	335	
Ser Gly Ser Asn Glu Glu Glu His Glu Ser Leu Asp His Glu Ser Ser			
340	345	350	
Lys Ser Arg Lys Lys Leu Ser Gly Val Lys Leu Pro Pro Val Arg Asn			
355	360	365	
Leu Leu Lys Gln Ile Asp Val Phe Asn Gly Pro Lys Arg Val			
370	375	380	
<210> 8			
<211> 762			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列			
<400> 8			
cttttgttaa tgaggatgaac aaaacaggca acacggcttt acattgggcg tcgttgaatg			60
gcaaattaga cgtggatcaag ctactgtgtg atgaatatga ggcagacccc tttattagaa			120
acaaattcgg ccacgatgct atctttgagg ccgagaacag cggaaggaa gaagtggaaa			180
catacttttt gaagaagtat gatgtcgaac ctgaagatga tgaagaagac acacaaactg			240
agggcaagaa ttcgggtccaa atcacaaagg gtacagaaat tgaacaagtc accaaggaag			300
ccaccgaggc tttaagagaa gaaaccgaga aactgaatat aaataaagac taaagtaaag			360
agcttgtttt cttcgtggaa taaaagccgt aatatccatt gagcatgata ttttatttct			420
tggtaccgga gaagataaaa ggatggaacc agcagaaatg cattaataaa tacaataaat			480
ttagaaaaga gttacagtaa taatgtatat ttctctcaca aactaagtaa ccgcttcaaa			540
agcgtatat ttgaatgcat tgaactttcc atttcattac ccgcagagcc ggagtcctca			600
tcaacgacgg agtgaaaaat tttgtaattg cgagaaaaag tgaaattgat ggaaaaaag			660
aaaaagaaa tagaagaaga cattataaga gagactagga aacttcttgc acatcaaccg			720
aaaagcgcct aggcaaccag tcatataata agcagcacg ag			762
<210> 9			
<211> 352			

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成DNA

<400> 9

atttattgga gaaagataac atatcatact ttccccact tttttcgagg ctctttctata	60
tcatattcat aaattagcat tatgtcattt ctcataacta ctttatcacg ttagaaatta	120
cttattatta ttaaattaat acaaaattta gtaaccaa ataatataaat aaatatgtat	180
atttgaattt taiaaaaaaaaa atcctataga gcaaaaggat tttccattat aatattagct	240
gtacacctct tccgcatttt ttgagggtgg ttacaacacc actcattcag aggctgtcgg	300
cacagttgct tctagcatct ggcgtccgta tgtatgggtg tatttttaaat aa	352