



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1189854 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 96195288.1

C12P 7/18 (2006.01)

(22) 申请日 1996.05.10

C12N 9/88 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/74 (2006.01)

08/440,293 1995.05.12 US

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C12N 15/79 (2006.01)

1998.01.05

审查员 丁海

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US1996/006705 1996.05.10

(87) PCT申请的公布数据

W096/35796 EN 1996.11.14

(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州威尔明顿

专利权人 詹伦卡国际有限公司

(72) 发明人 L·A·拉芬德 V·纳加拉杰安

C·E·纳卡穆拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 卢新华 姜建成

(51) Int. Cl.

C12N 15/60 (2006.01)

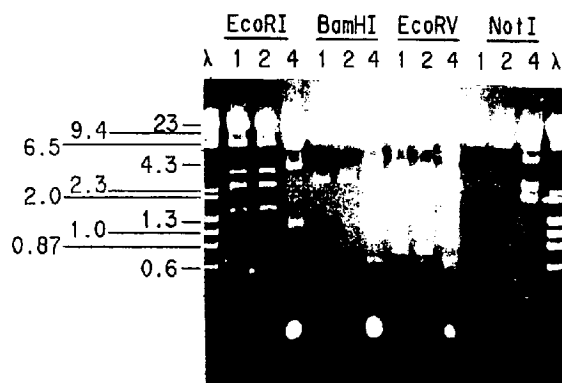
权利要求书 1 页 说明书 60 页 附图 2 页

(54) 发明名称

利用单一微生物将可发酵碳源生物转化为
1,3-丙二醇

(57) 摘要

本发明提供一种用单一微生物将一种碳底物生物转化为1,3-丙二醇的方法,所使用的微生物含有编码一种活性甘油脱水酶或二醇脱水酶的基因,本方法通过将这类微生物与一种碳底物在合适的发酵条件下接触来进行。



1. 一种生产 1,3- 丙二醇的生物转化方法,包括在合适的条件下,使一种不是甘油或二羟基丙酮的碳底物与一种表达甘油且含有编码活性脱水酶的 α 、 β 、 γ 亚单位的基因的单一重组微生物接触,其中所述碳底物是葡萄糖,所述重组微生物包含编码 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 的 DNA 片段。

2. 权利要求 1 的方法,其中基因编码甘油脱水酶,并分离自克雷伯氏菌属、乳杆菌属、肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、暗杆菌属、泥杆菌属和梭菌属。

3. 权利要求 1 的方法,其中基因编码二醇脱水酶,并分离自克雷伯氏菌属和沙门氏菌属。

4. 权利要求 1 的方法,其中脱水酶是一种甘油脱水酶或二醇脱水酶。

5. 权利要求 1 的方法,其中微生物转化有编码 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 的 DNA 片段,由此微生物表达活性的脱水酶。

6. 权利要求 1 的方法,其中微生物选自柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、梭菌属、克雷伯氏菌属、气杆菌属、乳杆菌属、曲霉属、酵母属、接合酵母属、毕赤酵母属、克鲁维酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、德巴利酵母属、毛霉属、球拟酵母属、甲基菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属和假单胞菌属。

7. 权利要求 6 的方法,其中微生物选自转化有一个编码甘油脱水酶的基因或一个编码二醇脱水酶的基因的重组微生物,或选自具有促进 1,3- 丙二醇产生的表型的突变微生物。

8. 权利要求 6 的方法,其中微生物选自克雷伯氏菌属、肠杆菌属和柠檬酸杆菌属,或者是重组的埃希氏菌属。

9. 权利要求 8 的方法,其中微生物是重组的大肠杆菌。

10. 权利要求 7 的方法,其中微生物选自链霉菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、酵母属、曲霉属、乳杆菌属和毕赤酵母属的重组菌株,这些重组微生物转化有编码 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 的 DNA 片段,由此微生物表达活性的脱水酶。

11. 权利要求 10 的方法,其中微生物选自重组的啤酒酵母、枯草芽孢杆菌、巴斯德毕赤酵母和地衣芽孢杆菌,这些重组微生物转化有编码 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 的 DNA 片段,由此微生物表达活性的脱水酶。

12. 权利要求 1 或 9 的方法,其中微生物是含有一个来自肺炎克雷伯氏菌的甘油脱水酶基因的重组大肠杆菌。

13. 权利要求 1 的方法,并进一步包括在微生物与碳底物接触前,使微生物在一种培养基中生长。

14. 权利要求 1 的方法,并进一步包括回收 1,3- 丙二醇。

利用单一微生物将可发酵碳源生物转化为 1,3- 丙二醇

发明领域

[0001] 本发明包括利用单一微生物将一种可发酵的碳源生物转化为 1,3- 丙二醇的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 1,3- 丙二醇是一种在生产聚酯纤维中和在制造聚亚胺酯及环状化合物中具有潜在应用价值的单体。

[0004] 已经知道有多种化学途径能够生产 1,3- 丙二醇。例如,可以利用一种催化剂,在存在磷化氢、水、一氧化碳、氢气和一种酸的情况下,通过丙烯醛的催化溶液相水合,然后还原,将环氧乙烷转化为 1,3- 丙二醇。或用碳氢化合物如甘油,在存在一氧化碳和氢气的条件下,使用含周期表第八族原子的催化剂进行反应来制备。虽然使用这些方法都能产生 1,3- 丙二醇,但它们非常昂贵,并且会产生含有环境污染物的废物。

[0005] 人们在一个世纪前就已经知道,1,3- 丙二醇可以通过发酵甘油来生产。已经在多种细菌例如柠檬酸杆菌属、梭菌属、肠杆菌属、泥杆菌属、克雷伯氏菌属、乳杆菌属和暗杆菌属中发现了能够生产 1,3- 丙二醇的菌株。在每种已经研究的情况中,甘油都经两个酶促反应序列步骤转化为 1,3- 丙二醇,第一步,一种脱水酶催化甘油转化为 3- 羟基丙醛 (3-HP) 和水,方程 1。第二步,3-HP 被一种 NAD^+ 相连的氧化还原酶还原为 1,3- 丙二醇,方程 2。1,3- 丙二醇不再被进一步代谢,因而在培养基中高浓度积累。整个反应消耗等当量的还原性辅助因子 - 还原型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH),NADH 被氧化成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+)。

[0006] $\text{甘油} \rightarrow 3\text{-HP} + \text{H}_2\text{O}$ (方程 1)

[0007] $3\text{-HP} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 1,3\text{- 丙二醇} + \text{NAD}^+$ (方程 2)

[0008] 由甘油产生 1,3- 丙二醇一般以甘油为唯一碳源在厌氧条件下进行,并且没有其它外源的还原性等价受体。在这种条件下,在如柠檬酸杆菌属,梭菌属,和克雷伯氏菌属的菌株中,起作用的是一种甘油代谢的平行途径,这一途径包括,甘油首先被一种 NAD^+ - (或 NADP^+ -) 连接的甘油脱氢酶氧化为二羟基丙酮 (DHA),方程 3。DHA 在一种 DHA 激酶的作用下磷酸化后产生磷酸二羟基丙酮 (DHAP) (方程 4),就可通过如糖酵解途径用于生物合成和支持 ATP 的产生。相对于 1,3- 丙二醇途径,这一途径可以为细胞提供碳源和能量,并且产生而不是消耗 NADH。

[0009] $\text{甘油} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{DHA} + \text{NADH} + \text{H}^+$ (方程 3)

[0010] $\text{DHA} + \text{ATP} \rightarrow \text{DHAP} + \text{ADP}$ (方程 4)

[0011] 在肺炎克雷伯氏菌和弗氏柠檬酸杆菌中,编码功能相连的甘油脱水酶 (dhaB)、1,3- 丙二醇氧化还原酶 (dhaT)、甘油脱水酶 (dhaD) 和二羟基丙酮激酶 (dhaK) 活性的基因都包含在调节子 dha 中。柠檬酸杆菌属和克雷伯氏菌属的 dha 调节子已在大肠杆菌中获得了表达,并且都显示能将甘油转化为 1,3- 丙二醇。

[0012] 制备甘油的生物过程已经知道,除一些细菌外,绝大多数甘油生产者都是酵母,其它真菌和藻类也已知可产生甘油。细菌和酵母都通过糖酵解途径中的果糖 -1,6- 二磷酸途径

或 Embden Meyerhof Parnas 途径转化葡萄糖或其它碳水化合物来生产甘油,但是,某些特定的藻类将叶绿体中溶解的二氧化碳和碳酸氢盐转化成卡尔文循环中的三碳中间产物。在一系列步骤中,这种三碳中间产物-磷酸甘油被转化为 3-磷酸甘油醛,3-磷酸甘油醛很容易互变为其酮异构体-磷酸二羟丙酮,并最终转化为甘油。虽然生产甘油和 1,3-丙二醇的生物方法都已经知道,但一直没能证明整个过程能由单一有机体来完成。

[0013] 上面介绍的生产 1,3-丙二醇的化学方法和生物方法都不能很好地适应于工业规模生产,因为化学过程消耗大量的能量,而生物过程需要昂贵的起始物质-甘油。因此需要一种只要求低能量输入和廉价起始物的方法。更需要这样一种方法,它应含有一种微生物,这种微生物能将基本碳源如碳水化合物或糖转化为所需的 1,3-丙二醇终产物。

[0014] 虽然需要能将可发酵碳源而不是甘油或二羟基丙酮转化为 1,3-丙二醇的单一有机体转化,但已经证明这种努力需要克服重大的困难。例如, Gottschalk 等人 (EP 373230) 指出,多数对生产 1,3-丙二醇有用的菌株如弗氏柠檬酸杆菌、*Clostridium autobutylicum*、丁酸梭菌和肺炎克雷伯氏菌,其生长会因存在氢供体如果糖或葡萄糖而受到干扰。短乳杆菌和布氏乳杆菌的菌株在甘油与果糖或葡萄糖中共发酵时能生产 1,3-丙二醇,但在用甘油作唯一碳源时却不能生长,而且,虽然已经显示静止细胞能代谢葡萄糖或果糖,但它们不产生 1,3-丙二醇 (Veiga DA Cunha 等,《细菌学杂志》174 卷,1013 页 (1992))。同样,已经显示多养泥杆菌的一个菌株,当提供甘油和乙酸时能产生 1,3-丙二醇,但在没有甘油时不能由碳水化合物包括果糖和葡萄糖产生 1,3-丙二醇。(Steib,《微生物学丛刊》(Arch. Microbiol.) 140 卷,139 页 (1984))。最后, Tong 等人 (《应用生物化学和生物技术》34 卷,149 页 (1992)) 指出,转化有编码甘油脱水酶的 dha 调节子的重组大肠杆菌在没有外源甘油时,不能由葡萄糖或木糖产生 1,3-丙二醇。

[0015] 提高由甘油生产 1,3-丙二醇的产量的努力已经有了报导,这些方法包含能提供还原性等价物的辅助底物,典型的辅助底物为可发酵的糖类。已有人宣称弗氏柠檬酸杆菌和肺炎克雷伯氏菌 DSM4270 的静止细胞在共发酵甘油和葡萄糖时,产量能够提高 (Gottschalk 等,上文; Tran-Dinh 等, DE 3734764); 但肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955 的生长细胞在共发酵甘油和葡萄糖时不能产生 1,3-丙二醇 (I-T. Tong, Ph. D. 论文, Wisconsin-Madison 大学 (1992))。用重组大肠杆菌在甘油与葡萄糖或果糖中共发酵时也有产量提高的报导;但在没有甘油时,不能产生 1,3-丙二醇 (Tong, 上文)。在这些系统中,单一有机体将碳水化合物用作产生 NADH 的原料,并为细胞的维持和生长提供能量和碳。这些公开内容提示,糖类并没有进入产生 1,3-丙二醇的碳流动。没有一种情况是在不含外源甘油的情况下产生了 1,3-丙二醇。因此文献清楚地提示,用单一有机体由一种碳水化合物生产 1,3-丙二醇是不可能的。

[0016] 本发明解决的难题是用单一有机体由廉价的碳底物如葡萄糖或其它糖类生物生产 1,3-丙二醇。这种生产 1,3-丙二醇的生物法需要甘油作为一个两步顺序反应的底物,在这个两步顺序反应中,一种脱水酶 (典型的酶是一种依赖辅酶 B₁₂ 的脱水酶) 将甘油转化为中间产物 3-羟基丙醛,后者随后被一种依赖于 NADH- (或 NADPH) 的氧化还原酶还原成 1,3-丙二醇。由于所需的辅助因子非常复杂,因此用这种反应顺序生产 1,3-丙二醇的工业方法必须使用完整细胞作为催化剂。而且,为使这种生产方法在经济上可行,需要比甘油或二羟基丙酮便宜一些的原料。葡萄糖和其它碳水化合物是合适的底物,但正如上面所讨论

的,它们干扰 1,3- 丙二醇的生产。结果没有一种单一的有机体显示出能将葡萄糖转化成 1,3- 丙二醇。

[0017] 本发明的申请者已经解决了上述难题,本发明提供使用单一有机体将一种可发酵碳源直接生物转化为 1,3- 丙二醇的方法。葡萄糖被用作为模式底物,而且这种生物转化方法可应用于任何存在的微生物。携带一种脱水酶基因的微生物能将葡萄糖和其它糖类通过甘油降解途径转化成 1,3- 丙二醇,产量和选择性都非常好。而且,本发明还可通用于包括任何一种能方便地转化为 1) 甘油、2) 二羟基丙酮、或 3) 甘油氧化而成的 C3 化合物(例如甘油 3- 磷酸)或 4) 二羟基丙酮氧化而成的 C3 化合物(例如磷酸二羟基丙酮或甘油醛 3- 磷酸)的碳底物。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明包括使用单一微生物将一种碳底物生物转化为 1,3- 丙二醇的方法,这种方法通过将所说的微生物与所说的底物接触来进行,所说的微生物至少带有一个能表达一种脱水酶的基因。这种微生物可以是野生型的,或者是遗传性状改变了的,例如一种重组微生物或微生物的一种突变体。脱水酶优选为一种甘油脱水酶或一种二醇脱水酶。

[0020] 本发明进一步包括上述方法的产物。

[0021] 本发明进一步包括一种粘粒,这种粘粒含有一个从肺炎克雷伯氏菌中分离的 35kb 的 DNA 片断,其中所说的 DNA 片断编码一种有活性的甘油脱水酶,其限制酶切图谱见图 1 的泳道 1 和泳道 2。这种粘粒在转入一种微生物时,能代谢一种碳底物特别是葡萄糖产生 1,3- 丙二醇。

[0022] 本发明进一步包括一种转化的微生物,这种转化的微生物包含宿主微生物和上面所说的粘粒或所说粘粒的编码一种活性功能蛋白但不是甘油脱水酶的任何 DNA 片断。

[0023] 本发明还包括一种生产 1,3- 丙二醇的生物转化方法,这种生物转化方法包括,在合适的条件下将甘油与至少带有一个能表达一种脱水酶的基因的单一微生物接触,所用的微生物选自曲霉属、酵母属、接合酵母属、毕赤酵母属、克鲁维酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、德巴利酵母属、毛霉属、球拟酵母属、甲基菌属、沙门氏菌属、芽胞杆菌属、链霉菌属和假单胞菌属。

[0024] 本发明还包括一种生产 1,3- 丙二醇的生物转化方法,这种生物转化方法包括,在合适的条件下将一种碳底物与至少带有一个能表达一种脱水酶的基因的单一微生物接触,其中所说的基因编码甘油脱水酶,并分离自克雷伯氏菌属、乳杆菌属、肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、暗杆菌属、泥杆菌属和梭菌属。

[0025] 本发明还包括一种生产 1,3- 丙二醇的生物转化方法,这种生物转化方法包括,在合适的条件下将一种碳底物与至少带有一个能表达一种脱水酶的基因的单一微生物接触,其中所说的基因编码甘油脱水酶,并分离自克雷伯氏菌属和沙门氏菌属。

[0026] 优选的宿主微生物选自柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、梭菌属、克雷伯氏菌属、气杆菌属、乳杆菌属、曲霉属、酵母属、接合酵母属、毕赤酵母属、克鲁维酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、德巴利酵母属、毛霉属、球拟酵母属、甲基菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、芽胞杆菌属、链霉菌属和假单胞菌属。

[0027] 本发明包含的重组微生物在生物保藏物简述中进行阐述。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 显示粘粒 pKP1、pKP2 和 pKP4 的限制酶 (EcoRI、BamHI、EcoRV 和 NotI) 消化物及其在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上的分离图谱, 上述粘粒图谱分别标记为泳道 1、2 和 4。分子大小标准参照物上样在末端泳道。标记为数字 1 和 2 的泳道代表含有一个甘油脱水酶的粘粒。

[0030] 图 2 显示 pKP1 的部分物理图谱和各基因以 DNA 序列为基础的位置。这些基因的鉴定基于推导出的开放阅读框与 Genbank 数据库的比较, 比较所用的软件为 Wisconsin 大学的序列分析软件提供的 Tfasta 程序 (Genetics Computer Group, 1991 年 4 月, 第 7 版, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)。

[0031] 生物保藏物和序列简述

[0032] 含有粘粒 pKP1 的转化大肠杆菌 DH5 α 依照《布达佩斯条约》于 1995 年 4 月 18 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC69789, 粘粒 pKP1 含有克雷伯氏菌基因组的编码甘油脱水酶的部分。含有粘粒 pKP4 的转化大肠杆菌 DH5 α 依照《布达佩斯条约》于 1995 年 4 月 18 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC69790, 粘粒 pKP4 含有克雷伯氏菌基因组的编码二醇脱水酶的部分。转化有一个含 dhaB 操纵子的质粒的铜绿假单胞菌菌株 PAO 2845 :pDT9 依照《布达佩斯条约》于 1996 年 4 月 11 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC55760。转化有非复制型质粒的巴斯德毕赤酵母菌株 MSP42.81 依照《布达佩斯条约》于 1996 年 4 月 11 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC74363, 非复制型质粒上含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 基因的表达盒。转化有一个含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 操纵子的质粒的啤酒酵母菌株 pMCK1/10/17 (HM) #A, 在本国际申请提交前依照《布达佩斯条约》于 1996 年 5 月 9 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC74370。转化有一个含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 操纵子的质粒的浅青紫链霉菌菌株 SL/14.2, 在本国际申请提交前依照《布达佩斯条约》于 1996 年 5 月 9 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC98052。转化有一个含有 dhaB1、dhaB2 和 dhaB3 操纵子的质粒的地衣芽孢杆菌菌株 BG188/pM26 (克隆 #8), 在本国际申请提交前依照《布达佩斯条约》于 1996 年 5 月 9 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC98051。转化有一个含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 操纵子的质粒的枯草芽孢杆菌菌株 BG2864/pM27 (克隆 #1), 在本国际申请提交前依照《布达佩斯条约》于 1996 年 5 月 9 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC98050。转化有一个含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 操纵子的质粒的黑曲霉株 TGR40-13, 在本国际申请提交前依照《布达佩斯条约》于 1996 年 5 月 9 日保藏在 ATCC, 并被命名为 ATCC74369。“ATCC”指位于 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 U.S.A 的美国典型培养物保藏中心国际保藏处。命名是指保藏物的登记号。

[0033] 本发明的申请人提供 46 个序列, 这些序列遵循“专利申请中核苷酸和氨基酸序列标准表述的规定”(EPO 局长决议的附录 I 和附录 II, 发表于 OJ EPO 的 No. 2 增补件, 12/1992), 并遵循 37 C.F.R. 1.821-1825 和附录 A 和 B (“含有核苷酸和 / 或氨基酸序列的申请文件的要求”)。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明提供一个在单一有机体中由可发酵的碳源生物生产 1,3-丙二醇的方法。这种方法包括一种含脱水酶的微生物, 这种微生物与一种碳底物相接触, 而 1,3-丙二醇从生长培养基中分离。这种单一有机体可以是野生型有机体, 或者可以是携带有编码脱水酶的基因的、遗传性状改变了的有机体。

[0036] 本发明提供一个快速、廉价和符合环保的 1,3- 丙二醇单体来源,这种 1,3- 丙二醇单体在聚酯和其它聚合物的生产中非常有用。

[0037] 在这里,下列词可用于权利要求和说明书的解释。

[0038] 在这里,“核酸”一词指由单体(核苷酸)组成的大分子,它可以是单链的,也可以是双链的。核苷酸包含一分子的糖、磷酸以及一分子的嘌呤或嘧啶。“核酸片断”指所给核酸分子的一个部分。在高等植物中,脱氧核糖核酸(DNA)是遗传物质,而核糖核酸(RNA)参与 DNA 到蛋白质的信息转移。“基因组”指有机体中每个细胞所含的全部遗传物质。“核苷酸序列”一词指 DNA 或 RNA 的多聚物,它可以是单链的,也可以是双链的,并可选择地含有能掺入 DNA 或 RNA 多聚物的人工合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。

[0039] 在这里,“基本上相同”指 DNA 序列可有并不引起所编码氨基酸改变的碱基改变,或者碱基改变使一个或多个氨基酸改变,但并不影响 DNA 序列所编码蛋白质的功能特性。所以应当理解本发明所包含的要大于序列特例。本发明也包括基本上不影响结果蛋白分子功能特性的序列修改,诸如在序列中产生沉默改变的删除、插入或替换。例如,本发明包括反映遗传密码简并性的基因序列改变,或在给定位点导致产生一个化学等价氨基酸的基因序列改变。因此,疏水性氨基酸丙氨酸的密码子可被编码另一个疏水性稍弱的氨基酸残基如甘氨酸的密码子取代,或可被编码疏水性更强的氨基酸残基的密码子取代,如被编码缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸的密码子取代。同样,导致一个带负电荷的残基取代另一个带负电荷的残基的改变,如天冬氨酸取代谷氨酸,或一个带正电荷的残基取代另一个带正电荷的残基,如赖氨酸取代精氨酸,预计也可产生生物等价产物。导致蛋白分子的 N 末端部分和 C 末端部分改变的核苷酸改变也不一定改变蛋白的活性。在某些情况下,事实上需要使序列突变来研究改变对蛋白生物活性的影响。上面每种设想的修改和编码产物保留的生物活性的鉴定都是本领域的常规技术。而且,本领域的技术人员应知道,本发明所包括的“基本上相同”的序列也可由它们与这里所举的序列例子在严格条件下(0.1XSSC,0.1% SDS,65℃)杂交的能力来定义。

[0040] “基因”指表达一个特殊蛋白的核酸片断,包括编码序列前面(5' 非编码区)和后面(3' 非编码区)的调节序列。“天然”或“野生型”的基因指自然界中发现的带有其自身调节序列的基因。

[0041] “遗传改变的或遗传改变的微生物”指适用于本发明的、天然遗传机制经历了改变的任何微生物。微生物的遗传改变可通过含异源核酸片断的载体转化、诱变剂(例如,UV 灯,乙磺酸)诱变、或其它任何能在细胞基因组中产生稳定改变的方法来进行。

[0042] “构建物”一词指任何来源的质粒、病毒、自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列,它们可以是线型的或环状的、单链的或双链的 DNA 或 RNA,在它们中,多种核苷酸序列组合或重组成一个独特的结构,这种独特的结构能将一个启动子片断、所选基因产物的 DNA 序列以及合适的 3' 非翻译序列导入一个细胞。

[0043] “转化”或“转染”指细胞在整合核酸后获得新的基因。所获得的基因可以整合在染色体中,也可作为染色体外复制序列导入。“转化子”指转化的产物。“遗传改变的”指用转化或突变的方法改变遗传物质的过程。

[0044] “表达”指由编码基因产物序列的基因经转录和翻译得到基因产物。

[0045] 在这里,“质粒”或“载体”或“粘粒”指染色体外的遗传元件,它们常常带有不是细

胞中心代谢的一部分的基因,并且通常为双链环状的 DNA 分子形式。

[0046] “脱水酶”指任何能够将甘油分子异构或转化为 3-羟基丙醛产物的酶。根据本发明的目的,脱水酶包括甘油脱水酶或二醇脱水酶,它们的优选底物分别为甘油和 1,2-丙二醇。

[0047] “碳底物”或“碳源”的意思是任何能被一种微生物代谢的碳源,其中底物中至少有一个碳原子。本发明的前提是,碳底物不是甘油或二羟基丙酮。

[0048] 重组有机体的构建

[0049] 本发明的重组有机体含有将碳底物转化为 1,3-丙二醇的酶促途径的编码基因,重组有机体可用本领域熟知的技术进行构建。在本发明中,编码脱水酶的基因可从一个天然宿主如克雷伯氏菌中分离,并用来转化大肠杆菌宿主菌株 DH5 α 、ECL707 和 AA200。

[0050] 从一个细菌的基因组中获取所需基因的方法在分子生物学领域中非常普通和熟知。例如,如果基因的序列是已知的,就用限制性内切酶消化来构建合适的基因组文库,并可用与所需基因序列互补的探针进行筛选。一旦分离到序列,就可用标准的引物指导下的扩增方法如聚合酶链反应 (PCR) (U. S. 4, 683, 202) 扩增 DNA,来获得大量适于用载体进行转化的 DNA。

[0051] 另外,可以构建粘粒文库,即可将大片断的基因组 DNA (35–45kb) 包装到载体中,用于转化合适的宿主。粘粒载体的独特性在于能容纳大量的 DNA。粘粒一般至少有一个拷贝的 cos DNA 序列,cos 序列对于外源 DNA 的包装及随后的环化是必需的。除了 cos 序列外,这些载体还含有复制的起始区域 (Col E1) 和药物抗性标记 (如抗氨苄青霉素或抗新霉素的基因)。用粘粒来转化合适细菌宿主的方法在 Sambrook, J. 等,《分子克隆实验指南》,第二版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press 中有详细的介绍,在此引入作为参考。

[0052] 对典型的粘粒克隆来说,外源 DNA 分离后,使用合适的限制性内切酶将其连接到粘粒载体的 cos 区域。然后含有线性外源 DNA 的粘粒载体与一个 DNA 包装载体如 λ 噬菌体反应。在包装过程中,cos 位点被切割,外源 DNA 被包装到细菌病毒颗粒的头部。然后这些颗粒被用于转染合适的宿主细胞,例如大肠杆菌。一旦注射到细胞内部,外源 DNA 在 cos 粘性末端的影响下环化。通过这种方式,外源 DNA 的大片断能被导入重组宿主细胞,并在其中表达。

[0053] 粘粒载体和粘粒转化方法在本发明的上下文中被用来从已知能将甘油加工成 1,3-丙二醇的细菌种属中克隆基因组 DNA 的大片断。特别是,来自肺炎克雷伯氏菌的基因组 DNA 用本领域熟知的方法进行了分离,并用限制性内切酶 Sau 3A 消化,然后插入到粘粒载体 Supercos 1TM,并用 GigapackII 包装抽提物包装。载体构建后,用此粘粒 DNA 转化大肠杆菌 XL1-Blue MR 细胞。使细胞在存在甘油的条件下生长,并分析培养基中 1,3-丙二醇的形成,来筛选能够将甘油转化为 1,3-丙二醇的转化子。

[0054] 对两个 1,3-丙二醇阳性的转化子进行了分析,并将其粘粒命名为 pKP1 和 pKP2。DNA 测序表明它们与来自弗氏柠檬酸杆菌的甘油脱水酶有着广泛的同源性,这证明这些转化子含有编码甘油脱水酶基因的 DNA。对其它 1,3-丙二醇阳性的转化子也进行了分析,它们的粘粒命名为 pKP4 和 pKP5。DNA 测序表明这些粘粒带有编码二醇脱水酶基因的 DNA。

[0055] 虽然本发明使用了来自一个克雷伯氏菌属粘粒的分离基因,脱水酶基因的其它来

源还可包括但不限于柠檬酸杆菌属、梭菌属和沙门氏菌属。

[0056] 能正向影响 1,3- 丙二醇产生的其它基因可在合适的宿主中表达。例如很可能非常需要甘油降解途径和 / 或其它途径中的特定酶超量表达,比现在在野生型细胞中发现的表达水平要高得多。这可通过将编码这些酶的基因选择性克隆到多拷贝质粒中或将这些基因置于一个诱导型或组成型的强启动子的后面来完成。超量表达所需蛋白的方法在分子生物学领域非常普通和熟知,在以上 Sambrook 文中可找到例子。而且,用本领域的技术人员熟知的方法对特定基因进行特异性地删除,会明显影响 1,3- 丙二醇的产生。这些方法的例子可在《酶学方法》,217 卷, R. Wu 编, Academic Press :San Diego (1993) 中找到。

[0057] 突变体

[0058] 应当理解,除了举例所用的细胞,本发明还能使用有着单一或多个突变的细胞,这些突变被特别设计来增加 1,3- 丙二醇的产量。通常将碳原料偏离到不能产生 1,3- 丙二醇的途径的细胞,或出现明显的分解代谢产物阻遏的细胞,都可通过突变来消除这些表型缺陷。例如,许多野生型细胞可因培养基中的葡萄糖和副产物产生分解代谢阻遏。可以理解这些有机体的突变株,如能抵抗葡萄糖的阻遏而生产 1,3- 丙二醇,将在本发明中特别有用。

[0059] 产生突变体的方法在本领域中非常普通和熟知。例如,野生型细胞可暴露在各种试剂如辐射或化学诱变剂中,然后筛选所需要的表型。当用辐射来产生突变时,紫外线 (UV) 或离子辐射都可以使用。用于遗传突变的合适短波紫外线的波长范围为 200nm 至 300nm,优选波长为 254nm。这个波长的 UV 辐射原则上导致核酸序列中的鸟嘌呤和胞嘧啶改变为腺嘌呤和胸腺嘧啶。因为所有的细胞都有 DNA 修复机制,能修复多数 UV 诱导的突变,可加入试剂如咖啡碱和其它抑制剂来干扰修复过程,使有效突变的数量变得最大。使用波长在 300nm 至 400nm 范围的长波 UV 诱变也可以,但除非与多种激活剂如能与 DNA 作用的补骨脂素染料联用,一般不如短波 UV 有效。

[0060] 用化学试剂来产生突变体也非常有效,常用的物质包括能影响非复制 DNA 的化合物如 HNO_2 和 NH_2OH ,以及影响复制 DNA 的试剂如吖啶染料,吖啶染料因能引起移码突变而非常引人注目。用辐射或化学试剂产生突变体的特殊方法在本领域中文献非常多。例如见, Thomas DBrock,《生物技术:工业微生物教程》,第二版 (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA., 或 Deshpande, Mukund V.,《应用生物化学和生物技术》,36 卷,227 页, (1992), 这里引入作为参考。

[0061] 诱变发生后,具有所需表型的突变体可用多种方法进行选择。随机筛选是最常用的,即选择能产生所需产物或中间产物的诱变细胞。另外,可使诱变群体在只有抗性克隆能够生长的选择培养基上生长来选择性地分离突变体。突变体选择的方法在工业微生物领域已经非常完备和熟知。见 Brook, 上文, DeMancilha 等,《食品化学》,14 卷,313 页, (1984)。

[0062] 1,3- 丙二醇产生途径中的突变和转化:

[0063] 代表性的酶途径。从葡萄糖产生 1,3- 丙二醇可由下面的系列步骤来完成。这个步骤系列是本领域的技术人员所熟知的多种途径的代表。葡萄糖经过一系列步骤在糖酵解途径的酶催化下转化为磷酸二羟基丙酮 (DHAP) 和 3- 磷酸甘油醛 (3-PG)。然后,甘油可由 DHAP 水解成二羟基丙酮 (DHA) 后还原形成,或由 DHAP 还原成甘油 3- 磷酸 (G3P) 后水解来形成。水解步骤可由各种已知没有底物特异性的细胞磷酸酶催化,或者这种活性可用转化来导入宿主。还原步骤可由一种 NAD^+ (或 NADP^+) 相连的宿主酶催化,或者这种活性可用转

化来导入宿主。值得注意的是 dha 调节子含有一个甘油脱氢酶 (E. C. 1. 1. 1. 6), 这个酶催化方程 3 的逆反应。

[0064] 甘油 $\rightarrow$ 3-HP+H₂O (方程 1)

[0065] 3-HP+NADH+H⁺ $\rightarrow$ 1,3- 丙二醇 +NAD⁺ (方程 2)

[0066] 甘油+NAD⁺ $\rightarrow$ DHA+NADH+H⁺ (方程 3)

[0067] 甘油经 3- 羟基丙醛 (3-HP) 中间产物转化为 1,3- 丙二醇, 这已在前面作了详细介绍。从甘油产生 3-HP (方程 1) 是由脱水酶催化的, 脱水酶可以由宿主编码或用转化的方法导入宿主。这种脱水酶可以是甘油脱水酶 (E. C. 4. 2. 1. 30)、二醇脱水酶 (E. C. 4. 2. 1. 28) 或任何能够催化这个转化的酶。甘油脱水酶是由 dha 调节子编码的, 而二醇脱水酶不是。从 3-HP 产生 1,3- 丙二醇 (方程 2) 是由一种 NAD⁺ (或 NADP⁺) 相连的宿主酶催化, 或者这种活性可用转化来导入宿主。这个产生 1,3- 丙二醇的最后反应可由 1,3- 丙二醇脱氢酶 (E. C. 1. 1. 1. 202) 或其它乙醇脱氢酶催化。

[0068] 影响碳通道的突变和转化。多种在 1,3- 丙二醇产生途径含有变异的突变有机体在本发明中非常有用。例如将一个丙糖磷酸异构酶突变 (tpi⁻) 引入本发明的微生物是一个应用突变来促进碳通道运行的例子。突变可直接针对一个结构基因来修复或提高一个酶的活性, 或直接针对一个调节基因来调节一个酶活性的表达水平。

[0069] 另外, 转化和突变可组合使用来控制特定的酶活性, 从而增加 1,3- 丙二醇的生成。因此, 对能提高 1,3- 丙二醇产生的全细胞催化能力的修饰也在本发明的范围内。

[0070] 培养基和碳底物

[0071] 本发明的发酵培养基必须含有合适的碳底物。合适的碳底物包括但不限于单糖 (如葡萄糖和果糖)、寡糖 (如乳糖和蔗糖)、多糖 (如淀粉或纤维素) 或其混合物和从可再生的原料 (如酪清、玉米浆、蔗糖甜菜浆、大麦麦芽) 获得的未纯化的混合物。另外, 碳底物还可以是已经证明可代谢转化为关键生物化学中间物的一碳底物如二氧化碳或甲醇。由单一碳源 (例如甲醇、甲醛或甲酸) 生产甘油在嗜甲基酵母 (K. Yamada 等, 《农业生物化学》, 53 卷第 2 期, 541-543 页, (1989)) 和细菌 (Hunter 等, 《生物化学》, 24 卷, 4148-4155 页, (1985)) 中都已报道。这些有机体能同化氧化状态的范围从甲醇到甲酸的单碳化合物, 并产生甘油。碳同化的途径可通过核酮糖单磷酸、丝氨酸、或木酮糖单磷酸 (Gottschalk, 《细菌代谢》, 第二版, Springer-Verlag: New York (1986)) 等途径。核酮糖单磷酸途径包括甲酸与核酮糖 -5- 磷酸结合而形成一个六碳糖, 然后这个六碳糖转化为果糖并最终转化为三碳产物甘油醛 -3- 磷酸。同样, 丝氨酸途径经过亚甲基四氢叶酸将一碳化合物同化到糖酵解途径中。

[0072] 除了一种或两种碳底物外, 嗜甲基有机体还已知有着利用多种含碳化合物 (如甲胺和葡萄糖胺) 和多种氨基酸的代谢活性。例如, 嗜甲基酵母已知可利用甲胺的碳来形成海藻糖和甘油 (Bellion 等, 《微生物在一碳化合物上的生长》 (Microb. Growth C1 Compd), [Int. Symp], 第 7 期 (1993), 415-32 页. 编辑: Murrel, J. Collin; Kelly, Don P. 出版: Intercept, Andover, UK)。同样, 假丝酵母属的许多种能代谢丙氨酸或油酸 (Sulter 等, 《微生物学丛刊》, (1990), 153 卷第 5 期, 485-9 页)。应当理解本发明所用的碳源可包括多种含碳底物, 并仅由有机体的选择来限制。

[0073] 虽然可以理解上述所有提到的碳底物及其混合物在本发明中是适用的, 但优选

的底物是葡萄糖、果糖、蔗糖或甲醇。

[0074] 除了一种合适的碳源,发酵培养基还必须含有本领域的技术人员所熟知的合适的矿物质、盐、辅助因子、缓冲液和其它成分,这些成分应适于培养物的生长和启动 1,3- 丙二醇产生所必需的酶促途径。特别应当注意 Co(II) 的盐类和 / 或维生素 B₁₂ 或其前体。

[0075] 培养条件

[0076] 细胞一般在合适的培养基中 30℃ 进行培养。本发明优选的生长培养基为普通的商业制备培养基,例如 Luria Bertani (LB) 肉汤、SabouraudDextrose (SD) 肉汤、或酵母培养基 (YM) 肉汤。其它的精确或合成的生长培养基也可以使用,而且特殊微生物生长的合适培养基应为微生物学和发酵科学领域的技术人员所熟知的。还可在反应培养基中使用已知能直接或间接调节代谢终产物抑制的试剂,如环腺苷 2' :3' - 单磷酸。同样,还可将已知能调节酶活性从而导致 1,3- 丙二醇产生增加的化合物 (如甲基紫精) 与遗传操作结合使用,或用来代替遗传操作。

[0077] 发酵的合适 pH 范围在 pH5.0 至 pH9.0 之间,其中 pH6.0 至 pH8.0 为优选的初始条件。

[0078] 反应可在有氧或无氧的条件下进行,其中,优选的条件是无氧或微氧。

[0079] 分批发酵和连续发酵

[0080] 本方法包括一个分批发酵的方法。经典的分批发酵是一个封闭的系统,培养基的成分在发酵开始时设置好,并在发酵过程中不再人为改变。因此,在发酵开始时培养基与所需的有机体或有机体混合物一起接种,在发酵开始后不再向系统中加入任何东西。在典型情况下,“分批”发酵是就碳源的加入而言的,人们常常需要控制某些因素如 pH 和氧浓度。在分批发酵系统中,系统的代谢和各组分的生物量持续改变直到发酵结束。在分批培养物中,细胞从静止的延迟期进入高速生长的对数期并最后进入稳定期,在稳定期中,细胞的生长率降低或停止。如果不进行处理,处于稳定期的细胞会最终死亡。处于对数期的细胞通常产生大多数的终产物和中间物。

[0081] 补料分批系统是标准分批系统的一个变化。补料分批发酵方法也适用于本发明,它除了包括经典的分批系统外,还包括在发酵过程中增加底物的量。补料分批系统在分解代谢物抑制细胞代谢时非常有用,因为在这种情况下需要限制培养基中的底物量。测定补料分批系统中的实际底物浓度非常困难,因而只能以可测量因素的变化为基础进行估计,例如用 pH、溶解氧和废气如 CO₂ 的分压的变化进行估计。分批发酵和补料分批发酵在本领域非常普通和熟知,相应的例子可在以上 Brock 文中找到。

[0082] 虽然本发明以分批模式进行,但应当理解这些方法也适合于连续发酵方法。连续发酵是一个开放系统,在连续发酵中,一种精确发酵培养基被连续加入生物反应器中,同时等量的反应培养基被移出。连续发酵一般使培养物维持持续的高浓度,而细胞主要处于对数生长期。

[0083] 连续发酵允许对影响细胞生长或终产物浓度的一个因素或多种因素进行调节。例如,一种方法能严格保持限制性养分如碳源或氮水平,而让其它参数改变。在其它系统中,可以连续改变多种影响生长的因子,而细胞浓度 (用细胞浊度进行测量) 保持恒定。连续系统尽量保持稳定的生长环境,因此,发酵中由于取出培养基而造成的细胞损失必须与细胞生长率相平衡。在连续发酵过程中调节养分和生长因子的方法以及使产物形成率达到最

大的技术在工业微生物领域是众所周知的,而且多种方法已由 Brock, 上文,作了详细介绍。

[0084] 应当理解,本发明可使用分批、补料分批或连续的方法实现,任何已知的发酵模式都是适用的。另外,应当理解细胞可作为全细胞催化物固定在底物上,为 1,3- 丙二醇的生成提供发酵环境。

[0085] 1,3- 丙二醇的纯化和鉴定

[0086] 从发酵培养基中纯化 1,3- 丙二醇的方法为本领域所熟知。例如,丙二醇可用下述方法从细胞培养基中获得,这个方法包括用一种有机溶剂抽提反应混合物、蒸馏和柱层析(U. S. 5, 356, 812)。在这个过程中,一个特别好的有机溶剂是环己烷(U. S. 5, 008, 473)。

[0087] 可以通过对培养基进行高压液相色谱(HPLC)来直接鉴定 1,3- 丙二醇。在本发明中优选的方法是在一个分析用离子交换柱上,使用等梯度的 0.01N 的硫酸作流动相对发酵培养基进行分析。

[0088] 细胞

[0089] 适用于本发明的细胞包括那些携带脱水酶的细胞。应当理解,合适的细胞既可以是原核细胞也可以是真核细胞,并仅受它们表达活性脱水酶的能力的限制。在本发明中特别有用的细胞是能方便地应用于大规模发酵方法的细胞。这样的有机体在工业生物工程领域是众所周知的,它们的例子可在《应用于工业和农业的重组微生物》,Murooka 等编辑,Marcel Dekker, Inc., New York, New York (1994) 中找到,包括发酵型的细菌以及酵母和丝状真菌。典型的酶可以是甘油脱水酶也可以是二醇脱水酶,其特异性底物分别为甘油和 1,2- 丙二醇。脱水酶能将甘油转化为羟基丙醛(3-HPA),然后 3-HPA 转化为 1,3- 丙二醇。含有这个途径的细胞可包括来自柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、梭菌属、克雷伯氏菌属、沙门氏菌属和乳杆菌属的突变或重组有机体。为本领域的技术人员所熟知的能通过发酵产生甘油的微生物都可以作为重组脱水酶的宿主,例如曲霉属、酵母属、接合酵母属、毕赤酵母属、克鲁维酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、Dunaliella、德巴利酵母属、毛霉属、球拟酵母属和甲基菌属。其它在本发明中适合用作宿主的细胞包括芽胞杆菌属、埃希氏菌属、假单胞菌属和链霉菌属。若不囿于理论,可以认为,自然界中存在的、属于上面所提到种类的有机体都适用于本发明。

[0090] 在申请人的实验工作基础上,应当理解多种细胞可用于本发明。例如申请人已经证明,在遗传和表型组合上差别很大的多种细胞都能将一种合适的碳底物生物转化为 1,3- 丙二醇,所举的细胞例子包括:一个组合有 dha 基因的肺炎克雷伯氏菌突变菌株、含有克雷伯氏菌属基因组中甘油或二醇脱水酶编码基因的元件的重组大肠杆菌菌株、和也用克雷伯氏菌属的元件转染并在编码磷酸丙糖异构酶的基因上带有一个突变的重组大肠杆菌(tpi⁻)菌株。

[0091] 虽然,即使在存在葡萄糖和木糖的情况下,含有来自肺炎克雷伯氏菌的 dha 调节子的大肠杆菌重组子也能将甘油转化为 1,3- 丙二醇(Tong 等,《应用生物化学和生物技术》,34 卷,149 页(1992))。但在仅有葡萄糖存在的情况下,在这些有机体中不能检测到 1,3- 丙二醇。与这一公开内容不同,本发明的申请人发现,三株大肠杆菌在没有外源加入甘油存在的情况下由葡萄糖原料产生 1,3- 丙二醇,这三株大肠杆菌携带两种独立分离的、含来自肺炎克雷伯氏菌的 dha 调节子的粘粒中的一种。携带有含肺炎克雷伯氏菌 dha 调节子的粘粒载体 pKP-1 或 pKP-2 的大肠杆菌菌株 ECL707,显示在没有外源加入甘油的情况下

可以检测到由葡萄糖产生的 1,3- 丙二醇,虽然产量不高(实施例 4)。从另一个宿主有机体 -DH5 α 构建而来的重组大肠杆菌菌株也含有 pKP-1 或 pKP-2 粘粒载体,这种菌株被发现在合适的条件下由葡萄糖产生 1,3- 丙二醇比 ECL707 重组体有效得多,(实施例 3)。在实施例 4 的条件下,由葡萄糖产生 1,3- 丙二醇更有效的菌株是含有粘粒载体 pKP-1 或 pKP-2 的重组大肠杆菌菌株 AA200,实施例 2,大肠杆菌 AA200 含有一个有缺陷的丙糖磷酸异构酶(tpi^-)。

[0092] 从转化反应独立分离株的混合物中选择了 AA200-pKP1 的一个菌株作进一步的研究,这株细菌经过一个两阶段反应将葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇。在第一阶段,菌株 AA200-pKP1-5 在不含葡萄糖和甘油的条件下生长到高细胞浓度。在第二阶段,将培养好的细胞悬浮在含有葡萄糖但没有甘油的培养基中,细胞就会以很高的转化率和选择性将葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇,实施例 5。虽然在免疫化学、色谱和遗传上不同,依赖于辅酶 B_{12} 的酶-甘油脱水酶(E. C. 4. 2. 1. 30)和二醇脱水酶(E. C. 4. 2. 1. 28)都能催化甘油转化为 3- 羟基丙醛。dha 调节子中包含甘油脱水酶,但不含二醇脱水酶。肺炎克雷伯氏菌 ATCC8724 含有一个二醇脱水酶而不是甘油脱水酶,它能将甘油转化为 1,3- 丙二醇(Forage 等,《细菌学杂志》,149 卷,413 页,(1982))。重组大肠杆菌菌株 ECL707 和 AA200 均含有能编码二醇脱水酶的粘粒 pKP4,它们都能将葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇,实施例 2 和实施例 4。

[0093] 肺炎克雷伯氏菌 ECL2106 是从一个天然存在的菌株通过诱变制备而来的(Ruch 等,《细菌学杂志》124 卷,348 页,(1975)),它能够组成型表达 dha 调节子(Ruch 等,上文;Johnson 等,《细菌学杂志》164 卷,479 页(1985))。用同样方法制备了具有同样表型的肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955 的一个衍生菌株(Forage 等,《细菌学杂志》149 卷,413 页(1982))。克雷伯氏菌属 dha 结构基因的表达部分受一个抑制子的控制(dha R 的产物)(Sprenger 等,《普通微生物学杂志》135 卷,1255 页(1989))。本发明的申请人已经证示,含有组成型 dha 结构基因的 ECL2106 能在没有外源加入甘油的条件下,由葡萄糖原料生产 1,3- 丙二醇,实施例 6。这与野生型的肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955 相反。肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955 在相同条件下不能产生可检测水平的 1,3- 丙二醇,实施例 6。

[0094] ECL2016 中 dha 结构基因的表达进一步受到分解代谢物表达的控制(Sprenger 等,《普通微生物学杂志》135 卷,1255 页,(1989))。将必需的结构基因置于另外的启动子控制下能够消除分解代谢物抑制。这一点已在弗氏柠檬酸杆菌的 1,3- 丙二醇氧化还原酶(dhaT)和产酸克雷伯氏菌的二醇脱水酶中得到了证实(Daniel 等,《细菌学杂志》177 卷,2151 页(1995)和 Tobimatsu 等,《生物与化学杂志》270 卷,7142 页,(1995))。通过这种方式在 ECL2106 中消除分解代谢物抑制,成功地提高了在没有外源甘油的情况下由葡萄糖生产 1,3- 丙二醇的产量。按前述的方法使用合适的碳通道可进一步提高 1,3- 丙二醇产量,例如使用 tpi^- 突变。

[0095] 因为柠檬酸杆菌和克雷伯氏菌的 dha 调节子非常相似。本领域的技术人员可以理解,在克雷伯氏菌中用来在没有外源甘油的条件下由葡萄糖生产 1,3- 丙二醇的技术也可用于柠檬酸杆菌。而且,因为丁酸梭菌的甘油代谢与肺炎克雷伯氏菌相同(Zeng 等,《生物技术与生物工程》44 卷,902 页,(1994)),这些技术也可用于梭菌。

实施例

[0096] 通用方法

[0097] 磷酸化、连接和转化的过程是本领域众所周知的,在下面的实施例中适用的技术可在 Sambrook, J 等,《分子克隆实验指南》,第二版, ColdSpring Harbor Laboratory Press(1989) 中找到。

[0098] 适用于细菌培养物维持和生长的材料和方法是本领域众所周知的。在下面的实施例中适用的技术可在《普通细菌学方法手册》(PhillippGerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg 和 G. Briggs Phillips, 编辑), 美国微生物学会, Washington, DC(1994) 中,或在 Thomas D. Brock 的《生物技术:工业微生物教程》,第二版 (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 中找到。除非另行说明,所有用于细菌生长和维持的试剂和材料都购自 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)、DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) 和 Sigma Chemical Company (St Louis, MO)。

[0099] 缩写的含义如下:“h”指小时,“min”指分钟,“sec”指秒,“d”指天,“mL”指毫升,“L”指升,50amp 为 50ug/mL 的氨苄青霉素, LB-50amp 为含 50ug/mL 氨苄青霉素的 Luria-Bertani 肉汤。

[0100] 在表中使用了下列缩写。“Con”为转化,“Sel”是以碳为基础的选择性,“nd”指没有检测。

[0101] 酶试验

[0102] 无细胞抽提物中的甘油脱水酶用 1,2- 丙二醇作底物来测定。这个试验的基础是醛与甲基苯并-2- 噻唑酮腈反应,详见 Forage 和 Foster 的介绍(《生物物理与生物化学学报》(B. B. A) 569, 249, (1979))。1,3- 丙二醇氧化还原酶有时被称为 1,3- 丙二醇脱氢酶,其活性可按照 Johson 和 Lin,《细菌学杂志》169 卷,2050 页 (1987) 介绍的方法进行测定。

[0103] 1,3- 丙二醇的分离和鉴定

[0104] 甘油到 1,3- 丙二醇的转化用 HPLC 来监测,使用色谱领域的技术人员常用的标准技术和材料进行分析。一个合适的方法是使用一台 WatersMaxima 820HPLC 系统,并用 UV (210nm) 和 RI 进行检测。样品注入一个已装有 Shodex SH-1011P 预装柱 (6mm×50mm) 的 Shodex SH-1011 柱 (8mm×300mm, 购自 Waters, Milford, MA), 温度控制在 50℃, 使用 0.01N H₂SO₄ 作流动相, 流速为 0.5mL/min。当需要进行定量分析时, 样品与作为外部标准的一定量的三甲基乙酸一起制备。一般来说, 甘油 (RI 检测)、1,3- 丙二醇 (RI 检测) 和三甲基乙酸 (UV 和 RI 检测) 的保留时间分别为 20.67 分、20.68 分和 35.03 分。

[0105] 1,3- 丙二醇的产生用 GC/MS 来证实。使用 GC/MS 领域的技术人员常用的技术和材料进行分析。一个合适的方法是使用一台与 HewlettPackard 5971 系列质量选择检测器 (EI) 偶联的 Hewlett Packard 5890 系列 II 气相色谱和一个 HP-INNOWax 柱 (30m 长, 0.25mm i. d., 0.25micro film 厚)。所产生的 1,3- 丙二醇的保留时间和质谱图与确定的 1,3- 丙二醇 (m/e :57, 58) 进行比较。

[0106] 另一个 GC/MS 方法包含样品的衍生。在 1.0mL 样品 (例如, 培养物上清) 中加入 30uL 浓 (70% v/v) 高氯酸, 混匀后将样品冷冻并干燥。在干燥物中加入双 (三甲基硅) 三氯乙胺: 吡啶的 1 : 1 混合物 (300uL), 剧烈混匀, 在 65℃ 放置 1 小时。离心除去不溶物, 获得的液体分为两相, 用上层液体进行分析。在一个 DB-5 柱 (48m, 0.25mm I. D., 0.25um film 厚; 获自 J&W Scientific) 上对样品进行层析。从培养物上清中获得的 1,3- 丙二醇衍生物

的保留时间和质谱图与确定的标准物进行比较。TMS 衍生的 1,3-丙二醇的质谱图包括 205、177、130 和 115AMU 的特征离子。肺炎克雷伯氏菌粘粒文库的构建

[0107] 肺炎克雷伯氏菌 (ATCC25955) 在 100mL LB 培养基中 37℃ 通气培养 8 小时。使用 DuPont Sorvall GLC 2.B 离心机在室温下将细菌 (每管 25ml) 3000rpm 离心 15 分钟。取细菌沉淀并弃去上清。将细菌沉淀在 -20℃ 冷冻。按下面指出的方法分离染色体 DNA, 并注意避免 DNA 剪切 (即避免涡旋)。将每管细菌重新悬浮在 2.5mL 的 50mM Tris-10mM EDTA 中, 加入 500uL 溶菌酶 (1mg/mL)。温和悬浮细菌, 并将悬液在 37℃ 保温 15 分钟。在悬液中加入十二烷基硫酸钠至终浓度为 0.5%。这会导致溶液变清。在悬液中加入蛋白酶 K (50ug/mL) 并 55℃ 保温 2 小时。将试管取出转至一个冰槽中, 并加入氯化钠至终浓度 0.4M。在溶液中加入两倍体积的乙醇。用一根玻璃管插入界面使 DNA 温和地缠绕在其上。将 DNA 浸入一个含 70% 乙醇的试管中。真空干燥后, 将 DNA 重新悬浮于 50uL 水中, 并用分光光度法测定 DNA 的浓度。取小份 DNA 稀释后在 0.5% 的琼脂糖凝胶上观察 DNA 的完整性。

[0108] 染色体 DNA 按 Sambrook 等, 上文, 介绍的方法用 Sau 3A 部分消化, DNA (0.2ug) 用 2 单位的 Sau 3A (Promega, Madison, WI) 在室温下消化, 反应总体积为 200uL。在 0、5、10 和 20 分钟分别取样 (50uL), 转入含 5umol EDTA 的试管中, 将这些试管在 70℃ 保温 10 分钟。取一份 (2uL) 在 0.5% 的琼脂糖凝胶上电泳分析, 确定消化的水平, 剩余的样品 (48uL) 在 -20℃ 保存。将凝胶用溴化乙啶染色并在 UV 下观察来测定染色体的部分消化。观察到染色体 DNA 的大小随时间的延长而变小, 这表明染色体 DNA 的变小是由于 Sau 3A 作用。用标准程序方法从剩余样品中抽提 DNA (Sambrook 等, 上文)。

[0109] 肺炎克雷伯氏菌的部分消化 DNA 粘粒文库用 Supercos 粘粒载体试剂盒和 GigapackII 包装抽提物制备, 所用的试剂购自 Stratagene (La Jolla, CA)。操作按厂家提供的说明进行。包装后的肺炎克雷伯氏菌用转染大肠杆菌 XL1-Blue MR 来测定, 含有 4×10^4 至 1.0×10^5 的噬菌体滴度。

[0110] 从 6 个大肠杆菌转化子中分离到了粘粒 DNA, 并发现它们含有大的 DNA 插入片断 (25 至 30kb)。

[0111] 实施例 1

[0112] 用粘粒 DNA 克隆和转化大肠杆菌宿主细胞来表达 1,3-丙二醇培养基

[0113] 合成培养基 S12 用来筛选能产生 1,3-丙二醇的细菌转化子。S12 培养基含有: 10mM 硫酸铵、50mM 磷酸钾缓冲液, pH7.0、2mM MgCl_2 、0.7mM CaCl_2 、50uM MnCl_2 、1uM FeCl_3 、1uM ZnCl_2 、1.7uM CuSO_4 、2.5uM CoCl_2 、2.4uM Na_2MoO_4 和 2uM 盐酸硫胺素。

[0114] 培养基 A 用于生长和发酵, 它包含: 10mM 硫酸铵、50mM MOPS/KOH 缓冲液, pH7.5、5mM 磷酸钾缓冲液, pH7.5、2mM MgCl_2 、0.7mM CaCl_2 、50uM MnCl_2 、1uM FeCl_3 、1uM ZnCl_2 、1.72uM CuSO_4 、2.53uM CoCl_2 、2.4uM Na_2MoO_4 、2uM 盐酸硫胺素、0.01% 酵母抽提物、0.01% 酪蛋白氨基酸、0.8ug/mL 维生素 B_{12} 和 50amp。根据需要, 培养基 A 可补加 0.2% 的甘油或 0.2% 的甘油加 0.2% 的 D-葡萄糖。

[0115] 细胞

[0116] 肺炎克雷伯氏菌 ECL2106 (Ruch 等, 《细菌学杂志》124 卷, 348 页 (1975)) 在文献中也被称为产气克雷伯氏菌或产气杆菌。该菌获自 E. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA), 并作为实验室培养物保藏。

[0117] 肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955 购自美国典型培养物保藏中心 (Rockville MD)。

[0118] 大肠杆菌 DH5 α 购自 Gibco/BRL, 并用分离自肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955、含有编码甘油或二醇脱水酶的基因的粘粒 DNA 进行了转化。含有甘油脱水酶的粘粒被确定为 pKP1 和 pKP2, 含有二醇脱水酶的粘粒被确定为 pKP4。转化后的 DH5 α 细胞被确定为 DH5 α -pKP1、DH5 α -pKP2 和 DH5 α -pKP4。

[0119] 大肠杆菌 ECL707 (Sprenger 等,《普通微生物学杂志》135 卷,1255 页 (1989)) 获自 E. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA), 并转化有相同的来自肺炎克雷伯氏菌的粘粒 DNA。含有甘油脱水酶基因的转化子被确定为 ECL707-pKP1 和 ELC707-pKP2, 含有二醇脱水酶基因的转化子被确定为 ECL707-pKP4。

[0120] 大肠杆菌 AA200 (Anderson 等,《普通微生物学杂志》62 卷,329 页 (1970)) 购自 Genetic Stock Center, Yale University (New Haven, CT), 这个菌株在 *tpi* 基因上有一个突变。用克雷伯氏菌粘粒 DNA 转化该菌株得到含有甘油脱水酶基因的 AA200-pKP1 和 AA200-pKP2 重组有机体, 和含二醇脱水酶基因的 AA200-pKP4 重组有机体。

[0121] DH5 α

[0122] 用肺炎克雷伯氏菌 DNA 转染大肠杆菌 XL1-Blue MR, 选取约含 1000 个菌落的六个转化平板, 用 5mL LB 培养基洗涤平板并离心。收集菌体并重新悬浮在 5mL LB 培养基 + 甘油中。取一份 (50uL) 接种到装有 S12 合成培养基并含有 0.2% 甘油 + 400ng/毫升的维生素 B₁₂ + 0.001% 酵母抽提物 + 50amp 的 15mL 试管中。试管中装满培养基直至顶部, 用封口膜封好并在 30°C 保温。48 小时后观察到轻微的浑浊。按上面所述方法分别在 78 小时和 132 小时取一份培养物来分析产物的分布。各份培养物均为 1,3- 丙二醇阳性, 时间点越后, 产生的 1,3- 丙二醇越多。

[0123] 将检测为 1,3- 丙二醇生成阳性的细菌系列稀释后涂布到 LB-50amp 平板上来分离单个的菌落。共分离到 48 个单菌落并再次检测它们能否产生 1,3- 丙二醇。从 6 个独立克隆中分离粘粒 DNA 并将其转化到大肠杆菌 DH5 α 中。再次检测转化子能否产生 1,3- 丙二醇。对两个转化子做了进一步的分析, 并将它们命名为 DH5 α -pKP1 和 DH5 α -pKP2。

[0124] 将 pKP1 中一段 12.1kb 的 EcoRI-SalI 片断亚克隆到 pIBI31 (IBIBiosystem, New Haven, CN) 中, 对这段序列做序列分析并将其命名为 pHK28-26 (SEQ ID NO:1)。测序结果揭示了编码甘油脱水酶的 *dhaT* 操纵子相关开放阅读框和必需调节基因的位置, 参见 SEQ ID NO:1, 在碱基 1-399 上发现了一个编码二羟基丙酮激酶的开放阅读框 *dhaK*; 在碱基 983-2107 上发现了编码甘油脱氢酶的开放阅读框 *dhaD*; 在碱基 2209-4134 上发现了编码抑制子的开放阅读框 *dhaR*; 在碱基 5017-6180 上发现了编码 1,3- 丙二醇氧化还原酶的开放阅读框 *dhaT*; 在碱基 7044-8711 上发现了编码甘油脱水酶 α 亚单位的开放阅读框 *dhaB1*; 在碱基 8724-9308 上发现了编码甘油脱水酶 β 亚单位的开放阅读框 *dhaB2*; 在碱基 9311-9736 上发现了编码甘油脱水酶 γ 亚单位的开放阅读框 *dhaB3*; 并在碱基 9749-11572 上发现了编码未知功能蛋白的开放阅读框 *dhaBX*。

[0125] 用来自肺炎克雷伯氏菌的包装好的粘粒转染大肠杆菌 XL1-BlueMR, 挑取单个菌落接种到含有 200uL S15 培养基 (硫酸铵, 10mM、磷酸钾缓冲液, pH7.0, 1mM、MOPS/KOH, pH7.0、50mM、MgCl₂, 2mM、CaCl₂, 0.7mM、MnCl₂, 50uM、FeCl₃, 1uM、ZnCl₂, 1uM、CuSO₄, 1.72uM、CoCl₂, 2.53uM、Na₂MoO₄, 2.42uM 和盐酸硫胺素, 2uM) + 0.2% 甘油 + 400ng/mL 维生素 B₁₂ + 0.001% 酵母

抽提物 +50ug/mL 氨苄青霉素的微滴定孔中。除了接种微滴定孔外,还接种一个含 LB-50amp 的主平板,96 小时后,取出 100uL,在一个含 0.2 微米尼龙纤维膜的 Rainin 微离心管中离心,细菌留在膜上,将膜处理后做 HPLC 分析。在筛选了 240 个克隆后,鉴定到了证明能产生 1,3- 丙二醇的阳性克隆。共鉴定到了三个阳性克隆,其中两个能在 LB-50amp 上生长,另一个不能。从两个能在 LB-50amp 上生长的阳性克隆的一个中分离了一个单菌落,并证实这个菌落能产生 1,3- 丙二醇。这个菌落被命名为 pKP4。从含有 pKP4 的大肠杆菌菌株中分离粘粒 DNA,并用它来转化大肠杆菌 DH5 α , 将一个独立的转化子命名为 DH5 α -pKP4。这个转化子证实能产生 1,3- 丙二醇。

[0126] ECL707

[0127] 用对应于 pKP1、pKP2、pKP4 的肺炎克雷伯氏菌 DNA 粘粒和 Supercos 空载体转化大肠杆菌 ECL707 菌株,所获得的转化子分别命名为 ECL707-pKP1、ECL707-pKP2、ECL707-pKP4 和 ECL707-pKP-sc。ECL707 含有缺陷的 glpK、gld 和 ptsD,这三个基因分别编码 ATP 依赖的甘油激酶、NAD⁺ 相连的甘油脱氢酶和磷酸烯醇式丙酮酸依赖的磷酸转移酶系统的催化磷酸二羟基丙酮的酶 II。

[0128] 在 LB-50amp 平板上,从每次粘粒转化中分离 20 个单菌落,并从 Supercos 空载体(阴性对照)转化中分离 5 个单菌落,将它们转入一个 LB-50amp 主平板。同样检测这些菌落将甘油转化为 1,3- 丙二醇的能力,从而确定它们是否含有脱水酶活性。用无菌牙签将这些转化子转入微滴定板。微滴定板中含有 200uL 的培养基 A,并补加有 0.2% 甘油或 0.2% 甘油 +0.2% D- 葡萄糖,再 30℃ 保温 48 小时后,将微滴定板小孔中的内容物滤过一个 0.45u 的尼龙滤器,然后用 HPLC 进行层析。这些检测的结果在表 1 中给出。

[0129] 表 1

[0130] 转化的 ECL707 将甘油转化为 1,3- 丙二醇 :阳性菌落的数目 / 检测菌落的数目

[0131]	转化子	甘油	甘油 + 葡萄糖
[0132]	ECL707-pKP1	19/20	19/20
[0133]	ECL707-pKP2	18/20	20/20
[0134]	ECL707-pKP4	0/20	20/20
[0135]	ECL707-sc	0/5	0/5

[0136] AA200 :

[0137] 用对应于 pKP1、pKP2、pKP4 的肺炎克雷伯氏菌 DNA 粘粒和 Supercos 空载体转化大肠杆菌 AA200 菌株,所获得的转化子分别命名为 AA200-pKP1、AA200-pKP2、AA200-pKP4 和 AA200-pKP-sc。菌株 AA200 在磷酸丙糖异构酶上有缺陷, (tpi⁻)。

[0138] 按在大肠杆菌 ECL707 中介绍的方法,从每次粘粒转化中分离 20 个单菌落,并从 Supercos 空载体转化中分离 5 个单菌落,检测这些菌落将甘油转化为 1,3- 丙二醇的能力,这些检测的结果见表 2。

[0139] 表 2

[0140] 转化的 AA200 将甘油转化为 1,3- 丙二醇 :阳性菌落的数目 / 检测菌落的数目

[0141]	转化子	甘油	甘油 + 葡萄糖
[0142]	AA200-pKP1	17/20	17/20
[0143]	AA200-pKP2	17/20	17/20

[0144] AA200-pKP4 2/20 16/20

[0145] AA200-sc 0/5 0/5

[0146] 实施例 2

[0147] 转化有含脱水酶活性的肺炎克雷伯氏菌 DNA 的大肠杆菌 AA200 菌株将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

[0148] 从含有肺炎克雷伯氏菌 dha 调节子粘粒 pKP1 或 pKP2、肺炎克雷伯氏菌 pdu 操纵子粘粒 pKP4 或 Supercos 空载体的大肠杆菌菌株 AA200 中挑取单菌落,接种到装满培养基(约 14mL 实施例 1 中介绍的培养基 A,并补加有 10ug/mL 的卡那霉素和 0.2% 的 D- 葡萄糖,加上或减去 0.5-1.0mM 的环腺苷酸 -2':3' 单磷酸(cAMP))的玻璃血清瓶中。为避免与甘油接触,接种可用一个 LB-50amp 琼脂)平板或用相同培养基制备的液体培养物来进行。整个反应可在 30℃ 保温约 72 小时并 250rpm 振荡。细菌的生长用 600nm 处的光吸收值的变化来测定,起始 OD₆₀₀ 为 0.020AU。葡萄糖减少和产物分布的量用 HPLC 来测定。单菌落用编号的后缀“-x”来表示。例如,AA200-pKP1-x。积累的结果见表 3 和表 4。

[0149] 表 3

[0150] 转化的大肠杆菌 AA200 菌株将 0.2% 的 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇:无 cAMP

	转化子	OD ₆₀₀	1,3-丙二醇(mM)	转化率(%)	选择性(%)
	AA200-pKP1-3	0.056	0.05	17	1
[0151]	AA200-pKP1-5	0.115	nd	0	
	..	0.007	nd	0	
	..	0.076	0.2	14	5
	..	0.076	0.2	14	5
	AA200-pKP1-20	0.116	nd	27	0
	..	0.205	0.3	17	8
	AA200-pKP2-10	0.098	0.2	13	7
	AA200-pKP2-14	0.117	0.5	17	14
	..	0.129	0.2	19	5
[0152]	AA200-pKP2-20	0.094	nd	11	0
	AA200-pKP4-4	0.198	0.1	28	2
	AA200-pKP4-19	0.197	0.2	34	3
	AA200-pKP4-20	0.206	0.1	38	1
	AA200-sc-1	0.097	nd	22	0
	..	0.176	nd	46	0

[0153] 表 4

[0154] 转化的大肠杆菌 AA200 菌株将 0.2% 的 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇:有 cAMP

[0155]

转化子	OD ₆₀₀	1,3-丙二醇(mM)	转化率(%)	选择性(%)
AA200-pKP1-3	0.102	0.5	19	12
AA200-pKP1-5	0.088	1.5	21	37
..	0.236	1.4	24	28
..	0.071	0.8	15	23
AA200-pKP1-20	0.153	nd	40	0
..	0.185	0.9	27	16
AA200-pKP2-10	0.098	0.2	13	7
AA200-pKP2-14	0.213	2.0	26	27
..	0.155	0.6	25	12
AA200-pKP2-20	0.198	1.2	40	14
AA200-pKP4-4	0.218	0.1	31	2
AA200-pKP4-19	0.223	0.2	37	3
AA200-pKP4-20	0.221	0.2	35	3
AA200-sc-1	0.111	nd	23	0
..	0.199	nd	49	0
..	0.122	nd	25	0

[0156] ^a1,3- 丙二醇的鉴定用通用方法中介绍的 GC/MS 方法证实。

[0157] 实施例 3

[0158] 转化有含脱水酶活性的肺炎克雷伯氏菌 DNA 的大肠杆菌 DH5 α 菌株将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

[0159] 按实施例 2 的方法,检测含肺炎克雷伯氏菌 dha 调节子粘粒 pKP1 或 pKP2 的大肠杆菌 DH5 α 菌株将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇的能力。结果列于表 5。

[0160] 表 5

[0161] 转化的大肠杆菌菌株 DH5 α 将 0.2% 的 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇加上 (+) 和减去 (-) cAMP

	转化子	OD ₆₀₀	1,3-丙二醇(mM)	转化率(%)	选择性(%)
[0162]	DH5 α -pKP1(-)	0.630	0.5	100	2
	DH5 α -pKP1(+)	0.774	0.6	100	3
	DH5 α -pKP2(-)	0.584	0.6	100	3
	DH5 α -pKP2(+)	0.699	0.7	100	3

[0163] 实施例 4

[0164] 转化有含脱水酶活性的肺炎克雷伯氏菌 DNA 的大肠杆菌 ECL707 菌株将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

[0165] 按实施例 2 的方法,检测含肺炎克雷伯氏菌 dha 调节子粘粒 pKP1 或 pPK2、肺炎克雷伯氏菌 pdu 操纵子粘粒 pKP4 或 Supercos 空载体的大肠杆菌 ECL707 菌株将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇的能力。在每次实验中,对转化进行定量。结果列于表 6。

[0166] 表 6

[0167] 转化的大肠杆菌菌株 ECL707 将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇有和没有 cAMP

[0168]

	转化子	OD ₆₀₀	1,3-丙二醇(mM)	OD ₆₀₀	1,3-丙二醇(mM)
			(没有 cAMP)		(有 cAMP)
	ECL707-pKP1-1	0.607	0.1	0.475	0.1
	ECL707-pKP1-3	0.619	0.1	0.422	0.1
	ECL707-pKP1-7	0.582	0.2	0.522	0.2
	ECL707-pKP1-10	0.593	0.1	0.408	0.1
	ECL707-pKP1-18	0.584	0.1	0.433	0.1
	ECL707-pKP2-4	0.588	0.1	0.408	0.1
	ECL707-pKP2-5	0.630	0.1	0.516	0.2
	ECL707-pKP2-8	0.542	0.1	0.486	0.1
	ECL707-pKP2-15	0.589	0.1	0.485	0.1
	ECL707-pKP2-19	0.577	0.1	0.504	0.1
[0169]	ECL707-pKP4-8	0.499	nd	0.361	<0.1
	ECL707-pKP4-9	0.544	nd	0.354	nd
	ECL707-pKP4-10	0.515	nd	0.265	<0.1
	ECL707-pKP4-14	0.512	nd	0.318	<0.1
	ECL707-pKP4-17	0.545	nd	0.388	<0.1
	ECL707-sc-1	0.592	nd	0.385	nd

[0170] 实施例 5

[0171] 大肠杆菌菌株 AA200-pKP1-5 经过两个阶段将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

[0172] 将 AA200-pkp1-5 的单菌落接种在含 50mL LB-amp 培养基的 Baffled 瓶 (250ml) 中,细胞在 30℃或 37℃振荡 (250rpm) 生长增殖过夜。

[0173] 将生长好的培养物离心 (10 分钟, 10,000rpm, 4℃), 并重新悬浮于不含葡萄糖的生产培养基中 (10mM 硫酸铵、5mM 磷酸钾缓冲液, pH7.5、50mM MOPS 缓冲液, pH7.5、0.01% 酵母抽提物、0.01% 酪蛋白氨基酸、0.8ug/mL 维生素 B₁₂ 和 50ug/mL 氨苄青霉素)。培养基中含有痕量的金属 A : (0.08uM CoCl₂、0.06uM CuCl₂、7uM FeSO₄、2uM H₃BO₄、0.2uM MnCl₂、0.1uM Na₂MoO₄、0.08uM NiCl₂、0.3uM ZnSO₄ 和 0.03mM 硫胺素), 或含有痕量的金属 B (0.7mM CaCl₂、2.53uM CoCl₂、1.72uM CuSO₄、1.0uM FeCl₃、2mM MgCl₂、0.05mM MnCl₂、2.42uM Na₂MoO₄、1.0uM ZnCl₂ 和 0.03mM 硫胺素)。再次将细胞离心, 并重新悬浮于 50mL 含 D- 葡萄糖的新鲜生产

培养基中,将重新悬浮的细胞装入一个 60mL 用异丁烯橡胶隔膜封口的血清瓶中。将血清瓶振荡 (250rpm),并用一个注射器穿过隔膜取样,取出的样品在分析前用 0.2u 的滤膜过滤。结果见表 7 和表 8。残留的葡萄糖用酶促分析 (Biochemistry Analyzer, Yellow Springs Instruments Co., Inc) 进行测定,1,3- 丙二醇用 HPLC 分析。

[0174] 表 7

[0175] 大肠杆菌 AA200-pKP1-5 将 0.2% 的 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇先进行增殖反应^a

[0176]

实验	时间(天)	葡萄糖(mM)	1,3-丙二醇(mM)	转化率(%)	选择性(%)
#1	1	0.1	2.3	99	10
#1	4	0.1	2.3	99	10
#2	1	2.8	2.3	75	14
#2	4	0.1	2.4	99	11

[0177] a:含有痕量金属 A 的反应物在 37℃ 进行接种。

[0178] 表 8

[0179] 大肠杆菌 AA200-pKP1-5^a 将 1% 的 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

	时间(天)	葡萄糖(mM)	1,3-丙二醇(mM)	转化率(%)	选择性(%)
	0	53	0	0	0
[0180]	1	39	5.6	26	20
	2	35	8.3	34	23
	3	33	8.4	38	21 ^b

[0181] a:含有痕量金属 B 的反应物在 30℃ 进行接种。

[0182] b:在反应结束时,1,3- 丙二醇的存在用 GC/MS 和 ¹³C-NMR(300MHz) 来证实。

[0183] 实施例 6

[0184] 肺炎克雷伯氏菌 ECL2106 将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 甘油醇但肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955 不能转化

[0185] 从一个含有肺炎克雷伯氏菌 ECL2106 或 ATCC25955 的 LB 琼脂平板中挑取细菌,小心接种到装满培养基(约 14mL)的血清瓶中。培养基中含有 50mM 葡萄糖、3mM (NH₄)₂SO₄、0.9mM CaCl₂、4uM CoCl₂、0.06uM CuCl₂、7uM FeSO₄、2uM H₃BO₄、0.8mM MgSO₄、0.2uMMnCl₂、0.1uM Na₂MoO₄、0.08uM NiCl₂、0.3uM ZnSO₄、0.1mg/mL DL- 半胱氨酸、10uM 乙二胺四乙酸、0.8ug/mL 维生素 B₁₂、表 9 中标明的磷酸钾,以及 50mM 的 HEPES 或者 MOPS 缓冲液, PH7.5。反应物在 30℃ 振荡 (250rpm) 47 小时。或者反应按实施例 2 介绍的方法进行。结果在表 9 中给出。

[0186] 表 9

[0187] 肺炎克雷伯氏菌 ECL2106 将 D- 葡萄糖转化为 1,3 甘油醇但肺炎克雷伯氏菌 ATCC25955 不能转化

[0188]	菌株	缓冲液	Pi (mM)	葡萄糖 (mM)	1,3- 丙二醇 (mM)
[0189]	2106	MOPS	5.0	11.4	0.2
[0190]	2106	MOPS	2.5	13.9	0.2
[0191]	2106	MOPS	1.3	14.8	0.1
[0192]	2106	MOPS	0.6	15.8	0.1
[0193]	2106	HEPES	5.0	21.1	0.1
[0194]	2106	HEPES	2.5	23.4	0.1
[0195]	2106	HEPES	1.3	26.4	0.1
[0196]	2106	HEPES	0.6	27.5	0.1
[0197]	25955	MOPS	5.0	4.4	nd
[0198]	25955	MOPS	2.5	5.4	nd
[0199]	25955	MOPS	1.3	2.8	nd
[0200]	25955	MOPS	0.6	7.8	nd
[0201]	25955	HEPES	5.0	7.0	nd
[0202]	25955	HEPES	2.5	13.5	nd
[0203]	25955	HEPES	1.3	10.2	nd
[0204]	25955	HEPES	0.6	17.8	nd

[0205] 实施例 7

[0206] 用重组巴斯德毕赤酵母生产 1,3- 丙二醇

[0207] 通用表达质粒的构建

[0208] 用来自 pA0815(Invitrogen, San Diego, CA) 的 0.9kbEcoRI/XbaI 片断取代 pHIL-D4(Phillips, Petroleum, Bartlesville, OK) 中的 0.9kb EcoRI/XbaI 片断,产生了含有下列元件的质粒 pHIL-D4B2:5' AOX1,为巴斯德毕赤酵母的甲醇诱导型乙醇氧化酶 I(AOX1) 启动子;AOX1term,为巴斯德毕赤酵母 AOX1 的转录终止区域;HIS4,为用于在 his4 宿主中进行筛选的巴斯德毕赤酵母组氨酸脱氢酶编码基因;Ran,是从转座子 Tn903 中获得的序列,它编码氨基糖苷-3' - 磷酸转移酶,从而可在多种宿主中提供卡那霉素、新霉素和 G418 抗性,并可用作盒拷贝数目的指示;3' AOX1,为巴斯德毕赤酵母中 AOX1 的下游序列,与 5' AOX1 一起用于定点的载体整合;ori,为 pBR322 的 DNA 复制起点,使质粒能在大肠杆菌中操作;和 amp,为来自 pBR322 的 β - 内酰胺酶基因,提供青霉素抗性。pHIL-D482 的另一个特征是用将 Bgl2/Xba1 片段上的盒亚克隆到 BamHI/Xba1 位点的方法,能很容易地将多个表达盒 (5' AOX1- 基因 -AOX1term) 放置在一个质粒上。

[0209] dhaB1 和 dhaB2 共表达质粒的构建

[0210] 使用 5' 端含有 EcoRI 位点的引物 (dhaB1 和 dhaB2 的引物分别为 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5),用 PCR 的方法从粘粒 pKP1 中扩增 dhaB1 和 dhaB2 的开放阅读框 (10 mM Tris pH8.3,50mM KCl,1.5mM MgCl₂,0.0001 % 明胶,200uM dATP,200uMdCTP,200uM dGTP,200uM dTTP,1uM 每种引物,1-10ng 靶 DNA,25 单位 / mL Amplitaq[®]DNA 聚合酶 Perkin Elmer Cetus, Norwalk CT)。PCR 的参数为 94°C,1 分钟、55°C,1 分钟、72°C,1 分钟,共进行 35 个循环。将 PCR 产物亚克隆到 pHIL-D482 的 EcoRI 位点中,从而产生分别含有 dhaB1 和 dhaB2 的表达质粒 pMP19 和 pMP20。

[0211] 将 pMP19 的 Bgl2/Xba1 片断上的 dhaB1 表达盒亚克隆到 pMP20 的 BamHI/Xba1 位点上,从而产生 pMP21。质粒 pMP21 含有 dhaB2 和 dhaB1 两者的表达盒,并含有 HIS4 选择标记。

[0212] dhaB3 和 dhaT 共表达质粒的构建

[0213] 使用 5' 端含有 EcoRI 位点的引物 (dhaT 和 dhaB3 的引物分别为 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9),用 PCR 的方法从粘粒 pKP1 中扩增 dhaT 和 dhaB3 的开放阅读框。将 PCR 产物亚克隆到 pHIL-D482 的 EcoRI 位点中,从而产生分别含有 dhaT 和 dhaB3 的表达质粒 pMP17 和 pMP18。

[0214] 将 pMP17 的 Bgl2/Xba1 片断上的 dhaT 表达盒亚克隆到 pMP18 的 BamHI/Xba1 位点上,从而产生 pMP22。质粒 pMP22 含有 dhaT 和 dhaB3 两者的表达盒。

[0215] 从 pRK20 (Phillips Petroleum, Bartlesville, OK) 中删除 4.1kb 的含有 SUC2 的 EcoRI 片断,产生 pMP2。SUC2 编码一个蔗糖酶,这个基因在毕赤酵母中可用作二级选择标记。从 pMP2 中删除 4.0kb 的含有 lacZ 的 Hind3 片断,产生 pMP3。将 pHIL-D482 中含 AOX1 term 的 0.4kb Hind3 片断亚克隆到 pMP3 的 Hind3 位点中,产生 pMP10。

[0216] 用来自 pMP22 的含有 dhaB3 和 dhaT 表达盒的 5.0kbBgl2/Xba1 片断取代 pMP10 中的 2.0kb 的 Bgl2/Xba1 片断,产生 pMP23。将来自 pRK20 含 SUC2 的 5.4kb 的 Pst1/Bgl2 片断亚克隆到 pSP73 (Progen, Madison, WI) 的 Pst1/Bgl2 位点中,产生 pMP11a。用 EcoRI 切割质粒 pMP11a,然后用 T4DNA 聚合酶补齐并重新连接,产生 pMP11b。用来自 pMP11b 的含有 SUC2 的 5.4kb Bgl2/Pst1 片断取代 pMP10 中的 1.1kb 的 Pst/Bgl2 片断,产生 pMP12。

[0217] 用来自 pMP12 含 SUC2 的 5.2kb Sca1/Bgl2 片断取代 pMP23 的 1.0kbSca1/Bgl2 片断,产生 pMP24 质粒 pMP24 含 dhaT 和 dhaB3 两者的表达盒和 SUC2 选择标记。

[0218] 用 dhaB1/dhaB2 表达质粒 pMP21 转化巴斯德毕赤酵母

[0219] 使用 Gregg 等介绍的原生质体转化法 (《分子细胞生物学》第 5 卷,3376 页, (1985)),用 1-2ug Bgl 线性化的质粒 pMP21 转化巴斯德毕赤酵母菌株 GTS 115(his4) (Phillips Petroleum, Bartlesville, OK)。细胞在不含组氨酸的平板上 30℃再生 3-4 天。质粒整合到染色体上后,转化子开始生长。将转化子收集到一个 YPD (1% Bacto 酵母抽提物,2%蛋白胨,2%葡萄糖)主平板上。

[0220] 筛选含有 dhaB1 和 dhaB2 的巴斯德毕赤酵母转化子

[0221] 从上面介绍的 his⁺ 转化子中制备染色体 DNA,并用 dhaB1 和 dhaB2 特异的引物进行 PCR 分析。使转化子在补加有 G418 (Sigma, St. Louis, MO) 的 YPD 培养基中生长,培养基中补加的 G418 的水平不断提高直至 2000ug/mL。用这种方法可从含有 dhaB1 和 dhaB2 两者的转化子中选择高拷贝数的菌株。能够抵抗高水平的 G418 表明表达盒的明显增加。

[0222] 用 dhaB3/dhaT 表达质粒 pMP24 第二次转化巴斯德毕赤酵母

[0223] 采用原生质体转化法,用质粒 pMP24 再次转化上面介绍的对高水平 G418 有抗性的转化子。转化后的细胞首先在非选择平板上 30℃培养 2 天进行再生,从平板上刮取含再生细胞的上层琼脂,在 20mL 水中涡旋混匀。使细胞通过四层薄棉布后,离心沉淀细胞,并重新悬浮于 10mL 水中。将悬液分成 200uL 的小份,涂布到蔗糖平板上,30℃温育 2 天。质粒整合到染色体上后,所有的转化子开始生长。转化子表现为小菌落背景上的大菌落,分离转化子。将转化子在 Msu 培养基 (每升,134 克有 / 无氨基酸的酵母氮源,10 克蔗糖,0.4 克生

物素)中 30℃振荡培养 24 小时。然后在 Msu 平板(Msu 培养基加 15g/mL 的琼脂)划线并 30℃培养 2 天。将分离的大菌落点种到一个 YPD 主平板上。

[0224] 筛选含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 以及它们对应的酶活性的巴斯德毕赤酵母双重转化子

[0225] 从上面介绍的 suc^+ 双重转化子中制备染色体 DNA,用 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 特异的引物对染色体做 PCR 分析。从而证明所有四个开放阅读框的存在。

[0226] 使用体外酶试验来证明活性的甘油脱水酶(dhaB)和 1,3-丙二醇氧化还原酶(dhaT)的存在。另外,用 Western 印迹可以证实所有开放阅读框表达的蛋白。用来分析上述蛋白的无细胞抽提物按下面的方法进行制备。含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 的双重转化子在 MGY(每升,13.4 克有/无氨基酸的酵母氮源,0.4 毫克生物素,10 毫升甘油)中 30℃通气振荡培养 2 天。离心沉淀细胞,重新悬浮在 MM(每升,13.4 克有/无氨基酸的酵母氮源,0.4 克生物素,5 毫升甲醇)中,按上面的方法温育,约 24 小时后,收集细胞,重新悬浮在缓冲液(0.1M tricine/KOH 缓冲液,pH 8.2,50mM KCl,2% 1,2-丙二醇)中,机械破碎(使用玻棒,在存在玻璃珠的情况下涡旋),然后离心。

[0227] 有一菌株对 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 以及它们对应的酶活性的存在都显示出阳性,将这株菌命名为 MSP42.81,并用于进一步的研究。

[0228] 用重组的巴斯德毕赤酵母体内生产 1,3-丙二醇

[0229] 在一个装有 1.5L 基本培养基的 BiostatB 发酵罐中(B Braun Biotech, Inc.)培养巴斯德毕赤酵母 MSP42.81(ATCC74363),基本培养基含有 8.5g/L KH_2PO_4 、2.1g/L $(NH_4)_2SO_4$ 、10g/L 甘油、2.3g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.18g/L $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 和 0.29mL/L PTMI。PTMI 是矿物质溶液的储存液,它包含 24mM $CuSO_4$ 、4.8mM KI、18mM $MnSO_4$ 、0.8mM Na_2MoO_4 、0.3mM H_3BO_3 、2.1mM $CoCl_2$ 、70mM $ZnSO_4$ 、26mM H_2SO_4 、234mM $FeSO_4$ 和 0.8mM 生物素。发酵罐的 pH 值用加入 2M NH_4OH 的方法控制在 pH 5.0,温度控制在 30℃,溶解氧分压用通气控制的方法控制在 30%。使用在 YM 肉汤中培养的巴斯德毕赤酵母 MSP42.81 作种子培养物。发酵罐中接种 20mL 种子培养物。

[0230] 当甘油被消耗后(接种后约 24 小时),加入甲醇原料来诱导 AOX 启动子。甲醇原料中含有 1 升甲醇、5mL PTMI 和 5mL 用水制备的浓度为 0.2g/L 生物素储存液。甲醇用手工方式加入并使其平均浓度为 0.5%,甲醇的浓度用 HPLC 分析来测定。诱导 15 小时后,从反应器中取出 50mL 的细胞($OD_{600} = 20AU$)。

[0231] 将 50mL 细胞悬液沉淀,重新悬浮于 12.5mL 充有氮气的基础培养基(6.7g/L 酵母氮源,3.0g/L 酵母抽提物,1.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L KH_2PO_4 、3.0g/L $(NH_4)_2SO_4$,滴定至 pH 7.2,过滤除菌)。在细胞悬液中加入辅酶 B12 至终浓度为 20ug/mL。辅酶 B₁₂ 事先在充有氮气的水中制备成 2mg/mL 的储存液。用基本培养基制备三种培养基储存液,它们分别含有 1% 的葡萄糖、0.5% 的葡萄糖和 0.5% 甘油(w/v)、和 1% 甘油(w/v),同时还制备氯喹储存液(1.06g/50mL, pH 7.2)。

[0232] 在 10mL 绉纹(crimp)密封的血清瓶中装 22mL 培养基储存液和 1mL 氯喹与水的混合物,使其终浓度为表 10 中列出的浓度,并且在加入 1mL 的细胞和辅酶 B₁₂ 混合物前充入氮气。将血清瓶在 30℃振荡温育,用 HPLC 分析加入细胞后立即取出的样品和温育 24 小时后取出的样品。结果见表 10。

[0233] 表 10

[0234] 用重组巴斯德毕赤酵母体内生产 1,3- 丙二醇

[0235]	反应	培养基 ^a	氯喹 (mM)	1,3- 丙二醇 (mM)
[0236]	1	葡萄糖 ^b	0	0.04
[0237]	2	葡萄糖	2.5	0.2
[0238]	3	葡萄糖	5	0.1
[0239]	4	葡萄糖	10	0.1
[0240]	5	葡萄糖 ^b / 甘油	0	0.2
[0241]	6	葡萄糖 / 甘油	2.5	0.4
[0242]	7	葡萄糖 / 甘油	5.0	0.4
[0243]	8	葡萄糖 / 甘油	10.0	1.2 ^c
[0244]	9	甘油	0	0.2
[0245]	10	甘油	2.5	0.3
[0246]	11	甘油	5.0	0.3
[0247]	12	甘油	10	1.4 ^c

[0248] ^a 除非指明, 24 小时内各底物的利用率均低于 10%。

[0249] ^b 24 小时后没有葡萄糖残留。

[0250] ^c 1,3- 丙二醇的存在用通用方法中介绍的 GC/MS 来证实。

[0251] 实施例 8

[0252] 用巴斯德毕赤酵母双重转化子由 D- 葡萄糖生产 1,3- 丙二醇

[0253] 在一个装有 1.5L 基本培养基的 BiostatB 发酵罐中 (B Braun Biotech, Inc.) 培养巴斯德毕赤酵母 MSP42.81, 基本培养基含有 8.5g/L KH_2PO_4 、2.1g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10g/L 葡萄糖、2.3g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.18g/L $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.29mL/L PTMI。或者, 发酵和诱导条件与实施例 7 中介绍的相同。诱导 15 小时后, 从发酵罐中取出 50mL 细胞。

[0254] 细胞悬液按实施例 7 中介绍的方法进行处理, 不同之处在于使用一个调整的基本培养基 (6.7g/L 酵母氮源, 1.0g/L K_2HPO_4 , 1.0g/L KH_2PO_4 , 3.0g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 滴定至 pH 7.2, 过滤除菌)。三种培养基储存液也用这种调整的基本培养基制备。其它的溶液都相同。按已介绍的方法制备反应混合物, 30℃ 振荡温育。用 HPLC 对加入细胞后立即取出的样品和接种 75 小时后取出的样品进行分析。在含有葡萄糖作为碳源和 5mM 氯喹的反应中, 产生了 0.17mM 的 1,3- 丙二醇。

[0255] 实施例 9

[0256] 构建用于在啤酒酵母中转化和表达 dhaB 和 dhaT 的质粒

[0257] 通用表达质粒的构建

[0258] 构建了两种类型的表达质粒, 一种是能通过重组整合到染色体中的质粒, 另一种是以游离复制元件形式存在的质粒。每种类型的通用质粒都含有一个酵母启动子。酵母启动子和酵母转录终止子为含有一个或多个限制性内切酶识别位点的 DNA 片段分隔, 每种类型的通用表达载体还含有: β - 内酰胺酶的编码基因, 用于在含有氨苄青霉素的平板上对大肠杆菌进行筛选; 一个复制起始区域, 使质粒在大肠杆菌中维持; 以及一个 2 微米的游离元件复制起始区域或者与在啤酒酵母染色体中发现的介导 DNA 重组或整合到染色体中的序列同源的序列。在酵母中使用并存在于表达质粒的营养选择标记为下列中的一个: 编码

咪唑甘油磷酸酯脱水酶的 HIS3 基因、编码乳清酸核苷-5' - 磷酸脱羧酶的 URA3 基因、编码 N-(5' - 磷酸核糖) 邻氨基苯甲酸异构酶的 TRP1 基因和编码 β - 异丙基苹果酸脱氢酶的 LEU2 基因。所用的酵母启动子为 ADH1 或 GAL1, 转录终止子为 ADH1、CYC1 或 AOX1, 后者来自巴斯德毕赤酵母。

[0259] 质粒 pGADGH(Clontech, Palo Alto, CA) 用 HindIII 消化, 然后与 HindIII-XmnI 和 EcoRI-XmnI 接头 (New England Biolabs, Beverly, MA) 连接, 使单链末端转变为 EcoRI 末端。含有正确 EcoRI 末端的质粒按如下方法进行选择: 将上述处理的质粒与质粒 pUC4K (Pharmacia Biotech, Uppsala) 的含卡那霉素抗性基因的 EcoRI 片断连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 并在含有 25mg/mL 卡那霉素的平板上进行筛选。得到的质粒 (pGAD/KAN2) 用 SnaBI 和 EcoRI 消化, 分离出带有 ADH1 启动子的 18kb 片断。质粒 pGBT9(Clontech, Palo Alto, CA) 用 SnaBI 和 EcoRI 消化, 用从 SnaBI 和 EcoRI 消化的 pGAD/KAN2 中分离的 1.8kb ADH1 启动子片断取代其中的 1.5kb ADH1/GAL4 片断。得到的载体 (pMCK11) 为带有一个 ADH1 启动子和终止子以及一个 TRP1 标记的复制型酵母质粒。

[0260] 质粒 pGADGH 用 SnaBI 和 HindIII 消化, 并分离含有 ADH1 启动子的 1.8kb 片断。将此片断与事先用 SmaI 和 HindIII 消化的载体 pRS405 (Stratagene, La Jolla, CA) 连接。用质粒编码的 LacZ α 肽的插入失活和 ADH1 启动子的存在来挑选阳性克隆。得到的质粒 (pMCK4) 含有一个 ADH1 启动子和一个 LEU2 标记。

[0261] 将 pGBT9 的含有 ADH1 终止子的大约 0.2kb NaeI-EcoRI 片断与用 EcoRI-HindIII 消化的 pRS403 (Stratagene, La Jolla, CA) 连接, 产生约 4.8kb 的质粒 pRVN5。将 pGAD/KAN2 中含有 ADH1 启动子的约 2.0kb 的 SnaBI-EcoRI 片断与用 SmaI-EcoRI 消化的 pRVN5 连接, 产生约 6.8kb 的质粒 pRVN6。质粒 pRVN6 带有 ADH1 启动子和终止子以及它们之间的一个单一 EcoRI 克隆位点。

[0262] pGADGH 的 0.4kb 的 HindIII 片断含有一个额外的 XmnI 位点。将这一片断删除, 载体重新连接产生 7.0kb 的载体 pGAD-D3。载体 pGAD-D3 用 XmnI 消化, 纯化含有 ADH1 启动子和终止子以及它们之间的一个 HindIII 克隆位点的约 2.4kb 片断。pRS404 (Stratagene, La Jolla, CA) 用 PvuII 消化, 纯化 3.8kb 的含有 TRP1 的较大片断, 将其与 pGAD-D3 的 XmnI 启动子和终止子片断连接, 产生质粒 pRVN11。

[0263] 使用 5' 端含有 EcoRI 位点的引物 (dhaT、dhaB3 和 dhaB1 的引物分别为 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3), 用 PCR 的方法从质粒 pHK28-26 (SEQ ID No:1) 中扩增 dhaT、dhaB3 和 dhaB1 的开放阅读框 (10mM Tris pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.0001% 明胶, 200 μ L dATP, 200 μ M dCTP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dTTP, 1 μ M 每种引物, 1-10ng 靶 DNA, 25 单位/mL **Amplitaq**[®] DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk CT))。PCR 的参数为 94 $^{\circ}$ C, 1 分钟、55 $^{\circ}$ C, 1 分钟、72 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 共进行 35 个循环。将 PCR 产物亚克隆到 pHIL-D4 (Phillips Petroleum, Bartlesville, OK) 的 EcoRI 位点中, 从而产生分别含有 dhaT、dhaB3 和 dhaB1 的质粒 pMP13、pMP14 和 pMP15。

[0264] dhaT 表达质粒的构建

[0265] 复制型质粒 pGAD/KAN2 用 EcoRI 消化, 去除卡那霉素抗性片断, 去磷酸化后与 pMP13 的 dhaT EcoRI 片断连接, 得到的质粒 (pMCK13) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaT, 并含有一个 LEU2 标记。

[0266] 质粒 pRNV6 用 EcoRI 消化, 并与 pMP13 的 dhaT EcoRI 片断连接, 得到的质粒 (pRNV6T) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaT, 并含有一个 HIS3 标记。

[0267] dhaB1 表达质粒的构建

[0268] 复制型质粒 pGADGH 用 HindIII 消化, 去磷酸化后与 pMP15 的 dhaB1HindIII 片断连接, 得到的质粒 (pMCK10) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB1, 并含有一个 LEU2 标记。

[0269] dhaB2 表达质粒的构建

[0270] 复制型质粒 pMCK11 用 EcoRI 消化, 去磷酸化后与 pMP20 的 dhaB2EcoRI 片断连接, 得到的质粒 (pMCK17) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB2, 并含有一个 TRP1 标记。

[0271] 质粒 pRS403 用 SmaI 消化, 并与 pCMK17 的 SnaBI/NaeI dhaB2 片断连接, 得到的质粒 (pMCK21) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB2, 并含有一个 HIS3 标记。

[0272] dhaB3 表达质粒的构建

[0273] 复制型质粒 pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) 用 EcoRI 消化, 去磷酸化后与 pMP14 的 dhaB3 EcoRI 片断连接, 得到的质粒 (pMCK1) 含有从 GAL1 启动子可正确转录的 dhaB3, 并含有一个 URA3 标记。

[0274] 复制型质粒 pGAD/KAN2 用 EcoRI 消化, 去磷酸化后与 pMP14 的 dhaB3EcoRI 片断连接, 得到的质粒 (pMCK15) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB3, 并含有一个 LEU2 标记。

[0275] 质粒 pRS404 用 Pst 和 HincII 消化, 并与 pCMK15 的 PstI/EcoRV dhaB3 片断连接, 得到的质粒 (pMCK20) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB3, 并含有一个 TRP1 标记。

[0276] 用 dhaT 表达质粒转化啤酒酵母

[0277] 应用 Stratagene 发表的 LiCl/ 聚乙二醇程序 (Catalog#217406), 用 1-2ug 质粒 DNA 转化啤酒酵母菌株 YPH499 (ura3-52lys2-80lade2-101trp1-del63his3-del200leu2-del1) (Stratagene, La Jolla, CA)。另外也可用一个 Zymo Reserach (Orange, CA) 的 Frozen-EZ 酵母转化试剂盒 (Catalog#T2001) 进行转化。转化克隆在补加有下列成分中的一种或多种的基础培养基 (SMM-0.67% 无氨基酸的酵母氮源, 2% 葡萄糖) 中 29℃ 培养 3~4 天, 补加成分为: 腺嘌呤硫酸 (20mg/L)、尿嘧啶 (20mg/L)、L- 色氨酸 (20mg/L)、L- 组氨酸 (30mg/L)、L- 亮氨酸 (30mg/L)、L- 赖氨酸 (30mg/L)。取菌落在选择平板上划线和接种到液体培养基。根据所用的载体, 菌落或者在质粒整合到染色体上后开始生长, 或者在游离体复制后开始生长。除了用单一类型的质粒进行转化, 还可用两种或更多的质粒进行共转化。

[0278] dhaB 的活性在转化的啤酒酵母中的表达

[0279] 用质粒 pMCK1、pMCK10 和 pMCK17 转化的菌株 YPH499 在含有 0.67% 无氨基酸的酵母氮源、2% 半乳糖、2% 蜜三糖、20mg/L 腺嘌呤硫酸、30mg/L L- 赖氨酸、和 20mg/L 组氨酸的加富的基础培养基上进行培养。将细胞匀浆后, 用抽提物分析其 dhaB 活性。结果得到 0.021 单位 /mg 的特异活性。

[0280] 实施例 10

[0281] 构建其它用于啤酒酵母转化的复制型和整合型质粒

[0282] 分离 pGAD/KAN2 的 SnaBI/EcoRI ADH1 片断, 将此片断与事先用 HincIII 和 EcoRI 消化的载体 pRS406 (Stratagene, La Jolla, CA) 连接, 构建了一个通用表达载体。阳性克隆用质粒编码的 lacZ α 肽插入失活和 ADH1 启动子片段的存在来鉴定。得到的质粒 (pMCK3)

用 EcoRI 和 SmaI 消化,并与 EcoRI 和 NaeI 消化的 pGBT9 的 0.2kb ADH1 终止子片段连接,得到的质粒 (pMCK5) 含有 ADH 启动子和终止子两者的序列,并含有一个 URA3 标记。

[0283] dhaT 表达质粒的构建

[0284] 载体 pMCK5 用 EcoRI 消化,并去磷酸化,从质粒 pMP13 中切下含 dhaT 的 EcoRI 片断,并与 pMCK5 连接,得到的质粒 (pMCK7) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaT,并含有一个 URA3 标记。

[0285] 整合载体 pRS404 用 KpnI 和 SacI 消化,从质粒 pMCK7 中切下含有 dhaT 基因及其两翼的启动子和终止子的 KpnI/SacI 片断,并与 pRS404 连接,得到的质粒含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaT,并含有一个 TRP1 标记。

[0286] dhaB1 表达质粒的构建

[0287] 载体 pMCK5 用 EcoRI 消化,并去磷酸化,从质粒 pMP15 中切下含 dhaB1 的 EcoRI 片断,并与 pMCK5 连接,得到的质粒 (pMCK8) 含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB1,并含有一个 URA3 标记。

[0288] 整合载体 pRS403 用 ClaI 和 AatII 消化,从质粒 pMCK8 中切下含有 dhaB1 基因及其两翼的启动子和终止子的 ClaI/AatII 片断,并与 pRS403 连接,得到的质粒含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB1,并含有一个 HIS3 标记。

[0289] 复制型质粒 pYES2 用 HindIII 和 SnaBI 消化,与用 SnaBI 和 HindIII 消化的 pGAGH 的 ADH1 启动子片断连接,来取代其 GAL1 启动子元件。将 pMP19 的 dhaB1 HindIII 和 XbaI 片断与经过修饰的含有 ADH1 启动子的 pYES2 的相应位点连接,得到的质粒含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB1,并含有一个 URA3 标记。

[0290] 载体 pMCK4 用 HindIII 消化,并去磷酸化,从质粒 pMP15 中切下含 dhaB1 的 HindIII 片断,并与 pMCK4 连接,得到的质粒含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB1,并含有一个 LEU2 标记。

[0291] dhaB2 表达质粒的构建

[0292] 载体 pRS404、pRS405 和 pRS406 用 SmaI 消化,从质粒 pMCK17 中切下含有 dhaB2 基因及其两翼的启动子和终止子的 SnaBI/NaeI 片断,并分别与上述三种整合载体连接,得到的质粒含有从 ADH1 启动子可正确转录的 dhaB2,并含有一个 LEU2、TRP1 或 URA3 标记。

[0293] 实施例 11

[0294] 在啤酒酵母中筛选 dhaT 转化子及其将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇筛选含有 dhaT 基因的啤酒酵母

[0295] 从按照实施例 9 和实施例 10 的方法构建的 Ura⁺、His⁺、Trp⁺ 或 Leu⁺ 转化子中提取染色体 DNA,使用在巴斯德毕赤酵母中介绍的 (SEQ IDNO :2-9) 每个基因的特异引物,用 PCR 进行分析。

[0296] 转化有 dhaT 基因的啤酒酵母由 D- 葡萄糖生产 1,3- 丙二醇

[0297] 按照实施例 9 和 10 中介绍的方法构建的含有 dhaT、dhaB1、dhaB2 和 dhaB3 的转化子,在补加有 20mg/L 腺嘌呤硫酸、30mg/L L- 赖氨酸和 1mg/L 维生素 B₁₂ 的 SMM 中 29℃ 有氧或无氧条件下振荡培养。培养至稳定期后,用 HPLC 测定 1,3- 丙二醇的存在。啤酒酵母转化子 pMCK1/10/17 (HM) #A 申请了保藏,并被命名为 ATCC_____。

[0298] 实施例 12

[0299] 巴斯德梭菌 ATCC6013 在氢气环境下由 D- 葡萄糖生产 1,3- 丙二醇巴斯德梭菌的一般生长条件

[0300] 除非特别指明,巴斯德梭菌 ATCC6013 在装有 10mL 培养基绉纹密封的血清瓶中进行培养,装有培养基的绉纹瓶在接种前无菌操作充入氢气。基础培养基(培养基 A)的 pH 值调节至 pH 7.2,它包含以下成分(g/L): KH_2PO_4 ,1.4、 NaH_2PO_4 ,0.69、 NH_4Cl ,1.8-2.5、 KCl ,0.50、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.50、 CaCl_2 ,0.025、 NaCl ,1.0、酵母抽提物,2.0、半胱氨酸 HCl,0.50、碳酸氢钠,2.5、对氨基苯甲酸,0.0080、生物素,0.000040、柠檬酸钠 $2\text{H}_2\text{O}$,0.10、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.050、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,0.010、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,0.0010、 ZnCl_2 ,0.00050、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,0.0025、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,0.010 和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,0.0050,并按下面的指示在培养基 A 中加入碳源。所有的温育均在 30℃、250rpm 振荡进行。

[0301] 在一批 10mL 补加有 5% 葡萄糖的培养基 A 中,接种 1mL 约含 15% (v/v) 甘油的巴斯德梭菌 ATCC6013 冻存液进行增菌。96 小时后,取 0.5mL 培养的细胞悬液转接到 10mL 新鲜培养基中继续培养。24 小时后,用氢气将新接种小瓶中的气压调至 30psi。继续培养 96 小时。在最后 96 小时阶段的开始和结尾分别取水相样品,用通用方法中介绍的 HPLC 进行分析。结果见表 11。

[0302] 表 11

[0303] 在氢气气体条件下巴斯德梭菌 ATCC6013 将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

	时间(小时)	增菌	葡萄糖(mM)	甘油(mM)	1,3-丙二醇(mM) ^a
[0304]	0	A	114	nd	2.7
	96	A	47	nd	3.4
[0305]	0	B	119	0.1	2.0
	96	B	59	0.1	2.5

[0306] ^a1,3- 丙二醇的存在用通用方法中介绍的 GC/MS 来证实。

[0307] 实施例 13

[0308] 巴斯德梭菌 ATCC6013 在甲基紫精存在的条件下由 D- 葡萄糖生产 1,3- 丙二醇

[0309] 实验 1。所有细胞均按照实施例 12 中的程序进行培养。在一批 10mL 补加有 5% 葡萄糖的培养基 A (实施例 12 中介绍) 中,接种 1mL 含 15% (v/v) 甘油的巴斯德梭菌 ATCC6013 冻存液进行增菌。96 小时后,取 0.5mL 培养的细胞悬液转接到 10mL 新鲜培养基中继续培养。24 小时后,在新接种小瓶中加入甲基紫精(1,1' -2 甲基 -4,4' -二氯联吡啶)至终浓度为 1mM。继续培养 96 小时。在最后 96 小时阶段的开始和结尾分别取水相样品,用通用方法中介绍的 HPLC 进行分析。结果见表 12。

[0310] 表 12

[0311] 在甲基紫精存在的条件下巴斯德梭菌 ATCC6013 将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

	时间(小时)	增菌	葡萄糖(mM)	甘油(mM)	1,3-丙二醇(mM) ^a
	0	A	113	0.3	2.4
[0312]	96	A	28	1.8	3.4
	0	B	87	0.3	2.1
	96	B	40	3.2	4.4

[0313] ^a1,3-丙二醇的存在用通用方法中介绍的 GC/MS 来证实。

[0314] 实验 2。在补加有 1% (v/v) 甘油 +1% (w/v) 葡萄糖的培养基中接种巴斯德梭菌 ATCC6013 的冻存物,该冻存物中含有约 15% (v/v) 的甘油,接种量为每 20mL 接种 0.2mL 冻存物。48 小时后,取 10mL 细胞悬液加入到 90mL 新鲜培养基中,继续培养 24 小时。将 100mL 细胞悬液在冰上冷却,在无氧条件下离心收集细胞。用无氧的缓冲液 (50mM 磷酸缓冲液, pH 7.2±0.5g/L 半胱氨酸 HCl, 事先充有氮气并在氮气环境下高压灭菌) 洗涤 3 次,并重新悬浮于 8mL 体积的无氧缓冲液中。在增菌试验中,将 1mL 这种细胞悬液接种到 10mL 补加有 1% 葡萄糖和 0mM、1mM、5mM 或 10mM 甲基紫精的培养基 A 中,温育 240 小时,在最后 240 小时阶段的开始和结尾分别取水相样品,用通用方法中介绍的 HPLC 进行分析。结果见表 13。

[0315] 表 13

[0316] 在甲基紫精 (MV) 存在的条件下巴斯德梭菌 ATCC6013 将 D-葡萄糖转化为 1,3-丙二醇

[0317]

MV(mM)	时间(小时)	增菌	葡萄糖(mM)	甘油(mM)	1,3-丙二醇(mM) ^a
0	0	A	38	nd	nd
..	240	A ^b	40	nd	nd
..	0	B	nd	nd	nd
..	240	B ^b	nd	nd	nd
1	0	A	40	nd	nd
..	240	A ^b	nd	4	1
..	0	B	45	nd	nd
..	240	B ^b	nd	5	2
5	0	A	37	nd	nd
..	240	A	nd	4	2
..	0	B	38	nd	nd
..	240	B	nd	3	1
10	0	A	40	nd	nd
..	240	A	nd	2	5
..	0	B	43	nd	nd
..	240	B	nd	3	1

[0318] ^a1,3- 丙二醇的存在用通用方法中介绍的 GC/MS 来证实。

[0319] ^b 在 120 小时,葡萄糖消耗后,加入外源甘油至终浓度为 1%。

[0320] 实验 3。在下面的所有研究中,巴斯德梭菌 TACC 6013 首先维持在巯基乙醇酸盐培养基(Difco[®])中,然后转接到补加有 0.4%葡萄糖的培养基 A 中。在后一种培养基中多次传代后,在 10mL 上面介绍的培养基中接种 1mL 分装的储存培养物培养过夜制备种子培养物。在一系列装有新鲜培养基并含有表 14 指示的甲基紫精浓度的血清瓶中,接种 1mL 过夜培养物,按表 14 标出的时间再次培养。从各瓶中间隔取样分析葡萄糖的利用并用通用方法中介绍的 HPLC 分析 1,3- 丙二醇和葡萄糖的存在。表 14 概括了分析的结果。

[0321] 表 14

[0322] 巴斯德梭菌 ATCC 6013 由葡萄糖生产 1,3- 丙二醇

	瓶	甲基紫精(mM)	时间(天)	葡萄糖(mM)	1,3-丙二醇(mM) ^d
	1	0	0	22.5	0
	1	0	5	0	0
[0323]	2	0.1	0	26.5	0
	2	0.1	5	0	0
	3	1.0	0	25.3	0
	3	1.0	5	10.0	2.4
	3	1.0	9	0	2.4

[0324] ^a1,3-丙二醇的鉴定用通用方法中介绍的 GC/MS 来证实。

[0325] 实施例 14

[0326] 构建用于转化芽孢杆菌属、链霉菌属和假单胞菌属的种类的通用表达质粒

[0327] 表达载体 pTacIQ

[0328] 大肠杆菌表达载体 pTacIQ 含有插入在 pBR322 (Sutcliffe 等, ColdSpring Harb. Symp. Quant. Biol. 43 卷, 77 页 (1979)) 的 EcoRI 位点的 lacIq 基因 (Farabaugh, 《自然》274 卷, 5673 页 (1978)) 和 tac 启动子 (Amann 等, 《基因》25 卷, 167 页 (1983))。一个多克隆位点和终止序列 (SEQ ID NO:10) 取代了 pBR322 的 EcoRI 和 SphI 之间的序列。

[0329] 亚克隆甘油脱水酶基因 (dhaB 1、2、3)

[0330] 使用 5' 末端含有一个 EcoRI 位点、3' 末端含有一个 XbaI 位点的引物 (SEQ ID NO:41 和 42), 用 PCR 从 pHK28-26 扩增 dhaB3 基因的开放阅读框。将 PCR 产物亚克隆到 pLitmus29 (New England Biolab, Inc, Beverly, MA) 中, 产生含有 dhaB3 的质粒 pDHAB3。

[0331] 使用限制性内切酶 KpnI 和 EcoRI, 将包含有 dhaB3 操纵子的四个基因的全部编码区的区域从 pHK28-26 中亚克隆到 pBluescript I IKS+ (Stratagene, La Jolla, CA) 中, 产生质粒 pM7。

[0332] 用 ApaI 和 XbaI 消化含有 dhaB(1, 2, 3, 4) 的质粒 pM7, 移去 dhaBX 基因 (删除部分的 dhaB3 和全部的 dhaBX)。将剩下的 5.9kb 片断纯化。并与质粒 pDHAB3 的 325-bp 的 ApaI-XbaI 片断连接 (恢复 dhaB3 基因), 产生含有 dhaB(1, 2, 3) 的 pM11。

[0333] 使用 5' 末端含有一个 HindIII 位点和一个共有的 RBS 核糖体结合位点、3' 末端含有一个 XbaI 位点的引物 (SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12), 用 PCR 从 pHK28-26 扩增 dhaB1 基因的开放阅读框。将 PCR 产物亚克隆到 pLitmus28 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) 中, 产生含有 dhaB1 的质粒 pDT1。

[0334] pM11 的 NotI-XbaI 片断含有 dhaB1 的部分基因、dhaB2 基因和 dhaB3 基因, 将这一片断插入 pDT1 中产生 dhaB 表达质粒 pDT2。将含有 dhaB(1, 2, 3) 的 pDT2 的 HindIII-XbaI 片断插入 pTacIQ, 产生 pDT3 亚克隆 1,3-丙二醇脱氢酶基因 (dhaT)

[0335] 将含有全部 1,3-丙二醇脱氢酶 (dhaT) 基因的 pHK28-26 的 KpnI-SacI 片断亚克隆到 pBluescript II KS+ 中, 产生质粒 pAH1。使用 5' 末端含有一个 XbaI 位点、3' 末端含有一个 BamHI 位点的合成引物 (SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14), 以 pAH1 为模板 DNA 用 PCR 扩增 dhaT 基因。将 PCR 产物亚克隆到 pCR-Script (Stratagene) 的 SrfI 位点, 产生含有 dhaT

的质粒 pAH4 和 pAH5。质粒 pAH4 含有从 pCR-Script 的 lac 启动子可正确表达的 dhaT 基因，而质粒 pAH5 则含有相反方向的 dhaT 基因。将来自 pAH4、含有 dhaT 基因的 XbaI-BamHI 片段插入 pTacIQ 产生质粒 pAH8 将含有 RBS 和 dhaT 基因的 pAH8 的 HindIII-BamHI 片段插入 pBluescriptII KS⁺，产生 pAH11。将含有 RBS、dhaT 基因和终止子的 pAH8 的 HindIII-SalI 片段插入 pBluescriptII SK⁺，产生 pAH12。

[0336] 构建 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 的表达盒

[0337] 应用分子生物学的标准方法，用上面介绍的单个的 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 亚克隆装配了一个 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 表达盒。将含有 RBS、dhaT 基因和终止子的 pAH8 的 SpeI-KpnI 片段插入 pDT3 的 XbaI-KpnI 位点，产生 pAH23。将 dhaB3 和 dhaT 基因之间的 SmaI-EcoRI 片段移去，产生 pAH26。用含有一个 EcoRI 位点的 pDT2 的 SpeI-NotI 片段取代 pAH26 的 SpeI-NotI 片段，产生 pAH27。

[0338] 构建 dhaT 和 dhaB(1,2,3) 的表达盒

[0339] 应用分子生物学的标准方法，用上面介绍的单个的 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 亚克隆装配了一个 dhaT 和 dhaB(1,2,3) 表达盒。将含有 dhaB(1,2,3) 基因的 pDT3 的 SpeI-SacI 片段插入 pAH11 的 SpeI-SacI 位点，产生 pAH24。

[0340] 实施例 15

[0341] 用重组的浅青紫链霉菌生产 1,3- 丙二醇

[0342] 葡萄糖异构酶启动子的亚克隆

[0343] 使用 5' 末端含有一个 SpeI 位点和一个 EcoRI 位点、3' 末端含有一个 HindIII 位点的引物 (SEQ ID NO:17 和 18)，用 PCR 从 pC0s121 (SEQ ID NO:15) 或 pC0121low (SEQ ID NO:16) 中扩增两个版本的葡萄糖并构酶启动子。将 PCR 产物亚克隆到 pLitmus29 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) 中，产生质粒 pDT7 和 pDT8。

[0344] 构建 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 的表达盒

[0345] 使用限制性内切酶 HindIII 和 SalI，将 pAH27 中 41kb 的 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 的表达盒 (实施例 14) 插入到 pDT7 或 pDT8 中，分别产生 pDT11 和 pDT12。

[0346] 构建在链霉菌中共表达 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 的质粒

[0347] 用 EcoRI 和 SalI 消化 pDT11 或 pDT12，移去 4.3kb 的 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 的表达盒。载体 pIJ488-101 用限制性内切酶 EcoRI 和 XbaI 消化。表达盒和载体与 SalI-XbaI 接头 SEQ ID No:19 和 SEQ ID No:20 连接，分别产生 pDT13 和 pDT14。

[0348] pIJ488-101 含有浅青紫链霉菌的 pIJ101 (Kendall 和 Cohen,《细菌学杂志》170 卷,4634 页 (1988)) 和大肠杆菌的 pUC18 (Norrande 等,《基因》26 卷,101 页 (1983)) 的复制起始区域。序列来源如下:碱基 1-2086 来自 pIJ101 (1-2086)，碱基 7688-8437 来自 pIJ101 (8080-8830)。碱基 2087-3368 来自远青链霉菌 (Thompson 等,《基因》20 卷,51 页 (1982)) 的硫链丝菌肽抗性基因。碱基 3369-7687 来自 pUC18 并在 KpnI 位点插入有红色糖多孢菌的红霉素抗性基因 (Thompson 等,上文)。

[0349] 用 dhaB(1,2,3) 和 dhaT 转化浅青紫链霉菌

[0350] 使用标准的原生质体转化技术 (Hopwood 等,《链霉菌的遗传操作》The John Innes Foundation (1985)), 将质粒 pDT13 和 pDT14 转化至浅青紫链霉菌 TK23。在含有 50ug/mL 硫链丝菌肽的平板上 30℃ 温育选择转化子。转化子的孢子重新铺板以获得纯培养。

[0351] 甘油脱水酶活性的检测

[0352] 链霉菌转化子在 25mL 补加有 1% 葡萄糖、2% 甘油、1mg/L 维生素 B₁₂、50ug/mL 硫链丝菌肽的 TSB(大豆蛋白胨肉汤, Difco, Detroit, MI) 中 30℃ 培养 3 天。离心收集细胞并重新悬浮在 1mL 的 100mM Tris 缓冲液, pH7.4 中。用弗氏压碎器 (20,000psi) 破碎细胞, 用细胞抽提物按通用方法中的介绍分析其甘油脱水酶活性。转化有 pDT13(克隆 8#) 或 pDT14(克隆 2#) 的浅青紫链霉菌 TK23 的细胞抽提物含有特异活性为 0.1U/mg 的甘油脱水酶。

[0353] 在重组浅青紫链霉菌中生产 1,3- 丙二醇

[0354] 浅青紫链霉菌 TK23/pDT14(克隆 2#) (ATCC____, 也被鉴定为浅青紫链霉菌菌株 SL 14.2) 从一个 TSA 平板上接种到一个 250mL 的瓶中进行培养, 瓶中装有 25mL 补加有 1% 葡萄糖、2% 甘油、1mg/L 维生素 B₁₂、50ug/mL 硫链丝菌肽的 TSB(大豆蛋白胨肉汤, Difco, Detroit, MI)。摇瓶在 30℃ 温育并剧烈振荡三天, 培养三天后, 按通用方法中的介绍, 用 GC-MS 分析 (TMS 衍生) 在上清中检测到 3mg/mL 的 1,3- 丙二醇。

[0355] 实施例 16

[0356] 用重组的浅青紫链霉菌由 D- 葡萄糖生产 1,3- 丙二醇

[0357] 在证明含有 pDT13 或 pDT14 的浅青紫链霉菌 TK23 生产 1,3- 丙二醇时, 细菌培养在 30℃ 通气的摇瓶 (锥形瓶, 液体体积为总体积的 1/10) 中进行。

[0358] 加富培养基摇瓶中的培养用两天的 TSA- 平板 (trypticase 大豆琼脂; BBL#11043) 接种开始。加富培养基可以是 TSB (trypticase 大豆肉汤; BBL#11768)、液体肉汤 (每升含有 16g 蛋白胨, 10g 酵母抽提物, 和 5g NaCl)、培养基 B (TSB 每升补加: 10.0g 葡萄糖, 2mL NTA 被柠檬酸取代的调整的 Balch' s 痕量元素溶液, 2.0g Na₂CO₃, 4.0g K₂HPO₄, 1mg 维生素 B₁₂, 最终 pH = 7.2)、或培养基 C (培养基 B, pH = 6.4)。调整的 Balch' s 痕量元素溶液的组分可在《普通和分子细菌学方法》(P. Gerhardt 等编辑, 158 页, 美国微生物学会, Washington, DC (1994)) 中查到。基本培养基摇瓶中的培养用两天的 TSB 液体培养物接种开始, 接种量为 1/30 (v/v)。基本培养基可以是: MM322 (每升含有: 12.0g 葡萄糖, 11.3g K₂HPO₄, 1.0g (NH₄)₂SO₄, 0.2g Difco 酵母抽提物, 0.1g NaCl, 2mg 维生素 B₁₂, 和 10mL 上面介绍的调整的 Balch' s 痕量元素溶液, 最终 pH6.7 (HCl)); 培养基 D (补加有 2.0g Na₂CO₃/L 的培养基 MM322, 最终 pH7.2)、或培养基 E (培养基 D, 最终 pH6.4)。培养基 B 和 C 以及基本培养基用过滤除菌, 其它培养基用高压灭菌。

[0359] 摇瓶在 30℃ 温育两天并剧烈振荡, 然后上清取样做 HPLC 分析。加入葡萄糖, 培养物在有氧条件下温育 1 小时, 然后将培养物转移到一个 25mL 体积的玻璃试管中 (接近装至顶部)。然后这些试管在无氧条件下 30℃ 继续温育。温育 2-5 天后, 用通用方法中介绍的 HPLC 检测上清中的 1,3- 丙二醇。

[0360] 实施例 17

[0361] 构建通用质粒、质粒用于在芽孢杆菌中超量表达 dhaB(1-3) 和 dhaT 以及用重组的地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌生产 1,3- 丙二醇

[0362] 构建通用表达质粒

[0363] 复制型高拷贝穿梭载体 pVS02 用于在芽孢杆菌中共表达 dhaB(1-3) 和 dhaT。pVS02 是通过将与枯草芽孢杆菌的 apr 启动子融合且携带一个碱性丝氨酸蛋白酶的 EcoRI/BamHI

片断克隆到 pBS19 中构建而来。pBS19 是 pBS42 (Band 和 Henner,《DNA》第 3 卷,17 页 (1984)) 的一个衍生物,在 pBS19 中 pBS42 的 EcoRI/BamHI 片断被 pUC 19 (Boehringer Mannheim) 的 EcoRI/HindIII 多接头取代。为了便于测序和 PCR 反应,用 PCR 方法将一个 45bp 的合成接头 (SEQ ID NO:21) 引入蛋白酶基因末端与转录终止子之间。

[0364] 复制型低拷贝穿梭载体 pSS15-B 用于在芽孢杆菌中共表达 dhaB(1-3) 和 dhaT。质粒 pSS15-B 的构建方法如下:用 HindIII/SalI (位点在多接头中) 消化质粒 pHP 13 (Haima 等,《分子和普通遗传学》209 卷,335 页 (1987)),用 T4DNA 聚合酶将末端补齐,重新连接产生 pSS13。将 pVS02 的 2kb 的 EcoRI/Bam HI 片断插入 pSS13 的 EcoRI/Bam HI 位点,就产生了 pSS 15-B。

[0365] 超量表达 dhaB(1-3) 和 dhaT 盒的质粒

[0366] 为在 dhaT 的 5' 末端产生一个芽孢杆菌共有的核糖体结合位点,将一个由合成引物 (SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:23) 退火得到的 EcoRI/XbaI 接头插入 pAH23 的 EcoRI/XbaI 位点,产生 pM17。为在 dhaB1 的 5' 末端引入一个 SalI 位点,将一个用合成引物 (SEQ ID NO:24 和 SEQ IDNO:25) 退火得到的 HindII/bglIII 接头加到 pM17 的 HindII/bgIII 位点,产生 pM20。将质粒 pM20 的 0.3kb 的 MluI/KpnI 片断用质粒 pAH4 的 0.3kb 的 MluI/KpnI 片断取代,引入一个 HindIII 位点,从而产生 pM21。

[0367] 将一个 SalI-XbaI 接头 (SEQ ID NO:26 和 27) 插入到用限制性内切酶 SalI-XbaI 消化的 pAH5 中,产生 pDT15。这个接头消除了 XbaI 位点并改变了阅读框,使 dhaT 基因与质粒 pSS15-B 和 pVS2 的蛋白酶编码序列的开放阅读框融合。然后,将 pDT15 的 1kb 的 SalI-MluI 片断插入到 pAH24 中,取代原来的 SalI-MluI 片断,产生 pDT17。

[0368] 将一个 SalI-XbaI 接头 (SEQ ID NO:28 和 29) 插入到用限制性内切酶 SalI-XbaI 消化的 pAH5 中,产生 pDT16。这个接头消除了 XbaI 位点并改变了阅读框,使 dhaT 基因与 pUSH1 (Schon 和 Schuman,《基因》147 卷,91 页 (1994)) 的 poly-His 编码序列的开放阅读框融合。然后,将 pDT16 的 1kb 的 SalI-MluI 片断插入到 pAH24 中,取代原来的 SalI-MluI 片断,产生 pDT18。

[0369] 质粒 pDT4 (含有 dahB(1-3)) 用将 pDT2 的 2.7kb 的 EcoRI/XbaI 片断引入用 EcoRI/XbaI 消化的 pUC18 (Boehringer Mannheim) 来构建。

[0370] 在芽孢杆菌中超量表达 dhaB(1-3) 和 dhaT 盒的质粒

[0371] pDT17 用 SacI 消化,末端用 T4 聚合酶补齐,DNA 用 SalI 消化以释放含有 dahT 和 dahB 的片断。将此片断与用 HindIII (末端用 T4 聚合酶补平) 和 SalI 消化的 pSS15-B 连接,产生 pM27。

[0372] 使用乳糖诱导系统在芽孢杆菌中超量表达 dhaB(1-3) 的质粒

[0373] 将含有 dahB(1-3) 的质粒 pDT4 的 2.7kb BgIII/HindIII 片断克隆到 pUSH1 的多接头的 HindIII/BamHI 位点,产生 pM26。dahB1 基因与 pUSH1 的 poly-His 编码序列的开放阅读框融合。

[0374] 将质粒转化进芽孢杆菌

[0375] 用自然转化的方法 (McCuen 和 Thorne,《细菌学杂志》107 卷,636-645 页 (1971)) 将质粒 pM26 和 pM27 转化进地衣芽孢杆菌 BG307。并分别在 10ug/mL 卡那霉素和 30ug/mL 氯霉素中进行筛选。用标准的原生质体转化技术 (Pragai 等,《微生物学》140 卷,305 页

(1994)) 将同样的质粒转化进地衣芽孢杆菌 BG188, 并按前述的方法进行筛选。枯草芽孢杆菌 BG2864 按自然转化的方法用 pM27 进行转化。含有质粒的转化子在含有 10ug/mL 氯霉素的 LA 平板上进行筛选。

[0376] 还将 pM26 转化进枯草芽孢杆菌菌株 1E62 (Saito 等,《分子和普通遗传学》170 卷, 117 页 (1979)), 含有质粒的转化子在含有 10ug/mL 红霉素和 20ug/mL 卡那霉素的 LA 平板上进行筛选。

[0377] 所有的转化子均生长在 30°C。

[0378] 甘油脱水酶活性的检测

[0379] 转化有 pM26 (克隆 #8) 的地衣芽孢杆菌菌株 BG 188 在 25mL 补加有 1% 葡萄糖和 10ug/mL 卡那霉素的 LB (Difco) 中 30°C 生长过夜。离心收集细胞并重新悬浮在 1mL 的 0.1M Tricine/KOH 缓冲液, pH 8.2, 50mM KCl, 1mM 二硫苏糖醇和 200uM 苯甲基磺酰氟中。在弗氏压碎器 (20,000psi) 中破碎细胞并收集细胞抽提物, 按通用方法中的介绍分析其甘油脱水酶活性。得到了 0.036U/mg 的特异活性。按通用方法中的介绍, 测量 1,3- 丙二醇脱氢酶的特异活性, 为 0.2U/mg。

[0380] 在重组芽孢杆菌中生产 1,3- 丙二醇

[0381] 转化有 pM26 (克隆 #8) 的地衣芽孢杆菌菌株 BG188 (ATCC____) 在装有 25mL 补加了 1% 葡萄糖和 10ug/mL 卡那霉素的 LB (Difco) 的摇瓶中 30°C 剧烈振荡生长过夜。然后取 1mL 接种到装有 25mL 补加了 1% 葡萄糖、1% 甘油、0.33ug/mL 维生素 B₁₂、和 10ug/mL 卡那霉素的 LB 的 250mL 摇瓶中。摇瓶在 30°C 温育并剧烈振荡, 生长 9 小时后, 按通用技术中的介绍, 用 GC/SM (TMS 衍生) 检测到 300ug/mL 的 1,3- 丙二醇

[0382] 转化有 pM27 (克隆 #1) 的枯草芽孢杆菌菌株 BG2864 (ATCC____) 在装有 25mL 补加了 1% 葡萄糖、1% 甘油、0.33ug/mL 维生素 B₁₂、和 10ug/mL 氯霉素的 LB 的 250mL 摇瓶中进行生长。摇瓶在 30°C 温育并剧烈振荡, 生长 43 小时后, 检测 1,3- 丙二醇。

[0383] 重组芽孢杆菌生产 3- 羟基丙醛

[0384] 芽孢杆菌发酵在一个总体积为 15.5 升的 Biolafitte 发酵罐中进行, 开始的工作体积为 7 升, 在发酵过程中增加到 9.5 升。有氧环境用 650rpm 的叶轮速率和 0.8bar 的负压、7 升 / 分钟的通气速率来保证 (有氧环境用 % 溶解氧 (100% DO 为大气压时的溶解氧) 来定义, 这一值用安装的 DO- 探针进行测量; 35% DO 被认为是有氧的最小值)。pH 值用自动加入 H₂SO₄ 或 28% NH₄OH 的方法维持在 pH6.70。温度维持在 30°C,

[0385] 将下列组分分批加入罐内, 121°C 灭菌 30 分钟: (克 / 升) 6NaH₂PO₄·H₂O、10K₂HPO₄、1.5NaCl、10(NH₄)₂SO₄、0.2FeCl₃、15 蛋白胨、6 酵母抽提物、10mL Balch' s 调整的痕量元素溶液 (《普通和分子细菌学方法》(P. Gerhardt 等, 编辑), 158 页, 美国微生物学会, Washington, DC (1994)) 和 2 MAZU DF204 (一种常规消泡剂)。灭菌后, 加入 350 克 50% 的葡萄糖原料, 并同时加入卡那霉素和氯霉素 (均至终浓度为 10mg/mL)

[0386] 从在 LBG1% (= 10g 蛋白胨, 5g 酵母抽提物, 5g NaCl, 10g 葡萄糖) 的摇瓶中生长了 24 小时的地衣芽孢杆菌 BG188/pM26 (克隆 #8) 中取 0.6 升接种发酵罐。然后使培养物生长, 消耗葡萄糖。当 pH 升至 6.60 时, 加入葡萄糖原料 (50% 葡萄糖, 高压灭菌, 0.7 克 / 分钟)。45 小时后, 加入营养物质 (50mL Balch' s 痕量元素溶液, 14 克 K₂HPO₄, 14 克酵母抽提物, 14ml 维生素溶液, pH 调至 6.60, 过滤除菌)。70 小时后, 加入维生素 B₁₂ 至终浓度

10mg/L。在前 92 小时, % D₀ 保持在有氧水平。在发酵过程中葡萄糖为(少量)过量存在(有氧期为 0.2-12g/L(前 92 小时); O₂- 限制期为 2.0-36g/L(92-164 小时))。在 87 小时所取的样品中, 怀疑有 3- 羟基丙醛存在, 通过用还原剂硼氢化钠处理样品后检测 1,3- 丙二醇得到了证实。

[0387] 实施例 18

[0388] 其它在芽孢杆菌中超量表达 dhaT 和 dhaB(1-3) 盒的质粒

[0389] 在芽孢杆菌中超量表达 dhaT 和 dhaB(1-3) 盒的质粒

[0390] 将含有 dhaB(1-3) 和 dhaT 的质粒 pM21 的 SalI/HindIII 片断与 5kb 的 SalI/HindIII pVS02 载体连接, 产生 pM22。pM22 含有处于一个高拷贝载体上的 apr 启动子控制下的 dhaB 和 dhaT。

[0391] 将 pM21 的 SalI/HindIII 片断与 5.8kb 的 pSS15-B 的 SalI/HindIII 片断连接, 产生 pM23。pM23 含有处于一个低拷贝载体上的 apr 启动子控制下的 dhaB 和 dhaT。

[0392] 在芽孢杆菌中超量表达 dhaT 和 dhaB(1-3) 盒的质粒

[0393] pDT17 用 SacI 消化, 末端用 T4DNA 聚合酶补齐, DNA 用 SalI 消化以释放含有 dhaT 和 dhaB 的片断。将此片断与用 HindIII(末端用 T4 聚合酶补平) 和 SalI 消化的 pVS02 连接, 产生 pM25。

[0394] 使用乳糖诱导系统在芽孢杆菌中超量表达 dhaB(1-3) 和 dhaT 盒的质粒

[0395] pDT18 用 SacI 消化, 末端用 T4DNA 聚合酶补齐, DNA 用 SalI 消化以释放含有 dhaT 和 dhaB 的片断, 两个基因都含有一个芽孢杆菌共有的核糖体结合位点。将此片断与用 HindIII(末端用 T4 聚合酶补平) 和 SalI 消化的 pUSH1 连接, 产生 pM24。

[0396] 实施例 19

[0397] 重组芽孢杆菌将 D- 葡萄糖转化为 1,3- 丙二醇

[0398] 芽孢杆菌的生长条件

[0399] 在证明地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌生产 1,3- 丙二醇时, 细菌的生长在一个摇瓶(锥形瓶) 和 15.5L(总体积) Biolafitte 发酵罐(工作体积为 7-10L) 中、30℃ 或 35℃(按照指示) 有氧条件下进行。

[0400] 在 LBG(每升含有: 16g 蛋白胨, 10g 葡萄糖, 10g 酵母抽提物和 5g NaCl) 摇瓶中的培养用培养了一天的 TSA(Trypticase 大豆琼脂, BBL#11043) 平板接种起始。然后用这些摇瓶去接种发酵罐或摇瓶, 来证明 D- 葡萄糖确实转化为 1,3- 丙二醇。

[0401] 摇瓶中的分批培养物

[0402] 加富培养基可以是 TSB(Trypticase 大豆肉汤, BBL#11768)、LBG、培养基 B(TSB 每升补加: 10.0g 葡萄糖, 2mL NTA 被柠檬酸取代的调整的 Balch' s 痕量元素溶液, 2.0g Na₂CO₃, 4.0g K₂HPO₄, 1mg 维生素 B₁₂, 最终 pH = 7.2)、或培养基 C(培养基 B, pH = 6.4)。调整的 Balch' s 痕量元素溶液的组分可在《普通和分子细菌学方法》(P. Gerhardt 等, 编辑, 158 页, 美国微生物学会, Washington, DC(1994)) 中查到。基本培养基可以是: MM322(每升含有: 12.0g 葡萄糖, 11.3g K₂HPO₄, 10g (NH₄)₂SO₄, 0.2g Difco 酵母抽提物, 0.1g NaCl, 2mg 维生素 B₁₂, 和 10mL 上面介绍的调整的 Balch' s 痕量元素溶液, 最终 pH6.7(HCl))、培养基 D(补加有 2.0g/L Na₂CO₃ 的培养基 MM322, 最终 pH7.2)、或培养基 E(培养基 D, 最终 pH6.4)。培养基 B 和 C 以及基本培养基用过滤除菌, 其它培养基用高压灭菌。

[0403] 摇瓶在 30℃温育一天并剧烈振荡,然后上清取样做 HPLC 分析。加入葡萄糖,培养物在有氧条件下温育 1 小时,然后将培养物转移到一个 25mL 体积的玻璃试管中(接近装至顶部)。然后这些试管在无氧条件下 30℃继续温育。温育 1-5 天后,用通用方法中介绍的 HPLC 检测上清中的 1,3- 丙二醇。

[0404] 在发酵罐中分批培养和补料分批培养

[0405] 从一个摇瓶中取总体积为 600mL 的培养物(LBG 培养基),接种到装有 6.4L 培养基的发酵罐中,发酵罐中的培养基为分批加入并高压灭菌 30 分钟(基本培养基)或 45 分钟(加富培养基)。发酵罐中典型的基本培养基是培养基 D,典型的“加富”培养基是另加有 50g 酵母抽提物/L 的培养基 D。发酵罐灭菌后,用注射器和发酵罐盖上的隔膜接口加入滤膜除菌的添加物(维生素 B12 或营养缺陷型的补偿物)。

[0406] 对负压(BP,0.1-0.5bar)、通气(升空气每分钟,0.4-1vvm)、搅拌(rpm,200-600)、温度(T,30-37℃)、溶解氧(% DO)、和 pH(5.8-7.2,加入 NH₄OH 和 H₂SO₄ 或 H₃PO₄) 进行监测,并按照指示控制在所需值。

[0407] 接种后,细胞以分批发酵模式先生长 14 小时,然后开始加入葡萄糖原料。对于厌氧生长/生产,可以按照指示通过降低 rpm 和 BP 或用 N₂ 取代空气使 % DO 降至 0。

[0408] 从发酵罐和摇瓶中取上清样品进行 OD₅₅₀ 读数(生长)和酶促葡萄糖试验;同时制备上清样品按照通用技术中列出的标准程序进行 HPLC 分析。上清中存在 1,3- 丙二醇。

[0409] 实施例 20

[0410] 用 dhaB(1-3) 和 dhaT 转化假单胞菌并证明其生产 1,3- 丙二醇构建在假单胞菌中共表达 dhaB(1-3) 和 dhaT 的质粒

[0411] 使用限制性内切酶 EcoRI 和 SalI,将 pAH27 的 4,1kb 的 dhaB(1-3) 和 dhaT 表达盒插入载体 pMMB66EH(Füste 等,《基因》48 卷,119 页(1986)) 和 pMMB207(Morales 等,《基因》97 卷,39 页(1991)),分别产生 pDT10 和 pDT9。

[0412] 用 pDT9 表达质粒转化铜绿假单胞菌 PA02845

[0413] 转化用的铜绿假单胞菌 PA02845 通过在 L- 肉汤中 37℃ 200rpm 振荡培养过夜来制备。将种子培养物按 1 : 25 接种到 25mL 经过预热和预通气的新鲜 L- 肉汤中。将此新鲜培养物在 37℃ 200rpm 温育 2-3 小时至对数期早期。离心收集细胞,用 10ml 冰冷的含 5% 二甲基亚砷的 0.15M MgCl₂ 洗涤两次,并悬浮于 2mL 的二甲基亚砷溶液。将细胞悬液(0.2mL)与 100-200ng 的 pDT9DNA 混合,冰上放置 60 分钟。反应混合物在 37℃ 热刺激 2 分钟,然后转置冰上 5 分钟。加入 L- 肉汤(0.5mL),细胞在 37℃ 温育 20 分钟。从补加有 37.5ug/mL 氯霉素的营养琼脂平板中挑取单菌落。

[0414] 将 pDT10 接合转移至铜绿假单胞菌 PA01

[0415] 质粒 pDT10 用 Figurski 和 Helinski 的方法(《美国国家科学院院报》,76 卷,1648 页(1979)) 接合转移至 PA01。将 pDT10 转化到大肠杆菌 AC80(Chakraborty 等,《美国国家科学院院报》,75 卷,3109 页(1978)) 中来产生一个供体菌株。辅助菌株是含有 pRK2013(Figurski 和 Helinski,上文)的大肠杆菌 HB101。受体菌株是铜绿假单胞菌 PA01(Royle 等,《细菌学杂志》145 卷,145 页(1981))。每种菌株的培养物(5mL)均在 LB 中 37℃ 生长过夜。细胞用 0.9% NaCl 洗涤,并重新悬浮于 200uL。将细胞混合在一起并涂布到 LA 平板(Luria 琼脂, Difco)上。平板在 37℃ 温育 6 小时。将细胞从平板中取出,转移

到含有 250ug/mL 羧苄青霉素的 PIA(Difco) 平板中,生长过夜。在相同培养基上挑选单菌落。

[0416] 检测甘油脱水酶活性和 1,3- 丙二醇脱氢酶活性

[0417] 铜绿假单胞菌 PA01/pDT 10 在 25mL 补加有 250ug/mL 羧苄青霉素、0.1mM IPTG 的 2XYT(16g/L 酵母抽提物,16g/L 蛋白胨,5g/L NaCl) 中 37℃ 过夜培养。离心收集细胞,并重新悬浮在 1mL 100mM 的 Tris 缓冲液 pH 7.4 中。细胞用弗氏压碎器在 5,000psi 进行破碎。然后用粗抽提物按标准方法分析甘油脱水酶活性和 1,3- 丙二醇脱氢酶活性。蛋白测定使用 Bio-Rad(Bradford) 蛋白试验。甘油脱水酶的特异活性为 5U/mg。1,3- 丙二醇脱氢酶的特异活性为 20U/mg。用同样方法制备转化有 pDT9 的铜绿假单胞菌 PA02845 粗抽提物,它含有 0.05U/mg 的甘油脱水酶活性。

[0418] 用含有 pDT9 质粒的铜绿假单胞菌生产 1,3- 丙二醇

[0419] 含有 pDT9 的铜绿假单胞菌 PA02845(ATCC55760) 在补加有 25ug/mL 氯霉素的 2XYT 培养基中 37℃ 和 200rpm 振荡培养过夜。生长过夜后,取一份细胞悬液转移到生长培养基(3 份 2XYT 培养基 +1 份 HEPES 0.1 培养基,补加有 0.25% (w/v) 葡萄糖,0.2% (w/v) KNO₃, 25ug/mL 氯霉素,50mg/L 酵母抽提物,和 80mg/L 营养肉汤) 中,使细胞悬液的 OD_{660nm} 达到 0.5-0.8AU。HEPES 0.1 培养基含有以下组分: NH₄Cl, 9.52mM; MgCl₂·6H₂O, 0.523mM; K₂SO₄, 0.276mM; HEPES(N-[2- 羟乙基] 哌嗪 -N-[2- 乙磺酸]), 40mM; tricine(N- 三(羟甲基) 甲基甘氨酸), 4mM; FeSO₄·7H₂O, 0.010mM; K₂HPO₄, 0.132mM; 和下列组分的痕量矿物质并使其终浓度(g/L) 如下: 柠檬酸钠 6H₂O, 0.001; FeSO₄·7H₂O, 0.0005; CoCl₂·6H₂O, 0.0001; MnCl₂·4H₂O, 0.00001; ZnCl₂, 0.000005; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.000025; NiCl₂·6H₂O, 0.0001; CuSO₄·2H₂O, 0.00005, 30℃ 250rpm 振荡培养约 1 小时后,在生长培养基中加入 0.5mM 的 IPTG(异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷),让细胞继续生长。在生长约 5 小时后,在室温下离心收集细胞。细胞用生产培养基洗涤三次,生产培养基为补加有 0.25% (w/v) 葡萄糖、0.2% (w/v) KNO₃、25ug/mL 氯霉素、50mg/L 酵母抽提物和 80mg/L 营养肉汤的 HEPES 0.1 培养基。在增菌时,洗涤后的细胞用原收集体积的含有 0.2% (v/v) 甘油的生长培养基重新悬浮。细胞悬液在氮气环境下 37℃ 250rpm 振荡温育。约 1 小时后,在细胞悬液中加入 5ug/mL 的辅酶 B₁₂(5,6- 二甲基- 苯并咪唑钴胺-5- 脱氧腺苷) 并继续在 30℃ 250rpm 振荡温育。从细胞悬液中周期取样进行产物分析。在收集样品时,从样品中离心去除细胞,在分析前将上清水相冻存在 -20℃。

[0420] HPLC 分析用已知的标准物校准后显示这些细胞悬液产生了 1,3- 丙二醇。结果见表 15。按照通用方法中的介绍用 GC/MS 分析来证实产物。

[0421] 表 15

[0422] 含有 pDT9 质粒的铜绿假单胞菌生产 1,3- 丙二醇

	样品	时间(小时)	1,3-丙二醇(mM)
	A	0	0
[0423]	A	24	5.1
	B	0	0
	B	24	5.6

[0424] 实施例 21

[0425] 用铜绿假单胞菌由 D- 葡萄糖生产 1,3- 丙二醇

[0426] 一般生长条件

[0427] 获自 PGSC(Pseudomonas Genetic Stock Center, East Carolina School of Medicine, Greenville, NC) 的铜绿假单胞菌 PA02845 在基础培养基 HEPES0.1 中进行培养, HEPES0.1 含有以下组分: NH_4Cl , 9.52mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.523mM; K_2SO_4 , 0.276mM; HEPES(N-[2-羟乙基]哌嗪-N-[2-乙磺酸]), 40mM; Tricine(N-三(羟甲基)甲基甘氨酸), 4mM; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.010mM; K_2HPO_4 , 0.132mM; 和下列组分的痕量矿物质并使其终浓度(g/L)如下: 柠檬酸钠 $6\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0001; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.00001; ZnCl_2 , 0.000005; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.000025; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0001; $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.00005。HEPES0.1 用于所有的实验, 在补加其它物质时会注明。

[0428] 用基因间断的方法构建铜绿假单胞菌 PA02845 的甘油阴性突变体

[0429] 铜绿假单胞菌 PA02845 在营养肉汤(Difco, Detroit, MI)中 37℃、200rpm 振荡培养过夜。离心回收细胞, 用标准的碱裂解程序(Sambrook, 1989 从细胞中抽提 DNA。使用 5' 末端带有 EcoRI 位点的引物 JJ-glpR-5' 和 JJ-glpR-3' (分别为 SEQ ID NOS: 30 和 31), 用 PCR 方法从铜绿假单胞菌 PA02845 中扩增 glpR(甘油分解代谢调节蛋白基因, GenbankACCESSION#M60805) 的开放阅读框。然后将这个 DNA 片断插入到质粒 pAR0180(Parke, 《基因》93 卷, 135 页, (1990)) 的单一 EcoRI 位点, 产生质粒 pJJ10。用 pJJ10 连接混合物的 DNA 转化大肠杆菌, 并涂布到含有 50ug/mL 氨苄青霉素和 0.08mg/mL Xgal(5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷)的营养琼脂(Difco, Detroit, MI)上。将很可能含有 glp 插入的白色菌落挑出, 转至补加有 50ug/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中。37℃、200rpm 振荡培养过夜后收集细胞, 并从细胞中回收 pJJ10。

[0430] 用 PCR 方法从 pUC4K(Pharmacia Cat. No. 27-4958-01) 中扩增卡那霉素盒区域, 引物(SEQ ID No32 和 33) 除设计用来扩增该区域外, 还将扩增片断的末端修饰, 使之能被限制性内切酶 Styl(Promega, Madison, WI) 识别。扩增的结果得到 4kb 的 pUC4K-styl 片断。将 pUC4K-styl DNA 片断亚克隆到质粒 pJJ10 上 glpR 基因内的 Styl 位点, 产生质粒 pJJ11, 用 pJJ11 连接混合物的 DNA 转化大肠杆菌, 并涂布到补加有 25ug/mL 卡那霉素和 50ug/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂上。挑取 5-20 个单菌落, 在补加有 25ug/mL 卡那霉素和 50ug/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37℃ 培养过夜后, 分别回收 DNA。用凝胶电泳证实所需质粒 DNA 的存在

[0431] 按照标准程序用 pJJ11DNA 转化铜绿假单胞菌 PA02845。主要过程是, 铜绿假单胞菌在 L- 肉汤中 37℃、200rpm 振荡培养过夜, 来制备用于转化的细胞。将此过夜培养物 1:25 接种至 25ml 预热并预先通气的新鲜 L- 肉汤中。新鲜的培养物在 37℃、200rpm 振荡温育 2-3 小时(至对数期早期)。离心细胞并弃上清。将收集的细胞重新悬浮在 10ml 无菌的、冰冷的、含 5% 二甲基亚砷的 0.15M MgCl_2 中, 并冰上放置 5-10 分钟。离心将细胞与上清分离, 重新悬浮在 10ml 无菌的、冰冷的、含 5% 二甲基亚砷的 0.15M MgCl_2 中, 并冰上放置 5-10 分钟。最后再次离心弃去上清, 将细胞重新悬浮在 2ml 无菌的、冰冷的、含 5% 二甲基亚砷的 0.15M MgCl_2 中。将每份 0.2ml 的冰冷细胞浓缩物与 100-200ng pJJ11DNA 混合在预冷的 1.5ml 聚丙烯离心管中, 并将混合物在冰上放置 60 分钟。然后将离心管迅速转移到 37℃ 水浴槽内 2 分钟, 并立即放回冰上 5 分钟。加入大约 0.5ml L- 肉汤, 在 37℃ 轻轻振荡

温育 0.3-1 小时。温育复苏后,取每份 10uL 和 50uL 的细胞悬液涂布到补加有 50ug/mL 卡那霉素的营养琼脂平板上。从选择平板上长出的菌落中筛选能在补加有 1%琥珀酸或 1%甘油的 HEPES0.1 培养基琼脂平板上生长的克隆。不能在甘油上生长但能在琥珀酸上生长的克隆冻存于 15%的甘油以备后用。

[0432] 用 pDT9 转化 gp1R⁻ 铜绿假单胞菌 PA02845

[0433] 按上面介绍的方法制备转化用的铜绿假单胞菌。将每份 0.2ml 的冰冷细胞浓缩物与 100-200ng pDT9DNA 混合在预冷的 1.5ml 聚丙烯离心管中,并将混合物在冰上放置 60 分钟。然后将离心管迅速转移到 37℃水浴槽内 2 分钟,并立即放回冰上 5 分钟。加入大约 0.5ml L⁻ 肉汤,在 37℃轻轻振荡温育 0.3-1 小时。温育复苏后,取每份 10uL 和 50uL 的细胞悬液涂布到补加有 37.5ug/mL 氯霉素的营养琼脂平板上。

[0434] 筛选含有 pDT9 的 gp1R⁻ 铜绿假单胞菌 PA02845 转化子

[0435] 将上面的转化子在补加有 37.5ug/mL 氯霉素的营养琼脂平板上铺板并 37℃培养过夜。从这些选择平板上长出的菌落中挑取约 20 个,转至 10mL 含有 37.5ug/mL 氯霉素的营养肉汤 (Difco, Detroit, MI) 中,37℃,200rpm 振荡培养过夜。为证实所选的转化子中存在 pDT9 质粒,将质粒 DNA 抽提、纯化并用 EcoRI (Promega, Madison, WI) 酶切。用凝胶电泳分析线型 DNA 的分子量。另外,在用凝胶电泳分析线型 DNA 的分子量后,使用与 dhaT、dhaB1、dhaB2 和 dhaB3 序列相同的引物对 (分别为 SEQ ID NO :34 和 35,36 和 37,8 和 9,4 和 5),用 PCR 扩增的方法来证实所需基因的存在。

[0436] 对转化有 pDT9 的 gp1R⁻ 铜绿假单胞菌 PA02845 进行分解代谢筛选

[0437] 从上面的阳性转化子中选择 1 至 20 个克隆做进一步分析。细胞在补加有 37.5ug/L 氯霉素的营养肉汤中 37℃、250rpm 振荡有氧生长过夜。将细胞按 1 : 8 的稀释比例转入加有 1.5mM IPTG (异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷) 的相同培养基中,继续生长 4-6 小时。离心收集细胞,并用补加有 10g/L 甘油、0.03g/L 小牛抽提物、0.05g/L 蛋白胨、0.05g/L 酵母抽提物 (均为 Difco, Detroit, MI) 和 0.2% KNO₃ 的 HEPES1.0 培养基洗涤一次。然后将细胞重新悬浮于 1/5 的原始体积,装入一个小瓶使瓶中没有空间剩余。在 30℃、100rpm 振荡温育 18-72 小时。离心去除细胞,用 HPLC 分析上清中 1,3- 丙二醇的存在。另外,用气相色谱-质谱鉴别了 1,3- 丙二醇。

[0438] 转化有 pDT9 的 gp1R⁻ 铜绿假单胞菌 PA02845 (ATCC55760) 由 D- 葡萄糖生产 1,3- 丙二醇

[0439] 按照上面的筛选程序,选择 1 至 5 个能最大量地由甘油生产 1,3- 丙二醇的克隆。在补加有 37.5ug/L 氯霉素的营养肉汤中 30℃、250rpm 振荡有氧生长过夜。将细胞按 1 : 8 的稀释比例转入加有 1.5mM IPTG 的相同培养基中,继续生长 4-6 小时。离心收集细胞,并用补加有 10g/L 甘油、0.03g/L 小牛抽提物、0.05g/L 蛋白胨、0.05g/L 酵母抽提物和 0.2% KNO₃ 的 HEPES0.1 培养基洗涤一次。然后将细胞重新悬浮于 1/5 的原始体积,装入一个小瓶使瓶中没有空间剩余。在 30℃、100rpm 振荡温育约 36 小时。离心去除细胞,用 HPLC 分析上清中 1,3- 丙二醇的存在。另外,用气相色谱-质谱鉴别了 1,3- 丙二醇。

[0440] 实施例 22

[0441] 构建在黑曲霉中表达 dhaB1、dhaB2、dhaB3 和 dhaT 的表达盒通用表达盒 (pAEX) :

[0442] 质粒 pGTPyrG (Berka 等,“发展丝状真菌的表达系统”《生物技术进展》第 7 卷,

127-154 页 (1989)) 的 1.4kb 的 SpeI-EcoRV 片断含有足够用于适当调节黑曲霉 gla A 启动子和终止子的部分,将此片断连接到 pLITMUS39 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的多接头的 SpeI 和 EcoRV 位点。

[0443] 黑曲霉的单个克隆表达盒

[0444] 使用相同的克隆策略,分别克隆单个的肺炎克雷伯氏菌 dhaB 亚单位和 dhaT 的开放阅读框 (ORF' s),并将它们与通用表达载体 (pAEX) 连接:

[0445] 根据已知的完整基因操纵子的序列,设计用于 PCR 扩增单个的 dhaBORF 和 dhaT ORF 的引物对,使它们与每种 ORF 的 5' 末端和 3' 末端的序列匹配 (dhaB1、dhaB2、dhaB3、dhaBX 和 dhaT 的引物对分别为:SEQID NO:38 和 12,39 和 40,41 和 42,45 和 46,43 和 44)。除了序列匹配外,每种 ORF 的 5' 末端引物还设计包含一个 EcoRI 限制酶切位点,在 5' 最末端还含有一个 BglIII 限制酶切位点,并在每种 ORF 的第一个 ATG 上游还有 5 个碱基的 CAGCA 序列。设计用来与每种 ORF 的 3' 末端匹配的引物在克隆的 3' 最末端、转录终止子的下游还含有一个 XbaI 限制酶切位点。

[0446] dhaB 和 dhaT ORF' s 的单个克隆片断,使用上面介绍的引物,用 PCR 方法从含有完整的肺炎克雷伯氏菌 dhaT 操纵子的质粒 pHK26-28 中扩增。单个 ORF 克隆片断根据它们各自的分子量进行分离 (dhaB1 = 1540bp ;dhaB2 = 607bp ;dhaB3 = 448bp ;dhaBX = 1846bp ;dhaT = 1187bp)。利用 PCR 引物中设计的 EcoRI 和 XbaI 限制酶切位点,将每种单个的 dhaB 和 dhaTORF 片断连接到 pLITMUS29 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的多接头的 EcoRI 和 XbaI 位点。测序证明 pLITMUS29 中的 dhaB2 和 dhaB3 克隆是正确的。将 pLITMUS29 中 dhaB 1 克隆编码区的 1363bp 的单一 NcoI-EcoRV 片断去除,用 pHK26-28 的相同酶切片断取代。将 pLITMUS29 中 dhaT 克隆编码区的 783bp 的单一 Tth111I-MluI 片断用 pHK26-28 的相同酶切片断取代。将 pLITMUS29 中 dhaBX 克隆编码区的 1626bp 的单一 EcoRV 片断用 pM7 (含有肺炎克雷伯氏菌的 dhaB 操纵子) 的相同酶切片断取代。对 dhaB1、dhaBX 和 dhaT 的 5' 和 3' 末端各测序约 250bp,证明其序列是正确的,但都含有一些取代片断的序列。

[0447] 将 pLITMUS29 的分别含有 dhaB1、dhaB2、dhaB3、dhaBX 和 dhaT 克隆的 ORF 的单一 BglIII-XbaI 限制酶切片断,分别连接到通用表达载体 pAEX 的 BglIII-XbaI 限制酶切位点上,使每个克隆的表达均置于黑曲霉 glaA 启动子和终止子的控制下。获得的载体根据其 ORF 进行命名,即:pAEX:dhaB1、pAEX:dhaB2、pAEX:dhaB3、pAEX:dhaBX 和 pAEX:dhaT。

[0448] 黑曲霉的双表达盒载体:

[0449] 从载体 pAEX:dhaB1 中分离含有 dhaB1 表达盒的单一 SnaB1-StuI 限制酶切片断 (包括黑曲霉的 glaA 启动子、dhB1 的 ORF 和终止子),将该片断连接到 pAEX:dhaB2 载体的单一 SnaB1 限制酶切位点上。将含有构巢曲霉 pyrG 营养缺陷型选择标记的 pBH2 (Ward 等,《实验真菌学》13 卷 (Exp. Myc.), 289 页 (1989)) 的约 2.2kb 的 ScaI-SmaI 限制酶切片断,连接到含有 dhaB1 和 dhaB2 表达盒的载体的单一 StuI 限制酶切位点上,这一载体命名为 pAEX:B1+B2。

[0450] 分别从 pAEX:dhaB3 和 pAEX:dhaT 载体中,分离含有 dhaB3 和 dhaT 完整表达盒的单一 SpeI-HindIII 限制酶切片断。将这两个表达盒片断同时按顺序连接到载体 pUC 18 的单一 HindIII 限制酶切位点上,这一载体命名为 pAEX:B3+T。

[0451] dhaB 和 dhaT 基因在曲霉属中的转化、转化子分离、表达盒整合的证实和表达

[0452] 应用 (Campbell 等的方法, “使用硝酸盐还原酶的同源 *niaD* 基因提高黑曲霉的转化效率”, 《当代遗传》16 卷, 53-56 页 (1989)) 用两种表达载体 pAEX :B1+B2 和 pAEX :B3+T 共转化黑曲霉株 FS 1 (pyrG⁻)。根据在不含尿嘧啶核苷的选择培养基上的生长能力选择转化子。用 HindIII 和 SpeI 消化转化子的基因组 DNA, 来释放预知分子量的片断, 从而证明完整表达盒的整合。每种表达盒的检测通过分别使用单个基因的探针用 Southern 分析来完成。dhaB2 蛋白的存在使用抗 -dhaB 抗体用 Western 分析进行检测。

[0453] 每种 ORF 的表达按下述方法进行检测, 将整合有 pAEX :B1+B2 和 pAEX :B3+T 载体的转化子培养在 10% CLS 培养基 (玉米浆 (50% 固体), 10% (w/v); NaH₂PO₄H₂O, 1.0g/L; MgSO₄, 0.50g/L; 麦芽糖, 100.0g/L; 葡萄糖, 10.0g/L; Mazu 消泡剂, 0.003% (v/v)) 中, 作为种子培养物。按 1/10 体积将这种种子培养物转入 MBM 碳培养基 (NaH₂PO₄, 0.70g/L; K₂HPO₄, 0.70g/L; KH₂PO₄, 0.70g/L; MgSO₄·7H₂O, 1.40g/L; (NH₄)₂SO₄, 10.5g/L; CaCl₂·2H₂O, 0.70g/L; NH₄NO₃, 3.50g/L; 柠檬酸钠, 14g/L; FeCl₂·4H₂O, 1.0mg/L; ZnCl₂, 5.87mg/L; CuCl₂·H₂O, 0.42mg/L; MnCl₂·4H₂O, 0.21mg/L; Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.07mg/L; 叶酸, 0.174mg/L; 吡哆醇 HCl, 6.12mg/L; 核黄素, 1.83mg/L; 泛酸, 23.60mg/L; 烟酸, 26.66mg/L; 生物素, 0.49mg/L; 硫胺素 HCl, 1.39mg/L; 麦芽糖, 120.0g/L; 羧苄青霉素, 0.035mg/L; 链霉素, 0.035mg/L; 吐温 80, 0.07% (w/v); Mazu 消泡剂, 0.14% (v/v)) 中来诱导 *glaA* 启动子。从转化子培养物中分离 mRNA (Fast Track 2Kit, Invitrogen Corp.), 并用化学发光 (Genius[®] System, Boehringer-Mannheim) 做 Northern 分析来检测每个基因的转录信息。使用每个 *dhaB* 和 *dhaTORF* 的基因片断作探针, 用 Northern 杂交证明了摇瓶培养物中 *dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3* 和 *dhaT* 的协同转录。

[0454] 选择那些显示能转录所有转化基因的分离克隆, 进一步用 pAEX :dhaBX 转化。用 pAEX :dhaBX 和 pAA 10 (3.2kb, pUC18 的含有构巢曲霉 *amdS* 选择标记的 *Acc1*-*Asp718* 限制酶切片断) 共转化这些克隆。新转化的培养物在含有乙酰胺作为唯一碳源的培养基中进行选择。使用引物 KpdhaBX-5' 和 KpdhaBX-3' (SEQ ID NO :45 和 46), 用 PCR 从基因组 DNA 中扩增 *dhaBX* ORF, 证明了能利用乙酰胺作为唯一碳源的转化子菌落含有整合的 *dhaBX* ORF。

[0455] 黑曲霉株 FS1 生产甘油

[0456] 黑曲霉株 FS1 在 10% CSL 培养基中培养作为种子培养物, 将种子培养物按 1 : 10 的稀释比例转入 MBM 碳培养基 +12% 麦芽糖。培养物上清中含有 6g/L 的曲霉产生的甘油。甘油分析用 HPLC 进行。

[0457] 重组黑曲霉生产 1,3- 丙二醇

[0458] 曲霉发酵在一个总体积为 15.5 升的 BiolaFitte 发酵罐中进行, 开始的工作体积为 8 升, 在发酵过程中增加到 11 升。有氧环境用 700-800rpm 的叶轮速率和 1.1bar 的负压、10 升 / 分钟的通气速率来保证 (有氧环境用 %溶解氧 (100% DO 为大气压时的溶解氧) 来定义, 这一值用安装的 DO- 探针进行测量; 35% DO 被认为是有氧的最小值)。pH 值用自动加入 10% H₃PO₄ 或 28% NH₄OH 的方法维持在 pH5.60。温度维持在 32℃。

[0459] 将下列组分分批加入罐内, 121℃ 灭菌 30 分钟: 2g/L NaH₂PO₄H₂O、17g/L (NH₄)₂SO₄、1g/L MgSO₄、2g/L 吐温 80、45g/L Promosoy-100 (一种含 70% 蛋白的大豆浓缩物)、6g/L 玉米浆 (50% 固体)、10g/L 麦芽糖、和 2g/L MAZU DF204 (一种传统的消泡剂)。灭菌后, 加入 500 克 50% 的 Maltrin150 原料, 并同时加入羧苄青霉素和链霉素 (均至终浓度为 10mg/L)

[0460] 取1升在装有10% CSL的摇瓶中生长了45小时、转化有两种表达载体pAEX :B1+B2和pAEX :B3+T的黑曲霉株(菌株TGR40)接种发酵罐。使培养物在有氧的情况下生长28小时,然后开始以0.8-1.0g/分钟的速率加入原料(50% Maltrin150溶液,加热灭菌)。让培养继续进行20小时,在这个过程中,由于细胞的O₂需求,% DO降至实际上为零(在发酵的剩余阶段,培养物维持在零至5%)。然后(接种后第48小时),在8小时的一段时间内加入甘油直至终浓度为163g/L。Maltrin原料在接种后第97小时停止加入,负压和通气量分别降至0.2bar和4L/分钟(0.5vvm),加入辅酶B₁₂至终浓度为10mg/L。当培养至122小时后,收集肉汤,离心,并在1L上清中加入0.2L的乙醇。

[0461] 取1L去除细胞的发酵肉汤在真空下蒸馏,产生约60mL的黑色浆状物。将这种浆状物离心,收集到约40mL的液体上清。然后用40mL乙醇处理这种液体,以通过离心来去除残留的固体。从倾析的液体中取少量作样品用HPLC进行分析,发现其中含有1,3-丙二醇:1,3-丙二醇用GC/MS得以证实。

[0462] 本发明的申请人已经申请保藏了一个重组黑曲霉株TGR40-13(ATCC____),该菌株含有编码dhaB(1-3)、dhaBx和dhaT的DNA片断。

[0463] 实施例23

[0464] 用重组黑曲霉从麦芽糖生产1,3-丙二醇

[0465] 曲霉发酵在一个总体积为15.5升的Biolafitte发酵罐中进行,开始的工作体积为8升,在发酵过程中增加到11升。有氧环境用700-800rpm的叶轮速率和1.1bar的负压、10升/分钟的通气速率来保证(有氧环境用%溶解氧(100% DO为大气压时的溶解氧)来定义,这一值用安装的DO-探针进行测量;35% DO被认为是有氧的最小值)。pH值用自动加入10% H₃PO₄或28% NH₄OH的方法维持在pH5.60。温度维持在32℃。

[0466] 将下列组分分批加入罐内,121℃灭菌30分钟:2g/LNaH₂PO₄H₂O、17g/L(NH₄)₂SO₄、1g/L MgSO₄、2g/L吐温80、45gLPromosoy-100(一种含70%蛋白的大豆浓缩物)、6g/L玉米浆(50%固体)、10g/L麦芽糖、和2g/L MAZU DF204(一种传统的消泡剂)。灭菌后,加入500克50%的Maltrin150原料,并同时加入羧苄青霉素和链霉素(均至终浓度为10mg/L)。

[0467] 取1升在装有10% CSL(见实施例22)的摇瓶中生长了40-48小时的转化有dhaB1、dhaB2、dhaB3、dhaB4、和dhaT基因的黑曲霉株接种发酵罐。使培养物生长30-35小时,然后开始以1g/分钟的速率加入原料(50% Maltrin 150溶液,加热灭菌)。让培养在O₂限制条件下(% DO为零完全通气)继续进行5小时。然后停止加入Maltrin原料,当测量到上清中的葡萄糖实际上为零时,将rpm降低至150,BP降低至0.2,并停止通气。向发酵罐中以7L/分钟的速率充入无氧气体混合混合物(5% H₂,5% CO₂,90% N₂)共30分钟。然后关闭气体的进口和出口,BP维持在0.4bar,加入辅酶B₁₂至终浓度为5mg/L。最后,取肉汤样品离心,制备用于HPLC和GC分析的上清。在上清中检测到了1,3-丙二醇。

[0468] 实施例2路氏乳杆菌(ATCC23272)由非甘油底物生产1,3-丙二醇

[0469] 路氏乳杆菌(ATCC23272)维持在MRS(Difco,Detroit,MI)平板上。将平板上的菌落接种到装有70mL补加了25mM NaHCO₃的乳杆菌MRS肉汤(Difco#0881-17)的250mL锥形瓶中。将瓶在无氧的气体环境(5-7% H₂,2-8% CO₂,85-93% N₂)下32℃温育。

[0470] 对乳杆菌MRS肉汤做HPLC分析显示了甘油组分的保留时间。将乳杆菌MRS肉汤用碱煮沸法处理后,用HPLC和酶促试验分析其甘油含量。在多数情况下,在起始培养基中

可检测到 0.25g/L 的甘油,如果所有这些甘油都转化为 1,3- 丙二醇。0.21g/L 的 1,3- 丙二醇可以说是由甘油生产而来的。

[0471] 经过 10 天的温育,从路氏乳杆菌培养瓶中取样,用 HPLC 和 GC-MS 进行分析,并与起始培养基样品进行比较。用培养基中存在的甘油校正后,1.35g/L 的 1,3- 丙二醇是路氏乳杆菌由非甘油的底物生产而来的

[0472] 序列表

[0473] (1) 一般信息

[0474] (i) 申请人 :

[0475] (A) 名称 :E. I. DUPONT DE NEMOURS AND COMPANY

[0476] (B) 街道 :1007MARKET STREET

[0477] (C) 城市 :WILMINGTON

[0478] (D) 州 :DELAWARE

[0479] (E) 国家 :U. S. A.

[0480] (F) 邮政编码 (ZIP) :19898

[0481] (G) 电话 :302-892-8112

[0482] (H) 传真 :302-773-0164

[0483] (i) 申请人 :

[0484] (A) 名称 :GENENCOR INTERNATIONAL, INC.

[0485] (B) 街道 :4CAMBRIDGE PLACE1870SOUTH WINTON ROAD

[0486] (C) 城市 :ROCHESTER

[0487] (D) 州 :NEW YORK

[0488] (E) 国家 :U. S. A.

[0489] (F) 邮政编码 (ZIP) :14618

[0490] (G) 电话 :

[0491] (H) 传真 :

[0492] (ii) 发明名称 :利用单一微生物将可发酵碳源生物转化为 1,3- 丙二醇

[0493] (iii) 序列数 :46

[0494] (iv) 计算机可读形式

[0495] (A) 介质类型 :3.50 英寸软盘

[0496] (B) 计算机 :IBM

[0497] (C) 操作系统 :MICROSOFT WINDOWS 3.1

[0498] (D) 软件 :MICROSOFT WORD 6.0

[0499] (v) 现申请数据 :

[0500] (A) 申请号 :

[0501] (B) 申请日 :

[0502] (C) 分类号 :

[0503] (vi) 在先申请数据 :

[0504] (A) 申请号 :08/440,293

[0505] (B) 申请日 :1995 年 5 月 12 日

- [0506] (vii) 代理人 / 代理机构信息 :
- [0507] (A) 姓名 :LINDA AXAMETHY FLOYD
- [0508] (B) 登记号 :33,692
- [0509] (C) 参考 / 备案号码 :CR-9715-B
- [0510] (2) SEQ ID NO :1 的信息 :
- [0511] (i) 序列特征 :
- [0512] (A) 长度 :12145 碱基对
- [0513] (B) 类型 :核酸
- [0514] (C) 链型 :单链
- [0515] (D) 拓扑构型 :线型
- [0516] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0517] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :1 :
- | | | |
|--------|--|------|
| [0518] | GTCCACCACC ACGGTGGTCA CTTTAATGCC GCTCTCATGC AGCAGCTCGG TGGCGGTCTC | 60 |
| [0519] | AAAATTCAGG ATGTCGCCGG TATAGTTTTT GATAATCAGC AAGACGCCTT CGCCGCCGTC | 120 |
| [0520] | AATTTGCATC GCGCATTCAC ACATTTTGTC CGGCGTCGGC GAGGTGAATA TTTCCCCCGG | 180 |
| [0521] | ACAGGCGCCG GAGAGCATGC CCTGGCCGAT ATAGCCGCAG TGCATCGGTT CATGTCCGCT | 240 |
| [0522] | GCCGCCGCCG GAGAGCAGGG CCACCTTGCC AGCCACCGGC GCGTCGGTGC GGGTCACATA | 300 |
| [0523] | CAGCGGGTCC TGATGCAGGG TCAGCTGCGG ATGGGCTTTA GCCAGCCCCT GTAATTGTTC | 360 |
| [0524] | ATTCAGTACA TCTTCAACAC GGTTAATCAG CTTTTTCATT ATTCAGTGCT CCGTTGGAGA | 420 |
| [0525] | AGGTTCGATG CCGCCTCTCT GCTGGCGGAG GCGGTCATCG CGTAGGGGTA TCGTCTGACG | 480 |
| [0526] | GTGGAGCGTG CCTGGCGATA TGATGATTCT GGCTGAGCGG ACGAAAAAAA GAATGCCCGG | 540 |
| [0527] | ACGATCGGGT TTCATTACGA AACATTGCTT CCTGATTTTG TTTCTTTATG GAACGTTTTT | 600 |
| [0528] | GCTGAGGATA TGGTGAAAAAT GCGAGCTGGC GCGCTTTTTT TCTTCTGCCA TAAGCGGCGG | 660 |
| [0529] | TCAGGATAGC CGGCGAAGCG GGTGGGAAAA AATTTTTTGC TGATTTTCTG CCGACTGCGG | 720 |
| [0530] | GAGAAAAGGC GGTCAAAACAC GGAGGATTGT AAGGGCATTA TGCGGCAAAG GAGCGGATCG | 780 |
| [0531] | GGATCCCAAT CCTGACAGAG ACTAGGGTTT TTTGTTCCAA TATGGAACGT AAAAAATTAA | 840 |
| [0532] | CCTGTGTTTC ATATCAGAAC AAAAAGGCGA AAGATTTTTT TGTTCCCTGC CGGCCCTACA | 900 |
| [0533] | GTGATCGCAC TGCTCCGGTA CGCTCCGTTT AGGCCGCGCT TCACTGGCCG GCGCGGATAA | 960 |
| [0534] | CGCCAGGGCT CATCATGTCT ACATGCGCAC TTATTTGAGG GTGAAAGGAA TGCTAAAAGT | 1020 |
| [0535] | TATTCAATCT CCAGCCAAAT ATCTTCAGGG TCCTGATGCT GCTGTTCTGT TCGGTCAATA | 1080 |
| [0536] | TGCCAAAAAC CTGGCGGAGA GCTTCTTCGT CATCGCTGAC GATTTTCGTAA TGAAGCTGGC | 1140 |
| [0537] | GGGAGAGAAA GTGGTGAATG GCCTGCAGAG CCACGATATT CGCTGCCATG CGGAACGGTT | 1200 |
| [0538] | TAACGGCGAA TGCAGCCATG CGGAAATCAA CCGTCTGATG GCGATTTTGC AAAAACAGGG | 1260 |
| [0539] | CTGCCGCGGC GTGGTCGGGA TCGGCGGTGG TAAAACCCTC GATACGCGA AGGCGATCGG | 1320 |
| [0540] | TTACTACCAG AAGCTGCCGG TGGTGGTGAT CCCGACCATC GCCTCGACCG ATGCGCCAAC | 1380 |
| [0541] | CAGCGCGCTG TCGGTGATCT ACACCGAAGC GGGCGAGTTT GAAGAGTATC TGATCTATCC | 1440 |
| [0542] | GAAAAACCCG GATATGGTGG TGATGGACAC GGCGATTATC GCCAAAGCGC CGGTACGCCT | 1500 |
| [0543] | GCTGGTCTCC GGCATGGGCG ATGCGCTCTC CACCTGGTTC GAGGCCAAAG CTTGCTACGA | 1560 |
| [0544] | TGCGCGCGCC ACCAGCATGG CCGGAGGACA GTCCACCGAG GCGGCGCTGA GCCTCGCCCC | 1620 |

[0545]	CCTGTGCTAT	GATACGCTGC	TGGCGGAGGG	CGAAAAGGCC	CGTCTGGCGG	CGCAGGCCGG	1680
[0546]	GGTAGTGACC	GAAGCGCTGG	AGCGCATCAT	CGAGGCGAAC	ACTTACCTCA	GCGGCATTGG	1740
[0547]	CTTTGAAAGC	AGTGGCCTGG	CCGCTGCCCA	TGCAATCCAC	AACGGTTTCA	CCATTCTTGA	1800
[0548]	AGAGTGCCAT	CACCTGTATC	ACGGTGAGAA	AGTGGCCTTC	GGTACCCTGG	CGCAGCTGGT	1860
[0549]	GCTGCAGAAC	AGCCCGATGG	ACGAGATTGA	AACGGTGCAG	GGCTTCTGCC	AGCGCGTCGG	1920
[0550]	CCTGCCGGTG	ACGCTCGCGC	AGATGGGCGT	CAAAGAGGGG	ATCGACGAGA	AAATCGCCGC	1980
[0551]	GGTGGCGAAA	GCTACCTGCG	CGGAAGGGGA	AACCATCCAT	AATATGCCGT	TTGCGGTGAC	2040
[0552]	CCCGGAGAGC	GTCCATGCCG	CTATCCTCAC	CGCCGATCTG	TTAGGCCAGC	AGTGGCTGGC	2100
[0553]	GCGTTAATTC	GCGGTGGCTA	AACCGCTGGC	CCAGGTCAGC	GGTTTTTCTT	TCTCCCCTCC	2160
[0554]	GGCAGTCGCT	GCCGGAGGGG	TTCTCTATGG	TACAACGCGG	AAAAGGATAT	GA CTGTTTCAG	2220
[0555]	ACTCAGGATA	CCGGGAAGGC	GGTCTCTTCC	GTCATTGCCC	AGTCATGGCA	CCGCTGCAGC	2280
[0556]	AAGTTTATGC	AGCGCGAAAC	CTGGCAAACG	CCGCACCAGG	CCCAGGGCCT	GACCTTCGAC	2340
[0557]	TCCATCTGTC	GGCGTAAAC	CGCGCTGCTC	ACCATCGGCC	AGGCGGCGCT	GGAAGACGCC	2400
[0558]	TGGGAGTTTA	TGGACGGCCG	CCCCTGCGCG	CTGTTTATTC	TTGATGAGTC	CGCCTGCATC	2460
[0559]	CTGAGCCGTT	GCGGCGAGCC	GCAAACCCTG	GCCCAGCTGG	CTGCCCTGGG	ATTTGCGGAC	2520
[0560]	GGCAGCTATT	GTGCGGAGAG	CATTATCGGC	ACCTGCGCGC	TGTCGCTGGC	CGCGATGCAG	2580
[0561]	GGCCAGCCGA	TCAACACCGC	CGGCGATCGG	CATTTTAAGC	AGGCGCTACA	GCCATGGAGT	2640
[0562]	TTTTGCTCGA	CGCCGGTGTT	TGATAACCAC	GGGCGGCTGT	TCGGCTCTAT	CTCGCTTTGC	2700
[0563]	TGTCTGGTCG	AGCACCAGTC	CAGCGCCGAC	CTCTCCCTGA	CGCTGGCCAT	CGCCCGCGAG	2760
[0564]	GTGGGTA ACT	CCCTGCTTAC	CGACAGCCTG	CTGGCGGAAT	CCAACCGTCA	CCTCAATCAG	2820
[0565]	ATGTACGGCC	TGCTGGAGAG	CATGGACGAT	GGGGTGATGG	CGTGGAACGA	ACAGGGCGTG	2880
[0566]	CTGCAGTTTC	TCAATGTTCA	GGCGGCGAGA	CTGCTGCATC	TTGATGCTCA	GGCCAGCCAG	2940
[0567]	GGGAAAATA	TCGCCGATCT	GGTGACCCTC	CCGGCGCTGC	TGCGCCGCGC	CATCAAACAC	3000
[0568]	GCCCGCGGCC	TGAATCACGT	CGAAGTCACC	TTTGAAAGTC	AGCATCAGTT	TGTCGATGCG	3060
[0569]	GTGATCACCT	TAAAACCGAT	TGTCGAGGCG	CAAGGCAACA	GTTTTATTCT	GCTGCTGCAT	3120
[0570]	CCGGTGGAGC	AGATGCGGCA	GCTGATGACC	AGCCAGCTCG	GTAAAGTCAG	CCACACCTTT	3180
[0571]	GAGCAGATGT	CTGCCGACGA	TCCGGAACCC	CGACGCCTGA	TCCACTTTGG	CCGCCAGGCG	3240
[0572]	GCGCGCGGCG	GCTTCCCGGT	GCTACTGTGC	GGCGAAGAGG	GGGTGCGGAA	AGAGCTGCTG	3300
[0573]	AGCCAGGCTA	TTCACAATGA	AAGCGAACGG	GCGGGCGGCC	CCTACATCTC	CGTCAACTGC	3360
[0574]	CAGCTATATG	CCGACAGCGT	GCTGGGCCAG	GACTTTATGG	GCAGCGCCCC	TACCGACGAT	3420
[0575]	GAAAATGGTC	GCCTGAGCCG	CCTTGAGCTG	GCCAACGGCG	GCACCCTGTT	TCTGGAAAAG	3480
[0576]	ATCGAGTATC	TGGCGCCGGA	GCTGCAGTCG	GCTCTGCTGC	AGGTGATTAA	GCAGGGCGTG	3540
[0577]	CTCACCCGCC	TCGACGCCCG	GCGCCTGATC	CCGGTGGATG	TGAAGGTGAT	TGCCACCACC	3600
[0578]	ACCGTCGATC	TGGCCAATCT	GGTGGAACAG	AACCGCTTTA	GCCGCCAGCT	GTA CTATGCG	3660
[0579]	CTGCACTCCT	TTGAGATCGT	CATCCCGCCG	CTGCGCGCCC	GACGCAACAG	TATTCGGTCG	3720
[0580]	CTGGTGCATA	ACCGGTTGAA	GAGCCTGGAG	AAGCGTTTCT	CTTCGCGACT	GAAAGTGGAC	3780
[0581]	GATGACGCGC	TGGCACAGCT	GGTGGCCTAC	TCGTGGCCGG	GGAATGATTT	TGAGCTCAAC	3840
[0582]	AGCGTCATTG	AGAATATCGC	CATCAGCAGC	GACAACGGCC	ACATTCGCCT	GAGTAATCTG	3900
[0583]	CCGGAATATC	TCTTTTCCGA	GCGGCCGGGC	GGGGATAGCG	CGTCATCGCT	GCTGCCGGCC	3960

[0584]	AGCCTGACTT	TTAGCGCCAT	CGAAAAGGAA	GCTATTATTC	ACGCCGCCCG	GGTGACCAGC	4020
[0585]	GGGCGGGTGC	AGGAGATGTC	GCAGCTGCTC	AATATCGGCC	GCACCACCCT	GTGGCGCAAA	4080
[0586]	ATGAAGCAGT	ACGATATTGA	CGCCAGCCAG	TTCAAGCGCA	AGCATCAGGC	CTAGTCTCTT	4140
[0587]	CGATTCGCGC	CATGGAGAAC	AGGGCATCCG	ACAGGCGATT	GCTGTAGCGT	TTAGCGCGT	4200
[0588]	CGCGCAGCGG	ATGCGCGCGG	TCCATGGCCG	TCAGCAGGCG	TTGAGCCGA	CGGGACTGGG	4260
[0589]	TGCGCGCCAC	GTGCAGCTGG	GCAGAGGCGA	GATTCCTCCC	CGGGATCACG	AACTGTTTTA	4320
[0590]	ACGGGCCGCT	CTCGGCCATA	TTGCGGTGCA	TAAGCCGCTC	CAGGGCGGTG	ATCTCCTCTT	4380
[0591]	CGCCGATCGT	CTGGCTCAGG	CGGGTCAGGC	CCCGCGCATC	GCTGGCCAGT	TCAGCCCCCA	4440
[0592]	GCACGAACAG	CGTCTGCTGA	ATATGGTGCA	GGCTTTCCCG	CAGCCCGGCG	TCGCGGGTCG	4500
[0593]	TGGCGTAGCA	GACGCCCAGC	TGGGATATCA	GTTTCATCGAC	GGTGCCGTAG	GCCTCGACGC	4560
[0594]	GAATATGGTC	TTTCTCGATG	CGGCTGCCGC	CGTACAGGGC	GGTGGTGCCT	TTATCCCCCG	4620
[0595]	TGCGGGTATA	GATACGATAC	ATTCACTTTC	TCTCACTTAA	CGGCAGGACT	TTAACCAGCT	4680
[0596]	GCCCCGGCTT	GGCGCCGAGC	GTACGCAGTT	GATCGTCGCT	ATCGGTGACG	TGTCCGGTAG	4740
[0597]	CCAGCGGCGC	GTCCGCCGGC	AGCTGGGCAT	GAGTGAGGGC	TATCTCGCCG	GACGCGCTGA	4800
[0598]	GCCCCGATACC	CACCCGCAGG	GGCGAGCTTC	TGGCCGCCAG	GGCGCCCAGC	GCAGCGGCGT	4860
[0599]	CACCGCCTCC	GTCATAGGTT	ATGGTCTGGC	AGGGGA	CCCCTGCTCCTCC	AGCCCCCAGC	4920
[0600]	ACAGCTCATT	GATGGCGCCG	GCATGGTGCC	CGCGCGGATC	GTAAAACAGG	CGTACGCCCTG	4980
[0601]	GCGGTGAAAG	CGACATGACG	GTCCCCTCGT	TAACACTCAG	AATGCCTGGC	GGAAAATCGC	5040
[0602]	GGCAATCTCC	TGCTCGTTGC	CTTTACGCGG	GTTGAGAGAC	GCATTGCCGT	CTTTTAGAGC	5100
[0603]	CATCTCCGCC	ATGTAGGGGA	AGTCGGCCTC	TTTTACCCCC	AGATCGCGCA	GATGCTGCGG	5160
[0604]	AATACCGATA	TCCATCGACA	GACGCGTGAT	AGCGGCGATG	GCTTTTTCCG	CCGCGTCGAG	5220
[0605]	AGTGGACAGT	CCGGTGATAT	TTTCGCCCAT	CAGTTCAGCG	ATATCGGCGA	ATTTCTCCCG	5280
[0606]	GTTGGCGATC	AGGTTGTAGC	GCGCCACATG	CGGCAGCAGG	ACAGCGTTGG	CCACGCCGTG	5340
[0607]	CGGCATGTGC	TACAGGCCGC	CCAGCTGGTG	CGCCATGGCG	TGCACGTAGC	CGAGGTTGGC	5400
[0608]	GTTATTGAAA	GCCATCCCGG	CCAGCAGAGA	AGCATAGGCC	ATGTTTTCCG	GCGCCTGCAG	5460
[0609]	ATTGCTGCCG	AGGGCCACGG	CCTGGCGCAG	GTTGCGGGCG	ATGAGGCGGA	TCGCCTGCAT	5520
[0610]	GGCGGCGGCG	TCCGTCACCG	GGTTAGCGTC	TTTGGAGATA	TAGGCCTCTA	CGGCGTGGGT	5580
[0611]	CAGGGCATCC	ATCCCGGTCG	CCCCGGTCAG	GGCGGCCGGT	TTACCGATCA	TCAGCAGTGG	5640
[0612]	ATCGTTGATA	GAGACCGACG	GCAGTTTGCG	CCAGCTGACG	ATCACAACT	TCACTTTGGT	5700
[0613]	TTCGGTGTGTG	GTCAGGACGC	AGTGGCGGGT	GACCTCGCTG	GCGGTGCCGG	CGGTGGTATT	5760
[0614]	GACCGCGACG	ATAGGCGGCA	GCGGGTTGGT	CAGGCTCTCG	ATTCCGGCAT	ACTGGTACAG	5820
[0615]	ATCCCCCTCA	TGGGTGGCGG	CGATGCCGAT	GCCTTTGCCG	CAATCGTGCG	GGCTGCCGCC	5880
[0616]	GCCCACGGTG	ACGATGATGT	CGCACTGTTT	GCGGCGAAAC	ACGGCGAGGC	CGTCGCGCAC	5940
[0617]	GTTGGTGTCT	TTGCGGTTTCG	GCTCGACGCC	GTCAAAGATC	GCCACCTCGA	TCCCGGCCTC	6000
[0618]	CCGCAGATAA	TGCAGGGTTT	TGTCCACCGC	GCCATCTTTA	ATTGCCCGCA	GGCCTTTGTC	6060
[0619]	GGTGACCAGC	AGGGCTTTTT	TCCCCCCCAG	CAGCTGGCAG	CGTTCGCCGA	CTACGGAAAT	6120
[0620]	GGCGTTGGGG	CCAAAAAAGT	TAACGTTTGG	CACCAGATAA	TCAAACATAC	GATAGCTCAT	6180
[0621]	AATATACCTT	CTCGCTTCAG	GTTATAATGC	GGAAAAACAA	TCCAGGGCGC	ACTGGGCTAA	6240
[0622]	TAATTGATCC	TGCTCGACCG	TACCGCCGCT	AACGCCGACG	GCGCCAATTA	CCTGCTCATT	6300

[0623]	AAAAATAACT	GGCAGGCCGC	CGCCAAAAAT	AATAATTCGC	TGTTGGTTGG	TTAGCTGCAG	6360
[0624]	ACCGTACAGA	GATTGTCCTG	GCTGGACCGC	TGACGTAATT	TCATGGGTAC	CTTGCTTCAG	6420
[0625]	GCTGCAGGCG	CTCCAGGCTT	TATTCAGGGA	AATATCGCAG	CTGGAGACGA	AGGCCTCGTC	6480
[0626]	CATCCGCTGG	ATAAGCAGCG	TGTTGCCTCC	GCGGTCAACT	ACGGAAAACA	CCACCGCCAC	6540
[0627]	GTTGATCTCA	GTGGCTTTTT	TTTCCACCGC	CGCCGCCATT	TGCTGGGCGG	CGGCCAGGGT	6600
[0628]	GATTGTCTGA	ACTTGTGGC	TCTTGTTCAT	CATTCTCTCC	CGCACCAGGA	TAACGCTGGC	6660
[0629]	GCGAATAGTC	AGTAGGGGGC	GATAGTAAAA	AACTATTACC	ATTCGGTTGG	CTTGCTTTAT	6720
[0630]	TTTTGTCAGC	GTTATTTTGT	CGCCCGCCAT	GATTTAGTCA	ATAGGGTTAA	AATAGCGTCG	6780
[0631]	GAAAAACGTA	ATTAAGGGCG	TTTTTTATTA	ATTGATTTAT	ATCATTGCGG	GCGATCACAT	6840
[0632]	TTTTTATTTT	TGCCGCCGGA	GTAAAGTTTC	ATAGTGAAAC	TGTCGGTAGA	TTTCGTGTGC	6900
[0633]	CAAATTGAAA	CGAAATTAAA	TTTATTTTTT	TCACCACTGG	CTCATTTAAA	GTTCCGCTAT	6960
[0634]	TGCCGGTAAT	GGCCGGGCGG	CAACGACGCT	GGCCCGGCGT	ATTCGCTACC	GTCTGCGGAT	7020
[0635]	TTCACCTTTT	GAGCCGATGA	ACAATGAAAA	GATCAAAACG	ATTTGCAGTA	CTGGCCCAGC	7080
[0636]	GCCCCGTCAA	TCAGGACGGG	CTGATTGGCG	AGTGGCCTGA	AGAGGGGCTG	ATCGCCATGG	7140
[0637]	ACAGCCCCTT	TGACCCGGTC	TCTTCAGTAA	AAGTGGACAA	CGGTCTGATC	GTCGAACTGG	7200
[0638]	ACGGCAAACG	CCGGGACCAG	TTTGACATGA	TCGACCGATT	TATCGCCGAT	TACGCGATCA	7260
[0639]	ACGTTGAGCG	CACAGAGCAG	GCAATGCGCC	TGGAGGCGGT	GGAAATAGCC	CGTATGCTGG	7320
[0640]	TGGATATTCA	CGTCAGCCGG	GAGGAGATCA	TTGCCATCAC	TACCGCCATC	ACGCCGGCCA	7380
[0641]	AAGCGGTCGA	GGTGATGGCG	CAGATGAACG	TGGTGGAGAT	GATGATGGCG	CTGCAGAAGA	7440
[0642]	TGCGTGCCCG	CCGGACCCCC	TCCAACCAGT	GCCACGTCAC	CAATCTCAAA	GATAATCCGG	7500
[0643]	TGCAGATTGC	CGCTGACGCC	GCCGAGGCCG	GGATCCGCGG	CTTCTCAGAA	CAGGAGACCA	7560
[0644]	CGGTCCGTAT	CGCGCGCTAC	GCGCCGTTTA	ACGCCCTGGC	GCTGTTGGTC	GGTTCGCAGT	7620
[0645]	GCGGCCGCCC	CGGCGTGTTG	ACGCAGTGCT	CGGTGGAAGA	GGCCACCGAG	CTGGAGCTGG	7680
[0646]	GCATGCGTGG	CTTAACCAGC	TACGCCGAGA	CGGTGTCGGT	CTACGGCACC	GAAGCGGTAT	7740
[0647]	TTACCGACGG	CGATGATACG	CCGTGGTCAA	AGGCGTTCCT	CGCCTCGGCC	TACGCCCTCC	7800
[0648]	GCGGGTTGAA	AATGCGCTAC	ACCTCCGGCA	CCGGATCCGA	AGCGCTGATG	GGCTATTCCG	7860
[0649]	AGAGCAAGTC	GATGCTCTAC	CTCGAATCGC	GCTGCATCTT	CATTACTAAA	GGCGCCGGGG	7920
[0650]	TTCAGGGACT	GCAAAACGGC	GCGGTGAGCT	GTATCGGCAT	GACCGGCGCT	GTGCCGTCGG	7980
[0651]	GCATTCCGGC	GGTGCTGGCG	GAAAACCTGA	TCGCCTCTAT	GCTCGACCTC	GAAGTGGCGT	8040
[0652]	CCGCCAACGA	CCAGACTTTC	TCCCACTCGG	ATATTCGCCG	CACCGCGCGC	ACCCTGATGC	8100
[0653]	AGATGCTGCC	GGGCACCGAC	TTTATTTTCT	CCGGCTACAG	CGCGGTGCCG	AACTACGACA	8160
[0654]	ACATGTTTCG	CGGCTCGAAC	TTCGATGCGG	AAGATTTTGA	TGATTACAAC	ATCCTGCAGC	8220
[0655]	GTGACCTGAT	GGTTGACGGC	GGCCTGCGTC	CGGTGACCGA	GGCGGAAACC	ATTGCCATTC	8280
[0656]	GCCAGAAAGC	GGCGCGGGCG	ATCCAGGCGG	TTTTCCGCGA	GCTGGGGCTG	CCGCCAATCG	8340
[0657]	CCGACGAGGA	GGTGGAGGCC	GCCACCTACG	CGCACGGCAG	CAACGAGATG	CCGCCGCGTA	8400
[0658]	ACGTGGTGGA	GGATCTGAGT	GCGGTGGAAG	AGATGATGAA	GCGCAACATC	ACCGGCCTCG	8460
[0659]	ATATTGTCGG	CGCGCTGAGC	CGCAGCGGCT	TTGAGGATAT	CGCCAGCAAT	ATTCTCAATA	8520
[0660]	TGCTGCGCCA	GCGGGTCACC	GGCGATTACC	TGCAGACCTC	GGCCATTCTC	GATCGGCAGT	8580
[0661]	TCGAGGTGGT	GAGTGCGGTC	AACGACATCA	ATGACTATC	AGGGGCCGGGC	ACCGGCTATC	8640

[0662]	GCATCTCTGC CGAACGCTGG GCGGAGATCA AAAATATTCC GGGCGTGGTT CAGCCCCGACA	8700
[0663]	CCATTGAATA AGGCGGTATT CCTGTGCAAC AGACAACCCA AATTACAGCCC TCTTTTACCC	8760
[0664]	TGAAAACCCG CGAGGGCGGG GTAGCTTCTG CCGATGAACG CGCCGATGAA GTGGTGATCG	8820
[0665]	GCGTCGGCCC TGCCTTCGAT AAACACCAGC ATCACACTCT GATCGATATG CCCCATGGCG	8880
[0666]	CGATCCTCAA AGAGCTGATT GCCGGGGTGG AAGAAGAGGG GCTTCACGCC CGGGTGGTGC	8940
[0667]	GCATTCTGCG CACGTCCGAC GTCTCCTTTA TGGCCTGGGA TGCGGCCAAC CTGAGCGGCT	9000
[0668]	CGGGGATCGG CATCGGTATC CAGTCGAAGG GGACCACGGT CATCCATCAG CGCGATCTGC	9060
[0669]	TGCCGCTCAG CAACCTGGAG CTGTTCTCCC AGGCGCCGCT GCTGACGCTG GAGACCTACC	9120
[0670]	GGCAGATTGG CAAAAACGCT GCGCGCTATG CGCGCAAAGA GTCACCTTCG CCGGTGCCCG	9180
[0671]	TGGTGAACGA TCAGATGGTG CGGCCGAAAT TTATGGCCAA AGCCGCGCTA TTTCATACA	9240
[0672]	AAGAGACCAA ACATGTGGTG CAGGACGCCG AGCCCGTCAC CCTGCACATC GACTTAGTAA	9300
[0673]	GGGAGTGACC ATGAGCGAGA AAACCATGCG CGTGCAAGAT TATCCGTTAG CCACCCGCTG	9360
[0674]	CCCGGAGCAT ATCCTGACGC CTACCGGCAA ACCATTGACC GATATTACCC TCGAGAAGGT	9420
[0675]	GCTCTCTGGC GAGGTGGGCC CGCAGGATGT GCGGATCTCC CGCCAGACCC TTGAGTACCA	9480
[0676]	GGCGCAGATT GCCGAGCAGA TGCAGCGCCA TGCGGTGGCG CGCAATTTCC GCCGCGCGGC	9540
[0677]	GGAGCTTATC GCCATTCCCTG ACGAGCGCAT TCTGGCTATC TATAACGCGC TGCGCCCGTT	9600
[0678]	CCGCTCCTCG CAGGCGGAGC TGCTGGCGAT CGCCGACGAG CTGGAGCACA CCTGGCATGC	9660
[0679]	GACAGTGAAT GCCGCCTTTG TCCGGGAGTC GGCGGAAGTG TATCAGCAGC GGCATAAGCT	9720
[0680]	GCGTAAAGGA AGCTAAGCGG AGGTCAGCAT GCCGTTAATA GCCGGGATTG ATATCGGCAA	9780
[0681]	CGCCACCACC GAGGTGGCGC TGGCGTCCGA CTACCCGAG GCGAGGGCGT TTGTTGCCAG	9840
[0682]	CGGGATCGTC GCGACGACGG GCATGAAAGG GACGCGGGAC AATATCGCCG GGACCCTCGC	9900
[0683]	CGCGCTGGAG CAGGCCCTGG CGAAAACACC GTGGTTCGATG AGCGATGTCT CTCGCATCTA	9960
[0684]	TCTTAACGAA GCCGCGCCGG TGATTGGCGA TGTGGCGATG GAGACCATCA CCGAGACCAT	10020
[0685]	TATCACCGAA TCGACCATGA TCGGTCATAA CCCGACAGCG CCGGGCGGGG TGGGCGTTGG	10080
[0686]	CGTGGGGACG ACTATCGCCC TCGGGCGGCT GCGACGCTG CCGGCGGCGC AGTATGCCGA	10140
[0687]	GGGGTGGATC GACTGATTG ACGACGCCGT CGATTTCCTT GACGCCGTGT GGTGGCTCAA	10200
[0688]	TGAGGCGCTC GACCGGGGA TCAACGTGGT GCGGCGATC CTCAAAAAGG ACGACGGCGT	10260
[0689]	GCTGGTGAAC AACCGCTGC GTAAAACCT GCCGGTGGTG GATGAAGTGA CGCTGCTGGA	10320
[0690]	GCAGGTCCCC GAGGGGGTAA TGGCGGCGGT GGAAGTGGCC GCGCCGGGCC AGGTGGTGCG	10380
[0691]	GATCCTGTCT AATCCCTACG GGATCGCCAC CTTCTTCGGG CTAAGCCCGG AAGAGACCCA	10440
[0692]	GGCCATCGTC CCCATCGCCC GCGCCCTGAT TGGCAACCGT TCCGCGGTGG TGCTCAAGAC	10500
[0693]	CCCGCAGGGG GATGTGCAGT CGCGGGTGAT CCCGGCGGGC AACCTCTACA TTAGCGGCGA	10560
[0694]	AAAGCGCCG GAGAGGGCCG ATGTGCGCGA GGGCGCGGAA GCCATCATGC AGGCGATGAG	10620
[0695]	CGCCTGCGCT CCGGTACGCG ACATCCGCGG CGAACCGGGC ACCCACGCGG GCGGCATGCT	10680
[0696]	TGAGCGGGTG CGCAAGGTAA TGGCGTCCCT GACCGGCCAT GAGATGAGCG CGATATACAT	10740
[0697]	CCAGGATCTG CTGGCGGTGG ATACGTTTAT TCCGCGCAAG GTGCAGGGCG GGATGGCCGG	10800
[0698]	CGAGTGCGCC ATGGAGAATG CCGTCGGGAT GCGGCGATG GTGAAAGCGG ATCGTCTGCA	10860
[0699]	AATGCAGGTT ATCGCCCGCG AACTGAGCGC CCGACTGCAG ACCGAGGTGG TGGTGGGCGG	10920
[0700]	CGTGGAGGCC AACATGGCCA TCGCCGGGGC GTTAACCACT CCCGGCTGTG CGGCGCCGCT	10980

[0701]	GGCGATCCTC GACCTCGGCG CCGGCTCGAC GGATGCGGCG ATCGTCAACG CGGAGGGGCA	11040
[0702]	GATAACGGCG GTCCATCTCG CCGGGGCGGG GAATATGGTC AGCCTGTTGA TTAACCCGA	11100
[0703]	GCTGGGCCTC GAGGATCTTT CGCTGGCGGA AGCGATAAAA AAATACCCGC TGGCCAAAGT	11160
[0704]	GGAAAGCCTG TTCAGTATTC GTCACGAGAA TGGCGCGGTG GAGTTCCTTC GGGAAGCCCT	11220
[0705]	CAGCCCGGCG GTGTTCGCCA AAGTGGTGTA CATCAAGGAG GGCGAACTGG TGCCGATCGA	11280
[0706]	TAACGCCAGC CCGCTGGAAG AAATTCGTCT CGTGCGCCGG CAGGCGAAAG AGAAAGTGTT	11340
[0707]	TGTCACCAAC TGCCTGCGCG CGCTGCGCCA GGTCTCAGCC GGCGGTTCCT TTCGCGATAT	11400
[0708]	CGCCTTTGTG GTGCTGGTGG GCGGCTCATC GCTGGACTTT GAGATCCCGC AGCTTATCAC	11460
[0709]	GGAAGCCTTG TCGCACTATG GCGTGGTCGC CGGGCAGGGC AATATTCGGG GAACAGAAGG	11520
[0710]	GCCGCGCAAT GCGGTGCGCCACCGGGCTGCT ACTGGCCGGT CAGGCGAATT AAACGGGCGC	11580
[0711]	TCGCGCCAGC CTCTCTCTTT AACGTGCTAT TTCAGGATGC CGATAATGAA CCAGACTTCT	11640
[0712]	ACCTTAACCG GGCAGTGCGT GGCCGAGTTT CTTGGCACCG GATTGCTCAT TTTCTTCGGC	11700
[0713]	GCGGGCTGCG TCGCTGCGCT GCGGGTCGCC GGGGCCAGCT TTGGTCAGTG GGAGATCAGT	11760
[0714]	ATTATCTGGG GCCTTGCGGT CGCCATGGCC ATCTACCTGA CGGCCGGTGT CTCCGGCGCG	11820
[0715]	CACCTAAATC CGGCGGTGAC CATTGCCCTG TGGCTGTTTG CCTGTTTTGA ACGCCGCAAG	11880
[0716]	GTGCTGCCGT TTATTGTTGC CCAGACGGCC GGGGCCTTCT GCGCCGCCGC GCTGGTGTAT	11940
[0717]	GGGCTCTATC GCCAGCTGTT TCTCGATCTT GAACAGAGTC AGCATATCGT GCGCGGCACT	12000
[0718]	GCCGCCAGTC TTAACCTGGC CGGGGTCTTT TCCACGTACC CGCATCCACA TATCACTTTT	12060
[0719]	ATACAAGCGT TTGCCGTGGA GACCACCATC ACGGCAATCC TGATGGCGAT GATCATGGCC	12120
[0720]	CTGACCGACG ACGGCAACGG AATTC	12145
[0721]	(2)SEQ ID NO:2 的信息:	
[0722]	(i) 序列特征:	
[0723]	(A) 长度:30 碱基对	
[0724]	(B) 类型:核酸	
[0725]	(C) 链型:单链	
[0726]	(D) 拓扑构型:线型	
[0727]	(ii) 分子类型:DNA(基因组)	
[0728]	(xi) 序列表述:SEQ ID NO:2:	
[0729]	GGGAATTCAT GAAAAGATCA AAACGATTTG	
[0730]	(2)SEQ ID NO:3 的信息:	
[0731]	(i) 序列特征:	
[0732]	(A) 长度:29 碱基对	
[0733]	(B) 类型:核酸	
[0734]	(C) 链型:单链	
[0735]	(D) 拓扑构型:线型	
[0736]	(ii) 分子类型:DNA(基因组)	
[0737]	(xi) 序列表述:SEQ ID NO:3:	
[0738]	GCGAATTCTT ATTCAATGGT GTCGGGCTG	
[0739]	(2)SEQ ID NO:4 的信息:	

- [0740] (i) 序列特征 :
- [0741] (A) 长度 :30 碱基对
- [0742] (B) 类型 :核酸
- [0743] (C) 链型 :单链
- [0744] (D) 拓扑构型 :线型
- [0745] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0746] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :4 :
- [0747] GCGAATTCAT GCAACAGACA ACCCAAATTC
- [0748] (2)SEQ ID NO :5 的信息 :
- [0749] (i) 序列特征 :
- [0750] (A) 长度 :25 碱基对
- [0751] (B) 类型 :核酸
- [0752] (C) 链型 :单链
- [0753] (D) 拓扑构型 :线型
- [0754] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0755] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :5 :
- [0756] GCGAATTCAC TCCCTTACTA AGTCG
- [0757] (2)SEQ ID NO :6 的信息 :
- [0758] (i) 序列特征 :
- [0759] (A) 长度 :27 碱基对
- [0760] (B) 类型 :核酸
- [0761] (C) 链型 :单链
- [0762] (D) 拓扑构型 :线型
- [0763] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0764] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :6 :
- [0765] GCGAATTCAT GAGCTATCGT ATGTTTG
- [0766] (2)SEQ ID NO :7 的信息 :
- [0767] (i) 序列特征 :
- [0768] (A) 长度 :28 碱基对
- [0769] (B) 类型 :核酸
- [0770] (C) 链型 :单链
- [0771] (D) 拓扑构型 :线型
- [0772] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0773] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :7 :
- [0774] GCGAATTCAG AATGCCTGGC GGAAAATC
- [0775] (2)SEQ ID NO :8 的信息 :
- [0776] (i) 序列特征 :
- [0777] (A) 长度 :28 碱基对
- [0778] (B) 类型 :核酸

- [0779] (C) 链型 :单链
- [0780] (D) 拓扑构型 :线型
- [0781] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0782] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :8 :
- [0783] GGGAATTCAT GAGCGAGAAA ACCATGCG
- [0784] (2)SEQ ID NO :9 的信息 :
- [0785] (i) 序列特征 :
- [0786] (A) 长度 :27 碱基对
- [0787] (B) 类型 :核酸
- [0788] (C) 链型 :单链
- [0789] (D) 拓扑构型 :线型
- [0790] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0791] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :9 :
- [0792] GCGAATTCTT AGCTTCCTTT ACGCAGC
- [0793] (2)SEQ ID NO :10 的信息 :
- [0794] (i) 序列特征 :
- [0795] (A) 长度 :94 碱基对
- [0796] (B) 类型 :核酸
- [0797] (C) 链型 :单链
- [0798] (D) 拓扑构型 :线型
- [0799] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0800] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :10 :
- [0801] AGCTTAGGAG TCTAGAATAT TGAGCTCGAA TTCCCGGGCA
- [0802] TGCGGTACCG GATCCAGAAA AAAGCCCGCA CCTGACAGTG
- [0803] CGGGCTTTTT TTTT
- [0804] (2)SEQ ID NO :11 的信息 :
- [0805] (i) 序列特征 :
- [0806] (A) 长度 :33 碱基对
- [0807] (B) 类型 :核酸
- [0808] (C) 链型 :单链
- [0809] (D) 拓扑构型 :线型
- [0810] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0811] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :11 :
- [0812] GGCCAAGCTT AAGGAGGTTA ATTAAATGAA AAG
- [0813] (2)SEQ ID NO :12 的信息 :
- [0814] (i) 序列特征 :
- [0815] (A) 长度 :26 碱基对
- [0816] (B) 类型 :核酸
- [0817] (C) 链型 :单链

- [0818] (D) 拓扑构型 :线型
- [0819] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0820] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :12 :
- [0821] GCTCTAGATT ATTCAATGGT GTCGGG
- [0822] (2)SEQ ID NO :13 的信息 :
- [0823] (i) 序列特征 :
- [0824] (A) 长度 :42 碱基对
- [0825] (B) 类型 :核酸
- [0826] (C) 链型 :单链
- [0827] (D) 拓扑构型 :线型
- [0828] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0829] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :13 :
- [0830] GCGCCGTCTA GAATTATGAG CTATCGTATG TTTGATTATC TG
- [0831] (2)SEQ ID NO :14 的信息 :
- [0832] (i) 序列特征 :
- [0833] (A) 长度 :36 碱基对
- [0834] (B) 类型 :核酸
- [0835] (C) 链型 :单链
- [0836] (D) 拓扑构型 :线型
- [0837] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0838] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :14 :
- [0839] TCTGATACGG GATCCTCAGA ATGCCTGGCG GAAAAT
- [0840] (2)SEQ ID NO :15 的信息 :
- [0841] (i) 序列特征 :
- [0842] (A) 长度 :181 碱基对
- [0843] (B) 类型 :核酸
- [0844] (C) 链型 :单链
- [0845] (D) 拓扑构型 :线型
- [0846] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0847] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :15 :
- [0848] CGATCTGTGC TGTTTGCCAC GGTATGCAGC ACCAGCGCGA
- [0849] GATTATGGGC TCGACGCTC GACTGTCGGA CGGGGGCACT
- [0850] GGAACGAGAA GTCAGGCGAG CCGTCACGCC CTTGACAATG
- [0851] CCACATCCTG AGCAAATAAT TCAACCACTA AACAAATCAA
- [0852] CCGCGTTTCC CGGAGGTAAC C
- [0853] (2)SEQ ID NO :16 的信息 :
- [0854] (i) 序列特征 :
- [0855] (A) 长度 :149 碱基对
- [0856] (B) 类型 :核酸

- [0857] (C) 链型 :单链
- [0858] (D) 拓扑构型 :线型
- [0859] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0860] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :16 :
- [0861] CGATCTGTGC TGTTCGCCAC GGTATGCAGC ACCAGCGCGA
- [0862] GATTATGGGC TCGCAGCTC GACTGTCGGA CGGGGGCACT
- [0863] GGAACATGCC ACATCCTGAG CAAATAATTC AACCACTAAA
- [0864] CAAATCAACC GCGTTTCCCG GAGGTAACC
- [0865] (2)SEQ ID NO :17 的信息 :
- [0866] (i) 序列特征 :
- [0867] (A) 长度 :33 碱基对
- [0868] (B) 类型 :核酸
- [0869] (C) 链型 :单链
- [0870] (D) 拓扑构型 :线型
- [0871] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0872] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :17 :
- [0873] GGAATTCACCT AGTCGATCTG TGCTGTTTGC CAC
- [0874] (2)SEQ ID NO :18 的信息 :
- [0875] (i) 序列特征 :
- [0876] (A) 长度 :33 碱基对
- [0877] (B) 类型 :核酸
- [0878] (C) 链型 :单链
- [0879] (D) 拓扑构型 :线型
- [0880] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0881] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :18 :
- [0882] GGGGAAGCTT GGTTACCTCC GGGAAACGCG GTT
- [0883] (2)SEQ ID NO :19 的信息 :
- [0884] (i) 序列特征 :
- [0885] (A) 长度 :16 碱基对
- [0886] (B) 类型 :核酸
- [0887] (C) 链型 :单链
- [0888] (D) 拓扑构型 :线型
- [0889] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0890] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :19 :
- [0891] TCGACCACAA GGAGGA
- [0892] (2)SEQ ID NO :20 的信息 :
- [0893] (i) 序列特征 :
- [0894] (A) 长度 :16 碱基对
- [0895] (B) 类型 :核酸

- [0896] (C) 链型 :单链
- [0897] (D) 拓扑构型 :线型
- [0898] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0899] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :20 :
- [0900] CTAGTCCTCC TTGTGG
- [0901] (2)SEQ ID NO :21 的信息 :
- [0902] (i) 序列特征 :
- [0903] (A) 长度 :45 碱基对
- [0904] (B) 类型 :核酸
- [0905] (C) 链型 :单链
- [0906] (D) 拓扑构型 :线型
- [0907] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0908] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :21 :
- [0909] ACTGGCCGTC GTTTTACTCG AGTCGTGACT GGGAAAACCC
- [0910] TGGCG
- [0911] (2)SEQ ID NO :22 的信息 :
- [0912] (i) 序列特征 :
- [0913] (A) 长度 :14 碱基对
- [0914] (B) 类型 :核酸
- [0915] (C) 链型 :单链
- [0916] (D) 拓扑构型 :线型
- [0917] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0918] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :22 :
- [0919] AATTCAAAGG AGGT
- [0920] (2)SEQ ID NO :23 的信息 :
- [0921] (i) 序列特征 :
- [0922] (A) 长度 :14 碱基对
- [0923] (B) 类型 :核酸
- [0924] (C) 链型 :单链
- [0925] (D) 拓扑构型 :线型
- [0926] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
- [0927] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :23 :
- [0928] CTAGACCTCC TTTG
- [0929] (2)SEQ ID NO :24 的信息 :
- [0930] (i) 序列特征 :
- [0931] (A) 长度 :19 碱基对
- [0932] (B) 类型 :核酸
- [0933] (C) 链型 :单链
- [0934] (D) 拓扑构型 :线型

- [0935] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0936] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :24 :
- [0937] AGCTTGTCGA CCATGAAAA
- [0938] (2)SEQ ID NO :25 的信息 :
- [0939] (i) 序列特征 :
- [0940] (A) 长度 :19 碱基对
- [0941] (B) 类型 :核酸
- [0942] (C) 链型 :单链
- [0943] (D) 拓扑构型 :线型
- [0944] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0945] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :25 :
- [0946] GATCTTTTCA TGGTCGACA
- [0947] (2)SEQ ID NO :26 的信息 :
- [0948] (i) 序列特征 :
- [0949] (A) 长度 :13 碱基对
- [0950] (B) 类型 :核酸
- [0951] (C) 链型 :单链
- [0952] (D) 拓扑构型 :线型
- [0953] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0954] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :26 :
- [0955] TCGACCAGGA GGA
- [0956] (2)SEQ ID NO :27 的信息 :
- [0957] (i) 序列特征 :
- [0958] (A) 长度 :13 碱基对
- [0959] (B) 类型 :核酸
- [0960] (C) 链型 :单链
- [0961] (D) 拓扑构型 :线型
- [0962] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0963] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :27 :
- [0964] CTAGTCCTCC TGG
- [0965] (2)SEQ ID NO :28 的信息 :
- [0966] (i) 序列特征 :
- [0967] (A) 长度 :18 碱基对
- [0968] (B) 类型 :核酸
- [0969] (C) 链型 :单链
- [0970] (D) 拓扑构型 :线型
- [0971] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [0972] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :28 :
- [0973] TCGACGAATT CAGGAGGA

- [0974] (2)SEQ ID NO:29 的信息:
- [0975] (i) 序列特征:
- [0976] (A) 长度:18 碱基对
- [0977] (B) 类型:核酸
- [0978] (C) 链型:单链
- [0979] (D) 拓扑构型:线型
- [0980] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [0981] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:29:
- [0982] CTAGTCCTCC TGAATTCG
- [0983] (2)SEQ ID NO:30 的信息:
- [0984] (i) 序列特征:
- [0985] (A) 长度:23 碱基对
- [0986] (B) 类型:核酸
- [0987] (C) 链型:单链
- [0988] (D) 拓扑构型:线型
- [0989] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [0990] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:30:
- [0991] ATGTACAAGA TCCTGATCGC CGA
- [0992] (2)SEQ ID NO:31 的信息:
- [0993] (i) 序列特征:
- [0994] (A) 长度:22 碱基对
- [0995] (B) 类型:核酸
- [0996] (C) 链型:单链
- [0997] (D) 拓扑构型:线型
- [0998] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [0999] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:31:
- [1000] TCAGCGGCGC AGGTAGGCGG CG
- [1001] (2)SEQ ID NO:32 的信息:
- [1002] (i) 序列特征:
- [1003] (A) 长度:31 碱基对
- [1004] (B) 类型:核酸
- [1005] (C) 链型:单链
- [1006] (D) 拓扑构型:线型
- [1007] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [1008] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:32:
- [1009] ATGACCAAGG GCCGATCCG TCGACCTGCA G
- [1010] (2)SEQ ID NO:33 的信息:
- [1011] (i) 序列特征:
- [1012] (A) 长度:32 碱基对

- [1013] (B) 类型 :核酸
[1014] (C) 链型 :单链
[1015] (D) 拓扑构型 :线型
[1016] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
[1017] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :33 :
[1018] CTACCCTTGG CCCCGGATCC GTCGACCTGC AG
[1019] (2)SEQ ID NO :34 的信息 :
[1020] (i) 序列特征 :
[1021] (A) 长度 :23 碱基对
[1022] (B) 类型 :核酸
[1023] (C) 链型 :单链
[1024] (D) 拓扑构型 :线型
[1025] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
[1026] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :34 :
[1027] CACGGCCT GGCGCAGGTTGC GGG
[1028] (2)SEQ ID NO :35 的信息 :
[1029] (i) 序列特征 :
[1030] (A) 长度 :21 碱基对
[1031] (B) 类型 :核酸
[1032] (C) 链型 :单链
[1033] (D) 拓扑构型 :线型
[1034] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
[1035] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :35 :
[1036] GGCAGCCCGC ACGATTGCGG C
[1037] (2)SEQ ID NO :36 的信息 :
[1038] (i) 序列特征 :
[1039] (A) 长度 :21 碱基对
[1040] (B) 类型 :核酸
[1041] (C) 链型 :单链
[1042] (D) 拓扑构型 :线型
[1043] (ii) 分子类型 :DNA(基因组)
[1044] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :36 :
[1045] GCGGAAAACC GCCTGGATCG C
[1046] (2)SEQ ID NO :37 的信息 :
[1047] (i) 序列特征 :
[1048] (A) 长度 :21 碱基对
[1049] (B) 类型 :核酸
[1050] (C) 链型 :单链
[1051] (D) 拓扑构型 :线型

- [1052] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [1053] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :37 :
- [1054] GGGTTCAGGG ACTGCAAAAC G
- [1055] (2)SEQ ID NO :38 的信息 :
- [1056] (i) 序列特征 :
- [1057] (A) 长度 :35 碱基对
- [1058] (B) 类型 :核酸
- [1059] (C) 链型 :单链
- [1060] (D) 拓扑构型 :线型
- [1061] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [1062] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :38 :
- [1063] GGAATTCAGA TCTCAGCAAT GAAAAGATCA AAACG
- [1064] (2)SEQ ID NO :39 的信息 :
- [1065] (i) 序列特征 :
- [1066] (A) 长度 :34 碱基对
- [1067] (B) 类型 :核酸
- [1068] (C) 链型 :单链
- [1069] (D) 拓扑构型 :线型
- [1070] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [1071] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :39 :
- [1072] GGAATTCAGA TCTCAGCAAT GCAACAGACA ACCC
- [1073] (2)SEQ ID NO :40 的信息 :
- [1074] (i) 序列特征 :
- [1075] (A) 长度 :28 碱基对
- [1076] (B) 类型 :核酸
- [1077] (C) 链型 :单链
- [1078] (D) 拓扑构型 :线型
- [1079] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [1080] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :40 :
- [1081] GCTCTAGATC ACTCCCCTTA CTAAGTCG
- [1082] (2)SEQ ID NO :41 的信息 :
- [1083] (i) 序列特征 :
- [1084] (A) 长度 :37 碱基对
- [1085] (B) 类型 :核酸
- [1086] (C) 链型 :单链
- [1087] (D) 拓扑构型 :线型
- [1088] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [1089] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :41 :
- [1090] GGAATTCAGATCTCAGCAAT GAGCGAGAAA ACCATGC

- [1091] (2)SEQ ID NO:42 的信息:
- [1092] (i) 序列特征:
- [1093] (A) 长度:27 碱基对
- [1094] (B) 类型:核酸
- [1095] (C) 链型:单链
- [1096] (D) 拓扑构型:线型
- [1097] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [1098] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:42:
- [1099] GCTCTAGATT AGCTTCCTTT ACGCAGC
- [1100] (2)SEQ ID NO:43 的信息:
- [1101] (i) 序列特征:
- [1102] (A) 长度:38 碱基对
- [1103] (B) 类型:核酸
- [1104] (C) 链型:单链
- [1105] (D) 拓扑构型:线型
- [1106] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [1107] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:43:
- [1108] GGAATTCAGA TCTCAGCAAT GAGCTATCGT ATGTTTGA
- [1109] (2)SEQ ID NO:44 的信息:
- [1110] (i) 序列特征:
- [1111] (A) 长度:24 碱基对
- [1112] (B) 类型:核酸
- [1113] (C) 链型:单链
- [1114] (D) 拓扑构型:线型
- [1115] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [1116] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:44:
- [1117] GCTCTAGATC AGAATGCCTG GCGG
- [1118] (2)SEQ ID NO:45 的信息:
- [1119] (i) 序列特征:
- [1120] (A) 长度:35 碱基对
- [1121] (B) 类型:核酸
- [1122] (C) 链型:单链
- [1123] (D) 拓扑构型:线型
- [1124] (ii) 分子类型:DNA(基因组)
- [1125] (xi) 序列表述:SEQ ID NO:45:
- [1126] GGAATTCAGA TCTAGCAATG CCGTTAATAG CCGGG
- [1127] (2)SEQ ID NO:46 的信息:
- [1128] (i) 序列特征:
- [1129] (A) 长度:26 碱基对

- [1130] (B) 类型 :核酸
- [1131] (C) 链型 :单链
- [1132] (D) 拓扑构型 :线型
- [1133] (ii) 分子类型 :DNA (基因组)
- [1134] (xi) 序列表述 :SEQ ID NO :46 :
- [1135] GCTCTAGATT AATTCGCCTGACCGGC

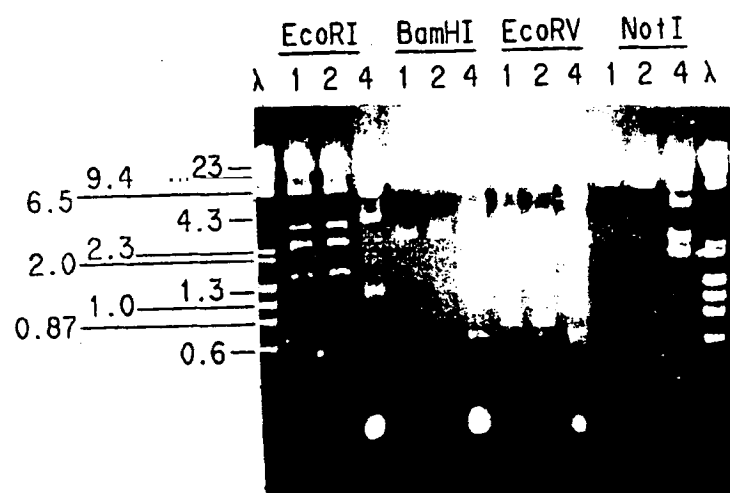


图 1

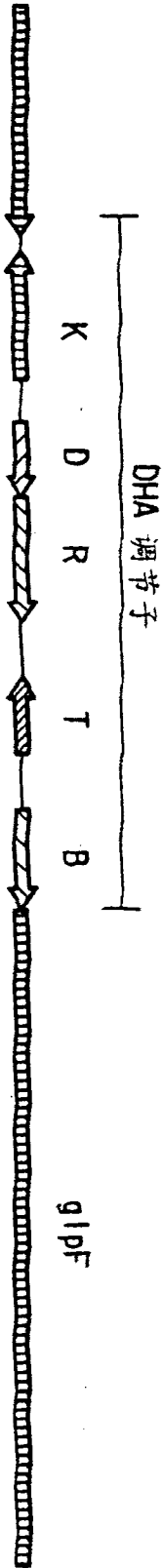


图 2