



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I853215 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：111106114

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 02 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12N15/11 (2006.01)

C12N15/113 (2010.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N1/21 (2006.01)

C12P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/02/19 日本

2021-025664

(71)申請人：國立研究開發法人產業技術總合研究所(日本) NATIONAL INSTITUTE OF
ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (JP)

日本

日商旭化成製藥股份有限公司(日本) ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION
(JP)

日本

(72)發明人：吉田圭太郎 YOSHIDA, KEITARO (JP)；安武義晃 YASUTAKE, YOSHIAKI (JP)；
田村具博 TAMURA, TOMOHIRO (JP)；小西健司 KONISHI, KENJI (JP)；酒瀨川
信一 SAKASEGAWA, SHIN-ICHI (JP)；村松周治 MURAMATSU, SHUJI (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2017/0137793A1

期刊 Agnoli K., et al., "Exposing the third chromosome of
Burkholderia cepacia complex strains as a virulence plasmid",
Molecular Microbiology, Vol. 83(2), 2012, page 362-378.

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：12 共 125 頁

(54)名稱

目標蛋白質之生產方法

(57)摘要

一種目標蛋白質之生產方法，其係生產藉由目標基因編碼之蛋白質之方法，
包括於伯克氏菌(Burkholderia)屬細菌中表現目標基因之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有選自由
BSFP_068740、BSFP_068730 及 BSFP_068720 所組成之群中之 1 個或複數個基因，或者該基因之
表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制。



I853215

【發明摘要】

【中文發明名稱】

目標蛋白質之生產方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR PRODUCING TARGET PROTEINS

【中文】

一種目標蛋白質之生產方法，其係生產藉由目標基因編碼之蛋白質之方法，

包括於伯克氏菌(*Burkholderia*)屬細菌中表現目標基因之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有選自由 BSFP_068740、BSFP_068730 及 BSFP_068720 所組成之群中之 1 個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

目標蛋白質之生產方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR PRODUCING TARGET PROTEINS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種於伯克氏菌(*Burkholderia*)屬細菌中生產目標蛋白質之方法等。

【先前技術】

【0002】 伯克氏菌屬細菌係分泌生產有用之脂肪酶之革蘭氏陰性細菌(專利文獻1)，可表現及分泌在大腸桿菌中難以活性型表現之細胞外分泌型之脂肪酶等，因此，有將其用作有用蛋白質表現系統之平台之報道(參照專利文獻2及3)。

【0003】 然而，使用伯克氏菌屬細菌之重組蛋白生產量與大腸桿菌或酵母、絲狀真菌等宿主載體系統相比較少，因此利用例較少，亦存在以下例：為了生產源自伯克氏菌屬之脂肪酶，使用利用大腸桿菌而並非伯克氏菌屬細菌之宿主載體系統(專利文獻4及非專利文獻1)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】 專利文獻1：日本專利特開平11-253157號公報

專利文獻2：日本專利特表2008-543294號公報

專利文獻3：日本專利特開2019-205402號公報

專利文獻4：日本專利第5993229號公報

[非專利文獻]

【0005】 非專利文獻 1：M El Khattabi et al., J. Bio Chem., 275(35), 26885-91(2000)

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0006】 本發明之課題在於，提供一種可於用作有用蛋白質表現系統之平台之例較少之伯克氏菌屬細菌中大量表現重組蛋白之新方法。

[解決問題之技術手段]

【0007】 本發明人等發現，藉由抑制位於伯克氏菌屬細菌所具有之特定染色體上之基因之功能，於伯克氏菌屬細菌中表現載體穩定，該細菌被賦予對蛋白質之穩定製造更佳之性質。亦新發現可增加目標蛋白質之表現量之新啟動子。

【0008】 即，本案包含以下發明。

[1]

一種目標蛋白質之生產方法，其係生產藉由目標基因編碼之蛋白質之方法，

包括於伯克氏菌(*Burkholderia*)屬細菌中表現目標基因之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有選自由 BSFP_068740、BSFP_068730 及 BSFP_068720 所組成之群中之 1 個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制。

[2]

如[1]所記載之方法，其中基因 BSFP_068740 包含以下(i)~(viii)中之任一 DNA(Deoxyribonucleic Acid，去氧核糖核酸)：

(i)包含序列編號1之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號1之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號1之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號1具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號2具有至少80%以上之序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

[3]

如[1]或[2]所記載之方法，其中基因BSFP_068730包含以下(i)～(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號3之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號3之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號3之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號3具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號4具有至少80%以上之序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

[4]

如[1]至[3]中任一項所記載之方法，其中基因BSFP_068720包含以下

(i)~(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號5之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號5之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號5之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號5具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號6之

胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號6具有至少80%以上之序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

[5]

如[1]至[4]中任一項所記載之方法，其中目標基因以可表現之方式連結於表現構建物。

[6]

如[2]至[5]中任一項所記載之方法，其中表現構建物係表現載體。

[7]

如[6]所記載之方法，其中表現構建物係可於伯克氏菌屬細菌中複製之質體。

[8]

如[7]所記載之方法，其中質體係廣泛宿主載體。

[9]

如[8]所記載之方法，其中廣泛宿主載體係pBBR122、pSa或RK2。

[10]

如[2]至[9]中任一項所記載之方法，其中表現構建物包含控制目標基因之表現之啟動子。

[11]

如[10]所記載之方法，其中啟動子源自伯克氏菌屬細菌。

[12]

如[1]至[11]中任一項所記載之方法，其中啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號7中連續的超過80個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[13]

如[12]所記載之方法，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號8之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號8之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號8之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號8具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[14]

如[1]至[13]中任一項所記載之方法，其中啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號9中連續的超過100個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[15]

如[14]所記載之方法，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號10之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號10之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號10之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號10具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[16]

如[1]至[15]中任一項所記載之方法，其中目標基因編碼酯酶。

[17]

如[16]所記載之方法，其中編碼酯酶之基因包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號11~13之任一鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號11~13之任一鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性；

(iii)包含序列編號11~13之任一鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性；或，

(iv)包含與序列編號11~13之任一鹼基序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性。

[18]

如[1]至[17]中任一項所記載之方法，其中表現構建物包含編碼摺疊酶之DNA。

[19]

如[18]所記載之方法，其中編碼摺疊酶之DNA包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號14~16之任一鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號14~16之任一鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性；

(iii)包含序列編號14~16之任一鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置

換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性；或，

(iv)包含與序列編號14~16之任一鹼基序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性。

[20]

如[1]至[19]中任一項所記載之方法，其中目標基因進而編碼訊息序列。

[21]

如[1]至[20]中任一項所記載之方法，其中伯克氏菌屬細菌係伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia stabilis*)。

[22]

一種啟動子，其包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號7中連續的超過80個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[23]

如[22]所記載之啟動子，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一

DNA：

(i)包含序列編號8之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號8之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號8之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號8具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[24]

一種啟動子，其包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號9中連續的超過100個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[25]

如[24]所記載之啟動子，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號10之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號10之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號10之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號10具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

[26]

一種伯克氏菌屬細菌之變異株，其以選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制之方式修飾。

[27]

如[26]所記載之變異株，其中變異株包含表現構建物，表現構建物包含控制目標基因之表現之啟動子。

[28]

如[27]所記載之變異株，其中啟動子係如[22]至[25]中任一項所記載之啟動子。

[29]

一種表現構建物之維持方法，其係於伯克氏菌屬細菌中維持表現構建物之方法，

包括培養包含表現構建物之伯克氏菌屬細菌之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制。

[30]

如[29]所記載之方法，其中於培養後之伯克氏菌屬細菌中，表現構建物之拷貝數增大，或表現構建物之穩定性增大。

[發明之效果]

【0009】 根據本發明，與位於特定染色體上之基因之功能未受到抑制之伯克氏菌屬細菌相比，可實現目標蛋白質之高生產，又，伯克氏菌屬細菌中之表現載體之穩定性可增大。

【圖式簡單說明】

【0010】 圖1表示基因破壞用載體之製作過程。

圖2表示野生株(1)與基因破壞株之破壞基因部分(2)之PCR(polymerase chain reaction，聚合酶鏈反應)產物之電泳結果(下側)、及野生株之基因與破壞之基因之模式圖(上側)。

圖3表示膽固醇酯酶表現載體。

圖4表示自導入pBBR122之野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株提取之pBBR122於各細菌中之拷貝數。

圖5表示自導入pBBR122之野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株提取之pBBR122之電泳結果。

圖6表示導入不包含膽固醇酯酶基因之pBBR122或包含膽固醇酯酶基因之pBBR122-182之野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株中之膽固醇酯酶活性。

圖7表示自導入pSa之野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730

破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株提取之pSa之電泳結果。

圖8表示導入pRK2-182之野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株中之膽固醇酯酶活性。

圖9表示導入包含源自洋蔥伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia cepacia*)之脂肪酶之載體之野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株中之脂肪酶活性。

圖10表示導入包含源自植物伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia plantarii*)之脂肪酶之載體之野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株中之脂肪酶活性。

圖11表示縮短14020啟動子及48230啟動子時之膽固醇酯酶之表現量。

圖12表示將斯沃蘭提卡伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia silvatlantica*)之全DNA及伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板、使用序列編號98及99之引子並藉由PCR所得之擴增產物之電泳結果。

【實施方式】

【0011】於第一實施方式中，提供一種目標蛋白質之生產方法，其係生產藉由目標基因編碼之蛋白質之方法，包括於伯克氏菌屬細菌中表現目標基因之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有例如選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制，該基因位於伯克氏菌(*Burkholderia*)屬細菌上之特定染色體上，例如於伯克霍爾德氏菌之情形時，位於染色體3上。

【0012】 作為編碼蛋白質之鹼基序列，並無特別限定，例如，可為匹配例如伯克霍爾德氏菌等伯克氏菌屬細菌等宿主之密碼子使用頻度來改變序列編號1、3或5之鹼基序列所得之鹼基序列。又，於上述蛋白質中，若分別為具有減少表現構建物之拷貝數或降低表現構建物之穩定性之功能之蛋白質，則可為編碼與各蛋白質實質上均等之胺基酸序列之鹼基序列，亦可為編碼胺基酸序列之均等物之鹼基序列，該胺基酸序列例如為使各蛋白質之胺基酸序列中之不參與上述功能之一部分胺基酸發生變異所得者，例如1個或複數個胺基酸缺失、置換或附加而成者。較佳為包含序列編號1、3或5之鹼基序列之全部或部分尤佳。

【0013】 作為革蘭氏陰性好氧桿菌之伯克氏菌屬細菌係有時用作有用蛋白質表現系統之平台之革蘭氏陰性好氧桿菌，登記有伯克霍爾德氏菌 (*Burkholderia stabilis*)等60以上之種類。伯克氏菌屬細菌之中，例如伯克霍爾德氏菌FERMP-21014(Genome Announcements Volume 5 Issue 29 e00636-17)具有3條染色體即染色體1(3.6 Mbp)、染色體2(3.2 Mbp)、染色體3(0.9 Mbp)，於最小之染色體3上存在849個基因。藉由使伯克氏菌屬細菌之特定染色體欠缺，與不欠缺之該細菌相比，可增大目標蛋白質之生產量。並非意欲受理論束縛，但認為藉由抑制存在於上述特定染色體上之具有使質體等表現載體之穩定性喪失之功能之基因的功能，表現載體之穩定性增大，其結果，蛋白質之生產量增大。

【0014】 於本說明書中使用之情形時，「伯克氏菌屬細菌」意指伯克氏菌屬之任意細菌。伯克氏菌屬細菌可為天然存在者，亦可為人為作出者，只要抑制具有使質體等表現載體之穩定性喪失之功能之基因的功能即可。伯克氏菌屬細菌之中，較佳為伯克霍爾德氏菌或斯沃蘭提卡伯克霍爾

德氏菌。

【0015】 伯克霍爾德氏菌FERMP-21014之基因組序列係公知者 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/45559?genome_assembly_id=331877)，例如構成染色體3之基因序列亦係公知者 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AP018113.1>)。作為具有使質體等表現載體之穩定性喪失之功能之基因之例，有伯克霍爾德氏菌FERMP-21014之BSFP_068740、BSFP_068730或BSFP_068720，存在於染色體3上。BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720之功能可均不同，亦可相同，藉由抑制各基因之1種或複數種功能，可提高表現載體之穩定性。BSFP編號係表示根據NCBI(National Center for Biotechnology Information，國家生物技術資訊中心)之基因座標籤。

【0016】 於較佳之形態中，基因BSFP_068740可包含以下(i)～(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號1之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號1之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號1之鹼基序列中1個或複數個、較佳為1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號1具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質

具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號2具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

【0017】 於較佳之形態中，基因BSFP_068730可包含以下(i)～(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號3之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號3之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號3之鹼基序列中1個或複數個、較佳為1個或數個鹼

基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號3具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號4具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

【0018】 於較佳之形態中，基因BSFP_068720可包含以下(i)～(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號5之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號5之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號5之鹼基序列中1個或複數個、較佳為1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號5具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號

6具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

【0019】 於本說明書中使用之情形時，「嚴格之條件」例如為「1×SSC(saline sodium citrate，檸檬酸鈉)、0.1% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate，十二烷基硫酸鈉)、37℃」程度之條件，更嚴格之條件為「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度之條件，進而嚴格之條件為「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」程度之條件。如此雜交之條件越嚴格，則越可期待與探針序列具有較高之同源性、較佳為較高之同一性之DNA之單離。然而，上述SSC、SDS及溫度之條件之組合係例示性者，業者可藉由將決定雜交之嚴格度之上述要素或其他要素(例如探針濃度、探針之長度、雜交之反應時間等)適當組合，而實現與上述相同之嚴格度。於此種嚴格之條件下雜交之DNA一般具有較高之序列同一性。較高之序列同一性係指具有至少60%以上、較佳為70%以上、進而較佳為80%以上、尤佳為90%以上、最佳為95%以上之同源性。

【0020】 於本說明書中使用之情形時，「1個或複數個鹼基」意指鹼基之數根據實施缺失、置換或附加之基準序列之全長而不同，例如對於包含100個鹼基之鹼基序列，為1~30個、較佳為1~20個、更佳為1~10個鹼基。「1個或數個鹼基」亦同樣如此，例如對於包含100個鹼基之鹼基序列，為1~10個、較佳為1~5個、更佳為4個、3個、2個或1個鹼基。

【0021】 於本說明書中使用之情形時，「1個或複數個胺基酸」意指胺基酸之數根據實施缺失、置換或附加之基準序列之全長而不同，例如對於包含100個胺基酸之胺基酸序列，為1~30個、較佳為1~20個、更佳

為1~10個胺基酸。「1個或數個胺基酸」亦同樣如此，例如對於包含100個胺基酸之胺基酸序列，為1~10個、較佳為1~5個、更佳為4個、3個、2個或1個胺基酸。

【0022】 序列同源性或序列同一性於使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool，基本局部比對搜索工具)等(例如使用預設值即初始設定之參數)計算時，對於特定序列為至少80%以上，較佳為90%以上，更佳為95%以上，進而較佳為98%以上。

【0023】 將意欲於伯克氏菌屬細菌中生產之藉由目標基因編碼之蛋白質亦稱為「目標蛋白質」。目標蛋白質若為可於伯克氏菌屬細菌中生產之蛋白質，則並無特別限定。目標蛋白質較佳為於大腸桿菌或酵母、絲狀真菌等先前公知之宿主載體系統之情形時表現困難之細胞外分泌型蛋白質。作為此種蛋白質，包括酶，例如，可例舉酯酶、脂肪酶、澱粉酶、葡糖澱粉酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、甘露糖苷酶、異構酶、轉化酶、轉移酶、核糖核酸酶、去氧核糖核酸酶、殼質酶、觸酶、蟲漆酶、酚氧化酶、氧化酶、氧化還原酶、纖維素酶、木聚糖酶、過氧化酶、水解酶、角質酶、蛋白酶、植酸酶、解離酶、果膠酶、胺肽酶、羧肽酶。該等酶之中，較佳為分類為EC 3.1.1羧酸酯水解酶之酯酶，更佳為分類為EC 3.1.1.1脫羧醯酯酶之酯酶，進而較佳為分類為EC 3.1.1.13-固醇酯酶之固醇酯酶、分類為EC 3.1.1.3之三醯甘油脂肪酶(脂肪酶)，尤佳為膽固醇酯酶。

【0024】 作為膽固醇酯酶之例，有源自伯克霍爾德氏菌之固醇酯水解酶(EC3.1.1.13)等。作為脂肪酶之例，有莢殼伯克霍爾德氏菌之脂肪酶(L G Frenken et al., Mol Microbiol. 9(3), 591-9 (1993))等。目標蛋白質

可包含訊息肽，不包含亦可。目標蛋白質較佳為進而包含訊息肽。訊息肽亦可使用例如大腸桿菌之訊息肽。亦可使用論文等報道者(Tullman-Ercek et al., J Bio Chem. 16, 282(11), 8309-16 (2007))、或於作為蛋白質資料庫之Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)中檢索胺基酸序列所得之訊息肽。若使用後者之方法，則可獲得例如大腸桿菌之所謂BsmA之蛋白質之訊息肽(<https://www.uniprot.org/uniprot/P39297>)、所謂YafY之蛋白質之訊息肽(<https://www.uniprot.org/uniprot/P77365>)、所謂YnjE之蛋白質之訊息肽(<https://www.uniprot.org/uniprot/P78067>)之序列資訊。

【0025】 作為編碼酯酶之鹼基序列，並無特別限定，例如，可為匹配宿主例如伯克霍爾德氏菌等伯克氏菌屬細菌等之密碼子使用頻度來改變序列編號11~13之任一鹼基序列所得之鹼基序列。又，若為具有酯酶之作用之蛋白質，則可為編碼實質上均等之胺基酸序列之鹼基序列，亦可為編碼胺基酸序列之均等物之鹼基序列，該胺基酸序列例如為使酯酶之胺基酸序列中之不參與酯酶之作用之一部分胺基酸發生變異所得者，例如1個或複數個胺基酸缺失、置換或附加而成者。

【0026】 於較佳之形態中，編碼酯酶之基因例如可包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號11~13之任一鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號11~13之任一鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性；

(iii)包含序列編號11~13之任一鹼基序列中1個或複數個、較佳為1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編

碼之蛋白質具有酯酶活性；或，

(iv)包含與序列編號11~13之任一鹼基序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性。

【0027】 編碼目標蛋白質之目標基因較佳為以可於伯克氏菌屬細菌中表現之方式連結於質體等表現構建物。表現構建物為可於伯克氏菌屬細菌中複製者即可，例如可例舉表現載體，較佳為自主複製之質體載體。作為表現載體，有可於伯克氏菌屬細菌中複製之質體載體，例如pBBR122、pSa、pRK2等廣泛宿主載體。

【0028】 表現構建物較佳為包含控制目標基因之表現之啟動子。啟動子可源自伯克氏菌屬細菌。藉由選擇具有適當之啟動子活性之啟動子，目標基因之轉錄量變多，生產之蛋白質量亦增加。作為此種啟動子，有以下啟動子：編碼甘油-3-磷酸去氫酶之BSFP_015180基因之啟動子，其於位於該基因之起始密碼子之上游之約80 bp或80 bp以上之連續之區域具有啟動子活性(以下亦稱為「14020啟動子」)；編碼功能未知之蛋白質之BSFP_052240基因之啟動子，其於位於該基因之起始密碼子之上游之約100 bp或100 bp以上之連續之區域具有啟動子活性(以下亦稱為「48230啟動子」)。

【0029】 表現構建物可由業者構建，例如，可藉由將啟動子併入於伯克氏菌屬細菌中自主複製之質體載體之任意位置，於啟動子序列之下游配置有助於表現目標基因之導入之多選殖位點或用於終止轉錄之終止子，而構建表現構建物。

【0030】 表現構建物於宿主內自複製起點複製。由此，較佳為使用具有可於宿主內複製之複製起點之表現構建物。於伯克氏菌屬細菌等革蘭

氏陰性細菌之情形時，較佳為具有可於革蘭氏陰性細菌中複製之複製起點之表現構建物。作為具有可於革蘭氏陰性細菌中複製之複製起點之質體載體，可例舉pBBR122載體。又，亦可使用具有與pBBR122不同之複製起點之pSa(Datta, American society for Microbiology, Washington, DC, pp9-15(1975)、Gorai et al., Plasmid 2 489-492 (1979)、Ward and Grinsted, Plasmid 7 239-250 (1982)、Tait et al., Mol. Gen. Genet. 186 10-15(1982))、或具有RK2ori之質體(T. J. Schmidhauser et al., Plasmid. 9(3) 325-30(1983))。

【0031】 表現構建物進而可包含選擇標記、接合傳遞起點。表現構建物向伯克氏菌屬細菌之導入可藉由業者公知之方法進行。例如，可例舉接合傳遞法或電穿孔法等(Kim et al., Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol.73, 81-88(1998))。

【0032】 將於構建之表現構建物之啟動子之下游導入有目標基因之質體載體轉形為宿主細胞，可期待目標蛋白質於按照表現構建物所具有之選擇標記而選擇之轉形體中恆常表現。使用之穿梭載體、多選殖位點、及終止子並無特別限定。表現構建物亦包含導入有此種表現目標基因者。

【0033】 目標基因可於啟動子序列之控制下配置於啟動子序列之下游，例如距啟動子序列30個鹼基以下，較佳為15個鹼基以下，更佳為6個鹼基以下，尤佳為直接連結。目標基因例如於編碼之蛋白質為分泌型之情形時，可具有訊息序列。

【0034】 於目標基因之下游，例如可不配置終止子序列，較佳為配置終止子序列。終止子序列係使RNA(Ribonucleic acid，核糖核酸)聚合酶自DNA背離、終止轉錄之序列，通常可配置於基因之下游。作為終止

子序列，並無特別限定，可使用公知之各種終止子序列。於表現目標基因編碼膽固醇酯酶之情形時，使用最初附著於該基因之天然之終止子序列亦較簡便，故而較佳。

【0035】 關於目標蛋白質，為了其表現或活化等，摺疊酶或伴侶可與目標蛋白質同時表現。藉此，形成正確之立體結構之多肽鏈，進而生成具有正確之功能之蛋白質。於生產蛋白質之情形時，若需要摺疊酶或伴侶，則較佳為將蛋白質與摺疊酶或伴侶同時表現。

【0036】 作為編碼伴侶之鹼基序列，並無特別限定，例如可為匹配宿主例如伯克霍爾德氏菌等伯克氏菌屬細菌等之密碼子使用頻度來改變公知之鹼基序列所得之鹼基序列。又，若為具有作為伴侶之功能之蛋白質，則可為編碼實質上均等之胺基酸序列之鹼基序列，亦可為編碼胺基酸序列之均等物之鹼基序列，該胺基酸序列例如為使伴侶之胺基酸序列中之不參與伴侶之功能之一部分胺基酸發生變異所得者，例如1個或複數個胺基酸缺失、置換或附加而成者。

【0037】 若將摺疊酶或伴侶與目標蛋白質同時表現，則可配置於序列上互相遠離之位置，較佳為位於轉錄之起始所需之啟動子之下游。

【0038】 為了將摺疊酶或伴侶與表現目標基因同時表現，可將摺疊酶序列或伴侶序列插入表現目標基因與終止子之間，將摺疊酶或伴侶藉由表現目標基因之啟動子表現。

【0039】 於摺疊酶或伴侶於特定位置發揮功能之情形時，編碼其等之序列較佳為包含訊息序列。

【0040】 於較佳之形態中，編碼摺疊酶之DNA可包含以下(i)～(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號14~16之任一鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號14~16之任一鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性；

(iii)包含序列編號14~16之任一鹼基序列中1個或複數個、較佳為1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性；或，

(iv)包含與序列編號14~16之任一鹼基序列具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性。

【0041】 目標蛋白質之生產可藉由於伯克氏菌屬細菌中表現目標基因而進行。較佳為可藉由培養藉由包含編碼目標基因之基因之表現構建物轉形之伯克氏菌屬細菌(轉形體)，自培養物單離純化目標基因編碼之蛋白質，而生產目標蛋白質。其中，培養物意指培養菌所得之菌體及固體或液體狀之培養液之混合物，轉形體可使用適合使用之宿主之培養基，藉由靜置培養法、利用轉瓶之培養法等進行培養。培養可藉由公知之方法進行，可根據使用之伯克氏菌屬細菌株之種類，適當決定使用之培養基或培養條件。

【0042】 於目標蛋白質於菌體內生產之情形時，可藉由使伯克氏菌屬細菌破碎而採集蛋白質。又，於目標蛋白質於菌體外生產之情形時，直接使用培養液，或者藉由離心分離等去除宿主細胞。其後，可藉由將使用用於蛋白質之單離純化之各種層析法之一般生化方法單獨使用或適當組合使用，而自上述培養物中單離純化目標蛋白質。

【0043】 於第二實施方式中，提供14020啟動子或48230啟動子。

【0044】 14020啟動子或48230啟動子可廣泛用於任意伯克氏菌屬細菌中之目標基因之表現，於在特定染色體上之基因之功能受到抑制之伯克氏菌屬細菌中使用之情形時，與用於野生株之情形時相比，顯示出明顯較高之啟動子活性。

【0045】 14020啟動子可包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號7之鹼基序列中連續約超過80個、例如90個以上、100個以上之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含序列編號7之鹼基序列中連續約超過80個、例如90個以上、100個以上之互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號7之鹼基序列中連續約超過80個、例如90個以上、100個以上之鹼基序列之1個或複數個、較佳為1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號7中連續約超過80個、例如90個以上、100個以上之鹼基序列具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、尤佳為序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【0046】 於較佳之形態中，14020啟動子例如可包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號8之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號8之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號8之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而

成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號8具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【0047】 48230啟動子可包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號9之鹼基序列中連續約超過100個、例如110個以上、120個以上之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含序列編號9之鹼基序列中連續約超過100個、例如110個以上、120個以上之互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號9之鹼基序列中連續約超過100個、例如110個以上、120個以上之鹼基序列之1個或複數個、較佳為1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號9中連續約超過100個、例如110個以上、120個以上之鹼基序列具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同源性、較佳為序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【0048】 於較佳之形態中，48230啟動子例如可包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號10之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號10之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號10之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號10具有至少80%以上、較佳為90%以上之序列同

源性、較佳為序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【0049】於第三實施方式中，提供一種伯克氏菌屬細菌之變異株，其以例如選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制之方式修飾，該基因位於特定染色體上。

【0050】使用之伯克氏菌屬細菌可為天然存在者，亦可為人為作出者，只要抑制存在於特定染色體上之具有使質體等表現載體之穩定性喪失之功能之基因的功能即可。

【0051】於較佳之形態中，特定染色體上之基因以受到破壞、或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制之方式修飾。

【0052】該抑制可使用使目標基因之功能欠缺之公知之方法，例如，可例舉利用基因重組法之基因破壞、利用突然變異法之功能欠缺之誘導等。對於已經存在之天然或變異型之伯克氏菌屬細菌，可藉由亞硝基胍等變異劑處理、或紫外線、X射線或 γ 射線之照射等物理處理，引起所需之變異。又，可藉由使目標基因上游之啟動子區域欠缺、或使啟動子之功能欠缺，而抑制目標基因之表現。

【0053】作為使染色體自身缺失之方法，可使用於新洋蔥伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)中實施之方法(Agnoli et al., Mol Microbiol., 83(2), 362-378(2012))、或於烏本伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia ubonensis*)中實施之方法(Price et al., PLoS Negl Trop Dis.. 11(9): e0005928 (2017))。

【0054】作為分類為伯克氏菌屬之微生物，除上述伯克霍爾德氏菌以外，可例舉多噬伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia multivorans*)、洋蔥伯克

霍爾德氏菌、鼻疽伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia mallei*)、莢殼伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia glumae*)、雙向伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia ambifaria*)、杜氏伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia dolosa*)、唐菖蒲伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia gladioli*)、植物伯克霍爾德氏菌(AZEGAMI et al., *Int J Syst Evol Microbiol*, 37(2): 144-152(1987) ; Seo et al., *BMC Genomics*, 16: 346(2015))等。較佳為伯克霍爾德氏菌或斯沃蘭提卡伯克霍爾德氏菌。

【0055】 由於伯克氏菌屬細菌存在於各種自然生態系統，故而培養伯克氏菌屬細菌之培養基或條件各不相同。例如為了培養伯克霍爾德氏菌，可於LB培養基(1% Bacto(商標)胰化蛋白、0.5% Bacto(商標)酵母萃取物、0.5% 氯化鈉)中於30℃下培養。又，對於可於DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen，德國微生物菌種保藏中心)購入之菌株，DSMZ推薦之培養基及條件已作為培養條件公佈，可參照該培養條件。

【0056】 於第四實施方式中，提供一種表現構建物之維持方法，其係於伯克氏菌屬細菌中維持表現構建物之方法，包括培養包含表現構建物之伯克氏菌屬細菌之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有例如選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制，該基因位於特定染色體上。

【0057】 於較佳之形態中，培養後之伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數與特定染色體上之基因之功能未受到抑制之伯克氏菌屬細菌相比增大，及/或表現構建物之穩定性可增大。

【0058】藉由表現構建物之拷貝數或穩定性增大，可實現目標蛋白質之高表現。表現構建物之穩定性可將宿主中之表現構建物之穩定性、例如相對於在不含有抗生素之培養基上增殖之菌落數之在含有抗生素之培養基上增殖之菌落數(表現構建物攜帶率)作為指標，進行評價。

【0059】於第五實施方式中，提供一種表現構建物之穩定性之增大方法，其係於伯克氏菌屬細菌中增大表現構建物之穩定性之方法，包括培養包含表現構建物之伯克氏菌屬細菌之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有例如選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制，該基因位於特定染色體上。

[實施例]

【0060】以下，基於實施例等對本發明進行說明，但本發明之範圍並未限定於以下實施例等來解釋。又，關於以下所示之測定值等，根據測定之條件或使用設備之精度等，其值可發生變化。再者，於實施例中之瓊脂糖凝膠電泳中，使用GeneDireX公司製造之1Kb plus DNA梯狀標記RTU(Ready To Use，即用)作為分子量標記。該標記包含13個片段，分子量由小到大為100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、1500 bp、2000 bp、3000 bp、4000 bp、5000 bp、6000 bp、8000 bp、10000 bp。

【0061】 實施例1 基因破壞株之製作(同源重組)

於LB培養基(1% Bacto(商標)胰化蛋白、0.5% Bacto(商標)酵母萃取物、0.5%氯化鈉)中於30℃下對伯克霍爾德氏菌(寄存編號：NITE BP-02704)進行振盪培養，使其增殖至靜止期，將藉此所得之菌液500 μL分別添加於10 mL之LB培養基中，於30℃下培養12小時。

【0062】 培養後，藉由離心分離(3,000 g，10分鐘，室溫)而對菌進行回收，藉由DNeasy(註冊商標)血液與組織套組(Blood & Tissue Kit)(QIAGEN公司製造)提取全DNA。

【0063】 將所得之伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板，使用序列編號17及18之合成寡去氧核糖核苷酸引子(以下簡寫為引子)，藉由聚合酶鏈反應法(以下簡寫為PCR：Saiki et al., Science、239 487-491(1988))進行DNA之擴增。再者，所使用之PCR用酶係KOD FX Neo(Toyobo公司製造)。其結果，獲得包含序列編號19之DNA。將藉由PCR反應擴增之該等DNA片段用於瓊脂糖凝膠電泳，自凝膠中切出，使用QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司製造)進行純化。

【0064】 又，將pK18mobsacB(SCHAFFER et al., Gene、145(1) 69-73(1994))作為模板，同樣地使用序列編號20及序列編號21之引子，藉由PCR進行DNA之擴增。其結果，獲得包含約4.1 kb之DNA。對藉由PCR反應擴增之DNA片段同樣地藉由瓊脂糖凝膠電泳進行純化。

【0065】 使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(TaKaRa公司製造)，將包含序列編號19與約4.1 kb之分別完成純化之DNA片段連結，轉形為大腸桿菌DH5 α 後，塗佈於包含50 μ g/mL之康黴素之LB瓊脂培養基。於30°C下培養24小時後，將所得之菌落於包含50 μ g/mL之康黴素之LB培養基中繼代培養，於37°C下培養12小時後，使用QIAprep質體小提套組(Spin Miniprep Kit)(QIAGEN公司製造)自培養液提取質體，獲得破壞株製作用之pK18mobsacB-P0205(圖1)。

【0066】 將伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板，使用序列編號22與序列編號23、序列編號24與序列編號25、序列編號26與序列編號27、序

列編號28與序列編號29、序列編號30與序列編號31、序列編號32與序列編號33之引子，藉由PCR進行DNA之擴增。對藉由PCR反應擴增之DNA片段同樣地藉由瓊脂糖凝膠電泳進行純化，獲得各DNA序列。分別設為BSFP_068720A、BSFP_068720B、BSFP_068730A、BSFP_068730B、BSFP_068740A、BSFP_068740B。

【0067】藉由EcoRI及HindIII(Takara Bio公司製造)對pK18mobsacB-P0205進行切割，並藉由瓊脂糖凝膠電泳進行純化。使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)，將3個片段即所得之pK18mobsacB-P0205片段、BSFP_068720A及BSFP_068720B連結，轉形為大腸桿菌DH5 α 。同樣地，使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)，將3個片段即pK18mobsacB-P0205片段、BSFP_068730A及BSFP_068730B、以及3個片段即pK18mobsacB-P0205片段、BSFP_068740A及BSFP_068740B亦連結，轉形為大腸桿菌DH5 α 。將所得之包含3個轉形體之大腸桿菌塗佈於包含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之LB瓊脂培養基。於30 $^{\circ}\text{C}$ 下培養24小時後，將所得之菌落於包含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之LB培養基中繼代培養，於37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養12小時後，自培養液提取質體，獲得作為破壞用載體之pK18mobsacB-P0205-BSFP_068720、pK18mobsacB-P0205-BSFP_068730、pK18mobsacB-P0205-BSFP_068740。

【0068】將所得之各載體轉形為大腸桿菌DH5 α ，獲得DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068720)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068730)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068740)。將作為輔助質體之pRK2013(ATCC37159)轉形為大腸桿菌HB101，獲得

HB101(pRK2013)。

【0069】 將伯克霍爾德氏菌接種於5 mL之LB培養基，於30°C下培養12小時，獲得伯克霍爾德氏菌培養液。又，將DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068720)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068730)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068740)、HB101(pRK2013)接種於包含20 μ g/mL之康黴素之10 mL之LB培養基，於37°C下培養12小時，獲得各大腸桿菌培養液。

【0070】 對伯克霍爾德氏菌培養液1.5 mL進行離心分離(15,000 g，1分鐘，4°C)，獲得伯克霍爾德氏菌菌體。

【0071】 又，對DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068720)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068730)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068740)、HB101(pRK2013)培養液2 mL進行離心分離(15,000 g，1分鐘，4°C)，去除上清液，添加2 mL之LB培養基使其懸浮，再次對菌體進行離心分離(15,000 g，1分鐘，4°C)，獲得DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068720)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068730)、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068740)、HB101(pRK2013)菌體。

【0072】 使伯克霍爾德氏菌菌體、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068720)菌體、HB101(pRK2013)菌體於100 μ L之LB培養基中懸浮並混合，塗佈於LB瓊脂培養基。同樣地，使伯克霍爾德氏菌菌體、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068730)菌體、HB101(pRK2013)菌體懸浮，使伯克霍爾德氏菌菌體、DH5 α (pK18mobsacB-P0205-BSFP_068740)菌體、HB101(pRK2013)菌體懸浮，分別塗佈於LB瓊脂培

養基。將各瓊脂培養基於30°C下培養一晚。

【0073】 過一晚後，使用細胞鋪展器刮取各生長之菌體，使其懸浮於1 mL之10 mM硫酸鎂溶液。將懸浮液稀釋10倍，將稀釋液100 µL接種於包含200 µg/mL之康黴素及50 µg/mL之安比西林之營養肉汁(Becton, Dickinson and Company公司製造)瓊脂培養基，於30°C下培養2日，獲得BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740破壞用一次重組體。

【0074】 繼而，將各一次重組體接種於5 mL之LB培養基，於30°C下培養12小時。將所得之培養液使用LB培養基稀釋 $10^3 \sim 10^5$ 倍，接種於包含0.33% Bacto(商標)胰化蛋白、0.17% Bacto(商標)酵母萃取物、0.5%氯化鈉、10%蔗糖、1.5%瓊脂之瓊脂培養基，於30°C下培養2日。

【0075】 將所得之菌落接種於營養肉汁瓊脂培養基及包含200 µg/mL之康黴素之營養肉汁瓊脂培養基，選擇失去耐康黴素性之菌落，對於源自BSFP_068720一次重組之菌落使用序列編號34及序列編號35所記載之引子，對於源自BSFP_068730一次重組之菌落使用序列編號36及序列編號37所記載之引子，對於源自BSFP_068740一次重組之菌落使用序列編號38及序列編號39所記載之引子，實施PCR，並實施瓊脂糖凝膠電泳，長度與野生株相比變短(圖2)，由此，確認各基因變短，無法發揮功能。將該等株分別設為BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株。

【0076】 實施例2 基因破壞株之製作(變異誘導)

將伯克霍爾德氏菌接種於100 mL之LB培養基，於28°C下培養20小時。對培養液30 mL進行離心分離，去除上清液，獲得菌體。於菌體中添加30 mL之0.85%氯化鈉水溶液，使其懸浮。於懸浮之菌體9.5 mL中添加

0.5 mL三羥甲基胺基甲烷-馬來酸緩衝液(2 M三羥甲基胺基甲烷、2 M馬來酸，pH值6.2)後，添加50 mg/mL之1-甲基-3-硝基-1-亞硝基胍、1 mL之N,N-二甲基甲醯胺，於28°C下以200 rpm振盪60分鐘。振盪後，進行離心分離，去除上清液，於所得之菌體中添加10 mL之0.85%氯化鈉水溶液，使其懸浮。同樣地進行離心分離，去除上清液，於所得之菌體中添加10 mL之0.85%氯化鈉水溶液，使其懸浮，再次進行離心分離，獲得菌體。於菌體中添加10 mL之LB培養基，於28°C下以200 rpm振盪培養2小時。改變稀釋濃度以各100 µL接種於LB瓊脂培養基，於28°C下培養48小時。

【0077】使所得之菌落懸浮於20 µL之QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)之P1緩衝液，添加20 µL之P2緩衝液。將所得之溶液作為模板，使用序列編號40及41之引子，藉由PCR進行DNA之擴增。再者，所使用之PCR用酶係KOD FX Neo(Toyobo公司製造)。對於將未藉由該等引子組擴增之株於LB培養基中於30°C下振盪培養使其增殖至靜止期所得之菌液500 µL，將其添加於10 mL之LB培養基，於30°C下培養12小時。培養後，藉由離心分離回收菌體，藉由500 µL三羥甲基胺基甲烷-EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid，乙二胺四乙酸)(Tris- EDTA，TE)緩衝液進行再懸浮，添加50 µL蛋白酶K(20 mg/mL)及25 µL之10%SDS(Sodium dodecyl sulfonate，十二烷基磺酸鈉)，於55°C下培育30分鐘。反應後，添加600 µL苯酚、氯仿、異戊醇混合溶液(50：49：1)，攪拌後，進行離心分離。將所得之上清液移至其他管，藉由苯酚、氯仿、異戊醇混合液進行再提取後，於所得之上清液中添加50 µL之3 M乙酸鈉及350 µL異丙醇，使DNA沈澱，回收DNA，對於回收之DNA，藉由500 µL

之70%乙醇洗淨2次。將DNA於室溫下風乾10分鐘，使其溶解於200 μ L之去離子水。對於所得之DNA，按照TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit(Illumina公司製造)之標準操作說明(350 bp Insert)進行序列庫製備。繼而，使用下一代定序儀HiSeq，於雙端(Paired end)、100鹼基/讀取進行DNAseq。確認輸出之讀取序列不包含染色體3。將進行DNAseq之該株作為染色體3缺失株。

【0078】 實施例3 膽固醇酯酶表現載體之製作

藉由以下記載之方法，製作日本專利特開2019-205402號公報(前述)中記載之膽固醇酯酶表現載體。將實施例1中所得之伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板，使用序列編號42與序列編號43、序列編號44與序列編號45、序列編號46與序列編號47之引子，藉由PCR進行DNA之擴增。其結果，獲得2種終止子(序列編號48及49)、多選殖位點(BglIII、NheI、SnaBI、SacI、KpnI、SpeI、BamHI、XbaI、NdeI)片段(序列編號50)。同樣地，將pBBR122質體(MoBiTec公司製造)作為模板，使用序列編號51、52之引子，進行DNA之擴增。將藉由PCR反應擴增之該等DNA片段用於瓊脂糖凝膠電泳，自凝膠中切出，使用QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司製造)進行純化。使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)，將完成純化之DNA片段連結，轉形為大腸桿菌DH5 α 後，塗佈於包含50 μ g/mL之康黴素之LB瓊脂培養基。於30 $^{\circ}$ C下培養24小時後，將所得之菌落於包含50 μ g/mL之康黴素之LB培養基中繼代培養，於37 $^{\circ}$ C下培養12小時後，使用QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)自培養液提取質體，獲得pBBR122-T-MCS-T。

【0079】 將實施例1中所得之伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板，

使用序列表中之序列編號53與54、55與56之引子，藉由PCR進行DNA之擴增。其結果，獲得編碼膽固醇酯酶及其伴侶之基因之DNA片段、及啟動子區域之DNA片段。將所得之DNA片段用於瓊脂糖凝膠電泳，自凝膠中切出，使用QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司製造)進行純化。將pBBR122-T-MCS-T作為模板，使用序列表中之序列編號57、58之引子，進行DNA之擴增，對表現載體之DNA片段進行擴增。使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)，將包含所得之表現載體DNA片段、之前獲得之編碼膽固醇酯酶及其伴侶之基因之DNA片段、及啟動子區域之DNA片段之純化DNA連結。將連結之DNA轉形為大腸桿菌DH5 α 後，塗佈於包含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之LB瓊脂培養基。於30 $^{\circ}\text{C}$ 下培養24小時後，將所得之菌落於包含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之LB培養基中繼代培養，於37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養12小時後，使用QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)自培養液提取質體，獲得pBBR122-182(圖3)。

【0080】 實施例4 重組體之製作

將伯克霍爾德氏菌野生株及實施例1、實施例2中所得之BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株分別於LB培養基100 mL中於30 $^{\circ}\text{C}$ 下進行振盪培養直至對數增殖期後，藉由離心分離回收菌體。於回收之菌體中添加100 mL冰浴冷卻殺菌水，使其懸浮後，再次進行離心分離，回收菌體。再次重複該操作後，於回收之菌體中添加5 mL冷卻10%甘油溶液，使其充分懸浮，藉由離心分離回收菌體。

【0081】 於回收之菌體中添加5 mL冰浴冷卻10%甘油溶液，使其懸浮，按各40 μL 分注，於-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷凍，獲得野生株、BSFP_068720破壞

株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株各者之勝任細胞。將所得之勝任細胞於冰上融解，將pBBR122及實施例3中所得之pBBR122-182分別各添加約200~400 ng，並混合。將該混合液移至0.2 cm寬電穿孔比色管(Bio-Rad公司製造)，使用基因導入裝置基因脈衝儀II，以電場強度12.5 kV/cm、電容25 μ F、外部電阻200 Ω 分別施加電氣脈衝。將經電氣脈衝處理之菌體及DNA之混合液混合於1 mL之LB培養基中，於30°C下培養1小時後，將200 μ L菌液塗佈於包含50 μ g/mL之康黴素之LB培養基，於30°C下培養1日，獲得作為各表現載體之轉形體之野生株-pBBR122、野生株-pBBR122-182、BSFP_068720破壞株-pBBR122、BSFP_068720破壞株-pBBR122-182、BSFP_068730破壞株-pBBR122、BSFP_068730破壞株-pBBR122-182、BSFP_068740破壞株-pBBR122、BSFP_068740破壞株-pBBR122-182、染色體3缺失株-pBBR122、染色體3缺失株-pBBR122-182。

【0082】 實施例5 質體之拷貝數之確認

將實施例4中所得之作為轉形體之野生株-pBBR122、BSFP_068720破壞株-pBBR122、BSFP_068730破壞株-pBBR122、BSFP_068740破壞株-pBBR122、染色體3缺失株-pBBR122接種於包含100 μ g/mL康黴素之5 mL之LB培養基，於28°C下培養12小時。將該菌液以菌體濁度OD=0.2之方式添加於包含100 μ g/mL康黴素之5 mL之LB培養基，於28°C下培養24小時及48小時，分別獲得培養時間不同之菌體。分別藉由離心分離(3,000 g，10分鐘，室溫)回收培養24小時之菌體及培養48小時之菌體。

【0083】 對於培養24小時之菌體，使用QIAamp DNA迷你套組(QIAGEN公司製造)提取全DNA。

【0084】 為了確認質體之拷貝數，對於所得之各全DNA，藉由Choi KH et.al., Appl. Environ. Microbiol., 74(4) 1064-75 (2008)中記載之方法實施即時PCR。即，使用序列編號59及序列編號60之引子組，對作為染色體上之基因的天冬胺酸半醛去氫酶 (aspartate-semialdehyde dehydrogenase)基因進行擴增。將所得之DNA片段用於瓊脂糖凝膠電泳，自凝膠中切出，使用QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司製造)進行純化，獲得DNA片段。使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)，將該DNA片段與藉由SmaI(Takara Bio公司製造)切割pBBR122所得之DNA片段連結。將連結之DNA轉形為大腸桿菌DH5 α 後，塗佈於包含50 μ g/mL氯黴素之LB瓊脂培養基。於30 $^{\circ}$ C下培養24小時後，將所得之菌落於包含50 μ g/mL氯黴素之LB培養基中繼代培養，於37 $^{\circ}$ C下培養12小時後，使用QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)自培養液提取質體，獲得pBBR122-asd。按照LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I(Roche公司製造)之操作說明，將全DNA、pBBR122-asd、各引子組(用於算出染色體之拷貝數之序列編號61及序列編號62之引子組，用於算出質體之拷貝數之序列編號63及序列編號64之引子組)混合，製備樣品，使用LightCycler 480(Roche公司製造)，實施即時PCR。關於PCR條件，於改性95 $^{\circ}$ C、10秒、退火60 $^{\circ}$ C、30秒、延伸72 $^{\circ}$ C、1秒之條件下實施。對於各基因，輸出藉由二次求導法(2nd Derivative Maximum)算出之Cp值。使用pBBR122-asd之Cp值繪製校準曲線，算出各株之質體之拷貝數(圖4)。其結果，野生株中之pBBR122約為30個拷貝，但BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株中之pBBR122約為300~400個拷貝。由此表明，藉由使

BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者喪失功能，質體之拷貝數增加。

【0085】 對於培養48小時之菌體，使用QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)提取質體。將所得之質體藉由XhoI(Takara Bio公司製造)切割，進行瓊脂糖凝膠電泳(圖5)。其結果，可見源自質體之單一訊息，與於野生株-pBBR122中相比，訊息於BSFP_068720破壞株-pBBR122、BSFP_068730破壞株-pBBR122、BSFP_068740破壞株-pBBR122、染色體3缺失株-pBBR122中較強。

【0086】 以上結果表明，與向野生株導入pBBR122所得之株相比，向BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740分別被破壞之株導入pBBR122所得之株之利用瓊脂糖電泳所得之訊息較強，又，即時PCR結果表明，質體之拷貝數較多。又，表明與向野生株導入pBBR122所得之株相比，於向使包含BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之染色體3缺失而成之株導入pBBR122所得之株中，質體之拷貝數亦較多。此亦表明，藉由使BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者喪失功能，質體之拷貝數增加。

【0087】 實施例6 質體之穩定性之確認

將實施例4中所得之作為轉形體之野生株-pBBR122-182、BSFP_068720破壞株-pBBR122-182、BSFP_068730破壞株-pBBR122-182、BSFP_068740破壞株-pBBR122-182、染色體3缺失株-pBBR122-182接種於5 mL之LB培養基，於28°C下培養24小時。將24小時後之培養液作為第一代，將第一代培養液2 μL接種於5 mL新LB培養基，於28°C下培養24小時。將所得之培養液作為第二代，將第二代培養液2 μL接種於5

mL新LB培養基，於28°C下培養24小時。將所得之培養液作為第三代。將第一代培養液、第三代培養液分別藉由LB培養基稀釋 10^7 倍，接種於LB瓊脂培養基及包含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 康黴素之LB瓊脂培養基。於30°C下培養2日，測量生長之菌落數，作為菌落形成單元(CFU)。於LB瓊脂培養基中生長之菌落表示總菌數，於包含康黴素之LB培養基中生長之菌落表示攜帶質體之菌數，由此，由下述式計算質體攜帶率。

【0088】 (式)質體攜帶率(%) = 包含康黴素之LB瓊脂培養基中之CFU/LB瓊脂培養基中之CFU $\times 100$

【0089】 [表1]

	第一代			第三代		
	Km(-)	Km(+)	質體攜帶率(%)	Km(-)	Km(+)	質體攜帶率(%)
野生株-pBBR122-182	145	0	0	138	0	0
$\Delta\text{BSFP}_{068720}$ -pBBR122-182	92	111	121	91	89	98
$\Delta\text{BSFP}_{068730}$ -pBBR122-182	103	81	79	90	85	94
$\Delta\text{BSFP}_{068740}$ -pBBR122-182	88	97	110	104	76	73
染色體3缺失株-pBBR122-182	100	90	90	88	82	93

【0090】 表中之數值表示稀釋 10^7 倍之培養液之CFU。又，表中之Km(-)表示LB瓊脂培養基中之CFU，Km(+)表示包含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 康黴素之LB瓊脂培養基中之CFU。

【0091】 如表1所示，於野生株中加入表現載體之株之情形時，若於不包含康黴素之LB液體培養基中培養一次，則質體脫落。另一方面，於BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之任一者被破壞之株、或者使包含該等3個基因之染色體3缺失而成之株之情形時，即便於不包含康黴素之LB培養基中繼代三次，質體亦不易脫落。以上結果表明，藉由使BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者喪失功能，於菌體內穩定地攜帶質體。

【0092】 實施例7 膽固醇酯酶生產性之確認

將實施例4中所得之轉形體中之野生株 -pBBR122-182、BSFP_068720破壞株 -pBBR122-182、BSFP_068730破壞株 -pBBR122-182、BSFP_068740破壞株 -pBBR122-182、染色體3缺失株 -pBBR122-182分別接種於包含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 康黴素之5 mL之YSO培養基(3%酵母萃取物、3%山梨醇、3%油酸甲酯，pH值7.0)，於28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養72小時。培養後，使用以下酵素活性測定法，對各株生產之膽固醇酯酶之量進行評價。

【0093】 < 酵素活性測定法 >

製備以如下所述之濃度含有下述試劑之反應試劑。

[反應試劑]

40 mM 磷酸鉀緩衝液(pH值6.8)

0.02% TODB(N,N-Bis(4-sulfobutyl)-3-methylaniline, disodium salt, N,N-雙(4-磺丁基)-3-甲基苯胺二鈉鹽)(同仁化學研究所)

10 U/mL 過氧化酶

0.3% Triton X-100

2.5 U/mL 膽固醇氧化酶

10% 胎牛血清液

0.035% 4-胺基安替比林

【0094】 將反應試劑於37 $^{\circ}\text{C}$ 下預加溫10分鐘，使用日立7080自動分析裝置(日立製作所(股)製造)，於150 μL 反應試劑中添加3 μL 重組型膽固醇酯酶溶液，於37 $^{\circ}\text{C}$ 下進行反應。對添加後76.69秒至119.53秒之主波長546 nm、副波長660 nm時之吸光度進行測定，獲得每單位時間之吸光度變化量($\Delta A/\text{min}$)。將由下述式所得之值定義為膽固醇酯酶活性，算出膽

固醇酯酶活性。

【0095】 (式)

$$\text{膽固醇酯酶活性(U/mL)} = \Delta A/\text{min} \div 18 \times (150 + 3) \div 3 \div 1000$$

{式中， $\Delta A/\text{min}$ 表示對添加上述反應試劑後76.69秒至119.53秒之主波長546 nm、副波長660 nm時之吸光度進行測定所得之每單位時間之吸光度變化量。18意指TODB與4-胺基安替比林之氧化縮合反應物之550 nm時之毫莫耳分子吸光係數，150+3意指反應總體積(反應試劑之體積+重組型脂肪酶溶液之體積)，3意指上述重組型膽固醇酯酶溶液之體積}

【0096】 分別獨立培養3次，對各株生產之膽固醇酯酶之活性進行測定(圖6)。

【0097】 如圖6所示，表明與向野生株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株相比，於向BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740分別被破壞之株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株中，膽固醇酯酶活性較高，膽固醇酯酶生產量提高。又，與向野生株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株相比，於向使包含BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之染色體3缺失而成之株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株中，膽固醇酯酶活性亦較高，膽固醇酯酶生產量亦提高。由此可知，若BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者受到破壞而喪失功能，則即便除上述3個基因以外之基因受到破壞而喪失功能，膽固醇酯酶生產量亦提高。認為藉由於實施例5及實施例6中質體之拷貝數增加，穩定性增加，從而膽固醇酯酶生產量提高。

【0098】 實施例8 其他質體之情形時之效果之確認

為了確認除pBBR122以外之質體之情形時之BSFP_068720、

BSFP_068730、BSFP_068740破壞之效果，使用具有與pBBR122不同之複製起點之質體 pSa(Datta, American society for Microbiology, Washington, DC, pp9-15(1975)、Gorai et al., Plasmid 2 489-492 (1979)、Ward and Grinsted, Plasmid 7 239-250 (1982)、Tait et al., Mol. Gen. Genet. 186 10-15(1982))，確認質體之穩定性。藉由基因全合成製作包含pSa之起點(origin)且包含與pBBR122相同之耐康黴素性基因及耐氯黴素性基因之區域，獲得序列編號65所表示之pSa質體。

【0099】與實施例4同樣地，藉由電穿孔法將pSa質體導入至野生株、BSFP_068720破壞株、BSFP_068730破壞株、BSFP_068740破壞株、染色體3缺失株各者之勝任細胞，獲得作為轉形體之野生株-pSa、BSFP_068720破壞株-pSa、BSFP_068730破壞株-pSa、BSFP_068740破壞株-pSa、染色體3缺失株-pSa。

【0100】將該等轉形體接種於包含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 康黴素之5 mL之LB培養基，於28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養12小時。將該菌液以菌體濁度 $\text{OD} = 0.2$ 之方式添加於包含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 康黴素之5 mL之LB培養基，於28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養24小時及48小時，分別獲得培養時間不同之菌體。對於培養24小時及48小時之菌體，使用QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)提取質體。將所得之質體藉由XhoI(Takara Bio公司製造)切割，進行瓊脂糖凝膠電泳(圖7)。其結果，於野生株-pSa中未見源自質體之訊息，但於BSFP_068720破壞株-pSa、BSFP_068730破壞株-pSa、BSFP_068740破壞株-pSa、染色體3缺失株-pSa中可見源自質體之單一訊息。

【0101】以上結果表明，與向野生株導入pSa所得之株相比，向BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740分別被破壞之株導入pSa

所得之株之利用瓊脂糖電泳之訊息較強。又，表明與向野生株導入pSa所得之株相比，於向使包含BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之染色體3缺失而成之株導入pSa所得之株中，質體之拷貝數亦較多。由此表明，不僅於pBBR122中，於pSa質體中亦是藉由使BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者喪失功能，質體之拷貝數增加。

【0102】 又，為了進而確認其他質體之情形時之效果，使用具有與pBBR122不同之複製起點即RK2ori之質體(T. J. Schmidhauser et al., *Plasmid*. 9(3) 325-30(1983))，確認膽固醇酯酶活性。對具有RK2ori之質體所需之區域即包含RK2ori、trpA之區域、及包含pBBR122之耐康黴素性基因之區域、182啟動子、膽固醇酯酶及其摺疊酶、及終止子區域進行基因全合成，獲得序列編號66所表示之pRK2-182質體。與實施例4同樣地轉形為各破壞株，與實施例7同樣地確認於28℃下培養72小時後之膽固醇酯酶活性。如圖8所示，表明與向野生株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株相比，於向BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740分別被破壞之株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株中，膽固醇酯酶活性較高，膽固醇酯酶生產量提高。又，與向野生株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株相比，於向使包含BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之染色體3缺失而成之株導入膽固醇酯酶表現載體所得之株中，膽固醇酯酶活性較高，膽固醇酯酶生產量提高。由此可知，若BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者受到破壞而喪失功能，則即便除上述3個基因以外之基因受到破壞而喪失功能，膽固醇酯酶生產量亦提高。由此表明，不僅於pBBR122中，於pRK2質體中亦是藉由使

BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者喪失功能，膽固醇酯酶生產性提高。

【0103】 以上結果表明，於作為除pBBR122以外之質體之pSa、pRK2中，亦可見相同之拷貝數增加，藉此膽固醇酯酶生產性提高。

【0104】 實施例9 其他蛋白質表現之效果之確認

為了確認除膽固醇酯酶以外之蛋白質表現中之BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740破壞之效果，對序列編號67所表示之包含源自植物伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia plantarii*)(ATCC43733)之脂肪酶基因及其伴侶基因之DNA序列進行全合成。將全合成基因作為模板，使用序列編號68及序列編號69所表示之引子，進行PCR，藉由瓊脂糖凝膠電泳切出擴增片段，使用QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司製造)進行純化，獲得BpLip(*Burkholderia plantarii*之脂肪酶)片段。將pBBR122-182作為模板，使用序列編號70及序列編號71所表示之引子，進行PCR，同樣地進行瓊脂糖凝膠電泳、使用QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司製造)之純化。使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)，將所得之序列及BpLip片段連結，轉形為大腸桿菌DH5 α 後，塗佈於包含50 μ g/mL之康黴素之LB瓊脂培養基。於30 $^{\circ}$ C下培養24小時後，將所得之菌落於包含50 μ g/mL之康黴素之LB培養基中繼代培養，於37 $^{\circ}$ C下培養12小時後，使用QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)自培養液提取質體，獲得pBBR122-BpLip。

【0105】 又，對序列編號72所表示之包含源自洋蔥伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia cepacia*)之脂肪酶基因之DNA序列進行全合成。將全合成基因作為模板，使用序列編號73及序列編號74所表示之引子，進行PCR，

藉由瓊脂糖凝膠電泳切出擴增片段，使用 QIA 快速凝膠提取套組 (QIAGEN 公司製造) 進行純化，獲得 BcLip (*Burkholderia cepacia* 之脂肪酶) 片段。將 pBBR122-182 作為模板，使用序列編號 70 及序列編號 75 所表示之引子，進行 PCR，同樣地進行瓊脂糖凝膠電泳、使用 QIA 快速凝膠提取套組 (QIAGEN 公司製造) 之純化。使用 In-Fusion (註冊商標) HD 選殖套組 (Takara Bio 公司製造)，將所得之序列及 BcLip 片段連結，轉形為大腸桿菌 DH5 α 後，塗佈於包含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之 LB 瓊脂培養基。於 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 24 小時後，將所得之菌落於包含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之 LB 培養基中繼代培養，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 12 小時後，使用 QIAprep 質體小提套組 (QIAGEN 公司製造) 自培養液提取質體，獲得 pBBR122-BcLip。

【0106】與實施例 4 同樣地，藉由電穿孔法將 pBBR122-BpLip 或 pBBR122-BcLip 導入至野生株及染色體 3 缺失株各者之勝任細胞，獲得作為轉形體之野生株-pBBR122-BpLip、染色體 3 缺失株-pBBR122-BpLip、野生株-pBBR122-BcLip、染色體 3 缺失株-pBBR122-BcLip。將各轉形體接種於包含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 康黴素之 5 mL 之 YS 培養基 (3% 酵母萃取物、3% 山梨醇，pH 值 7.0)，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 72 小時。培養後，使用 T. Yamaguchi et al., Agr. Biol. Chem. 37 (1973) 中記載之酵素活性測定法，對各株生產之脂肪酶之量進行評價，測定各株生產之脂肪酶之活性 (圖 9、圖 10)。

【0107】如圖 9、圖 10 所示，與向野生株導入包含源自植物伯克霍爾德氏菌之脂肪酶、或源自洋蔥伯克霍爾德氏菌之脂肪酶之表現載體所得之株相比，於向使包含 BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 之染色體 3 缺失而成之株導入該表現載體所得之株中，脂肪酶活性較高，脂肪酶之生產量提高。由此可知，若 BSFP_068720、BSFP_068730、

BSFP_068740之至少一者受到破壞而喪失功能，則即便除上述3個基因以外之基因受到破壞而喪失功能，脂肪酶生產量亦提高。以上結果表明，藉由使BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之至少一者喪失功能，導入至表現載體之目標蛋白質之生產量提高。

【0108】 實施例10 使用新啟動子之表現載體之製作

將實施例1中所得之伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板，使用序列表中之序列編號76與77、78與79之引子，藉由PCR進行DNA之擴增。其結果，分別獲得作為啟動子區域之DNA片段之14020啟動子DNA片段及48230啟動子DNA片段。將所得之DNA片段用於瓊脂糖凝膠電泳，自凝膠中切出，使用QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司製造)進行純化。將pBBR122-182作為模板，使用序列編號80及81之引子，進行DNA之擴增，對表現載體之DNA片段進行擴增。使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)，將所得之表現載體DNA片段與14020啟動子DNA片段、表現載體DNA片段與48230啟動子DNA片段分別連結。將連結之各DNA轉形為大腸桿菌DH5 α 後，塗佈於包含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之LB瓊脂培養基。於30 $^{\circ}\text{C}$ 下培養24小時後，將所得之菌落於包含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之康黴素之LB培養基中繼代培養，於37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養12小時後，使用QIAprep質體小提套組(QIAGEN公司製造)自培養液提取質體，分別獲得膽固醇酯酶基因之上游之啟動子替換成新啟動子之表現載體即pBBR122-14020及pBBR122-48230。

【0109】 實施例11 藉由新啟動子生產之膽固醇酯酶活性之確認

將實施例4中製作之染色體3缺失株之勝任細胞於冰上融解，將實施例10中所得之pBBR122-14020或pBBR122-48230分別各添加約200~400

ng，並混合。將該混合液移至0.2 cm寬電穿孔比色管(Bio-Rad公司製造)，使用基因導入裝置基因脈衝儀II，以電場強度12.5 kV/cm、電容25 μ F、外部電阻200 Ω 分別施加電氣脈衝。將經電氣脈衝處理之菌體及DNA之混合液混合於1 mL之LB培養基中，於30°C下培養1小時後，將200 μ L菌液塗佈於包含50 μ g/mL之康黴素之LB培養基，於30°C下培養1日，獲得作為轉形體之染色體3缺失株-pBBR122-14020、染色體3缺失株-pBBR122-48230。

【0110】將該等轉形體及實施例4中所得之染色體3缺失株-pBBR122-182分別接種於包含100 μ g/mL之康黴素之5 mL培養基(4%酵母萃取物、1.5%山梨醇、1.5%甘油、5%油酸甲酯，pH值6.5)，於28°C下培養72小時。培養後，使用實施例7中記載之酵素活性測定法，對各株生產之膽固醇酯酶之量進行評價。

【0111】 [表2]

	膽固醇酯酶活性(U/mL)
染色體3缺失株-pBBR122-182	111.0
染色體3缺失株-pBBR122-14020	146.4
染色體3缺失株-pBBR122-48230	145.2

【0112】如表2所示，使用14020啟動子、48230啟動子作為啟動子之轉形體之膽固醇酯酶生產量高於使用日本專利特開2019-205402號公報(前述)中記載之膽固醇酯酶表現載體即pBBR122-182作為啟動子之轉形體。由此表明，14020啟動子、48230啟動子對目標蛋白質表現非常有用。

【0113】 實施例12 由新啟動子之長度之不同引起之表現量之確認

藉由以下方法製作新啟動子之長度縮短之表現載體。將實施例1中所得之伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板，與實施例10同樣地使用序列編

號82與77、83與77、84與77、85與77、86與77、87與77、88與77、89與77、90與77、91與77、92與77、93與77、94與77、95與77、96與77、97與77之引子組，進行利用PCR之DNA擴增、瓊脂糖電泳、及自凝膠之提取，獲得DNA片段。將各DNA片段設為14020-250、14020-200、14020-150、14020-100、14020-90、14020-80、14020-70、14020-60、14020-50、48230-250、48230-200、48230-150、48230-140、48230-130、48230-120、48230-110。各者表示「啟動子名稱-啟動子之長度」，例如14020-250係用於製作14020啟動子之長度設為250 bp者之DNA片段。

【0114】 與實施例10同樣地操作，將各DNA片段即14020-250、14020-200、14020-150、14020-100、14020-90、14020-80、14020-70、14020-60、14020-50、48230-250、48230-200、48230-150、48230-140、48230-130、48230-120、48230-110、及實施例10中製作之pBBR122-182作為模板，使用序列編號80及81之引子，進行DNA擴增，使用In-Fusion(註冊商標)HD選殖套組(Takara Bio公司製造)將藉此所得之表現載體之DNA片段連結，與實施例10同樣地進行向大腸桿菌之轉形、培養、質體之提取，獲得作為表現載體之pBBR122-14020-250、pBBR122-14020-200、pBBR122-14020-150、pBBR122-14020-100、pBBR122-14020-90、pBBR122-14020-80、pBBR122-14020-70、pBBR122-14020-60、pBBR122-14020-50、pBBR122-48230-250、pBBR122-48230-200、pBBR122-48230-150、pBBR122-48230-140、pBBR122-48230-130、pBBR122-48230-120、pBBR122-48230-110。

【0115】 與實施例11同樣地將該等表現載體轉形為染色體3缺失株之勝任細胞，獲得各啟動子長度縮短之轉形體即染色體3缺失株-

pBBR122-14020-250、染色體3缺失株-pBBR122-14020-200、染色體3缺失株-pBBR122-14020-150、染色體3缺失株-pBBR122-14020-100、染色體3缺失株-pBBR122-14020-90、染色體3缺失株-pBBR122-14020-80、染色體3缺失株-pBBR122-14020-70、染色體3缺失株-pBBR122-14020-60、染色體3缺失株-pBBR122-14020-50、染色體3缺失株-pBBR122-48230-250、染色體3缺失株-pBBR122-48230-200、染色體3缺失株-pBBR122-48230-150、染色體3缺失株-pBBR122-48230-140、染色體3缺失株-pBBR122-48230-130、染色體3缺失株-pBBR122-48230-120、染色體3缺失株-pBBR122-48230-110。藉由與實施例11相同之方法，分別對該等轉形體、實施例10中所得之染色體3缺失株-pBBR122-14020、染色體3缺失株-pBBR122-48230進行培養，使用實施例7中記載之酵素活性測定法，對各株生產之膽固醇酯酶之量進行評價。對於14020啟動子，使用下述式求出針對300 bp長之啟動子之相對膽固醇酯酶活性(圖11)。

【0116】 (式)(上述轉形體生產之膽固醇酯酶活性)÷(染色體3缺失株-pBBR122-14020生產之膽固醇酯酶活性)×100

【0117】 同樣地，對於48230啟動子，使用下式求出針對300 bp長之啟動子之相對膽固醇酯酶活性。

【0118】 (式)(上述轉形體生產之膽固醇酯酶活性)÷(染色體3缺失株-pBBR122-48230生產之膽固醇酯酶活性)×100

【0119】 如圖11所示，14020啟動子及48230啟動子即便短於300 bp，亦可生產膽固醇酯酶。

【0120】 實施例13 其他伯克氏菌屬細菌之情形時之效果之確認

為了確認本發明亦可應用於其他伯克氏菌屬細菌，對除伯克霍爾德

氏菌以外之伯克氏菌屬細菌是否攜帶BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740進行研究。與實施例1同樣地操作，自斯沃蘭提卡伯克霍爾德氏菌(NBRC106337)提取全DNA。將所得之斯沃蘭提卡伯克霍爾德氏菌之全DNA或實施例1中所得之伯克霍爾德氏菌之全DNA作為模板，使用可對包含BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之區域進行擴增之序列編號98及99之引子，藉由PCR進行DNA之擴增。將所得之DNA片段用於瓊脂糖凝膠電泳，其結果，與伯克霍爾德氏菌同樣地，於斯沃蘭提卡伯克霍爾德氏菌中亦可見DNA擴增(圖12)。根據該結果，斯沃蘭提卡伯克霍爾德氏菌攜帶BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740之同源基因，藉由將該等基因破壞，可期待高生產化或表現構建物之拷貝數之增加。

【序列表】

<110> 國立研究開發法人產業技術綜合研究所(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

日商旭化成製藥股份有限公司(Asahi Kasei Pharma Corporation)

<120> 目標蛋白質之生產方法

<130> 201027W001

<150> JP2021-025664

<151> 2021-02-19

<160> 99

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 864

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 1

```

atgacctcga ttagcaaacg tcatagccgc caaccctct tccggcggat tggcagcggg      60
accgaatttc ggacaggcac agcggacgcg atagacgacg cgcccgaggc gtacgcccc      120
gacaggaggg aggaactgct tgacgaaggg gacgatgagt cccgtcgtcc agtggactgc      180
ggccaggaga aggcgctttt cgaaggcgac tcgtcgacgc taccgtatga cgtgcgccgg      240
gcgtacgcgc tgcttcttcg cgggtccatcc attgacgaac gtcacagcaa actctggcca      300
gtcctgatcg atcatgaact gcgattgcga cagttgctac acgcggcctt cctcgatctc      360
gtcatcgatc gggagcaaaa aatcgcatth gacgccccgg tcgatgctcc ggagctcgac      420
gtgccgcaac ttctgcggga ggtccggctt actttcgttg attccgctct ggtgcttttc      480
ctgaggatgg agctgactct ggctgaggcc gaaggccgcc gtgcaacggt ttcccggtec      540
gaaatggtcg atcatctcaa agcgtatgaa gctagcgata atgttgaccg agcccccttt      600
agcaggcagg tcgaggcggc gattgaaaag gccaaagaat acaacttcc tgcctgatt      660
cgtaatagcg gagatcgctt cgaggtgtcg ccagcgcica agctgggtgtt ctcacatgag      720
cagataagcg aactgtcgcg aacctatcgg cgtatcaggg aacaggcggg cggaagacca      780

```

I853215

gcagaggtcg atggcgcggg gagttttccg ggcgtcgacg agccggacga atttgacgaa 840

gacagtgtga tggacgggga gtga 864

<210> 2

<211> 287

<212> PRT

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 2

Met Thr Ser Ile Ser Lys Arg His Ser Arg Gln Pro Ala Phe Arg Arg
1 5 10 15

Met Gly Gly Gly Thr Glu Phe Arg Thr Gly Ile Ala Asp Val Ile Asp
20 25 30

Asp Ala Pro Glu Val Ser Asp Leu Asp Gly Arg Glu Glu Leu Phe Asp
35 40 45

Glu Arg Asp Asp Glu Pro His Arg Pro Val Asp Gly Gly Gln Glu Arg
50 55 60

Ala Leu Phe Glu Gly Asp Ser Ser Thr Leu Pro Tyr Asp Val Arg Arg
65 70 75 80

Ala Tyr Ala Leu Leu Leu Arg Gly Pro Ser Ile Asp Glu Arg His Ser
85 90 95

Arg Leu Trp Pro Val Leu Ile Asp His Glu Leu Arg Leu Arg Gln Leu
100 105 110

Leu His Ala Ala Phe Leu Asp Leu Val Ile Asp Arg Glu Gln Lys Ile
115 120 125

Ala Phe Ala Arg Pro Val Tyr Ala Pro Glu Leu Asp Val Pro Gln Leu
130 135 140

Leu Arg Glu Val Arg Leu Thr Phe Val Asp Ser Ala Leu Val Leu Phe
145 150 155 160

Leu Arg Met Glu Leu Thr Leu Ala Glu Ala Glu Gly Arg Arg Ala Thr
 165 170 175

Ile Ser Arg Ser Glu Met Val Asp His Leu Lys Ala Tyr Glu Ala Ser
 180 185 190

Asp Asn Val Asp Arg Ala Arg Phe Ser Arg Gln Val Glu Ala Ala Ile
 195 200 205

Glu Lys Ala Lys Lys Tyr Asn Phe Leu Arg Leu Ile Arg Asn Ser Gly
 210 215 220

Asp Arg Phe Glu Val Ser Pro Ala Leu Lys Leu Val Phe Ser His Glu
 225 230 235 240

Gln Ile Ser Glu Leu Ser Leu Thr Tyr Arg Arg Ile Arg Glu Gln Ala
 245 250 255

Asp Gly Arg Pro Ala Val Asp Asp Gly Ala Gly Ser Met Pro Ser Val
 260 265 270

Asp Glu Pro Asp Glu Phe Asp Glu Asp Ser Val Thr Asp Gly Glu
 275 280 285

<210> 3

<211> 3450

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 3

gtggagacag cccagctatt cgaggatccg gaattgtcgc cggcagcggc ggacgagacg 60

gcgcataggg gagaggatca tcgcccgaca tggagcgatt acgatctcga agaagcgggg 120

caacagcagt tcaggctgcg gcaaatgcag gtcatgaact gggggacgtt tagcaagctc 180

cacgtattcg atatctcgcc gcgcgacac ttgctcgttg ggccgtccgg atcgggcaag 240

tcgaccattc tcgatgcgca ttcggcggtg atggcgccgc cgaattcaga gttcaatgcc 300

gcccgggg	gtaacgataa	agtcacccgc	gatcggacga	tggtcactta	tgtgcgggg	360
gcttgggcta	cgcaggaatc	ggaggaagg	atcatcgtg	cgcagtacct	gcggcctgac	420
accaccctta	gtgcagtcgc	cgaggtgtat	gcaaacgcac	aggggcagat	gctgacgctg	480
gtcggcatgt	ggtggatcaa	gggtaagtcg	acactcgcga	aggacgtgcg	acactgtttc	540
tfcgtgatcg	aacgggaatt	cagtctcaag	gaactgtcgt	tcttcatgca	ggccgactac	600
aatctgcgct	cgtttgcaaa	gcatcttccg	gaagtcaaac	ctttcgatac	gcacgcgtcc	660
ttccgtgaac	gcttcaaggc	gcgcctcgg	atcgaccacg	acctggcgtt	gcgactgctt	720
cacaggacgc	agtcgtcga	gaatctgggt	gatatcaacg	cgttcatgcg	tgacaatatg	780
ctggacgagc	cccaaacgtt	cagcctcggc	aaagcgtctt	gcgacgactt	caacacgctg	840
gcacggggcc	accaggacgt	cgtggaggcc	cgtaagcagc	gggacctgct	gaacctcgca	900
cgtttgatc	atgagctgta	tcaggagcat	cacacggagg	tcgccagggt	cgacgaactg	960
ctgaagcagc	tgaccatca	ccgcgaatat	ctgcaataca	cgttgcgtgg	caggcgtgtg	1020
gacgagttga	agattgtgct	caaagggtg	caccagagcg	tcgatgcatt	ggcccgaag	1080
gcgaacgacg	agcagaccga	actccagcga	ttgatgacgc	agcgtgccgg	catgaacgac	1140
ggcaatgtcg	caggactaca	gtcgcagttg	gccacgaagg	aaacgcaact	gaagcaggtt	1200
cgccgtgcac	gtgcacgggt	gtcagtcgtg	ctccagacgc	tcgggtggcc	tgagccgcaa	1260
gatgctggcc	atthtggcga	atgtgtcggc	cgcgctgggg	tgctgcggga	tcgtggtcag	1320
ggcgaagaag	gcgaggcaaa	ggccgaggaa	ctgcgccaga	agagatttga	ggcagagcgg	1380
caactcaagg	agctgctcgc	tgatgcggca	tcgcttgaac	agagaaaatc	gaacttgccg	1440
cgagaactgg	tcaatgtccg	tgaccagatt	gcacttgccc	tgaatctgga	tcccgttcg	1500
cttcatttcg	gcggtgaact	gctcgacata	tccgagaaat	tcaaacggtg	gcaaggtgtt	1560
cttgagcgtt	tgctggctcc	tcttaccgc	tcgtttctcg	tgccggaaga	acactatccg	1620
ggagttgtga	actggctcga	gtcaaatcat	acgggacagc	atgtgcttta	cctgcgtatg	1680
cgccgcac	agaagcgttt	cgataatggt	ccgaaggctc	cgggcaggat	gctggattcg	1740
tcggcggatg	aatacggcga	ctggctcgc	gacgagatag	ccgtgcatta	cggcgacttt	1800

gtgtgcgag aaacgactga agagtttcgc aattcgccac gcgccgtcag tctgcatggt 1860
 cagatcaagc ggggagggtgc acggcatgag aaaaatgacc gtacccgcct tgatgaacgc 1920
 cggggctggg cgattggctt ttccaacgag cagaaaaaac ttgagcttct ccatgaaatt 1980
 cacgctcagc agaagggtgga aagcgaagct agtcgggagt tagccgaact cctggtgacg 2040
 cagaacaagg aacgggagaa gctgaacgca gcggcggaat tgacgcagggt ggtctgggag 2100
 gacatcgacg acgtctcggg ggccgatgag gtgcagcgtt tgctgaacca gatagaagag 2160
 gcgcaacggt cacaccgga gatacaggaa ctcgatgggc aatcaaggc gcagggggta 2220
 aaggcgtccc aggtgggtag cgcgcatgaa accgaaaaga aaaaatacgc tgatactgaa 2280
 cagcggatca acgggttgac ccgggatctg gaaaatacac gtgacgatgt gcgtatgccg 2340
 cctgtagatg gggataagct tcagttattg tttggccacc tggacggcct gacgctggag 2400
 aacctggatc agcgacgcct gtctgcygc agcgaactga aggacagaag gaacgacgcc 2460
 gataaggctc aagcaaatga ccggagcctg cttgaggag tactccgtac gtttcagcgt 2520
 gaacataaga tggcggccgc ggatatgggg acgacgctgg acgattggcc cgactatgcc 2580
 cggctgttag ccaaaatcga ggaggacgat ctgccccgat tcgaggagcg gttttcagg 2640
 ctctcaacg agcagagcga tcgccatctg gccagactgc ggcagcgtct cgttaccgag 2700
 aaggatgaga tacgggggcy catgaatatt gtcaacgacg cactatcgca gactgagttc 2760
 aacgctggca cctatctggt tctggagaac cgccctcga cgctgccgga tgtgaccgcy 2820
 ttctggccg aactcaagaa ctgccttgag cgcaatatca aaccagatgc gaccccgaa 2880
 gagcgcgagg agcagtttaa ggcgctcaat acaatcgtcc agcggttaca cagtgacaag 2940
 ccggaggacg agcgttgaa agcactcgtc ctgcacgtac ggcaacacgt cgaatttggt 3000
 gcgaaggaat ttgatgctga tggctgtgtg cgcgacattt ttcagtccgg cgccggtaa 3060
 tctggcggac agcgacaaaa gcttgccgcy acgtgcctcg cggcggcgt gcgctatcaa 3120
 ctgcccggga cgcaaagacc gctgccgag ttttgacgg tattgatgga tgaggcgttc 3180
 gacaaagccg atagcgagtt cacggcgatg acgctgaaca tcttcaatac attcggattc 3240
 cagatgctga tggctacgcc aatgaaggca gtaagaacgc tcgaaccatt catagcggt 3300

I853215

gcacacgtct ttagcaacag gttgcgcaac agttctggag cggtagcgat cgagtacgac 3360

atggcgcatac gacggctgct cggctctcagc caccagcgat ccttagaaaa aggtaacgcc 3420

gacggtgaaa tgccgcagag cgaggactaa 3450

<210> 4

<211> 1149

<212> PRT

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 4

Met Glu Thr Ala Gln Leu Phe Glu Asp Pro Glu Leu Ser Pro Val Ala

1 5 10 15

Thr Asp Gly Ala Ala Arg Arg Glu Gly Glu Pro Arg Pro Thr Trp Ser

20 25 30

Asp Arg Asn Leu Glu Glu Ala Gly Gln Gln Gln Phe Arg Leu Arg Gln

35 40 45

Met Gln Val Met Asn Trp Gly Thr Phe Ser Lys Leu His Val Phe Asp

50 55 60

Ile Ser Pro Arg Gly His Leu Leu Val Gly Pro Ser Gly Ser Gly Lys

65 70 75 80

Ser Thr Ile Leu Asp Ala His Ser Ala Leu Met Ala Pro Pro Asn Ser

85 90 95

Glu Phe Asn Ala Ala Ala Arg Gly Asn Asp Lys Val Thr Arg Asp Arg

100 105 110

Thr Met Val Thr Tyr Val Arg Gly Ala Trp Ala Thr Gln Glu Ser Glu

115 120 125

Glu Gly Ile Ile Ala Ala Gln Tyr Leu Arg Pro Asp Thr Thr Leu Ser

130 135 140

I853215

Ala Val Ala Glu Val Tyr Ala Asn Ala Gln Gly Gln Met Leu Thr Leu
145 150 155 160

Val Gly Met Trp Trp Ile Lys Gly Lys Ser Thr Leu Ala Lys Asp Val
165 170 175

Arg His Cys Phe Phe Val Ile Glu Arg Ala Phe Ser Leu Lys Glu Leu
180 185 190

Ser Phe Phe Met Gln Ala Asp Tyr Asn Leu Arg Ser Phe Ala Lys His
195 200 205

Leu Pro Glu Val Lys Pro Phe Asp Thr His Ala Ser Phe Arg Glu Arg
210 215 220

Phe Lys Ala Arg Leu Gly Ile Asp His Asp Leu Ala Leu Arg Leu Leu
225 230 235 240

His Arg Thr Gln Ser Ser Lys Asn Leu Gly Asp Ile Asn Ala Phe Met
245 250 255

Arg Asp Asn Met Leu Asp Glu Pro Gln Thr Phe Gly Leu Ala Lys Ala
260 265 270

Leu Cys Asp Asp Phe Asn Thr Leu Ala Ala Ala His Gln Asp Val Val
275 280 285

Glu Ala Arg Glu Gln Arg Asp Leu Leu Asn Leu Ala Arg Ser His His
290 295 300

Glu Arg Tyr Arg Ala His His Ala Glu Val Ala Arg Val Asp Glu Leu
305 310 315 320

Leu Thr Gln Leu Asp His His Arg Glu Tyr Leu Gln Tyr Thr Leu Arg
325 330 335

Gly Arg Arg Val Asp Glu Leu Lys Ile Val Leu Glu Gly Leu Arg Gln
340 345 350

Ser Val Asp Ala Leu Ala Arg Lys Ala Asn Asp Asp Gln Thr Glu Leu
 355 360 365

Gln Arg Leu Met Thr Gln Arg Ala Gly Met Asn Asp Gly Asn Val Ala
 370 375 380

Gly Leu Gln Ser Gln Leu Val Thr Lys Glu Thr Gln Leu Lys Gln Val
 385 390 395 400

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Val Ser Val Trp Leu Gln Thr Leu Gly Trp
 405 410 415

Pro Glu Pro Gln Asp Ala Gly His Phe Gly Glu Cys Val Gly Arg Ala
 420 425 430

Gly Val Leu Arg Asp Arg Gly Pro Gly Glu Glu Ala Glu Val Lys Ala
 435 440 445

Glu Glu Leu Arg Gln Lys Arg Phe Glu Ala Glu Arg Gln Leu Lys Glu
 450 455 460

Leu Leu Ala Asp Ala Ala Ser Leu Glu Gln Arg Lys Ser Asn Leu Pro
 465 470 475 480

Arg Glu Leu Val Asn Val Arg Asp Gln Ile Ala Leu Ala Leu Asn Leu
 485 490 495

Asp Pro Ala Ser Leu Pro Phe Gly Gly Glu Leu Leu Asp Met Pro Glu
 500 505 510

Lys Phe Arg Gln Trp Gln Gly Ala Leu Glu Arg Leu Leu Ala Pro Leu
 515 520 525

Thr Arg Ser Phe Leu Val Pro Glu Glu Tyr Tyr Pro Gly Val Val Asn
 530 535 540

I853215

Trp Leu Glu Ser Asn His Thr Gly Gln His Val Leu Tyr Leu Arg Met
545 550 555 560

Arg Pro His Gln Lys Arg Phe Asp Asn Gly Pro Lys Ala Pro Gly Arg
565 570 575

Met Leu Asp Ser Ser Ala Asp Glu Tyr Gly Gly Trp Leu Arg Asn Glu
580 585 590

Ile Ala Ser His Tyr Gly Glu Phe Val Cys Ala Glu Thr Ala Glu Glu
595 600 605

Phe Arg Asn Ser Pro Arg Ala Ile Ser Leu His Gly Gln Ile Lys Arg
610 615 620

Gly Gly Ala Arg His Glu Lys Asn Asp Arg Thr Arg Leu Asp Glu Arg
625 630 635 640

Arg His Trp Val Ile Gly Phe Ser Asn Glu Gln Lys Lys Leu Glu Leu
645 650 655

Leu Asp Glu Ile His Ala Gln Gln Lys Val Glu Arg Glu Ala Ser Arg
660 665 670

Ala Leu Ala Glu Leu Gln Ala Thr Gln Asn Lys Glu Arg Glu Lys Leu
675 680 685

Asn Ala Ala Ala Glu Leu Thr Gln Val Val Trp Glu Asp Ile Asp Asp
690 695 700

Val Ser Val Ala Asp Glu Val Gln His Leu Leu Asn Gln Ile Glu Glu
705 710 715 720

Ala Gln Arg Ser His Pro Glu Ile Gln Glu Leu Asp Gly Gln Ile Gln
725 730 735

Ala Gln Gly Val Lys Ala Ser Gln Ala Gly Ser Ala His Glu Thr Glu
740 745 750

Lys Lys Lys Phe Ala Asp Thr Glu Gln Gln Ile Asn Gly Leu Ile Arg
 755 760 765

Asp Arg Glu Asn Thr Arg Asp Asp Val Arg Met Pro Pro Val Asp Gly
 770 775 780

Asp Glu Ile Gln Leu Leu Phe Gly His Leu Asp Gly Leu Thr Leu Glu
 785 790 795 800

Asn Leu Glu Gln Arg Arg Leu Ser Ala Arg Ser Glu Leu Lys Asp Arg
 805 810 815

Arg Asn Asp Ala Asp Lys Ala Gln Ala Asn Asp Arg Ser Leu Leu Glu
 820 825 830

Glu Val Leu Arg Thr Phe Gln Arg Glu His Lys Met Ala Ala Ala Asp
 835 840 845

Met Gly Ala Thr Leu Asp Asp Trp Ser Asp Tyr Ala Gln Leu Leu Ala
 850 855 860

Lys Ile Glu Glu Asp Asp Leu Pro Arg Phe Glu Glu Arg Phe Phe Arg
 865 870 875 880

Leu Leu Asn Glu Gln Ser Asp Arg His Leu Ala Arg Leu Arg Gln Arg
 885 890 895

Leu Ile Thr Glu Lys Asp Glu Ile Arg Gly Arg Met Asn Ile Val Asn
 900 905 910

Asp Ala Leu Ser Gln Ser Glu Phe Asn Ala Gly Thr Tyr Leu Val Leu
 915 920 925

Glu Asn Arg Pro Arg Thr Leu Pro Asp Val Thr Ala Phe Leu Ala Glu
 930 935 940

I853215

Leu Lys Ser Cys Leu Glu Arg Asn Ile Arg Pro Glu Ala Thr Arg Glu
945 950 955 960

Glu Arg Glu Glu Gln Phe Lys Ala Leu Asn Thr Ile Val Gln Arg Leu
965 970 975

His Ser Asp Lys Pro Glu Asp Glu Arg Trp Lys Ala Leu Val Leu Asp
980 985 990

Val Arg Gln His Val Glu Phe Val Ala Lys Glu Phe Asp Ala Asp Gly
995 1000 1005

Arg Val Arg Asp Ile Phe Gln Ser Gly Ala Gly Lys Ser Gly Gly
1010 1015 1020

Gln Arg Gln Lys Leu Ala Ala Thr Cys Leu Ala Ala Ala Leu Arg
1025 1030 1035

Tyr Gln Leu Ala Gly Thr Gln Arg Pro Leu Pro Gln Phe Cys Thr
1040 1045 1050

Val Leu Met Asp Glu Ala Phe Asp Lys Ala Asp Ser Glu Phe Thr
1055 1060 1065

Ala Met Thr Leu Asn Ile Phe Asn Thr Phe Gly Phe Gln Met Leu
1070 1075 1080

Met Ala Thr Pro Met Lys Ala Val Arg Thr Leu Glu Pro Phe Ile
1085 1090 1095

Gly Gly Ala His Val Phe Ser Asn Lys Leu Arg Asn Ser Ser Gly
1100 1105 1110

Ala Val Ala Ile Glu Tyr Asp Met Ala His Arg Arg Leu Val Gly
1115 1120 1125

Leu Gly His Gln Arg Ser Glu Glu Arg Gly Asn Ala Gly Gly Glu
1130 1135 1140

Ile Pro Gln Ser Glu Asp

1145

<210> 5

<211> 1209

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 5

atgccactgg atgaacttgg cggggcattg ctgcccgacg atctcgcggt tgcattgccgg 60
cgtcagctgg agcgtcatca ggccggctgg ctggcgcagc tatcggagga ctcatggccc 120
ttatcggttg ctttgcgtgg tccgtcggac aggcaggcgg tcaacgtcc aggggccgtg 180
cggacctggc ttggtgcgtg gaatgattc gataggattt ctagggaaaa ggggcgaagg 240
gctgcggccg tgtggcgtc ggtgaactgg cggaccatgg gcaacgtcac cataccggaa 300
aagggtttgt tcgaagatgc gcaggctgtg gcggattgtg caggactgcg ccggcattgg 360
gatacccttc atgcgcgtg gcggaggata ggcgagcggg atccggtctt ggccggcgag 420
cgcgattgcg cgaatgccgt cataagaacc gccgactggt ctgacgatga tttccggcga 480
ctgatggaat tgctggcctg gtgcaggcag aaccggcgga gcggactcta cctgcgcaa 540
ttgccactgg tagacataga cacgaaatgg gttgagggac ggctggcgt cgtggaaccg 600
ctgcttcgaa tccttatggg caaggagggt gatattcgtg aggtcatggg gctgaggcgt 660
tcaccgata cggctccgat gagactgctc gatgccgggc ttcgcgagca actgctgggc 720
atggaggata ttcagatccc cgtaggccag tggaaacctg tgtttcggta tccaccaaag 780
cgactactga ttgtcagaaa cctcagatgc gggctggcgc ttcccgatat cgaagggtg 840
gcggtcgtga tggcgtcgg gaacaatgtg actgccctac ggggaataga atgggcgccc 900
gctgcggatg ttctctactg gggggacatc gatacctggg ggttgcata tctgtcccgg 960
gctcgcggca tcttcccaca tctgaggtcg gttctgatga cggagggggg cgttgagtcg 1020
catcgacatc tctgaccga cgagccgact caggacaagc ggctgccgt gaatctcacg 1080
aaggacgagg cggaactatt gtccgacctt caaacggac gatggggcga acgccgtcgt 1140

I853215

ctggaacagg agcgaataca ctggccaaag gtaacagagg aagttcgccg ccaatggact 1200

tattcttga 1209

<210> 6

<211> 402

<212> PRT

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 6

Met Pro Leu Gly Glu Leu Gly Gly Ala Leu Leu Pro Asp Asp Leu Ala
1 5 10 15

Val Ala Cys Arg Arg Gln Leu Glu Arg His Gln Ala Asp Trp Leu Ala
20 25 30

Gln Pro Ser Glu Gly Ser Trp Pro Leu Ser Val Ala Leu Arg Ser Pro
35 40 45

Ser Asp Arg Gln Ala Ala Asn Ala Pro Gly Ala Met Arg Ala Trp Leu
50 55 60

Gly Ala Trp Asn Asp Phe Asp Arg Ile Ser Arg Asp Lys Gly Arg Arg
65 70 75 80

Ala Ala Ala Val Trp Arg Ser Val Asn Trp Arg Thr Met Gly Asn Val
85 90 95

Thr Ile Pro Glu Arg Val Leu Phe Glu Asp Ala Gln Ala Val Ala Asp
100 105 110

Cys Ala Gly Leu Arg Arg Tyr Trp Asp Thr Leu His Met Arg Trp Gln
115 120 125

Arg Met Gly Glu Arg Tyr Pro Val Leu Ala Gly Gln Arg Asp Cys Thr
130 135 140

Asn Ala Val Ile Arg Thr Ala Asp Trp Ser Asp Asp Asp Phe Arg Arg
145 150 155 160

I853215

Leu Met Glu Leu Leu Ala Trp Cys Arg Gln Asn Pro Ala Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Leu Arg Gln Leu Pro Leu Ile Asp Ile Asp Thr Lys Trp Val Glu
180 185 190

Gly Arg Arg Gly Val Val Glu Pro Leu Val Arg Ile Leu Met Gly Lys
195 200 205

Asp Gly Asp Ile Arg Glu Val Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Asp Thr
210 215 220

Val Arg Met Arg Leu Leu Asp Pro Gly Leu Arg Glu Gln Leu Leu Gly
225 230 235 240

Met Glu Asp Leu Gln Ile Pro Ile Gly Gln Trp Asn His Val Phe Arg
245 250 255

Tyr Pro Pro Lys Arg Leu Leu Ile Val Glu Asn Leu Glu Ser Gly Leu
260 265 270

Ala Leu Pro Asp Ile Glu Gly Val Ala Val Val Met Ala Leu Gly Asn
275 280 285

Asn Val Thr Thr Leu Arg Gly Ile Glu Trp Ala Leu Ala Ala Asp Val
290 295 300

Leu Tyr Trp Gly Asp Ile Asp Thr Trp Gly Leu His Ile Leu Ser Arg
305 310 315 320

Ala Arg Gly Ile Phe Pro His Leu Arg Ser Val Leu Met Thr Glu Gly
325 330 335

Val Ile Glu Ser His Arg His Leu Leu Thr Glu Glu Pro Thr Gln Asp
340 345 350

I853215

Lys Arg Pro Ala Val Asn Leu Thr Lys Asp Glu Ala Gln Leu Leu Ser
355 360 365

Asp Leu Gln Ala Gly Arg Trp Gly Glu Arg Arg Arg Leu Glu Gln Glu
370 375 380

Arg Ile His Trp Pro Asn Val Ile Glu Glu Val Cys Arg Gln Trp Thr
385 390 395 400

Asp Ser

<210> 7

<211> 90

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 7

ttcgaacttt actttttcga tttcgttcgt taaatttcga attcgaacat ttcgtgttca 60

cccatttcca tcagacgata aggacagcag 90

<210> 8

<211> 300

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 8

gtcgcgcgcg gtgccgccgc acgacgtctg caggtcggcg aacgacggcg cccgccagtt 60

gccggcgagc ggccggcgtgc cggcgttca ccccgccaga aggacggcgc acacgccggc 120

ccacatccca atacgatga ttcacctcgc gaaacggtcg attccgccag tategtccgg 180

gatcgcgccg cgcgtactg gccccgttt ttcgaacttt actttttcga tttcgttcgt 240

taaatttcga attcgaacat ttcgtgttca cccatttcca tcagacgata aggacagcag 300

<210> 9

<211> 110

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 9

cagtgttttc gctctttcat ggttttcctt aggggacgcc gggactaac tctgttccat 60

cgctgcagac atggtgtgtg cggcggagca aaaaaatccc ggaggtaatc 110

<210> 10

<211> 300

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 10

gctgccggcg aacctcgtgc aggcgcagcg cgacttcttc ggcgcgcaca cgttcgagcg 60

taccgacaag ccgggcagct tccacgcgaa ctggtcgtaa ccgcctcgcg ggggcagcat 120

tgttgcgaaa atctattcta tgaatagggt tctctatcc cggatgccgg cattgttggc 180

tccggggaaa cagtgttttc gctctttcat ggttttcctt aggggacgcc gggactaac 240

tctgttccat cgctgcagac atggtgtgtg cggcggagca aaaaaatccc ggaggtaatc 300

<210> 11

<211> 966

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 11

atggccgacg attacgcgac gacgcgttat ccgatcgtcc tcgtgcacgg gctcacgggc 60

accgacaagt acgcgggcyt gctcagtagc ttgtacggca tccaggaaga cctgcagcag 120

catggcgcga ccgtctacgt cgcgaacctg tcgggcttcc agagcgacga cggcccgaac 180

gggcgcggcg aacagttgct cgcgtacgtg aagacggtgc ttgccgcgac gggcgcgacc 240

aaggtcaatc tcgtcggcca cagccagggc gggctcacgt cgcgttacgt cgcgctgtc 300

gcgccggatc tcgtcgcgtc ggtgacgacg atcggcacgc cgcacgcgg ctccgagttc 360

gccgacttcg tgcagggcgt gctcgcatac gatccgaccg ggctttcgtc atcggtgatc 420

gcggcgttcg tcaatgtgtt cggaatctc acgagcagca gccacaacac gaaccaggac 480

gcgctcgcgt cgctgaagac gctgacgacc gcccaggccg ccacgtacaa ccagaactat 540

ccgagcgcgg gccttggcgc gccgggcagt tgccagaccg gcgcgccgac ggaaaccgtc 600

ggcggcaaca cgcacgtgct gtattcgtgg gccggcacgg cgatccagcc gacgccttcc 660

I853215

gtgttcggtg tcacgggagc gacggacact agcacgattc cgctcgtcga tccggcgaac 720
gcgctcgacc cgtcgacgct tgcgctgttc ggcacgggca cggatgatgat caaccgaggc 780
tcgggccaga acgacgggct cgtgtcgaaa tgcagcgcgc tgtacggcca ggtgctgagc 840
acgagctaca agtggaaacca tatcgacgag atcaaccagt tgctcggcgt gcgcggcgcg 900
tttgcggaag atccggtcgc ggtgatccgc acgcatgcga accgtctgaa gctggcgggc 960
gtgtaa 966

<210> 12

<211> 963

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 12

atggcggaca cctacgcggc gacgcgctat ccggtgatcc tcgtccacgg cctcgcgggc 60
accgacaagt tcgcaaacgt ggtggactat tggtaggaa tccagagcga tctgcaatcg 120
catggcgcga aggtgtacgt cgcgaatctc tcgggattcc agagcgacga cgggccgaac 180
ggccgcggcg agcagctgct cgcctacgtg aagcaggcgc tcgcggccac cggcgcgacc 240
aaggtgaacc tgatcggcca cagccagggc ggcctgacct cgcgctacgt cgcggccgctc 300
gcgccgaac tggtagcctc ggtgacgacg atcggcacgc cgcacgcgg ctccgagttc 360
gccgacttcg tgcaggacgt gctgaagacc gatccgaccg ggctctcgtc gacggtgac 420
gccgccttcg tcaacgtgtt cggcacgctc gtcagcagct cgcacaacac cgaccaggac 480
gcgctcgcgg cgctcgcac gctcaccacc gcgcagaccg ccacctaaa ccggaacttc 540
ccgagcgcgg gcctgggagc gcccgttcg tgccagacgg gcgccgcgac cgaaaccgctc 600
ggcggcagcc agcacctgct ctattcgtgg ggcggcaccg cgatccagcc cacctccacc 660
gtgctcggcg tgaccggcgc gaccgacacc agcaccggca cgtcgcacgt cgcgaacgtg 720
accgaccctg ccacgctcgc gctgctcgc accggcgcgg tgatgateaa tcgcgctcgc 780
gggcagaacg acgggctcgt ctcgcgctgc agctcgtgtg tcgggcaggc gatcagcacc 840
agctaccact ggaaccatct cgacgagatc aaccagctgc tcggcgtgcg cggcgccaac 900
gcggaagatc cggctcgcggg gatccgcacg cacgtgaacc ggcicaagct gcaggcgtg 960

tga 963

<210> 13

<211> 978

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 13

atggcgagtg cgcccgtcga caactacgcg gcgacgcgtt atccgatcat tctcgtgcac 60

gggctcaccg gcaccgacaa atacgcaggt gtgctcgagt actggtatgg gatccaggag 120

gacctgcagc agcatggcgc gaccgtctat gtcgcgaacc tgtcgggctt ccagagcgcac 180

gacggcccga acgggcgcgg cgaacagttg ctggcctacg tgaagacggt gctcgcgcgc 240

acggggggcga ccaagggtcaa cctcgtcggc cacagccagg gcgggctgac gtcgcgttat 300

gtcgcggccg tcgcgccga tctggtcgcg tcggtgacga cgatcggcac gccgcatcgc 360

ggctccgagt tcgccgactt cgtgcagggc gtactcgcgt acgatccgac cgggctgtcg 420

tcgacggtga tcgccgctt cgtcaatgtg ttcggaatcc tcacgagcag cagcaacaac 480

acgaaccagg acgcgctcgc tgcgctgaag acgctgacga ccgcgcaggc cggcacgtac 540

aaccagaact acccgagcgc gggcctcggc gcgccgggca gttgccagac cggcgcgccg 600

acgaaaccg tcggcggcaa cacgcatctg ttgtattcgt gggccggcac cgcgatccag 660

ccgacgatct ccgtgttcgg cgtcacgggt gcgacggata cgagcaccat tccgctcgtc 720

gatccggcga atgcactcga cccgtcgacg ctgcgcgtgt tcggcaccgg cacggtgatg 780

atcaaccgcg gttcgggcca gaacgacgga gtcgtgtcga agtgcagcgc gttgtacggc 840

caggtgctga gcacagcta caagtggaac catctcgacg agatcaacca gttgctcggc 900

gtgcgcggcg cgaatgcgga agatccggtc gcggtgatcc gcacgcatgc gaaccggctg 960

aagctcgcgg gcgtgtga 978

<210> 14

<211> 1035

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

I853215

<400> 14
atggcggcac gtgaagggcg cgcgccctg gcgcggcg ctgcggtcta cgggtcgtg 60
gggctggcgg caatcggcg cgtcgcgatg tggagcgggg cgggatggca tcgcggtgcg 120
ggtagcgccg gcgaatcgcc cgacgcggcg gcggtgggcg gcgtggctgc ggcaccgccc 180
caggccgccg tgccggcgag cgcgggctg ccgtcgtcgc tggccggttc cagcgcgccg 240
cggctgccgc tcgatgcggg cggccatctc gcgaaggfac gcgcggtgcg cgatttcttc 300
gactactgcc tgaccgcgca gagcgacctc agcgcggccc cgctcgacgc actcgtcgtg 360
cgcgagattg ccgcgcagct cgacggcacg gccgcgcacg ccgaggcgt cgacgtgtgg 420
catcgttata gcgcgtatct cgacgcctc gcgaaactgc gcgatgccgg cgcggtcgac 480
aagtcgatt tgggcgcgt gcaactcgc ctcgaccagc gcgcatcgat cgcgtatcgc 540
acgcttggcg actggagcca gccgttcttc gcgcggaac agtggcggca gcgctacgat 600
ctcgcgcggc tgaagatcgc gcaggatcgc acgctgaccg atgcgcagaa ggccgagcgg 660
ctcgcggcgc tggagcagca gctgccggcc gatgaacgcg ccgcgcagca gcgggtcgac 720
cggcagcggg ccgcgatcga ccagatcgcg cagttgcaga agaacggggc gacccccgat 780
gcgatgcgcg cgcaactgac gcagacctc gggcccagg ccgccgcgcg cgtcgcgcag 840
atgcgacagc acgacgcata gtggcagagc cgtacgcgg actatgcggc gcagcgtgcg 900
cagatcgaat cggccggcct gtcgccgag gaccgcgacg cgcagatcgc cgcgttgcgg 960
cagcgcgtgt tcacaaaacc cggcgaagcg gtgcgcgcgg cgtcgtcga tcgcggggcg 1020
ggcagcgcgc agtaa 1035

<210> 15

<211> 1062

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 15

atggcgcagg ccgatcgtcc ggcgcgcggc gggctggccg cgcgcccgat gcgcggcgcg 60
tcgttcgcgc tggccgggct cgtcgcgtgt gccgcctgtg ccgcggtcgt gctgtggctt 120
cggccccccg ccccgtgcc cgcgccggcc ggcgccgtcg cgggcgggccc ggcggcccgc 180

gtgcccggc cggcaagcgg cgcggcggag gccgccatgc cgttgccggc ggcgctgcc 240
 ggcgctgg ctggctgca tgcgccgccc ctgccctgg ccgccggcgg ccggctcgc 300
 aggacgcgc cggtgccga gttcttcgac tattgcctga ccgcgcaggg cgaactgac 360
 cccgccgccc tcgatgcct ggtgcccgc gagatgccg cgcagcttga cggcagcccc 420
 gcgcaagcgg aggcgctcgg cgtctggcgc cgtatcgcg cctacttcga cgcgctcgc 480
 caattgccc gcgacggcgc ggtgctcggc gacaagctc atccggccg catgcagtc 540
 gcgctcgtc agcgcgcggc gctggccgac cgcacgctc gcgagtggg cgcagccgtc 600
 ttccgagac agcagcggc gcagcggcat gacctgaaac ggatccggat cggcaacgac 660
 accacgctga gccctgagca gaaggccgccc cggcttgccc cgtcgcagc gcagctgac 720
 ccggacgagc gcgcgcagca ggcggcgcctg catgcgcagc aggacgcggt gacgaagatc 780
 gccgacttgc agaaggcccg cgcgacgccc gaccagatgc gcgcgcagat cgcgcagac 840
 ctccggccc aggcggcccg gcgcggcccg cagatgcagc aggacgacga ggcgtggcag 900
 acgcgctatc aagcctatgc ggccgagcgc gaccggatc cggcgcaggg gctcgcgcc 960
 caggatcgc atgcgcggat cgcgcagctc aggcagcaga ctttcacggc gccgggggag 1020
 gcgatccgc cggcgtcgt cgatcgcggc gcgggcgggt ag 1062

<210> 16

<211> 1035

<212> DNA

<213> 伯克氏菌屬細菌

<400> 16

atgacggcac gtgaaggcgc cgcgccctg gcgcggcgc ctgtggtcta cgggtgctg 60
 ggcgtggcgg cgatcggcgg cgtcgcgat tggagcggg cgggatggca tcgcgggac 120
 ggcacggccc ccgagttgcc ggacgcggct gcggcaggc ggcggctgc cgcgccgccc 180
 cagggcgcca tgccggcgag cacgggctg ccgtcgtcgc tggccggctc cagcgcgcc 240
 cgactgccg tcgatgccgg cggccatctt gcgaagtcgc gtgtggtgcg cgatttctc 300
 gactactgcc tgaccgcgca gagcgacctg agcgcggccc cgtcgtatgc gttcgtcgt 360
 cgcgagatc ccgcgcagct cgacggcacg gttgcgcagg ccgaggcgt cgacgtctg 420

I853215

caccgggtacc gtgcgtatct cgacgcgctc gcgaagttgc gcgatgccgg cgcggtcgac 480
aagtcggacc tgggcgcgct gcagctcgcg ctcgaccagc gcgctcgat cgcataccgc 540
acgctcggcg actggagcca gccgtttttc ggcgcgagc agtggcggca gcgctacgat 600
ctcgcgcgat tgaagatcgc acaggatcgc acgctgacgg atgcgcagaa ggccgagcgg 660
ctcgcggcgc tcgagcagca gatgccggcc gacgagcgcg ccgcgagca gcgggtcgac 720
cagcagcggg ccgcatcga ccagatcgcg caattgcaga agggcggcgc gacccccgat 780
gcgatgcgcg cgcaactgac gcagacgctc ggcccggaag ccgccgcgcg cgtcgcgcag 840
atgcagcagg acaacgcacg gtggcagagc cgtacgcgg actatgcggc gcagcgtgcg 900
cagatcgagt cggccggcct gtcgccgagc gatcgcgatg cacagatcgc cgcgttacga 960
cagcgcgtgt tcacgaaacc cggtgaggcc gtgcgggcgg catcgtcga tcgcggcgcg 1020
ggcagcgcgc agtga 1035

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 17
gcaattccac gtctaccgat g 21

<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 18
tgcittacct ccgctaagtg gtgatgaac 29

<210> 19
<211> 257

I853215

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 擴增產物

<400> 19

gcaattccac gtctaccgat ggctcgggtg gtctgacgg ctgcgcggaa acgggagcgg 60

aatggcagcc ccaccagga tggcaggcgc gtgacgaagt gcacgaagtg ttgcgcgact 120

tcaacgcggc cttgcgttgc gccaaagatcc ggtgcacatt gatccgtcac ttttgttaca 180

ctcgacacgc actcgtttgc agtcgccaga caaaacggca acattcgggt tcatcaccac 240

ttagcggagg taaagca 257

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 20

atgaacatca aaaagtttgc aaaacaagca ac 32

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 21

atgggttaaa aaggatcgat cctctagcg 29

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 擴增產物

I853215

<400> 22
acatgattac gaattggcgc atgaatattg tcaac 35

<210> 23
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 23
ccagccggcc tgatgacgct ccagctgacg ccggc 35

<210> 24
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 24
catcaggccg gctggcgatg gggcgaacgc cgtcg 35

<210> 25
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 25
ggccagtgcc aagcttccgc cgaagtcgtg gatac 35

<210> 26
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 26
acatgattac gaattccgga caagatggcg ttgtg 35

<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 27
tgtcgggcga tgatcctctc ccctatg 27

<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 28
gatcatgcc cgacaatggc gcatcgacgg ctgct 35

<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 29
ggccagtgcc aagctcgtag ggcagtcaca ttggt 35

<210> 30
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 30
acatgattac gaattgatga ctgaggcgat tgcag 35

I853215

<210> 31
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 31
cgcgctccgct gtgcctgtcc gaaattcggc c 31

<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 32
ggcacagcgg acgcgagacc agcagaggtc gatgg 35

<210> 33
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 33
ggccagtgcc aagctccgtg tgatgctcct gatac 35

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 34
ggcgcataaa tattgtcaac 20

<210> 35
<211> 20

I853215

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 35

tccgccgaag tcgtggatac

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 36

ccggacaaga tggcgttgtg

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 37

cgtagggcag tcacattgtt

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 38

gatgactgag gcgattgcag

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 39

ccgtgtgatg ctctgatac

20

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 40

gctgaaagct tacctgagct taaaag

26

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 41

cagcgtgttc agcattattc catttg

26

<210> 42

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 42

cgtaaataat tgcagcatgc gcgcgcacga ac

32

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

I853215

<223> 引子

<400> 43

gcagatctgg ccaacgtttg cgcctgac

29

<210> 44

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 44

caaacgtttg ccagatctgc tagctacgta gagctcggta ccactagtgg

50

<210> 45

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 45

aaaccgcggc cataatgggtc tagaggatcc actagtggta ccgagct

47

<210> 46

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 46

ccatatggcc gcggttttcg actgcttcaa ag

32

<210> 47

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

I853215

<400> 47	
cataagcggc cgggcgacga ggccagagag c	31
<210> 48	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 終止子	
<400> 48	
gccgcggttt tcgactgctt caaagccccg ctccggcggg gctttttcat tgatgcccg	60
ccgggcgctc tctggcctcg tcgccc	87
<210> 49	
<211> 97	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 終止子	
<400> 49	
ttgcagcatg cgcgcgcacg aacgcggccc cggccgaacg ggcggggcgc gtcaagcgat	60
tagagaaccg tgtctagtca gggcgcaaac gttggcc	97
<210> 50	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MCS片段	
<400> 50	
agatctgcta gctacgtaga gctcggtaac actagtggat ccctagacc catatg	56
<210> 51	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

I853215

<223> 引子

<400> 51

tcgtcgcccc gccgcttatg tctattgctg gtttacc

37

<210> 52

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 52

gcatgctgca atatttaacg accctgccct gaaccg

36

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 53

gccagatcga tgcgttccag ggtg

24

<210> 54

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 54

cataagcggc ttactgcgcg ctgccccccc

30

<210> 55

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

I853215

<400> 55
acgttggcca gatctgcaat tccacgtcta ccgatggctc 40

<210> 56
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 56
acgcatcgat ctggccattg ctttacctec gctaagtggt gatg 44

<210> 57
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 57
gcagtaagcc gcggttttcg actgcttcaa ag 32

<210> 58
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 58
agatctggcc aacgtttgcg ccctg 25

<210> 59
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 59
accactgcca tccccactgg atgacggcga tgacc 35

<210> 60
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 60
gaatgctggt ttcccgtcga tgtcgaggat ggcgg 35

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 61
actggatgac ggcgatgacc 20

<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 62
gtcgatgtcg aggatggcgg aag 23

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 63
ctgtggccga tctagggctg 20

I853215

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 64
acgcgctttg agattcccag 20

<210> 65
<211> 5376
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pSa質體

<400> 65
gctgtagccg cctcggcc ctataccttg tctgcctccc cgcggtgcgt cgcggtgcat 60
ggagccgggc caccctcgacc tgaatggaag ccggcggcac ctcgctaacg gattcaccgt 120
ttttatcagg ctctgggagg cagaataaat gatcataatcg tcaattatta cctccacggg 180
gagagcctga gcaaaactggc ctcaggcatt tgagaagcac acggtcacac tgcttccggt 240
agtcaataaa ccggtaaacc agcaatagac ataagcggct atttaacgac cctgcctga 300
accgacgacc gggctgaatt tgctttcgaa tttctgcat tcatccgctt attatactta 360
ttcaggcgta gcaccaggcg ttttaaggca ccaataactg ccttaaaaaa attaccccc 420
gcctgccac tcatcgagc actggtgtaa ttcattaagc attctgccga catggaagcc 480
atcacagacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcacc agcaccttgt cgccttgcgt 540
ataatatttg cccatggtga aaacgggggc gaagaagttg tccatattgg ccacgtttaa 600
atcaaaactg gtgaaactca cccagggatt gctgagacg aaaaacatat tctcaataaa 660
cccttaggg aaataggcca ggtttcacc gtaacacgcc acatcttgcg aatatatgtg 720
tagaaactgc cggaaatcgt cgtggtatc actccagac gatgaaaacg tttcagtttg 780
ctcatgaaa acggtgtaac aagggtgaac actateccat atcaccagct caccgtcttt 840
cattgccata cggaaatccg gatgagcatt catcaggcgg gcaagaatgt gaataaagcc 900

cggataaaac ttgtgcttat tttcttttac ggtctttaaa aaggccgtaa tatccagctg 960
 aacggctctgg ttataggtac attgagcaac tgaactgaaat gcctcaaaat gttctttacg 1020
 atgccattgg gataatcaaa cgggtggfata tccagtgatt tttttctcca ttttagcttc 1080
 cttagctcct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacgcgc ggtagtgatc ttatttcatt 1140
 atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg atcaacgtct cattttcgcc aaaagtggc 1200
 ccagggttc ccggtatcaa caggacacc aggatttatt tattctgaca ggctgcgct 1260
 gccacagagc ttgaccacag ggattgccc ccggtaccc agccttcgac cacatacca 1320
 ccggtccaa ctgcgcggcc tgcggcctt gccatcaat tttttaatt ttctctgggg 1380
 aaaagcctcc ggccctgcgc ctgcgcctt cgtttgccgg ttggacacca agtggaaaggc 1440
 gggfcaaggc tcgcgcagcg accgcgcagc gctttggcct tgacgcgcct ggaacgacct 1500
 aagcctatgc gagtgggggc agtcgaaggc gaagcccgcc cgcctgcccc ccgagacctg 1560
 cagggggggg ggggcgctga ggtctgcctc gfgaagaagg tgttgctgac tcataccagg 1620
 cctgaatgc cccatcatcc agccagaaag tgaggagacc acggttgatg agagctttgt 1680
 tftaggtgga ccagttggtg attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt 1740
 cgggaagatg cgtgatctga tcttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc 1800
 gccgtccct caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga 1860
 ttgaaaaac tcactgagca tcaaatgaaa ctgcaattta tcatatcag gattatcaat 1920
 accatatttt tgaaaaagcc gttctgttaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 1980
 taggatggca agatcctggt atcggctctg gattccgact cgtccaacat caatacaacc 2040
 tattaatttc cctcgtcaa aaataagggt atcaagtgag aaatcacat gagtgacgac 2100
 tgaatccgt gagaatggca aaagcttatg catttcttc cagacttggt caacaggcca 2160
 gccattacgc tcgtcatcaa aatcactgc atcaacaaa ccgtattca ttcgtgattg 2220
 cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 2280
 atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcg atcaacaata tttcacctg aatcaggata 2340
 ttcttctaat acctggaatg ctgttttccc ggggatcga gtggtgagta accatgcatc 2400

atcaggagta cggataaaat gcttgaatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 2460
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 2520
caactctggc gcatcgggct tcccatataa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccagc 2580
attatcgcga gcccatlta acccatataa atcagcatcc atgttggaa ttaatcgcgg 2640
cctcgagcaa gacgtttccc gttgaafatg gtcataaca ccccttgtat tactgtttat 2700
gtaagcagac agttttattg ttcattgatga tatatttita tcttgtgcaa tgtaacatca 2760
gagatlttga gacacaacgt ggctttcccc cccccctg caggccccga gcctcacggc 2820
ggcgagtgcg ggggttccaa gggggcagcg ccaccttggg caaggccgaa ggccgcgag 2880
tcgatcaaca agccccggag gggccacttt ttgccggagg gggagccgcg ccgaaggcgt 2940
gggggaacc cgcaggggtg cccttagtca aaagcctccg accggaggct tttgactaaa 3000
acttcccttg gggttatcat tggggctcac tcaaaggcgg taatcagata aaaaaatcc 3060
ttagctttcg ctaaggatga tttctgctag agctgtcaga ccagagctcc aaaccaacgt 3120
tttatctata ccgctacagg gtatttaatt cctatttaat ctgcgctaga atgaggcatg 3180
ttaaaccgaa tctgacgttt tccctgcaaa tgccaaaata ctatgcctat ctccgggttt 3240
cgcgtgacgg ccaagaccg gaaaacaaa aatacgttt gctcgaatac gcgaacgcca 3300
aaggcttcgc gccgctacag atcgaggaag aaattgccag cagagcaaag gactggcgca 3360
agcgaagct cggagcaatc atcgaaaagg ccgagcgtgg cgacgtgcta ctgacccgg 3420
agattacgcg cattgccggt tccgccctcg ccgcttggg aattctcaa gcggcgagcg 3480
agcgcggcct aatcgtccat gtgacaaaac agaagatcat catggacggc agcctacaaa 3540
gcgacatcat ggcaaccgtg cttggcttgg ctgcacagat cgagcggcat ttcattcagg 3600
cacgtaccac cgagcgcta caagtcgcca gagagcgcgg caagacgctc gggcgacca 3660
agggcagcaa atcgagcgcc ttgaagctgg acagccgtat tgatgaagta caggcatacg 3720
tgaaccttgg cttgccgcaa agtcgcgag ccgagttgtt aggcgtcagc cctcacacct 3780
tgcgcctgtt catcaaacgc cggaacatca aaccacaaa cactagacca accatcacca 3840
tgccggggag ggaacaacat gcctaagaac aacaaagccc ccggccatcg tateaacgag 3900

atcatcaaga cgagcctcgc gctcgaatg gaggatgccc gcgaagctgg cttagtcggc 3960
tacatggccc gttgccttgt gcaagcgacc atgccccaca ccgaccccaa gaccagctac 4020
tttgagcgca ccaatggcat cgtcaccttg tcatcatgg gcaagccgag catcggcctg 4080
ccctacggtt ctatgccgcg caccttgctt gcttggatat gcaccgaggc cgtgcgaacg 4140
aaagaccccc tgttgaacct tggccggtcg caatcggaat ttctacaaag gctcggaatg 4200
cacaccgatg gccgttacac ggccaccctt cgcaatcagg cgcaacgcct gttttcatcc 4260
atgatttcgc ttgccggcga gcaaggcaat gacttcggca ttgagaacgt cgtcattgcc 4320
aagcgcgctt ttctattctg gaatcccaag cggccagaag atcgggcgct atgggatagc 4380
accctcacc tcacaggcga tttcttcgag gaagtacccc gctcaccggt tcctatccga 4440
atcgactacc tgcatgcctt gcggcagctt ccgcttcgga tggacattta cacgtggctg 4500
acctatcgcg tgttcctggt gcgggccaag ggccgcccct tcgtgcaaat cccttgggtc 4560
gccctgcaag cgcaattcgg ctcatcctat ggcagccgcg cacgcaactc gcccgaactg 4620
gacgataagg cccgagagcg ggcagagcgg gcagcactcg ccagcttcaa atacaacttc 4680
aaaaagcgcc tacgcgaagt gttgattgtc tatcccgagg caagcgactg catcgaagat 4740
gacggcgaat gcctgcgcat caaatccaca cgcttgcag tcaccgcgc acccgcaag 4800
ggcgtcgcga tcggccccc tccgacttga ccaggccaac gctacgcttg gcttgggtcaa 4860
gccttcccat ccaacagccc gccgtcagc gggctttttt atccccgaa gcctgtggat 4920
agagggtagt tatccacgtg aaaccgctaa tgcgccgcaa agccttgatt cacggggctt 4980
tccggcccgc tccaaaaact atccacgtga aatcgctaat cagggtacgt gaaatcgcta 5040
atcggagtac gtgaaatcgc taataaggtc acgtgaaatc gctaatcaaa aaggcacgtg 5100
agaacgctaa tagccctttc agatcaacag cttgcaaaca cccctcgtc cggcaagtag 5160
ttacagcaag tagtatgttc aattagcttt tcaattatga atatataat caattattgg 5220
tcgcccttgg cttgtggaca atgcgctacg cgcaccgctt ccgcccgtgg acaaccgcaa 5280
gcggttgcce accgtcagc gccagcgctt ttgcccaaa cccggcggcc gcaacagatc 5340
gttttataaa ttttttttt tgaaaaagaa aaagcc 5376

I853215

<210> 66
<211> 6475
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pRK2-182質體

<400> 66
aaagccacgt tgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat 60
catgaacaat aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgagccata 120
ttcaacggga aacgictttgc tcgaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat 180
atgggtataa atgggctcgc gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgattgt 240
atgggaagcc cgatgcgcca gagttgtttc tgaacatgg caaaggtagc gttgccaatg 300
atgttacaga tgagatggtc agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca 360
tcaagcattt tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggga 420
aaacagcatt ccaggatta gaagaatata ctgattcagg tgaanaatatt gttgatgcgc 480
tggcagtgtt cctgcgccgg ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg 540
atcgcgtatt tcgtctcgct caggcgcgat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga 600
gtgattttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata 660
agcttttgcc attctcaccg gattcagtcg tcaactatgg tgattttctc cttgataacc 720
ttatTTTTGA cgaggggaaa ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag 780
accgatacca ggatcttgcc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct cttcattac 840
agaaacggct ttttcaaaa tatggtattg ataatcctga tatgaataaa ttgcagtttc 900
atttgatgct cgatgagttt ttctaatacag aattggttfaa ttggttgtaa cactggcaga 960
gcattacgct gacttgacgg gacggcggct ttgttgaata aatcgaactt ttgctgagtt 1020
gaaggatcag atcacgcata tccccacaa cgcagaccgt tccgtgctga gcgtcagacc 1080
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcggggg atcaggaccg 1140
ctgccggagc gcaaccact cactacagca gagccatgta gggccgccgg cgttgtggat 1200

accacgcgga aaacttggcc ctcaactgaca gatgaggggc ggacgttgac acttgagggg 1260
ccgactcacc cggcgcggcg ttgacagatg aggggcaggc tcgatttcgg ccggcgacgt 1320
ggagctggcc agcctcgcga atcggcgaaa acgcctgatt ttacgcgagt ttcccacaga 1380
tgatgtggac aagcctgggg ataagtcccc tgcggtattg aacttgagg ggcgcgacta 1440
ctgacagatg aggggcgcga tccttgacac ttgaggggca gagtgatgac agatgagggg 1500
cgcacctatt gacatttgag gggctgtcca caggcagaaa atccagcatt tgcaagggtt 1560
tccgccggtt ttctggccac cgctaacctg tcttttaacc tgcttttaa ccaatattta 1620
taaaccttgt ttttaaccag ggctgcgccc tggcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 1680
tgccccccct tctcgaacct tcccggccc ctaacgcggc accccatccc cccaggggct 1740
gcgccccctg gcccggaacg acctcacccc aaaaatggca gccacgtaga aagccagtcc 1800
gcgaaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa 1860
cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg 1920
ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct ctggtaaagt 1980
tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgag 2040
gggatcaaga tcgacggatc gatccgggga attaattccg gggcaatccc gcaaggaggg 2100
tgaatgaatc ggacgttga ccggaaggca tacaggaag aactgatcga cgcggggttt 2160
tccgccgagg atgccgaaac catcgcaagc cgcaccgtca tgcgtgcgcc ccgcgaaacc 2220
ttccagtccg tcggctcgat ggtccagcaa gctacggcca agatcgagcg cgacagcgtg 2280
caactggctc cccctgccct gcccgcgcca tcggccgccc tggagcgttc gcgtcgtctc 2340
gaacaggagg cggcagggtt ggcaagtcg atgaccatcg acacgcgagg aactatgacg 2400
accaagaagc gaaaaaccgc cggcgaggac ctggcaaac aggtcagcga ggccaagcag 2460
gcccggttgc tgaaacacac gaagcagcag atcaaggaaa tgcagctttc cttgttcgat 2520
attgcgccgt ggccggacac gatgcgagcg atgccaaac acacggcccc ctctgccctg 2580
ttcaccacgc gcaacaagaa aatcccgcgc gaggcgtgc aaaacaaggt cattttccac 2640
gtcaacaagg acgtgaagat cacctacacc ggcgtcgagc tgcgggccga cgatgacgaa 2700

ctggtgtggc agcaggtgtt ggagtacgcg aagcgcaccc ctatcggcga gccgatcacc 2760
ttcacgttct acgagctttg ccaggacctg ggcctggcga tcaatggccg gtattacacg 2820
aaggccgagg aatgcctgtc gcgcctacag gcgacggcga tgggcttcac gtccgaccgc 2880
gttgggcacc tggaaatcggg gtcgctgctg caccgcttcc gcgtcctgga ccgtggcaag 2940
aaaacgtccc gttgccaggc cctgatcgac gaggaaatcg tcgtgctgtt tgctggcgac 3000
cactacacga aattcatatg ggagaaglac cgcaagctgt cgccgacggc ccgacggatg 3060
ttcgactatt tcagctcgca ccgggagccg taccgcctca agctggaaac cttccgctc 3120
atgtgcggat cggattccac ccgcgtgaag aagtggcgcg agcaggtcgg cgaagcctgc 3180
gaagagttagc gaggcagcgg cctggtagaa cacgcctggg tcaatgatga cctggtgcat 3240
tgcaaacgct agggccttgt ggggtcagtt ccggctgggg gttcagcagc cacctgcatc 3300
gcaagctagc ttgctagagg gtcagcttta tgcttgtaaa ccgttttgtg aaaaaatftt 3360
taaaataaaa aaggggacct ctaggttccc caattaatta gtaataaat ctattaaagg 3420
tcattcaaaa ggtcatccac cggatcaatt ccctgctcg cgcaggctgg gtgccaagct 3480
ctcgggtaac atcaaggccc gatccttggg agtcggcaaa taatgtctaa caattcgttc 3540
aagccgacgc cgcttcgagg cgcggcttaa ctcaagcgtt agatgacta agcacataat 3600
tgctcacagc caaactatca ggtcaagtct gcttttatta ttttaagcg tgcataataa 3660
gcctacaca aattgggaga tataatcatga aaggctggct ttttcttgtt atcgcaatag 3720
ttggcgaagt aatcgcaaca tccgcattaa aatctagcga gggctttact aagctgatcc 3780
ggtggatgac cttttgaatg accttaata gattatatta ctaattaatt ggggacccta 3840
gaggtccctt tttttatftt aaaaatfttt tcacaaaacg gtttacaagc ataaagctga 3900
ctctagctag aggatcttcg aatgcatcgc gcgcaccgta cgtctcgagg aattcgcaat 3960
tccacgtcta ccgatggctc ggggtgttct gacggctgcg cggaacggg agcggaatgg 4020
cagccccacc caggatggca ggcgcgtgac gaagtgcacg aagtgttgcg cgacttcaac 4080
gcggccttgc gttgcgcaa gatccggtgc acattgatcc gtcacttttg ttacactega 4140
cacgcactcg tttgcagtcg ccagacaaaa cggcaacatt cgggttcate accacttagc 4200

ggaggtaaag caatggccag atcgatgcgt tccaggggtgg tggcaggggc agtggcatgc 4260
gcgatgagcg tcgcccgtt cgcggggacg accgcggtga tgacgctcgc gacgacgcac 4320
gcggcgatgg cggcgaccgc gcccgccgac gattacgcga cgacgcgta tccgatcgtc 4380
ctcgtgcacg ggctcacggg caccgacaag tacgcgggcg tgctcgagta ctggtacggc 4440
atccaggaag acctgcagca gcatggcgcg accgtctacg tcgcgaacct gtcgggcttc 4500
cagagcgacg acggcccga cgggcgcggc gaacagttgc tcgctacgt gaagacggtg 4560
cttgccgcga cgggcgcgac caaggtaaat ctgctcgcc acagccaggg cgggctcacg 4620
tcgcttacg tcgcgctgt cgcgccgat ctgctcgt cggtgacgac gatcggcacg 4680
ccgcatcgcg gctccagtt cgcgacttc gtgcaggcgc tgctcgata cgatccgacc 4740
gggctttcgt catcggatgat cgcggcgttc gtcaatgtgt tcggaatcct cacgagcagc 4800
agccacaaca cgaaccagga cgcgctcgcg tcgctgaaga cgctgacgac cggccaggcc 4860
gccacgtaca accagaacta tccgagcgcg ggccttggcg cgcggggcag ttgccagacc 4920
ggcgcgccga cggaaaccgt cggcggcaac acgcatctgc tgtattcgtg ggccggcacg 4980
gcgatccagc cgacgctttc cgtgttcggt gtacgggcg cgacggacac tagcacgatt 5040
ccgctcgtcg atccggcga cgcgctcgac ccgtcgacgc ttgcgctgtt cggcacgggc 5100
acggtgatga tcaaccgcgg ctcgggccag aacgacgggc tcgtgtcga atgcagcgcg 5160
ctgtacggc aggtgctgag cacgagctac aagtggaacc atatcgacga gateaaccag 5220
ttgctcggcg tgcgggcg gtttgcggaa gatccggtcg cggtgatccg cacgcatgcg 5280
aaccgtctga agctggcggg cgtgtaatcg atggcggcac gtgaaggcg cgcccgctg 5340
gcgcggcgcg ctgcggtcta cgggtgctg gggctggcgg caatgccgg cgtcgcgatg 5400
tggagcgggg cgggatggca tcgcggtgcg ggtagcggcg gcgaatgcc cgacgcggcg 5460
gcggtgggcg gcgtggctgc ggcaccgcc caggccgcc tgccggcgag cgcgggcctg 5520
ccgtcgtcgc tggccggttc cagcgcgcc cggctgccgc tcgatgcggg cggccatctc 5580
gcgaaggtac gcgcggtgcg cgatttcttc gactactgcc tgaccgcga gagcgacctc 5640
agcgcggccc cgtcgcgacg actcgtcgtg cgcgagattg ccgcgcagct cgacggcacg 5700

gccgcgcacg ccgaggcgct cgacgtgtgg catcgttatc gcgcgtatct cgacgcgctc 5760
 gcgaaactgc gcgatgccgg cgcggtcgac aagtccgatt tgggcgcgct gcaactcgcg 5820
 ctcgaccagc gcgcatcgat cgcgtatcgc acgcttggcg actggagcca gccgttcttc 5880
 ggccgcggaac agtggcggca gcgctacgat ctccgcgcgc tgaagatcgc gcaggatcgc 5940
 acgttgaccg atgcgcagaa ggccgagcgg ctccgcgcgc tggagcagca gctgccggcc 6000
 gatgaacgcg ccgcgcagca gcgggtcgcg cggcagcggg ccgcgatcga ccagatcgcg 6060
 cagttgcaga agaacggggc gacgcccgat gcgatgcgcg cgcaactgac gcagacgctc 6120
 gggcccagag ccgccgcgcg cgtcgcgcag atgcagcacg acgacgcacg gtggcagagc 6180
 cgctacgcgg actatgcggc gcagcgtcgc cagatcgaat cggccggcct gtcgccgcag 6240
 gaccgcgacg cgcagatcgc cgcgttgcgg cagcgcgtgt tcacgaaacc cggcgaagcg 6300
 gtgcgcgcgg cgtcgcctga tcggggggcg ggcagcgcgc agtaagccgc ggttttcgac 6360
 tgcttcaaag ccccctccg gcggggcttt ttattgatg cccgtccggg cgctctctgg 6420
 cctcgtgcc cgtctagata cctaggtag cctcgtgtacc gcggccgcaa ttac 6475

<210> 67

<211> 2138

<212> DNA

<213> 植物伯克霍爾德氏菌

<400> 67

atggtcagat cgatgcgttc caggggtggc gcgagggcgg tggcatgggc gttggcggtg 60
 atgccgctgg ccggcgcggc cgggttgacg atggccgcgt cggccgcggc cgtcgcggcg 120
 gacacctacg cggcagcgcg ctatccggtg atcctcgtcc acggcctcgc gggcaccgac 180
 aagttcgcga acgtggtgga ctattggtac ggaatccaga gtgatctgca atcgcattggc 240
 gcgaaggtgt acgtcgcgaa tctctcggga ttccagagcg acgacgggcc gaacggccgc 300
 ggccgagcagc tgctcgccta cgtgaagcag gtgctcgcgg ccaccggcgc gaccaaggtg 360
 aacctgatcg gccacagcca gggcggcctg acctcgcgt acgtcgcggc cgtggcggcg 420
 caactggtgg cgtcgggtgac gacgatcggc acgccgcatc gcggctccga gttcggcgac 480

ttcgtgcagg acgtgctgaa gaccgatccg accgggctct cgtcgcagg gatcgcgcc 540
 ttcgtcaacg tgttcggcac gctcgtcagc agctcgcaca acaccgacca ggatgcgctc 600
 gcggcgctgc gcacgctcac caccgcgagc accgccacct acaaccgga cttcccagc 660
 gcgggcctgg gcgcgcccgg ttcgtgccag acgggcgccg cgaccgaaac cgtcggcggc 720
 agccagcacc tgctctattc gtggggcggc accgcgatcc agcccacctc caccgtgctc 780
 ggctgaccg gcgcgaccga caccagcacc ggcacgctcg acgtcgcgaa cgtgaccgac 840
 ccgtccacgc tcgcgctgct cggcaccggc gcggtgatga tcaatcgcgc ctcggggcag 900
 aacgacgggc tcgtctcgcg ctgcagctcg ctgttcgggc aggtgatcag caccagctac 960
 cactggaacc atctcgacga gatcaaccag ctgctcggcg tgcgcggcgc caacgcgga 1020
 gatccggtcg cggatgatcc caccgacgtg aaccggctca agctgcaggg cgtgtgatgg 1080
 cgcaggccga tcgtccggcg cgcggcgggc tggccgcgcg cccgatgcgc ggcgcgtcgt 1140
 tcgcgctggc cgggctcgtc gcgtgtgccg cctgtgccg ggctcgtctg tggcttcggc 1200
 ccgcccccc gtcgcccgcg ccggccgggt ccgtcgcggg cgggccggcg gccggcgtgc 1260
 ccgccgcggc aagcggcgcg gcggaggccg ccatgccgtt gccggcggcg ctgccggcg 1320
 cgtggccgg ctcgcatgcg ccgcgcctgc cgtggccgc cggcggcggg ctcgcgagga 1380
 cgcgcgcggt gcgcgagttc ttcgactatt gcctgaccgc gcagggcgaa ctgaccccc 1440
 ccgcgctcga tcgcgtggtg cggcgcgaga tcgccgcga gcttgacggc agccccgcg 1500
 aagcggaggc gctcggcgtc tggcggcct atcgcgccta cttcgacgcg ctcgcgcaat 1560
 tgcccggcga cggcgcggtg ctcggcgaca agctcgatcc ggccgcatg cagctcgcg 1620
 tcgatcagcg cgcggcgtg gccgaccgca cgtcggcga gtgggcccag ccgttcttcg 1680
 gcgacgagca gcgccggcag cgccatgacc tcgaacggat ccggatgcc aacgacacca 1740
 cgctgagccc cgagcagaag gccgcgcggc ttgccgcgt cgacgcgag ctgacgccg 1800
 acgagcgcgc gcagcaggcg gcgctgcatg cgcagcagga cgcggtgac aagatcggc 1860
 acctgcagaa ggccggcgcg acccccacc agatgcgcgc gcagatcgcg cagacgctcg 1920
 ggcccgaggc ggccgcgcgc gccgcgcaga tcagcagga gcagaggcg tggcagacgc 1980

I853215

gctatcaagc ctatgcggcc gagcgcgacc ggatcgcggc gcaggggctc gcgccgcagg 2040

atcgcgatgc gcggatcgcg cagctcaggc agcagacttt tacggcggcc ggggaggcga 2100

tccgcgcggc gtcgctcgat cgcggcgcgg gcggttag 2138

<210> 68

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 68

agcggaggta aagcaatggt cagatcgatg cgttc 35

<210> 69

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 69

gtcgaaaacc gcggcctaac cgcccgcgcc gcgat 35

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 70

tgctttacct ccgctaagtg gtgatgaac 29

<210> 71

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

I853215

<400> 71
gccgcggttt tcgactgctt caaag 25

<210> 72
<211> 1095
<212> DNA
<213> 洋蔥伯克霍爾德氏菌

<400> 72
atggccagat cgatgcgttc cagggtggtg gcaggggcag tggcatgcgc gatgagcgtc 60
gcgccgttcg cggggacgac cgcggtgatg acgctcgcga cgacgcacgc ggcatggcg 120
gcgaccgcgc ccgccgacaa ctacgcggcg acgcgttacc cgatcatcct cgtgcacggg 180
ctcacgggca ccgacaagta cgcgggcgtg ctcgagtact ggtacggcat ccaggaagac 240
ctgcagcagc gcggcgcgac cgtctacgtc gcgaacctgt cgggcttcca gagcgacgac 300
ggcccgaacg ggcgcggcga acagttgctc gcgtacgtga agacggtgct tgccgcgacg 360
ggcgcgacca aggtcaatct cgtcggccac agccaggcgc ggctcacgtc gcgttacgtc 420
gcggctgtcg ccccgatct cgtcgcgtcg gtgacgacga tcggcacgcc gcatcgcggc 480
tccgagttcg ccgacttcgt gcagggcgtg ctgcatacg atccgaccgg gctttcgtca 540
acggtgatcg cggcgttcgt caatgtgttc ggaatcctca cgagcagcag caacaacacg 600
aaccaggacg cgctcgcggc gctgaagacg ctgacgaccg cccaggccgc cacgtacaac 660
cagaactatc cgagcgcggg ccttgcgcg cggggcagtt gccagaccgg cgcgcccagc 720
gaaaccgtcg gcggcaacac gcatctgctg tattcgtggg ccggcacggc gatccagccg 780
acgatctccg tgttcggtgt cacggcgcgc acggacacta gcacgattcc gctcgtcgat 840
ccggcgaacg cgctcgacc gtcgacgctt gcgctgttcg gcacgggcac ggtgatggtc 900
aaccgcggct cgggccagaa cgacggggtc gtgtcgaat gcagcgcgt gtacggccag 960
gtgctgagca cgagctacaa gtggaacct ctggacgaga tcaaccagtt gctcggcgtg 1020
cgcggcgcga acgcggaaga tccggtcgcg gtgatccga cgcagcga ccgtctgaag 1080
ctggcgggcg tgtaa 1095

I853215

<210> 73
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 73
cgataaggac agcagatggc cagatcgatg cgttc 35

<210> 74
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 74
acgtgccgc atcgattaca cgccccag ctca 35

<210> 75
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 75
tcgatggcgg cacgtgaagg gcgcgcgccg ctggc 35

<210> 76
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 76
acgttgcca gatctgtcgc gcgcggtgcc gccgc 35

<210> 77
<211> 35

I853215

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 77

catcgatctg gccatctgct gtccttatcg tctga

35

<210> 78

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 78

acgttggcca gatctgctgc cggcgaacct cgtgc

35

<210> 79

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 79

catcgatctg gccatgatta cctccgggat ttttt

35

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 80

atggccagat cgatgcgttc

20

<210> 81

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 81

agatctggcc aacgtttgcg ccctgactag

30

<210> 82

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 82

acgttgcca gatctccgc cagttgccg cgagc

35

<210> 83

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 83

acgttgcca gatctaggac ggcgcacacg ccggc

35

<210> 84

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 84

acgttgcca gatctgaaac ggtcgattcc gccag

35

<210> 85

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

I853215

<223> 引子

<400> 85

acgttggcca gatctgcccc gctttttcga acttt

35

<210> 86

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 86

acgttggcca gatctttcga actttacttt ttcga

35

<210> 87

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 87

acgttggcca gatctacttt ttcgatttcg ttcgt

35

<210> 88

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 88

acgttggcca gatcttttcg ttcgttaaatt ttcga

35

<210> 89

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

I853215

<400> 89
acgttggcca gatcttaaatt ttcgaattcg aacat 35

<210> 90
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 90
acgttggcca gatctattcg aacatttcgt gtca 35

<210> 91
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 91
acgttggcca gatctcgttc gagcgtaccg acaag 35

<210> 92
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 92
acgttggcca gatctccgcc tcgcgggggc agcat 35

<210> 93
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 93
acgttggcca gatctttctc tatcccggat gccgg 35

<210> 94
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 94
acgttggcca gatctcggat gccggcattg ttggc 35

<210> 95
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 95
acgttggcca gatctcattg ttggctccgg ggaaa 35

<210> 96
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 96
acgttggcca gatcttccgg ggaaacagtg ttttc 35

<210> 97
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 97
acgttggcca gatctcagtg ttttcgetct ttcatt 35

I853215

<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 98
atgacctcga ttagcaaacg 20

<210> 99
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 99
ttggccagtg tattcgtcc tgttccag 28

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種蛋白質之生產方法，其係生產藉由目標基因編碼之蛋白質之方法，

包括於伯克氏菌(*Burkholderia*)屬細菌中表現目標基因之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有選自由 BSFP_068740、BSFP_068730 及 BSFP_068720 所組成之群中之1個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中基因BSFP_068740包含以下(i)~(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號1之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號1之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號1之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號1具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號2之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號2具有至少80%以上之序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中基因BSFP_068730包含以下(i)~(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號3之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號3之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號3之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號3具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建

物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號4之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號4具有至少80%以上之序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

【請求項4】

如請求項1之方法，其中基因BSFP_068720包含以下(i)~(viii)中之任一DNA：

(i)包含序列編號5之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號5之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iii)包含序列編號5之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌

菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(iv)包含與序列編號5具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(v)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列；

(vi)可與包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列，藉由該DNA編碼之蛋白質具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；

(vii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含序列編號6之胺基酸序列中1個或數個胺基酸缺失、置換或附加而成之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能；或，

(viii)包含編碼蛋白質之鹼基序列之DNA，該蛋白質包含與序列編號6具有至少80%以上之序列同一性之胺基酸序列，且具有減少伯克氏菌屬細菌中之表現構建物之拷貝數、或降低表現構建物之穩定性之功能。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之方法，其中目標基因以可表現之方式連結於表現構建物。

【請求項6】

如請求項2至4中任一項之方法，其中表現構建物係表現載體。

【請求項7】

如請求項6之方法，其中表現構建物係可於伯克氏菌屬細菌中複製之質體。

【請求項8】

如請求項7之方法，其中質體係廣泛宿主載體。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中廣泛宿主載體係pBBR122、pSa或RK2。

【請求項10】

如請求項2至4中任一項之方法，其中表現構建物包含控制目標基因之表現之啟動子。

【請求項11】

如請求項10之方法，其中啟動子源自伯克氏菌屬細菌。

【請求項12】

如請求項1至4中任一項之方法，其中啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號7中連續的超過80個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號8之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號8之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號8之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號8具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【請求項14】

如請求項1至4中任一項之方法，其中啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號9中連續的超過100個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號10之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號10之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號10之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號10具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【請求項16】

如請求項1至4中任一項之方法，其中目標基因編碼酯酶。

【請求項17】

如請求項16之方法，其中編碼酯酶之基因包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號11~13之任一鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號11~13之任一鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性；

(iii)包含序列編號11~13之任一鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性；或，

(iv)包含與序列編號11~13之任一鹼基序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有酯酶活性。

【請求項18】

如請求項1至4中任一項之方法，其中表現構建物包含編碼摺疊酶之DNA。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中編碼摺疊酶之DNA包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號14~16之任一鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號14~16之任一鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性；

(iii)包含序列編號14~16之任一鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性；或，

(iv)包含與序列編號14~16之任一鹼基序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列之DNA，藉由該DNA編碼之蛋白質具有摺疊酶活性。

【請求項20】

如請求項1至4中任一項之方法，其中目標基因進而編碼訊息序列。

【請求項21】

如請求項1至4中任一項之方法，其中伯克氏菌屬細菌係伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia stabilis*)。

【請求項22】

一種伯克氏菌屬細菌之變異株，其以選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因之表現或

該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制之方式修飾，

該變異株包含表現構建物，且表現構建物包含控制目標基因之表現之啟動子。

【請求項23】

如請求項22之變異株，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號7之鹼基序列中連續的超過80個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號7中連續的超過80個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【請求項24】

如請求項23之變異株，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號8之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號8之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號8之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號8具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【請求項25】

如請求項22之變異株，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列且具有啟動子活性之DNA；

(ii)可與包含與序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號9之鹼基序列中連續的超過100個鹼基之序列之1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；或，

(iv)包含與序列編號9中連續的超過100個鹼基之序列具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA。

【請求項26】

如請求項25之變異株，其中上述啟動子包含以下(i)~(iv)中之任一DNA：

(i)包含序列編號10之鹼基序列之DNA；

(ii)可與包含與序列編號10之鹼基序列互補之鹼基序列之DNA於嚴格之條件下雜交且具有啟動子活性之DNA；

(iii)包含序列編號10之鹼基序列中1個或數個鹼基缺失、置換或附加而成之鹼基序列且具有啟動子活性之DNA；

(iv)包含與序列編號10具有至少80%以上之序列同一性之鹼基序列且

具有啟動子活性之DNA。

【請求項27】

一種表現構建物之維持方法，其係於伯克氏菌屬細菌中維持表現構建物之方法，

包括培養包含表現構建物之伯克氏菌屬細菌之步驟，該伯克氏菌屬細菌不具有選自由BSFP_068740、BSFP_068730及BSFP_068720所組成之群中之1個或複數個基因，或者該基因之表現或該基因編碼之蛋白質之表現受到抑制。

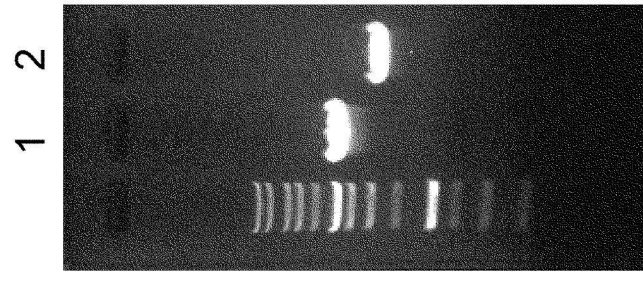
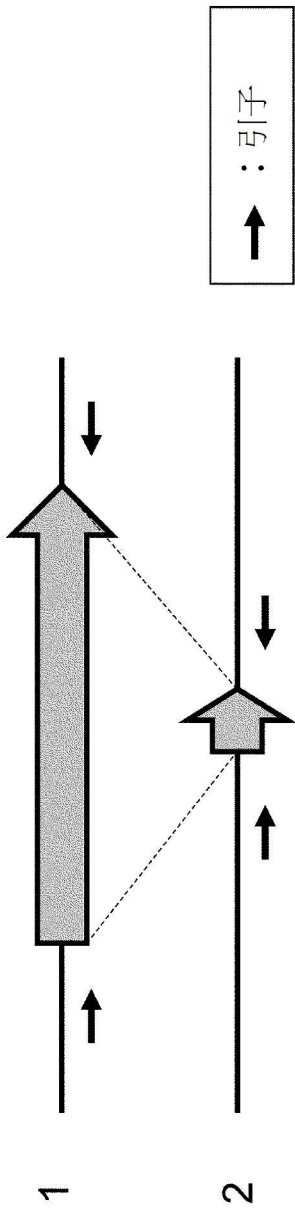
【請求項28】

如請求項27之方法，其中於培養後之伯克氏菌屬細菌中，表現構建物之拷貝數增大，或表現構建物之穩定性增大。

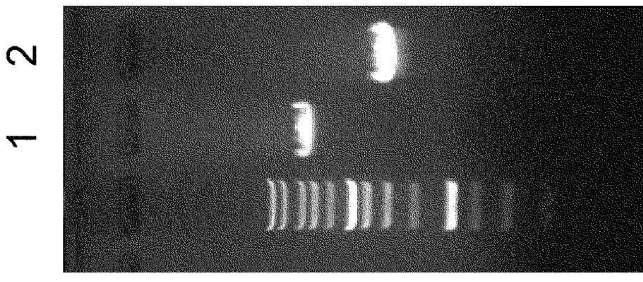
【發明圖式】



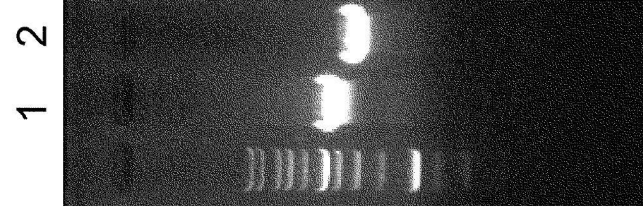
【圖1】



1.WT
2. BSFP_068720 破壞株

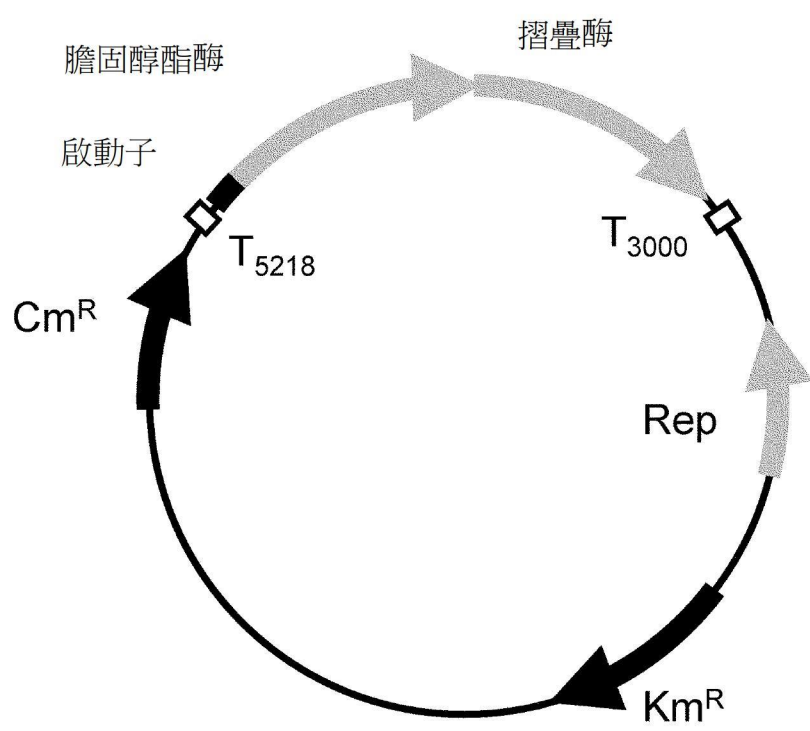


1.WT
2. BSFP_068730 破壞株



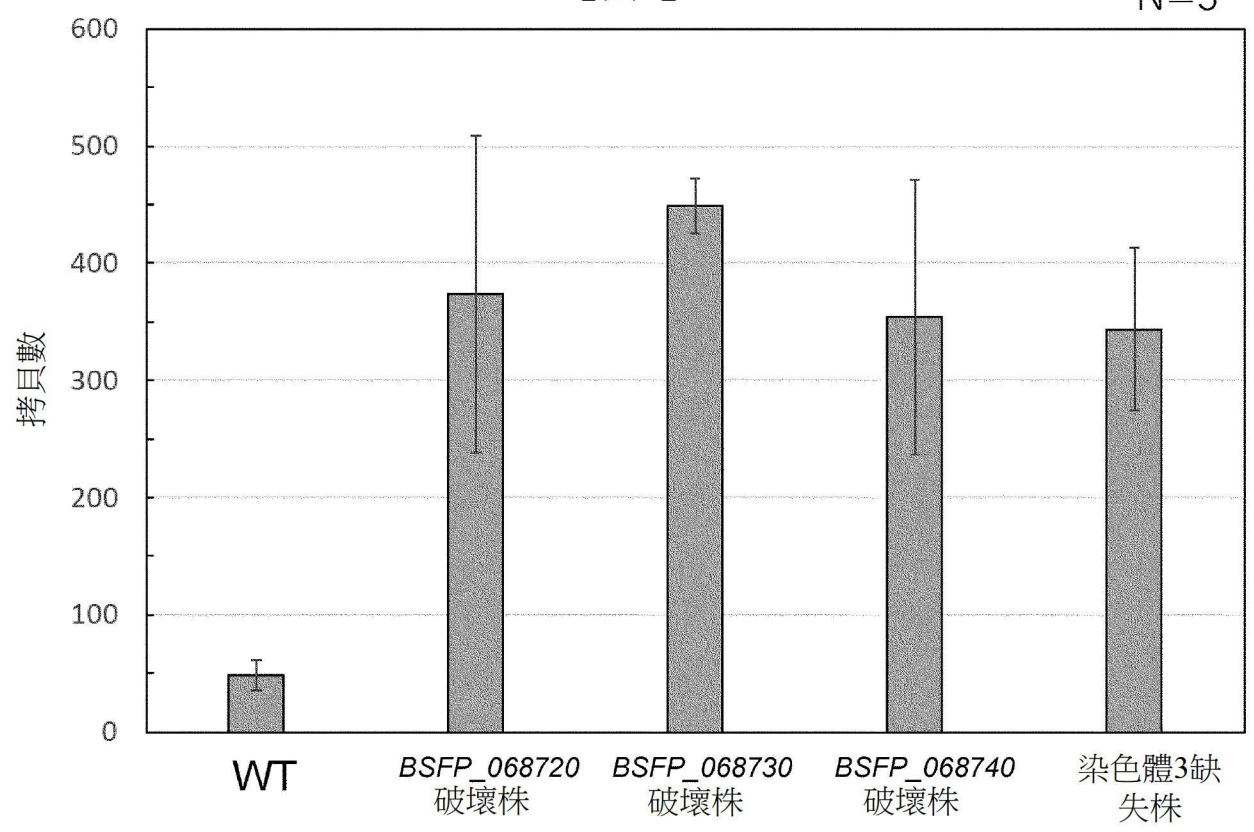
1.WT
2. BSFP_068740 破壞株

【圖2】

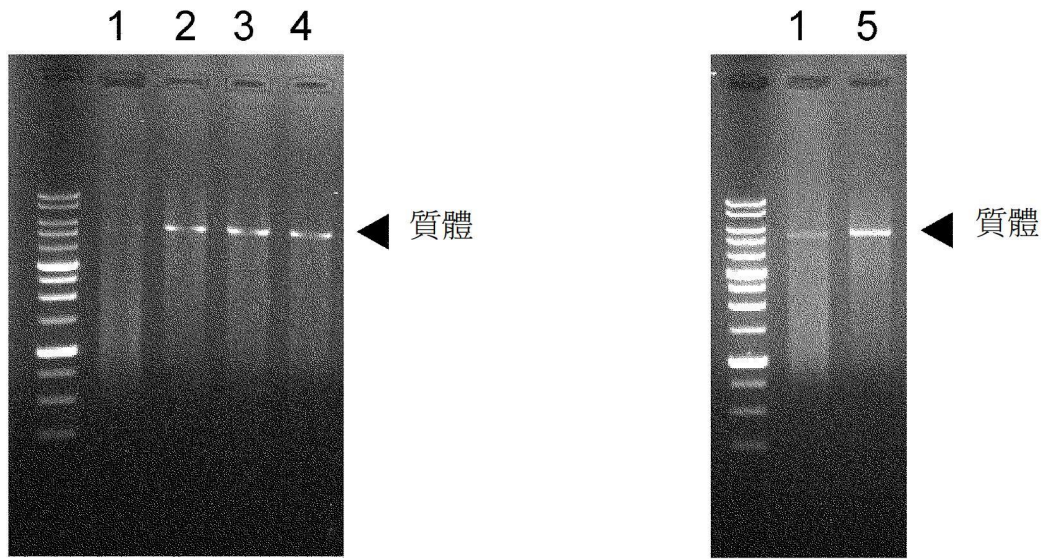


【圖3】

N=3



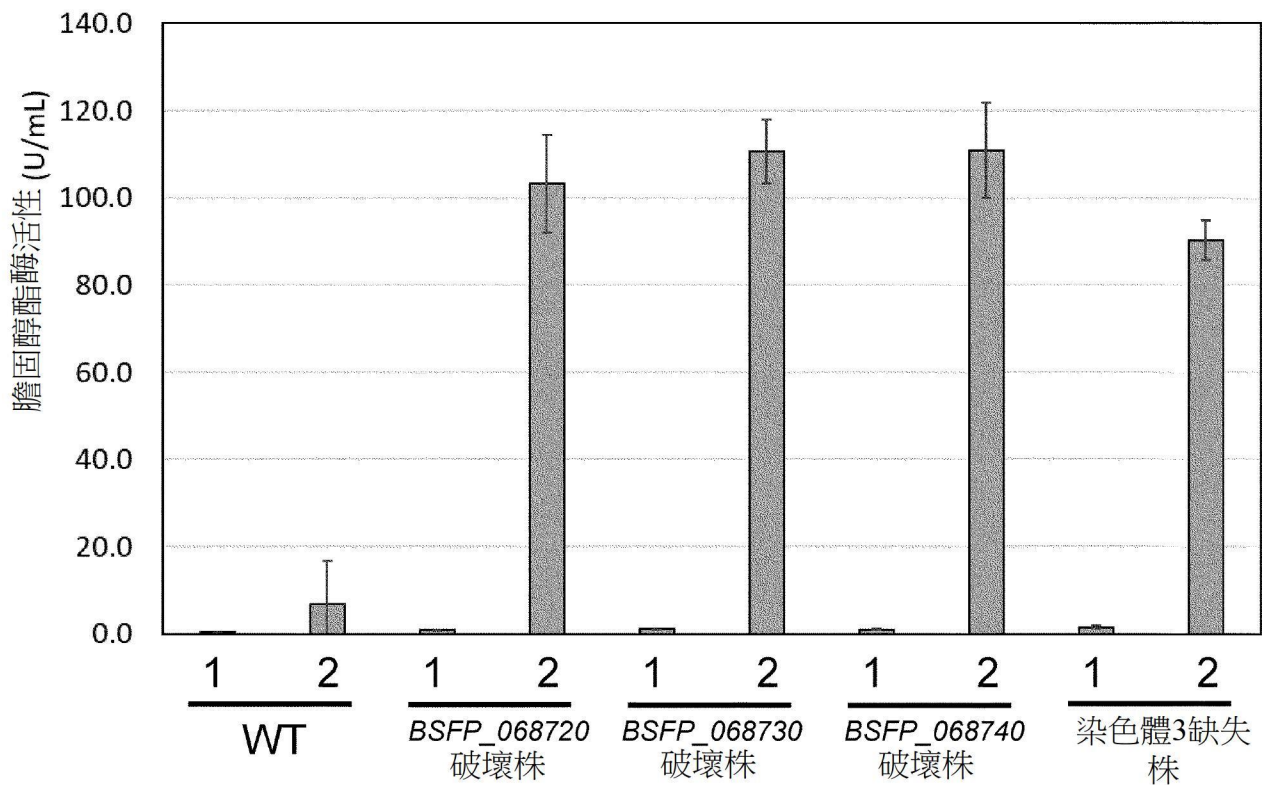
【圖4】



1. WT-pBBR122
2. *BSFP_068720* 破壞株 -pBBR122
3. *BSFP_068730* 破壞株 -pBBR122
4. *BSFP_068740* 破壞株 -pBBR122
5. 染色體3缺失株 -pBBR122

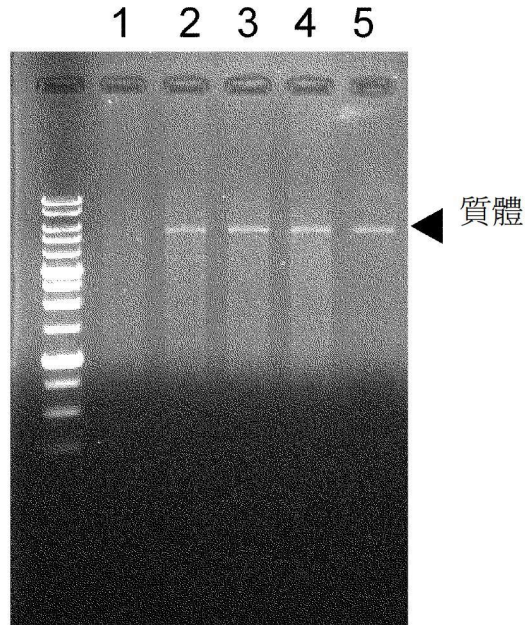
【圖5】

N=3



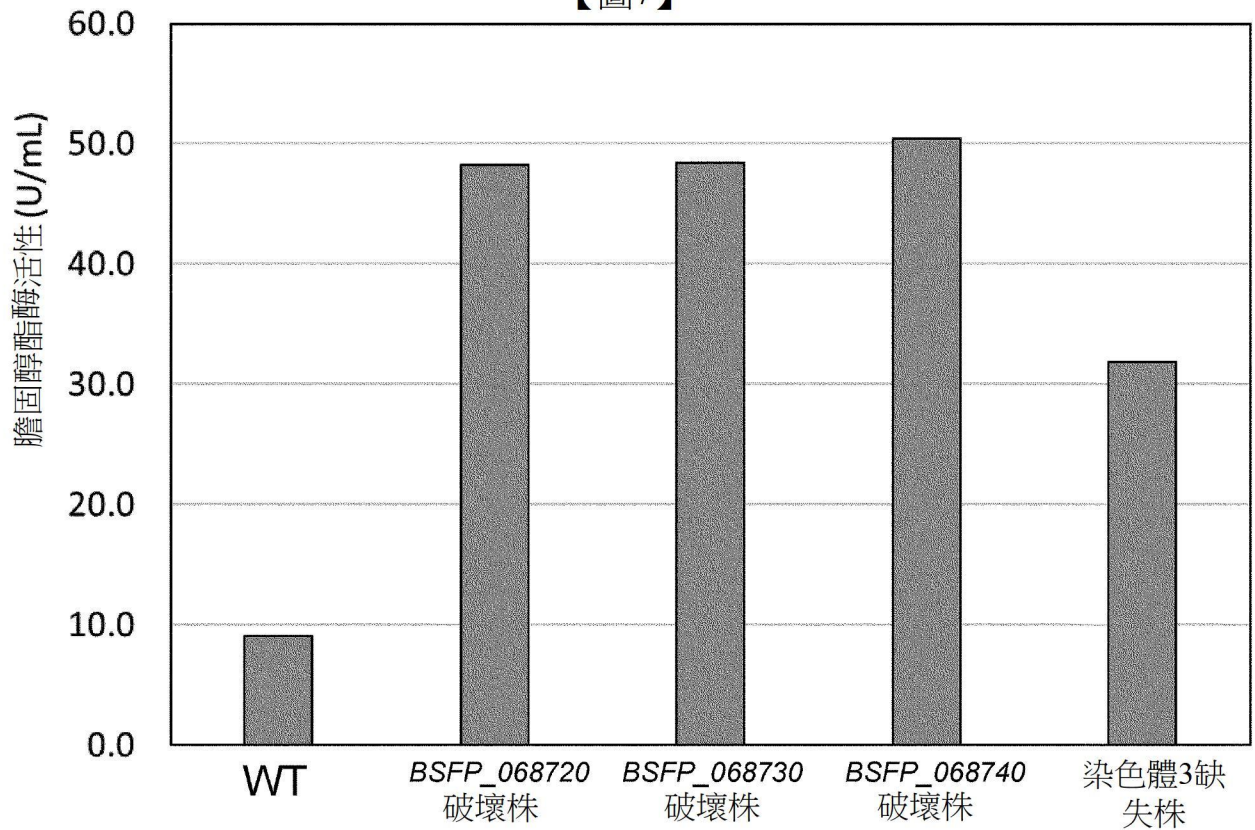
- 1, pBBR122
- 2, pBBR122-182

【圖6】



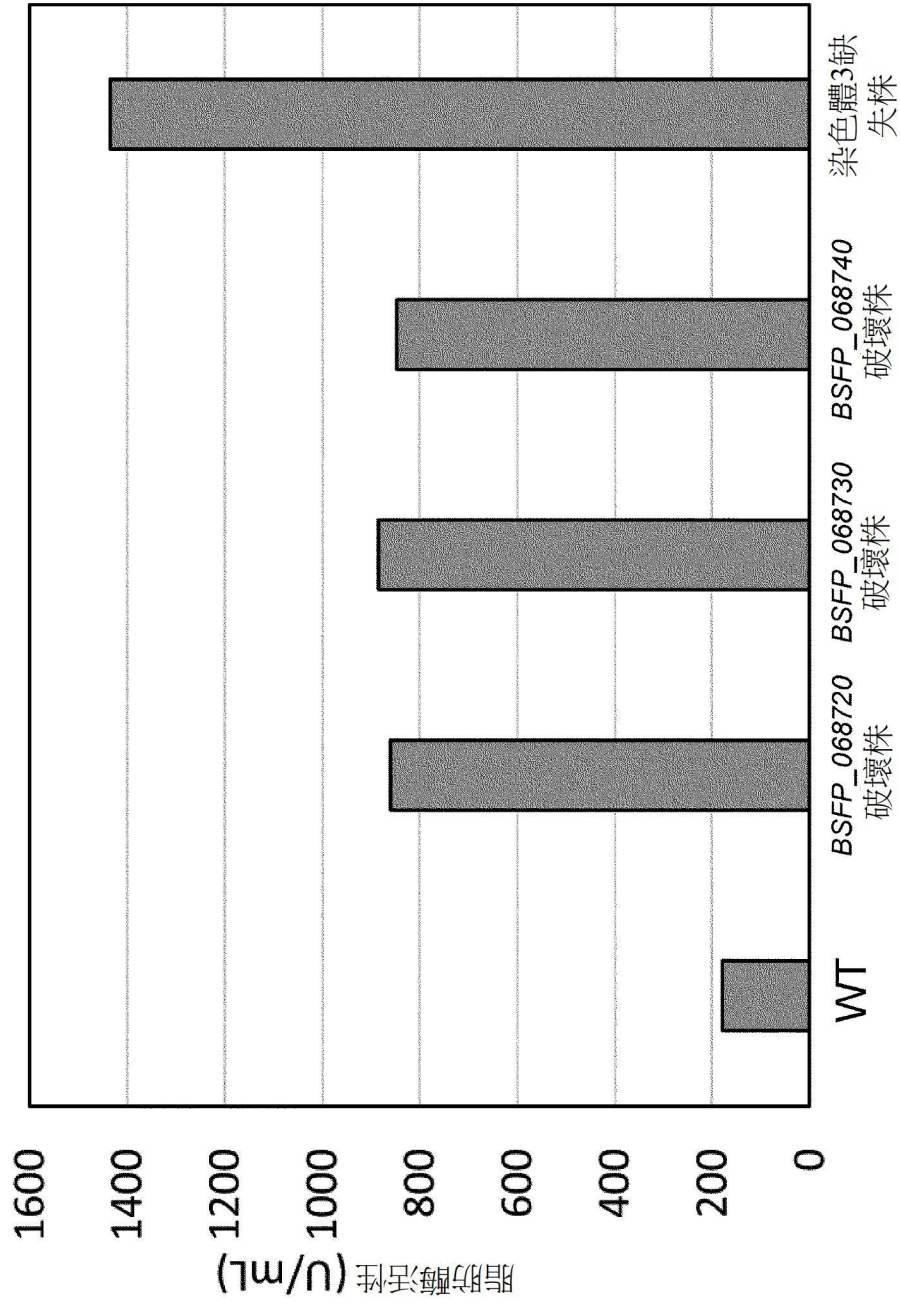
1. WT-pSa
2. *BSFP_068720* 破壞株 -pSa
3. *BSFP_068730* 破壞株 -pSa
4. *BSFP_068740* 破壞株 -pSa
5. 染色體3缺失株 -pSa

【圖7】



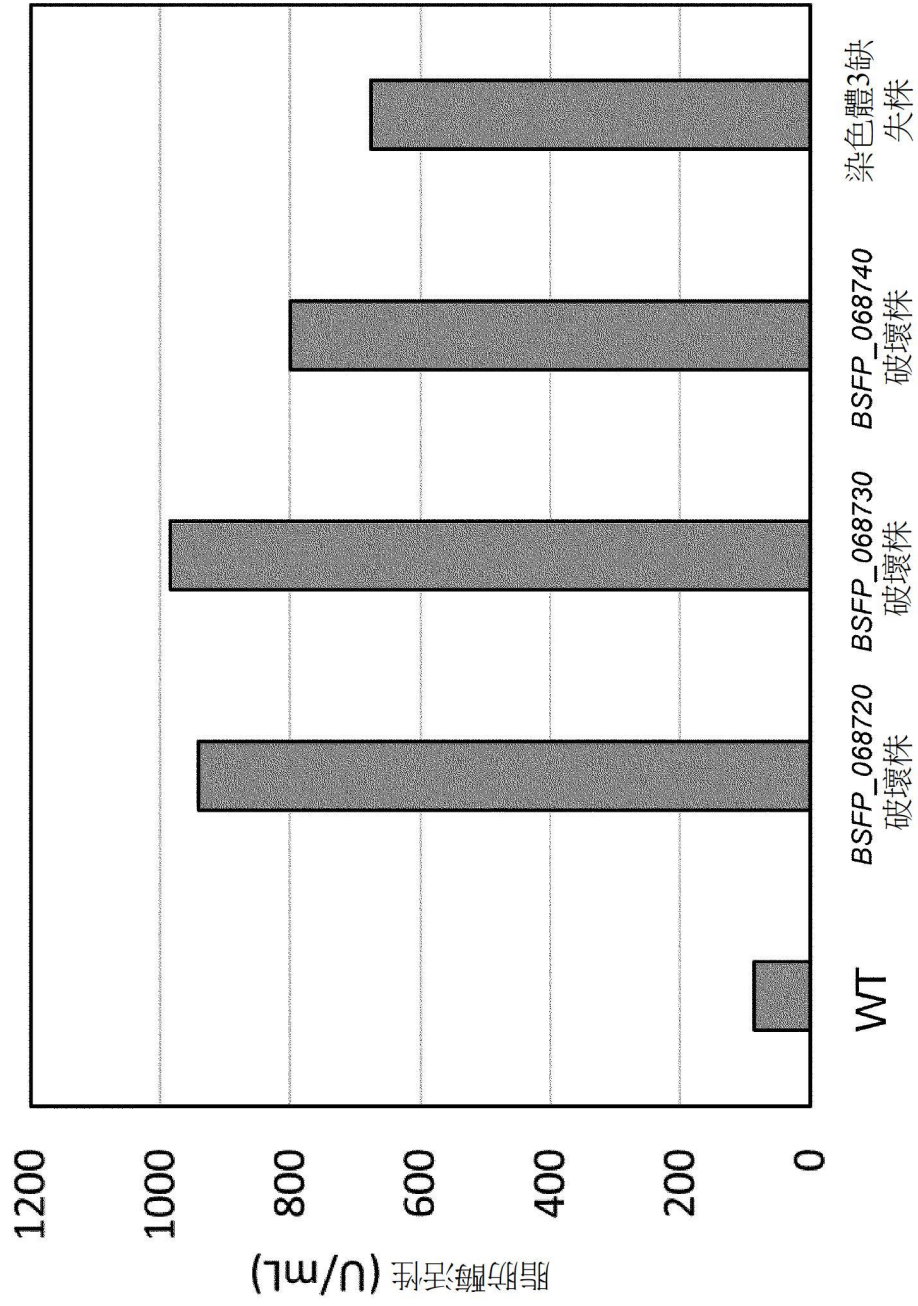
【圖8】

BcLip 生產量

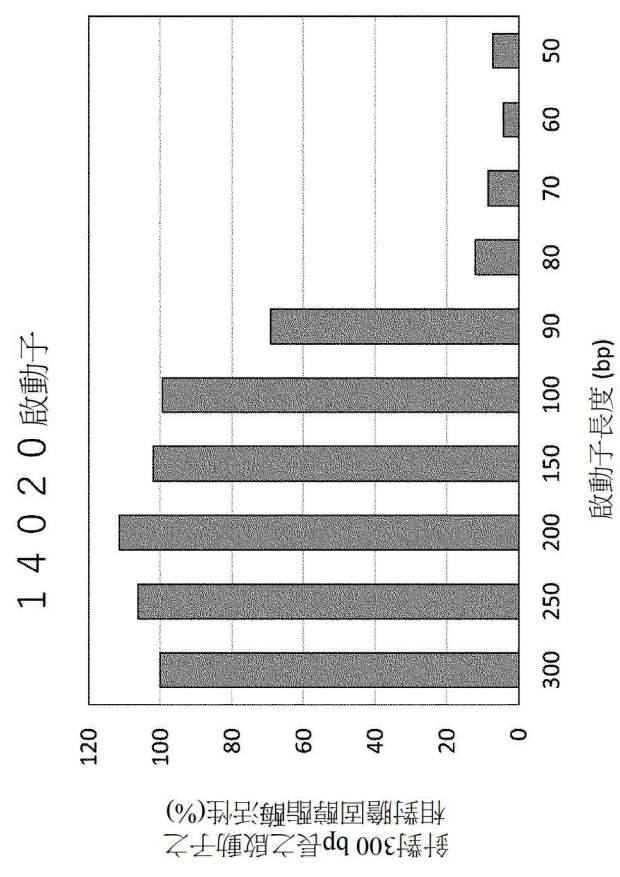
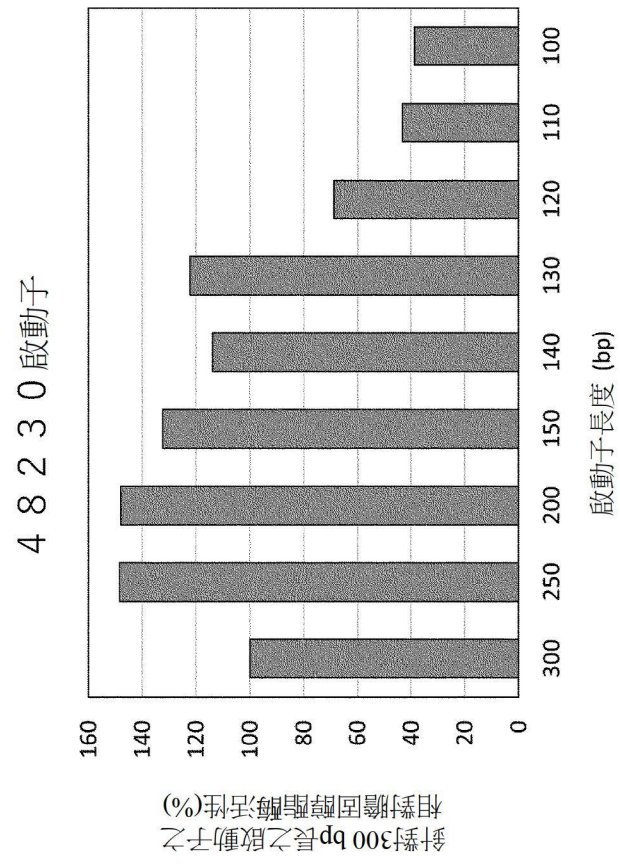


【圖9】

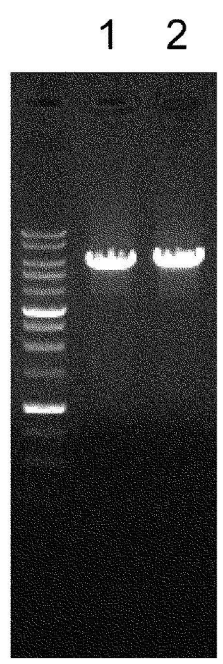
BpLip 生產量



【圖10】



【圖11】



1. 伯克霍爾德氏菌
2. 斯沃蘭提卡伯克霍爾德氏菌

【圖12】