

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/21

C12N 15/53 C12N 15/77

C12P 13/08 C12P 13/02

//(C12N1/21, C12R

1: 15)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00121279.6

[43]公开日 2001 年 2 月 21 日

[11]公开号 CN 1284560A

[22]申请日 2000.8.14 [21]申请号 00121279.6
[30]优先权
[32]1999.8.13 [33]US [31]09/373,731
[71]申请人 德古萨-于尔斯股份公司
地址 联邦德国美因河畔法兰克福
共同申请人 国立科学研究中心
[72]发明人 缪瑞尔·默尔卡姆 阿梅尔·居永瓦尔彻
阿希姆·马克思

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

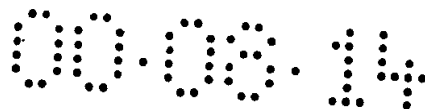
权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 代谢产物的发酵制备方法及编码 sod 基因的核苷酸序列

[57]摘要

本发明提供了编码 sod 基因的核苷酸序列,和用棒状菌经发酵制备核苷酸,维生素和 L-氨基酸,尤其 L-赖氨酸的方法,其中 sod 基因是扩增的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 来自棒状菌的优选地是重组的 DNA，其能在棒状微生物中复制，并至少含有编码 sod 基因的以 SEQ ID NO: 1 代表的核苷酸序列。
2. 权利要求 1 的能复制的 DNA，其包括
 - (i) SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列，或
 - (ii) 至少一个在遗传密码简并区内相应于 (i) 序列的序列；
 - (iii) 至少一个与互补于序列 (i) 或 (ii) 的序列杂交的序列，和任选地
 - (iv) (i) 中的有功能中性有义突变。
3. 衍生自权利要求 1 或 2 中的核苷酸序列的蛋白质的氨基酸序列，以 SEQ ID NO: 2 代表。
4. 通过导入一或多个如权利要求 1 或 2 的可复制的 DNA 而转化的棒状微生物，尤其棒杆菌属。
5. 穿梭载体 pMM23，特征在于图 1 所提供的限制图谱，并保藏于 E. coli 中，保藏号 DSM 12860。
6. 一种提高棒状菌中超氧化物歧化酶活性的方法，其中 sod 基因，或编码其的核苷酸序列是扩增的，尤其是过表达的。
7. 一种通过棒状菌发酵制备代谢产物，尤其 L-赖氨酸的方法，其中所用细菌中 sod 基因或编码其的核苷酸序列是扩增的，尤其是过表达的。
8. 权利要求 7 的方法，其中所用细菌中，所需代谢产物的生物合成途径中其它基因是扩增的。
9. 权利要求 7 的方法，其中所用细菌中，降低所需代谢产物产生的代谢途径至少部分被关闭。
10. 权利要求 7~9 的方法，其中使用已用质粒载体转化的菌株，且此质粒载体携带编码 sod 基因的核苷酸序列。

11. 权利要求 9 的方法，其中使用的是用保藏于 E. coli 中保藏号 DSM 12860 的质粒载体 pMM23 转化的细菌。

12. 前述一或多项权利要求的方法，其中使用产生核苷酸，维生素和氨基酸的棒状菌。

13. 前述一或多项权利要求的方法，其中使用的棒状菌产生 L-赖氨酸。

14. 如权利要求 8 产生核苷酸的方法，其中编码谷氨酰胺-PRPP-酰胺转移酶的 *purF* 基因是同时过表达的。

15. 如权利要求 8 制备核苷酸的方法，其中编码氨甲酰合成酶的 *carAB* 基因是同时过表达的。

16. 如权利要求 8 制备 D-泛酸的方法，其中编码天冬氨酸脱羧酶的 *panD* 基因是同时过表达的。

17. 如权利要求 8 制备 L-赖氨酸的方法，其中编码二氢吡啶二羧酸合酶的 *dapA* 基因是同时过表达的。

18. 如权利要求 8 制备 L-赖氨酸的方法，其中促进 S-（2-氨乙基）半胱氨酸抗性的 DNA 片段是同时扩增的。

19. 前述一或多项权利要求的经发酵制备所需代谢产物的方法，其中进行以下步骤：

（a）发酵产生所需代谢产物的棒状菌，其中至少 *sod* 基因是扩增的，

（b）富集培养基或细菌细胞中的所需代谢产物，并

（c）分离所需产物。

20. 权利要求 19 的经发酵制备 L-氨基酸的方法，其中进行以下步骤：

（a）发酵产生所需代谢产物的棒状菌，其中至少 *sod* 基因是扩增的，

（b）富集培养基或细菌细胞中的所需代谢产物，并

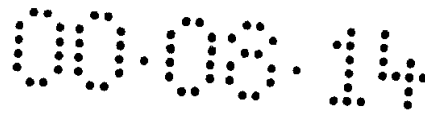
(c) 分离所需产物。

21. 权利要求 19 的经发酵制备 D-泛酸的方法，其中进行以下步骤：

- (a) 发酵产生 D-泛酸的棒状菌，其中至少 sod 基因是扩增的，
- (b) 富集培养基或细菌细胞中的 D-泛酸，并
- (c) 分离 D-泛酸。

22. 权利要求 19, 20 或 21 的方法，任选地存在含氧化合物。

23. 权利要求 22 的方法，其中含氧化合物是过氧化氢。



说明书

代谢产物的发酵制备方法及编码 sod 基因的核苷酸序列

本发明提供了编码 sod 基因的核苷酸序列，及用棒状菌发酵制备核苷酸，维生素和 L-氨基酸，尤其 L-赖氨酸的方法，其中棒状菌中 sod 基因是扩增的。

核苷酸，维生素和 L-氨基酸尤其 L-赖氨酸，被用于粮食工业，动物饲料，人的内服药及制药工业。

已知这些物质可通过棒状菌菌株，尤其谷氨酸棒状菌发酵制备。由于这些物质的极其重要性，对制备方法的改良进行了持续努力。方法的改良可涉及发酵工程因素如搅拌和供氧，或营养培养基的组分，如发酵期间糖浓度，或目的在于获得产物本身的加工方法，例如通过离子交换层析，或微生物自身的固有机能。

为改良微生物的机能，可使用诱变，选择及突变选择等方法。以此方法可获得对抗代谢物有抗性 or 显著调节中间体的营养缺陷菌株，并产生核苷酸，维生素及氨基酸。

一段时间以来，重组 DNA 工程的方法也用于谷氨酸棒状菌生产 L-氨基酸的菌株的改良，其通过扩增各个氨基酸生物合成基因，并研究对 L-氨基酸生产的影响。

US-A5,179,010 阐述了如抗甲基紫精或苯甲酰过氧化物的棒状菌菌株，其具有提高的超氧化物歧化酶活性，并具有改良的赖氨酸产量。这些菌株用诱变剂 N-甲基-N-硝基-亚硝基胍通过非定向诱变产生。所述菌株中超氧化物歧化酶的浓度增加至多 56%。

US-A4,529,697 阐述了生产谷氨酸的棒状菌突变体。此所述菌株中超氧化物歧化酶的浓度增加至多 105%。

本发明的目的在于提供处理棒状菌中超氧化物歧化酶的改良新步骤。这些步骤可用在核苷酸，维生素和 L-氨基酸，尤其 L-赖

氨酸的发酵制备期间。

核苷酸，维生素和 L-氨基酸，尤其 L-赖氨酸，被用于粮食工业，动物饲料，人的内服药及制药工业。现有技术已知生产赖氨酸的棒状菌菌株，其中超氧化物歧化酶的浓度由 27%提高至 56%，且释出扩增的赖氨酸，这些菌株通过非定向诱变获得。

当后文中提及 L-赖氨酸或赖氨酸时，不仅指碱，也指盐，如赖氨酸单盐酸盐或赖氨酸硫酸盐。

本发明提供了棒状菌来源的优选为重组的 DNA，其在棒状微生物中可以复制，并至少含有以 SEQ ID NO: 1 表示的编码 sod 基因的核苷酸序列。

本发明还提供了根据权利要求 1 的可复制的 DNA，其包括：

- (i) SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列，或
- (ii) 相当于在遗传密码简并区范围内的 (i) 序列的至少一个序列；
- (iii) 与互补于 (i) 或 (ii) 序列的序列杂交的至少一个序列，及任选地
- (vi) (i) 中有功能的中性有义突变。

本发明还提供了通过导入上述可复制的 DNA 转化的棒状微生物，尤其棒状菌菌株。

本发明另外还提供了经发酵制备核苷酸，维生素和 L-氨基酸，尤其 L-赖氨酸的方法，其使用尤其已生产相关产物的棒状菌，且其中编码 sod 基因的核苷酸序列是扩增的，尤其是过表达的。

文中“扩增”是指微生物中由相应 DNA 编码的一或多种酶的胞内活性的提高，例如通过提高基因的拷贝数，用强启动子或编码高活性相应酶的基因，及任选地组合这些步骤。

本发明的微生物可从葡萄糖，蔗糖，乳糖，果糖，麦芽糖，糖蜜，淀粉，纤维素，或从甘油和乙醇中生产核苷酸，维生素和 L-

氨基酸。它们可以是棒状菌家族，尤其棒杆菌属成员。在棒状菌属尤其谷氨酸棒状菌的情况中，应提及的是对其生产 L-氨基酸的能力，本领域技术人员已熟知。

适当的棒杆菌属，尤其谷氨酸棒状菌菌株，例如是已知的野生型菌株：

谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032

醋谷棒杆菌 ATCC 15806

嗜乙酰乙酸棒杆菌 ATCC 13870

产氨棒杆菌 ATCC 6871

嗜热产氨棒杆菌 FERM BP-1539

黄色短杆菌 ATCC 14067

乳发酵短杆菌 ATCC 13869 和

扩展短杆菌 ATCC 14020

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

产氨短杆菌 IF012072

和从中制备的能生产核苷酸，维生素和 L-氨基酸的突变体或菌株如：

生产 5' - 肌苷酸的菌株：

产氨棒杆菌 ATCC15190

产氨棒杆菌 ATCC15454

谷氨酸棒杆菌 ATCC14998

或如生产 5' - 鸟苷酸的菌株：

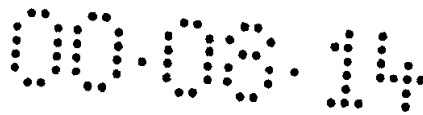
谷氨酸棒杆菌 ATCC 21171 或

产氨棒杆菌 ATCC 19216

或如 L-赖氨酸生产菌株：

谷氨酸棒杆菌 FERM-P 1709

黄色短杆菌 FERM-P 1708



乳发酵短杆菌 FERM—P 1712

谷氨酸棒杆菌 FERM—P 6463 和

谷氨酸棒杆菌 FERM—P 6464

谷氨酸棒杆菌 DSM 5714

本发明人能从 *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 中分离新的 *sod* 基因。

在此，超氧化物歧化酶蛋白用层析法首先纯化为均一性，纯化和制备蛋白质的方法及指导，如见于 Schleifer 和 Wensink 所著教材：分子生物学实用方法（Springer Verlag Berlin, 德国，1981），Harris 和 Angal 所著手册：蛋白质纯化法：实用方案（IRL Press, Oxford, UK, 1989），Scopes 所著教材：蛋白质纯化：原理与实践，第 3 版（Springer Verlag, 纽约，美国，1993），及一般熟知的教材及手册中的充分阐述。然后，纯化的酶蛋白通过用适当的酶如胰蛋白酶或糜蛋白酶处理，能被降解为肽。这些肽中的氨基酸序列可通过 Edman 所述的 N—末端测序方法确定（Archives of Biochemistry 22, 475, (1949)）。蛋白质测序方法及指导如见于 Smith：蛋白质测序法：分子生物学方法，第 64 卷和第 112 卷（Humana Press, Totowa, NJ, 美国，1996），和 Kamp 等：蛋白质结构分析：制备，鉴定及微量测序（Springer Verlag, 纽约，NY，美国，1997）中所述。根据复杂度，以此方式可部分或全部确定超氧化物歧化酶蛋白质中氨基酸序列。

通过利用棒状菌密码子的已知用途（Malumbres 等，Gene 134, 15-24 (1993)），合成的寡核苷酸可被合成，并用作通过 PCR 扩增相应染色体 DNA 区段的引物。本领域技术人员可发现此方面的指导，参见如 Gait 所著：寡核苷酸合成实用方法（IRL Press, Oxford, UK, 1984），和 Newton 和 Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 德国, 1994) 所述。然后将以此方式获得的 *sod* 基因的 DNA 片段用已知方法克隆，如 Sambrook 等在分子克隆实验手册，第 2 版，



(Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989) 中所述方法, 并可用作测试基因库中包括 5' 和 3' 侧翼的完整基因的探针。

基因库的构建见于通常熟知的教材及手册中所述。例如以下所述的: Winnacker 所著教材: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, 德国, 1990), 或由 Sambrook 等所著手册: *分子克隆实验手册* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。非常熟知的基因库是由 Kohara 等 (*Cell* 50,495-508 (1987)) 在 λ 载体中构建的 *E. coli* K-12 菌株 W3110 的基因库。Bathe 等 (*Molecular and General Genetics*, 252: 255-265, 1996) 阐述了谷氨酸棒状菌 ATCC 13032 的基因库, 其是借助于粘粒载体 SuperCos I (Wahl 等, 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) 在 *E. coli* K-12 菌株 NM 554 (Raleigh 等, 1988, *核酸研究* 16: 1563-1575) 中构建的。Bormann 等 (*分子微生物学* 6(3), 317-326) 也阐述了一用粘粒 pHG79 (Hohn and Collins, *Gene* 11,291-198 (1980)) 构建的谷氨酸棒状菌 ATCC 13032 基因库。为在 *E. coli* 中产生谷氨酸棒状菌的基因库, 也可使用如 pBR322 (Bolivar, *Life Sciences*, 25,807-818 (1979)) 或 pUC9 (Vieira 等, 1982, *Gene* 19: 259-268) 等质粒。适当的宿主尤其是那些限制和重组缺陷的 *E. coli* 菌株。例如由 Grant 等 (*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 87, (1990)4645-4649) 所述的菌株 DH5 α mc^r。然后将借助于粘粒克隆的长 DNA 片段在目前用于测序的载体中亚克隆, 然后如 Sanger 等 (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74:5463-5467, 1977) 中所述进行测序。

然后将所得 DNA 序列用已知算法或序列分析程序测试, 如 Staden 程序 (*核酸研究* 14, 217-232(1986)), Bulter 的 GCG 程序 (*生化分析方法* 39, 74-97 (1998)), Pearson 和 Lipman 的 FASTA 算法 (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85,2444-

2448 (1988)), 或 Altschul 等的 BLAST 算法 (Nature Genetics 6,119-129 (1994)), 并与公共可入数据库中的登记序列相对比。公共可入核苷酸序列库如欧洲分子生物学实验室 (EMBL, Heidelberg, 德国), 或国立生物技术信息中心 (NCBI, Bethesda, MD, USA) 的数据库。

以此方式获得的编码 sod 基因的谷氨酸棒状菌的新 DNA 序列是本发明的一部分, 示作 SEQ ID NO: 1。另外, 相应蛋白质的氨基酸序列衍生自此 DNA 序列。sod 基因产物的氨基酸序列示作 SEQ ID NO: 2。

通过遗传密码的简并产自 SEQ ID NO: 1 的编码 DNA 序列也是本发明的一部分。同样, 与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 1 的部分杂交的 DNA 序列也是本发明的一部分。另外保守氨基酸置换如蛋白质中甘氨酸与丙氨酸或天冬氨酸与谷氨酸的置换, 称为“有义突变”已为本领域技术人员所知, 且不引起蛋白质活性的任何基本变化, 即它们是有功能的中性改变。另外, 已知蛋白质 N 和/或 C 末端的改变基本不影响甚至能稳定其功能。关于此方面的数据参见 Ben-Bassat 等 (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), O' Regan 等 (Gene 77:237-251 (1989)), Sahin-Toth 等 (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), Hochuli 等 (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) 及关于遗传及分子生物学的熟知教材。以相应方式产生自 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列也是本发明的一部分。

棒状菌中 sod 基因的扩增导致该微生物中超氧化物歧化酶浓度非同一般的增高。

为产生过表达, 可以提高相应基因的拷贝数, 或使启动子和位于结构基因上游的调节区或核糖体结合位点突变。掺入结构基因上游的表达盒以同样方式操作。在用可诱导启动子经发酵生产 L-赖氨酸期间增加表达也是可能的。通过延长 mRNA 的寿命也可以改良表达。另外, 通过抑制酶蛋白的降解, 也可扩增酶活性。基因或基

因构建体可以不同拷贝数存在于质粒中，或在染色体中整合与扩增。或者，通过修改培养基的组分和培养方法也可达到相关基因的过表达。

这些方法的指导参见于 Martin 等 (Bio/Technology 5,137-146 (1987)), Guerrero 等 (Gene 138,35-41 (1994)), Tsuchiya 和 Morinaga (Bio/Technology 6,428-430 (1988)), Eikmanns 等 (Gene 102,93-98 (1991)), 欧洲专利 EP-B-0472 869, 美国专利 4,601,893, Schwarzer 和 Puhler (Bio/Technology 9,84-87 (1991)), Reinscheid 等 (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)), Labarre 等 (Journal of Bacteriology 175,1001-1007 (1993)), 专利申请 WO 96/15246, Malumbres 等 (Gene 134,15-24 (1993)), 日本专利文献 JP-A-10-229891, Jensen 和 Hammer (Biotechnology and Bioengineering, 58, 191-195 (1998)), Makrides (Microbiological Reviews, 60:512-538 (1996)) 和遗传及分子生物学的熟知教材中所述。

可过表达 *sod* 基因的质粒例如是 pMM23 (图 1), 其包含于菌株 MH20-22B/pMM23 中。质粒 pMM23 是基于质粒 pBLI (Feransez-Gonzalez 等, Journal of Bacteriology 176 (11), 3154-3161 (1994)), pACYC184 (Chang 和 Cohen, Journal of Bacteriology 134 (3), 1141-1156 (1978)) 和 *trc* 启动子 (Brosius 等, Journal of Biological Chemistry 260,3539-3541 (1985)) 的携带 *sod* 基因的 *E. coli*-谷氨酸棒状菌穿梭载体。其它可在谷氨酸棒状菌中复制的质粒载体如 pEKEx1 (Eikmanns 等, Gene 102:93-98 (1991)) 或 pZ8-1 (欧洲专利 0 375 889), 可以同样方式用作克隆和表达 *sod* 基因的起始载体。

除 *sod* 基因之外, 过表达特殊生物合成途径中的一或多种酶, 对核苷酸, 维生素, 尤其 L-氨基酸的生产也是有益的。

因此, 例如, 为制备核苷酸:

- 编码谷氨酰胺 PRPP-酰胺转移酶的 *purF* 基因可同时过表达;

- 编码氨甲酰磷酸合酶的 *carAB* 基因可同时过表达。

因此，例如，为制备 D-泛酸：

- 编码天冬氨酸脱羧酶的 *panD* 基因（Dusch 等，*Applied and Environmental Microbiology* 65,1530-1539 (1999)）可同时过表达。

最后，例如，为制备 L-赖氨酸：

- 编码二氢吡啶二羧酸合酶的 *dap* 基因可同时过表达（EP-B-0 197 335），或
- 促进 S-（2-氨基乙基）-半胱氨酸抗性的 DNA 片段可同时扩增（EP-A 0 088 166）。

另外，除了 *sod* 基因的过表达之外，关闭非所需的副反应对核苷酸，维生素，尤其 L-氨基酸，特别是 L-赖氨酸的生产是有益的。（Nakayama, “产氨基酸微生物的育种”，微生物产物的过量产生, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), 学术出版社，英国伦敦，1982）。

根据本发明制备的微生物可连续培养，或以分批法或补料分批法或重复补料分批法等分批方式培养，以生产代谢产物。已知培养法参见于 Chemiel 所著教材（*Bioprozesstechnik1, Einfuhrung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)），或 Storhas 所著教材（*Bioreaktoren und Periphere Einrichtungen* (Vieweg Verlag, Braunschweig/ Wiesbaden, 1994)）中所述。

所利用的培养基必须适合特定微生物的需要。各种微生物的培养基的描述在美国细菌学学会(华盛顿 D.C., USA, 1981)的“普通细菌学方法手册”中找到。可以利用碳源是糖和碳水化合物，例如葡萄糖，蔗糖，乳糖，果糖，麦芽糖，糖蜜，淀粉和纤维素，油和脂肪，例如大豆油，向日葵油，落花生油和椰子脂肪，脂肪酸，例如棕榈酸，硬脂酸和亚油酸，醇，例如甘油和乙醇，以及有机酸，例如乙酸。这些物质可以单独或混合使用。可以利用氮源是有机含氮化合物，如胨，酵母提取物，肉膏，麦芽抽提物，玉米浆，大豆粉

和尿素，或无机化合物，如硫酸铵，氯化铵，磷酸铵，碳酸铵和硝酸铵。氮源可以单独或混合使用。可以利用的磷源是磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或对应的钠盐。培养基也必须含有金属盐，例如硫酸镁或硫酸铁，这对生长必需的。最后，除以上提及的物质之外，可以使用必需的促生长物质如氨基酸和维生素。另外，合适的前体也可加入到培养基中。所述原料可一批加入培养物中，也可在培养过程中以合适的方式补加。

培养物的 pH 通过适当使用碱性化合物，如氢氧化钠，氢氧化钾或氨，或酸性化合物，如磷酸或硫酸控制。可以利用消泡剂，如脂肪酸聚乙二醇酯控制。质粒的稳定性可以通过向培养基中添加合适的选择性作用物保持，例如抗生素。需氧条件可以通过向培养基中引入氧或含氧的气体混合物保持，例如空气。培养温度通常是 20℃-45℃，优选的是 25℃-40℃。继续培养，直到 L-氨基酸的形成达到最大值。这一目标通常在 10 小时 160 小时之内达到。

以下微生物根据布达佩斯条约保藏在德意志微生物保藏中心 (DSMZ, 不伦瑞克, 德国):

- E.coli 菌株 XL1 blue/pMM23, 保藏号 DSM 12860
- *Corynebacterium melassecola* 菌株 1019, 保藏号 DSM12859。

本发明的方法用于用棒状菌经发酵制备核苷酸，维生素，尤其 L-氨基酸，特别是制备 L-赖氨酸。

以下附图 1: 质粒 pMM23 图

附图 2: 质粒 pCGL482 图。

所得与碱基对数目相关的数值在可重复范围内。

所用缩写解释如下:

P_{trc}: trc 启动子;

Sod: 超氧化物歧化酶基因;

Cat: 氯霉素抗性基因;

Ori pBL 1: 质粒 pBL1 的复制区;

Ori pACYC: 质粒 pACYC 184 的复制区;

Ori M 13: 噬菌体 M13 的复制区;

bp: 碱基对;

Not I: 限制酶 Not I 的切割点;

Xba I: 限制酶 Xba I 的切割点;

BamHI: 限制酶 BamHI 的切割点;

Nco I: 限制酶 Nco I 的切割点;

Sal I: 限制酶 Sal I 的切割点;

Bgl II: 限制酶 Bgl II 的切割点;

Nde I: 限制酶 Nde I 的切割点;

Sma I: 限制酶 Sma I 的切割点;

Pst I: 限制酶 Pst I 的切割点;

Stu I: 限制酶 Stu I 的切割点;

Xho I: 限制酶 Xho I 的切割点。

实施例

以下实施例将进一步例证本发明。

实施例 1 sod 基因的克隆与测序

1. *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 的超氧化物歧化酶的纯化及鉴定

为纯化超氧化物歧化酶, 将 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 在 Bacto®脑心浸液培养基(DIFCO Laboratories, Detroit, 美国)上, 在 34°C 有氧生长直至晚期指数期。用 BECKMANN (Palo Alto, 美国) 的 Avanti J-25 离心机和 JLA-10.500 转子, 在 5000g, 在 4°C 离心 15 分钟收集 1L 培养物的细胞, 并重悬浮于 10mM MgCl₂, 1μg/ml 核糖核酸酶 A, 1μg/ml 脱氧核糖核酸酶 I, 25mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.5 中, 经 BECKMAN 的 DU 7400 光密度计 (Palo Alto,



美国) 在波长 570nm 测定最终光密度 500。为破坏细胞, 将细胞在 16000psi (110MPa) 剪切应力, 3 次经过具有 SLM AMINCO® (Urbana, 美国) 的 FRENCH® 压力细胞压机的 Manual-Fill 40K 室 (FA-030)。将所得提取物用 BECKMAN (Palo Alto, 美国) 的 Avanti J-25 离心机和 JA-25.50 转子在 10000g, 在 4°C 离心 15 分钟。用 BECKMAN (Palo Alto, 美国) 的 L8-70M 超离心机和 VTi 65.2 转子将上清液在 130000g, 在 4°C 超离心 2 小时。此上清液用作粗提物。

通过如 Schmidt 等 (European Journal of Biochemistry 156,149-155 (1986)) 所述在非变性凝胶电泳后经活性染色, 或如 Ukeda 等 (Analytical Biochemistry 251 (2), 206-209 (1997)) 所述特异酶促分析, 和如 Laemmli (Nature 277,680-685 (1970)) 所述 SDS-PAGE 分析, 纯化上步中的超氧化物歧化酶。通过 Lowry 的方法 (Lowry 等, Journal of Biological Chemistry 193, 265-275 (1951)), 用牛免疫球蛋白 G 作标准估计蛋白质含量。

通过加入结晶硫酸铵至终饱和度为 90%, 将粗提物在冰上沉淀 30 分钟。用 BECKMAN (Palo Alto, 美国) 的 Avanti J-25 离心机和 JA-25.50 转子, 在 10000g 在 4°C 离心 15 分钟以收集沉淀物, 并弃去。将上清液调节至 100% 硫酸铵饱和度, 并如上经离心收集沉淀物。将粒状沉淀溶于 10ml 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH8.0 中。将此溶液用 2L 相同缓冲液透析 24 小时。将此蛋白质溶液上样于 BIO-RAD (Hercules, 美国) 的 2ml Bioscale Q2 离子交换柱, 用 2 柱体积的 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0 冲洗此柱, 然后用 0~0.5 M NaCl 线性梯度洗脱。集合活性组分, 用 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0 透析。在 PHARMACIA Biotech (St Quentin en Yvelines, 法国) 的 100ml Sephacryl S300 柱上经凝胶过滤分离蛋白质。用 BIO-RAD 的 FPLC BioLogic HR 系统 (Hercules, 美国) 进行所有层析步骤。集合活性组

分, 并用 AMICON (Epernon, France) 的 Centricon®-30 浓缩柱浓缩。最终超氧化物歧化酶溶液体积为 540 μ l, 经 Lowry 方法 (Lowry 等, Journal of Biological Chemistry 193,265-275 (1951)) 估算, 蛋白质浓度 0.2mg/ml。经 SDS-PAGE 分析 (Laemmli, Nature 227,680-685 (1970)) 评价, 超氧化物歧化酶是纯化的, 且其亚单位分子量估算为 24.5 kDa。

将纯化的超氧化物歧化酶 (10 μ g) 从 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶切片内分离。将蛋白质在凝胶切片中用在 200 μ l 0.01%TWEEN 20, 0.1M Tris-HCl 缓冲液 pH8.6 中的 0.2 μ g 胰蛋白酶消化。用 APPLIED BIOSYSTEMS (Foster City,美国) 的 104A HPLC 层析系统, 在 DEAE-C18 柱上, 经线性乙腈/0.1%三氟乙酸梯度分离胰化肽。用 APPLIED BIOSYSTEMS 473A 测序仪 (Foster City, 美国) 对二个分离的肽测序, 这些肽具有以下序列:

肽 15: NLAFLNLTGGHTNHSVF

肽 18: FQDHFNSAALGLQGS

用 BLAST 程序 (Altschul 等, Journal of Molecular Biology 215,403-410 (1990)), 将测序的肽与国立生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中蛋白质序列对比, 揭示出 15 肽与粘性放线菌的超氧化物歧化酶 (100%相同, 登录号 X81381), 白喉棒杆菌 (86%相同, 登录号 X81382) 的高度相同性, 18 肽与白喉棒杆菌 (78 %相同, 登录号 X81382) 和假白喉棒杆菌 (73%相同, 登录号 X81383) 的高度相同性。

2. 克隆 sod 基因

用于克隆实验的分子生物学技术见于 Ausubel 等 (Ausubel 等, 分子生物学常用方法, John Wiley and sons, 纽约, 美国 (1987)) 所述, 除了当特别提出时。通过普罗梅加公司 (Madison,美国) 或



宝灵格曼海姆法国公司 (Meylan, 法国) 购买分子生物学产物, 除了特别需要之外。

为克隆编码超氧化物歧化酶的 *sod* 基因, 构建基因组 DNA 库。将 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 在 Bacto® 脑心浸液培养基上 (DIFCO Laboratories, Detroit, 美国) 在 34°C 有氧生长至晚期指数期。用 BECKMANN (Palo Alto, 美国) 的 Avanti® J-25 离心机和 JLA-10.500 转子, 在 4°C 离心 15 分钟, 收集 25ml 培养物的细胞, 再悬浮于 3ml 10mM 乙二胺四乙酸, 1% 葡萄糖, 20mg/ml 溶菌酶, 25mM Tris-Cl 缓冲液 pH8.5 中, 并在 37°C 培养 1 小时。加入 6.5ml 1mM 乙二胺四乙酸, 0.5% 十二烷基硫酸钠, 1mg/ml 蛋白酶 K, 10mM Tris-Cl 缓冲液 pH7.5, 并在 37°C 培养 1 小时, 使细胞裂解。向此悬浮液中加入 1.8ml 的 5M NaCl 和 1.5ml 的 10% 十六烷基溴化铵 (CTAB), 0.7M NaCl 溶液。在 60°C 培养 20 分钟后, 通过与等体积的 24: 1 v/v 氯仿/异戊醇溶液轻度混合提取染色体 DNA。将水相中的染色体 DNA 用 0.6 体积的异丙醇沉淀。用 BECKMAN (Palo Alto, 美国) 的 Avanti® J-25 离心机和 JA-25.50 转子, 在 10000g 在 4°C 离心 15 分钟回收 DNA 沉淀物, 并重悬浮于 1mM EDTA, 10mM Tris-Cl 缓冲液 pH7.5 中。向用适当缓冲液稀释的 1mg 染色体 DNA 中, 加入 15 单位的限制酶 *Mbo*I, 并将此混合物在 37°C 培养 1 小时。用 BECKMAN (Palo Alto, 美国) 的 L8-70M 超离心机和 SW40Ti 转子, 在 20°C 以 80000g, 在 10~40% w/v 蔗糖梯度超离心 17 小时, 根据大小分级分离限制消化的 DNA。经水平琼脂糖凝胶电泳估算的大小在 6~10Kb 的染色体 DNA 片段被回收并集合。将选择阳性克隆载体 pUN121 (Nilsson 等, 核酸研究 11,8019-8030 (1983)) 通过限制酶 *Bcl*II 线性化。在含 0.1 单位 T4 DNA 连接酶的连接混合物中加入 1μg 线性的 pUN121, 2μg 来自 *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 的 *Mbo*I 产生的染色体 DNA 片段, 在 16°C 培养 24 小

时。然后将此连接混合物如 Bonamy 等 (Bonamy 等, FEMS Microbiology Letters 66,263-270 (1990)) 所述经电穿孔用于转化 E.coli 菌株 DH 5 α (Hananhan, Journal of Molecular Biology 166,557-580 (1983))。在 37°C, 在含 10 μ g/ml 四环素的 Bacto® Luria Bertani 琼脂 (DIFCO Laboratories, Detroit USA) 的平板上培养 24 小时后, 回收转化体。可得到 10000 个以上独立转化体克隆, 由 Clarke 和 Carbon (Clarke 和 Carbon, Cell 9,91-99 (1976)) 表明任何 *Corynebacterium melassecola* 产生的染色体 DNA 片段在此 DNA 库中至少出现一次的可能性为 99.9%。将转化体单独挑取, 并在含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基的 96 孔微滴定平板中, 在 37°C 培养 24 小时。将所有转化体影印铺板于 AMERSHAM (Little Chalfont, 英国) 的 AMERSHAM Hybond-N 尼龙膜上, 使其在 37°C 生长 24 小时。将菌落在膜上裂解。将主微滴定平板在每个孔用 25 μ l 80% 甘油充至 50 μ l 后, 贮存在一 80°C, 直至使用。

如 Ausubel 等所述 (Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and sons (eds), 纽约, 美国 (1987)), 通过与 *sod* 特异放射性探针经 DNA/DNA 杂交, 可筛选 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 DNA 库中 *sod* 基因存在与否。如下制备 *sod* 特异性 DNA 探针。考虑到在棒状菌物种中高表达基因密码偏倚指数 (Malumbres 等, Gene 134,15-24 (1993)), 分别在肽 15 和肽 18 序列基础上设计简并的寡核苷酸 S1 和 S2。从肽 DMWEHAFYL 中设计另外寡核苷酸, 命名为 S3。这些寡核苷酸具有以下序列:

S1: 5' GGCCACACCAACCACTCCGTSTT 3'

S2: 5' GAGTTGAAGTGRTCCTGGAAGTT 3'

S3: 5' AGGTAGAAWGCCTGCTCCCACAT 3'

(单字母密码: S=C 或 G, R=A 或 G, W=A 或 T)

用 POLYGEN 有限公司的 Polygen DNA 合成仪 (Langen, 德国)

合成寡核苷酸。这些寡核苷酸用于在 PCR 中以如前制备的 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 染色体 DNA 作模板, 扩增 DNA 片段。此 PCR 试验在 CrocodileII 微处理机控制的 APPLIGENE ONCOR 的培养系统 (Illkirch, 法国) 中, 用 Ampli Taq Gold 聚合酶进行, 且其来自 PERKIN ELMER (Foster City, 美国) 的缓冲液如下:

染色体 DNA:	30ng
寡核苷酸 S1:	0.5 μ M
寡核苷酸 S2 或 S3:	0.5 μ M
Ampli Taq Gold:	2.5 单位
10 $\times$ 缓冲液:	5 μ l
水 :	至终体积为 50 μ l。

PCR 包括在 94 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟, 随后进行 35 次扩增循环 (在 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 在 54 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 在 72 $^{\circ}$ C 聚合 1 分钟/每循环)。经琼脂糖凝胶电泳估算, 扩增的 DNA 片段大小接近从已知 *sod* 基因的核苷酸序列数据预期的大小。用寡核苷酸 S1 和 S2 扩增提供一大约 130 个核苷酸的片段。用寡核苷酸 S1 和 S3 扩增提供一大约 290 个核苷酸的片段。将这两个扩增的片段的克隆入特异的普罗梅加公司 (Madison, 美国) 的 pGEM $\oplus$ -T 载体中, 以提供质粒 pMM6 和 pMM7。质粒 pMM6 含有用 S1 和 S2 扩增的片段, pMM7 含有用 S1 和 S3 扩增的片段。通过 Sanger 等所述 (Sanger 等, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74, 5463-5467 (1977)) 的双脱氧核苷酸链终止法, 用寡核苷酸 S1 作引物, 对插入的片段测序。用 APPLIED BIOSYSTEM (Foster City, 美国) 的 Model 373 DNA 测序系统进行 DNA 测序。DNA 序列分析证实这二个片段均相当于超氧化物歧化酶编码基因的片段。

用 S1 和 S3 作引物获得的扩增片段的起点通过如下 Southern 试验 (Southern, *Journal of Molecular Biology* 98, 503-517 (1975)) 控制。

将 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 和 *E. coli* DH5 α (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166,557-580 (1983)) 的染色体 DNA 用酶 Hind III, Pst I 或 Pvu II 限制消化。通过水平琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段, 印迹于 AMERSHAM (Little Chalfont, 英国) 的 AMERSHAM Hybond-N 尼龙膜上。寡核苷酸 S1 和 S3 用于通过如前述 PCR 用 pMM7 作模板扩增 *sod* 特异 DNA 片段。此片段用 PHARMACIA Biotech 的 T7 QuickPrimeo 试剂盒 (St Quentin en Yvelines, 法国) 用 α^{32} P dCTP 放射标记。如供应商所示进行标记。此放射性探针与 *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 染色体 DNA 特异杂交。

此标记的 DNA 探针也用于筛选预先铺板于尼龙膜上的 *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 基因组文库。通过此筛选, 首先选择 6 个菌落。从代表性菌落中分离质粒, 并进行限制分析和 PCR 分析。选择质粒 pMM8 以进一步研究。因为其含有与衍生自 pMM7 的放射性探针杂交的 10kbp 重组 DNA 片段, 从中用寡核苷酸 S1 和 S3 作引物, 经 PCR 扩增 290 个核苷酸的片段。

3. *sod* 基因的测序

通过 Sanger 等所述双脱氧核苷酸链终止法 (Sanger 等, Proceedings of the National Academy of Science USA 74,5463-5467 (1977)), 在 APPLIED BIOSYSTEM (Foster City, 美国) 的 Model 373 DNA 测序系统上, 对质粒 pMM8 中 *sod* 基因座测序。测序起自一个方向的作为引物的寡核苷酸 S1 和另一方向的 S3。通过“DNA 行走”策略, 对两个链上序列完全进行测定, 从预先确定的核苷酸序列中设计新的寡核苷酸, 并如前述合成。用 BIOSOFT (Cambridge, UK) 提供的序列处理器, Gene Jockey II 程序, 对核苷酸序列进行计算机分析。此序列示作 SEQ ID NO: 1。由此, 一 603 个核苷酸的主要开放读框被鉴定。此开放读框相当于 200 个氨基酸

的蛋白质 (SEQ ID NO: 2), 此推导的蛋白质分子量计算为 22,103 da, 接近经 SDS-Page 电泳确定的超氧化物歧化酶蛋白质的实验值。

(如上)。实验确定的肽 15 和肽 18 序列在推导的蛋白质序列中发现。另外, 推导的蛋白质与其它完全测序的超氧化物歧化酶呈广泛相同, 如与国立生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中序列对比所见。Corynebacterium melassecola ATCC 17965 超氧化物歧化酶示出与 Nocardia asteroides (65%相同, 登录号 U02341), Mycobacterium fortuitum (63%相同, 登录号 X70914), Mycobacterium avium (61%相同, 登录号 X16453) 和 Mycobacterium tuberculosis (60%相同, 登录号 X52861) 的 sod 相同。

实施例 2 sod 基因的表达

1. 将 sod 基因克隆入表达载体

为表达 sod 基因, 从 pCGL482 构建表达载体 pMM23。

质粒 pCGL482 (图 2) 是一 E. coli-谷氨酸棒状菌穿梭载体, 由 pACYC 184 (Chang 和 Cohen, Journal of Bacteriology 134 (3), 1141-1156 (1978)) 的区段, pBL1 (Fernandez-Gonzalez 等, Journal of Bacteriology 176 (11), 3154~3161 (1994)), 噬菌体 M13 的复制起点 (Rashed 和 Oberer, Microbiological Review 50, 401-427, (1986)), 多重克隆位点和作为选择标记的 pACYC184 的氯霉素抗性基因组成。

将 pCGL482 的 DNA 用限制酶 BamHI 和 StuI 消化。用 NcoI 和 SmaI 消化质粒 pMM8, 且通过琼脂糖凝胶电泳分离含 sod 基因的 0.8kbpDNA 片段。将质粒 pKK388-1 (Brosius, in Vector: A Survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez Editor, pp205-225, Butterworth Boston, 美国 (1988)) 用 BamHI 和 NcoI 消化, 且含 trc 启动子 (Brosius 等, Journal of Biological Chemistry 260, 3539-3541 (1985)) 的 0.36kbp DNA 片段经琼脂糖凝胶电泳分离。将此三种组

分混合，并用 T4-DNA 连接酶处理。此连接混合物用于通过如 Bonamy 等所述 (Bonamy 等, FEMS Microbiology Letters 66,263-270 (1990)) 经电穿孔转化 E.coli 菌株 XL1-Blue (Bullock 等, 生物技术 5,376-378 (1987))。通过在补加氯霉素 (30 μ g/ml) 的 Bacto®LB 琼脂上 (DIFCO Laboratories, Detroit, 美国) 在 37°C 培养 2 天，以选择转化体。从一个单菌落中分离质粒 DNA，并命名为 pMM23 (图 1)。

Corynebacterium melassecola 菌株 1019 (保藏号 DSM 12859)，是衍生自菌株 ATCC 17965 的限制缺陷突变体，将其用质粒 pCGL482 和 pMM23 转化，如 Bonamy 等所述 (Bonamy 等, FEMS Microbiology Letters 66,263-270 (1990))。在补加氯霉素 (6 μ g/ml) 的 Bacto®脑心浸液琼脂 (DIFCO Laboratories, Detroit, 美国) 上，在 34°C 培养 2 天，选择转化体。

2. 酶测定

将菌株 1019, 1019/pCGL482 和 1019/pMM23 在补加氯霉素的 Bacto®脑心浸液培养基 (DIFCO Laboratories, Detroit, 美国) 上有氧培养，在 34°C 将后二个菌株培养直至中期指数期。用 HERAUS Instruments GmbH 的 Megafuge 1.0R 离心机 (Hanau, 德国)，在 5000g 离心 15 分钟收集菌株，并重悬浮于 50mM 磷酸钠缓冲液 pH8.0 中，至经 BECKMAN 的 DU7400 光度计 (Palo Alto, 美国) 在波长 570nm 测定最终光密度为 50。

用玻珠将细胞机械破坏。将 1ml 细胞悬浮液与 1g 直径 0.5mm 的玻璃珠在 2ml Eppendorf 管中混合。将此悬浮液旋动 2 分钟，然后在冰上培养 2 分钟。将此步骤重复 3 次。将所得悬浮液用 SIGMA (St.Louis, 美国) 的 Sigma 113 离心机在 13000rpm 至少离心 15 分钟。将此上清液用于酶分析。

如 Ukeda 等所述 (Analytical Biochemistry 251 (2),206-209 (1997))，用得自 SIGMA-ALDRICH (St Quentin, Fallavier, 法国)

E. coli Mn 依赖超氧化物歧化酶作标准，进行超氧化物歧化酶分析。通过 Lowry 的方法（Lowry 等，Journal of Biological Chemistry 193,265-275 (1951)），用牛免疫球蛋白 G 作标准，进行蛋白质浓度估算。所得结果示于表 1。1 个酶单位指在偶联的系统中用黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶在 pH7.8 和 25°C 抑制 50% 细胞色素 C 还原率的酶的量。

表 1:

菌株	超氧化物歧化酶活性 (单位/mg 蛋白)
1019	16
1019/pCGL482	13
1019/pMM23	56

实施例 3 构建具有增强的超氧化物歧化酶的赖氨酸生产菌

本领域已知谷氨酸棒状菌菌株 MH20-22B 是赖氨酸生产菌，如 EP-B-0435132 中所述。菌株 MH20-22B 根据布达佩斯条约保藏在德意志微生物保藏中心 (DSM, Braunschweig, 德国)，保藏号 DSM5715。

如实施例 2 所述，用质粒 pMM2 和 pCGL482 转化菌株 MH20-22B，由此获得具有增强的超氧化物歧化酶活性的菌株 MH20-22B/pMM23 和菌株 MH20-22B/pCGL482。

实施例 4 在氧化应力下生产赖氨酸

将菌株 MH20-22B 和 MH20-22B/pMM23 在 50ml CGIII (Menkel 等, 1989, Applied and Environmental Microbiology 55:684-688) 中预培养。使用加档板的 500ml 摇瓶，并在初始 pH7.0, 33°C 在旋转直径 50mm 摇床中以 250rpm 培养 19 小时。将细胞用于接种



在 660nm 光密度为 0.3 的主培养物 (Biochrom Novaspec 4049, LKB Instrument GmbH, Grafelfing, 德国, 样品池宽 10mm), 将主培养物在 50ml CGC (Schrumpf 等, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) 中培养, 此 CGC 通过加入 5g/L 玉米浸液, 30g/L 葡萄糖, 42g/L 吗啉丙磺酸和 150mg/L 亮氨酸和补加 200mg/l 甲基紫精而修改。使用有档板的 500ml 摇瓶, 并在初始 pH7.0, 33°C 在旋转直径 50mm 的摇床上以 250rpm 培养 20 小时。在发酵末期, 确定赖氨酸浓度 (氨基酸分析仪, Eppendorf-BioTronik, Hamburg, 德国)。

在菌株 MH20-22B 的培养物中赖氨酸浓度为 4.8g/L, 在菌株 MH20-22B/pMM23 培养物中是 6.6g/L。浓度以盐酸赖氨酸提供。

实施例 5 由过氧化氢或甲基紫精所致抗氧化还原应力抗性

在灭菌和填加 4ml 表 2 所述无菌 GCG-TEST 培养基的 10ml 试管中, 分别进行抗性分析或存活分析。将过氧化物或甲基紫精分别加入 CGC-TEST 培养基中, 以表 3 和表 4 所示浓度加入。

如实施例 4 所述, 将菌株 MH20-22B/pMM23 和 MH20-22B/pCGL482 预培养。通过在 15000g 离心 10 分钟, 从培养肉汤中除去主要培养物的生物量, 并用于随后存活分析中的分析。将粒状沉淀再悬浮于 CGC-TEST 培养基中, 至 D_{660} 为 1.0。将 0.1mL 等份转移至 4ml CGC-TEST 中。在初始 pH7.0, 37°C, 以 250rpm 在旋转直径 25mm 的摇床上, 将 10ml 试管中培养物培养 20 小时。通过将适当稀释度的 100 μ l 等份涂布铺板于牛心浸液琼脂上, 确定 20 小时样本的菌落形成单位。

用氧化还原应力剂过氧化氢所得结果示于表 3, 过氧化氢可用作在发酵中使细菌生长最佳化的氧源。

用氧化还原应力剂甲基紫精所得结果示于表 4。甲基紫精启动超氧化物自由基的形成。

00:08:14

表2

成分	浓度
右旋糖（单独灭菌）	5 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/L
Urea	5 g/L
$\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 g/L
生物素（过滤除菌）	200 $\mu\text{g/L}$
KH_2PO_4	500 mg/L
K_2HPO_4	500 mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	250 mg/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
CuSO_4	200 $\mu\text{g/L}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 $\mu\text{g/L}$
培养基用自来水制备	

00.08.14

表3

过氧化氢 (g/L)	MH20-22B/pCGL482		MH20-22B/pMM23	
	CFU	Rel.	CFU	Rel.
	(cell /mL)		(cell /mL)	
0	11.0 10 ⁶	1.0	4.1 10 ⁶	1.0
0.03	3.1 10 ⁶	0.3	8.9 10 ⁶	2.2
3.00	5.0 10 ⁶	0.5	10.0 10 ⁶	2.4
CFU: 菌落形成单位 (mL ⁻¹)				
Rel.: 相对单位				

表4

甲基紫精 (mg/L)	MH20-22B/pCGL482		MH20-22B/pMM23	
	CFU	Rel.	CFU	Rel.
	(cell /mL)		(cell /mL)	
0	8.4 10 ⁶	1.0	4.9 10 ⁶	1.0
200	4.6 10 ⁶	0.5	14.0 10 ⁶	2.9
5 CFU: 菌落形成单位 (mL ⁻¹)				
Rel.: 相对单位				

序列表

<110> 德古萨—于尔斯股份公司
国立科学研究中心 (CNRS)

<120> 代谢产物的发酵制备方法及编码sod基因的核苷酸序列

<130> 990078 BT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1143

<212> DNA

<213> Corynebacterium melassecola ATCC 17965

<220>

<221> CDS

<222> (338)..(937)

<400> 1

```

ggatccggcc aatgcttctg gcgtcaggca gccatcggaa gctgtggtat ggctgtgcag 60
gtcgtaaatc actgcataat tcgtgtcgtc caaggcgcac tcccgttctg gataatgttt 120
tttgccgcca catcataacg gttctggcaa atattctgaa atgagctgtt gacaattaat 180
catccggctc gtataatgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc 240
gccgctgaga aaaagcgaag cggcactgct ctttaacaat ttatcagaca atctgtgtgg 300
gcactcgacc ggaattatcg ataaggaggt ttaaacc atg gct gta tac gaa ctc 355
                               Met Ala Val Tyr Glu Leu
                               1           5

cca gaa ctc gac tac gca tac gac gct ctc gag cca cac atc gcc gct 403
Pro Glu Leu Asp Tyr Ala Tyr Asp Ala Leu Glu Pro His Ile Ala Ala
           10           15           20

gaa atc atg gag ctt cac cac tcc aag cac cac gca acc tac gtt gca 451
Glu Ile Met Glu Leu His His Ser Lys His His Ala Thr Tyr Val Ala
           25           30           35

ggc gca aac gca gca ctc gag gca cta gag aag gca cgc gaa gag ggc 499
Gly Ala Asn Ala Ala Leu Glu Ala Leu Glu Lys Ala Arg Glu Glu Gly
           40           45           50

acc aac cct gac cag atc cgt gca ctg tcc aag aac ctt gca ttc aac 547
Thr Asn Pro Asp Gln Ile Arg Ala Leu Ser Lys Asn Leu Ala Phe Asn
           55           60           65           70

ctc ggt gga cac acc aac cac tcc gtt ttc tgg aag aac ctc tcc cct 595
Leu Gly Gly His Thr Asn His Ser Val Phe Trp Lys Asn Leu Ser Pro
           75           80           85

```

00.08.14

aac ggt ggc ggc gag cct acc ggc gaa ctg gct gag gct atc aac cgc 643
 Asn Gly Gly Gly Glu Pro Thr Gly Glu Leu Ala Glu Ala Ile Asn Arg
 90 95 100

gac ttc ggt tct ttc gct aag ttc cag gat cac ttc aac tct gca gca 691
 Asp Phe Gly Ser Phe Ala Lys Phe Gln Asp His Phe Asn Ser Ala Ala
 105 110 115

ctc ggc ctg cag ggc tcc ggc tgg gcg gtt ctc ggc tac gac cac atc 739
 Leu Gly Leu Gln Gly Ser Gly Trp Ala Val Leu Gly Tyr Asp His Ile
 120 125 130

tcc ggt cgc ctg gtt atc gag cag ctc acc gac cag cag ggc aac atc 787
 Ser Gly Arg Leu Val Ile Glu Gln Leu Thr Asp Gln Gln Gly Asn Ile
 135 140 145 150

tcc gtc gac atc acc cca gtt ctg atg ctc gat atg tgg gag cac gct 835
 Ser Val Asp Ile Thr Pro Val Leu Met Leu Asp Met Trp Glu His Ala
 155 160 165

ttc tac ctg cag tac aag aac gtt aag gca gat tac gtc aag gct gtt 883
 Phe Tyr Leu Gln Tyr Lys Asn Val Lys Ala Asp Tyr Val Lys Ala Val
 170 175 180

tgg aac gtc ttc aac tgg gac gac gca gca gca cgc ttc gca gca gct 931
 Trp Asn Val Phe Asn Trp Asp Asp Ala Ala Ala Arg Phe Ala Ala Ala
 185 190 195

tcc aag taagcatttt tagtacgtgc aataaccact ctgggtttttc cagggtggtt 987
 Ser Lys
 200

ttttgatgcc ctttttggag ttttcaactg ggtagcgtta ggattcacca tttccggcgg 1047

gcatccggcg aaaaatggtg aatccacaca ctgttgcccg gcagtaagta cttttcgccg 1107

accccgatcg ctaggccagc tgtggcaagc cccggg 1143

<210> 2

<211> 200

<212> PRT

<213> Corynebacterium melassecola ATCC 17965

<400> 2

Met Ala Val Tyr Glu Leu Pro Glu Leu Asp Tyr Ala Tyr Asp Ala Leu
 1 5 10 15

Glu Pro His Ile Ala Ala Glu Ile Met Glu Leu His His Ser Lys His
 20 25 30

His Ala Thr Tyr Val Ala Gly Ala Asn Ala Ala Leu Glu Ala Leu Glu
 35 40 45

Lys Ala Arg Glu Glu Gly Thr Asn Pro Asp Gln Ile Arg Ala Leu Ser
 50 55 60

Lys Asn Leu Ala Phe Asn Leu Gly Gly His Thr Asn His Ser Val Phe
 65 70 75 80

Trp Lys Asn Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gly Glu Pro Thr Gly Glu Leu
 85 90 95

00:08:14

Ala	Glu	Ala	Ile	Asn	Arg	Asp	Phe	Gly	Ser	Phe	Ala	Lys	Phe	Gln	Asp	100	105	110
His	Phe	Asn	Ser	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Gln	Gly	Ser	Gly	Trp	Ala	Val	115	120	125
Leu	Gly	Tyr	Asp	His	Ile	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Ile	Glu	Gln	Leu	Thr	130	135	140
Asp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Ser	Val	Asp	Ile	Thr	Pro	Val	Leu	Met	Leu	145	150	155
Asp	Met	Trp	Glu	His	Ala	Phe	Tyr	Leu	Gln	Tyr	Lys	Asn	Val	Lys	Ala	165	170	175
Asp	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Trp	Asn	Val	Phe	Asn	Trp	Asp	Asp	Ala	Ala	180	185	190
Ala	Arg	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys									195	200	

说明书附图

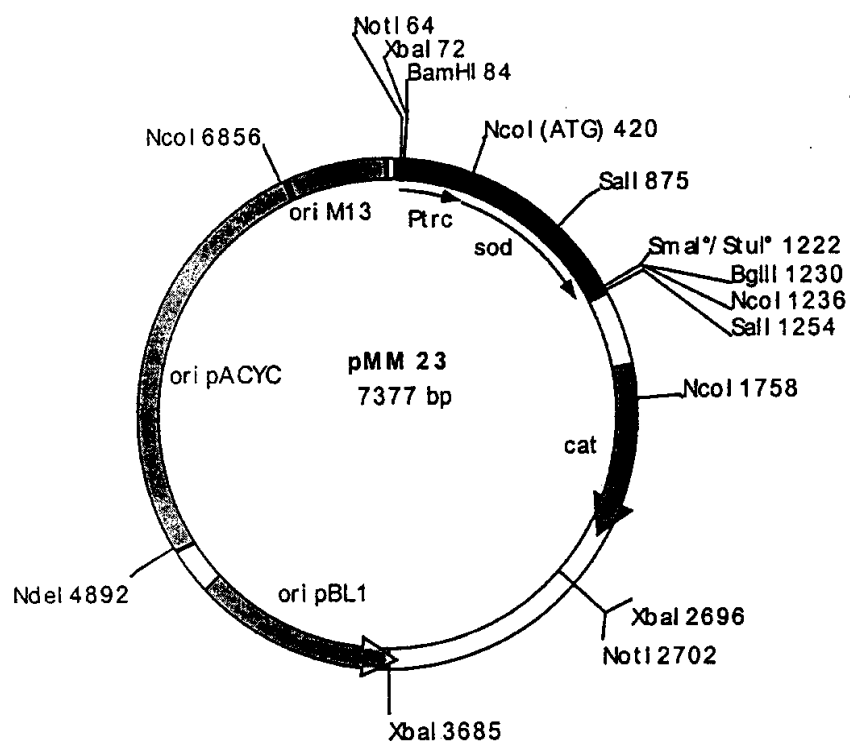


图1

00.03.14

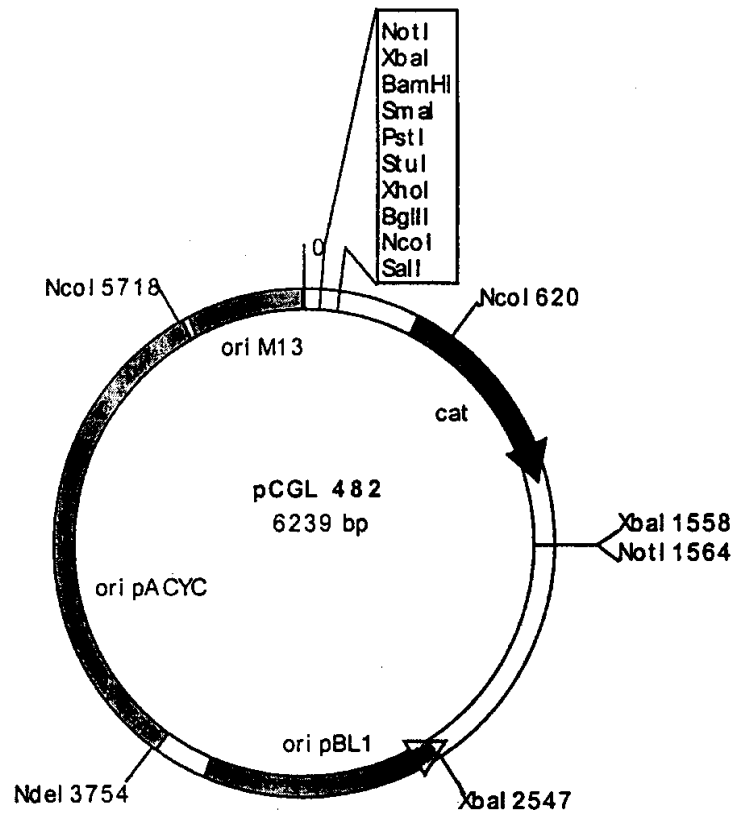


图2