



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101490251 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 29

(21) 申请号 200780027157. 1  
 (22) 申请日 2007. 07. 12  
 (30) 优先权数据  
 2006125964 2006. 07. 19 RU  
 60/885, 671 2007. 01. 19 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2009. 01. 19  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/JP2007/064304 2007. 07. 12  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02008/010565 EN 2008. 01. 24  
 (73) 专利权人 味之素株式会社  
 地址 日本东京都  
 (72) 发明人 利奥尼德·R·普蒂特辛  
 伊里纳·B·奥尔特曼  
 韦罗妮卡·A·科特利亚罗瓦  
 奥尔佳·N·莫科瓦  
 塔蒂亚纳·A·亚姆波尔斯卡亚  
 尤里·I·科兹洛夫 寺下优  
 白田佳弘 松井和彦  
 (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
 11105  
 代理人 史悦

(51) Int. Cl.  
*C12N 9/04*(2006. 01)  
*C12P 13/04*(2006. 01)  
*C12P 13/06*(2006. 01)  
*C12P 13/08*(2006. 01)  
*C12P 13/10*(2006. 01)  
*C12P 13/14*(2006. 01)  
*C12P 13/22*(2006. 01)  
*C12P 13/24*(2006. 01)

(56) 对比文件  
 US 20060063238 A1, 2006. 03. 23, 说明书  
**【0008】-【0009】、【0023】、【0031】、【0043】、【0045】**.  
 US 20060063238 A1, 2006. 03. 23, 说明书  
**【0008】-【0009】、【0023】、【0031】、【0043】、【0045】**.  
 Carol A. 等. Aerobic Activity of……  
 Amino Acid. 《Journal of Bacteriology》. 2000,  
 第 182 卷 (第 21 期), 6049-6054.

审查员 樊颖

权利要求书1页 说明书35页  
序列表54页 附图9页

(54) 发明名称  
 使用肠杆菌科细菌产生 L- 氨基酸的方法

(57) 摘要  
 描述了一种使用肠杆菌科的细菌产生 L- 氨基酸的方法, 例如 L- 苏氨酸、L- 赖氨酸、L- 组氨酸、L- 苯丙氨酸、L- 精氨酸、L- 色氨酸或 L- 谷氨酸, 其中已经对所述细菌进行了修饰以增强由 adhE 基因编码的野生型醇脱氢酶或对有氧失活有抗性的突变醇脱氢酶的活性。

CN 101490251 B

1. 一种用于通过发酵产生L-氨基酸的方法,其包括:

A) 在有氧培养条件下在含有乙醇的培养基中培养具有醇脱氢酶的肠杆菌科的产生L-氨基酸的细菌,和

B) 从培养基中分离L-氨基酸,

其中编码所述醇脱氢酶的基因在非天然启动子的调控下表达,所述启动子在有氧培养条件下有功能并由此增强了醇脱氢酶的活性,和

其中所述醇脱氢酶对有氧失活有抗性,

其中所述醇脱氢酶由SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列组成,只是位置568的谷氨酸残基被替代为不是天冬氨酸残基的另一种氨基酸残基,

其中所述醇脱氢酶具有至少一个额外的突变,该突变能够改进所述细菌在含有乙醇作为唯一碳源的液体培养基中的生长,其中所述额外的突变选自下组:

A) 用缬氨酸残基替代SEQ ID NO:2中位置566的苯丙氨酸残基;和

B) 用甘氨酸残基、缬氨酸残基、半胱氨酸残基、丝氨酸残基和缬氨酸残基分别替代SEQ ID NO:2中分别在位置22、236、461、554和786的谷氨酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基、异亮氨酸残基和丙氨酸残基。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述非天然启动子选自下组:P<sub>tac</sub>、P<sub>lac</sub>、P<sub>trp</sub>、P<sub>trc</sub>、P<sub>R</sub>和P<sub>L</sub>。

3. 根据权利要求1的方法,其中所述醇脱氢酶源于选自下组的细菌:大肠杆菌、胡萝卜软腐欧文氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、弗氏志贺氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、*Pantoea ananatis*、植物乳杆菌和乳酸乳球菌。

4. 根据权利要求1的方法,其中所述醇脱氢酶由SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列组成,只是位置568的谷氨酸残基被替代为赖氨酸残基。

5. 根据权利要求1的方法,其中所述产生L-氨基酸的细菌属于选自下组的属:埃希氏菌属、肠杆菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏菌属、泛菌属、普罗威登斯菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、志贺氏菌属和摩根氏菌属。

6. 根据权利要求1-5中任一项的方法,其中所述L-氨基酸选自下组:L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸和L-亮氨酸。

## 使用肠杆菌科细菌产生L-氨基酸的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物工业,具体涉及通过使用具有增强的醇脱氢酶活性的细菌进行发酵来产生L-氨基酸的方法,所述L-氨基酸如L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸和L-亮氨酸。

### 背景技术

[0002] 常规而言,在工业上通过利用从天然来源获得的微生物菌株或其变体的发酵方法产生L-氨基酸。通常对微生物进行修饰以提高L-氨基酸的产率(production yield)。

[0003] 已经报道过许多提高L-氨基酸产率的技术,包括用重组DNA转化微生物(美国专利No.4,278,765)。用于提高产率的其它技术包括增加氨基酸生物合成中涉及的酶的活性和/或使目标酶对产生的L-氨基酸的反馈抑制脱敏(美国专利Nos.4,346,170、5,661,012和6,040,160)。

[0004] 通过优化期望的化合物的主要生物合成途径,能够实现对产生L-氨基酸的菌株的进一步改进。通常这通过为细菌补充越来越大量的碳源(如糖,例如葡萄糖)来实现。无论通过PTS的葡萄糖转运的效率为何,但是在高产菌株中对碳源的获取(access)却仍可能不足。另一种增加产生L-氨基酸的菌株的生产力和降低目标L-氨基酸成本的方法是使用替代性(alternative)的碳源,如醇,例如乙醇。

[0005] 大肠杆菌的醇脱氢酶(乙醇氧化还原酶,AdhE)是一种多功能酶,其通过两个连续的NADH-依赖性乙酰辅酶A还原反应,以及使将丙酮酸切割成乙酰辅酶A和甲酸的丙酮酸甲酸裂合酶来催化乙醇的发酵生产。

[0006] AdhE在葡萄糖存在下在厌氧生长的过程中大量合成(约 $3 \times 10^4$ 拷贝每细胞),并形成称为螺旋体(spirosome)的螺旋结构,这些螺旋结构大约0.22 $\mu$ m长,含有40-60个AdhE分子(Kessler,D.,Herth,W.和Knappe,J.,J.Biol.Chem.,267,18073-18079(1992))。当将大肠杆菌细胞培养从厌氧条件转换至有氧条件时,adhE基因的转录降低,并维持在于厌氧条件下所得范围的10%以内(Chen,Y.M.和Lin,E.C.C.,J.Bacteriol.173,8009-8013(1991); Leonardo,M.R.,Cunningham,P.R.和Clark,D.P.,J.Bacteriol.175,870-878(1993); Mikulskis,A.,Aristarkhov,A.和Lin,E.C.C.,J.Bacteriol.179,7129-7134(1997); Membrillo-Hernandez,J.和Lin,E.C.C.,J.Bacteriol.181,7571-7579(1999))。翻译也受到调节,并且需要RNA酶III(Membrillo-Hernandez,J.和Lin,E.C.C.,J.Bacteriol.181,7571-7579(1999); Aristarkhov,A.等,J.Bacteriol.178,4327-4332(1996))。已将AdhE鉴定为大肠杆菌细胞经受过氧化氢应激(hydrogen peroxide stress)时的主要靶物之一(Tamarit,J.,Cabisco,E.和Ros,J.,J.Biol.Chem.273,3027-3032(1998))。

[0007] 尽管由AdhE催化的两个NADH-偶联反应具有可逆性,野生型大肠杆菌也无法在乙醇作为唯一碳源和能源存在时生长,因为adhE基因在有氧条件下以低水平转录(Chen,Y.M.和Lin,E.C.C.,J.Bacteriol.73,8009-8013(1991); Leonardo,M.R.,Cunningham,P.R.& Clark,D.P.,J.Bacteriol.175870-878(1993)),并且在有氧代谢过程中AdhE蛋白的半衰期

因金属催化的氧化(MCO)而缩短。

[0008] 已经分离并表征了能够在乙醇作为唯一碳源和能源时进行有氧生长的大肠杆菌突变体(在37°C,具有取代Ala267Thr的突变体,在乙醇存在下生长,倍增时间为240分钟;具有取代Ala267Thr和Glu568Lys的变体,倍增时间为90分钟)(Membrillo-Hernandez, J.等, J. Biol. Chem. 275, 33869-33875(2000); Holland-Staley, C.A. 等, J. Bacteriol. 182, 6049-6054(2000))。显然,当按照与生理上的方向相反的方向催化两个连续反应时,对于野生型 AdhE而言乙酰辅酶A的形成是速率受限的。作为通过AdhE中的A267T取代来改进 $V_{max}$ 的交换(tradeoff)是酶的热稳定性降低和对MCO损坏的敏感性增加。AdhE中的第二氨基酸取代E568K(A267T/E568K)部分恢复了蛋白质稳定性和对MCO损坏的抗性,而未进一步改进在底物氧化中的催化效率。

[0009] 然而,迄今尚未有报道使用肠杆菌科(Enterobacteriaceae family)细菌通过在含有乙醇的培养基中发酵来增加L-氨基酸的产生,所述肠杆菌科细菌具有活性增强的对有氧失活(aerobic inactivation)有抗性的天然醇脱氢酶或突变醇脱氢酶。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的目的包括提高产生L-氨基酸的菌株的生产力,和提供使用这些菌株产生非芳族或芳族L-氨基酸的方法。

[0012] 通过发现在处于有氧培养条件下有功能的启动子的调控下表达编码醇脱氢酶的天然或突变adhE基因使L-氨基酸(例如,L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸和/或L-亮氨酸)的产生增强而达到了该目的。

[0013] 本发明的目的是提供用于产生L-氨基酸的方法,其包括:

[0014] A)在含有乙醇的培养基中培养具有醇脱氢酶的肠杆菌科的产生L-氨基酸的细菌,和

[0015] B)从培养基中分离L-氨基酸,

[0016] 其中编码所述醇脱氢酶的基因在非天然启动子的调控下表达,所述非天然启动子在有氧培养条件下有功能。

[0017] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述非天然启动子选自下组: $P_{tac}$ 、 $P_{Iac}$ 、 $P_{trp}$ 、 $P_{trc}$ 、 $P_R$ 和 $P_L$ 。

[0018] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述醇脱氢酶对有氧失活有抗性。

[0019] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述醇脱氢酶源于选自下组的细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、*Pantoea ananatis*(菠萝泛菌)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。

[0020] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述醇脱氢酶包含SEQ ID NO: 2中所列的氨基酸序列,只是位置568的谷氨酸残基被替代为另一种除天冬氨酸残基之外的氨基酸残基。

[0021] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述醇脱氢酶包含SEQ ID NO: 2中所列的氨基酸序列,只是位置568的谷氨酸残基被替代为赖氨酸残基。

[0022] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述醇脱氢酶具有至少一个额外的突变,该突变能够改进所述细菌在含有乙醇作为唯一碳源的液体培养基中的生长。

[0023] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述额外的突变选自下组:

[0024] A)用另一种氨基酸残基替代SEQ ID NO:2中在位置560的谷氨酸残基;

[0025] B)用另一种氨基酸残基替代SEQ ID NO:2中在位置566的苯丙氨酸残基;

[0026] C)用其它氨基酸残基替代SEQ ID NO:2中分别在位置22、236、461、554和786的谷氨酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基、异亮氨酸残基和丙氨酸残基;和

[0027] D)以上各项的组合。

[0028] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述额外的突变选自下组:

[0029] A)用赖氨酸残基替代SEQ ID NO:2中在位置560的谷氨酸残基;

[0030] B)用缬氨酸残基替代SEQ ID NO:2中在位置566的苯丙氨酸残基;

[0031] C)用甘氨酸残基、缬氨酸残基、半胱氨酸残基、丝氨酸残基和缬氨酸残基分别替代SEQ ID NO:2中在位置22、236、461、554和786的谷氨酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基、异亮氨酸残基和丙氨酸残基;和

[0032] D)以上各项的组合。

[0033] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述细菌属于选自下组的属:埃希氏菌属(*Escherichia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、泛菌属(*Pantoea*)、普罗威登斯菌属(*Providencia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、志贺氏菌属(*Shigella*)和摩根氏菌属(*Morganella*)。

[0034] 本发明进一步的目的是提供如上所述的方法,其中所述L-氨基酸选自下组:L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸和L-亮氨酸。

[0035] 优选实施方案详述

[0036] 醇脱氢酶是Fe<sup>2+</sup>-依赖性多功能蛋白质,其在N-末端具有乙醛-辅酶A脱氢酶活性,在C-末端具有铁依赖性醇脱氢酶活性,和丙酮酸甲酸裂合酶失活酶(deactivase)活性。同物异名包括B1241、AdhC和Ana。在有氧条件下,在有氧代谢过程中的活性AdhE蛋白的半衰期因金属催化的氧化而缩短。

[0037] 在本发明中,短语“醇脱氢酶的活性”的意思是催化醇变成醛或酮的NAD-依赖性氧化反应的活性。醇脱氢酶(EC 1.1.1.1)良好地作用于乙醇、正丙醇和正丁醇。醇脱氢酶的活性能够通过例如由Membrillo-Hernandez, J. 等描述的方法(*J. Biol. Chem.* 275, 33869-33875(2000))来检测和度量。

[0038] 醇脱氢酶由adhE基因编码,并且可以使用源自或天然存在于(native to)属于以下菌属的细菌的任何adhE基因作为本发明中的醇脱氢酶基因:埃希氏菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、泛菌属、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和乳球菌属。adhE基因的来源的具体实例包括细菌菌株,如大肠杆菌、胡萝卜软腐欧文氏菌、肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、鼠伤寒沙门氏菌、弗氏志贺氏菌、假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、*Pantoea ananatis*、植物乳杆菌和乳酸乳球菌。已经阐明了编码大肠杆菌醇脱氢酶的野生型adhE基因(与GenBank登录号NC\_000913.2, gi:49175990的序列中编号1294669-1297344互补的核苷酸号)。adhE基因位于大

肠杆菌K-12染色体上的y<sub>chG</sub>和y<sub>chE</sub> ORF之间。也已经阐明编码醇脱氢酶的其它adhE基因：来自胡萝卜软腐欧文氏菌的adhE基因(GenBank登录号NC\_004547.2;gi:50121254的序列中的核苷酸号2634501-2637176);来自肠沙门氏菌的adhE基因(GenBank登录号NC\_004631.1;gi:29142095的序列中的核苷酸号1718612-1721290);来自鼠伤寒沙门氏菌的adhE基因(GenBank登录号U68173.1;gi:1519723的序列中的核苷酸号1-2637);来自弗氏志贺氏菌的adhE基因(与GenBank登录号NC\_004741.1;gi:30062760的序列中的核苷酸号1290816-1293491互补的核苷酸号);来自假结核耶尔森氏菌的adhE基因(与GenBank登录号NC\_006155.1;gi:51596429的序列中的核苷酸号2478099-2480774互补的核苷酸号);来自Pantoea ananatis的adhE基因(SEQ ID NO:29);来自植物乳杆菌的adhE基因(UniProtKB Entry:Q88RY9\_LACPL);来自乳酸乳球菌MG1363的adhE基因(EMBL登录号AJ001007);等等(见图2)。来自大肠杆菌的adhE基因的核苷酸序列由SEQ ID NO:1表示。由这种adhE基因编码的氨基酸序列由SEQ ID NO:2表示。

[0039] 因此,能够使用基于来自大肠杆菌染色体的基因的已知核苷酸序列制备的引物通过PCR(聚合酶链式反应;参见White,T.J.等.,Trends Genet.,5,185(1989))获得adhE基因。编码来自其它微生物的醇脱氢酶的基因能够以类似的方式获得。

[0040] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自大肠杆菌的adhE基因的示例:

[0041] (A)具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的蛋白质;或

[0042] (B)SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。

[0043] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自Pantoea ananatis的adhE基因的示例:

[0044] (A)具有SEQ ID NO:30中所示氨基酸序列的蛋白质;或

[0045] (B)SEQ ID NO:30中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。

[0046] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自弗氏志贺氏菌的adhE基因的示例:

[0047] (A)具有SEQ ID NO:53中所示氨基酸序列的蛋白质;或

[0048] (B)SEQ ID NO:53中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。

[0049] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自鼠疫耶尔森氏菌的adhE基因的示例:

[0050] (A)具有SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列的蛋白质;或

[0051] (B)SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。

[0052] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自胡萝卜软腐欧文氏菌的adhE基因的示例:

[0053] (A)具有SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列的蛋白质;或

[0054] (B)SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。

[0055] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自鼠伤寒沙门氏菌的adhE基因的示例:

[0056] (A)具有SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列的蛋白质;或

[0057] (B)SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。

[0058] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自植物乳杆菌的adhE基因的示例:

[0059] (A)具有SEQ ID NO:57中所示氨基酸序列的蛋白质;或

- [0060] (B)SEQ ID NO:57中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。
- [0061] 用编码以下的蛋白质(A)或(B)的DNA作为源自乳酸乳球菌的adhE基因的示例:
- [0062] (A)具有SEQ ID NO:58中所示氨基酸序列的蛋白质;或
- [0063] (B)SEQ ID NO:58中所示氨基酸序列的变体蛋白,该变体蛋白具有醇脱氢酶活性。
- [0064] 短语“变体蛋白”如用于本发明中意思是序列中具有变化的蛋白质,无论这些变化是氨基酸的缺失、插入、添加或取代,但是所述蛋白质仍保留可用水平的醇脱氢酶活性。变体蛋白中变化的数量依赖于蛋白质三维结构中的位置或氨基酸残基的类型。相对于蛋白质(A)而言,变化的数量可为1-30,优选1-15,和更优选1-5。变体中的这些变化是保留蛋白质功能的保守突变。换句话说,这些变化可以发生在对于蛋白质功能而言非关键性的蛋白质区域中。这是因为一些氨基酸彼此具有高同源性,所以这样的变化不影响三维结构或活性。因此,只要保持醇脱氢酶活性,蛋白质变体(B)可以是一种与SEQ ID NO.2中所示醇脱氢酶的完整氨基酸序列具有不少于70%,优选不少于80%,更优选不少于90%,并最优选不少于95%同一性的蛋白质变体。
- [0065] 两个氨基酸序列之间的同源性能够使用公知的方法来测定,例如,计算以下三种参数的计算机程序BLAST 2.0:得分、同一性和相似性。
- [0066] 一个或几个氨基酸残基的取代、缺失、插入或添加应为保守突变,从而保持活性。代表性保守突变是保守取代。保守取代的实例包括用Ser或Thr取代Ala,用Gln、His或Lys取代Arg,用Glu、Gln、Lys、His或Asp取代Asn,用Asn、Glu或Gln取代Asp,用Ser或Ala取代Cys,用Asn、Glu、Lys、His、Asp或Arg取代Gln,用Asn、Gln、Lys或Asp取代Glu,用Pro取代Gly,用Asn、Lys、Gln、Arg或Tyr取代His,用Leu、Met、Val或Phe取代Ile,用Ile、Met、Val或Phe取代Leu,用Asn、Glu、Gln、His或Arg取代Lys,用Ile、Leu、Val或Phe取代Met,用Trp、Tyr、Met、Ile或Leu取代Phe,用Thr或Ala取代Ser,用Ser或Ala取代Thr,用Phe或Tyr取代Trp,用His、Phe或Trp取代Tyr,和用Met、Ile或Leu取代Val。
- [0067] 对来自大肠杆菌、弗氏志贺氏菌、*Pantoea ananatis*、鼠疫耶尔森氏菌、胡萝卜软腐欧文氏菌、鼠伤寒沙门氏菌(革兰氏阴性细菌)和植物乳杆菌、乳酸乳球菌(革兰氏阳性细菌)的醇脱氢酶的基本序列(primary sequence)进行比较的数据显示这些蛋白之间高水平的同源性(参见图2)。从这个观点,取代或缺失在全部上述蛋白中都相同的氨基酸残基(用星号标记)对于这些蛋白质的功能可能是重要的。用相似的氨基酸残基替代相似的(用冒号标记的)氨基酸残基而无损于蛋白质活性是可能的。但是对其它非保守氨基酸残基的修饰可能不导致醇脱氢酶活性的改变。
- [0068] 可以获得编码与上述醇脱氢酶基本上相同的蛋白质的DNA,例如,通过修饰编码醇脱氢酶的DNA的核苷酸序列(SEQ ID NO:1),例如通过定点诱变的方式,从而缺失、取代、插入或添加负责特定位点的一个或多个氨基酸残基的核苷酸序列。如上所述修饰的DNA可以通过常规已知的突变处理获得。这些处理包括以羟胺处理编码本发明的蛋白质的DNA,或用UV照射或试剂如N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍或亚硝酸处理含有所述DNA的细菌。
- [0069] 编码与醇脱氢酶基本上相同的蛋白质的DNA可通过在适当的细胞中表达具有如上所述突变的DNA并研究任何表达产物的活性来获得。编码与醇脱氢酶基本上相同的蛋白质的DNA也可以通过如下获得:分离能够在严紧条件下与探针杂交并且编码具有醇脱氢酶活性的蛋白质的DNA,所述探针具有核苷酸序列,该序列包含例如如SEQ ID NO:1所示的核苷

酸序列。本文所提及的“严紧条件”是这样的条件，在该条件下形成所谓的特异性杂合体，并且不形成非特异性杂合体。例如，可以以一些条件作为严紧条件的示例，在所述这些条件下，具有高同源性的DNA，例如具有不低于50%，优选不低于60%，更优选不低于70%，还更优选不低于80%，进一步优选不低于90%，最优选不低于95%的同源性的DNA能够相互杂交；但是具有低于上述同源性的DNA不能相互杂交。可选地，可以以一些条件作为严紧条件的示例，在所述这些条件下，DNA能够在下述盐浓度下杂交，该盐浓度等同于Southern杂交中通常的洗涤条件，即1xSSC, 0.1% SDS, 优选0.1xSSC, 0.1% SDS, 在60°C。洗涤的持续时间依赖于用于印迹的膜的类型，并且通常由制造商推荐。例如，在严紧条件下对于Hybond™ N+尼龙膜(Amersham)推荐的洗涤持续时间是15分钟。优选地，可以进行2至3次洗涤。

[0070] 也可以将SEQ ID NO:1的核苷酸序列的部分序列用作探针。可以使用基于SEQ ID NO:1的核苷酸序列的引物，并使用含有SEQ ID NO:1的核苷酸序列的DNA片段作为模板通过PCR制备探针。当使用长度约300bp的DNA片段作为探针时，用于洗涤的杂交条件包括，例如，50°C, 2x SSC和0.1% SDS。

[0071] 如上所述的核苷酸的取代、缺失、插入或添加也包括天然存在的突变(突变体或变体)，例如，由于细菌的种或者属的多样性而天然存在的突变，并且所述细菌含有醇脱氢酶(, and which contains alcohol dehydrogenase)。

[0072] 野生型醇脱氢酶可能受到金属催化的氧化。尽管可以使用这样的野生型醇脱氢酶，但是对有氧失活有抗性的突变醇脱氢酶在本发明中是优选的。短语“对有氧失活有抗性的突变醇脱氢酶”的意思是在有氧条件下保持其活性的突变醇脱氢酶，或与野生型醇脱氢酶相比活性降低的量可忽略的突变醇脱氢酶。

[0073] 在大肠杆菌adhE基因的情况下，野生型醇脱氢酶包含SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列。SEQ ID NO:2的醇脱氢酶中导致该蛋白质对有氧失活有抗性的突变的实例是用赖氨酸残基替代位置568处的谷氨酸残基。然而，向adhE基因中引入突变(例如在SEQ ID NO:2中的位置568处)可能导致在含有乙醇作为碳源的液体培养基中的生长延缓，在这样的情况下，优选的是突变醇脱氢酶具有能够改进细菌在含有乙醇作为唯一碳源的液体培养基中的生长的至少一个额外突变。例如，当用另一种氨基酸残基替代SEQ ID NO:2的醇脱氢酶中位置568处的谷氨酸残基时，通过引入选自下组的额外突变，改进了大肠杆菌的生长：

[0074] A)用另一种氨基酸残基，例如赖氨酸残基，替代SEQ ID NO:2中在位置560的谷氨酸残基；

[0075] B)用另一种氨基酸残基，例如缬氨酸残基，替代SEQ ID NO:2中在位置560的谷氨酸残基；

[0076] C)用其它氨基酸残基，例如分别用甘氨酸残基、缬氨酸残基、半胱氨酸残基、丝氨酸残基和缬氨酸残基，替代SEQ ID NO:2中分别在位置22、236、461、554和786的谷氨酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基、异亮氨酸残基和丙氨酸残基；和

[0077] D)以上各项的组合。

[0078] 涉及的序列中的位置号，例如，短语“在位置22、236、554、560、566和786的氨基酸残基”是指在来自大肠杆菌的野生型AdhE的氨基酸序列中这些残基的位置。然而，氨基酸残基的位置可能变化。例如，如果在N-末端部分插入一个氨基酸残基，那么原本位于位置22的氨基酸残基则变成在位置23。在这样的情况下，在原位置22的氨基酸残基是本发明的在位



置22的氨基酸残基。

[0079] 突变AdhE可以在除上面A)-C)中确定的位置之外的一个或多个位置包括一个或几个氨基酸的缺失、取代、插入或添加,条件是不丧失或降低AdhE活性。

[0080] 根据本发明的突变AdhE和突变adhE基因能够从野生型adhE基因获得,例如,通过使用常规方法的位点特异性诱变,所述常规方法如PCR(聚合酶链式反应,参见White, T.J.等., Trends Genet., 5, 185(1989)),其利用基于所述基因的核苷酸序列制备的引物。

[0081] 野生型大肠杆菌中adhE基因的转录仅在厌氧条件下被诱导,主要是响应于还原的NADH水平提高(Leonardo, M.R., Cunningham, P.R. & Clark, D.P., J. Bacteriol. 175:870-878 (1993))。

[0082] 在本发明中,修饰用于产生L-氨基酸的细菌菌株,从而使adhE基因的表达由非天然启动子调控,即,在野生型菌株中不调控adhE基因表达的启动子。这样的修饰可以通过用在有氧培养条件下有功能的非天然启动子替代染色体上adhE基因的天然启动子从而使adhE基因与该非天然启动子可操作地连接来实现。作为在有氧培养条件下有功能的非天然启动子,可以使用在有氧培养条件下能够使adhE基因的表达在特定水平之上的任何启动子。关于本发明中AdhE蛋白的水平,根据Clark和Cronan(J. Bacteriol. 141:177-183(1980))的方法测量的无细胞提取物中醇脱氢酶的活性应为每mg蛋白质1.5个单位或更多,优选5个单位或更多,并且更优选10个单位或更多。有氧培养条件可以是那些通常用于培养细菌的条件,其中通过如振摇、通气和搅拌等方法来提供氧气。具体而言,可以使用已知在有氧培养条件下表达基因的任何启动子。例如,可以使用糖酵解(glycolysis)、磷酸戊糖途径、TCA循环、氨基酸生物合成途径等中涉及的基因的启动子。此外, $\lambda$ 噬菌体的P<sub>tac</sub>启动子、lac启动子、trp启动子、trc启动子、P<sub>r</sub>或P<sub>L</sub>启动子全部已知为在有氧培养条件下有功能的强启动子,并且是优选使用的。

[0083] 可以将非天然启动子的使用与基因拷贝的倍增(multiplication)组合。例如,将与非天然启动子可操作地连接的adhE基因插入能够在肠杆菌科细菌中发挥功能的载体,并将该载体引入细菌,这使得细胞中所述基因的拷贝数增加。优选地,使用低拷贝载体。低拷贝载体的实例包括,但不限于,pSC101、pMW118、pMW119等。术语“低拷贝载体”用于拷贝数为多至5个拷贝每细胞的载体。增加adhE基因的拷贝数也可以通过如下来实现:通过例如同源重组、Mu整合等将该基因的多个拷贝引入细菌的染色体DNA。同源重组使用以多个拷贝存在的序列作为染色体DNA上的靶来进行。在染色体DNA上具有多个拷贝的序列包括,但不限于,重复DNA,或存在于转座元件末端的反向重复序列。同样,如美国专利No. 5,595,889中公开的,可以将adhE基因并入转座子,再使其转移以将该基因的多个拷贝引入染色体DNA。在这些情况下,可以将adhE基因置于在有氧培养条件下有功能的启动子的调控之下。可选地,可以通过例如向该启动子中引入突变以增加位于该启动子下游的基因的转录水平来增强启动子的作用。另外,已知对于在核糖体结合位点(RBS)和起始密码子之间的间隔区中的几个核苷酸的取代,特别是在起始密码子紧邻上游的序列中的几个核苷酸的取代,显著影响mRNA的可翻译性(translatibility)。例如,依赖于起始密码子之前的三个核苷酸的性质,发现了20倍范围的表达水平(Gold等, Annu. Rev. Microbiol., 35, 365-403, 1981; Hui等, EMBO J., 3, 623-629, 1984)。之前,显示了rhtA23突变是在相对于ATG起始密码子的-1位置的A对G的取代(A-for-G substitution)(ABSTRACTS of 17<sup>th</sup> International Congress of

Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (第17届国际生物化学与分子生物学大会暨美国生物化学与分子生物学学会1997年年会摘要), San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457)。因此, 可以想到rhtA23突变增强rhtA基因表达, 并因此增加对苏氨酸、高丝氨酸和转运到细胞外的一些其它物质的抗性。

[0084] 另外, 还可以将核苷酸取代引入细菌染色体上adhE基因的启动子区, 其产生更强的启动子功能。可以进行表达调控序列的改变, 例如, 使用温度敏感质粒按照与基因取代相同的方式进行, 如国际专利公开WO 00/18935和日本专利申请公开号1-215280。

[0085] 在本发明中, “产生L-氨基酸的细菌”的意思是当在培养基中培养所述细菌时, 具有产生L-氨基酸并将L-氨基酸分泌到培养基中的能力的细菌。可以通过培育来赋予或增强产生L-氨基酸的能力。本文使用的术语“产生L-氨基酸的细菌”也表示能够产生L-氨基酸并且引起L-氨基酸以大于该细菌(例如, 大肠杆菌, 如大肠杆菌K-12)的野生型或亲本菌株的量在培养基中积累的细菌, 并且优选地表示能够在培养基中引起不少于0.5g/L, 更优选不少于1.0g/L的量的目标L-氨基酸积累的细菌。术语“L-氨基酸”包括L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸。L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸和L-亮氨酸是特别优选的。

[0086] 肠杆菌科包括属于以下属的细菌: 埃希氏菌属、肠杆菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏菌属、泛菌属、发光杆菌属(Photobacterium)、普罗威登斯菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、志贺氏菌属、摩根氏菌属、耶尔森氏菌属等。具体而言, 可以使用根据NCBI(National Center for Biotechnology Information; 国家生物技术信息中心)数据库使用的分类学(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>)归类于肠杆菌科的那些。属于埃希氏菌属或泛菌属的细菌是优选的。短语“属于埃希氏菌属的细菌”的意思是根据微生物领域的技术人员已知的分类法归类于埃希氏菌属的细菌。如在本发明中使用的属于埃希氏菌属的细菌的实例包括, 但不限于大肠杆菌(E. coli)。

[0087] 对于能够用于本发明的属于埃希氏菌属的细菌无具体限制, 然而, 例如, Neidhardt, F.C.等.(*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, 表1)描述的细菌包括在本发明内。

[0088] 属于泛菌属的细菌的意思是根据微生物领域的技术人员已知的分类法归类于泛菌属的细菌。最近已经将成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)的一些种基于16S rRNA的核苷酸序列分析等重新归类于成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)、*Pantoea ananatis*(菠萝泛菌)、斯氏泛菌(*Pantoea stewartii*)等(*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 162-173 (1993))。

[0089] 本发明的细菌包括这样的肠杆菌科的菌株, 该菌株具有产生L-氨基酸的能力, 并且已经经过修饰从而使编码醇脱氢酶的基因在启动子的调控下表达, 所述启动子在有氧培养条件下有功能。此外, 本发明的细菌包括这样的肠杆菌科的菌株, 该菌株具有产生L-氨基酸的能力, 并且没有天然的醇脱氢酶活性, 但是已经用编码醇脱氢酶的DNA片段转化。

[0090] 在本发明中, 由于编码醇脱氢酶的基因在处于有氧培养条件下时有功能的启动子

的控制下表达,所以在含有乙醇作为碳源的培养基中积累的L-氨基酸的量能够显著增加,所述L-氨基酸例如L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸或L-亮氨酸。

[0091] 产生L-氨基酸的细菌

[0092] 作为被修饰而具有本发明的突变醇脱氢酶的本发明的细菌,可以使用能够产生芳族或非芳族L-氨基酸的细菌。

[0093] 可以通过将编码本发明的突变醇脱氢酶的基因引入天然具有产生L-氨基酸的能力的细菌来获得本发明的细菌。或者,可以通过将产生L-氨基酸的能力赋予已经具有突变醇脱氢酶的细菌来获得本发明的细菌。

[0094] 产生L-苏氨酸的细菌

[0095] 能够用于得到本发明产生L-苏氨酸的细菌的亲本菌株实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,例如大肠杆菌TDH-6/pVIC40(VKPM B-3996)(美国专利No.5,175,107,美国专利No.5,705,371)、大肠杆菌472T23/pYN7(ATCC 98081)(美国专利No.5,631,157)、大肠杆菌NRRL-21593(美国专利No.5,939,307)、大肠杆菌FERM BP-3756(美国专利No.5,474,918)、大肠杆菌FERM BP-3519和FERM BP-3520(美国专利No.5,376,538)、大肠杆菌MG442(Gusyatiner等,Genetika(俄语),14,947-956(1978))、大肠杆菌VL643和VL2055(EP 1149911 A)等。

[0096] 菌株TDH-6是thrC基因缺陷的,也是蔗糖同化性的(sucrose-assimilative),并且此菌株中的ilvA基因具有渗漏突变(leaky mutation)。这种菌株还在rhtA基因中具有突变,该突变赋予对高浓度的苏氨酸或高丝氨酸的抗性。菌株B-3996含有质粒pVIC40,其通过将包括突变thrA基因的thrA\*BC操纵子插入由RSF1010衍生的载体而获得。这种突变thrA基因编码天冬氨酸激酶高丝氨酸脱氢酶I,其具有基本上脱敏的苏氨酸反馈抑制。菌株B-3996于1987年11月19日以登录号RIA 1867保藏在All-Union Scientific Center of Antibiotics(全联盟抗生素科学中心)(Russia,117105 Moscow,Nagatinskaya Street 3-A)。该菌株还于1987年4月7日以登录号VKPM B-3996保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心(Russian National Collection of Industrial Microorganisms)(VKPM)(Russia,117545 Moscow,1 Dorozhny proezd,1)。

[0097] 大肠杆菌VKPM B-5318(EP 0593792B)也可以用作亲本菌株来得到本发明的产生L-苏氨酸的细菌。菌株B-5318相对于异亮氨酸是原养型的,温度敏感 $\lambda$ 噬菌体C1阻抑物和P<sub>R</sub>启动子替代了该菌株含有的质粒pVIC40中的苏氨酸操纵子的调节区。菌株VKPM B-5318在1990年5月3日以登录号VKPM B-5318保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心(VKPM)。

[0098] 优选地,额外地修饰本发明的细菌以增强以下基因中一个或多个的表达:

[0099] -突变thrA基因,其编码对苏氨酸反馈抑制有抗性的天冬氨酸激酶-高丝氨酸脱氢酶I;

[0100] -thrB基因,其编码高丝氨酸激酶;

[0101] -thrC基因,其编码苏氨酸合酶;

[0102] -rhtA基因,其编码推定的跨膜蛋白;

[0103] -asd基因,其编码天冬氨酸- $\beta$ -半醛脱氢酶;和

[0104] -aspC基因,其编码天冬氨酸氨基转移酶(天冬氨酸转氨酶);

[0105] 编码大肠杆菌的天冬氨酸激酶高丝氨酸脱氢酶I的thrA基因已经阐明(GenBank登录号NC\_000913.2,gi:49175990的核苷酸位置337-2799)。thrA基因位于大肠杆菌K-12染色体上的thrL和thrB基因之间。编码大肠杆菌高丝氨酸激酶的thrB基因已经阐明(GenBank登录号NC\_000913.2,gi:49175990的核苷酸位置2801-3733)。thrB基因位于大肠杆菌K-12染色体上的thrA和thrC基因之间。编码大肠杆菌苏氨酸合酶的thrC基因已经阐明(GenBank登录号NC\_000913.2,gi:49175990的核苷酸位置3734-5020)。thrC基因位于大肠杆菌K-12染色体上的thrB基因和yaaX开读框之间。所有三个基因起单一的苏氨酸操纵子的作用。为了增强苏氨酸操纵子的表达,理想的是将影响转录的弱化子区域从该操纵子中去除(W02005/049808、W02003/097839)。

[0106] 编码对苏氨酸反馈抑制有抗性的天冬氨酸激酶高丝氨酸脱氢酶I的突变thrA基因,连同thrB和thrC基因,能够作为一个操纵子从已知质粒pVIC40获得,该质粒存在于产生苏氨酸的大肠杆菌菌株VKPM B-3996中。质粒pVIC40在美国专利No.5,705,371中详细描述。

[0107] rhtA基因位于大肠杆菌染色体上的18分钟处,接近glnHPQ操纵子,glnHPQ操纵子编码谷氨酰胺转运系统的组分。rhtA基因与ORF1(ybiF基因,核苷酸位置764-1651,GenBank登录号AAA218541,gi:440181)相同,并且位于pexB和ompX基因之间。已经将表达由ORF1编码的蛋白的DNA序列定名为rhtA基因(rht:对高丝氨酸和苏氨酸的抗性)。同样,已知rhtA23突变是在相对于ATG起始密码子而言的位置-1处A对G的取代(ABSTRACTS of the 17<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology(第17届国际生物化学与分子生物学大会暨美国生物化学与分子生物学学会1997年年会摘要),San Francisco,California August 24-29,1997,abstract No.457,EP 1013765 A)。在下文中,将rhtA23突变标记为rhtA\*。

[0108] 大肠杆菌的asd基因已经阐明(核苷酸位置3572511-3571408,GenBank登录号NC\_000913.1,gi:16131307),并且能够利用基于该基因的核苷酸序列制备的引物通过PCR(聚合酶链式反应;参见White,T.J.等,Trends Genet.,5,185(1989))获得。其它微生物的asd基因能够以相似的方式获得。

[0109] 同样,大肠杆菌的aspC基因已经阐明(核苷酸位置983742-984932,GenBank登录号NC\_000913.1,gi:16128895),并且能够通过PCR获得。其它微生物的aspC基因能够以相似的方式获得。

[0110] 产生L-赖氨酸的细菌

[0111] 属于埃希氏菌属的产生L-赖氨酸的细菌的实例包括对L-赖氨酸类似物具有抗性的突变体。L-赖氨酸类似物抑制属于埃希氏菌属的细菌的生长,但是当培养基中存在L-赖氨酸时,这种抑制全部或部分地脱敏。L-赖氨酸类似物的实例包括,但不限于,氧代赖氨酸(oxalysine)、赖氨酸羟肟酸(lysinehydroxamate)、S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)、 $\gamma$ -甲基赖氨酸、 $\alpha$ -氯代己内酰胺( $\alpha$ -chlorocaprolactam)等。对这些赖氨酸类似物具有抗性的突变体能够通过对于属于埃希氏菌属的细菌进行常规人工诱变处理来获得。可用于产生L-赖氨酸的细菌菌株的具体实例包括大肠杆菌AJ11442(FERM BP-1543,NRRL B-12185;参见美国专利No.4,346,170)和大肠杆菌VL611。在这些微生物中,天冬氨酸激酶的L-赖氨酸反馈抑制是脱敏的。

[0112] 可以使用菌株WC196作为产生L-赖氨酸的大肠杆菌细菌。这种细菌菌株是通过将AEC抗性赋予源自大肠杆菌K-12的菌株W3110来培育的。将所得菌株命名为大肠杆菌AJ13069,并且在1994年12月6日保藏在工业技术研究院国立生命科学与人体技术研究所(National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology)(现在称作独立行政法人产业技术综合研究所特许微生物保藏中心(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository), Tsukuba Central 6,1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan),并且获得了登录号FERM P-14690。之后根据布达佩斯条约规定在1995年9月29日将其转为国际保藏,并且获得了登录号FERMBP-5252(美国专利No.5,827,698)。

[0113] 能够用于得到本发明产生L-赖氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括这样的菌株,在这些菌株中将编码L-赖氨酸生物合成酶的一个或多个基因的表达增强。这些基因的实例包括,但不限于,编码二氢吡啶二羧酸合酶的基因(dapA)、编码天冬氨酸激酶的基因(lysC)、编码二氢吡啶二羧酸还原酶的基因(dapB)、编码二氨基庚二酸脱羧酶的基因(lysA)、编码二氨基庚二酸脱氢酶的基因(ddh)(美国专利No.6,040,160)、编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的基因2pc)、编码天冬氨酸半醛脱氢酶的基因(asd)和编码天冬氨酸酶的基因(aspA)(EP 1253195 A)。另外,亲本菌株可以具有表达水平增加的涉及能效(energy efficiency)的基因(cyo)(EP 1170376 A)、编码烟酰胺核苷酸转氢酶的基因(pntAB)(美国专利No.5,830,716)、ybjE基因(WO2005/073390)或它们的组合。

[0114] 用于得到本发明的产生L-赖氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括这样的菌株,其具有活性降低或消除的酶,该酶催化通过从L-赖氨酸生物合成途径分支(branch off)而产生L-赖氨酸之外化合物的反应。催化通过从L-赖氨酸生物合成途径分支而生成L-赖氨酸之外化合物的反应的酶的实例包括高丝氨酸脱氢酶、赖氨酸脱羧酶(美国专利No.5,827,698)和苹果酸酶(malic enzyme)(WO2005/010175)。

[0115] 产生L-赖氨酸的菌株的实例包括大肠杆菌WC196  $\Delta$  cadA  $\Delta$  ldc/pCABD2(WO2006/078039),这种菌株通过向菌株WC196中引入质粒pCABD2(其在美国专利No.6,040,160中公开)获得,菌株WC196具有破坏的编码赖氨酸脱羧酶的cadA和ldcC基因。质粒pCABD2含有:具有突变的编码二氢吡啶二羧酸合酶的大肠杆菌dapA基因,所述突变使L-赖氨酸反馈抑制脱敏;具有突变的编码天冬氨酸激酶III的大肠杆菌lysC基因,所述突变使L-赖氨酸的反馈抑制脱敏;编码二氢吡啶二羧酸还原酶的大肠杆菌dapB基因;和编码二氨基庚二酸脱氢酶的谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)ddh基因。

[0116] 产生L-半胱氨酸的细菌

[0117] 能够用于得到本发明产生L-半胱氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如用编码反馈抗性丝氨酸乙酰转移酶的不同cysE等位基因转化的大肠杆菌JM15(美国专利No.6,218,168,俄罗斯专利申请2003121601);使编码蛋白质的基因过表达的大肠杆菌W3110,所述蛋白质适于分泌对细胞有毒的物质(美国专利No.5,972,663);半胱氨酸脱巯基酶(cysteine desulfohydase)活性减少的大肠杆菌菌株(JP11155571 A2);由cysB基因编码的半胱氨酸调节子的正向转录调控物(positive transcription regulator)活性增加的大肠杆菌W3110菌株(WO0127307A1),等等。

[0118] 产生L-亮氨酸的细菌

[0119] 能够用于得到本发明产生L-亮氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如对亮氨酸有抗性的大肠杆菌菌株(例如,菌株57(VKPM B-7386,美国专利No.6,124,121))或对亮氨酸类似物(包括 $\beta$ -2-噻吩丙氨酸( $\beta$ -2-thienylalanine)、3-羟基亮氨酸、4-氮杂亮氨酸、5,5,5-三氟亮氨酸)有抗性的大肠杆菌菌株(JP 62-34397 B和JP 8-70879 A);通过遗传工程方法获得的大肠杆菌菌株如W096/06926中描述的那些;大肠杆菌H-9068(JP 8-70879 A),等等。

[0120] 可以通过增强L-亮氨酸生物合成中涉及的一个或多个基因的表达来改进本发明的细菌。实例包括leuABCD操纵子中的基因,这些基因优选的代表是突变leuA基因,该基因编码不受L-亮氨酸反馈抑制的异丙基苹果酸合酶(美国专利6,403,342)。此外,可以通过增强编码从细菌细胞分泌L-氨基酸的蛋白的一个或多个基因的表达来改进本发明的细菌。这些基因的实例包括b2682和b2683基因(ygaZH基因)(EP 1239041 A2)。

[0121] 产生L-组氨酸的细菌

[0122] 能够用于得到本发明产生L-组氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如大肠杆菌24菌株(VKPM B-5945,RU2003677);大肠杆菌80菌株(VKPM B-7270,RU2119536);大肠杆菌NRRLB-12116-B12121(美国专利No.4,388,405);大肠杆菌H-9342(FERM BP-6675)和H-9343(FERM BP-6676)(美国专利No.6,344,347);大肠杆菌H-9341(FERM BP-6674)(EP1085087);大肠杆菌AI80/pFM201(美国专利No.6,258,554)等等。

[0123] 能够用于得到本发明产生L-组氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括如下菌株,所述菌株中编码L-组氨酸生物合成酶的一个或多个基因的表达增强。这些基因的实例包括编码下述酶的基因:ATP磷酸核糖基转移酶(hisG)、磷酸核糖基AMP环化水解酶(hisI)、磷酸核糖基-ATP焦磷酸水解酶(hisIE)、磷酸核糖基亚氨基-5-氨基咪唑氨甲酰核糖核苷酸异构酶(phosphoribosyl formimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase)(hisA)、酰胺转移酶(hisH)、组氨醇磷酸氨基转移酶(hisC)、组氨醇磷酸酶(hisB)、组氨醇脱氢酶(hisD)等。

[0124] 已知由hisG和hisBHAFI编码的L-组氨酸生物合成酶被L-组氨酸所抑制,因此还可以通过将突变引入任何这些基因中以将对反馈抑制的抗性赋予由这些基因编码的酶,从而有效地增强产生L-组氨酸的能力(俄罗斯专利Nos.2003677和2119536)。

[0125] 具有产生L-组氨酸能力的菌株具体实例包括:大肠杆菌FERM P-5038和5048,其已经用携带编码L-组氨酸生物合成酶的DNA的载体转化(JP56-005099 A);用rht(即氨基酸输出蛋白的基因)转化的大肠杆菌菌株(EP1016710 A);赋予了磺胺胍、DL-1,2,4-三唑-3-丙氨酸和链霉素-抗性的大肠杆菌80菌株(VKPM B-7270,俄罗斯专利No.2119536),等等。

[0126] 产生L-谷氨酸的细菌

[0127] 能够用于得到本发明产生L-谷氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如大肠杆菌VL334thrC<sup>+</sup>(EP 1172433)。大肠杆菌VL334(VKPM B-1641)是L-异亮氨酸和L-苏氨酸营养缺陷型菌株,其在thrC和ilvA基因中具有突变(美国专利No.4,278,765)。利用生长于野生型大肠杆菌菌株K12(VKPM B-7)细胞上的噬菌体P1,用常规转导来转移thrC基因的野生型等位基因。结果,获得了能够产生L-谷氨酸的L-异亮氨

酸营养缺陷型菌株VL334thrC<sup>+</sup>(VKPM B-8961)。

[0128] 能够用于得到本发明产生L-谷氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于, $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性缺陷的菌株,或其中编码L-谷氨酸生物合成酶的一个或多个基因的表达增强的菌株。这些基因的实例包括编码谷氨酸脱氢酶的基因(gdh)、编码谷氨酰胺合成酶的基因(glnA)、编码谷氨酸合成酶的基因(gltAB)、编码异柠檬酸脱氢酶的基因(icdA)、编码乌头酸水合酶的基因(acnA,acnB)、编码柠檬酸合酶(citrate synthase)的基因(gltA)、编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的基因(ppc)、编码丙酮酸脱氢酶的基因(aceEF,lpdA)、编码丙酮酸激酶的基因(pykA,pykF)、编码磷酸烯醇丙酮酸合酶的基因(ppsA)、编码烯醇化酶的基因(eno)、编码磷酸甘油酸变位酶的基因(pgmA,pgmI)、编码磷酸甘油酸激酶的基因(pgk)、编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因(gapA)、编码丙糖磷酸异构酶的基因(tpiA)、编码果糖二磷酸醛缩酶的基因(fbp)、编码磷酸果糖激酶的基因(pfkA,pfkB)、编码葡糖磷酸异构酶的基因(pgi)等。

[0129] 经修饰以使柠檬酸合酶(citrate synthetase)基因和/或磷酸烯醇丙酮酸羧化酶基因的表达降低的,和/或 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性缺陷的菌株的实例包括在EP1078989A、EP955368A和EP952221A中公开的那些菌株。

[0130] 用于得到本发明产生L-谷氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括将下述酶的活性减少或去除的菌株,所述酶催化从L-谷氨酸生物合成途径分支的除L-谷氨酸外的化合物的合成。这些酶的实例包括异柠檬酸裂合酶(aceA)、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶(sucA)、磷酸转乙酰酶(pta)、乙酸激酶(ack)、乙酰羟酸合酶(acetohydroxy acid synthase)(ilvG)、乙酰乳酸合酶(ilvI)、甲酸乙酰转移酶(pf1)、乳酸脱氢酶(ldh)、和谷氨酸脱羧酶(gadAB)。在美国专利Nos.5,378,616和5,573,945中描述了 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性缺失或降低的属于埃希氏菌属的细菌及获得它们的方法。具体地,这些菌株包括下面的:

[0131] 大肠杆菌W3110sucA::Km<sup>R</sup>

[0132] 大肠杆菌AJ12624(FERM BP-3853)

[0133] 大肠杆菌AJ12628(FERM BP-3854)

[0134] 大肠杆菌AJ12949(FERM BP-4881)

[0135] 通过破坏大肠杆菌W3110的 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶基因(在下文称为“sucA基因”)来获得大肠杆菌W3110sucA::Km<sup>R</sup>。该菌株完全缺失 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性。

[0136] 产生L-谷氨酸的细菌的其它实例包括属于埃希氏菌属并且对天冬氨酸抗代谢物具有抗性的细菌。这些菌株也可能是 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性缺陷的,包括例如大肠杆菌AJ13199(FERM BP-5807)(美国专利No.5,908,768),额外具有低L-谷氨酸分解能力的FERM P-12379菌株(美国专利No.5,393,671);AJ13138(FERM BP-5565)(美国专利No.6,110,714),等等。

[0137] 产生L-谷氨酸的细菌的实例包括 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性缺失或 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性降低的属于泛菌属(genus *Pantoea*)的突变菌株,并且可以如上所述获得。这些菌株包括*Pantoea ananatis* AJ13356(美国专利No.6,331,419)。*Pantoea ananatis* AJ13356于1998年2月19日保藏在通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(现在称作独立行政法人产业技术综合研究所特许微生物保藏中心,Central 6,1-1,Higashi 1-Chome,Tsukuba-shi,Ibaraki-ken,305-8566,Japan),登录号为FERM P-16645。其后按照布达佩斯

条约的规定,在1999年1月11日将其转为国际保藏,并得到登录号FERM BP-6615。作为破坏 $\alpha$  KGDH-E1亚基基因(sucA)的结果,Pantoea ananatis AJ13356的 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性缺失。当将上述菌株分离时将其鉴定为成团肠杆菌,并且作为成团肠杆菌AJ13356保藏。但是,近来基于对16S rRNA的核苷酸测序等,将其重新归类为Pantoea ananatis。尽管AJ13356作为成团肠杆菌保藏在前述保藏单位,就本说明书而言,将它们描述为Pantoea ananatis。

[0138] 产生L-苯丙氨酸的细菌

[0139] 能够用于得到本发明产生L-苯丙氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如大肠杆菌AJ12739(*tyrA::Tn10, tyrR*)(VKPM B-8197);具有突变pheA34基因的大肠杆菌HW1089(ATCC 55371)(美国专利No.5,354,672);大肠杆菌MWEC101-b(KR8903681);大肠杆菌NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146和NRRL B-12147(美国专利No.4,407,952)。同样地,可使用大肠杆菌K-12[W3110(*tyrA*)/pPHAB](FERM BP-3566),大肠杆菌K-12[W3110(*tyrA*)/pPHAD](FERM BP-12659),大肠杆菌K-12[W3110(*tyrA*)/pPHATerm](FERM BP-12662)和命名为AJ12604(FERM BP-3579)的大肠杆菌K-12[W3110(*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAB]作为亲本菌株(EP 488424 B1)。此外,还可使用由yedA基因或yddG基因编码的蛋白活性增强的产生L-苯丙氨酸的属于埃希氏菌属的细菌(美国专利申请2003/0148473 A1和2003/0157667 A1)。

[0140] 产生L-色氨酸的细菌

[0141] 能够用于得到本发明产生L-色氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如大肠杆菌JP4735/pMU3028(DSM10122)和JP6015/pMU91(DSM10123),其由突变trpS基因编码的色氨酰-tRNA合成酶缺陷(美国专利No.5,756,345);大肠杆菌SV164(pGH5),其具有编码不受丝氨酸反馈抑制的磷酸甘油酸脱氢酶的serA等位基因和编码不受色氨酸反馈抑制性的邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase)的trpE等位基因(美国专利6,180,373);色氨酸酶缺陷的大肠杆菌AGX17(pGX44)(NRRL B-12263)和AGX6(pGX50)aroP(NRRL B-12264)(美国专利No.4,371,614);产生磷酸烯醇丙酮酸的能力增强的大肠杆菌AGX17/pGX50, pACKG4-pps(WO9708333,美国专利No.6,319,696)等等。还可以使用由yedA或yddG基因编码的蛋白活性增强的产生L-色氨酸的属于埃希氏菌属的细菌(美国专利申请2003/0148473A1和2003/0157667A1)。

[0142] 能够用于得到本发明产生L-色氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括其中以下酶中一种或多种的活性增强的菌株:邻氨基苯甲酸合酶(trpE)、磷酸甘油酸脱氢酶(serA)和色氨酸合酶(trpAB)。邻氨基苯甲酸合酶和磷酸甘油酸脱氢酶两者均受L-色氨酸和L-丝氨酸的反馈抑制,因此可以向这些酶中引入使反馈抑制脱敏的突变。具有此类突变的菌株的具体实例包括具有脱敏的邻氨基苯甲酸合酶的大肠杆菌SV164和通过将质粒pGH5引入大肠杆菌SV164获得的转化菌株(WO 94/08031),所述质粒pGH5包含编码反馈脱敏的磷酸甘油酸脱氢酶的突变serA基因。

[0143] 能够用于得到本发明产生L-色氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括已经用色氨酸操纵子转化的菌株,所述色氨酸操纵子包含编码脱敏的邻氨基苯甲酸合酶的基因(JP 57-71397 A、JP 62-244382 A、美国专利No.4,371,614)。此外,可以通过增强色氨酸操纵子(trpBA)中编码色氨酸合酶的基因的表达来赋予产生L-色氨酸的能力。色氨酸合酶由 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基组成,其分别由trpA和trpB基因编码。另外,可以通过增强异柠檬酸裂合酶-苹果酸合



酶操纵子的表达来改进产生L-色氨酸的能力(WO2005/103275)。

[0144] 产生L-脯氨酸的细菌

[0145] 能够用于得到本发明产生L-脯氨酸的细菌的亲本菌株实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如*ilvA*基因缺陷并且能够产生L-脯氨酸的大肠杆菌702*ilvA*(VKPM B-8012)(EP 1172433)。可以通过增强L-脯氨酸生物合成中涉及的一个或多个基因的表达来改进本发明的细菌。这些基因的实例包括编码对L-脯氨酸反馈抑制脱敏的谷氨酸激酶的*proB*基因(德国专利3127361)。此外,可以通过增强一个或多个编码负责从细菌细胞分泌L-氨基酸的蛋白的基因的表达来改进本发明的细菌。这些基因的例子是*b2682*和*b2683*基因(*ygaZH*基因)(EP1239041 A2)。

[0146] 具有产生L-脯氨酸活性的属于埃希氏菌属的细菌的实例包括下列大肠杆菌菌株:NRRL B-12403和NRRL B-12404(英国专利2075056),VKPMB-8012(俄罗斯专利申请2000124295),德国专利3127361中描述的质粒突变体,Bloom F.R.等描述的质粒突变体(The 15<sup>th</sup> Miami winter symposium(第15界迈阿密冬季研讨会),1983,第34页)等等。

[0147] 产生L-精氨酸的细菌

[0148] 能够用于得到本发明产生L-精氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,属于埃希氏菌属的菌株,如大肠杆菌237菌株(VKPM B-7925)(美国专利申请2002/058315 A1)及其带有突变的N-乙酰谷氨酸合酶(N-acetylglutamate synthase)的衍生菌株(俄罗斯专利申请No.2001112869),大肠杆菌382菌株(VKPM B-7926)(EP1170358A1),用编码N-乙酰谷氨酸合成酶(N-acetylglutamate synthetase)的*argA*基因转化的产生精氨酸的菌株(EP1170361A1),等等。

[0149] 能够用于得到本发明产生L-精氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括编码L-精氨酸生物合成酶的一个或多个基因的表达增强的菌株。这些基因的实例包括编码N-乙酰谷氨酰磷酸还原酶的基因(*argC*)、编码鸟氨酸乙酰转移酶的基因(*argJ*)、编码N-乙酰谷氨酸激酶的基因(*argB*)、编码乙酰鸟氨酸转氨酶的基因(*argD*)、编码鸟氨酸氨甲酰基转移酶的基因(*argF*)、编码精氨酸琥珀酸合成酶的基因(*argG*)、编码精氨酸琥珀酸裂合酶的基因(*argH*)、编码氨甲酰基磷酸合成酶的基因(*carAB*)等。

[0150] 产生L-缬氨酸的细菌

[0151] 能够用于得到本发明的产生L-缬氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,经修饰以过表达*ilvGMEDA*操纵子的菌株(美国专利No.5,998,178)。理想的是将负责衰减的*ilvGMEDA*操纵子的区域移除以使产生的L-缬氨酸不会削弱该操纵子的表达。此外,理想的是将操纵子中的*ilvA*基因破坏从而降低苏氨酸脱氨酶的活性。

[0152] 能够用于得到本发明的产生L-缬氨酸的细菌的亲本菌株的实例还包括氨酰t-RNA合成酶的突变体(美国专利No.5,658,766)。例如,可以使用大肠杆菌VL1970,该菌株在编码异亮氨酸tRNA合成酶的*ileS*基因中具有突变。已将大肠杆菌VL1970在1988年6月24日保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心(VKPM)(Russia,117545 Moscow,1Dorozhny Proezd, 1),登录号为VKPM B-4411。

[0153] 此外,还可以使用生长需要硫辛酸(lipoic acid)的突变体和/或缺乏H<sup>+</sup>-ATP酶的突变体作为亲本菌株(WO96/06926)。

[0154] 产生L-异亮氨酸的细菌

[0155] 能够用于得到本发明产生L-异亮氨酸的细菌的亲本菌株的实例包括,但不限于,对6-二甲基氨基嘌呤有抗性的突变体(JP 5-304969 A),对异亮氨酸类似物如硫代异亮氨酸(thiaisoleucine)和异亮氨酸氧肟酸具有抗性的突变体,以及额外对DL-乙硫氨酸(DL-ethionine)和/或精氨酸氧肟酸具有抗性的突变体(JP 5-130882 A)。此外,还可以使用以编码L-异亮氨酸生物合成中涉及的蛋白(如苏氨酸脱氨酶和乙酰羟酸合酶(acetohydroxate synthase))的基因转化的重组菌株(JP 2-458 A,FR 0356739和美国专利No.5,998,178)作为亲本菌株。

[0156] 用于产生本发明的L-氨基酸的方法包括以下步骤:在培养基中培养本发明的细菌,使L-氨基酸能够在培养基中积累,和从培养基中收集L-氨基酸。此外,本发明的方法包括用于产生L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸或L-亮氨酸的方法,包括以下步骤:在培养基中培养本发明的细菌,使L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸或L-亮氨酸能够在培养基中积累,和从培养基中收集L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-谷氨酸或L-亮氨酸。

[0157] 在本发明中,从培养基培养、收集和纯化L-氨基酸等可通过常规发酵方法进行,其中使用细菌来产生L-氨基酸。

[0158] 培养基可以是合成的或天然的,只要该培养基包括碳源、氮源、矿质,如有必要,还包括细菌生长所需的适量营养物。碳源可以包括多种糖,例如葡萄糖和蔗糖,多种有机酸和醇,如乙醇。根据本发明,可以使用乙醇作为唯一碳源或者与糖(如葡萄糖和蔗糖)混合。作为氮源,可以使用多种铵盐如氨水和硫酸铵,其它含氮化合物如胺,天然氮源如蛋白胨、大豆-水解物和消化的发酵微生物。作为矿质,可以使用磷酸氢二钾(potassiummonophosphate)、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钙等等。作为维生素,可以使用硫胺素、酵母提取物等等。如有必要,可以向培养基添加额外的营养物。例如,如果细菌生长需要L-氨基酸(L-氨基酸营养缺陷型(L-amino acid auxotrophy)),可以向培养基添加足够量的L-氨基酸。

[0159] 培养优选在有氧条件下进行,如摇动培养和带有通气的搅拌培养,温度为20-40℃,优选30-38℃。培养物的pH通常为5-9,优选6.5-7.2。可以用氨水、碳酸钙、多种酸、多种碱和缓冲剂调节培养物的pH。通常1-5天的培养导致目标氨基酸在液体培养基中的积累。

[0160] 培养之后,可以通过离心或膜过滤将固体如细胞从液体培养基去除,然后可以收集目标L-氨基酸并通过离子交换、浓缩和/或结晶方法纯化。

[0161] 附图简述

[0162] 图1显示大肠杆菌染色体中adhE基因上游区的结构,以及含有cat基因和P<sub>L-tac</sub>启动子的整合DNA片段的结构。

[0163] 图2显示来自以下菌种的醇脱氢酶的原始序列的比对:大肠杆菌(ADHE\_ECOLI,SEQ ID NO:2)、弗氏志贺氏菌(Q83RN2\_SHIFL,SEQ ID NO:53)、Pantoea ananatis(ADHE PANAN,SEQ ID NO:30)、鼠疫耶尔森氏菌(Q66AM7\_YERPS,SEQ ID NO:54)、胡萝卜软腐欧文氏菌(Q6D4R4\_ERWCT,SEQ ID NO:55)、鼠伤寒沙门氏菌(P74880\_SALTY,SEQ ID NO:56)、植物乳杆菌(Q88RY9\_LACPL,SEQ ID NO:57)和乳酸乳球菌(086282\_9LACT,SEQ ID NO:58)。所述比对使用PIR多重比对程序来进行(<http://pir.georgetown.edu>)。用星号(\*)标记相同的氨

氨酸,用冒号(:)标记相似的氨基酸。

[0164] 图3显示在含有乙醇(2%或3%)作为唯一碳源的M9基本培养基上生长的修饰菌株的生长曲线。

[0165] 图4显示在含有葡萄糖(0.1重量%)和乙醇(0.1体积%)的混合物的M9基本培养基上生长的修饰菌株的生长曲线。

[0166] 图5显示具有在天然启动子或P<sub>L-tac</sub>启动子调控下的突变adhE\*基因的菌株在含有乙醇(2%或3%)作为唯一碳源的M9基本培养基上生长的生长曲线的比较。

[0167] 实施例

[0168] 将参考以下非限定性实施例对本发明进行更具体的阐释。

[0169] 实施例1. 制备大肠杆菌MG1655  $\Delta$ tdh,rhtA\*

[0170] 通过如下构建产生L-苏氨酸的大肠杆菌菌株MG1655  $\Delta$ tdh,rhtA\*(pVIC40):使用cat基因将大肠杆菌MG1655(ATCC 700926)中编码苏氨酸脱氢酶的天然tdh基因失活,其后引入rhtA23突变(rhtA\*),该突变赋予对高浓度的苏氨酸(>40mg/ml)和高丝氨酸(>5mg/ml)的抗性。然后用来自大肠杆菌VKPM B-3996的质粒pVIC40转化所得菌株。质粒pVIC40在美国专利No.5,705,371中详细描述。

[0171] 为了替代天然的tdh基因,用Datsenko K.A.和Wanner B.L.(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000,97,6640-6645)所述的也称为“Red介导的整合(Red-mediated integration)”和/或“Red-驱动整合(Red-driven integration)”的方法,将携带由cat基因编码的氯霉素抗性标记(Cm<sup>R</sup>)的DNA片段整合到大肠杆菌MG1655的染色体中以替代天然基因。使用具有热敏感的复制子的重组质粒pKD46(Datsenko,K.A.,Wanner,B.L.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000,97,6640-6645)作为负责Red-介导的重组体系的由噬菌体 $\lambda$ 得到的基因的供体。含有重组质粒pKD46的大肠杆菌BW25113可以从E.coli Genetic StockCenter,Yale University,New Haven,USA获得,其登录号为CGSC7630。

[0172] 使用商业上可获得的质粒pACYC184(GenBank/EMBL登录号X06403,“Fermentas”,Lithuania)作为模板,以及引物P1(SEQ ID NO:3)和P2(SEQ IDNO:4)通过PCR获得了含有由cat基因编码的Cm<sup>R</sup>标记的DNA片段。引物P1含有引入到该引物中的与tdh基因5'-区同源的35个核苷酸用于进一步整合到细菌染色体中。引物P2含有引入到该引物中的与tdh基因3'-区同源的32个核苷酸用于进一步整合到细菌染色体中。

[0173] 使用“Gene Amp PCR System 2700”扩增设备(Applied Biosystems)来提供PCR。反应混合物(总体积50 $\mu$ l)组成为5 $\mu$ l含25mM MgCl<sub>2</sub>的10x PCR缓冲液(“Fermentas”,Lithuania)、每种dNTP 200 $\mu$ M、每种所用的引物25pmol和1U Taq聚合酶(“Fermentas”,Lithuania)。向所述反应混合物加入约5ng质粒DNA作为PCR扩增用的模板DNA。温度曲线设定如下:在95 $^{\circ}$ C初始DNA变性5分钟,其后是25个循环的95 $^{\circ}$ C变性30秒、55 $^{\circ}$ C退火30秒、72 $^{\circ}$ C延伸40秒,和在72 $^{\circ}$ C最终延伸5分钟。然后将扩增的DNA片段通过琼脂糖凝胶电泳纯化,使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(Sigma,USA)提取,并用乙醇沉淀。

[0174] 将获得的DNA片段用于电穿孔和Red介导整合入大肠杆菌MG1655/pKD46的细菌染色体中。

[0175] 将MG1655/pKD46细胞在含有氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)的液体LB培养基中在30 $^{\circ}$ C培养过夜,然后用含有氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)和L-阿拉伯糖(10mM)(使用阿拉伯糖来诱导含

有Red系统的基因的质粒)的SOB培养基(酵母提取物5g/l;NaCl 0.5g/l;胰蛋白胨20g/l;KCl 2.5mM;MgCl<sub>2</sub> 10mM)以1:100稀释,并且在30℃培养至细菌培养物的光密度达到OD<sub>600</sub>=0.4-0.7。将来自10ml该细菌培养物的经培养细胞用冰冷的去离子水洗涤3次,其后在100μl水中悬浮。向该细胞悬液添加10μl溶解在去离子水中的DNA片段(100ng)。用“Bio-Rad”电穿孔仪(USA)(No.165-2098,2-89型)根据制造商的说明书进行电穿孔。将经过电击的细胞(shocked cell)添加至1ml SOC培养基(Sambrook等,“Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition”(《分子克隆实验手册第二版》),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)),在37℃温育2小时,然后涂布到含有25μg/ml氯霉素的L-琼脂上。使用引物P3(SEQ ID NO:5)和P4(SEQ ID NO:6)通过PCR检测生长了24小时的菌落中取代天然tdh基因Cm<sup>R</sup>标记的存在。为此,将新鲜分离的菌落悬浮在20μl水中,其后使用1μl所得悬液进行PCR。温度曲线设定如下:在95℃初始DNA变性5分钟;其后是30个循环的95℃变性30秒、55℃退火30秒和72℃延伸40秒;以及在72℃最终延伸5分钟。少数经检测的Cm<sup>R</sup>菌落含有期望的1104bp DNA片段,其确认了取代tdh基因的1242bp片段的Cm<sup>R</sup>标记DNA的存在。获得的菌株之一通过在37℃培养消除了热敏质粒pKD46,并且将所得的菌株命名为大肠杆菌MG1655 Δ tdh。

[0176] 然后,将来自菌株VL614rhtA23(Livshits V.A.等,2003,Res.Microbiol.,154:123-135)的rhtA23突变引入获得的菌株MG1655 Δ tdh,产生菌株MG1655 Δ tdh, rhtA\*。rhtA23是一种赋予对高浓度的苏氨酸(>40mg/ml)和高丝氨酸(>5mg/ml)的抗性的突变。为此用生长在供体菌株VL614rhtA23上的噬菌体P<sub>vir</sub>感染菌株MG1655 Δ tdh。在含有8mg/ml高丝氨酸和0.4%作为唯一碳源的葡萄糖的M9基本培养基上选择转导体。

[0177] 实施例2.构建大肠杆菌MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE

[0178] 通过用P<sub>L-tac</sub>启动子替代菌株MG1655中adhE基因的天然启动子区获得了大肠杆菌MG1655::P<sub>L-tac</sub>adh。

[0179] 为了替代adhE基因的天然启动子区,通过Datsenko K.A.和Wanner B.L.(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000,97,6640-6645)描述的也称为“Red-介导的整合”和/或“Red-驱动整合”的方法,将携带P<sub>L-tac</sub>启动子和由cat基因编码的氯霉素抗性标记(Cm<sup>R</sup>)的DNA片段整合到了大肠杆菌MG1655的染色体中来取代天然启动子区。

[0180] 使用大肠杆菌MG1655P<sub>L-tac</sub>xy1E(WO2006/043730)的染色体DNA作为模板通过PCR获得了含有P<sub>L-tac</sub>启动子和cat基因的片段。P<sub>L-tac</sub>启动子的核苷酸序列在序列表中提供(SEQ ID NO:7)。使用引物P5(SEQ ID NO:8)和P6(SEQ ID NO:9)用于PCR扩增。引物P5含有引入到该引物中的与位于adhE基因起始密码子上游318bp的区域互补的40个核苷酸,用于进一步整合到细菌染色体中;引物P6含有与adhE基因的5'-序列相同的39个核苷酸。

[0181] 使用“Gene Amp PCR System 2700”扩增设备(Applied Biosystems)来提供PCR。反应混合物(总体积50μl)组成为5μl含15mM MgCl<sub>2</sub>的10x PCR缓冲液(“Fermentas”, Lithuania)、每种dNTP 200μM、每种所用的引物25pmol和1U Taq聚合酶(“Fermentas”, Lithuania)。向所述反应混合物加入约20ng大肠杆菌MG1655P<sub>L-tac</sub>xy1E基因组DNA作为PCR的模板。

[0182] 温度曲线如下:在95℃初始DNA变性5分钟,其后是35个循环的95℃变性30秒、54℃退火30秒、72℃延伸1.5分钟,和在72℃最终延伸5分钟。然后将扩增的DNA片段通过琼脂糖

凝胶电泳纯化,使用“GenElute SpinColumns”(Sigma,USA)提取,并用乙醇沉淀。将获得的DNA片段用于电穿孔和Red介导的整合入大肠杆菌MG1655/pKD46的细菌染色体中。

[0183] 将MG1655/pKD46细胞在含有氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)的液体LB培养基中在30 $^{\circ}$ C培养过夜,然后用含有氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)和L-阿拉伯糖(10mM)(使用阿拉伯糖来诱导编码Red系统的基因的质粒)的SOB培养基(酵母提取物5g/l;NaCl 0.5g/l;胰蛋白胨20g/l;KCl 2.5mM;MgCl<sub>2</sub>10mM)以1:100稀释,并且在30 $^{\circ}$ C培养以达到细菌培养物的光密度OD<sub>600</sub>=0.4-0.7。将来自10ml该细菌培养物的经培养细胞用冰冷的去离子水洗涤3次,其后在100 $\mu$ l水中悬浮。向该细胞悬液添加10 $\mu$ l溶解在去离子水中的DNA片段(100ng)。用“Bio-Rad”电穿孔仪(USA)(No.165-2098,2-89型)根据制造商的说明书进行了电穿孔。

[0184] 将经过电击的细胞添加至1ml SOC培养基(Sambrook等,“MolecularCloning A Laboratory Manual,Second Edition”(《分子克隆实验手册第二版》),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)),在37 $^{\circ}$ C温育2小时,然后涂布到含有25 $\mu$ g/ml氯霉素的L-琼脂上。

[0185] 将约100个所得克隆在含有2%乙醇作为唯一碳源的M9平板上进行选择。选取了在36小时中在含有2%乙醇的M9平板上生长的一些克隆,并使用引物P7(SEQ ID NO:10)和P8(SEQ ID NO:11)通过PCR检测这些克隆中取代adhE基因天然启动子区的Cm<sup>R</sup>标记的存在。为此,将新鲜分离的菌落悬浮在20 $\mu$ l水中,然后将1 $\mu$ l所得悬液用于PCR。温度曲线如下:在95 $^{\circ}$ C初始DNA变性10分钟;其后是30个循环的95 $^{\circ}$ C变性30秒、54 $^{\circ}$ C退火30秒和72 $^{\circ}$ C延伸1.5分钟;在72 $^{\circ}$ C最终延伸1分钟。少数经检测的Cm<sup>R</sup>菌落含有期望的~1800bp DNA片段,这证实了取代adhE基因的520bp天然启动子区的Cm<sup>R</sup>标记DNA的存在。获得的菌株之一通过在37 $^{\circ}$ C的培养消除了热敏质粒pKD46,并将所得的菌株命名为大肠杆菌MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE(参见图1)。

[0186] 实施例3.构建大肠杆菌MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE

[0187] 通过将来自菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE的P<sub>L-tac</sub>启动子转导至菌株MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*中获得了大肠杆菌MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE。

[0188] 用生长在供体菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE上的噬菌体P1<sub>vir</sub>感染菌株MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*,获得了菌株MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE。检查这种菌株在含有2%乙醇作为唯一碳源的M9平板上的生长。生长速率与菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE的生长速率相同。

[0189] 实施例4.增加adhE基因表达对L-苏氨酸产生的影响

[0190] 为了评估增强adhE基因的表达对L-苏氨酸产生的影响,用质粒pVIC40转化了两种大肠杆菌菌株MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE和MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*。

[0191] 将菌株MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE(pVIC40)和亲本菌株MG1655  $\Delta$  tdh,rhtA\*(pVIC40)各自在营养培养液(nutrient broth)中在37 $^{\circ}$ C培养18小时,将获得的每种培养物的0.3ml接种到20x200mm试管中具有以下组成的3ml发酵培养基中,并且用旋转摇床在34 $^{\circ}$ C培养48小时。表1和2显示来自至少10次独立实验的数据。

[0192] 发酵培养基组成(g/l):

[0193]	乙醇	24或16
[0194]	葡萄糖	0(表1)或3(表2)
[0195]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16

[0196]	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7
[0197]	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
[0198]	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01
[0199]	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01
[0200]	盐酸硫胺素	0.002
[0201]	酵母提取物	1.0
[0202]	L-异亮氨酸	0.01
[0203]	CaCO <sub>3</sub>	33
[0204]	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O和CaCO <sub>3</sub> 各自分开灭菌。	

[0205] 从表1和2中能够看出, MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, Pl<sub>-tac</sub>adhE与MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*相比能够积累更高量的L-苏氨酸。而且, MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, Pl<sub>-tac</sub>adhE能够在含有乙醇作为唯一碳源的培养基上生长, 并且引起L-苏氨酸的积累, 而MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*在含有乙醇作为唯一碳源的培养基中显示非常差的生长和生产力。

[0206] 实施例5. 构建大肠杆菌MG1655  $\Delta$  adhE

[0207] 通过用kan基因使大肠杆菌MG1655中的天然adhE基因失活构建了此菌株。

[0208] 为了失活(或破坏)天然adhE基因, 通过Datsenko K. A. 和Wanner B. L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6640-6645)描述的也称为“Red-介导的整合”和/或“Red-驱动的整合”的方法, 将携带由kan基因编码的卡那霉素抗性标记(Km<sup>R</sup>)的DNA片段整合至大肠杆菌MG1655(ATCC 700926)的染色体中来取代天然基因。

[0209] 使用商业上可获得的质粒pACYC177(GenBank/EMBL登录号X06402, “Fermentas”, Lithuania)作为模板, 和引物P9(SEQ ID NO:12)和P10(SEQ IDNO:13)通过PCR获得了含有Km<sup>R</sup>标记(kan基因)的DNA片段。引物P9含有引入到该引物中的与位于adhE基因起始密码子上游318bp的区域同源的40个核苷酸, 用于进一步整合到细菌染色体中。引物P10含有引入到该引物中的与adhE基因3'-区同源的41个核苷酸, 用于进一步整合到细菌染色体中。

[0210] 使用“Gene Amp PCR System 2700”扩增设备(Applied Biosystems)来提供PCR。反应混合物(总体积50 $\mu$ l)组成为5 $\mu$ l含25mM MgCl<sub>2</sub>的10x PCR缓冲液(“Fermentas”, Lithuania)、每种dNTP 200 $\mu$ M、每种所用的引物25pmol和1U Taq聚合酶(“Fermentas”, Lithuania)。向所述反应混合物加入约5ng质粒DNA作为PCR扩增的模板DNA。温度曲线如下: 在95 $^{\circ}$ C初始DNA变性5分钟, 其后是25个循环的95 $^{\circ}$ C变性30秒、55 $^{\circ}$ C退火30秒、72 $^{\circ}$ C延伸40秒, 和在72 $^{\circ}$ C最终延伸5分钟。然后将扩增的DNA片段通过琼脂糖凝胶电泳纯化, 使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(Sigma, USA)提取, 并用乙醇沉淀。

[0211] 将获得的DNA片段用于电穿孔和Red介导的整合入大肠杆菌MG1655/pKD46的细菌染色体中。

[0212] 将MG1655/pKD46细胞在含有氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)的液体LB培养基中在30 $^{\circ}$ C培养过夜, 然后用含有氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)和L-阿拉伯糖(10mM)(使用阿拉伯糖来诱导编码Red系统的基因的质粒)的SOB培养基(酵母提取物5g/l; NaCl 0.5g/l; 胰蛋白胨20g/l; KCl 2.5mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM)以1:100稀释, 并且在30 $^{\circ}$ C培养以达到细菌培养物的光密度OD<sub>600</sub>=0.4-0.7。将来自10ml该细菌培养物的经培养细胞用冰冷的去离子水洗涤3次, 其后在100 $\mu$ l水中悬浮。向该细胞悬液添加10 $\mu$ l溶解在去离子水中的DNA片段(100ng)。用“Bio-Rad”电穿

孔仪(USA)(No.165-2098,2-89型)根据制造商的说明书进行了电穿孔。将经过电击的细胞添加至1ml SOC培养基(Sambrook等,“Molecular Cloning A Laboratory Manual,Second Edition”(《分子克隆实验手册第二版》),Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)),在37℃温育2小时,然后涂布到含有20μg/ml卡那霉素的L-琼脂上。使用引物P11(SEQ ID NO:14)和P12(SEQ ID NO:15)通过PCR检测了24小时内生长的菌落中取代天然adhE基因的Km<sup>R</sup>标记的存在。为此,将新鲜分离的菌落悬浮在20μl水中,然后将1μl所得悬液用于PCR。温度曲线如下:在95℃初始DNA变性5分钟;其后是30个循环的95℃变性30秒、55℃退火30秒和72℃延伸30秒;在72℃最终延伸5分钟。少数经检测的Km<sup>R</sup>菌落含有期望的约1030bp DNA片段,这证实了取代3135bp的adhE基因片段的Km<sup>R</sup>标记DNA的存在。获得的菌株之一通过在37℃的培养消除了热敏质粒pKD46,并将所得的菌株命名为大肠杆菌MG1655 Δ adhE。

[0213] 实施例6. 构建大肠杆菌MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*

[0214] 通过向adhE基因中引入G1u568Lys(E568K)突变获得了大肠杆菌MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*。首先,使用大肠杆菌MG1655的基因组DNA作为模板,以及引物P13(SEQ ID NO:16)和P12(SEQ ID NO:15)通过PCR获得了携带E568K突变的adhE基因的1.05kbp片段。引物P15与adhE基因的1662-1701bp和1703-1730bp区同源,并且包括以粗体显示的取代g/a(位置1702bp),引物P12与adhE基因的3'-末端同源。使用“Gene Amp PCR System 2700”扩增设备(Applied Biosystems)来提供PCR。反应混合物(总体积50μl)组成为5μl含MgCl<sub>2</sub>的10x PCR缓冲液(“TaKaRa”,Japan)、每种dNTP 250μM、每种所用的引物25pmol和2.5U Pyrobest DNA聚合酶(“TaKaRa”,Japan)。向所述反应混合物加入约20ng大肠杆菌MG1655基因组DNA作为PCR的模板。温度曲线如下:在95℃初始DNA变性5分钟,其后是35个循环的95℃变性30秒、54℃退火30秒、72℃延伸1分钟,和在72℃最终延伸5分钟。通过琼脂糖凝胶电泳纯化获得的片段,使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(“Sigma”,USA)提取,并用乙醇沉淀。

[0215] 在第二步中,使用大肠杆菌MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE的基因组DNA作为模板(参见实施例2),使用引物P11(SEQ ID NO:14),并使用携带突变序列的1.05kbp片段(见上文)作为第二引物通过PCR获得了包含P<sub>L-tac</sub>启动子具有突变adhE基因并由提供氯霉素抗性的cat基因标记的片段。引物P11与位于adhE基因起始密码子上游402-425bp的区域同源。使用“Gene Amp PCR System2700”扩增设备(Applied Biosystems)来提供PCR。反应混合物(总体积50μl)组成为5μl 10x PCR缓冲液(“TaKaRa”,Japan)、25mM MgCl<sub>2</sub>、每种dNTP 250μM、10ng引物P11、1μg作为第二引物的1.05kbp片段和2.5U TaKaRa LADNA聚合酶(“TaKaRa”,Japan)。向所述反应混合物加入约20ng的大肠杆菌MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE基因组DNA作为PCR的模板。温度曲线如下:在95℃初始DNA变性5分钟,其后是35个循环的95℃变性30秒、54℃退火30秒、72℃延伸3.5分钟,和在72℃最终延伸7分钟。通过琼脂糖凝胶电泳纯化所得片段,使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(“Sigma”,USA)提取,并用乙醇沉淀。

[0216] 为了替代adhE基因的天然区,通过Datsenko K.A.和Wanner B.L.(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000,97,6640-6645)描述的也称为“Red-介导的整合”和/或“Red-驱动的整合”的方法,将携带P<sub>L-tac</sub>启动子及突变adhE和由cat基因编码的氯霉素抗性标记(Cm<sup>R</sup>)的DNA片段(cat-P<sub>L-tac</sub>adhE\*,4.7kbp)整合到了大肠杆菌MG1655 Δ adhE的染色体中。将MG1655 Δ adhE/pKD46细胞在含有氨苄青霉素(100μg/ml)的液体LB培养基中在30℃培养过夜,然后用含有氨苄青霉素(100μg/ml)和L-阿拉伯糖(10mM)(使用阿拉伯糖来诱导编

码Red系统的基因的质粒)的SOB培养基(酵母提取物5g/l;NaCl 0.5g/l;胰蛋白胨20g/l;KCl 2.5mM;MgCl<sub>2</sub>10mM)以1:100稀释,并且在30℃培养以达到细菌培养物的光密度OD<sub>600</sub>=0.4-0.7。将来自10ml该细菌培养物的经培养细胞用冰冷的去离子水洗涤3次,其后在100μl水中悬浮。向该细胞悬液添加10μl溶解在去离子水中的DNA片段(300ng)。用“Bio-Rad”电穿孔仪(USA)(No.165-2098,2-89型)根据制造商的说明书进行了电穿孔。

[0217] 将经过电击的细胞添加至1ml SOC培养基(Sambrook等,“MolecularCloning A Laboratory Manual,Second Edition”(《分子克隆实验手册第二版》),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)),在37℃温育2小时,然后涂布到含有25μg/ml氯霉素的L-琼脂上。

[0218] 将获得的克隆在含有2%乙醇作为唯一碳源的M9平板上进行了选择。

[0219] 选择失控克隆(runaway clone)并验证了完整基因序列。揭示了如下的突变列(row):Glu568Lys(gag-aag),Ile554Ser(atc-agc),Glu22Gly(gaa-gga),Met236Val(atg-gtg),Tyr461Cys(tac-tgc),Ala786Val(gca-gta)。将此克隆命名为MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*。

[0220] 实施例7.构建大肠杆菌MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE\*

[0221] 通过转导来自菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*的P<sub>L-tac</sub>adhE\*突变获得了大肠杆菌MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE\*。

[0222] 用生长在供体菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*上的噬菌体P1<sub>vir</sub>转染菌株MG1655 Δtdh,rhtA\*,获得了菌株MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE\*。检查了此菌株在含有2%乙醇作为唯一碳源的M9平板上的生长。生长速率与菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*的生长速率相同。

[0223] 实施例8.构建大肠杆菌MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568

[0224] 进行了为获得具有Glu568Lys突变的单突变adhE的第二个尝试。为此,构建了大肠杆菌菌株MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-wt Δ34。

[0225] 通过用kan基因取代大肠杆菌MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-wt(wt表示野生型)中adhE基因的34bp片段(1668-1702bp的区域,包括编码Glu568的三联体)获得了大肠杆菌MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-wt Δ34。通过DatsenkoK.A.和Wanner B.L.(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000,97,6640-6645)描述的也称为“Red-介导的整合”和/或“Red-驱动整合”的方法将kan基因整合至大肠杆菌MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-wt的染色体中。

[0226] 使用商业上可获得的质粒pACYC177(GenBank/EMBL登录号X06402,“Fermentas”,Lithuania)作为模板,以及引物P14(SEQ ID NO:17)和P15(SEQ ID NO:18)通过PCR获得了含有由kan基因编码的Km<sup>R</sup>标记的DNA片段。引物P14含有与adhE基因的1627-1668bp区域相同的41个核苷酸,而引物P15含有引入到该引物中的与adhE基因的1702-1740bp区域互补的39个核苷酸,用于进一步整合到细菌染色体中。

[0227] 使用“Gene Amp PCR System 2700”扩增设备(Applied Biosystems)来提供PCR。反应混合物(总体积50μl)组成为5μl含25mM MgCl<sub>2</sub>的10x PCR缓冲液(“Fermentas”,Lithuania)、每种dNTP 200μM、每种所用的引物25pmol和1UTaq聚合酶(“Fermentas”,Lithuania)。向所述反应混合物加入约5ng质粒DNA作为PCR扩增的模板DNA。温度曲线如下:在95℃初始DNA变性5分钟,其后是25个循环的95℃变性30秒、55℃退火30秒、72℃延伸50秒,和在72℃最终延伸5分钟。然后通过琼脂糖凝胶电泳纯化扩增的DNA片段,使用



“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(Sigma,USA)提取,并用乙醇沉淀。

[0228] 使用引物P16(SEQ ID NO:19)和P17(SEQ ID NO:20)通过PCR检测了所得菌落中 $Km^R$ 标记的存在。为此,将新鲜分离的菌落悬浮在20 $\mu$ l水中,然后将1 $\mu$ l所得悬液用于PCR。温度曲线如下:在95 $^{\circ}$ C初始DNA变性5分钟;其后是30个循环的95 $^{\circ}$ C变性30秒、55 $^{\circ}$ C退火30秒和72 $^{\circ}$ C延伸45秒;在72 $^{\circ}$ C最终延伸5分钟。少数经检测的 $Km^R$ 菌落含有期望的1200bpDNA片段,这证实了取代天然adhE基因的230bp片段的 $Km^R$ 标记DNA的存在。获得的菌株之一通过在37 $^{\circ}$ C的培养消除了热敏质粒pKD46,并且将所得的菌株命名为大肠杆菌MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-wt  $\Delta$  34。

[0229] 然后,为了用编码Glu568Lys突变的adhE基因的片段替代由kan基因编码的卡那霉素抗性标记( $Km^R$ ),通过“Red-介导的整合”和/或“Red-驱动整合”的方法(Yu D., Sawitzke J.等., Recombineering with overlappingsingle-stranded DNA oligonucleotides: Testing of recombination intermediate, PNAS, 2003, 100(12), 7207-7212),将携带适当突变的寡核苷酸P18(SEQ ID NO:21)和P19(SEQ ID NO:22)整合到了大肠杆菌MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA, P<sub>L-tac</sub>adhE-wt  $\Delta$  34的染色体中。引物P18含有与adhE基因的1627-1702bp区域相同的75个核苷酸,而引物P19含有与adhE基因的1668-1740bp区域互补的75个核苷酸,这两种引物均包括编码Lys568代替Glu568的三联体。

[0230] 将克隆在含有2%乙醇和25mg/ml琥珀酸盐作为碳源的M9基本培养基上进行选择。

[0231] 使用引物P16(SEQ ID NO:19)和P17(SEQ ID NO:20)通过PCR检测克隆中 $Km^R$ 标记的缺失。为此,将新鲜分离的菌落悬浮在20 $\mu$ l水中,然后将1 $\mu$ l所得悬液用于PCR。温度曲线如下:在95 $^{\circ}$ C初始DNA变性5分钟;其后是30个循环的95 $^{\circ}$ C变性30秒、55 $^{\circ}$ C退火30秒和72 $^{\circ}$ C延伸25秒;在72 $^{\circ}$ C最终延伸5分钟。少数经检测的 $Km^S$ 菌落含有期望的adhE基因的230bp DNA片段,这证实了取代1200bp片段的 $Km^R$ 标记DNA的缺失。几个获得的菌株通过在37 $^{\circ}$ C的培养消除了热敏质粒pKD46,并且将所得的菌株命名为大肠杆菌MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568。

[0232] 通过测序证实了Glu568Lys突变的存在,例如,克隆18具有单突变Glu568Lys。另外还发现某些克隆(#1, 13)含有额外的突变:克隆1-Glu568Lys, Phe566Val;克隆13-Glu568Lys, Glu560Lys。

[0233] 研究了菌株MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568(克隆18)、MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568, Val566(克隆1)、MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568, Lys560(克隆13)和MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE\*的生长曲线(图3和4)。

[0234] 将菌株培养在具有乙醇作为唯一碳源的M9培养基中,以及含葡萄糖和乙醇(摩尔比1:3)的M9培养基中。

[0235] 实施例9. 构建大肠杆菌MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, adhE\*

[0236] 通过重建菌株MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE\*中的天然adhE启动子获得了大肠杆菌菌株MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, adhE\*。将菌株MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE\*的染色体中携带P<sub>L-tac</sub>启动子和由cat基因编码的氯霉素抗性标记( $Cm^R$ )的DNA片段替代为携带天然adhE启动子和由kan基因编码的卡那霉素抗性标记( $Km^R$ )的片段。使用菌株MG1655的DNA作为模板,以及引物P20(SEQ ID NO:23)和P21(SEQ ID NO:24)通过PCR获得天然P<sub>adhE</sub>。引物P20在其5'-端含有EcoRI识别位点,该位点是进一步连接于kan基因所必需的;引物P21含有与adhE基因

的5'-区(50bp-20bp)同源的30个核苷酸。

[0237] 使用商业上可获得的质粒pACYC177(GenBank/EMBL登录号X06402,“Fermentas”, Lithuania)作为模板,以及引物P22(SEQ ID NO:25)和P23(SEQ ID NO:26)通过PCR获得了含有由kan基因编码的Km<sup>R</sup>标记的DNA片段。引物P22含有引入到该引物中的与位于adhE基因起始密码子上游425bp的区域同源的41个核苷酸,用于进一步整合到细菌染色体中;而引物P23在其3'-端含有EcoRI识别位点,该位点是进一步连接于P<sub>adhE</sub>启动子所必需的。

[0238] 使用“Gene Amp PCR System 2700”扩增设备(Applied Biosystems)来提供PCR。反应混合物(总体积50μl)组成为5μl含25mM MgCl<sub>2</sub>的10x PCR缓冲液(“Fermentas”, Lithuania)、各200μM的dNTP、各25pmol所用的引物和1U Taq聚合酶(“Fermentas”, Lithuania)。向所述反应混合物加入约20ng基因组DNA或5ng质粒DNA作为PCR扩增的模板。温度曲线如下:在95℃初始DNA变性5分钟;其后是35个循环(对于P<sub>adhE</sub>)或25个循环(对于kan基因)的95℃变性30秒、55℃退火30秒、72℃延伸20秒(对于Ptac启动子)或50秒(对于kan基因);和在72℃最终延伸5分钟。然后通过琼脂糖凝胶电泳纯化扩增的DNA片段,使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(“Sigma”,USA)提取,并用乙醇沉淀。

[0239] 用EcoRI限制酶分别处理上述两种DNA片段并连接。使用引物P21和P22通过PCR扩增了连接产物。通过琼脂糖凝胶电泳纯化扩增的kan-P<sub>adhE</sub> DNA片段,使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(“Sigma”,USA)提取,并用乙醇沉淀。将所得DNA片段用于电穿孔和Red-介导的整合入大肠杆菌MG1655 Δtdh::rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE\*/pKD46的细菌染色体中。

[0240] 将MG1655 Δtdh::rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE\*/pKD46细胞在添加了氨苄青霉素(100μg/ml)的液体LB培养基中在30℃培养过夜,然后用添加了氨苄青霉素(100μg/ml)和L-阿拉伯糖(10mM)(使用阿拉伯糖来诱导编码Red系统的基因的质粒)的SOB培养基(酵母提取物5g/l; NaCl 0.5g/l;胰蛋白胨20g/l;KCl 2.5mM;MgCl<sub>2</sub> 10mM)以1:100稀释,并且在30℃培养以达到细菌培养物的光密度OD<sub>600</sub>=0.4-0.7。将来自10ml该细菌培养物的经培养细胞用冰冷的去离子水洗涤3次,其后在100μl水中悬浮。向该细胞悬液添加10μl溶解在去离子水中的DNA片段(100ng)。用“Bio-Rad”电穿孔仪(USA)(No.165-2098,2-89型)根据制造商的说明书进行了电穿孔。

[0241] 将经过电击的细胞添加至1ml SOC培养基(Sambrook等,“MolecularCloning A Laboratory Manual,Second Edition”(《分子克隆实验手册第二版》),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)),在37℃温育2小时,然后涂布到含有20μg/ml卡那霉素的L-琼脂上。

[0242] 使用引物P24(SEQ ID NO:27)和P25(SEQ ID NO:28)通过PCR检测在24小时内生长的菌落中取代P<sub>L-tac</sub>-Cm<sup>R</sup>-标记的P<sub>adhE</sub>-Km<sup>R</sup>标记的存在。为此,将新鲜分离的菌落悬浮在20μl水中,然后将1μl所得悬液用于PCR。温度曲线如下:在95℃初始DNA变性5分钟;其后是30个循环的95℃变性30秒、54℃退火30秒和72℃延伸1.0分钟;以及在72℃最终延伸5分钟。少数经检测的Km<sup>R</sup>菌落含有期望的1200bp DNA片段,这证实了天然P<sub>adhE</sub>启动子和Km<sup>R</sup>-标记DNA的存在。对这些片段中的一些进行了测序。证实了天然P<sub>adhE</sub>启动子的结构。含有在天然启动子调控下的突变adhE基因的菌株之一通过在37℃培养消除了热敏质粒pKD46,并将所得菌株命名为大肠杆菌MG1655 Δtdh,rhtA\*,adhE\*。

[0243] 对所有获得的菌株MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE;MG1655 Δtdh,rhtA\*,P<sub>L-</sub>

*tacadhE\**;MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*P<sub>L-tacadhE</sub>*-Lys568(克隆18);MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*P<sub>L-tacadhE</sub>*-Lys568,*Val566*(克隆1);MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*adhE\**和亲本菌株MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**在含有乙醇作为唯一碳源的基本培养基M9上的生长的能力进行了研究。显示亲本菌株MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**和野生型醇脱氢酶表达增强的菌株不能在含有乙醇(2%或3%)作为唯一碳源的培养基上生长(图3,A和B)。先前描述的在醇脱氢酶中含有单突变的菌株MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*P<sub>L-tacadhE</sub>*-Lys568(克隆18)(Membrillo-Hernandez, J.等, J. Biol. Chem. 275, 33869-33875(2000))在相同的培养基中显示非常差的生长。但是在醇脱氢酶中含有除突变Glu568Lys之外的突变的菌株显示出良好的生长(图3,A和B)。全部上述菌株均能在含有葡萄糖和乙醇的混合物的基本培养基M9上生长,但是含有除突变Glu568Lys之外的突变的突变醇脱氢酶表达增强的菌株显示出更好的生长(图4)。

[0244] 还显示了包含在天然启动子调控下的具有5个突变的醇脱氢酶的菌株MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*adhE\**不能在含有乙醇(2%或3%)作为唯一碳源的基本培养基M9上生长。编码所述醇脱氢酶的基因表达的增强对于良好的生长是必需的(图5)。

[0245] 实施例10. 增加突变*adhE*基因表达对L-苏氨酸产生的影响

[0246] 为了评估增强突变*adhE*基因的表达对苏氨酸产生的影响,将大肠杆菌菌株MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*P<sub>L-tacadhE</sub>*;MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*P<sub>L-tacadhE\*</sub>*;MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*P<sub>L-tacadhE</sub>*-Lys568(克隆18);MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*P<sub>L-tacadhE</sub>*-Lys568,*Val566*(克隆1);MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**,*adhE\**和亲本菌株MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**用质粒pVIC40转化。

[0247] 将这些菌株和亲本菌株MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**(pVIC40)在营养培养液中在37°C培养18个小时,将获得的每种培养物的0.3ml接种到20x200mm试管中的3ml发酵培养基(参见实施例4)中,并且用旋转摇床在34°C培养48小时。来自至少10次独立实验的数据在表1和2中显示。

[0248] 从表1和2中能够看出,与MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**(其中野生型醇脱氢酶和突变醇脱氢酶的表达均未增加)相比,或者甚至与MG1655  $\Delta$  *tdh*,*rhtA\**或*P<sub>L-tacadhE</sub>*(其中野生型醇脱氢酶的表达增加)相比,突变醇脱氢酶能够引起更高量的L-苏氨酸的积累。在含有葡萄糖和乙醇的混合物或者仅含乙醇作为唯一碳源的培养基中均观察到了这种在发酵过程中更高的L-苏氨酸积累。

[0249] 表1

[0250]

菌株	3%乙醇		2%乙醇	
	OD <sub>540</sub>	Thr, g/l	OD <sub>540</sub>	Thr, g/l
MG1655 $\Delta$ <i>tdh</i> , <i>rhtA*</i> (pVIC40)	1.6±0.1	< 0.1	1.4±0.1	< 0.1
MG1655 $\Delta$ <i>tdh</i> , <i>rhtA*</i> , <i>P<sub>L-tacadhE</sub></i> (wt) (pVIC40)	7.9±0.3	1.1±0.1	7.6±0.2	0.9±0.1
MG1655 $\Delta$ <i>tdh</i> , <i>rhtA*</i> , <i>P<sub>L-tacadhE</sub></i> -Lys568(pVIC40) (克隆 18)	14.7±0.3	3.3±0.1	13.7±0.4	2.3±0.3
MG1655 $\Delta$ <i>tdh</i> , <i>rhtA*</i> , <i>P<sub>L-tacadhE</sub></i> -Lys568, <i>Val566</i> (pVIC40) (克隆 1)	14.2±0.4	3.2±0.2	12.5±0.3	2.1±0.3
MG1655 $\Delta$ <i>tdh</i> , <i>rhtA*</i> , <i>P<sub>L-tacadhE*</sub></i> (pVIC40)	17.0±0.3	3.9±0.2	14.3±0.3	2.8±0.1
MG1655 $\Delta$ <i>tdh</i> , <i>rhtA*</i> , <i>adhE*</i> (pVIC40)	2.8±0.2	< 0.1	2.1±0.1	< 0.1

[0251] 表2

[0252]

菌株	2.7%乙醇+0.3%葡萄糖	
	OD <sub>540</sub>	Thr, g/l
MG1655 $\Delta$ tdh, rhtA* (pVIC40)	6.6 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2
MG1655 $\Delta$ tdh, rhtA*, P <sub>L-tac</sub> adhE(wt) (pVIC40)	13.4 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3
MG1655 $\Delta$ tdh, rhtA*, P <sub>L-tac</sub> adhE-Lys568 (pVIC40) (克隆 18)	16.1 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.2
MG1655 $\Delta$ tdh, rhtA*, P <sub>L-tac</sub> adhE-Lys568, Val566(pVIC40) (克隆 1)	15.5 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.2
MG1655 $\Delta$ tdh, rhtA*, P <sub>L-tac</sub> adhE*(pVIC40)	18.8 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.1
MG1655 $\Delta$ tdh, rhtA*, adhE*(pVIC40)	5.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3

[0253] 试管发酵在不恢复(reversion)蒸发的乙醇的条件下进行。

[0254] 实施例11. 增加adhE基因表达对L-赖氨酸产生的影响

[0255] 为了测试在P<sub>L-tac</sub>启动子调控下adhE基因增强的表达对赖氨酸产生的影响,将来自上述菌株MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE; MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE\*; MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568(克隆18); MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568, Val566(克隆1); MG1655  $\Delta$  tdh, rhtA\*, adhE\*的染色体的DNA片段通过P1转导(Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY)转移至产生赖氨酸的大肠杆菌菌株WC196  $\Delta$  cadA  $\Delta$  ldc (pCABD2)。pCABD2是包含以下基因的质粒:编码具有突变的二氢吡啶二羧酸合酶的dapA基因,所述突变使L-赖氨酸的反馈抑制脱敏;编码具有突变的的天冬氨酸激酶III的lysC基因,所述突变使L-赖氨酸的反馈抑制脱敏;编码二氢吡啶二羧酸还原酶的dapB基因;和编码二氨基庚二酸脱氢酶的ddh基因(美国专利No. 6,040,160)。

[0256] 将所得菌株和亲本菌株WC196  $\Delta$  cadA  $\Delta$  ldc (pCABD2)在37 $^{\circ}$ C涂布到含20mg/l链霉素的L-培养基平板上,再将对应于1/8平板的细胞接种至500ml摇瓶中含有所需药品的20ml发酵培养基中。培养可使用往复式摇床,以115rpm的搅动速度在37 $^{\circ}$ C进行48小时。培养之后,培养基中L-赖氨酸和残余乙醇的量可以通过已知方法测量(Bio-Sensor BF-5,由Oji Scientific Instruments制造)。然后,可以对每种菌株计算L-赖氨酸相对于消耗的乙醇的得率(yield)。

[0257] 发酵培养基的组成(g/l)如下:

[0258] 乙醇 20.0

[0259] (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 24.0

[0260] K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0

[0261] MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.0

[0262] FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01

[0263] MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01

[0264] 酵母提取物 2.0

[0265] 用KOH将pH调节至7.0,将培养基在115 $^{\circ}$ C高压灭菌10分钟。将乙醇和MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O分开灭菌。将CaCO<sub>3</sub>在180 $^{\circ}$ C干热灭菌2小时,再以终浓度30g/l添加至培养基。来自两次平行实验的数据示于表3。

[0266] 表3

[0267]

菌株	2%乙醇	
	OD <sub>600</sub>	Lys, g/l
WC196 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc (pCABD2)	1.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
WC196 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc, P <sub>L-tac</sub> adhE(wt) (pCABD2)	1.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
MG1655 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc, P <sub>L-tac</sub> adhE-Lys568 (pCABD2) (克隆 18)	5.2 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.1
MG1655 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc, P <sub>L-tac</sub> adhE-Lys568, Val566(pCABD2) (克隆 1)	1.6 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.3
MG1655 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc, P <sub>L-tac</sub> adhE*( pCABD2)	5.9 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1

[0268] 从表3能够看出,与野生型醇脱氢酶和突变醇脱氢酶的表达均未增加的WC196  $\Delta$  cadA  $\Delta$  ldc (pCABD2)相比,突变醇脱氢酶和野生型醇脱氢酶能够引起生长增强和更高量的L-赖氨酸积累。

[0269] 实施例12. 构建大肠杆菌MG1655  $\Delta$  argR, P<sub>L-tac</sub>adhE\*

[0270] 1. 构建菌株MG1655  $\Delta$  argR

[0271] 通过用kan基因失活天然argR基因构建了此菌株,所述argR基因编码大肠杆菌MG1655中L-精氨酸生物合成途径的阻抑物。为了替代天然argR基因,通过Red-驱动整合将携带由kan基因编码的卡那霉素抗性标记(Km<sup>R</sup>)的DNA片段整合至大肠杆菌MG1655(ATCC 700926)的染色体中来取代天然argR基因。

[0272] 使用商业上可获得的质粒pACYC177(GenBank/EMBL登录号X06402,“Fermentas”, Lithuania)作为模板,以及引物P26(SEQ ID NO:31)和P27(SEQ ID NO:32)通过PCR获得了含有由kan基因编码的Km<sup>R</sup>标记的DNA片段。引物P26含有引入到该引物中的与argR基因的5'-区同源的40个核苷酸,用于进一步整合到细菌染色体中。引物P27含有引入到该引物中的与argR基因的3'-区同源的41个核苷酸,用于进一步整合到细菌染色体中。温度曲线如下:在95 $^{\circ}$ C初始DNA变性5分钟,其后是25个循环的95 $^{\circ}$ C变性30秒、55 $^{\circ}$ C退火30秒、72 $^{\circ}$ C延伸40秒,和在72 $^{\circ}$ C最终延伸5分钟。然后,通过琼脂糖凝胶电泳纯化扩增的DNA片段,使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(“Sigma”,USA)提取,并用乙醇沉淀。

[0273] 将获得的DNA片段用于电穿孔和Red介导的整合入大肠杆菌MG1655/pKD46的细菌染色体中。

[0274] 将MG1655/pKD46细胞在添加了氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)的液体LB培养基中在30 $^{\circ}$ C培养过夜,然后用添加了氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)和L-阿拉伯糖(10mM)(使用阿拉伯糖来诱导编码Red系统的基因的质粒)的SOB培养基(酵母提取物5g/l;NaCl 0.5g/l;胰蛋白胨20g/l;KCl 2.5mM;MgCl<sub>2</sub>10mM)以1:100稀释,并且在30 $^{\circ}$ C培养以达到细菌培养物的光密度OD<sub>600</sub>=0.4-0.7。将来自10ml该细菌培养物的经培养细胞用冰冷的去离子水洗涤3次,其后在100 $\mu$ l水中悬浮。向该细胞悬液添加10 $\mu$ l溶解在去离子水中的DNA片段(100ng)。用“Bio-Rad”电穿孔仪(USA)(No.165-2098,2-89型)根据制造商的说明书进行了电穿孔。将经过电击的细胞添加至1ml SOC培养基,在37 $^{\circ}$ C温育2小时,然后涂布到含有25 $\mu$ g/ml氯霉素的L-琼脂上。使用引物P28(SEQ ID NO:33)和P29(SEQ ID NO:34)通过PCR检测24小时内生长的菌落中取代天然argR基因的Km<sup>R</sup>标记的存在。为此,将新鲜分离的菌落悬浮在20 $\mu$ l水中,然后将1 $\mu$ l所得悬液用于PCR。温度曲线如下:在95 $^{\circ}$ C初始DNA变性5分钟;其后是30个循环的95 $^{\circ}$ C变性30

秒、55℃退火30秒和72℃延伸30秒；以及在72℃最终延伸5分钟。少数经检测的Km<sup>R</sup>菌落含有期望的1110bp DNA片段，这证实了取代660bp的argR基因片段的Km<sup>R</sup>标记DNA的存在。获得的菌株之一通过在37℃培养消除了热敏质粒pKD46，并且将所得的菌株命名为大肠杆菌MG1655 Δ argR。

[0275] 2. 构建大肠杆菌MG1655 Δ argR, P<sub>L-tac</sub>adhE\*

[0276] 通过转导来自菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*的P<sub>L-tac</sub>adhE\*突变获得了大肠杆菌MG1655 Δ argR, P<sub>L-tac</sub>adhE\*。

[0277] 用生长在供体菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*上的噬菌体P<sub>1vir</sub>感染菌株MG1655 Δ argR, 获得了菌株MG1655 Δ argR, P<sub>L-tac</sub>adhE\*。在含有2%乙醇作为唯一碳源的M9平板上检查此菌株的生长。生长速率与菌株MG1655::P<sub>L-tac</sub>adhE\*的生长速率相同(36h)。

[0278] 实施例13. 构建pMW119-ArgA4质粒

[0279] 将具有提供fbr(反馈抗性)表型的单突变并且在其自身启动子调控下的ArgA基因(JP2002253268, EP1170361)克隆至pMW119载体中。

[0280] 使用质粒pKKA<sub>argA-r4</sub>(JP2002253268, EP1170361)作为模板, 以及引物P30(SEQ ID NO:35)和P31(SEQ ID NO:36)通过PCR获得了argA基因。引物P30的序列与位于argA基因起始密码子上游20bp和下游19bp的argA基因5'-区同源。引物P31含有与argA基因的3'-区同源的24个核苷酸和引入的HindIII限制位点, 用于进一步克隆至pMW119/BamHI-HindIII载体中。

[0281] 使用大肠杆菌MG1655作为模板, 以及引物P32(SEQ ID NO:37)和P33(SEQ ID NO:38)通过PCR获得了P<sub>argA</sub>启动子的序列。引物P32含有与位于启动子上游245bp的argA基因5'-非翻译区同源的30个核苷酸, 并且此序列包括BamHI识别位点。引物P33含有与位于起始密码子上游20bp的argA基因5'-区和起始密码子本身同源的24个核苷酸。温度曲线如下: 在95℃初始DNA变性5分钟, 其后是25个循环的95℃变性30秒、54℃退火30秒、72℃延伸1分20秒(对于ArgA基因)或20秒(对于P<sub>argA</sub>启动子), 和在72℃最终延伸5分钟。然后通过琼脂糖凝胶电泳纯化扩增的DNA片段, 使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(“Sigma”, USA)提取, 并用乙醇沉淀。

[0282] 使用上述两种DNA片段:P<sub>argA</sub>启动子和ArgA基因通过PCR获得了P<sub>argA</sub>ArgA片段。首先, 反应混合物(总体积100μl)组成为10μl含25mM MgCl<sub>2</sub>的10x PCR缓冲液(Sigma, USA)、各200μM的dNTP和1U Accu-Taq DNA聚合酶(Sigma, USA)。同时使用argA片段(25ng)和P<sub>argA</sub>(5ng)作为模板DNA和引物。接下来, 向反应混合物添加引物P31和P32。温度曲线如下: 第一步-在95℃初始DNA变性5分钟, 其后是10个循环的95℃变性30秒、53℃退火30秒、72℃延伸1分钟; 第二步-15个循环的95℃变性、54℃退火30秒、72℃延伸1分30秒。通过琼脂糖凝胶电泳纯化扩增的DNA片段, 使用“GenElute Spin Columns(GenElute自旋柱)”(“Sigma”, USA)提取, 用乙醇沉淀, 用BamHI和HindIII处理并与pMW119/BamHI-HindIII载体连接。结果获得了质粒pMW119-ArgA4。

[0283] 实施例14. 增加adhE基因表达对L-精氨酸产生的影响

[0284] 为了评估突变adhE基因增强的表达对L-精氨酸产生的影响, 将大肠杆菌菌株MG1655 Δ argR P<sub>L-tac</sub>adhE\*和MG1655 Δ argR各自用质粒pMW119-ArgA4转化。将每种转化体的10个所得菌落在补充了150mg/l Ap的营养培养液中在37℃培养18小时, 并且将每种所得培

养物的0.1ml接种至20x200mm试管中的2ml发酵培养基中,并用旋转摇床在32℃培养96小时。培养之后,使用以下流动相通过纸层析确定培养基中积累的L-精氨酸的量:丁醇:乙酸:水=4:1:1(v/v)。使用茚三酮的丙酮溶液(2%)作为显示试剂(visualizing reagent)。切下含有L-精氨酸的点,在CdCl<sub>2</sub>的0.5%水溶液中洗脱L-精氨酸,并且以分光光度法在540nm估计L-精氨酸的量。独立试管发酵的结果示于表4。如下表4所示,在补充了葡萄糖或不含葡萄糖的培养基中,与MG1655  $\Delta$  argR<sub>PL-tac</sub>adhE\*相比, MG1655  $\Delta$  argR PL-tacadhE\*均产生了更高量的L-精氨酸。

[0285] 发酵培养基的组成如下(g/l):

[0286]	乙醇	20
[0287]	葡萄糖	0/5
[0288]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25
[0289]	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
[0290]	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
[0291]	盐酸硫胺素	0.002
[0292]	酵母提取物	5.0
[0293]	CaCO <sub>3</sub>	33

[0294] 将MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、乙醇和CaCO<sub>3</sub>各自分开灭菌。

[0295] 表4

[0296]

菌株	乙醇(2%)		乙醇(2%)和葡萄糖(5%)	
	OD <sub>550</sub>	L-精氨酸的量, g/l	OD <sub>550</sub>	L-精氨酸的量, g/l
MG1655 $\Delta$ argR(pMW-argAm4)	1.3±0.2	<0.1	8.0±0.4	1.5±0.2
MG1655 $\Delta$ argRcat-P <sub>L-tac</sub> -adhE* (pMW-argAm4)	7.2±0.4	0.8±0.3	13.4±0.3	1.9±0.2

[0297] 实施例15. 构建产生L-亮氨酸的大肠杆菌菌株NS1391

[0298] 如下获得了菌株NS1391。

[0299] 首先,构建了乙酰乳酸合酶基因失活的菌株( $\Delta$  ilvIH和 $\Delta$  ilvGM缺失的组合)。通过P1转导(Sambrook等, "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))使ilvIH基因( $\Delta$  ilvIH::cat)从野生型菌株大肠杆菌K12(VKPM B-7)中缺失。使用大肠杆菌MG1655  $\Delta$  ilvIH::cat作为供体菌株。用Red-驱动整合方法进行了菌株MG1655中ilvIH操纵子的缺失。根据这种方法,构建了与ilvIH操纵子相邻的两个区域同源的PCR引物P34(SEQ ID NO:39)和P35(SEQ ID NO:40)和在模板质粒中赋予氯霉素抗性的基因。使用质粒pMW-attL-Cm-attR(PCT申请W005/010175)作为PCR反应中的模板。PCR所用条件如下:变性步骤在95℃进行3分钟;前两个循环的曲线:95℃1分钟、34℃30秒、72℃40秒;后30个循环的曲线:95℃30秒、50℃30秒、72℃40秒;最终步骤在72℃进行5分钟。在琼脂糖凝胶中纯化获得的1713bp PCR产物,并用于大肠杆菌MG1655/pKD46的电穿孔。在电穿孔之后选择氯霉素抗性的重组体,并使用位点特异性引物P36(SEQ ID NO:41)和P37(SEQ ID NO:42)通过PCR来验证。PCR验证的条件如下:变性步骤在94℃进行3分钟;30个循环的曲线:94℃30秒、53℃30秒、72℃1分20秒;最终步骤:72℃7分

钟。在使用来自亲本IlvIH<sup>+</sup>菌株MG1655的染色体DNA作为模板的反应中获得的PCR产物的长度为2491nt。在使用来自突变MG1655  $\Delta$  ilvIH::cat菌株的染色体DNA作为模板的反应中获得的PCR产物的长度为1823nt。结果获得了菌株MG1655  $\Delta$  ilvIH::cat。在通过P1转导从大肠杆菌K12(VKPM B-7)缺失了ilvIH基因( $\Delta$  ilvIH::cat)之后,选择Cm<sup>R</sup>的转导体。结果获得了菌株B-7  $\Delta$  ilvIH::cat。为了从B-7  $\Delta$  ilvIH::cat消除氯霉素抗性标记,用质粒pMW118-int-xis(Ap<sup>R</sup>)(W02005/010175)转化细胞。将Ap<sup>R</sup>克隆在含有150mg/l氨苄青霉素的LB琼脂平板上在30℃培养。挑取了几十个Ap<sup>R</sup>克隆并且测试其氯霉素敏感性。通过在LB琼脂平板上在42℃的温育将质粒pMW118-int-xis从Cm<sup>S</sup>细胞中去除。结果获得了菌株B-7  $\Delta$  ilvIH。

[0300] 通过P1转导使ilvGM基因( $\Delta$  ilvGM::cat)从大肠杆菌B-7  $\Delta$  ilvIH中缺失。使用大肠杆菌MG1655  $\Delta$  ilvGM::cat作为供体菌株。通过Red-驱动整合使ilvGM操纵子从菌株MG1655中缺失。根据这种方法,构建了与ilvGM操纵子两个相邻区域同源的PCR引物P38(SEQ ID NO:43)和P39(SEQ ID NO:44)和在模板质粒中赋予氯霉素抗性的基因。在PCR反应中使用质粒pMW-attL-Cm-attR(PCT申请W0 05/010175)作为模板。PCR的条件如下:变性步骤在95℃进行3分钟;前两个循环的曲线:95℃1分钟、34℃30秒、72℃40秒;后30个循环的曲线:95℃30秒、50℃30秒、72℃40秒;最终步骤在72℃进行5分钟。

[0301] 在琼脂糖凝胶中纯化获得的1713bp PCR产物,并用于大肠杆菌MG1655/pKD46的电穿孔。在电穿孔之后选择氯霉素抗性重组体,并使用位点特异性引物P40(SEQ ID NO:45)和P41(SEQ ID NO:46)通过PCR验证。PCR验证的条件如下:变性步骤在94℃进行3分钟;30个循环的曲线:94℃30秒、54℃30秒、72℃1分30秒;最终步骤:72℃7分钟。在使用来自亲本菌株MG1655的染色体DNA作为模板的反应中获得的PCR产物的长度为2209nt。在使用来自突变MG1655  $\Delta$  ilvGM::cat菌株的染色体DNA作为模板的反应中获得的PCR产物的长度为1941nt。结果获得了菌株MG1655  $\Delta$  ilvGM::cat。在通过P1转导从大肠杆菌B-7  $\Delta$  ilvIH缺失了ilvGM基因( $\Delta$  ilvGM::cat)之后,选择Cm<sup>R</sup>的转导体。结果获得了菌株B-7  $\Delta$  ilvIH  $\Delta$  ilvBN  $\Delta$  ilvGM::cat。如上所述将氯霉素抗性标记从B-7  $\Delta$  ilvIH  $\Delta$  ilvBN  $\Delta$  ilvGM::cat中消除。结果获得了菌株B-7  $\Delta$  ilvIH  $\Delta$  ilvGM。

[0302] 通过Red-驱动整合用噬菌体 $\lambda$ Pl启动子替代ilvBN操纵子的天然调节子区。为此,使用具有单一AHAS I的菌株B7  $\Delta$  ilvIH  $\Delta$  ilvGM作为原始菌株用于这样的修饰。根据Red-驱动整合的方法,构建了PCR引物P42(SEQ ID NO:47)和P43(SEQ ID NO:48)。寡核苷酸P42(SEQ ID NO:47)与ilvB基因上游的区域以及存在于BW25113cat-Pl-yddG染色体DNA中赋予抗生素抗性的基因的相邻区域同源。寡核苷酸P43(SEQ ID NO:48)与ilvB区和BW25113cat-Pl-yddG染色体中存在的Pl启动子下游的区域二者同源。先前已经详细描述了BW25113cat-Pl-yddG的获得(EP1449918A1,俄罗斯专利RU2222596)。使用菌株BW25113cat-Pl-yddG的染色体DNA作为PCR的模板。PCR的条件如下:变性在95℃进行3分钟;前两个循环的曲线:95℃1分钟、34℃30秒、72℃40秒;后30个循环的曲线:95℃30秒、50℃30秒、72℃40秒;最终步骤在72℃进行5分钟。结果获得了PCR产物(SEQ IDNO:49),将其在琼脂糖凝胶中纯化,并用于含有温度敏感复制质粒pKD46的大肠杆菌B-7  $\Delta$  ilvIH  $\Delta$  ilvGM的电穿孔。如下制备电感受态细胞:将大肠杆菌菌株B-7  $\Delta$  ilvIH  $\Delta$  ilvGM在含有氨苄青霉素(100mg/l)的LB培养基中在30℃培养过夜,再用5ml含有氨苄青霉素和L-阿拉伯糖(1mM)的SOB培养基(Sambrook等,“Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor



Laboratory Press(1989))将培养物稀释100倍。将细胞在通气条件下在30℃培养至OD<sub>600</sub> ≈ 0.6,然后通过浓缩100倍并用冰冷的去离子水洗涤3次来将其制成电感受态。使用70μl细胞和 ≈ 100ng PCR产物进行电穿孔。电穿孔之后,将细胞与1ml SOC培养基(Sambrook等,“MolecularCloning A Laboratory Manual,Second Edition”,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))一起在37℃温育2.5小时,温育之后铺板至L-琼脂上,在37℃培养以选择Cm<sup>R</sup>重组体。然后,为了去除pKD46质粒,在含有Cm的L-琼脂上在42℃进行两次传代,并且测试获得的菌落对氨苄青霉素的敏感性。

[0303] 获得的菌株B7 Δ ilvIH Δ ilvGM cat-P<sub>L</sub>-ilvBN是缬氨酸敏感性的。从这种菌株获得了AHAS I的新的缬氨酸抗性自发突变体。表征了在1g/l缬氨酸条件下生长更好的菌株。

[0304] 还获得了对异亮氨酸有抗性的缬氨酸抗性突变。获得了与野生型相比具有更大比活性的变体。测定了突变ilvBN4的突变操纵子的核苷酸序列。揭示了I1vBN4在I1vN:N17K Asn-Lys中含有一个点突变(用aag代替密码子aac)。将获得的菌株B7 Δ ilvIH Δ ilvGM cat-P<sub>L</sub>-ilvBN4用于以下的构建。

[0305] 然后,通过P1转导将cat-P<sub>L</sub>-ilvBN4DNA片段从大肠杆菌B7 Δ ilvIH Δ ilvGM cat-P<sub>L</sub>-ilvBN4转移至大肠杆菌MG1655mini-Mu::scrKYABR(EP申请1149911)。结果获得了菌株ESP214。如上所述从菌株ESP214中消除氯霉素抗性标记。结果获得了菌株ESP215。

[0306] 然后为了随后整合入染色体中,将(SEQ ID NO:50)中所示DNA片段用于菌株ESP215/pKD46的电穿孔。这种DNA片段含有与基因b1701的3'区和基因b1703的5'区互补的区域(这些基因与基因pps相邻),其为整合到所述染色体中所必需的。该片段还含有可切除的(excisable)氯霉素抗性标记cat,和在组成型启动子P<sub>L</sub>调控下的突变ilvBN4操纵子。如上所述进行电穿孔。由于将cat-P<sub>L</sub>-ilvBN4片段整合至染色体中,所以选择的Cm<sup>R</sup>重组体含有基因pps的缺失。由此获得了菌株ESP216。如上所述将氯霉素抗性标记从菌株ESP216中消除。结果获得了菌株ESP217。

[0307] 在下一步中,将在组成型启动子P<sub>L</sub>调控下的突变leuA基因(Gly479->Cys)引入菌株ESP217。为了随后整合入染色体中,将(SEQ ID NO:51)中所示DNA片段用于菌株ESP217/pKD46的电穿孔。该DNA片段含有35nt区,其是整合入染色体中所必需的,并且与基因leuA的上游区同源。该DNA片段还含有与氯霉素抗性标记cat的序列互补的可切除的区,以及在组成型启动子P<sub>L</sub>调控下的突变leuA(Gly479->Cys)基因。如上所述进行电穿孔。选择的Cm<sup>R</sup>重组体含有整合入染色体中的组成型启动子P<sub>L</sub>调控下的突变基因leuA(Gly479->Cys)。由此获得了菌株ESP220。如上所述从菌株ESP220消除了氯霉素抗性标记。结果获得了菌株ESP221。

[0308] 然后,为了随后整合入染色体中,将SEQ ID NO:52中所示DNA片段用于菌株ESP221/pKD46的电穿孔。这种DNA片段含有与基因tyrB的上游区同源的35nt区,其是整合入染色体中所必需的。该DNA片段还含有与氯霉素抗性标记cat的序列互补的可切除的区域,以及具有修饰的调节(-35)区的基因tyrB。如上所述进行电穿孔。选择的Cm<sup>R</sup>重组体包含具有修饰调节(-35)区的基因tyrB。由此获得了菌株NS1390。如上所述将氯霉素抗性标记从菌株NS1390中消除。结果获得了菌株NS1391。将产生亮氨酸的菌株NS1391用于进一步的工作。

[0309] 实施例16. 增加突变adhE基因表达对L-亮氨酸产生的影响

[0310] 为了测试在P<sub>L-tac</sub>启动子调控下adhE基因的增强表达对L-亮氨酸产生的影响,通过

P1转导(Miller, J.H.(1972)Experiments in Molecular Genetics, ColdSpring Harbor Lab.Press, Plainview, NY)将来自上述菌株MG1655  $P_{L-tac}adhE^*$ 染色体的DNA片段转移至产生L-亮氨酸的大肠杆菌菌株NS1391, 以获得菌株NS1391 $P_{L-tac}adhE^*$ 。

[0311] 将两种大肠杆菌菌株NS1391和NS1391 $P_{L-tac}adhE^*$ 在L-琼脂平板上在37℃培养18-24小时。为了获得种子培养物, 在旋转摇床(250rpm)上将菌株在20x200-mm试管中在32℃培养18个小时, 所述试管含有补充了4%蔗糖的2ml L-培养液。然后, 用0.21ml种子材料(10%)接种发酵培养基。在20x200-mm试管中的2ml基本发酵培养基中进行发酵。将细胞在32℃以250rpm摇动的条件下培养48-72小时。通过纸层析(液相组成: 丁醇-乙酸-水=4:1:1)测定L-亮氨酸的量。十个独立试管发酵的结果示于表5。如下表5所示, 在含有不同浓度乙醇的培养基中, 与NS1391相比, NS1391  $P_{L-tac}adhE^*$ 产生了更高量的L-亮氨酸。

[0312] 发酵培养基(pH 7.2)的组成(g/l)如下:

[0313]	葡萄糖	60.0
[0314]	乙醇	0/10.0/20.0/30.0
[0315]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25.0
[0316]	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
[0317]	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
[0318]	硫胺素	0.01
[0319]	CaCO <sub>3</sub>	25.0

[0320] 将葡萄糖、乙醇和CaCO<sub>3</sub>分开灭菌。

[0321] 表5

[0322]

菌株	葡萄糖(6%)							
	不含乙醇		+1%乙醇		+2%乙醇		+3%乙醇	
	Leu, g/l	OD <sub>550</sub>	Leu, g/l	OD <sub>550</sub>	Leu, g/l	OD <sub>550</sub>	Leu, g/l	OD <sub>550</sub>
NS1391	5.0±0.1	34.2±0.6	4.8±0.1	31.7±0.4	3.9±0.2	31.3±0.6	4.0±0.1	28.0±0.6
NS1391 $P_{L-tac}adhE^*$	5.1±0.1	31.1±0.2	5.9±0.1	29.3±0.3	4.9±0.1	27.3±0.6	4.6±0.1	22.8±0.2

[0323] 实施例17. 增加adhE基因表达对L-苯丙氨酸产生的影响

[0324] 为了测试在 $P_{L-tac}$ 启动子调控下的adhE基因的增强表达对苯丙氨酸产生的影响, 可以通过P1转导(Miller, J.H.(1972)Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab.Press, Plainview, NY)将来自如上所述MG1655  $\Delta tdh, rhtA^*, P_{L-tac}adhE$ ; MG1655  $\Delta tdh, rhtA^*, P_{L-tac}adhE^*$ ; MG1655  $\Delta tdh, rhtA^*, P_{L-tac}adhE-Lys568$ (克隆18); MG1655  $\Delta tdh, rhtA^*, P_{L-tac}adhE-Lys568, Val566$ (克隆1); MG1655  $\Delta tdh, rhtA^*, adhE^*$ 的染色体的DNA片段转移至产生苯丙氨酸的大肠杆菌菌株AJ12739。菌株AJ12739已经在2001年11月6日以登录号VKPM B-8197保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心(VKPM)(Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, .1), 其后在2002年8月23日转换为根据布达佩斯条约规定的保藏。

[0325] 可以将每种所得菌株和亲本菌株AJ12739各自都在营养培养液中在37℃培养18个小时, 并且可以将所得培养物的0.3ml各自接种至20x 200mm试管中的3ml发酵培养基中, 并且用旋转摇床在37℃培养48小时。培养之后, 能够通过TLC测定培养基中积累的苯丙氨酸的

量。可使用以0.11mm的不含荧光指示剂的Sorbfil硅胶层涂覆的10x 15cm TLC平板(StockCompany Sorbpolymer,Krasnodar,Russia)。可以用流动相(2-丙醇(*propan-2-ol*):乙酸乙酯:25%氨水:水=40:40:7:16(v/v)将Sorbfil平板展开。可以使用茚三酮的丙酮溶液(2%)作为显示试剂。

[0326] 发酵培养基的组成(g/l):

[0327]	乙醇	20.0
[0328]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16.0
[0329]	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
[0330]	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
[0331]	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01
[0332]	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01
[0333]	盐酸硫胺素	0.0002
[0334]	酵母提取物	2.0
[0335]	酪氨酸	0.125
[0336]	CaCO <sub>3</sub>	20.0

[0337] 将乙醇和硫酸镁分开灭菌。CaCO<sub>3</sub>在180℃干热灭菌2小时。将pH调节至7.0。

[0338] 实施例18. 增加adhE基因表达对L-色氨酸产生的影响

[0339] 为了测试在P<sub>L-tac</sub>启动子调控下的adhE基因的增强表达对色氨酸产生的影响,通过P1转导(Miller,J.H.(1972)Experiments in Molecular Genetics,ColdSpring Harbor Lab.Press,Plainview,NY)将来自上述菌株MG1655 Δ *tdh*,*rhtA*\*,P<sub>L-tac</sub>adhE;MG1655 Δ *tdh*,*rhtA*\*,P<sub>L-tac</sub>adhE\*;MG1655 Δ *tdh*,*rhtA*\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568(克隆18);MG1655 Δ *tdh*,*rhtA*\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568,Va1566(克隆1);MG1655 Δ *tdh*,*rhtA*\*,*adhE*\*的染色体的DNA片段转移至产生色氨酸的大肠杆菌菌株SV164(pGH5)。菌株SV164具有编码不受色氨酸反馈抑制的邻氨基苯甲酸合酶的*trpE*等位基因。质粒pGH5含有突变*serA*基因,该基因编码不受丝氨酸反馈抑制的磷酸甘油酸脱氢酶。菌株SV164(pGH5)在美国专利No.6,180,373或欧洲专利0662143中详细描述。

[0340] 可将所得菌株和亲本菌株SV164(pGH5)各自在3ml补充了20mg/l四环素(pGH5质粒的标记物)的营养培养液中在37℃摇动培养18小时。将每种获得的培养物的0.3ml接种至20x 200mm试管中含有四环素(20mg/l)的3ml发酵培养基中,并且用旋转摇床以250rpm在37℃培养48小时。培养之后,可以通过如实施例17中所述的TLC来测定培养基中积累的色氨酸的量。发酵培养基组分列于表6,但是应当以如所示的各个单独的组A、B、C、D、E、F和H进行灭菌,以避免灭菌过程中不良的相互作用。

[0341] 表6

[0342]

溶液	组分	终浓度, g/l
----	----	----------

A	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
	NaCl	0.5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5
	L-甲硫氨酸	0.05
	L-苯丙氨酸	0.1
	L-酪氨酸	0.1
	Mameno(豆浓)(总N)	0.07
	B	乙醇
C	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.3
	CaCl <sub>2</sub>	0.011
D	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075
	柠檬酸钠	1.0
E	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.00015
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0025
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.00007
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.00025
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0016
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0003
F	盐酸硫胺素	0.005
G	CaCO <sub>3</sub>	30.0
H	吡哆醇	0.03

[0343] 溶液A具有7.1的pH,通过NH<sub>4</sub>OH调节。

[0344] 实施例19.增加adhE基因表达对L-苏氨酸产生的影响

[0345] 为了测试在P<sub>L-tac</sub>启动子调控下的adhE基因的增强表达对产生组氨酸的影响,通过P1转导(Miller,J.H.(1972)Experiments in Molecular Genetics,Cold Spring Harbor Lab.Press,Plainview,NY)将来自如上所述菌株MG1655 Δ tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE;MG1655 Δ tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE\*;MG1655 Δ tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568(克隆18);MG1655 Δ tdh,rhtA\*,P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568,Val566(克隆1);MG1655 Δ tdh,rhtA\*,adhE\*的染色体的DNA片段转移至产生组氨酸的大肠杆菌菌株80。菌株80已经在俄罗斯专利2119536中描述,并且在1999年10月15日以登录号VKPM B-7270保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心(Russia,117545Moscow,1Dorozhny proezd,1),其后在2004年7月12日转为根据布达佩斯条约的保藏。

[0346] 可以将所得菌株和亲本菌株80各自在L培养液中在29℃培养6小时。然后将每种获得的培养物的0.1ml接种至20x200mm试管中的2ml发酵培养基中,并且用旋转摇床(350rpm)在29℃培养65小时。培养之后,可以通过纸层析来测定培养基中积累的组氨酸的量。纸可以用以下流动相来展开:正丁醇:乙酸:水=4:1:1(v/v)。可以使用茚三酮的丙酮溶液(0.5%)作为显示试剂。

[0347] 发酵培养基(pH 6.0)的组成(g/l):

[0348] 乙醇 20.0

[0349]	Mameno(豆浓)(大豆水解物)	0.2作为总氮(as total nitrogen)
[0350]	L-脯氨酸	1.0
[0351]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25.0
[0352]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
[0353]	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
[0354]	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01
[0355]	MnSO <sub>4</sub>	0.01
[0356]	硫胺素	0.001
[0357]	甜菜碱	2.0
[0358]	CaCO <sub>3</sub>	60.0

[0359] 将乙醇、脯氨酸、甜菜碱和CaCO<sub>3</sub>分开灭菌。在灭菌之前将pH调节至6.0。

[0360] 实施例20. 增加adhE基因表达对L-谷氨酸产生的影响

[0361] 为了测试在P<sub>L-tac</sub>启动子调控下的adhE基因的增强表达对谷氨酸产生的影响,通过P1转导(Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, ColdSpring Harbor Lab. Press, Plainview, NY)将来自上述菌株MG1655 Δ tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE; MG1655 Δ tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE\*; MG1655 Δ tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568(克隆18); MG1655 Δ tdh, rhtA\*, P<sub>L-tac</sub>adhE-Lys568, Val566(克隆1); MG1655 Δ tdh, rhtA\*, adhE\*的染色体的DNA片段转移至产生谷氨酸的大肠杆菌菌株VL334thrC<sup>+</sup>(EP1172433)。菌株VL334thrC<sup>+</sup>已经在2004年12月6日以登录号VKPM B-8961保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心,并且在2004年12月8日转为根据布达佩斯条约的保藏。

[0362] 可将所得菌株和亲本菌株VL334thrC<sup>+</sup>各自在3ml营养培养液中在37℃摇动培养18小时。将每种获得的培养物的0.3ml接种至20x 200mm试管中的3ml发酵培养基中,并且用旋转摇床以250rpm在37℃培养48小时。

[0363] 发酵培养基(pH 7.2)的组成(g/l):

[0364]	乙醇	20.0
[0365]	硫酸铵	25.0
[0366]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
[0367]	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
[0368]	硫胺素	0.0001
[0369]	L-异亮氨酸	0.05
[0370]	CaCO <sub>3</sub>	25.0

[0371] 将乙醇和CaCO<sub>3</sub>分开灭菌。

[0372] 尽管已经参考本发明的优选实施方案详细地描述了本发明,但是对于本领域技术人员显而易见的是可以在不背离本发明范围的前提下进行多种改变以及采用等同物。将每个上文提到的文件通过引用整体并入本文。

[0373] 工业实用性

[0374] 根据本发明,通过肠杆菌科的细菌产生L-氨基酸能够得到增强。

<110>味之素株式会社(Ajinomoto Co.,Inc.)

<120>使用肠杆菌科细菌产生L-氨基酸的方法

<130>C666-C7177

<150>RU2006125964

<151>2006-07-09

<150>US60/885671

<151>2007-01-19

<160>58

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>2676

<212>DNA

<213>大肠杆菌(Escherichia coli)

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(2676)

<400>1

atg gct gtt act aat gtc gct gaa ctt aac gca ctc gta gag cgt gta	48
Met Ala Val Thr Asn Val Ala Glu Leu Asn Ala Leu Val Glu Arg Val	
1                    5                    10                    15	
aaa aaa gcc cag cgt gaa tat gcc agt ttc act caa gag caa gta gac	96
Lys Lys Ala Gln Arg Glu Tyr Ala Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Asp	
20                    25                    30	
aaa atc ttc cgc gcc gcc get ctg get get gca gat get cga atc cca	144
Lys Ile Phe Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Arg Ile Pro	
35                    40                    45	
ctc gcg aaa atg gcc gtt gcc gaa tcc ggc atg ggt atc gtc gaa gat	192
Leu Ala Lys Met Ala Val Ala Glu Ser Gly Met Gly Ile Val Glu Asp	
50                    55                    60	



ctg ttg cag ggt aaa gag ctg aaa gct gtt cag gat gtt atc ctg aaa	864
Leu Leu Gln Gly Lys Glu Leu Lys Ala Val Gln Asp Val Ile Leu Lys	
275 280 285	
aac ggt gcg ctg aac gcg gct atc gtt ggt cag cca gcc tat aaa att	912
Asn Gly Ala Leu Asn Ala Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Tyr Lys Ile	
290 295 300	
gct gaa ctg gca ggc ttc tct gta cca gaa aac acc aag att ctg atc	960
Ala Glu Leu Ala Gly Phe Ser Val Pro Glu Asn Thr Lys Ile Leu Ile	
305 310 315 320	
ggt gaa gtg acc gtt gtt gat gaa agc gaa ccg ttc gca cat gaa aaa	1008
Gly Glu Val Thr Val Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys	
325 330 335	
ctg tcc ccg act ctg gca atg tac cgc gct aaa gat ttc gaa gac gcg	1056
Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Phe Glu Asp Ala	
340 345 350	
gta gaa aaa gca gag aaa ctg gtt gct atg ggc ggt atc ggt cat acc	1104
Val Glu Lys Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Cly Gly Ile Gly His Thr	
355 360 365	
tct tgc ctg tac act gac cag gat aac caa ccg gct cgc gtt tct tac	1152
Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Pro Ala Arg Val Ser Tyr	
370 375 380	
ttc ggt cag aaa atg aaa acg gcg cgt atc ctg att aac acc cca gcg	1200
Phe Gly Gln Lys Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala	
385 390 395 400	
tct cag ggt ggt atc ggt gac ctg tat aac ttc aaa ctc gca cct tcc	1248
Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser	
405 410 415	
ctg act ctg ggt tgt ggt tct tgg ggt ggt aac tcc atc tct gaa aac	1296
Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn	
420 425 430	
ggt ggt ccg aaa cac ctg atc aac aag aaa acc gtt gct aag cga gct	1344
Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala	
435 440 445	
gaa aac atg ttg tgg cac aaa ctt ccg aaa tct atc tac ttc cgc cgt	1392
Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg	
450 455 460	
ggc tcc ctg cca atc gcg ctg gat gaa gtg att act gat ggc cac aaa	1440
Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Asp Glu Val Ile Thr Asp Gly His Lys	
465 470 475 480	



cgt gcg ctc atc gtg act gac cgc ttc ctg ttc aac aat ggt tat gct	1488
Arg Ala Leu Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Ala	
485 490 495	
gat cag atc act tcc gta ctg aaa gca gca ggc gtt gaa act gaa gtc	1536
Asp Gln Ile Thr Ser Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Glu Thr Glu Val	
500 505 510	
ttc ttc gaa gta gaa gcg gac ccg acc ctg agc atc gtt cgt aaa ggt	1584
Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly	
515 520 525	
gca gaa ctg gca aac tcc ttc aaa cca gac gtg att atc gcg ctg ggt	1632
Ala Glu Leu Ala Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly	
530 535 540	
ggt ggt tcc ccg atg gac gcc gcg aag atc atg tgg gtt atg tac gaa	1680
Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu	
545 550 555 560	
cat ccg gaa act cac ttc gaa gag ctg gcg ctg cgc ttt atg gat atc	1728
His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile	
565 570 575	
cgt aaa cgt atc tac aag ttc ccg aaa atg ggc gtg aaa gcg aaa atg	1776
Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Lys Met	
580 585 590	
atc gct gtc acc acc act tct ggt aca ggt tct gaa gtc act ccg ttt	1824
Ile Ala Val Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe	
595 600 605	
gcg gtt gta act gac gac gct act ggt cag aaa tat ccg ctg gca gac	1872
Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp	
610 615 620	
tat gcg ctg act ccg gat atg gcg att gtc gac gcc aac ctg gtt atg	1920
TyrAla Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met	
625 630 635 640	
gac atg ccg aag tcc ctg tgt gct ttc ggt ggt ctg gac gca gta act	1968
Asp Met Pro Lys Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr	
645 650 655	
cac gcc atg gaa gct tat gtt tct gta ctg gca tct gag ttc tct gat	2016
His Ala Met Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Ser Glu Phe Ser Asp	
660 665 670	
ggt cag gct ctg cag gca ctg aaa ctg ctg aaa gaa tat ctg cca gcg	2064
Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Ala	
675 680 685	

tcc tac cac gaa ggg tct aaa aat ccg gta gcg cgt gaa cgt gtt cac	2112
Ser Tyr His Glu Gly Ser Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His	
690 695 700	
agt gca gcg act atc gcg ggt atc gcg ttt gcg aac gcc ttc ctg ggt	2160
Ser Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly	
705 710 715 720	
gta tgt cac tca atg gcg cac aaa ctg ggt tcc cag ttc cat att ccg	2208
Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Gln Phe His Ile Pro	
725 730 735	
cac ggt ctg gca aac gcc ctg ctg att tgt aac gtt att cgc tac aat	2256
His Gly Leu Ala Asn Ala Leu Leu Ile Cys Asn Val Ile Arg Tyr Asn	
740 745 750	
gcg aac gac aac ccg acc aag cag act gca ttc agc cag tat gac cgt	2304
Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg	
755 760 765	
ccg cag gct cgc cgt cgt tat gct gaa att gcc gac cac ttg ggt ctg	2352
Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu	
770 775 780	
agc gca ccg ggc gac cgt act gct gct aag atc gag aaa ctg ctg gca	2400
Ser Ala Pro Gly Asp Arg Thr Ala Ala Lys Ile Glu Lys Leu Leu Ala	
785 790 795 800	
tgg ctg gaa acg ctg aaa gct gaa ctg ggt att ccg aaa tct atc cgt	2448
Trp Leu Glu Thr Leu Lys Ala Glu Leu Gly Ile Pro Lys Ser Ile Arg	
805 810 815	
gaa gct ggc gtt cag gaa gca gac ttc ctg gcg aac gtg gat aaa ctg	2496
Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala Asn Val Asp Lys Leu	
820 825 830	
tct gaa gat gca ttc gat gac cag tgc acc ggc gct aac ccg cgt tac	2544
Ser Glu Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Tyr	
835 840 845	
ccg ctg atc tcc gag ctg aaa cag att ctg ctg gat acc tac tac ggt	2592
Pro Leu Ile Ser Glu Leu Lys Gln Ile Leu Leu Asp Thr Tyr Tyr Gly	
850 855 860	
cgt gat tat gta gaa ggt gaa act gca gcg aag aaa gaa gct gct ccg	2640
Arg Asp Tyr Val Glu Gly Glu Thr Ala Ala Lys Lys Glu Ala Ala Pro	
865 870 875 880	
gct aaa gct gag aaa aaa gcg aaa aaa tcc gct taa	2676
Ala Lys Ala Glu Lys Lys Ala Lys Lys Ser Ala	
885 890	

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;891

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;大肠杆菌

&lt;400&gt;2

```

Met Ala Val Thr Asn Val Ala Glu Leu Asn Ala Leu Val Glu Arg Val
1           5           10           15
Lys Lys Ala Gln Arg Glu Tyr Ala Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Asp
           20           25           30
Lys Ile Phe Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Arg Ile Pro
           35           40           45
Leu Ala Lys Met Ala Val Ala Glu Ser Gly Met Gly Ile Val Glu Asp
           50           55           60
Lys Val Ile Lys Asn His Phe Ala Ser Glu Tyr Ile Tyr Asn Ala Tyr
65           70           75           80
Lys Asp Glu Lys Thr Cys Gly Val Leu Ser Glu Asp Asp Thr Phe Gly
           85           90           95
Thr Ile Thr Ile Ala Glu Pro Ile Gly Ile Ile Cys Gly Ile Val Pro
           100          105          110
Thr Thr Asn Pro Thr Ser Thr Ala Ile Phe Lys Ser Leu Ile Ser Leu
           115          120          125
Lys Thr Arg Asn Ala Ile Ile Phe Ser Pro His Pro Arg Ala Lys Asp
           130          135          140
Ala Thr Asn Lys Ala Ala Asp Ile Val Leu Gln Ala Ala Ile Ala Ala
145          150          155          160
Gly Ala Pro Lys Asp Leu Ile Gly Trp Ile Asp Gln Pro Ser Val Glu
           165          170          175
Leu Ser Asn Ala Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala
           180          185          190
Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro
           195          200          205
Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Ile Asp Glu Thr
           210          215          220
Ala Asp Ile Lys Arg Ala Val Ala Ser Val Leu Met Ser Lys Thr Phe
225          230          235          240
Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Val Val Val Val Asp
           245          250          255

```

Ser Val Tyr Asp Ala Val Arg Glu Arg Phe Ala Thr His Gly Gly Tyr  
 260 265 270  
 Leu Leu Gln Gly Lys Glu Leu Lys Ala Val Gln Asp Val Ile Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Gly Ala Leu Asn Ala Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Tyr Lys Ile  
 290 295 300  
 Ala Glu Leu Ala Gly Phe Ser Val Pro Glu Asn Thr Lys Ile Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Val Thr Val Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Phe Glu Asp Ala  
 340 345 350  
 Val Glu Lys Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Gly Ile Gly His Thr  
 355 360 365  
 Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Pro Ala Arg Val Ser Tyr  
 370 375 380  
 Phe Gly Gln Lys Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser  
 405 410 415  
 Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn  
 420 425 430  
 Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala  
 435 440 445  
 Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg  
 450 455 460  
 Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Asp Glu Val Ile Thr Asp Gly His Lys  
 465 470 475 480  
 Arg Ala Leu Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Ala  
 485 490 495  
 Asp Gln Ile Thr Ser Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Glu Thr Glu Val  
 500 505 510  
 Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly  
 515 520 525  
 Ala Glu Leu Ala Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly  
 530 535 540  
 Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu  
 545 550 555 560  
 His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile

	565		570		575
Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Lys Met					
	580		585		590
Ile Ala Val Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe					
	595		600		605
Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp					
	610		615		620
Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met					
625		630		635	640
Asp Met Pro Lys Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr					
	645		650		655
His Ala Met Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Ser Glu Phe Ser Asp					
	660		665		670
Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Ala					
	675		680		685
Ser Tyr His Glu Gly Ser Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His					
	690		695		700
Ser Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly					
705		710		715	720
Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Gln Phe His Ile Pro					
	725		730		735
His Gly Leu Ala Asn Ala Leu Leu Ile Cys Asn Val Ile Arg Tyr Asn					
	740		745		750
Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg					
	755		760		765
Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu					
	770		775		780
Ser Ala Pro Gly Asp Arg Thr Ala Ala Lys Ile Glu Lys Leu Leu Ala					
785		790		795	800
Trp Leu Glu Thr Leu Lys Ala Glu Leu Gly Ile Pro Lys Ser Ile Arg					
	805		810		815
Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala Asn Val Asp Lys Leu					
	820		825		830
Ser Glu Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Tyr					
	835		840		845
Pro Leu Ile Ser Glu Leu Lys Gln Ile Leu Leu Asp Thr Tyr Tyr Gly					
	850		855		860
Arg Asp Tyr Val Glu Gly Glu Thr Ala Ala Lys Lys Glu Ala Ala Pro					
865		870		875	880

Ala Lys Ala Glu Lys Lys Ala Lys Lys Ser Ala  
 885 890

<210>3

<211>70

<212>DNA

<213>人工的

<220>

<223>引物P1

<400>3

gatgaaagcg ttatccaaac tgaaagegga agaggecgac gcactttgcg ccgaataaat 60  
 acctgtgacg 70

<210>4

<211>69

<212>DNA

<213>人工的

<220>

<223>引物P2

<400>4

ttaatccag ctcagaataa ctttcccgga ctttacgcc cgccctgcca ctcacgcag 60  
 tactgttgt 69

<210>5

<211>18

<212>DNA

<213>人工的

<220>

<223>引物P3

<400>5

cggtcacgct tggatgatg 18

<210>6

<211>21	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P4	
<400>6	
ttaatcccag ctcagaataa c	21
<210>7	
<211>183	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>杂合启动子	
<400>7	
ctagatctct cacctaccaa acaatgcccc cctgcaaaaa ataaattcat aaaaaacata	60
cagataacca tctgcggtga taaattatct ctggcggtgt tgacaattaa tcatcggctc	120
gtataatgtg tggaattgtg agcggtttaa cattatcagg agagcattat ggctgttact	180
aat	183
<210>8	
<211>69	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P5	
<400>8	
cgttattgtt atctagttgt gcaaaacatg ctaatgtage attacgcccc gccctgccac	60
tcatcgcag	69
<210>9	
<211>58	
<212>DNA	

<213>人工的	
<220>	
<223>引物P6	
<400>9	
attagtaaca gccataatgc tctcctgata atgttaaacc gtcacaatt ccacacat	58
<210>10	
<211>24	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P7	
<400>10	
acttgttcctt gagtgaaact ggca	24
<210>11	
<211>22	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P8	
<400>11	
aagacgcgct gacaatacgc ct	22
<210>12	
<211>69	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P9	
<400>12	
cgttattggt atctagttgt gcaaaacatg ctaatgtage atcagaaaaa ctcatcgagc	60



atcaaatga	69
<210>13	
<211>65	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P10	
<400>13	
agccggagca gcttctttct tcgctgcagt ttcaccttct acgttgtgtc tcaaaatctc	60
tgatg	65
<210>14	
<211>24	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P11	
<400>14	
aagacgcgct gacaatacgc cttt	24
<210>15	
<211>24	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P12	
<400>15	
aaggggccgt ttatgttgcc agac	24
<210>16	
<211>69	
<212>DNA	

<213>人工的	
<220>	
<223>引物P13	
<400>16	
catgtgggtt atgtacgaac atccggaaac tcaacttcgaa aagtcggcgc tgcgctttat	60
ggatatccg	69
<210>17	
<211>69	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P14	
<400>17	
atggacgccg cgaagatcat gtgggttatg tacgaacatc ccgttgtgtc tcaaaatctc	60
tgatgttac	69
<210>18	
<211>67	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P15	
<400>18	
cattttcggg aacttgtaga tacgtttacg gatatccatt cagaaaaact catcgagcat	60
caaatga	67
<210>19	
<211>23	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P16	

<400>19	
cttcgaagta gaagcggacc cga	23
<210>20	
<211>27	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P17	
<400>20	
ccagaagtgg tggtagacagc gatcatt	27
<210>21	
<211>75	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P18	
<400>21	
atggacgccg cgaagatcat gtgggttatg tacgaacatc cggaaactca cttcgaaaag	60
ctggcgctgc gcttt	75
<210>22	
<211>73	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P19	
<400>22	
cattttcggg aactttaga tacgtttacg gatatccata aagcgcagcg ccagcttttc	60
gaagtgagtt tcc	73
<210>23	

<211>31	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P20	
<400>23	
atcgaattca agacgcgctg acaatacgc t	31
<210>24	
<211>27	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P21	
<400>24	
cacgctctac gagtgcgta agttcag	27
<210>25	
<211>69	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P22	
<400>25	
aagcaaaagc cggataatgt tagccataaa taaggttgaa atcagaaaaa ctcatcgagc	60
atcaaatga	69
<210>26	
<211>30	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	

<223>引物P23

<400>26

ttcgaattcg ttgtgtctca aaatctccga

30

<210>27

<211>21

<212>DNA

<213>人工的

<220>

<223>引物P24

<400>27

cgtcttcaga cagaacacca c

21

<210>28

<211>23

<212>DNA

<213>人工的

<220>

<223>引物P25

<400>28

atgcttgatg gtcggaagag gca

23

<210>29

<211>2688

<212>DNA

<213>Pantoea ananatis(菠萝泛菌)

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(2688)

<400>29

atg gcc gtt act aat gtc get gaa ctc aat gca ctg gtt gaa cgt gta  
Met Ala Val Thr Asn Val Ala Glu Leu Asn Ala Leu Val Glu Arg Val

48

1	5	10	15	
aaa aaa gcc cag caa gaa ttc gcc aat ttt tct caa caa cag gtc gat				96
Lys Lys Ala Gln Gln Glu Phe Ala Asn Phe Ser Gln Gln Gln Val Asp				
	20	25	30	
gcc atc ttc cgc gca gcc gca ctg gcc gcc gcg gat gcc cga att cca				144
Ala Ile Phe Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Arg Ile Pro				
	35	40	45	
ctc gct aaa atg gcg gtg gcg gaa tcg ggc atg ggc att gtt gaa gac				192
Leu Ala Lys Met Ala Val Ala Glu Ser Gly Met Gly Ile Val Glu Asp				
	50	55	60	
aaa gtc att aaa aat cac ttc gct tct gaa tac atc tac aac gcc tat				240
Lys Val Ile Lys Asn His Phe Ala Ser Glu Tyr Ile Tyr Asn Ala Tyr				
65	70	75	80	
aag gat gag aaa acc tgc ggc gta ctg gac acc gat gat acg ttt ggc				288
Lys Asp Glu Lys Thr Cys Gly Val Leu Asp Thr Asp Asp Thr Phe Gly				
	85	90	95	
acc atc acc atc gct gaa ccc atc ggc ctg att tgc ggt att gtc ccc				336
Thr Ile Thr Ile Ala Glu Pro Ile Gly Leu Ile Cys Gly Ile Val Pro				
	100	105	110	
acc act aac cct acc tcg acc gca att ttt aag gca ctt atc agc ctt				384
Thr Thr Asn Pro Thr Ser Thr Ala Ile Phe Lys Ala Leu Ile Ser Leu				
	115	120	125	
aaa acc cgc aac ggg att atc ttc tcc ccc cat cct cga gcc aaa gat				432
Lys Thr Arg Asn Gly Ile Ile Phe Ser Pro His Pro Arg Ala Lys Asp				
	130	135	140	
gcg acg aac aaa gcg gcg gat att gtc ctg cag gca gcg att gcc gct				480
Ala Thr Asn Lys Ala Ala Asp Ile Val Leu Gln Ala Ala Ile Ala Ala				
145	150	155	160	
ggc gcg ccc aaa gac att ata ggc tgg att gat gca cct tct gtg gaa				528
Gly Ala Pro Lys Asp Ile Ile Gly Trp Ile Asp Ala Pro Ser Val Glu				
	165	170	175	
ctg tcc aat cag ttg atg cac cat cct gat att aac ctg att ctg gcg				576
Leu Ser Asn Gln Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala				
	180	185	190	
acg ggt ggc ccc ggc atg gtc aaa gcc gcc tac agc tca ggt aag ccg				624
Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro				
	195	200	205	
gcg att ggc gtg ggg gcc ggt aac acg ccc gtt gtc atc gat gaa aca				672
Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Ile Asp Glu Thr				

210	215	220	
gct gat gtt aaa cgc gcc gtt gcc tcc atc ctg atg tca aaa acg ttt			720
Ala Asp Val Lys Arg Ala Val Ala Ser Ile Leu Met Ser Lys Thr Phe			
225	230	235	240
gat aac ggt gtg atc tgt gcc tct gaa cag tcg gtt atc gtg gtg gat			768
Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Val Ile Val Val Asp			
	245	250	255
gcc gtc tac gac gcc gtg cgc gag cgc ttc gcc agc cat ggt gcc tat			816
Ala Val Tyr Asp Ala Val Arg Glu Arg Phe Ala Ser His Gly Gly Tyr			
	260	265	270
ttg ctt cag gga cag gag ctg agt gcg gta caa aat atc att cta aaa			864
Leu Leu Gln Gly Gln Glu Leu Ser Ala Val Gln Asn Ile Ile Leu Lys			
	275	280	285
aac ggt ggg ctt aac gcc gcc att gtg ggc cag cct gcg gtg aag att			912
Asn Gly Gly Leu Asn Ala Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Val Lys Ile			
	290	295	300
gcg gag atg gcc ggc atc agc gta cct ggt gaa acc aaa atc ctg att			960
Ala Glu Met Ala Gly Ile Ser Val Pro Gly Glu Thr Lys Ile Leu Ile			
305	310	315	320
ggc gaa gtt gaa cgg gtc gat gaa tca gaa cct ttc gct cat gaa aaa			1008
Gly Glu Val Glu Arg Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys			
	325	330	335
ctg tcg ccg aca ctg gcg atg tac cgt gct aaa gat tat cag gat gcc			1056
Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Tyr Gln Asp Ala			
	340	345	350
gtc agc aaa gcg gag aaa ctg gtg gcg atg ggc ggt att ggt cat acg			1104
Val Ser Lys Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Gly Ile Gly His Thr			
	355	360	365
tca tgc ctg tat acc gac cag gac aat cag aca gcg cgc gtg cac tat			1152
Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Thr Ala Arg Val His Tyr			
	370	375	380
ttt ggc gac aag atg aaa aca gcc cgc att ctg atc aac acg cca gct			1200
Phe Gly Asp Lys Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala			
385	390	395	400
tct cag ggc ggt att ggt gat tta tat aac ttc aaa ctc gcc cct tct			1248
Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser			
	405	410	415
ctg aca ctg ggt tgt ggt tcc tgg ggc ggt aac tcc att tct gaa aac			1296
Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn			

420	425	430	
gtg ggg ccc aaa cat ctc atc aac aag aaa acc gtc gct aag cga gct			1344
Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala			
435	440	445	
gaa aat atg ttg tgg cat aaa ctt ccg aag tcc att tac ttt cgt cgc			1392
Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg			
450	455	460	
ggc tct tta ccc att gcg ctt gaa gag atc gcc act gac ggt gcc aaa			1440
Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Glu Glu Ile Ala Thr Asp Gly Ala Lys			
465	470	475	480
cgc gcg ttt gtg gtg act gac cgc ttc ctg ttt aac aac ggt tat gcc			1488
Arg Ala Phe Val Val Thr Asp Arg Phe Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Ala			
485	490	495	
gat cag gtc acc cgc gtt tta aaa tet cac ggc atc gaa acc gaa gtt			1536
Asp Gln Val Thr Arg Val Leu Lys Ser His Gly Ile Glu Thr Glu Val			
500	505	510	
ttc ttt gag gtt gaa gcg gat ccc acc tta agc atc gtg cgt aaa ggt			1584
Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly			
515	520	525	
gca gaa cag atg aac agc ttt aag cca gac gtg atc atc gcc ctg ggc			1632
Ala Glu Gln Met Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly			
530	535	540	
ggc ggt tcg ccg atg gat gca gcc aaa atc atg tgg gtc atg tat gag			1680
Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu			
545	550	555	560
cat cca gaa acc cat ttt gaa gag ctg gca ctg ccg ttt atg gat att			1728
His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile			
565	570	575	
cgc aaa cgt atc tat aag ttc cct aaa atg ggc gtg aaa gcg cgc atg			1776
Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Arg Met			
580	585	590	
gtg gcc att acg aca acc tca ggc aca ggt tca gaa gtg acg cct ttt			1824
Val Ala Ile Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe			
595	600	605	
gcc gtg gta acg gat gac gcg acc gga cag aaa tac ccg ctg gcc gat			1872
Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp			
610	615	620	
tat gcg ctg acg ccg gat atg gct atc gtt gat gcc aac ctg gtc atg			1920
Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met			



625	630	635	640	
gat atg cca cgt tca ctt tgt gcc ttc ggc ggt ctg gat gcg gtg acg				1968
Asp Met Pro Arg Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr				
	645	650	655	
cac gcg ctg gaa gcc tat gtg tcc gtt ctg gcc aat gaa tac tcc gat				2016
His Ala Leu Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Asn Glu Tyr Ser Asp				
	660	665	670	
ggt cag gcc ctg cag gcg ctt aag ctg ctt aaa gag aac tta ccg gcg				2064
Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Asn Leu Pro Ala				
	675	680	685	
agt tat gca gaa ggt gca aaa aat ccg gtt gcc cgt gaa cgt gta cat				2112
Ser Tyr Ala Glu Gly Ala Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His				
	690	695	700	
aat gcc gcc acc atc gcc ggt atc gcc ttt gct aac gcc ttc ctc ggg				2160
Asn Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly				
705	710	715	720	
gtt tgt cac tca atg gcg cat aag ctt ggc tct gag ttc cat att cct				2208
Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Glu Phe His Ile Pro				
	725	730	735	
cat gga ctg gct aac tcg ctg ctg att tcc aac gtt att cgc tat aac				2256
His Gly Leu Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Asn Val Ile Arg Tyr Asn				
	740	745	750	
gcc aat gac aac cct act aag caa acc gca ttc agc cag tac gat cgt				2304
Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg				
	755	760	765	
ccc cag gcg cgt cgt cgt tat gct gaa att gcg gat cat ctt ggt ctc				2352
Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu				
	770	775	780	
acc gcg acg ggc gac cgc act gcc cag aaa att gag aag ctg ctg gta				2400
Thr Ala Thr Gly Asp Arg Thr Ala Gln Lys Ile Glu Lys Leu Leu Val				
785	790	795	800	
tgg ctg gat gag atc aaa acg gaa ctg ggt att ccg gca tcg att cgt				2448
Trp Leu Asp Glu Ile Lys Thr Glu Leu Gly Ile Pro Ala Ser Ile Arg				
	805	810	815	
gaa gcc ggt gtg cag gag gca gac ttc ctg gcg aaa gtc gat aaa ctg				2496
Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala Lys Val Asp Lys Leu				
	820	825	830	
gcg gat gat gcc ttt gat gac cag tgt act ggc gcg aat cca cgt tat				2544
Ala Asp Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Tyr				

835	840	845	
ccg ctg att gcc gaa ctc aaa cag ctg atg ctg gac agc tac tac gga			2592
Pro Leu Ile Ala Glu Leu Lys Gln Leu Met Leu Asp Ser Tyr Tyr Gly			
850	855	860	
cgc aaa ttt gtc gag ccg ttc gcc agt gcc gcc gag gct gcc cag gct			2640
Arg Lys Phe Val Glu Pro Phe Ala Ser Ala Ala Glu Ala Ala Gln Ala			
865	870	875	880
cag cct gtc agt gac agc aaa gcg gcg aag aaa gct aaa aaa gcc tag			2688
Gln Pro Val Ser Asp Ser Lys Ala Ala Lys Lys Ala Lys Lys Ala			
	885	890	895

&lt;210&gt;30

&lt;211&gt;895

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Pantoea ananatis(菠萝泛菌)

&lt;400&gt;30

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

Leu Ser Asn Gln Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala  
 180 185 190  
 Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro  
 195 200 205  
 Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Ile Asp Glu Thr  
 210 215 220  
 Ala Asp Val Lys Arg Ala Val Ala Ser Ile Leu Met Ser Lys Thr Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Val Ile Val Val Asp  
 245 250 255  
 Ala Val Tyr Asp Ala Val Arg Glu Arg Phe Ala Ser His Gly Gly Tyr  
 260 265 270  
 Leu Leu Gln Gly Gln Glu Leu Ser Ala Val Gln Asn Ile Ile Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Gly Gly Leu Asn Ala Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Val Lys Ile  
 290 295 300  
 Ala Glu Met Ala Gly Ile Ser Val Pro Gly Glu Thr Lys Ile Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Val Glu Arg Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Tyr Gln Asp Ala  
 340 345 350  
 Val Ser Lys Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Gly Ile Gly His Thr  
 355 360 365  
 Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Thr Ala Arg Val His Tyr  
 370 375 380  
 Phe Gly Asp Lys Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser  
 405 410 415  
 Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn  
 420 425 430  
 Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala  
 435 440 445  
 Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg  
 450 455 460  
 Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Glu Glu Ile Ala Thr Asp Gly Ala Lys  
 465 470 475 480  
 Arg Ala Phe Val Val Thr Asp Arg Phe Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Ala

	485	490	495
Asp Gln Val Thr Arg Val Leu Lys Ser His Gly Ile Glu Thr Glu Val			
	500	505	510
Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly			
	515	520	525
Ala Glu Gln Met Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly			
	530	535	540
Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu			
545	550	555	560
His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile			
	565	570	575
Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Arg Met			
	580	585	590
Val Ala Ile Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe			
	595	600	605
Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp			
	610	615	620
Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met			
625	630	635	640
Asp Met Pro Arg Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr			
	645	650	655
His Ala Leu Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Asn Glu Tyr Ser Asp			
	660	665	670
Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Asn Leu Pro Ala			
	675	680	685
Ser Tyr Ala Glu Gly Ala Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His			
	690	695	700
Asn Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly			
705	710	715	720
Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Glu Phe His Ile Pro			
	725	730	735
His Gly Leu Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Asn Val Ile Arg Tyr Asn			
	740	745	750
Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg			
	755	760	765
Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu			
	770	775	780
Thr Ala Thr Gly Asp Arg Thr Ala Gln Lys Ile Glu Lys Leu Leu Val			
785	790v95	800	



<213>人工的	
<220>	
<223>引物P28	
<400>33	
aatcccgctc tttcataaca ttat	24
<210>34	
<211>23	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P29	
<400>34	
attaatcgca ggggaaagca ggg	23
<210>35	
<211>42	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P30	
<400>35	
atcatgcaaa gaggtgtgcc gtggtaaagg aacgtaaac cg	42
<210>36	
<211>42	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P31	
<400>36	

atcatgcaaa gaggtgtgcc gtggtaaagg aacgtaaac cg	42
<210>37	
<211>30	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P32	
<400>37	
gttggatcct gacatgcctc tcccagcaa	30
<210>38	
<211>24	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P33	
<400>38	
ccacggcaca cctctttgca tgat	24
<210>39	
<211>61	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P34	
<400>39	
ttcacctttc ctctgttta ttettattac cctgaagcc tgctttttta tactaagttg	60
g	61
<210>40	
<211>64	
<212>DNA	

<213>人工的	
<220>	
<223>引物P35	
<400>40	
acatgttggg ctgtaaattg cgcattgaga tcattccgct caagttagta taaaaaagct	60
gaac	64
<210>41	
<211>21	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P36	
<400>41	
ttgctgtaag ttgtgggatt c	21
<210>42	
<211>20	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P37	
<400>42	
tccaggttcc cactgatttc	20
<210>43	
<211>64	
<212>DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223>引物P38	



<400>43		
gtttctcaag attcaggacg gggaactaac tatgaatgaa gcttgctttt ttatactaag		60
ttgg		64
<210>44		
<211>64		
<212>DNA		
<213>人工的		
<220>		
<223>引物P39		
<400>44		
tcagctttct tcgtggcat ttttatatte cttttgcgct caagttagta taaaaagct		60
gaac		64
<210>45		
<211>20		
<212>DNA		
<213>人工的		
<220>		
<223>引物P40		
<400>45		
tggtcgtgat tagcgtggtg		20
<210>46		
<211>20		
<212>DNA		
<213>人工的		
<220>		
<223>引物P41		
<400>46		
cacatgcacc ttcgcttctt		20
<210>47		

<211>64		
<212>DNA		
<213>人工的		
<220>		
<223>引物P42		
<400>47		
ccgcaggcga ctgacgaaac ctcgctccgg cggggtcgct caagttagta taaaaaagct	60	
gaac	64	
<210>48		
<211>64		
<212>DNA		
<213>人工的		
<220>		
<223>引物P43		
<400>48		
tgcccgaact tgccatgctc cagtctcctt cttctgagct gtttccttct agacggccaa	60	
tgct	64	
<210>49		
<211>1968		
<212>DNA		
<213>人工的		
<220>		
<223>含有cat基因和PL启动子的DNA片段		
<400>49		
ccgcaggcga ctgacgaaac ctcgctccgg cggggtcgct caagttagta taaaaaagct	60	
gaacgagaaa cgtaaaatga tataaatatc aatatattaa attagatttt gcataaaaaa	120	
cagactacat aatactgtaa aacacaacat atgcagtcac tatgaatcaa ctacttagat	180	
ggatttagtg acctgtaaca gactgcagtg gtcgaaaaaa aaagcccgcga ctgtcaggtg	240	
cgggcttttt tctgtgttaa gettcgacga atttctgcca ttcatecget tattatact	300	
tattcaggcg tagcaccagg cgtttaaggg caccaataac tgccttaaaa aaattacgcc	360	
ccgccctgcc actcatcgca gtactgttgt aattcattaa gcattctgcc gacatggaag	420	

ccatcacaga	cggcatgatg	aacctgaatc	gccagecggca	tcagcacett	gtcgcettgc	480
gtataatatt	tgcccatggt	gaaaacgggg	gcgaagaagt	tgtccatatt	ggccacgttt	540
aatcaaaac	tggtgaaact	caccagggga	ttggctgaga	cgaaaaacat	attctcaata	600
aaccctttag	ggaaataggc	caggttttca	ccgtaacacg	ccacatcttg	cgaatatatg	660
tgtagaaact	gccggaaatc	gtcgtggtat	tcactccaga	gcgatgaaaa	cgtttcagtt	720
tgctcatgga	aaacggtgta	acaagggtga	acactatccc	atatcaccag	ctcaccgtct	780
ttcattgcca	tacggaattc	cggatgagca	ttcatcaggc	gggcaagaat	gtgaataaag	840
gccggataaa	acttgtgctt	atTTTTcttt	acggctctta	aaaaggccgt	aatatccagc	900
tgaacggctc	ggttataggt	acattgagca	actgactgaa	atgcctcaaa	atgttcttta	960
cgatgccatt	gggatatac	aacggtggtg	tatccagtga	TTTTTTctc	catttttagct	1020
tccttagctc	ctgaaaaatc	cggatccgat	atctagctag	agcgcgccgt	tgacgctgct	1080
agtgttacct	agcgatttgt	atcttactgc	atgttacttc	atgttgtaa	tacctgtttt	1140
tcgtgcgact	tatcaggetg	tctaettatc	cggagateca	caggacgggt	gtggctgcca	1200
tgatcgcgta	gtcgatagtg	gctccaagta	gcgaagcgag	caggactggg	cggcggccaa	1260
agcggtcgga	cagtgtctcg	agaacgggtg	cgcatagaaa	ttgcatcaac	gcataatagc	1320
ctagcagcac	gccatagtga	ctggcgatgc	tgtcggaatg	gacgatatcc	cgcaagaggc	1380
ccggcagtac	cggcataacc	aagcctatgc	ctacagcatc	cagggtgacg	gtgccgagga	1440
tgacgatgag	cgcattgta	gatttcatac	acggtgectg	actgcgttag	caatttaact	1500
gtgataaact	accgcattaa	agcttatcga	tgataagctg	tcaaactatga	gaattcgaaa	1560
tcaaataatg	atTTTatTTT	gactgatagt	gacctgttcg	ttgcaacaaa	ttgataagca	1620
atgctTTTTT	ataatgccaa	cttagtataa	aaaagcaggc	ttcaagatct	tcacctacca	1680
aacaatgccc	ccctgcaaaa	aataaattca	tataaaaaac	atacagataa	ccatctgcgg	1740
tgataaatta	tctctggcgg	tgttgacata	aataccactg	gcggtgatac	tgagcacatc	1800
agcaggacgc	actgaccacc	atgaagggtg	cgctcttaaa	aattaagccc	tgaagaaggg	1860
cagcattcaa	agcagaaggc	tttgggggtg	tgatacga	acgaagcatt	ggccgtctag	1920
aaggaaacag	ctcagaagaa	ggagactgga	gcatggcaag	ttcgggca		1968

<210>50

<211>4971

<212>DNA

<213>DNA片段

<400>50

aatctgatcc	ttcactgccc	gtgcacgget	ctcattttcg	acaaacggca	gcgtgatgct	60
gctgatagtg	acgggaaatt	gtgacattac	tgcgtgtcct	aatacctccg	cagttattgc	120
cgtaccatca	gaaaataaaa	aaacgtggcg	atcaacagea	ttatccattt	tgttcttccc	180
gtgatgcaga	cataattcta	tgaaagcata	aattaaaaac	gcacagaagc	gtagaacgtt	240
atgtctgggt	tataaaatga	accttcaatt	ttatTTTTta	tgaaaacagc	atttcatttt	300
tatggtttcg	tttataccga	tggtttatgt	ggaaattgtc	gaagagagca	gatttgcgca	360

acgctgggat	cagtcttaaa	aagtaaaaaa	atatatttgc	ttgaacgatt	caccgttttt	420
ttcatccggt	taaatatgca	aagataaatg	cgcagaaatg	tgtttctcaa	accgttcatt	480
tatcacaaaa	ggattgttcg	atgtccaaca	atggctcgta	accgctggtg	ctttggtcgc	540
tcaagttagt	ataaaaaagc	tgaacgagaa	acgtaaaatg	atataaatat	caatatatta	600
aattagattt	tgcataaaaa	acagactaca	taatactgta	aacacaaca	tatgcagtca	660
ctatgaatca	actacttaga	tggtattagt	gacctgtaac	agactgcagt	ggtcgaaaaa	720
aaaagcccg	actgtcaggt	gcgggctttt	ttctgtgta	agcttcgacg	aatttctgcc	780
attcatccgc	ttattatcac	ttattcaggc	gtagcaccag	gcgtttaagg	gcaccaataa	840
ctgccttaaa	aaaattacgc	cccgcctgc	cactcatcgc	agtactgttg	taattcatta	900
agcattctgc	cgacatggaa	gccatcacag	acggcatgat	gaacctgaat	cgccagcggc	960
atcagcacct	tgctgccttg	cgtataatat	ttgcccattg	tgaaaacggg	ggcgaagaag	1020
ttgtccatat	tgccacggt	taaatcaaaa	ctggtgaaac	tcaccagg	attggctgag	1080
acgaaaaaca	tattctcaat	aaacccttta	gggaaatagg	ccaggttttc	accgtaacac	1140
gccacatctt	gcgaatata	gtgtagaaac	tgccggaaat	cgctcgtgta	ttactccag	1200
agcgatgaaa	acgtttcagt	ttgctcatgg	aaaacggtgt	aacaagggtg	aacactatcc	1260
catatcacca	gctcaccgtc	tttcattgcc	atacgaatt	ccgatgagc	attcatcagg	1320
cgggcaagaa	tgtgaataaa	ggccggataa	aacttgtgct	tatttttctt	tacggtcttt	1380
aaaaaggccg	taatatccag	ctgaacggtc	tggttatagg	tacattgagc	aactgactga	1440
aatgcctcaa	aatgttcttt	acgatgccat	tgggatata	caacggtggt	atatccagtg	1500
atTTTTTct	ccattttagc	ttccttagct	cctgaaaatc	tcgatccga	tatctagcta	1560
gagcgcccg	ttgacgctgc	tagtgttacc	tagcgatttg	tatcttactg	catgttactt	1620
catgttgtea	atacctgttt	ttcgtgcgac	ttatcagget	gtctacttat	ccggagatcc	1680
acaggacggg	tgtggtcgcc	atgatcgctg	agtcgatagt	ggctccaagt	agcgaagcga	1740
gcaggactgg	gcggcggcca	aagcggtcgg	acagtgtctc	gagaacgggt	gcgcatagaa	1800
attgcatcaa	cgcatatagc	gctagcagca	cgccatagtg	actggcgatg	ctgtcggaat	1860
ggacgatata	ccgcaagagg	cccggcagta	ccggcataac	caagcctatg	cctacagcat	1920
ccagggtgac	ggtgccgagg	atgacgatga	gcgcattggt	agatttcata	cacggtgcct	1980
gactgcgtta	gcaatttaac	tgtgataaac	taccgcatta	aagcttatcg	atgataagct	2040
gtcaaacatg	agaattcgaa	atcaaaataat	gattttattt	tgactgatag	tgacctgttc	2100
gttgcaacaa	attgataaagc	aatgcttttt	tataatgcca	acttagtata	aaaaagcagg	2160
cttcaagatc	ttcacctacc	aaacaatgcc	ccctgcaaa	aaataaatc	atataaaaaa	2220
catacagata	accatctgcg	gtgataaatt	atctctggcg	gtgttgacat	aaataccact	2280
ggcggtgata	ctgagcacat	cagcaggacg	cactgaccac	catgaagggtg	acgctcttaa	2340
aaattaagcc	ctgaagaagg	gcagcattca	aagcagaagg	ctttgggggtg	tgtgatacga	2400
aacgaagcat	tggccgtcta	gaaggaaaca	gctcagaaga	aggagactgg	agcatggcaa	2460
gttcgggcac	aacatcgacg	cgtaagcget	ttaccggegc	agaatttate	gttcatttcc	2520
tggaacagca	gggcattaag	attgtgacag	gcattccggg	cggttctatc	ctgcctgttt	2580
acgatgcctt	aagccaaaagc	acgcaaatcc	gccatattct	ggcccgtcat	gaacaggggcg	2640
cgggctttat	cgctcaggga	atggcgcgca	ccgacggtaa	accggcggtc	tgtatggcct	2700

gtagcggacc	gggtgcgact	aacctggtga	ccgccattgc	cgatgcgcgg	ctggactcca	2760
tcccgtgat	ttgcatcact	ggtcaggttc	ccgcctcgat	gatcggcacc	gacgccttcc	2820
aggaagtgga	cacctacggc	atctctatcc	ccatcaccaa	acacaactat	ctggtcagac	2880
atatcgaaga	actcccgcag	gtcatgagcg	atgccttccg	cattgcgcaa	tcaggccgcc	2940
caggccccgt	gtggatagac	attcctaagg	atgtgcaaac	ggcagttttt	gagattgaaa	3000
cacagcccgc	tatggcagaa	aaagccgccc	ccccgcctt	tagcgaagaa	agcattcgtg	3060
acgcagcggc	gatgattaac	gctgccaaac	gcccgggtgt	ttatctgggc	ggcgggtgta	3120
tcaatgcgcc	cgcacgggtg	cgtgaactgg	cggagaaagc	gcaactgcct	accacatga	3180
ctttaatggc	gctgggcatg	ttgccaaaag	cgcacccgtt	gtcgtctggg	atgctgggga	3240
tgcacggcgt	gcgcagcacc	aactatattt	tgcaggaggc	ggatttgttg	atagtgtctg	3300
gtgcgcgttt	tgatgaccgg	gcgattggca	aaaccgagca	gttctgtccg	aatgcaaaa	3360
tcattcatgt	cgatategac	cgtgcagagc	tgggtaaaat	caagcagccg	cacgtggcga	3420
ttcaggcgga	tgttgatgac	gtgctggcgc	agttgatecc	gctgggtgga	gcgcaaccgc	3480
gtgcagagtg	gcaccagttg	gtagcggatt	tgcagcgtga	gtttccgtgt	ccaatcccga	3540
aagcgtgcga	tccgttaagc	cattacggcc	tgatcaacgc	cgttgccgcc	tgtgtcgatg	3600
acaatgcaat	tatcaccacc	gacgttggtc	agcatcagat	gtggaccgcg	caagcttate	3660
cgtcaatcg	cccacgccag	tggetgacct	ccggtgggct	gggcacgatg	ggttttgccc	3720
tgctgcggc	gattggcgct	gcgctggcga	accgggatcg	caaagtgttg	tgtttctccg	3780
gcgacggcag	cctgatgatg	aatattcagg	agatggcgac	cgccagtgaa	aatcagctgg	3840
atgtcaaaaat	cattctgatg	aacaacgaag	cgctggggct	ggtgcatcag	caacagagtc	3900
tgttctacga	gcaaggcgtt	tttgccgcca	cctatccggg	caaaatcaac	tttatgcaga	3960
ttgccgccgg	attcggcctc	gaaacctgtg	atttgaataa	cgaagccgat	ccgcaggctt	4020
cattgcagga	aatcatcaat	cgccctggcc	cggcgctgat	ccatgtgcgc	attgatgccg	4080
aagaaaaagt	ttaccgatg	gtgccgccag	gtgcggcgaa	tactgaaatg	gtgggggaat	4140
aagccatgca	aaacacaact	catgacaacg	taattctgga	gctcaccgtt	cgcaaccatc	4200
cgggcgtaat	gaccacggtt	tgtggccttt	ttgcccgccg	cgcttttaac	gttgaaggca	4260
ttctttgtct	gccgattcag	gacagcgaca	aaagccatat	ctggctactg	gtcaatgacg	4320
accagcgtct	ggagcagatg	ataagccaaa	tcgataagct	ggaagatgtc	gtgaaagtgc	4380
agcgtaatca	gtccgatccg	acgatgttta	acaagatcgc	ggtgtttttt	cagtaacaaa	4440
cctggttaag	cctggctgaa	ctgaagaaat	aaaataaatc	cccggcggcg	tttagtcgcc	4500
ggggttatgt	gatccccgaa	gatgaaactt	attcaatctc	ttcacagaca	tcttgcgtta	4560
aaccccgcat	aatatctttt	cttaacaaaa	acttttgtat	tttacctgag	gtagttcgcg	4620
gtagtttttc	gattaccacg	atatgttcag	gatatttata	ttttgcgacc	cgtttacggc	4680
taaaaaaagc	cactacctct	tccagcgata	atgaatgatg	cggcgctttc	agcacgacat	4740
aagcgcgatg	tcgttcacct	aaacgttcat	cggacattgc	aaccacacag	gcategtgaa	4800
ttttaggatg	ctgcaataaa	atatettcca	ctteacggct	gctaataattt	tcgccgccgc	4860
ggacaataat	atcttttttg	cgtccggtaa	ttttatata	gccagcctca	tccatacggc	4920
agagatcgcc	gctgtaatac	cagcettett	catccagggc	acgggcggtt	a	4971

&lt;210&gt;51

&lt;211&gt;3786

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;DNA片段

&lt;400&gt;51

aaatgtgctt atttaataat taatttatat atttaatgca ttaattctta acattaattg	60
atcaataata ttcaccaaat caatatcaaa aaaaatcgca aaacatataa ttcaatacaa	120
atcatcagga taggttttgc aacgcgtgca ttttgteccc ttttctctcg ttgattagat	180
gcaaaaaatt atgctgaaat atgtcaaccg atgaaaagcg tcggtagtta agcagaaatt	240
aatatcgctt actttaacca ccgcagcaca attagctaata tttacggatg cagaactcac	300
gctggcgctc aagttagtat aaaaaagctg aacgagaaac gtaaaatgat ataaatatca	360
atatattaaa ttagattttg cataaaaaac gaactacata atactgtaaa acacaacata	420
tgcagtcaact atgaatcaac tacttagatg gtattagtga cctgtaacag actgcagtgg	480
tcgaaaaaaaa aagcccgcac tgtcaggtgc gggetttttt ctgtgttaag cttegacgaa	540
tttctgccat tcatccgctt attatacctt attcaggcgt agcaccaggc gtttaagggc	600
accaataact gccttaaaaa aattacgccc cgccctgcc a ctcatcgcag tactgttgta	660
attcattaag cattctgccg acatggaagc catcacagac ggcatgatga acctgaatcg	720
ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgcg tataatattt gcccatggtg aaaacggggg	780
cgaagaagtt gtccatattg gccacgttta aatcaaaaact ggtgaaactc acccagggat	840
tggtcgagac gaaaaacata ttctcaataa acccttagg gaaataggcc aggttttcac	900
cgtaacacgc cacatcttgc gaatataatg gtagaaactg ccggaaatcg tcgtggtatt	960
cactccagag cgatgaaaac gtttcagttt gctcatggaa aacgggtgta caagggtgaa	1020
cactatccca taccaccagc tcaccgtctt tcattgccat acggaattcc ggatgagcat	1080
tcatcaggcg ggcaagaatg tgaataaagg ccgataaaa cttgtgctta ttttcttta	1140
cggtctttta aaaggccgta atatccagct gaacggctctg gttataggta cattgagcaa	1200
ctgactgaaa tgcctcaaaa tgttctttac gatgccattg ggatatatca acggtggtat	1260
atccagtgat tttttctcc attttagctt ctttagctcc tgaaaatctc ggatccgata	1320
tctagctaga gcgcccgggt gacgtgcta gtgttaccta gcgatttgta tcttactgca	1380
tgttacttca tgttgcaat acctgtttt cgtgceactt atcaggetgt ctacttatcc	1440
ggagatccac aggacgggtg tggtcgccat gatcgctag tcgatagtgg ctccaagtag	1500
cgaagcgagc aggactgggc ggcggccaaa gcggtcggac agtgctccga gaacgggtgc	1560
gcatagaaat tgcataacg catatagcgc tagcagcagc ccatagtac tggcgatgct	1620
gtcggaatgg acgatatccc gcaagaggec cggcagtacc ggcataacca agcctatgcc	1680
tacagcatcc agggtgacgg tgccgaggat gacgatgagc gcattgttag atttcataca	1740
cggtgcctga ctgcgttagc aatttaactg tgataaacta ccgcattaaa gcttatcgat	1800
gataagctgt caaacatgag aattcgaaat caaataatga ttttattttg actgatagtg	1860
acctgttcgt tgcaacaaat tgataagcaa tgctttttta taatgccaac ttagtataaa	1920
aaagcaggct tcaagatctt cacctaccaa acaatgcccc cctgcaaaaa ataaattcat	1980

ataaaaaaca	tacagataac	catctgcggt	gataaattat	ctctggcggg	gttgacataa	2040
ataccactgg	cggtgatact	gagcacatca	gcaggacgca	ctgaccacca	tgaaggtgac	2100
gctcttaaaa	attaagccct	gaagaagggc	agcattcaaa	gcagaaggct	ttgggggtgtg	2160
tgatacgaaa	cgaagcattg	gccgtctaga	aggaacacgc	taaggacca	aaccatgagc	2220
cagcaagtca	ttattttcga	taccacattg	cgcgacgggtg	aacaggcggtt	acaggcaagc	2280
ttgagtgtga	aagaaaaact	gcaaattgcg	ctggcccttg	agcgtatggg	tgttgacgtg	2340
atggaagtcg	gtttccccgt	ctcttcgccg	ggcgattttg	aatcggtgca	aaccatcgcc	2400
cgccaggtta	aaaacagccg	cgtatgtgcg	ttagctcgct	gcgtggaaaa	agatatcgac	2460
gtggcggccg	aatccctgaa	agtcgccgaa	gccttcgcta	ttcatacctt	tattgccact	2520
tcgccaatgc	acatcgccac	caagctgcgc	agcacgctgg	acgaggtgat	cgaacgcgct	2580
atctatatgg	tgaaacgcgc	ccgtaattac	accgatgatg	ttgaattttc	ttgcgaagat	2640
gccgggcgta	caccatttgc	cgatctggcg	cgagtggctg	aagcggcgat	taatgccggt	2700
gccaccacca	tcaacattcc	ggacaccgtg	ggctacacca	tgccgtttga	gttcgccgga	2760
atcatcagcg	gcctgtatga	acgcgtgcct	aacatcgaca	aagccattat	ctccgtacat	2820
accacgacg	atgtgggctt	ggcggctcga	aactcaactg	cggcgggtaca	tgccgggtgca	2880
cgccagggtg	aaggcgcaat	gaacgggatc	ggcgagcgtg	ccggaaactg	ttccctggaa	2940
gaagtcatca	tggcgatcaa	agttcgtaag	gatattctca	acgtccacac	cgccattaat	3000
caccaggaga	tatggcgcac	cagccagtta	gtagccaga	tttgtaatat	gccgatcccg	3060
gcaaacaaag	ccattgttgg	cagcggcgca	ttcgcacact	cctccggtat	acaccaggat	3120
ggcgtgctga	aaaaccgcga	aaactacgaa	atcatgacac	cagaatctat	tggctctgaac	3180
caaatccagc	tgaatctgac	ctctcgttcg	ggcgtgcggg	cggtgaaaca	tcgcatggat	3240
gagatggggg	ataaagaaag	tgaatataat	ttagacaatt	tgtacgatgc	tttctgaag	3300
ctggcggaca	aaaaagggtca	ggtgtttgat	tacgatctgg	aggcgtggc	cttcatcggt	3360
aagcagcaag	aagagccgga	gcatttccgt	ctggattact	tcagcgtgca	gtctggctct	3420
aacgatatcg	ccaccgccgc	cgtaaaactg	gcctgtggcg	aagaagtcaa	agcagaagcc	3480
gccaacggta	acggtccggt	cgatgccgtc	tatcaggcaa	ttaaccgat	caactgaatat	3540
aacgtcgaac	tggtgaaata	cagcctgacc	gcaaaggcc	acggtaaaga	tgcgctgggt	3600
caggtggata	tcgtcgctaa	ctacaacggt	cgccgcttc	acggcgtctg	cctggctacc	3660
gatattgtcg	agtcactctg	caaagccatg	gtgcacgttc	tgaacaatat	ctggcgtgcc	3720
gcagaagtcg	aaaaagagtt	gcaacgcaaa	gctcaacaca	acgaaaaca	caaggaaacc	3780
gtgtga						3786

<210>52

<211>2942

<212>DNA

<213>DNA片段

<400>52

gtgcctctgg	cggatgtacg	tttgtcatga	gtctcacgct	caagttagta	taaaaagct	60
------------	------------	------------	------------	------------	-----------	----

gaacgagaaa	cgtaaaatga	tataaatatc	aatatattaa	attagatttt	gcataaaaaa	120
cagactacat	aatactgtaa	aacacaacat	atgcagtcac	tatgaatcaa	ctacttagat	180
ggtattagtg	acctgtaaca	gactgcagtg	gtcgaaaaaa	aaagcccgca	ctgtcaggtg	240
cgggcttttt	tctgtgttaa	gcttcgacga	atttctgcca	ttcatccgct	tattatcact	300
tattcaggcg	tagcaccagg	cgtttaaggg	caccaataac	tgccttaaaa	aaattacgcc	360
ccgccctgcc	actcatcgca	gtactgttgt	aattcattaa	gcattctgcc	gacatggaag	420
ccatcacaga	cggcgatgat	aacctgaatc	gccagcggca	tcagcacctt	gtcgccttgc	480
gtataatatt	tgcccatggt	gaaaacgggg	gcgaagaagt	tgtccatatt	ggccacgttt	540
aaatcaaaac	tggtgaaact	caccagggga	ttggctgaga	cgaaaaacat	attctcaata	600
aaccctttag	ggaaatagge	caggttttca	ccgtaacacg	ccacatcttg	cgaatatatg	660
tgtagaaact	gccggaaaac	gtcgtgggat	tactccaga	gcgatgaaaa	cgtttcagtt	720
tgctcatgga	aaacggtgta	acaaggggtga	acactatecc	atateaccag	ctcaccgtct	780
ttcattgcca	tacggaatc	cggatgagca	ttcatcagge	gggcaagaat	gtgaataaag	840
gccggataaa	acttgtgctt	atTTTTtett	acggtcttta	aaaaggccgt	aatatccagc	900
tgaacggtct	ggttataggt	acattgagca	actgactgaa	atgcctcaa	atgttcttta	960
cgatgccatt	gggatatac	aacggtggta	tatccagtga	TTTTTTtctc	catttttagct	1020
tccttagctc	ctgaaaatct	cggatccgat	atctagctag	agcgcgccgt	tgacgctgct	1080
agtgttacct	agcgatttgt	atcttactgc	atgttacttc	atgttgtaa	tacctgtttt	1140
tcgtgcgact	tatcaggctg	tctacttate	cggagatcca	caggacgggt	gtggctgcca	1200
tgatcgcgta	gtcgatagtg	gctccaagta	gcgaagcgag	caggactggg	cggcggccaa	1260
agcggtcgga	cagtgtctcg	agaacgggtg	cgcatagaaa	ttgatcaaac	gcataatagc	1320
ctagcagcac	gccatagtga	ctggcgatgc	tgtcggaatg	gacgatatcc	cgcaagaggc	1380
ccggcagtac	cggcataacc	aagcctatgc	ctacagcate	cagggtgacg	gtgccgagga	1440
tgacgatgag	cgcatgtta	gatttcatac	acggtgcctg	actgcgttag	caatttaact	1500
gtgataaact	accgcattaa	agcttatcga	tgataagctg	tcaaactatga	gaattcgaaa	1560
tcaaataatg	atTTTtattt	gactgatagt	gacctgttcg	ttgcaacaaa	ttgataagca	1620
atgctTTTTt	ataatgccaa	cttagtataa	aaaagcagge	ttcatagaca	ttgccttctt	1680
tccggtttat	tatgttttaa	ccacctgccc	gtaaacctgg	agaacctatc	ctctagaagg	1740
aaacagctat	gtttcaaaaa	gttgacgctt	acgtggcgca	cccgattctt	acgcttatgg	1800
agcgttttaa	agaagacctt	cgcagcgaca	aagtgaattt	aagtatcggg	ctgtactaca	1860
acgaagacgg	aattattcca	caactgcaag	ccgtggcgga	ggcgggaagc	cgctgaaatg	1920
cgcagcctca	tggcgcttcg	ctttatttac	cgatggaagg	gcttaactgc	tatgccatg	1980
ccattgcgcc	gctgctgttt	ggtgcggacc	atccggtact	gaaacaacag	cgcgtagcaa	2040
ccattcaaac	ccttggcggc	tccggggcat	tgaaagtggg	cgcggatttc	ctgaaacgct	2100
acttcccgga	atcaggcgtc	tgggtcagcg	atcctacctg	ggaaaaccac	gtagcaatat	2160
tcgccggggc	tggattcgaa	gtgagtaett	accctggta	tgacgaagcg	actaacggcg	2220
tgcgctttaa	tgacctgttg	gcgacgetga	aaacattacc	tgcccgcagt	attgtgttgc	2280
tgcattccatg	ttgccacaac	ccaacgggtg	ccgatctcac	taatgatcag	tgggatgcgg	2340
tgattgaaat	tctcaaagcc	cgcgagetta	ttcattcctt	cgatattgcc	tatcaaggat	2400



ttggtgccgg tatggaagag gatgcctacg ctattegegc cattgccage gctggattac 2460  
 ccgctctggg gagcaattcg ttctcgaana tttctecct ttacggcgag cgcgtcggcg 2520  
 gactttctgt tatgtgtgaa gatgccgaag ccgctggccg cgtactgggg caattgaaag 2580  
 caacagttcg ccgcaactac tccagcccgc cgaattttgg tgcgcaggtg gtggctgcag 2640  
 tgctgaatga cgaggcattg aaagccagct ggctggcgga agtagaagag atgcgtactc 2700  
 gcattctggc aatgcgtcag gaattggtga aggtattaag cacagagatg ccagaacgca 2760  
 atttcgatta tctgcttaat cagcgcggca tgttcagtta taccggttta agtgccgctc 2820  
 aggttgaccg actacgtgaa gaatttgggtg tctatctcat cgccagcggg cgcatgtgtg 2880  
 tcgccgggtt aaatacggca aatgtacaac gtgtggcaaa ggcgtttgct gcggtgatgt 2940  
 aa 2942

<210>53

<211>891

<212>PRT

<213>弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)

<400>53

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

Leu Ser Asn Ala Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala  
 180 185 190  
 Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro  
 195 200 205  
 Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Ile Asp Glu Thr  
 210 215 220  
 Ala Asp Ile Lys Arg Ala Val Ala Ser Val Leu Met Ser Lys Thr Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Val Val Val Val Asp  
 245 250 255  
 Ser Val Tyr Asp Ala Val Arg Glu Arg Phe Ala Thr His Gly Gly Tyr  
 260 265 270  
 Leu Leu Gln Gly Lys Glu Leu Lys Ala Val Gln Asp Val Ile Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Gly Ala Leu Asn Ala Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Tyr Lys Ile  
 290 295 300  
 Ala Glu Leu Ala Gly Phe Ser Val Pro Glu Asn Thr Lys Ile Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Val Thr Val Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Phe Glu Asp Ala  
 340 345 350  
 Val Glu Lys Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Gly Ile Gly His Thr  
 355 360 365  
 Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Pro Ala Arg Val Ser Tyr  
 370 375 380  
 Phe Gly Gln Lys Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser  
 405 410 415  
 Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn  
 420 425 430  
 Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala  
 435 440 445  
 Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg  
 450 455 460  
 Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Asp Glu Val Ile Thr Asp Gly His Lys  
 465 470 475 480  
 Arg Ala Leu Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Ala

	485	490	495
Asp Gln Ile Thr Ser Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Glu Thr Glu Val			
	500	505	510
Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly			
	515	520	525
Ala Glu Leu Ala Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly			
	530	535	540
Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu			
545	550	555	560
His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile			
	565	570	575
Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Lys Met			
	580	585	590
Ile Ala Val Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe			
	595	600	605
Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp			
	610	615	620
Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met			
625	630	635	640
Asp Met Pro Lys Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr			
	645	650	655
His Ala Met Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Ser Glu Phe Ser Asp			
	660	665	670
Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Ala			
	675	680	685
Ser Tyr His Glu Gly Ser Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His			
	690	695	700
Ser Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly			
705	710	715	720
Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Gln Phe His Ile Pro			
	725	730	735
His Gly Leu Ala Asn Ala Leu Leu Ile Cys Asn Val Ile Arg Tyr Asn			
	740	745	750
Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg			
	755	760	765
Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu			
	770	775	780
Ser Ala Pro Gly Asp Arg Thr Ala Ala Lys Ile Glu Lys Leu Leu Ala			
785	790	795	800

Trp Leu Glu Thr Leu Lys Ala Glu Leu Gly Ile Pro Lys Ser Ile Arg  
805 810 815  
Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala Asn Val Asp Lys Leu  
820 825 830  
Ser Glu Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Tyr  
835 840 845  
Pro Leu Ile Ser Glu Leu Lys Gln Ile Leu Leu Asp Thr Tyr Tyr Gly  
850 855 860  
Ar g Asp Tyr Val Glu Asp Glu Thr Ala Ala Lys Lys Glu Ala Ala Pro  
865 870 875 880  
Ala Lys Ala Glu Lys Lys Ala Lys Lys Ser Ala  
885 890

&lt;210&gt;54

&lt;211&gt;891

&lt;212&gt;PRT

<213>鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)

&lt;400&gt;54

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

Gly Ala Pro Ala Asp Ile Ile Gly Trp Ile Asp Ala Pro Thr Val Glu  
 165 170 175  
 Leu Ser Asn Gln Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala  
 180 185 190  
 Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro  
 195 200 205  
 Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Val Asp Glu Thr  
 210 215 220  
 Ala Asp Ile Lys Arg Val Val Ala Ser Ile Leu Met Ser Lys Thr Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Ile Ile Val Val Asp  
 245 250 255  
 Ser Val Tyr Asp Ala Val Arg Glu Arg Phe Ala Ser His Gly Gly Tyr  
 260 265 270  
 Leu Leu Gln Gly Lys Glu Leu Lys Ala Val Gln Asp Ile Ile Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Gly Gly Leu Asn Ala Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Thr Lys Ile  
 290 295 300  
 Ala Glu Met Ala Gly Ile Lys Val Pro Ser Asn Thr Lys Ile Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Val Lys Val Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asn Phe Glu Glu Ala  
 340 345 350  
 Val Glu Lys Ala Glu Lys Leu Val Glu Met Gly Gly Ile Gly His Thr  
 355 360 365  
 Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Thr Ala Arg Val Lys Tyr  
 370 375 380  
 Phe Gly Asp Lys Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser  
 405 410 415  
 Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn  
 420 425 430  
 Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala  
 435 440 445  
 Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg  
 450 455 460  
 Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Glu Glu Val Ala Thr Asp Gly Ala Lys

465	470	475	480
Arg Ala Phe Ile Val Thr Asp Arg Tyr Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Ala			
	485	490	495
Asp Gln Val Thr Ser Val Leu Lys Ser His Gly Ile Glu Thr Glu Val			
	500	505	510
Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly			
	515	520	525
Ala Glu Gln Met Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly			
	530	535	540
Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu			
545	550	555	560
His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile			
	565	570	575
Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Lys Leu			
	580	585	590
Val Ala Ile Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe			
	595	600	605
Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp			
	610	615	620
Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met			
625	630	635	640
Asn Met Pro Lys Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr			
	645	650	655
His Ala Leu Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Asn Glu Tyr Ser Asp			
	660	665	670
Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Phe Leu Pro Ala			
	675	680	685
Ser Tyr Asn Glu Gly Ala Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His			
	690	695	700
Asn Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly			
705	710	715	720
Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Glu Phe His Ile Pro			
	725	730	735
His Gly Leu Ala Asn Ala Met Leu Ile Ser Asn Val Ile Arg Tyr Asn			
	740	745	750
Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg			
	755	760	765
Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu			
	770	775	780



Ala Thr Asn Lys Ala Ala Asp Ile Val Leu Gln Ala Ala Ile Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Ala Pro Lys Asp Ile Ile Gly Trp Ile Asp Gln Pro Ser Val Asp  
 165 170 175  
 Leu Ser Asn Gln Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala  
 180 185 190  
 Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro  
 195 200 205  
 Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Ile Asp Glu Thr  
 210 215 220  
 Ala Asp Ile Lys Arg Ala Val Ala Ser Ile Leu Met Ser Lys Thr Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Val Ile Val Val Asp  
 245 250 255  
 Ser Ala Tyr Asp Ala Val Arg Glu Arg Phe Ala Thr His Gly Gly Tyr  
 260 265 270  
 Met Leu Lys Gly Lys Glu Leu His Ala Val Gln Gly Ile Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Gly Ser Leu Asn Ala Asp Ile Val Gly Gln Pro Ala Pro Lys Ile  
 290 295 300  
 Ala Glu Met Ala Gly Ile Thr Val Pro Ala Asn Thr Lys Val Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Val Thr Ala Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Phe Asn Asp Ala  
 340 345 350  
 Val Ile Lys Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Gly Ile Gly His Thr  
 355 360 365  
 Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Pro Glu Arg Val Asn His  
 370 375 380  
 Phe Gly Asn Met Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser  
 405 410 415  
 Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn  
 420 425 430  
 Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala  
 435 440 445  
 Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg



450	455	460
Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Glu Glu Val Ala Ser Asp Gly Ala Lys		
465	470	475
Arg Ala Phe Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Val		
	485	490
Asp Gln Val Thr Ser Val Leu Lys Gln His Gly Leu Glu Thr Glu Val		
	500	505
Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly		
	515	520
Ala Glu Gln Met His Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly		
	530	535
Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu		
545	550	555
His Pro Thr Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile		
	565	570
Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Lys Met		
	580	585
Val Ala Ile Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe		
	595	600
Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp		
	610	615
Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met		
625	630	635
Asn Met Pro Lys Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr		
	645	650
His Ser Leu Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Asn Glu Tyr Ser Asp		
	660	665
Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Asn Leu Pro Asp		
	675	680
Ser Tyr Arg Asp Gly Ala Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His		
	690	695
Asn Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly		
705	710	715
Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Glu Phe His Ile Pro		
	725	730
His Gly Leu Ala Asn Ala Met Leu Ile Ser Asn Val Ile Arg Tyr Asn		
	740	745
Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Thr Phe Ser Gln Tyr Asp Arg		
	755	760
		765

Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Arg Leu  
 770 775 780  
 Thr Ala Pro Ser Asp Arg Thr Ala Gln Lys Ile Glu Lys Leu Leu Asn  
 785 790 795 800  
 Trp Leu Glu Glu Ile Lys Thr Glu Leu Gly Ile Pro Ala Ser Ile Arg  
 805 810 815  
 Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala Lys Val Asp Lys Leu  
 820 825 830  
 Ser Glu Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Tyr  
 835 840 845  
 Pro Leu Ile Ser Glu Leu Lys Gln Ile Leu Leu Asp Thr Tyr Tyr Gly  
 850 855 860  
 Arg Lys Phe Ser Glu Glu Val Lys Thr Glu Thr Val Glu Pro Val Ala  
 865 870 875 880  
 Lys Ala Ala Lys Thr Gly Lys Lys Ala Ala His  
 885 890

<210>56

<211>878

<212>PRT

<213>鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)

<400>56

Met Ala Val Thr Asn Val Ala Glu Leu Asn Ala Leu Val Glu Arg Val  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Ala Gln Arg Glu Tyr Ala Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Asp  
 20 25 30  
 Lys Ile Phe Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Arg Ile Pro  
 35 40 45  
 Leu Ala Lys Met Ala Val Ala Glu Ser Gly Met Gly Ile Val Glu Asp  
 50 55 60  
 Lys Val Ile Lys Asn His Phe Ala Ser Glu Tyr Ile Tyr Asn Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Lys Asp Glu Lys Thr Cys Gly Val Leu Ser Glu Asp Asp Thr Phe Arg  
 85 90 95  
 Thr Ile Thr Ile Ala Glu Pro Ile Gly Ile Ile Cys Gly Ile Val Pro  
 100 105 110  
 Thr Thr Asn Pro Thr Ser Thr Ala Ile Phe Lys Ser Leu Ile Ser Leu  
 115 120 125

Lys Thr Arg Asn Ala Ile Ile Phe Ser Pro His Pro Arg Ala Lys Glu  
 130 135 140  
 Ala Thr Asn Lys Ala Ala Asp Ile Val Ser Lys Ala Leu Ser Leu Pro  
 145 150 155 160  
 Ala Arg Arg Lys Ile Arg Leu Ala Arg Ser Ile Asn Leu Pro Val Glu  
 165 170 175  
 Leu Ser Asn Val Asp Ala Pro Pro Gly Tyr Ile Pro Asp Pro Ala Thr  
 180 185 190  
 Gly Ser Arg His Gly Tyr Ser Cys Ile Gln Leu Gly Ser Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 Ala Ile Gly Gln Ala Thr Leu Arg Leu Val Leu Met Lys Pro Leu Ile  
 210 215 220  
 Asp Ser Asn Ala Ala Cys Gly Leu Cys Leu Asp Ala Tyr Asn Leu Cys  
 225 230 235 240  
 Tyr Arg Gly Asn Leu Cys Phe Cys Thr Ser Leu Phe Val Val Asp Ser  
 245 250 255  
 Ala Tyr Leu His Met Arg Pro Asp Phe Arg Gln His Gly Gly Tyr Met  
 260 265 270  
 Arg Arg Pro Glu Leu Lys Ala Val Gln Arg Tyr Pro Glu Lys Trp Arg  
 275 280 285  
 Ser Glu Arg Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Tyr Lys Ile Ala Glu Leu  
 290 295 300  
 Ala Gly Phe Ser Val Pro Glu Thr Thr Lys Ile Leu Ile Gly Glu Val  
 305 310 315 320  
 Thr Val Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys Leu Ser Pro  
 325 330 335  
 Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Phe Glu Glu Ala Val Glu Lys  
 340 345 350  
 Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Gly Ile Gly His Thr Ser Cys Leu  
 355 360 365  
 Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Pro Glu Arg Val Ala Tyr Phe Gly Gln  
 370 375 380  
 Met Lys Asn Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala Ser Gln Gly Gly  
 385 390 395 400  
 Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Pro Pro Ser Leu Thr Leu Gly  
 405 410 415  
 Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Pro Lys  
 420 425 430  
 His Leu Ile Tyr Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala Glu Asn Met Trp

435	440	445
His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg Gly Ser Leu Pro Ile		
450	455	460
Ala Leu Asp Glu Val Ile Thr Asp Gly His Lys Arg Ala Leu Ile Val		
465	470	475
Thr Asp Arg Phe Cys Ser Thr Thr Val Ser Asp Arg Ser Leu Cys Ala		
485	490	495
Glu Arg Arg Gly Val Glu Thr Glu Val Phe Phe Glu Val Glu Ala Ala		
500	505	510
Asp Pro Thr Leu Ser Val Val Arg Lys Gly Pro Glu Leu Ala Asn Ser		
515	520	525
Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Val Gly Gly Val Pro Arg Trp Thr		
530	535	540
Arg Gly Glu Ile Ile Gly Ser Cys Thr Asn His Pro Glu Thr Arg Leu		
545	550	555
Ile Glu Glu Arg Val Arg Phe Met Thr Ser Tyr Arg Ile Tyr Lys Phe		
565	570	575
Pro Lys Met Val Lys Ala Lys Cys Ser Pro Ser Thr Thr Thr Ser Gly		
580	585	590
Thr Gly Ser Lys Leu His Arg Leu Arg Leu Cys Pro Thr Thr Leu Leu		
595	600	605
Pro Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp Tyr Ala Val Thr Pro Asp Met Ala		
610	615	620
Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met Asp Met Pro Asn Thr Leu Thr Arg		
625	630	635
Lys Gly Pro Leu His Arg Leu Thr His Ala Met Glu Arg Ile Val Ser		
645	650	655
Val Leu Ala Ser Gln Ser Asp Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Glu		
660	665	670
Tyr Phe Pro Ala Ser Tyr His Glu Gly Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu		
675	680	685
Arg Leu His Ser Ala Ala Thr Ile Ala Pro Ile Ala Phe Ala Asn Ala		
690	695	700
Phe Leu Gly Val Cys His Trp Met Ala His Lys Leu Pro Ala Gln Leu		
705	710	715
His Ile Pro His Gly Pro Phe Asn Ala Arg Tyr Arg His Ser Val Arg		
725	730	735
Arg Ala Gln Ser Asn Pro Thr Lys Gln Val Ala Leu Ser Gln Tyr Leu		
740	745	750

Tyr Asn Phe Ala Ala His Arg Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ile Pro Arg  
 755 760 765  
 Ala Arg Thr Gly Ile Arg Pro Arg Lys Tyr Lys Leu Val Pro Val Ala  
 770 775 780  
 Leu Cys His Val Lys Gly Ile Lys Ala Asp Leu Gly Ile Pro Lys Ser  
 785 790 795 800  
 Ile Arg Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala His Val Asp  
 805 810 815  
 Lys Leu Ser Glu Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro  
 820 825 830  
 Arg Tyr Pro Leu Met Ser Glu Leu Lys Gln Ile Leu Leu Asp Thr Tyr  
 835 840 845  
 Tyr Gly Arg Asp Phe Thr Glu Gly Glu Val Ala Ala Lys Lys Asp Val  
 850 855 860  
 Val Ala Ala Pro Lys Ala Glu Lys Lys Ala Lys Lys Ser Ala  
 865 870 875

<210>57

<211>867

<212>PRT

<213>植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)

<400>57

Met Ile Lys Thr Glu Lys Asn Gln Thr Ser Lys Val Thr Asp Glu Val  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Leu Val Gln Arg Ser Lys Lys Ala Leu Ala Ile Leu Lys Ser  
 20 25 30  
 Tyr Thr Gln Ala Gln Ile Asp Asp Leu Cys Glu Lys Val Ala Val Ala  
 35 40 45  
 Ala Leu Asp Asn His Met Lys Leu Ala Lys Leu Ala Val Glu Glu Thr  
 50 55 60  
 Gly Arg Gly Val Val Glu Asp Lys Ala Ile Lys Asn Ile Tyr Ala Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Tyr Ile Trp Asn Ser Met Arg His Asp Lys Thr Val Gly Val Ile  
 85 90 95  
 Lys Glu Asp Asp Glu Glu Gln Leu Met Glu Ile Ala Glu Pro Val Gly  
 100 105 110  
 Ile Val Ala Gly Val Thr Pro Val Thr Asn Pro Thr Ser Thr Thr Val  
 115 120 125

Phe Lys Thr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Arg Asn Thr Ile Val Phe Gly  
 130 135 140  
 Phe His Pro Gln Ala Gln Lys Cys Ser Ser Ala Ala Ala Asp Val Met  
 145 150 155 160  
 Arg Glu Ala Ile Lys Ala Ala Gly Gly Pro Ala Asp Ala Val Leu Tyr  
 165 170 175  
 Ile Glu His Pro Ser Ile Glu Ala Thr Asp Ala Leu Met His His Thr  
 180 185 190  
 Asp Val Ala Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Pro Ser Met Val Thr Ala  
 195 200 205  
 Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro Ala Leu Gly Val Gly Pro Gly Asn Gly  
 210 215 220  
 Pro Thr Tyr Val Glu Lys Thr Ala Asp Ile Lys Gln Ala Val Asn Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Val Leu Ser Lys Thr Phe Asp Asn Gly Met Ile Cys Ala Ser Glu  
 245 250 255  
 Asn Ser Ala Ile Ile Asp Lys Glu Ile Tyr Ala Glu Val Lys Ala Glu  
 260 265 270  
 Phe Ile Arg Leu Gly Cys Tyr Tyr Val Lys Pro Lys Asp Val Gln Ala  
 275 280 285  
 Leu Ser Asp Ala Val Ile Asp Pro Asn Arg His Thr Val Arg Gly Pro  
 290 295 300  
 Val Ala Gly Lys Thr Ala Tyr Gln Ile Ala Gln Met Ala Gly Leu Lys  
 305 310 315 320  
 Asp Val Ala Lys Asp Cys Arg Val Leu Ile Ala Glu Ile Asn Gly Val  
 325 330 335  
 Gly Ile Lys Tyr Pro Leu Ser Gly Glu Lys Leu Ser Pro Val Leu Thr  
 340 345 350  
 Val Tyr Lys Ala Asp Ser His Glu Ala Ala Phe Lys Arg Ala Asn Glu  
 355 360 365  
 Leu Leu His Tyr Gly Gly Leu Gly His Thr Ala Gly Ile His Thr Thr  
 370 375 380  
 Asp Asp Ala Leu Val Lys Glu Phe Gly Leu Gln Met Pro Ala Cys Arg  
 385 390 395 400  
 Ile Leu Val Asn Thr Pro Ser Ser Val Gly Gly Leu Gly Asn Ile Tyr  
 405 410 415  
 Asn Asn Met Ala Pro Ser Leu Thr Leu Gly Thr Gly Ser Tyr Gly Gly  
 420 425 430  
 Asn Ser Ile Ser His Asn Val Thr Asp Met Asp Leu Ile Asn Ile Lys

435	440	445
Thr Val Ala Lys Arg Arg Asn Asn Met Gln Trp Val Lys Met Pro Pro		
450	455	460
Lys Val Tyr Phe Glu Arg Asn Ser Val Arg Tyr Leu Glu His Met Ala		
465	470	475
Gly Ile Lys Lys Val Phe Leu Val Cys Asp Pro Gly Met Val Glu Phe		
485	490	495
Gly Tyr Ala Asp Arg Val Thr Ala Val Leu Asn Lys Arg Thr Asp Pro		
500	505	510
Val Asp Ile Asp Ile Phe Ser Glu Val Glu Pro Asn Pro Ser Thr Asp		
515	520	525
Thr Val Tyr Lys Gly Val Ala Arg Met Lys Ala Phe Lys Pro Asp Thr		
530	535	540
Ile Ile Ala Leu Gly Gly Gly Ser Ala Met Asp Ala Ala Lys Gly Met		
545	550	555
Trp Leu Phe Tyr Glu His Pro Glu Ala Ser Phe Leu Gly Ala Lys Gln		
565	570	575
Lys Phe Leu Asp Ile Arg Lys Arg Thr Tyr Lys Val Pro Val Ser Glu		
580	585	590
Lys Val Thr Tyr Ile Gly Ile Pro Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu		
595	600	605
Val Thr Pro Tyr Ala Val Ile Thr Asp Ser Lys Thr His Val Lys Tyr		
610	615	620
Pro Ile Thr Asp Tyr Ala Met Gln Pro Asp Ile Ala Ile Val Asp Pro		
625	630	635
Gln Phe Val Glu Thr Val Pro Lys Arg Thr Thr Ala Trp Thr Gly Leu		
645	650	655
Asp Val Ile Thr His Ala Thr Glu Ala Tyr Val Ser Thr Met Ala Ser		
660	665	670
Asp Phe Thr Arg Gly Trp Ser Ile Gln Ala Leu Gln Leu Ala Phe Lys		
675	680	685
Tyr Leu Lys Ala Ser Tyr Asp Gly Asp Lys Met Ala Arg Glu Lys Met		
690	695	700
His Asn Ala Ser Thr Leu Ala Gly Met Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu		
705	710	715
Gly Ile Asn His Ser Ile Ala His Lys Leu Gly Gly Glu Phe Asn Leu		
725	730	735
Pro His Gly Leu Ala Ile Ala Ile Thr Tyr Pro Gln Val Val Arg Tyr		
740	745	750

Asn Ala Glu Ile Pro Thr Lys Leu Ala Met Trp Pro Lys Tyr Asn His  
 755 760 765  
 Asn Thr Ala Leu Ala Asp Tyr Ala Asn Ile Ala Arg Ala Leu Gly Leu  
 770 775 780  
 Pro Gly Lys Thr Asp Glu Glu Leu Lys Glu Ser Leu Val Lys Ala Tyr  
 785 790 795 800  
 Ile Asp Leu Ala His Ser Met Asp Val Thr Leu Ser Leu Lys Ala Asn  
 805 810 815  
 Arg Val Glu Lys Lys His Phe Asp Ala Thr Val Asp Glu Leu Ala Glu  
 820 825 830  
 Leu Ala Tyr Glu Asp Gln Cys Thr Thr Ala Asn Pro Arg Glu Pro Leu  
 835 840 845  
 Ile Ser Glu Leu Lys Ala Ile Ile Glu Arg Glu Trp Asp Gly Gln Gly  
 850 855 860  
 Thr Glu Lys  
 865

<210>58

<211>903

<212>PRT

<213>乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)

<400>58

Met Ala Thr Lys Lys Ala Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Leu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Lys Ala Ala Lys Phe Gln Glu Val Val Ala Tyr Thr Asp Gln  
 20 25 30  
 Leu Val Lys Lys Ala Gln Ala Ala Val Leu Lys Phe Glu Gly Tyr Thr  
 35 40 45  
 Gln Thr Gln Val Asp Thr Ile Val Ala Ala Met Ala Leu Ala Ala Ser  
 50 55 60  
 Lys His Ser Leu Glu Leu Ala His Glu Ala Val Asn Glu Thr Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Val Val Glu Asp Lys Asp Thr Lys Asn His Phe Ala Ser Glu Ser  
 85 90 95  
 Val Tyr Asn Ala Ile Lys Asn Asp Lys Thr Val Gly Val Ile Ala Glu  
 100 105 110  
 Asn Lys Val Ala Gly Ser Val Glu Ile Ala Ser Pro Leu Gly Val Leu  
 115 120 125



Ala Gly Ile Val Pro Thr Thr Asn Pro Thr Ser Thr Ala Ile Phe Lys  
 130 135 140  
 Ser Leu Leu Thr Ala Lys Thr Arg Asn Ala Ile Val Phe Ala Phe His  
 145 150 155 160  
 Pro Gln Ala Gln Lys Cys Ser Ser His Ala Ala Lys Ile Val Tyr Asp  
 165 170 175  
 Ala Ala Ile Glu Ala Gly Ala Pro Glu Asp Phe Ile Gln Trp Ile Glu  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Leu Asp Met Thr Thr Ala Leu Ile Gln Asn Arg Gly Ile  
 195 200 205  
 Ala Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Asn Ala Ala Leu  
 210 215 220  
 Lys Ser Gly Asn Pro Ser Leu Gly Val Gly Ala Gly Asn Gly Ala Val  
 225 230 235 240  
 Tyr Val Asp Ala Thr Ala Asn Ile Asp Arg Ala Val Glu Asp Leu Leu  
 245 250 255  
 Leu Ser Lys Arg Phe Asp Asn Gly Met Ile Cys Ala Thr Glu Asn Ser  
 260 265 270  
 Ala Val Ile Asp Ala Ser Ile Tyr Asp Glu Phe Val Ala Lys Met Pro  
 275 280 285  
 Thr Gln Gly Ala Tyr Met Val Pro Lys Lys Asp Tyr Lys Ala Ile Glu  
 290 295 300  
 Ser Phe Val Phe Val Glu Arg Ala Gly Glu Gly Phe Gly Val Thr Gly  
 305 310 315 320  
 Pro Val Ala Gly Arg Ser Gly Gln Trp Ile Ala Glu Gln Ala Gly Val  
 325 330 335  
 Asn Val Pro Lys Asp Lys Asp Val Leu Leu Phe Glu Leu Asp Lys Lys  
 340 345 350  
 Asn Ile Gly Glu Ala Leu Ser Ser Glu Lys Leu Ser Pro Leu Leu Ser  
 355 360 365  
 Ile Tyr Lys Ser Glu Thr Arg Glu Glu Gly Ile Glu Ile Val Arg Ser  
 370 375 380  
 Leu Leu Ala Tyr Gln Gly Ala Gly His Asn Ala Ala Ile Gln Ile Gly  
 385 390 395 400  
 Ala Met Asp Asp Pro Phe Val Lys Glu Tyr Gly Ile Lys Val Glu Ala  
 405 410 415  
 Ser Arg Ile Leu Val Asn Gln Pro Asp Ser Ile Gly Gly Val Gly Asp  
 420 425 430  
 Ile Tyr Thr Asp Ala Met Arg Pro Ser Leu Thr Leu Gly Thr Gly Ser

435	440	445
Trp Gly Lys Asn Ser Leu Ser His Asn Leu Ser Thr Tyr Asp Leu Leu		
450	455	460
Asn Val Lys Thr Val Ala Lys Arg Arg Asn Arg Pro Gln Trp Val Arg		
465	470	475
Leu Pro Lys Glu Ile Tyr Tyr Glu Lys Asn Ala Ile Ser Tyr Leu Gln		
485	490	495
Glu Leu Pro His Val His Lys Ala Phe Ile Val Ala Asp Pro Gly Met		
500	505	510
Val Lys Phe Gly Phe Val Asp Lys Val Leu Glu Gln Leu Ala Ile Arg		
515	520	525
Pro Thr Gln Val Glu Thr Ser Ile Tyr Gly Ser Val Gln Pro Asp Pro		
530	535	540
Thr Leu Ser Glu Ala Ile Ala Ile Ala Arg Gln Met Asn His Phe Glu		
545	550	555
Pro Asp Thr Val Ile Cys Leu Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ala Gly		
565	570	575
Lys Ile Gly Arg Leu Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Arg Gly Glu Ala Asp		
580	585	590
Leu Ser Asp Asp Ala Ser Leu Lys Glu Ile Phe Gln Glu Leu Ala Gln		
595	600	605
Lys Phe Val Asp Ile Arg Lys Arg Ile Ile Lys Phe Tyr His Pro His		
610	615	620
Lys Ala Gln Met Val Ala Ile Pro Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu		
625	630	635
Val Thr Pro Phe Ala Val Ile Thr Asp Asp Glu Thr His Val Lys Tyr		
645	650	655
Pro Leu Ala Asp Tyr Gln Leu Thr Pro Gln Val Ala Ile Val Asp Pro		
660	665	670
Glu Phe Val Met Thr Val Pro Lys Arg Thr Val Ser Trp Ser Gly Ile		
675	680	685
Asp Ala Met Ser His Ala Leu Glu Ser Tyr Val Ser Val Met Ser Ser		
690	695	700
Asp Tyr Thr Lys Pro Ile Ser Leu Gln Ala Ile Lys Leu Ile Phe Glu		
705	710	715
Asn Leu Thr Glu Ser Tyr His Tyr Asp Pro Ala His Pro Thr Lys Glu		
725	730	735
Gly Gln Lys Ala Arg Glu Asn Met His Asn Ala Ala Thr Leu Ala Gly		
740	745	750

Met Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly Ile Asn His Ser Leu Ala His  
 755 760 765  
 Lys Ile Ala Gly Glu Phe Gly Leu Pro His Gly Leu Ala Ile Ala Ile  
 770 775 780  
 Ala Met Pro His Val Ile Lys Phe Asn Ala Val Thr Gly Asn Val Lys  
 785 790 795 800  
 Phe Thr Pro Tyr Pro Arg Tyr Glu Thr Tyr Arg Ala Gln Glu Asp Tyr  
 805 810 815  
 Ala Glu Ile Ser Arg Phe Met Gly Phe Ala Gly Lys Glu Asp Ser Asp  
 820 825 830  
 Glu Lys Ala Val Lys Ala Leu Val Ala Glu Leu Lys Lys Leu Thr Asp  
 835 840 845  
 Ser Ile Asp Ile Asn Ile Thr Leu Ser Gly Asn Gly Val Asp Lys Ala  
 850 855 860  
 His Leu Glu Arg Glu Leu Asp Lys Leu Ala Asp Leu Val Tyr Asp Asp  
 865 870 875 880  
 Gln Cys Thr Pro Ala Asn Pro Arg Gln Pro Arg Ile Asp Glu Ile Lys  
 885 890 895  
 Gln Leu Leu Leu Asp Gln Tyr  
 900

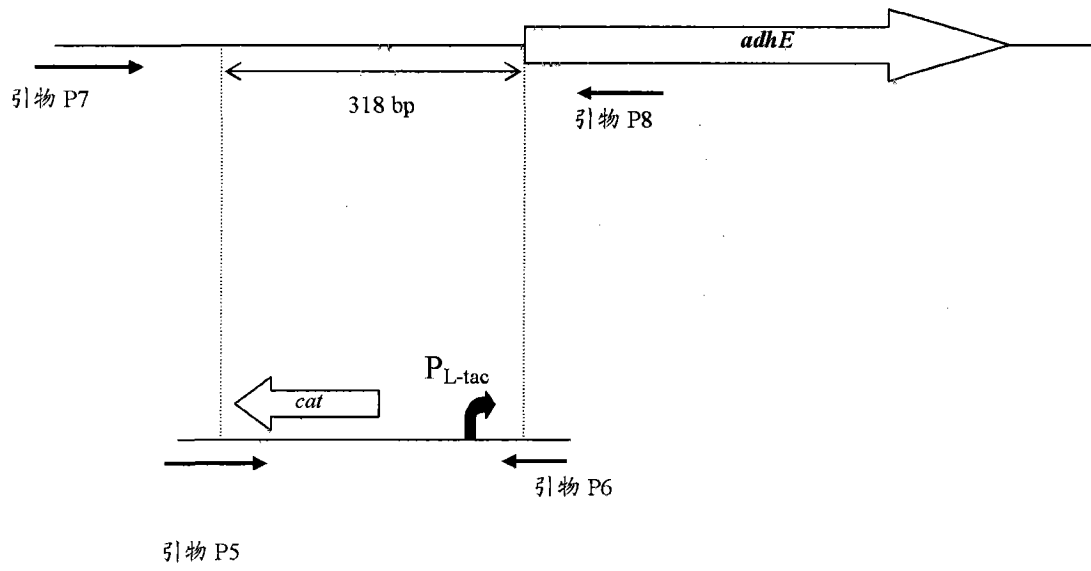


图1

ADHE_ECOLI	-----AVTNVAELNALVERVKKAOQREYASFTQEQVDKIFRAAA
Q83R <sub>N2</sub> _SHIFL	-----MAVTNVAELNALVERVKKAOQREYASFTQEQVDKIFRAAA
ADHE_PANAN	-----MAVTNVAELNALVERVKKAOQEFANFSQQQVDKIFRAAA
Q66A <sub>M7</sub> _YERPS	-----MAVTNVAELNELVARVKKAOQREYANFSQEQVDKIFRAAA
Q6D4 <sub>R4</sub> _ERWCT	-----MAVTNVAELNALVERVKKAOQEFATYTQEQVDKIFRAAA
P74880_SALTY	-----MAVTNVAELNALVERVKKAOQREYASFTQEQVDKIFRAAA
Q88R <sub>Y9</sub> _LACPL	-----MIKTEKNQTSKVTDEVDQLVQRSKKALAILKSYTQAQIDDLCEKVA
O86282_9LACT	MATKKAAPAACKVLSAEKKAQFQEVWAYTDQLVKKAQA <sub>AAV</sub> LKFE <sub>GYT</sub> QTQVDTIVAAMA : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : *
ADHE_ECOLI	LAAADARIPLAKMAVAESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNAYKDEKTCGVLSEDDTFGTIT
Q83R <sub>N2</sub> _SHIFL	LAAADARIPLAKMAVAESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNAYKDEKTCGVLSEDDTFGTIT
ADHE_PANAN	LAAADARIPLAKMAVAESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNAYKDEKTCGVLSEDDTFGTIT
Q66A <sub>M7</sub> _YERPS	LAAADARIPLAKLAVTESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNAYKDEKTCGILCEDKTFGTIT
Q6D4 <sub>R4</sub> _ERWCT	LAAADARIPLAKMAVAESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNAYQDEKTCGVLSTDDTFGTIT
P74880_SALTY	LAAADARIPLAKMAVAESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNAYKDEKTCGVLSEDDTFRTIT
Q88R <sub>Y9</sub> _LACPL	VAAALDNHMKLAKLAVEETGRGVVEDKAIKNIYASEYIWN <sub>SMR</sub> HDKTVGVIKEDDEEQ <sub>LME</sub>
O86282_9LACT	LAAASKHSLELAHEAVNETGRGVVEDKDTKNHFASESVYNAIKNDKTVGVIAENK <sub>VAGS</sub> VE : * * * : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
ADHE_ECOLI	IAEPIGIICGIVPTTNPSTSTAIFKSLISLKTRNAIIFSPHPRAKDATNKAADIVLQAAIA
Q83R <sub>N2</sub> _SHIFL	IAEPIGIICGIVPTTNPSTSTAIFKSLISLKTRNAIIFSPHPRAKDATNKAADIVLQAAIA
ADHE_PANAN	IAEPIGLICGIVPTTNPSTSTAIFKALISLKTRNGIIFSPHPRAKDATNKAADIVLQAAIA
Q66A <sub>M7</sub> _YERPS	IAEPIGLICGIVPTTNPSTSTAIFKALISLKTRNGIIFSPHPRAKDATNKAADIVLQAAIA
Q6D4 <sub>R4</sub> _ERWCT	IAEPIGLICGIVPTTNPSTSTAIFKALISLKTRNGIIFSPHPRAKDATNKAADIVLQAAIA
P74880_SALTY	IAEPIGIICGIVPTTNPSTSTAIFKSLISLKTRNAIIFSPHPRAKEATNKAADIVSKALS
Q88R <sub>Y9</sub> _LACPL	IAEPVGVIVAGVPTVNTPTSTTVFKTLISLKGRNTIVFGFHPQAQKCSSAAADVMREAIKA
O86282_9LACT	IASPLGVLAGIVPTTNPSTSTAIFKSLLTAKTRNAIVFAFHPQAQKCSSHAAKIVYDAIE * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *

图 2(A)

ADHE_ECOLI	AGAPKDLIGWIDQPSVELSNALMHHHPDINLI	ILATGGPGMVKAAAYSSGKPAIGVGAGNTPV
Q83RŃ2_SHIFL	AGAPKDLIGWIDQPSVELSNALMHHHPDINLI	ILATGGPGMVKAAAYSSGKPAIGVGAGNTPV
ADHE_PANAN	AGAPKDIIGWIDAPSVELSNQLMHHHPDINLI	ILATGGPGMVKAAAYSSGKPAIGVGAGNTPV
Q66AM7_YERPS	AGAPADIIGWIDAPTVELSNQLMHHHPDINLI	ILATGGPGMVKAAAYSSGKPAIGVGAGNTPV
Q6D4R4_ERWCT	AGAPKDIIGWIDQPSVDLSNQLMHHHPDINLI	ILATGGPGMVKAAAYSSGKPAIGVGAGNTPV
P74880_SALTY	PARRKIRLARSINLPVELSNVDAPPYIIPDPAT	GSRRHGYSICQLGSTLSAIGQ-ATLRLV
Q88RY9_LACPL	AGGPADAVLYIEHPSIEATDALMHHHTDVAT	ILATGGPMSVTAAYSSGKPALGVGPGNGPT
O86282_9LACT	AGAPEDFIQWIEVPSLDMTTALIQNRGIAT	ILATGGPGMVNAALKSGNPSLGVGAGNGAV
ADHE_ECOLI	VIDETADIKRAVASVLMSKTFDN-GVICASEQ	SVVVVDSVYDAVRERFATHGGYLLQGKE
Q83RŃ2_SHIFL	VIDETADIKRAVASVLMSKTFDN-GVICASEQ	SVVVVDSVYDAVRERFATHGGYLLQGKE
ADHE_PANAN	VIDETADVKRAVASILMSKTFDN-GVICASEQ	SVVVVDAVYDAVRERFASHGGYLLQGQE
Q66AM7_YERPS	VVDETADIKRVVASILMSKTFDN-GVICASEQ	SIIVVDSVYDAVRERFASHGGYLLQGKE
Q6D4R4_ERWCT	VIDETADIKRAVASILMSKTFDN-GVICASEQ	SVIVVDSAYDAVRERFATHGGYMLKGKE
P74880_SALTY	LMKPLIDSNAACGLCLDAYNLCYRGNLCFCT-	SLFVVDSAYLHMRPDRQHGGYMRR-PE
Q88RY9_LACPL	YVEKTADIKQAVNDIVLSKTFDN-GMICASE	NSAIDKEIYAEVKAEIFIRLGCYYVKPKD
O86282_9LACT	YVDATANIDRAVEDLLLSKRFDN-GMICATEN	SAVIDASIYDEFVAKMPTQGAYMVPKKD
ADHE_ECOLI	LKAVQDVILKNGALN-----AAIVGQPAYKIAELAGFS-	VPENTKILIGEVTVVDESEPF
Q83RŃ2_SHIFL	LKAVQDVILKNGALN-----AAIVGQPAYKIAELAGFS-	VPENTKILIGEVTVVDESEPF
ADHE_PANAN	LSAVQNIILKNGGLN-----AAIVGQPAVKIAEMAGIS-	VPGETKILIGEVERVDESEPF
Q66AM7_YERPS	LKAVQDIILKNGGLN-----AAIVGQPATKIAEMAGIK-	VPSNTKILIGEVKVVDESEPF
Q6D4R4_ERWCT	LHAVQGILLKNGSLN-----ADIVGQPAPKIAEMAGIT-	VPANTKVLIGEVTAVDESEPF
P74880_SALTY	LKAVQRYPEKWRSE-----RAIVGQPAYKIAELAGFS-	VPETTKILIGEVTVVDESEPF
Q88RY9_LACPL	VQALSDAVIDPNR---HTVRGPVAGKTAYQIAQMAGL	KDVAKDCRVLIAEINGVGIKYPL
O86282_9LACT	YKAIESFVFERAGEGFGVTGPVAGRSQWIAEQAGVN-	VPKDKDVLFFELDKKNI GEAL

图 2(B)

ADHE_ECOLI	AHEKLSPTLAM	YRAKDFE	DAVEKAEKLVAMGGI	GHTSCLYTDQDNQ	PARVSYFGQ	KMKTA
Q83RN2_SHIFL	AHEKLSPTLAM	YRAKDFE	DAVEKAEKLVAMGGI	GHTSCLYTDQDNQ	PARVSYFGQ	KMKTA
ADHE_PANAN	AHEKLSPTLAM	YRAKDYQ	DAVSKAEKLVAMGGI	GHTSCLYTDQDNQ	TARVHYFGD	KMKTA
Q66AM7_YERPS	AHEKLSPTLAM	YRAKNEFEE	AVEKAEKLVEMGGI	GHTSCLYTDQDNQ	TARVKYFGD	KMKTA
Q6D4R4_ERWCT	AHEKLSPTLAM	YRAKDFND	AVIKAEKLVAMGGI	GHTSCLYTDQDNQ	PERVNHFGN	MMKTA
P74880_SALTY	AHEKLSPTLAM	YRAKDFEE	AVEKAEKLVAMGGI	GHTSCLYTDQDNQ	PERVAYFG-Q	MKNA
Q88RY9_LACPL	SGEKLSPVL	TVYKAD	SHEAAFKRANEL	LHYGGLGHTAGIHT---	TDDALVKEFGLQ	MPAC
O86282_9LACT	SSEKLSPLLS	IYKSETREE	GIEIVRSLLAYQ	GAGHNAAIQIGA-MDD	PPFVKEYGIK	VEAS
	: *****	: ..	: . . . . .	: * * * * *	: * * * * *	: * * * * *
ADHE_ECOLI	RILINTPAS	QGGIGDLYNFK	LAPSLTLCGGS	WGGNSISENVGPKHL	INKKT	VAKRAENML
Q83RN2_SHIFL	RILINTPAS	QGGIGDLYNFK	LAPSLTLCGGS	WGGNSISENVGPKHL	INKKT	VAKRAENML
ADHE_PANAN	RILINTPAS	QGGIGDLYNFK	LAPSLTLCGGS	WGGNSISENVGPKHL	INKKT	VAKRAENML
Q66AM7_YERPS	RILINTPAS	QGGIGDLYNFK	LAPSLTLCGGS	WGGNSISENVGPKHL	INKKT	VAKRAENML
Q6D4R4_ERWCT	RILINTPAS	QGGIGDLYNFK	LAPSLTLCGGS	WGGNSISENVGPKHL	INKKT	VAKRAENML
P74880_SALTY	RILINTPAS	QGGIGDLYNFK	LAPSLTLCGGS	WGGNSISENVGPKHL	IYKKT	VAKRAEN-M
Q88RY9_LACPL	RILVNTPSS	VGGIGNIYNN	-MAPSLT	LTGTSYGGNSISHNVT	DMDLINIKT	VAKRRNNMQ
O86282_9LACT	RILVNQ	PDSIGGVGDI	YTDAMRPSL	TGTSWGGKNSLSHNL	STYDILLNVKT	VAKRRNRPQ
	*****	: *****	: *****	: *****	: *****	: *****
ADHE_ECOLI	WHKLPKSI	YFRRGSLPIAL	DEVIDTGHKRAL	IVTDRFLFNN	GYADQITSVL	KAA--GVET
Q83RN2_SHIFL	WHKLPKSI	YFRRGSLPIAL	DEVIDTGHKRAL	IVTDRFLFNN	GYADQITSVL	KAA--GVET
ADHE_PANAN	WHKLPKSI	YFRRGSLPIALEE	IATDGAKRAFV	VTDRFLFNN	GYADQVTRVL	KSH--GIET
Q66AM7_YERPS	WHKLPKSI	YFRRGSLPIALEE	VATDGAKRAF	IVTDRFLFNN	GYADQVTSVL	KSH--GIET
Q6D4R4_ERWCT	WHKLPKSI	YFRRGSLPIALEE	VASDGAKRAF	IVTDRFLFNN	GYVDQVTSVL	KQH--GLET
P74880_SALTY	WHKLPKSI	YFRRGSLPIAL	DEVITDGHKRAL	IVTDRFCSTT--	VSDRSLCA	ERR--GVET
Q88RY9_LACPL	WVKMP	PVYFERN	SVRYLEHMA---	GIKKVF	LVCDPGMVE	FGYADRVTAVLNKRTDPVDI
O86282_9LACT	WVRLPKEI	IYYEKNAIS	YLQELP---	HVHKAF	IVADPGMVK	FGFVDKVLQLEQLAIRPTQVET
	* * * * *	: * * * * *	: * * * * *	: * * * * *	: * * * * *	: * * * * *

图 2(C)





ADHE_ECOLI	QALKLLKEYLPASYHEGS-----KNPVARERVHSAATIAGIAFANAFLGVCHSMAHKLGS
Q83RN2_SHIFL	QALKLLKEYLPASYHEGS-----KNPVARERVHSAATIAGIAFANAFLGVCHSMAHKLGS
ADHE_PANAN	QALKLLKENLPASYAEGA-----KNPVARERVHNAATIAGIAFANAFLGVCHSMAHKLGS
Q66AM7_YERPS	QALKLLKEFLPASYNEGA-----KNPVARERVHNAATIAGIAFANAFLGVCHSMAHKLGS
Q6D4R4_ERWCT	QALKLLKENLPDSYRDGA-----KNPVARERVHNAATIAGIAFANAFLGVCHSMAHKLGS
F74880_SALTY	QALK---EYFPASYHEG-----KNPVARERLHSAATIAPIAFANAFLGVCHWMAHKLPA
Q88RY9_LACPL	QALQLAFKYLKASYDGD-----KMAREKMHNASTLAGMAFANAFLGINHSIAHKLGG
O86282_9LACT	QAIKLI FENLTESYHYDPAHPTKEGQKARENMHNAATLAGMAFANAFLGINHSLAHKLAG

ADHE_ECOLI	QFHIPHGLANALLICNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRPQARRRY-AEIAADHLGLSAPGDR
Q83RN2_SHIFL	QFHIPHGLANALLICNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRPQARRRY-AEIAADHLGLSAPGDR
ADHE_PANAN	EFHIPHGLANALLISNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRPQARRRY-AEIAADHLGLTATGDR
Q66AM7_YERPS	EFHIPHGLANAMLISNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRPQARRRY-AEIAADHLGLSAPGDR
Q6D4R4_ERWCT	EFHIPHGLANAMLISNVIRYNANDNPTKQTFQYDRPQARRRY-AEIAADHLRLTAFSDR
F74880_SALTY	QLHIPHGFNARYRHSVRR--AQSNPTKQVALSQLYNFAAHRWPAERSIPRARTGIRPR
Q88RY9_LACPL	EFNLPHGLAIAITYPOVVRYNAEIP-TKLAMWPKYNHNTALADY-ANIARALGLPGK--T
O86282_9LACT	EFGLPHGLAIAIALAMPHVIKFNVAVTGNVKFTPYPRYETYRAQEDY-AEISRFMGFAGKEDS

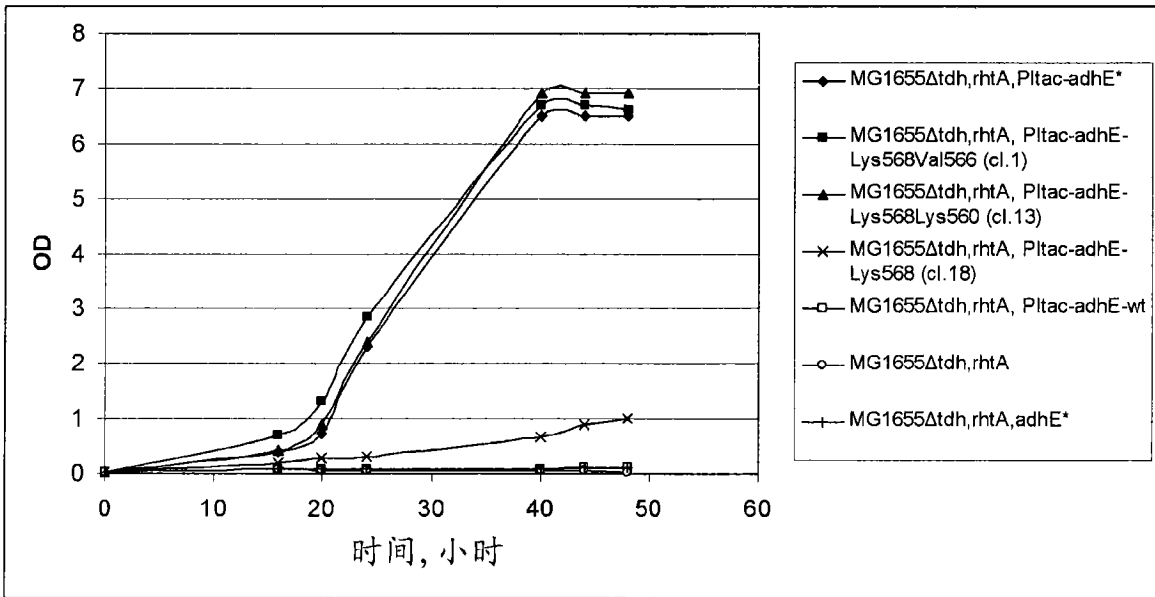
ADHE_ECOLI	TAAKIEKLLAWLETLKAEELGIPKSI REAGVQEADFLANVVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPL
Q83RN2_SHIFL	TAAKIEKLLAWLETLKAEELGIPKSI REAGVQEADFLANVVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPL
ADHE_PANAN	TAQKIEKLLVWLDEIKTELGI PASIREAGVQEADFLAKVDKLDADDAFDDQCTGANPRYPL
Q66AM7_YERPS	TAQKIQLLAWLDEIKAEELGIPASIREAGVQEADFLAKVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPL
Q6D4R4_ERWCT	TAQKIEKLLNWLEEIKTELGI PASIREAGVQEADFLAKVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPL
F74880_SALTY	KYKLVVALCHVKGIKADLGI PASIREAGVQEADFLAHVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPL
Q88RY9_LACPL	DEELKESLVKAYIDLAHSMVDVTL SLKANRVEKKHFDA TVDELAELAYEDQCTTANPREPL
O86282_9LACT	DEKAVKALVAELKKLTD SIDINI TILSGNGVDKAHLERELDKLADLVYDDQCTPANPRQPR

图 2(E)

ADHE_ECOLI	ISELKQIILLDTYYGRDYVEGETAAKKEAAPAKA--EKKAKKSA--
Q83RÑ2_SHIFL	ISELKQIILLDTYYGRDYVEDETAAKKEAAPAKA--EKKAKKSA--
ADHE_PANAN	IAELKQLMLDSYYGRKFFVEPFASAEEAAQAPVSDSKAACKAKKA
Q66AM7_YERPS	ISELKQIILLMDTYYGREYVEEFDREEEVAAAATAP---KAEKKTKK-
Q6D4R4_ERWCT	ISELKQIILLDTYYGRKFFSEEVKTEVEPVAKAA---KTGKKAH-
P74880_SALTY	MSELKQIILLDTYYGRDFTTEGEVAACKDVVAAPK-AEKKAKKSA--
Q88RY9_LACPL	ISELKAIIEREWDGQGTEK-----
O86282_9LACT	IDELKQIILLDQY-----

图 2(F)

A. M9 培养基 (3% 乙醇)



B. M9 培养基 (2% 乙醇)

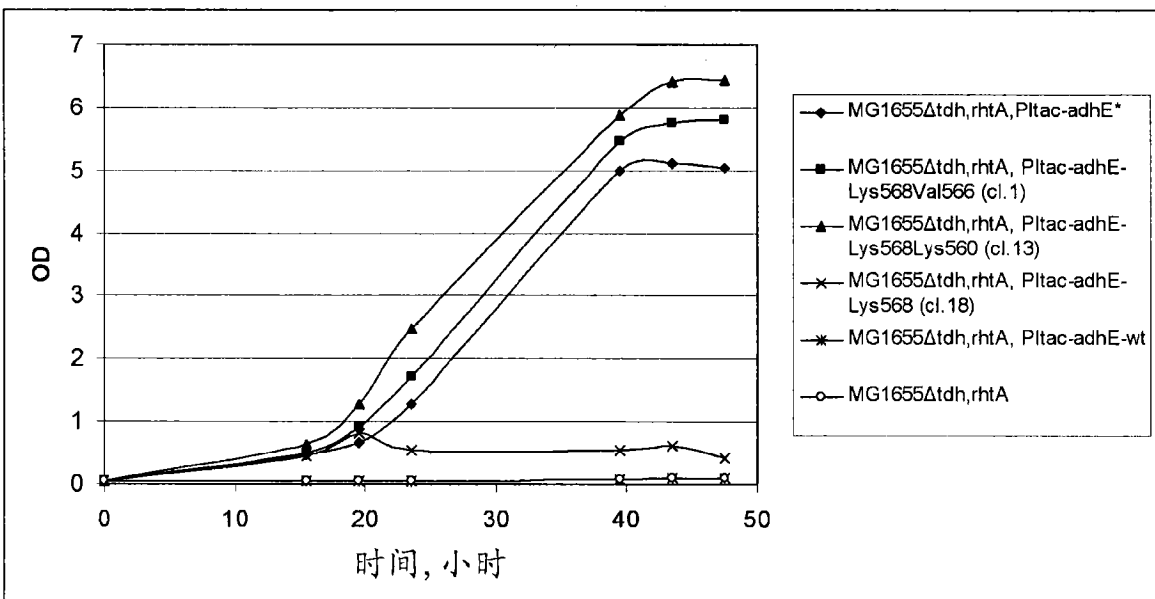


图3

M9 培养基 (0.1 % 葡萄糖 (重量 %), 0.1 % 乙醇 (体积 %))

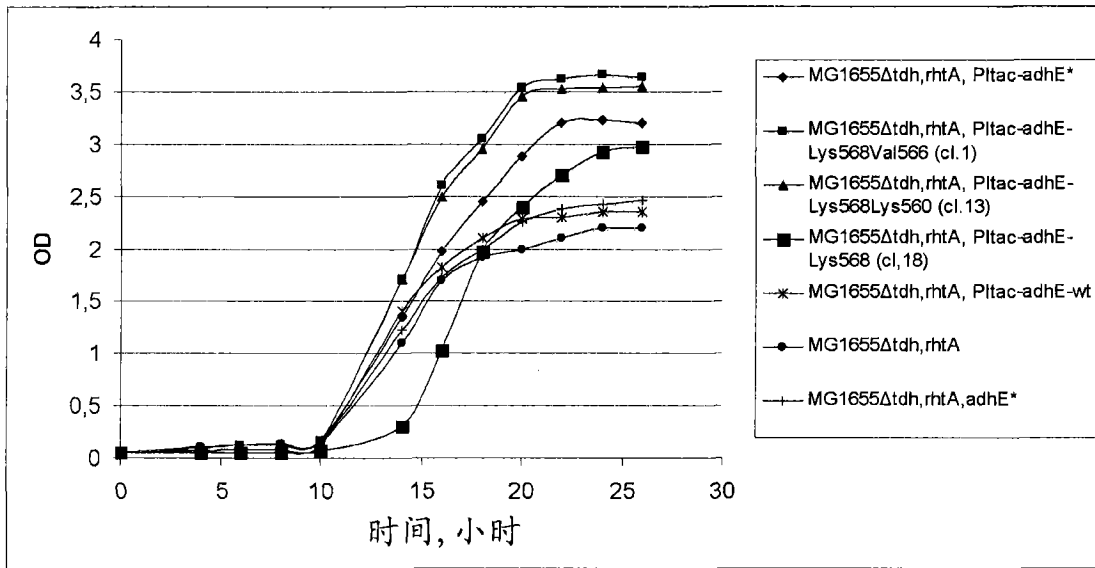


图4

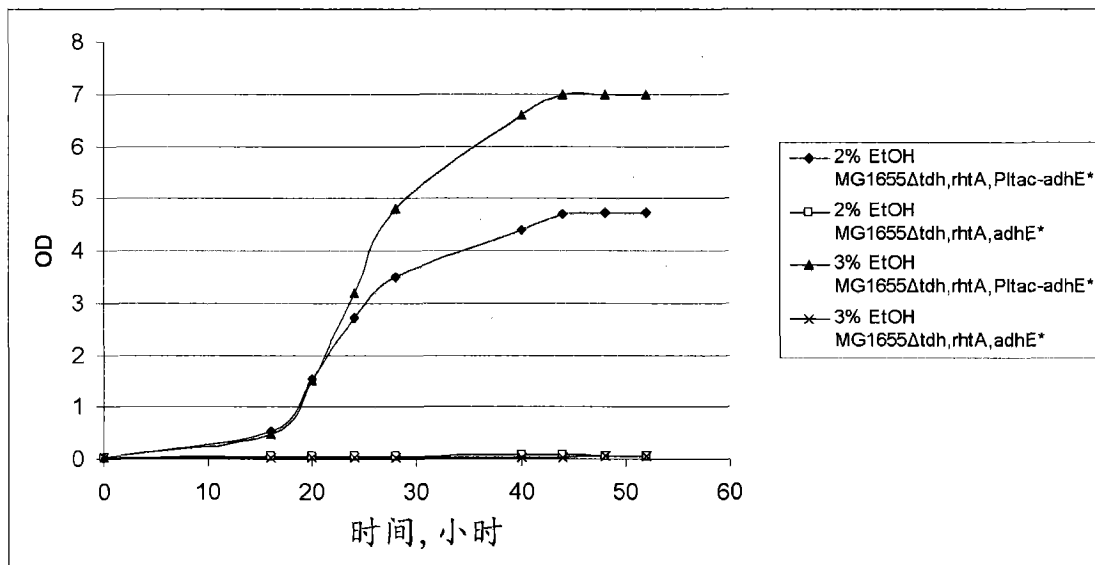


图5