[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/77 (2006.01)
C07K 14/34 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580044422.8

[43] 公开日 2007 年 12 月 12 日

[11] 公开号 CN 101087883A

[22] 申请日 2005.12.21
[21] 申请号 200580044422.8
[30] 优先权
[32] 2004.12.22 [33] DE [31] 102004061846.1
[86] 国际申请 PCT/EP2005/013809 2005.12.21
[87] 国际公布 WO2006/069711 德 2006.7.6
[85] 进入国家阶段日期 2007.6.22
[71] 申请人 巴斯福股份公司
地址 德国路德维希港
[72] 发明人 S·哈夫纳 H·施罗德
O·策尔德尔 C·克洛普罗格
A·赫罗尔德

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 87 页 序列表 106 页
附图 1 页

[54] 发明名称

多启动子及其在基因表达中的用途

[57] 摘要

本发明涉及多启动子和包含其的表达单元；其在调节基因的转录和表达中的用途；包含这类多启动子或表达单元的表达盒；包含这样的表达盒的载体；包含这类载体和/或表达单元的遗传修饰的微生物；和通过培养所述遗传修饰的微生物制备生物合成产物的方法。

1. 包含多启动子的表达单元，其沿5'-3'方向包含下式I的序列构件：

$$5'\text{-}P_1\text{-}(\text{-}A_x\text{-}P_x\text{-})_n\text{-}A_y\text{-}P_y\text{-}3' \qquad (I)$$

其中

n为从0至10的整数，

A_x和A_y是相同或不同的，且为化学键或连接区核酸序列；

P_1、P_x和P_y编码相同或不同的启动子序列，其包含至少一个RNA聚合酶结合区；且至少P_y包含介导核糖体结合的3'-末端序列区。

2. 根据权利要求1的表达单元，其中P_1、P_x和P_y在每一情况下衍生自相同或不同的真核或原核生物或为人工启动子序列。

3. 根据权利要求2的表达单元，其中P_1、P_x和P_y在每一情况下衍生自35至500个核苷酸残基的连续序列，该序列位于生物基因组中蛋白质编码序列的5'上游。

4. 根据权利要求2或3的表达单元，其中该生物是棒杆菌。

5. 根据前述权利要求的任一项的表达单元，其中P_1、P_x和P_y彼此独立地选自生物中高丰度蛋白质编码序列的启动子序列。

6. 根据前述权利要求的任一项的表达单元，其中P_1、P_x和P_y彼此独立地选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。

7. 根据前述权利要求的任一项的表达单元，其中启动子选自强启动子、组成型启动子或可调节的启动子。

8. 表达盒，其沿5'-3'方向包括下式II的序列构件：

$$5'\text{-}P_1\text{-}(\text{-}A_x\text{-}P_x\text{-})_n\text{-}A_y\text{-}P_y\text{-}G\text{-}3' \qquad (II)$$

其中

n、A_x、A_y、P_1、P_x和P_y定义如上，且G为至少一个功能地连接于5'上游调节序列的编码核酸序列。

9. 根据权利要求8的表达盒，其中 G 选自

a) 编码生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸生物合成途径的蛋白质的核酸，

b) 编码核苷酸及核苷生物合成途径的蛋白质的核酸，

c) 编码有机酸生物合成途径的蛋白质的核酸，

d) 编码类脂及脂肪酸生物合成途径的蛋白质的核酸，

e) 编码二元醇生物合成途径的蛋白质的核酸，

f) 编码碳水化合物生物合成途径的蛋白质的核酸，

g) 编码芳香化合物生物合成途径的蛋白质的核酸，

h) 编码维生素生物合成途径的蛋白质的核酸，

i) 编码辅因子生物合成途径的蛋白质的核酸，和

j) 编码酶生物合成途径的蛋白质的核酸，

k) 编码中心代谢的蛋白质的核酸。

10. 根据权利要求9a)的表达盒，其中编码氨基酸生物合成途径的蛋白质的核酸选自天冬氨酸激酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、二氨基庚二酸脱氢酶、二氨基庚二酸脱羧酶、二氢吡啶二羧酸合成酶、二氢吡啶二羧酸还原酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、3-磷酸甘油酸激酶、丙酮酸羧化酶、丙糖磷酸异构酶、转录调节物 LuxR、转录调节物 LysR1、转录调节物 LysR2、苹果酸-醌氧化还原酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡糖酸脱氢酶、转酮酶、转醛酶、高丝氨酸 O-乙酰转移酶、胱硫醚γ合酶、胱硫醚β裂合酶、丝氨酸羟甲基转移酶、O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶、亚甲基四氢叶酸还原酶、磷酸丝氨酸氨基转移酶、磷酸丝氨酸磷酸酶、丝氨酸乙酰转移酶、高丝氨酸脱氢酶、高丝氨酸激酶、苏氨酸合酶、苏氨酸输出子载体、苏氨酸脱水酶、丙酮酸氧化酶、赖氨酸输出子、生物素连接酶、半胱氨酸合酶 I、半胱氨酸合酶 II、辅酶 B12依赖型甲硫氨酸合酶、非辅酶 B12依赖型甲硫氨酸合酶、硫酸腺苷酰转移酶亚基1和2、磷酸腺苷磷酰硫酸还原酶、铁氧还蛋白亚硫酸盐还原酶、铁氧还蛋白 NADP 还原酶、3-磷酸甘油酸脱氢酶、RXA00655调节物、RXN2910调节物、精氨酰-tRNA 合成酶、磷酸

烯醇丙酮酸羧化酶、苏氨酸排出蛋白、丝氨酸羟甲基转移酶、果糖-1,6-二磷酸酶、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA077、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA248、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA247、蛋白质 OpcA、1-磷酸果糖激酶、6-磷酸果糖激酶、四氢吡啶羧酸琥珀酰酶、琥珀酰氨基酮庚二酸氨基转移酶、琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶、二氨基庚二酸差向异构酶、6-磷酸葡糖酸脱氢酶、葡萄糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇化酶、丙酮酸激酶、天冬氨酸转氨酶和苹果酸酶。

11. 包含至少一个根据权利要求8至10的任一项的表达盒的载体。

12. 遗传修饰的微生物，其经由至少一个根据权利要求11的载体转化，或包含至少一个根据权利要求8至10的任一项的表达盒。

13. 根据权利要求12的遗传修饰的微生物，其衍生自棒杆菌。

14. 根据权利要求13的遗传修饰的微生物，其衍生自棒杆菌属或短杆菌属的细菌。

15. 根据权利要求12至14的任一项的遗传修饰的微生物，其包含至少一个处于整合形式的表达盒。

16. 制备生物合成产物的方法，其包括培养根据权利要求12至15的任一项的遗传修饰的微生物和从培养物分离目的产物。

17. 根据权利要求16的方法，其中该生物合成产物选自有机酸、蛋白质、核苷酸及核苷、生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸、类脂及脂肪酸、二元醇、碳水化合物、芳香化合物、维生素及辅因子、酶及蛋白质。

18. 根据权利要求1至7的任一项的表达单元在调节产物生物合成中的用途。

多启动子及其在基因表达中的用途

技术领域

本发明涉及多启动子和包含其的表达单元；其在调节基因转录和表达中的用途；包含这类多启动子或表达单元的表达盒；包含这样的表达盒的载体；包含这类载体和/或表达盒的遗传修饰的微生物；以及通过培养所述遗传修饰的微生物制备生物合成产物的方法。

背景技术

多种生物合成产物是在细胞中通过天然代谢方法产生，并用于包括食品原料、化妆品、饲料、食品及医药的许多工业领域中。这些物质统称为精细化学品/蛋白质，其尤其包含有机酸、生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸(proteinogenic and non-proteinogenic amino acid)、核苷酸及核苷、类脂及脂肪酸、二元醇、碳水化合物、芳香化合物、维生素及辅因子以及蛋白质和酶。在各种情况下通过培养为了产生和分泌大量目的物质而开发出的细菌菌株，非常方便地大规模生产这些物质。特别适于这一目的的生物为棒杆菌(coryneform bacteria)，其为革兰氏阳性非病原菌。

已知可以通过棒杆菌菌株的发酵，尤其是谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)菌株的发酵来制备氨基酸。由于其重要性，在其生产方法的改良上进行了不懈的努力。该方法改良可与以下事宜相关：发酵技术的手段，例如搅拌与供氧；或营养培养基的组成，例如发酵中的糖浓度；或用于获得产物的处理，例如通过离子交换层析或喷雾干燥；或微生物自身的内在性能特性。

通过扩增个别基因并研究其对精细化学品/蛋白质的生产的作用，重组DNA技术已在产生精细化学品/蛋白质的棒杆菌菌株的改良中应用多年。

用于发展生产精细化学品或蛋白质的方法，或用于增加或提高已存在方法的生产率的其它方式包括增加或改变一种或多种基因的表达，和/或通过适合的多核苷酸序列影响mRNA的翻译。就此而言，影响可包括基因表达的增加、减少或其它因素，例如与时间相关的表达模式。

本领域的技术人员已知细菌调节序列的多种组分。对于以下结合位点已作出了区分：调节物结合位点，也称为操纵基因；RNA聚合酶全酶结合位点，也称为-35与-10区以及核糖体16S RNA结合位点，也称为核糖体结合位点或另称为Shine-Dalgarno序列。

如文献(E. coli 和 S. typhimurium, Neidhardt F. C. 1995 ASM Press)所述，Shine-Dalgarno 序列的多核苷酸序列的组成和碱基序列串以及存在于Shine-Dalgarno序列中的多核苷酸序列与起始密码子的距离均对翻译起始速率具有显著影响。

具有启动子活性的核酸序列可以多种方式影响 mRNA 的形成。其活性不依赖于生物的生理生长期的启动子称为组成型。其它启动子响应外部的化学及物理刺激，例如氧、代谢物、热、pH 等。其它启动子显示出其活性在不同生长期的强依赖性。例如，文献中描述的在微生物的指数生长期或恰好在微生物生长的稳定期中显示特别显著活性的启动子的实例。根据代谢途径，启动子的两种特征可对精细化学品及蛋白质的生产率具有有益的作用。

已经可以从棒杆菌物种分离出那些用于增强或减弱基因表达的核苷酸序列。由于细胞内部和/或外部条件的作用，这些受调节的启动子可提高或降低基因转录的速率。在某些情况下，称为诱导物的特定因子的存在可刺激从启动子的转录速率。诱导物可直接或间接影响从启动子的转录。称为抑制物的另一类因子能够降低或抑制从启动子的转录。类似于诱导物，抑制物也可直接或间接地起作用。而热调节的启动子也是已知的。因此，例如，可通过将生长温度增至高于细胞的正常生长温度来增强或减弱这类启动子的转录水平。

至今已描述了少量源自谷氨酸棒杆菌的启动子。DE-A-44 40118 中描

述了源自谷氨酸棒杆菌的苹果酸合酶基因的启动子。该启动子被插入到编码蛋白质的结构基因的上游。将这种构建体转化进入棒杆菌之后，该启动子下游结构基因的表达受到调节。一旦在培养基中添加相应的诱导物，就诱导结构基因的表达。

Reinscheid 等人在 Microbiology 145:503 (1999)中描述了源自谷氨酸棒杆菌的 pta-ack 启动子与报道基因(氯霉素乙酰转移酶)之间的转录融合作用。包含这种转录融合作用的谷氨酸棒杆菌细胞在含有乙酸的培养基上生长时，呈现报道基因的增强表达。与此相比，在葡萄糖上生长的转化细胞未显示所述报道基因的增强表达。

Patek 等人在 Microbiology 142:1297 (1996)中描述了能够增强报道基因在谷氨酸棒杆菌细胞中表达的某些源自谷氨酸棒杆菌的 DNA 序列。将这些序列在一起进行比较以便确定谷氨酸棒杆菌启动子的共有序列。

专利 WO 02/40679 中已经描述了可用于调节基因表达的其它源自谷氨酸棒杆菌的 DNA 序列。这些分离的多核苷酸为可用于增加或降低基因表达的源自谷氨酸棒杆菌的表达单元。该公布的专利还描述了重组质粒，在这些重组质粒上源自谷氨酸棒杆菌的所述表达单元与异源基因连接在一起。本文所描述的将源自谷氨酸棒杆菌的启动子与异源基因融合的方法，尤其可用于调节氨基酸生物合成的基因。

更早的、先前未公布的专利申请 DE-A-103 59 594、DE-A-103 59 595、DE-A-103 59 660 和 DE-A-10 2004 035 065 公开了源自谷氨酸棒杆菌的特异性单启动子。

发明简述

本发明基于提供更多调节性核酸序列的目标，特别是具有有利特性大的启动子构建体和/或表达单元，例如与最初启动子相比，增加的或改变的转录活性和/或翻译活性。

本发明的目标通过提供包含多启动子的表达单元而实现，其沿 5'-3' 方向包含下式 I 的序列构件:

$$5'\text{-}P_1\text{-}(\text{-}A_x\text{-}P_x\text{-})_n\text{-}A_y\text{-}P_y\text{-}3' \qquad (I)$$

其中

n 为从 0 至 10 的整数，

A_x 和 A_y 是相同或不同的，并且为化学键或连接区核酸序列；

P_1、P_x 和 P_y 编码相同或不同的启动子序列，其包含至少一个 RNA 聚合酶结合区，例如核心区；并且至少 P_y 包含一个介导核糖体结合的 3'-末端序列区。P_1 和个别的或所有的 P_x 还可彼此独立地具有介导核糖体结合的这类序列区。

根据一个实施方案，P_1、P_x 和 P_y 衍生自相同或不同的真核或(特别是)原核生物。也可以使用人工启动子。

根据优选的实施方案，P_1、P_x 和 P_y 在各种情况下从 35 至 500 核苷酸残基，优选 35 至 300 核苷酸残基，更优选 35 至 210 核苷酸残基并且特别优选 35 至 100 核苷酸残基的连续序列衍生，该序列位于蛋白质的编码序列的 5' 上游，例如在所述生物基因组中涉及该生物的生物合成途径的蛋白质。

根据另一实施方案，表达单元的 P_1、P_x 和 P_y 衍生自谷氨酸棒杆菌。

根据优选的实施方案，表达单元的 P_1、P_x 和 P_y 彼此独立地选自在真核或原核生物，特别是在棒状杆菌(例如在棒杆菌属或短杆菌属之一，例如表 3 所列物种或菌株中)具有高丰度的蛋白质编码序列的启动子序列。

此外，可以从表 1 所列蛋白质的编码序列的启动子序列中选择单个或所有的这些启动子序列，并且其涉及生物的氨基酸生物合成。然而，就此而言，本发明表达单元的至少一个启动子应该具有如本文所定义的高丰度。

根据本发明的另一优选实施方案，表达单元的 P_1、P_x 和 P_y 是彼此独立地选自图 1 所述核苷酸序列，或衍生自 SEQ ID NO:1 (pGRO)、SEQ ID NO:2 (pEFTs)、SEQ ID NO:3 (pEFTu)和 SEQ ID NO:4 (pSOD) (将在后对其具体解释)。

根据本发明的另一优选实施方案，表达单元的 P_1、P_x 和 P_y 彼此独立地选自强启动子、组成型启动子或可调节的启动子。

在另一方面，本发明涉及表达盒，其沿 5'-3'的方向包含下式 II 的序列构件：

$$5'\text{-}P_1\text{-}(\text{-}A_x\text{-}P_x\text{-})_n\text{-}A_y\text{-}P_y\text{-}G\text{-}3' \qquad (II)$$

其中

n、A_x、A_y、P_1、P_x 和 P_y 如上定义，并且

G 为至少一个编码核酸序列，其功能地或有效地连接于 5'上游调节序列。

根据表达盒优选的实施方案，G 选自

a) 编码生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸生物合成途径蛋白质的核酸，

b) 编码核苷酸及核苷生物合成途径蛋白质的核酸，

c) 编码有机酸生物合成途径蛋白质的核酸，

d) 编码类脂及脂肪酸生物合成途径蛋白质的核酸，

e) 编码二元醇生物合成途径蛋白质的核酸，

f) 编码碳水化合物生物合成途径蛋白质的核酸，

g) 编码芳香化合物生物合成途径蛋白质的核酸，

h) 编码维生素生物合成途径蛋白质的核酸，

i) 编码辅因子生物合成途径蛋白质的核酸，

j) 编码酶生物合成途径蛋白质的核酸，和

k) 编码中心代谢蛋白质的核酸。

根据表达盒的特别优选的实施方案，G 选自氨基酸生物合成途径的蛋白质的编码核酸，所述氨基酸生物合成途径的蛋白质选自：天冬氨酸激酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、二氨基庚二酸脱氢酶、二氨基庚二酸脱羧酶、二氢吡啶二羧酸(dihydrodipicolinate)合成酶、二氢吡啶二羧酸还原酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、3-磷酸甘油酸激酶、丙酮酸羧化酶、丙糖磷酸异构酶、转录调节物 LuxR、转录调节物 LysR1、转录调节物 LysR2、苹果酸-醌氧化还原酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡糖酸脱氢酶、转酮酶、转醛酶、高丝氨酸 O-乙酰转移酶、胱硫醚 γ 合酶、胱硫醚 β 裂合酶、丝氨酸羟甲基

转移酶、O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶、亚甲基四氢叶酸还原酶、磷酸丝氨酸氨基转移酶、磷酸丝氨酸磷酸酶、丝氨酸乙酰转移酶、高丝氨酸脱氢酶、高丝氨酸激酶、苏氨酸合酶、苏氨酸输出子载体(exporter carrier)、苏氨酸脱水酶、丙酮酸氧化酶、赖氨酸输出子、生物素连接酶、半胱氨酸合酶 I、半胱氨酸合酶 II、辅酶 B12 依赖型甲硫氨酸合酶、非辅酶 B12 依赖型甲硫氨酸合酶、硫酸腺苷酰转移酶亚基 1 和 2、磷酸腺苷磷酰硫酸还原酶、铁氧还蛋白亚硫酸盐还原酶、铁氧还蛋白 NADP 还原酶、3-磷酸甘油酸脱氢酶、RXA00655 调节物、RXN2910 调节物、精氨酰-tRNA 合成酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、苏氨酸排出蛋白(efflux protein)、丝氨酸羟甲基转移酶、果糖-1,6-二磷酸酶、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA077、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA248、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA247、蛋白质 OpcA、1-磷酸果糖激酶及 6-磷酸果糖激酶、四氢吡啶羧酸(tetrahydropicolinate)琥珀酰酶、琥珀酰氨基酮庚二酸氨基转移酶、琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶、二氨基庚二酸差向异构酶、6-磷酸葡糖酸脱氢酶、葡萄糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇化酶、丙酮酸激酶、天冬氨酸转氨酶、苹果酸酶。

另一方面，本发明涉及包含至少一个上述表达盒的载体。

另一方面，本发明涉及用至少一个上述载体转化的遗传修饰的微生物或包含至少一个上述表达盒的载体(优选处于整合形式)的遗传修饰的微生物。

根据一个实施方案，遗传修饰的生物来自谷氨酸棒杆菌。

根据优选的实施方案，遗传修饰的生物来自棒杆菌属或短杆菌属的细菌。

另一方面，本发明涉及制备生物合成产品的方法，其包括培养任何上述遗传修饰的微生物和从培养物分离目的产物。

根据该方法的一个实施方案，该生物合成产物选自有机酸、蛋白质、核苷酸及核苷、生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸、类脂及脂肪酸、二元醇、碳水化合物、芳香化合物、维生素及辅因子、酶及蛋白质。特别优选的生

物合成产物是赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸和海藻糖。

另一方面，本发明涉及本发明的表达单元在调节产物生物合成中的用途。

附图说明

图 1：描述了四个启动子的特异性序列，其用于制备在示例的实施方案中所述的多启动子。显示了如下启动子的序列：pEFTu (图 1A)、pGRO (图 1B)、pEFTs (图 1C)和 pSOD (图 1D)。每种启动子显示两条序列，其中更长的(上面的序列)表示包括核糖体结合位点(RBS)的全长启动子序列，以粗斜体打印。在本发明的多启动子构建体中特定启动子的 3'末端排列情况下，给出在每一情况下使用较长核苷酸序列(包括 RBS)的参考。3'末端启动子单元的 5'上游启动子序列不包含任何 RBS 并且被用于在每一情况第二位置所示的截短的核酸序列(无 RBS)。较短的启动子序列还可以缺少(如果适当)以大写字母和粗体显示的 3'末端的部分序列。可能的“－10 区”加下划线。

发明详述

I. 通用定义：

“生物合成产物”意指为本发明的目的，在细胞中经由天然代谢过程(生物合成途径)产生的那些产物。它们被用于多种不同方面，特别是食品原料、化妆品、饲料、食物和药品工业。这些物质被总称为精细化学品/蛋白质，其特别包括有机酸、生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸、核苷酸及核苷、类脂及脂肪酸、二元醇、碳水化合物、芳香化合物、维生素及辅因子、以及蛋白质和酶。

“启动子”、“带有启动子活性的核酸”或“启动子序列”意指根据本发明的核酸，其功能地连接于待转录的核酸并且其调节所述核酸的转录。

除非清楚地指明“单个启动子”，根据本发明并且依赖于本文，术语“启动子”还包括超过一条核酸序列的顺序安排(即“多启动子”)，其每一序

列当被功能地连接于待转录的核酸时，将能够调节后者的转录。

术语“单个启动子”相应地指单独的核酸序列，其能够调节待转录核酸的转录并且当将其功能地连接于待转录核酸时，能够调节后者的转录。

对于“多启动子”的情况，至少将两条相同或不同的核酸序列(其中每条当将其功能地连接于待转录的核酸时，能够调节后者的转录) (单个启动子)以这样的方式顺序连接，即从任选地所述核酸序列之一起始转录可以产生含有所述待转录核酸的转录物。就此而言，在每种情况下可以将更多的无启动子功能的序列(例如具有例如一个或多个限制性切割位点的接头)插入两个单个启动子之间。任选地，在每种情况下两个单个启动子还可以直接地彼此相连。所述多启动子优选仅含有一个核糖体结合位点(RBS)，特别在启动子的3’末端区。

“高丰度”蛋白质编码序列的启动子序列具体而言意指“强启动子”。如果打算使用多启动子增强基因，给出了以合适的方式组合这类强启动子的参考。强启动子调节基因的转录使后者比生物的大多数基因更频繁地被RNA聚合酶读取。在多数情况下，强启动子的存在使细胞中也存在大量的转录物。当所述转录物的百分数相对高于其它细胞转录物时，称其为“高丰度转录物”。在细菌中，转录物的量和编码的相应蛋白质量因而通常相关联，即在大部分时间“高丰度转录物”也产生“高丰度蛋白质”。以下，通过实例对能够经由蛋白质丰度鉴定“强启动子”的方法进行描述。方法操作的细节和更多的参考可以在例如Proteomics in Practice – A Laboratory Manual of Proteome Analysis (作者：R. Westermeier、T. Naven；出版商：Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002)中找到。破坏细菌细胞并通过2D凝胶电泳对细胞提取物的蛋白质分级。接着通过普通方法例如考马斯、银或荧光染料染色法对蛋白质染色。这里要避免蛋白质的过染，从而在其后能够量化单个的蛋白质点。随后扫描凝胶并在合适软件(如 Melanie, Amersham Biosciences)的辅助下分析获得的图像。为此，首先鉴定全部可检测的点并确定该点体积。在初步估计中，所有点体积的总和对应于总蛋白质。接着可以在图像分析软件的辅助下选出具有特别大的点体积的点。例如，体积

占据超过总的点体积 0.1％的点可以被称为高丰度的。随即从凝胶切出含有显著高丰度蛋白质的点。通常随即对存在于凝胶切片中的蛋白质蛋白水解消化(例如使用胰蛋白酶)并且在例如 MALDI-ToF MS (Matrix assisted laser desorption ionization - Time of Flight Mass Spectrometry)的辅助下确定产生肽的摩尔质量。基于蛋白质的一些胰蛋白酶消化肽段的摩尔质量，可以随后在数据库搜索中鉴定相应的蛋白质。这特别是在如果待研究生物的基因组已被测序(例如谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌和许多其它细菌)时是可能的。基于所述蛋白质的鉴定可以接着确定编码所述蛋白质的 ORF (开放阅读框)。在细菌中，调节所述基因的启动子通常紧接起始密码子的上游。因此，“强”启动子通常还存在于“高丰度”蛋白质的起始密码子上游约 200 核苷酸的区域。

出于本发明目的，“人工”启动子具体包括在原位没有转录活性而在另一序列环境中(例如，具体而言在本发明的表达单元或表达盒的环境中) 具有转录活性的那些序列。

根据本发明，“启动子活性”意指由启动子在特定时间形成的 RNA 量，即转录速率。

根据本发明，“特异性”启动子活性意指对于每种启动子，由启动子在特定时间形成的 RNA 量。

对于(与野生型相比)基因的“受影响的”启动子活性或转录速率，从而，与野生型相比，影响在野生型的这一形式中不存在的 RNA 的形成。

对于(与野生型相比)基因的“改变”的启动子活性或转录速率，从而，与野生型相比，在特定时间形成的 RNA 量被改变。

在这一点上，“改变”优选意指增加或减少。

在这一点上，“功能的”或“有效的”连接意指，例如任何具有启动子活性的本发明的核酸和待转录的核酸序列以及(如果合适的)更多的调节元件(诸如，例如确保核酸转录的核酸序列，以及例如终止子)的顺序安排，从而使每一所述调节元件能够完成其在所述核酸序列转录中的功能。这并不必需化学意义上的直接连接。遗传控制序列，例如增强子序列也可以从

更远的位置或甚至从其它 DNA 分子行使其对靶标序列的功能。给出参考的安排，其中待转录的核酸序列位于本发明的启动子序列之后(即，在其 3' 末端)，使两条序列彼此共价地连接。在本文中，启动子序列和要转基因表达的核酸序列之间的距离优选少于 200 碱基对，特别优选少于 100 碱基对，尤其特别优选少于 50 碱基对。

本发明的“核糖体的结合位点”或“核糖体结合位点”(RBS)的序列(或称为 Shine-Dalgarno 序列)意指富含 A/G 的多核苷酸序列，其位于翻译起始密码子上游多至 30 碱基处。

根据本发明，“转录”意指从 DNA 模板开始，产生互补 RNA 分子的过程。这一过程涉及蛋白质，例如 RNA 聚合酶、“σ因子”和转录调节蛋白。合成的 RNA 接着用作翻译过程中的模板，其随后产生生物合成的有活性蛋白质。

根据本发明，启动子的“核心区”意指从约 20 至 80，或 30 至 60 核苷酸的连续核酸序列，其包含至少一个可能的“－10 区”。在本文中，对单个优选启动子序列的可能的－10 区的实例进行了描述；具体比较图 1。“－10 区”也称为 TATA 盒或 Pribnow-Schaller 序列。使用的每个启动子应该包含这些可能的－10 区(例如 1、2、3、4 或 5)的至少一个。核心区位于 RBS 的 5'上游并且可以是距离后者 1 至 200 或 10 至 150 或 20 至 100 个核苷酸残基。

根据本发明，“表达单元”意指具有表达活性的核酸，其包含如本文定义的多启动子，并且所述多启动子在功能的连接至待表达核酸或基因之后调节所述核酸或基因的表达(即转录和翻译)。在这一点，因此又称所述核酸序列为“调节的核酸序列”。除了多启动子构建体，可以存在其它调节元件，例如增强子。

根据本发明，“表达盒”意指功能地连接于待表达核酸或基因的表达单元。因此，与表达单元相比，表达盒不仅包含调节转录和翻译的核酸序列，还包含作为转录和翻译的结果被表达为蛋白质的核酸序列。

根据本发明，“表达活性”意指由表达盒或其表达单元在特定时间形成

的蛋白质量，即表达速率。

根据本发明，“特异性表达活性”意指对于每一表达单元，由表达盒或其表达单元在特定时间形成的蛋白质量。

对于(与野生型相比)基因的“受影响的”表达活性或表达速率，从而，与野生型相比，影响在野生型的这一形式中不存在的蛋白质的形成。

对于(与野生型相比)基因的“改变的”表达活性或表达速率，从而，与野生型相比，在特定时间形成的蛋白质的量被改变。在这一点上，“改变”优选意指增加或减少的改变。这可以例如通过增加或减少内源表达单元的比活性(例如通过突变或通过刺激或抑制)而发生。还可以例如通过本发明的表达单元调节微生物中基因(与表达单元异源的基因)的表达而获得改变的表达活性或表达速率。

“形成的速率”(生物合成的活性蛋白质以其产生)是转录和翻译速率的结果。根据本发明，两种速率皆可受到影响并因而影响在微生物中产物/精细化学品的形成的速率。

根据本发明，术语“野生型”意指合适的起始微生物并且无需对应于天然产生的生物。

由本发明的内容决定。术语“微生物”可以意指起始微生物(野生型)或本发明的遗传修饰的微生物或两者。

对于改变或影响启动子活性或转录速率、改变或影响表达活性或表达速率以及对于增加生物合成产物含量的每一情况下，且特别是在不可能清楚地指定微生物或野生型的情况下，“野生型”优选意指“参照生物”。在优选的实施方案中，该“参照生物”是谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 或通过特异性或非特异性突变从 ATCC 13032 衍生的微生物。

特别利用已经能够生产目的产物(精细化学品/蛋白质)的“起始微生物”。

根据本发明，如果不给出其它信息，“衍生的”序列(例如衍生的启动子序列)意指与起始序列具有至少 80% 或至少 90%，具体地 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和 99%同一性的序列。

两条核酸之间的“同一性”意指在每一情况下核酸全长范围核苷酸的同一性，具体地，在来自 Informax (USA)的 Vector NTI Suite 7.1 软件的辅助下使用聚类方法(Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1)通过比较计算同一性，设定参数如下：

多比对参数:	
空位开放罚分	10
空位延伸罚分	10
空位分离罚分范围	8
空位分离罚分	关闭
比对延迟同一性%(%identity for alignment delay)	40
残基特异性空位	关闭
亲水残基空位	关闭
转换权重(Transition weighing)	0

Pairwise 比对参数:	
FAST 算法	开
K 字大小(K-tuple size)	1
空位罚分	3
窗口大小	5
最佳对角线值	5

“杂交”意指在严格条件下多核苷酸或寡核苷酸结合至基本互补序列的能力，而在这样的条件下非互补的配偶体之间不形成非特异性结合。为此目的，该序列应该优选为 90-100%互补。可以将能够彼此特异性结合的互补序列的特性用于，例如 Northern 或 Southern 印迹技术或用于 PCR 或 RT-PCR 中的引物结合。

根据本发明，在严格条件下发生“杂交”。这种杂交条件在例如 Sambrook, J.、Fritsch, E.F.、Maniatis, T.在：分子克隆(A Laboratory

Manual)，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 9.31-9.57页，或在现代分子生物操作手册，John Wiley 和 Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中有描述。具体而言，严格的杂交条件意指：在 42℃于溶液中孵育过夜，该溶液组成为 50%甲酰胺、5 × SSC (750 mM NaCl、75 mM 柠檬酸三钠)、50 mM 磷酸钠(pH 7.6)、5 × Denhardt 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20 g/ml 变性、剪切的鲑精 DNA，继而在 65℃用 0.1 × SSC 洗滤膜。

“功能相当的片段”意指具有启动子活性片段的核酸序列，其与起始序列相比具有基本一致或改变的、更低或更高的特异性启动子活性。

“基本一致”意指特异性的启动子活性，其具有起始序列的特异性启动子活性的至少 50%例如，至少 60%、70%、80%、90%或至少 95%。

II. 表达单元、表达盒和其组分

a) 表达单元

本发明尤其涉及提供包含多启动子的表达单元，其包含沿 5'-3'方向的下式 I 的序列构件:

$$5'\text{-}P_1\text{-}(\text{-}A_x\text{-}P_x\text{-})_n\text{-}A_y\text{-}P_y\text{-}3'$$

其中

n 为从 0 至 10 的整数，例如 1、2、3、4、5 或 6;

A_x 和 A_y 相同或不同的并且是化学键(特别是共价键)，或化学地(特别是共价地)整合的接头核酸序列;

P_1、P_x 和 P_y 编码相同或不同的启动子序列，其包含至少一个 RNA 聚合酶结合区，例如核心区；和至少(例如仅 P_y)包含一个介导核糖体结合的 3'末端序列区。

启动子序列 P_1、P_x 和 P_y 可以来自生物的基因，其编码涉及所述生物的生物合成途径的蛋白质。这里的启动子序列位于所述生物基因组中特定蛋白质编码序列 5'上游的从 20 至 500 个核苷酸残基，或从 20 至 300 个核苷酸残基，例如从 20 至 210 个核苷酸残基，和特别是从 20 至 100 或 35 至 100 个核苷酸残基。

启动子序列 P_1、P_x和 P_y可以从其衍生的序列的实例是以下表 1 所列基因。

特定启动子序列的非限制性实例衍生自根据 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 以及图 1 的核酸序列，然而其并非意在限制。

就此而言，SEQ ID NO:1 对应位于 GroES 陪伴蛋白(pGRO)编码区上游的序列，SEQ ID NO:2 对应位于蛋白质延伸因子 TS (pEFTs)编码区上游的序列，SEQ ID NO:3 对应位于蛋白质延伸因子 TU (pEFTu)编码区上游的序列，和 SEQ ID NO:4 对应位于超氧化物歧化酶(pSOD)编码区上游的序列，每一种都来自谷氨酸棒杆菌。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 对应野生型的启动子序列。

根据本发明，“衍生的”序列意指与起始序列具有至少 80%或至少 90%，例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和特别是 99%同一性的序列。这一同一性程度具体用于以上定义的特定启动子的“核心区”。这里，特定核心区之外的同一性程度可以更低并且可以在从 0 至 80%，例如从 10 至 80%、20 至 70%、30 至 60%或 40 至 50%的范围中。

可用的核心区位于，例如

对于 pGRO 在从 SEQ ID NO:1 的位置 50 至 80 的范围;

对于 pEFTs 在从 SEQ ID NO:2 的位置 130 至 170 的范围;

对于 pEFTu 在从 SEQ ID NO:3 的位置 30 至 110 的范围;

对于 pSOD 在从 SEQ ID NO:4 的位置 50 至 100 的范围。

本发明的表达单元具体含有两个或多个的具有启动子活性的核酸序列，

a) 优选衍生自相同或不同的序列，所述序列选自 SEQ. ID. NO. 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4; 或其它具有相当或更高丰度基因的启动子序列;

b)具有(如果适当的)一个或多个通过对所述序列进行核苷酸的取代、插入、倒置或缺失或添加而衍生的序列，该序列(特别是在核心区)与优选

选自序列 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 的序列或具有相当或更高丰度基因的其它启动子序列在核酸水平上具有至少 80％的同一性，

c)或具有(如果适当的)代表在严格条件下与另一序列杂交的一个或多个的这些核酸序列，所述另一序列与 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 的序列之一和/或与具有相当或更高丰度基因的其它启动子序列互补，

d)或具有(如果适当的)一个或多个的核酸序列，其代表 a)、b)或 c)中序列的“功能相当的片段”。

通过将来自数据库的核酸序列与上述 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 的序列或根据图 1 的序列或其它具有相当或更高丰度基因的启动子序列比较同一性，可以(例如从多种基因组序列已知的生物中)容易地鉴定可用作本发明的多启动子组分的其它天然启动子。

通过以本身已知的方式应用杂交技术，从上述核酸序列开始，特别是从 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 序列和/或从具有相当或更高丰度基因的启动子序列开始，可以从多种基因组序列未知的生物中容易地鉴定更多适合的天然启动子。

还可以通过技术人员已知的方法分离更多适合的天然启动子，如，例如在 Cadenas 等人(1991) Gene 98, 117-121; Eikmanns 等人(1991) Gene 102, 93-98.; Patek 等人(1996) Microbiology 142, 1297-1309 或 Santamaria 等人(1987) Gene 56, 199-208 所述。这通常涉及使用其中插入了所研究基因组的基因组片段的“启动子探针”载体。接着，可以在提到的实验装置中通过测量下游报告基因(例如氯霉素乙酰转移酶)的活性测定单个片段的启动子活性。

因此，本发明还包括本文未列举名称的那些启动子的组合。这也应用于，例如在 Patek 等人(2003). J of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova 等人(1999) J. Bacteriol 181, 6188—6191)所述，已知的单个启动子的组合。

因此本发明还涉及用于参入本发明含有多启动子表达单元的具有启动子活性的核酸，其含有能够与 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 的核酸序列或者与具有相当或更高丰度基因的启动子序列在严格条件下杂交的核酸序列。

这一核酸序列包含至少 10 个，优选超过 12、15、30、50 或超过 150 个核苷酸。

可以从序列 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 或根据图 1 和/或具有相当或更高丰度基因的启动子序列开始，通过人工变异和突变，例如通过添加、取代、插入、倒置或缺失一个或多个单独或连续的核苷酸残基，容易地制备人工启动子序列，用于参入本发明的包含多启动子的表达单元(Patek 等人(2003). J of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova 等人(1999) J. bacteriol 181, 6188—6191 和文中提到的参考文献)。

启动子序列 P_y 的介导核糖体结合的 3'末端序列区合适的实例是 pGRO 的 RBS: GGAGGGA; pEFTs 的 RBS: AGGAGGA; pEFTu 的 RBS: AGGAGGA 以及 pSOD 的 RBS: GGAGGGA (也参见附图 1)。理论上最佳 RBS，即与谷氨酸棒杆菌 16S rRNA 的抗-Shine-Dalgarno 序列 100%互补的序列为: 5' GAAAGGAGG 3'。例如通过人工变异和突变，例如通过核苷酸的取代、插入、倒置、添加或缺失，或经由与数据库中启动子序列的同源性比对，可以容易地鉴定其它合适的 RBS 序列区。

本发明的包含多启动子表达单元的非限制性实例选自:

e)序列，其编码

PeftuPsod，来自 SEQ ID NO: 45 中位置 18 至 390;

PsodPeftu，来自 SEQ ID NO: 52 中位置 18 至 395;

PgroPsod，来自 SEQ ID NO: 55 中位置 18 至 369;

PgroPsodPefts，来自 SEQ ID NO: 59 中位置 11 至 538;

PeftuPsodPefts，来自 SEQ ID NO: 60 中位置 11 至 559;

或

f)通过核苷酸的取代、插入、倒置、添加或缺失从根据 e)的序列衍生而来的序列，并且其与所述起始序列相比在核酸水平具有至少 80%或至少 90%的同一性; 或

g)在严格条件下与 e)的互补序列杂交的核酸序列; 或

h)上述序列 e)、f)和 g)的“功能相当的片段”。

根据实施方案 d)和 h)，具体而言，“功能相当的片段”意指对于表达单元具有如/比起始序列基本相同或更高的特异性表达活性的片段。

“基本一致”意指特异性的表达活性，其具有起始序列的特异性表达活性的至少 50%，优选 60%，更优选 70%，更优选 80%，更优选 90%，特别优选 95%。

“片段”意指由实施方案 a)至 h)所述序列的部分序列。所述片段优选具有超过 10，但是更优选超过 12、15、30、50 个，或特别优选超过 150 个起始序列的连续核苷酸。

本发明的表达单元可以优选包含一个或多个下列遗传元件：－10 区、转录起始、增强子区和操纵基因区。

这些遗传元件优选是棒杆菌物种，特别是谷氨酸棒杆菌特异性的。

细菌启动子通常由三个 RNA 聚合酶识别位点组成，即－10 区、－35 区和 UP 元件。这些启动子元件在大肠杆菌中高度保守，但在谷氨酸棒杆菌中不是。对于－35 区尤其如此。因此，后者通常可以仅仅从整体可信度不高的序列衍生。与包含了富含 AT 基因组的生物相比，－10 区也具有较低的高度保守性。在这里，先前所述的共有序列为 TGNGNTA(C/T)AATGG 和 GNTANAATNG (Patek 等人(2003), J. of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova 等人(1999) J. Bacteriol 181, 6188—6191)。

众所周知的是，在具有中等或高 GC 含量的细菌(例如，谷氨酸棒杆菌)的共有序列中通常出现高变异性(Bourn 和 Babb, 1995, Bashyam 等人, 1996)。这特别适用于－35 区，因此其经常无法预测。这在例如 Patek 等人(2003). J of Biotechnology 104, 325-334 中有描述。

b)表达盒

本发明还涉及本发明的含有多启动子的表达单元，其功能的连接于可翻译的核酸序列。出于本发明的目的，这些能够表达基因的构建体也被称为表达盒。

就此而言，“功能的连接”意指，例如任何本发明的表达单元和要转基因表达的核酸序列、以及(如果合适)更多的调节元件(例如终止子)的顺序安

排，从而使每一所述调节元件能够完成其在所述核酸序列的转基因表达中的功能。这并不必需化学意义上的直接连接。遗传控制序列，例如增强子序列还可以从更远的位置或甚至从其它 DNA 分子行使其对靶标序列的功能。给出参考的安排，其中要转基因表达的核酸序列位于本发明的表达单元序列之后(即，在 3'末端)，从而使两条序列彼此共价地连接。在本文中，表达单元序列与待转基因表达的核酸序列之间的距离优选少于 200 碱基对，特别优选少于 100 碱基对，最优选少于 50 碱基对。

本发明的包含多启动子的表达盒使能够获得与原始表达活性不同的表达活性，并因此能够精细调节目的基因的表达。

通过本发明的表达单元对微生物中基因表达的调节优选通过以下实现:

- 向微生物的基因组引入一个或多个本发明的表达单元(如果合适，其具有改变的特异性表达活性)，从而在引入的本发明的表达单元控制下表达一个或多个内源基因；或

- 向微生物引入一个或多个核酸构建体，即表达盒，其包含本发明的表达单元(如果合适，具有改变的特异性表达活性)和功能地连接的一个或多个要表达的核酸。

在本发明的表达盒中，选择与要表达基因相关的表达单元的物理位置，从而使所述表达单元调节要表达基因的转录(优选还有翻译)并且因而能够形成一个或多个蛋白质。在这里，“使能够形成”包括组成型地增加所述形成、在特异条件下减弱或阻断所述形成和/或在特异条件下增加所述形成。在这里，“条件”包括: (1)向培养基加入组分，(2)从培养基移去组分，(3)用第二种组分代替培养基中的一组分，(4)增加培养基的温度，(5)降低培养基的温度，和(6)调节在其中维持培养基的大气条件，例如氧浓度或氮浓度。

c)通用信息

还可以通过本身已知的化学合成方式(例如通过双螺旋的各个重叠互补核酸构件的片段缩合)从核苷酸构件制备上述所有具有启动子活性的核酸和表达单元以及表达盒。例如，可以使用本身已知的 phosphoamidite 方

法(Voet, Voet, 第二版, Wiley Press New York, 896-897 页)进行寡核苷酸的化学合成。合成的寡核苷酸汇编和在 DNA 聚合酶的 Klenow 片段帮助下的空位补平以及连接反应还有通常的克隆操作描述于 Sambrook 等人(1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

本发明使用的方法和技术对于在微生物和重组 DNA 技术领域受到训练的技术人员是公知的。这样的技术和方法的实例是生长细菌细胞、将分离的 DNA 分子转运至宿主细胞以及分离、克隆以及测序分离的核酸分子等等方法和技术。这些方法在多项标准文献中有描述: Davis 等人, Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer 和 P. Berg, Genes & Genomes, University Science Books, Mill Valley, California (1991); J. Sambrook、E.F. Fritsch 和 T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann 等人, Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick 和 J.E. Thompson 编辑, CRC Press, Boca Raton, Florida (1993);还有 P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, The Guilford Press, New York, NY (1989)。

本发明的全部核酸分子优选为分离的核酸分子形式。将“分离的”核酸分子从所述核酸的天然来源中存在的其它核酸分子中移出，并且可能必需另外的除去其它细胞材料或培养基(如果通过重组技术制备)，或除去化学前体或其它化学制剂(如果化学合成)。

本发明还包括与明确描述的核苷酸序列或其片段互补的核酸分子。

也能够从本发明的核苷酸序列产生用于在其它细胞类型和微生物中鉴

定和/或克隆同源序列的探针和引物。这一类的探针和引物通常包括核苷酸序列区，其在严格条件下杂交于本发明核酸序列的正义链或相应的反义链的至少约 12 个，优选至少约 25 个，例如约 40、50 或 75 个连续核苷酸。

本发明还包括这样的核酸序列(其包含“沉默突变”或与明确提到的序列相比，其特定来源或宿主生物的密码子使用发生改变)，以及天然发生的变体(例如其剪接变体或等位变体)。

III. 表达载体

本发明还涉及包含上述本发明的表达盒的表达载体。

载体对于技术人员是众所周知的，并且可以在例如“克隆载体”(Pouwels P. H.等人，编辑, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985)中找到。除了质粒之外，载体还意指技术人员已知的任何其它载体，例如噬菌体、转座子、IS 元件、质粒、黏粒和线形或环形 DNA。所述载体可以在宿主生物中自动复制或可以染色体地复制。

特别优选那些在棒杆菌中复制的质粒。许多已知的质粒载体，例如 pZ1 (Menkel 等人，Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554)、pEKEx1 (Eikmanns 等人, Gene 102: 93-98 (1991))或 pHS2-1 (Sonnen 等人, Gene 107: 69-74 (1991))是基于隐蔽性质粒 pHM1519、pBL1 或 pGA1。同样可以使用其它质粒载体，例如 pCLiK5MCS (见实施例 1)或基于 pCG4 (US-A 4,489,160)或 pNG2 (Serwold-Davis 等人，FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990))或 pAG1 (US-A 5,158,891)的那些质粒载体。

另外适用的还有那些质粒载体，在其帮助下可以通过整合进入染色体进行基因扩增过程，例如由 Remscheid 等人(Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994))所述的对 hom-thrB 操纵子的复制和扩增。在这一方法中，将完整的基因克隆在可以在宿主(通常为大肠杆菌)中复制而不能在谷氨酸棒杆菌中复制的质粒载体。合适的载体的实例是 pSUP301 (Sirnon 等人, Bio/ Technology 1, 784-791 (1983))、pK18mob 或 pK19mob

(Schäfer 等人, Gene 145, 69-73 (1994); Bernard 等人, Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993))、pEM1 (Schrumpf 等人 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510--4516)或 pBGS8 (Spratt 等人,1986, Gene 41: 337-342)。接着，通过转化将含有待扩增基因的质粒载体转移进入目的谷氨酸棒杆菌菌株。转化方法如在 Thierbach 等人(Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988))、Dunican 和 Shivnan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989))以及 Tauch 等人(FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994))所述。

IV. 基因和由此编码的蛋白质

可以通过本发明的表达单元调节基因在所述微生物中的转录，在微生物中改变或影响(与野生型相比)基因的转录速率和/或翻译速率，所述基因与所述表达单元是异源的。

这优选通过以下获得:

- 向微生物基因组导入一个或多个本发明的具有启动子活性的核酸，从而在所述导入的具有启动子活性的核酸(如果合适，其具有改变的特异性启动子活性)控制下转录一个或多个内源基因；或

- 向微生物导入一个或多个核酸构建体，其含有本发明的具有启动子活性的核酸和功能连接的一个或多个待转录的外源或内源核酸。

如果将一个或多个基因导入微生物的基因组使一个或多个导入的基因在本发明的核酸控制下转录，可能发生插入使基因整合进入编码或非编码区。优选发生进入非编码区的插入。

在这一点，可以染色体的插入或染色体外的插入核酸构建体。优选核酸构建体为染色体的插入。“染色体的”整合是 DNA 片段插入宿主细胞的染色体。

“内源的”意指这样的遗传信息，例如已经存在于野生型基因组的基因(如上定义)。

“外源的”意指这样的遗传信息，例如在野生型基因组中不存在的基因。

如果外源的遗传信息，例如本发明的包含多启动子的表达单元被导入野生型菌株的基因组，由此产生遗传修饰的菌株，那么这一遗传信息相对于最初产生的遗传菌株及其子代是内源的，但是相对于不包含所述遗传信息的原始野生型菌株是外源的。

关于通过具有启动子活性的本发明核酸的转录调节，术语“基因”意指优选的核酸，其包含要转录的区域，即，例如调节翻译区、编码区和(如果合适)更多的调节元件，例如终止子。

关于通过本发明的表达单元的表达调节，术语“基因”意指优选的核酸，其包含编码区和(如果合适)更多的调节元件，例如终止子。

“编码区”意指编码蛋白质的核酸序列。

关于具有启动子活性的核酸和基因，“异源”意指所使用基因在野生型中的转录不受到具有启动子活性的本发明核酸调节，但是当产生了在野生型中不存在的新的功能连接，则产生在野生型中不存在的具有启动子活性的本发明核酸与特定基因的功能组合。

关于表达单元和基因，“异源”意指所使用基因在野生型中的表达不受到本发明表达单元的调节，但是当产生了在野生型中不存在的新的功能连接，则产生在野生型中不存在的本发明表达单元与特定基因的功能组合。

在本发明上述方法的优选的实施方案中，为了在微生物中改变或影响基因的转录速率和/或表达速率，从精细化学品生物合成途径蛋白质的编码核酸组成的组选择基因，如果合适，所述基因可能含有更多的调节元件。

在本发明上述方法的特别优选的实施方案中，为了在微生物中改变或影响基因的转录速率和/或表达速率，该基因选自：编码生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸的生物合成途径蛋白质的核酸；编码核苷酸及核苷的生物合成途径蛋白质的核酸；编码有机酸的生物合成途径蛋白质的核酸；编码类脂及脂肪酸的生物合成途径蛋白质的核酸；编码二元醇的生物合成途径蛋白质的核酸；编码碳水化合物的生物合成途径蛋白质的核酸；编码芳香化合物的生物合成途径蛋白质的核酸；编码维生素的生物合成途径蛋白质的核酸；编码辅因子的生物合成途径蛋白质的核酸；编码酶的生物合成途径

蛋白质的核酸；编码中心代谢的蛋白质的核酸，如果合适，所述基因可能含有更多的调节元件。

在特别优选的实施方案中，蛋白质选自氨基酸的生物合成途径，即：天冬氨酸激酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、二氨基庚二酸脱氢酶、二氨基庚二酸脱羧酶、二氢吡啶二羧酸合成酶、二氢吡啶二羧酸还原酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、3-磷酸甘油酸激酶、丙酮酸羧化酶、丙糖磷酸异构酶、转录调节物 LuxR、转录调节物 LysR1、转录调节物 LysR2、苹果酸-醌氧化还原酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡糖酸脱氢酶、转酮酶、转醛酶、高丝氨酸 O-乙酰转移酶、胱硫醚 γ 合酶、胱硫醚 β 裂合酶、丝氨酸羟甲基转移酶、O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶、亚甲基四氢叶酸还原酶、磷酸丝氨酸氨基转移酶、磷酸丝氨酸磷酸酶、丝氨酸乙酰转移酶、高丝氨酸脱氢酶、高丝氨酸激酶、苏氨酸合酶、苏氨酸输出子载体、苏氨酸脱水酶、丙酮酸氧化酶、赖氨酸输出子、生物素连接酶、半胱氨酸合酶 I、半胱氨酸合酶 II、辅酶 B12 依赖型甲硫氨酸合酶、非辅酶 B12 依赖型甲硫氨酸合酶、硫酸腺苷酰转移酶亚基 1 和 2、磷酸腺苷磷酰硫酸还原酶、铁氧还蛋白亚硫酸盐还原酶、铁氧还蛋白 NADP 还原酶、3-磷酸甘油酸脱氢酶、RXA00655 调节物、RXN2910 调节物、精氨酰-tRNA 合成酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、苏氨酸排出蛋白、丝氨酸羟甲基转移酶、果糖-1,6-二磷酸酶、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA077、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA248、硫酸盐还原作用的蛋白质 RXA247、蛋白质 OpcA、1-磷酸果糖激酶及 6-磷酸果糖激酶、四氢吡啶羧酸琥珀酰酶、琥珀酰氨基酮庚二酸氨基转移酶、琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶、二氨基庚二酸差向异构酶、6-磷酸葡糖酸脱氢酶、葡萄糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇化酶、丙酮酸激酶、天冬氨酸转氨酶和苹果酸酶。

优选的蛋白质和编码所述蛋白质的核酸分别是微生物来源的蛋白质序列和核酸序列，优选来自棒杆菌属或短杆菌属细菌，优选来自棒杆菌，特别优选来自谷氨酸棒杆菌。

蛋白质序列和氨基酸生物合成途径所述蛋白质的相应编码核酸序列的

特别优选的实例、其参考的文献和其在参考文件中的名称列于表 1:

表 1

蛋白质	蛋白质的编码核酸	参考文献	参考文献中的 SEQ. ID. NO.
天冬氨酸激酶	Ask 或 lysC	EP1108790	DNA: 281 蛋白质: 3781
天冬氨酸半醛脱氢酶	asd	EP1108790	DNA: 331 蛋白质: 3831
二氢吡啶二羧酸合成酶	dapA	WO 0100843	DNA: 55 蛋白质: 56
二氢吡啶二羧酸还原酶	dapB	WO 0100843	DNA: 35 蛋白质: 36
内消旋-二氨基庚二酸 D-脱氢酶	ddh	EP1108790	DNA : 3494 蛋白质 : 6944
二氨基吡啶羧酸脱羧酶	lysA	EP1108790	DNA: 3451 蛋白质:6951
赖氨酸输出子	lysE	EP1108790	DNA: 3455 蛋白质: 6955
四氢吡啶羧酸琥珀酰酶	dapD	EP1108790	DNA : 1229 蛋白质: 4729
琥珀酰氨基酮庚二酸氨基转移酶	dapC	WO 0100843	DNA : 327 蛋白质: 328
琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶	dapE	WO 0100843	DNA: 31 蛋白质: 32
二氨基庚二酸差向异构酶	dapF	EP1108790	DNA: 2131 蛋白质: 5632
精氨酰-tRNA 合成酶	argS	EP1108790	DNA: 3450 蛋白质: 6950
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	zwf	WO 0100844	DNA: 243 蛋白质: 244
转酮酶	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 蛋白质: 5240
转醛酶	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 蛋白质: 246
OpcA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 蛋白质: 80
6-磷酸葡糖酸内酯酶	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 蛋白质: 2
6-磷酸葡糖酸脱氢酶		EP1108790	DNA: 1605 蛋白质: 5105
葡萄糖磷酸异构酶	gpi	WO 0100844	DNA: 41 蛋白质: 42
苹果酸-醌氧化还原酶	mqo	WO 0100844	DNA: 569 蛋白质: 570

甘油醛-3-磷酸脱氢酶	gap	WO 0100844	DNA: 187 蛋白质: 188
3-磷酸甘油酸激酶	pgk	WO 0100844	DNA: 69 蛋白质: 70
丙糖磷酸异构酶	tpi	WO 0100844	DNA: 61 蛋白质: 62
1-磷酸果糖激酶 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 蛋白质: 56
1-磷酸果糖激酶 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 蛋白质: 58
6-磷酸果糖激酶 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 蛋白质: 4883
6-磷酸果糖激酶 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 蛋白质: 2
果糖-1,6-二磷酸酶 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 蛋白质: 4636
丙酮酸氧化酶	poxB	WO 0100844	DNA : 85 蛋白质: 86
磷酸甘油酸变位酶		WO 0100844	DNA: 49 蛋白质: 50
烯醇化酶	eno	WO 0100844	DNA: 71 蛋白质: 72
丙酮酸激酶	pykA	WO 0100844	DNA: 75 蛋白质: 76
丙酮酸激酶	pykA	EP1108790	DNA: 3328 蛋白质: 6828
丙酮酸羧化酶	pycA	EP1108790	DNA: 765 蛋白质: 4265
天冬氨酸转氨酶		EP1108790	DNA: 3226 蛋白质: 4726 DNA: 3134 蛋白质: 6634 DNA: 2861 蛋白质: 6361 DNA: 911 蛋白质: 4411
PEP-羧化酶	pck	EP1108790	DNA: 3470 蛋白质: 6970
苹果酸酶	*malE*	EP1108790	DNA: 3328 蛋白质: 6828
生物素连接酶	birA	EP1108790	DNA: 786 蛋白质: 4286
高丝氨酸激酶	thrB	WO 0100843	DNA: 173 蛋白质: 174
苏氨酸合酶	thrC	WO 0100843	DNA: 175 蛋白质: 176

苏氨酸输出子载体	thrE	WO 0251231	DNA: 41 蛋白质: 42
苏氨酸排出蛋白	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 蛋白质: 8
苏氨酸脱水酶	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 蛋白质: 5828
高丝氨酸-O-乙酰转移酶	metA	EP 1108790	DNA:727 蛋白质: 4227
胱硫醚γ合酶	metB	EP 1108790	DNA:3491 蛋白质: 6991
胱硫醚β裂合酶	metC	EP 1108790	DNA:2535 蛋白质: 6035
辅酶B12依赖型甲硫氨酸合酶	metH	EP 1108790	DNA:1663 蛋白质: 5163
O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶	metY	EP 1108790	DNA:726 蛋白质: 4226
亚甲基四氢叶酸还原酶	metF	EP 1108790	DNA:2379 蛋白质: 5879
D-3-磷酸甘油酸脱氢酶	serA	EP 1108790	DNA:1415 蛋白质: 4915
磷酸丝氨酸磷酸酶 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 蛋白质:154
磷酸丝氨酸磷酸酶 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 蛋白质: 3967
磷酸丝氨酸磷酸酶 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 蛋白质: 3834
磷酸丝氨酸转氨酶	serC	WO 0100843	DNA: 151 蛋白质: 152
丝氨酸乙酰转移酶	cysE	WO 0100843	DNA: 243 蛋白质: 244
半胱氨酸合酶 I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 蛋白质: 6317
半胱氨酸合酶 II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 蛋白质: 5838
高丝氨酸脱氢酶	hom	EP 1108790	DNA: 3452 蛋白质: 6952
非辅酶B12依赖型甲硫氨酸合酶	metE	WO 0100843	DNA:755 蛋白质: 756
丝氨酸羟甲基转移酶	glyA	WO 0100843	DNA: 143 蛋白质: 144
硫酸盐还原作用的蛋白质	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 蛋白质: 6589
硫酸盐还原作用的蛋白质	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 蛋白质: 6590
硫酸腺苷酰转移酶亚基 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 蛋白质: 6592

硫酸腺苷酰转移酶亚基 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 蛋白质: 6593
磷酸腺苷磷酰硫酸还原酶	CysH	WO 02729029	DNA: 7 蛋白质: 8
铁氧还蛋白亚硫酸盐还原酶	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 蛋白质: 330
铁氧还蛋白 NADP 还原酶	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 蛋白质: 80
转录调节物 LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 蛋白质: 298
转录调节物 LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 蛋白质: 4176
转录调节物 LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 蛋白质: 6728
转录调节物 LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 蛋白质: 5700
RXA00655 调节物	RXA655	US2003162267.2	DNA: 1 蛋白质: 2
RXN02910 调节物	RXN2910	US2003162267.2	DNA: 5 蛋白质: 6

根据本发明从以上列出的基因中选择要调节的靶基因 G 作为给出的参考。

来自氨基酸生物合成的另一特别优选的蛋白质序列，在每一情况下具有表 1 所示的此蛋白质的氨基酸序列，其中各个蛋白质在表 2 第 2 栏所示的这一氨基酸序列的至少一个氨基酸位置上具有与在表 2 中同一行的第 3 栏所示的各个氨基酸不同的生蛋白氨基酸。在另一优选的实施方案中，蛋白质在表 2 第 2 栏所示的该氨基酸序列的至少一个氨基酸位置上具有在表 2 中同一行的第 4 栏所示的氨基酸。表 2 中所示蛋白质是氨基酸生物合成途径中的突变蛋白质，其具有特别有利的特性并且因此特别适于通过本发明的启动子构建体表达相应的核酸和生产氨基酸。例如，突变 T311I 导致要求的反馈抑制被关闭。

可以通过常规方法制备以上表 2 所述的编码突变蛋白质的相应核酸。

制备突变蛋白质的编码核酸序列的合适的起始点是，例如谷氨酸棒杆菌菌株的基因组(其可以从美国模式培养和保藏所名称为 ATCC13032 下获得)，或表 1 中涉及的核酸序列。为了将突变蛋白质氨基酸序列反向翻译为编码这些蛋白质的核酸序列，利用该核酸序列被导入的生物或在其中存在

该核酸序列的生物的密码子使用是有利的。例如，对于谷氨酸棒杆菌，使用谷氨酸棒杆菌的密码子使用是有利的。可以以本身已知的方式从数据库或专利申请(其描述了目的生物的至少一个蛋白质和编码这一蛋白质的一个基因)确定特定生物的密码子使用。

表 2 中的信息应该理解如下:

在第 1 栏“名称”中，显示关于表 1 的每一序列的清楚的名称

在第 2 栏“氨基酸位置”，各个数字指来自表 1 的相应多肽序列的氨基酸位置。在“氨基酸位置”栏“26”相应地意指相应所示多肽序列的氨基酸位置 26。位置编号在 N 末端从 +1 开始。

在第 3 栏“氨基酸野生型”，以单独的字母给出在表 1 序列的相应野生型菌株中在第 2 栏所示位置的氨基酸名称(以单字母密码表示)。

在第 4 栏“氨基酸突变体”，以单独的字母给出在相应的突变体菌株中在第 2 栏所示位置的氨基酸名称(以单字母密码表示)。

在第 5 栏“功能”，显示相应多肽序列的生理功能。

对于具有特定功能的突变蛋白质(第 5 栏)和特定的起始氨基酸序列(表 1)，第 2、3 和 4 栏描述了至少一个突变和一些序列的多重突变。这一多重突变经常指在以上每种情况中最接近的起始氨基酸序列(表 1)。术语特定氨基酸序列的“至少一个氨基酸位置”优选意指所述这一氨基酸序列在第 2、3 和 4 栏的至少一个突变。

生蛋白氨基酸的单字母密码:

A 丙氨酸	I 异亮氨酸	Q 谷氨酰胺
C 半胱氨酸	K 赖氨酸	R 精氨酸
D 天冬氨酸	L 亮氨酸	S 丝氨酸
E 谷氨酸	M 甲硫氨酸	T 苏氨酸
F 苯丙氨酸	N 天冬酰胺	V 缬氨酸
G 甘氨酸	P 脯氨酸	W 色氨酸
H 组氨酸		Y 酪氨酸

表 2

第 1 栏	第 2 栏	第 3 栏	第 4 栏	第 5 栏
名称	氨基酸位置	氨基酸野生型	氨基酸突变体	功能
ask	317	S	A	天冬氨酸激酶
	311	T	I	
	279	A	T	
asd	66	D	G	天冬氨酸-半醛脱氢酶
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	二氢吡啶二羧酸合成酶
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	二氢吡啶二羧酸还原酶
	83	D	N	
ddh	174	D	E	内消旋-二氨基庚二酸 D-脱氢酶
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	二氨基吡啶羧酸脱羧酶
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	精氨酰-tRNA 合成酶
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
pycA	7	S	L	丙酮酸羧化酶
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	
	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP 羧化酶
	241	G	D	
	829	T	R	

第 1 栏	第 2 栏	第 3 栏	第 4 栏	第 5 栏
thrB	103	S	A	高丝氨酸激酶
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	苏氨酸合酶
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	苏氨酸排出蛋白
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	高丝氨酸脱氢酶
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	转录调节物 LysR1
lysR3	142	R	W	转录调节物 LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	转酮酶
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	转醛酶
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	天冬氨酸-1-脱羧酶
	33	G	S	6-磷酸葡糖酸内酯酶

遗传修饰的微生物

通过技术人员公知的方法，例如缀合或电穿孔，将本发明的表达单元、上述基因以及上述核酸构建体或表达盒导入微生物，特别是棒杆菌中(例如 Liebl 等人(1989) FEMS Microbiology Letters 53, 299-303)。

优选通过 SacB 方法选择整合的表达盒。SacB 方法是技术人员公知的并且被描述于，例如 Schäfer A、Tauch A、Jäger W、Kalinowski J、Thierbach G、Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined

deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73 和 Blomfield IC、Vaughn V、Rest RF、Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57。

给出根据本发明用作起始微生物的参考，那些微生物已经生产可变的目的产品(精细化学品/蛋白质)。

本发明因此还涉及遗传修饰的微生物，其包含本发明的表达盒或包含本发明的表达盒的载体。

本发明特别优选涉及遗传修饰的微生物，特别是棒杆菌，其包含载体，特别是穿梭载体或质粒载体，所述载体带有至少一个本发明的表达盒。

优选的微生物或遗传修饰的微生物是细菌、藻类、真菌或酵母。

具体而言，特别优选的微生物是棒杆菌。

优选的棒杆菌是棒杆菌属细菌，特别是谷氨酸棒杆菌菌种、乙酰谷氨酸棒杆菌菌种、嗜乙酰乙酸棒杆菌(Corynebacterium acetoacidophilum)菌种、热产氨棒杆菌(Corynebacterium thermoaminogenes)菌种、栖糖蜜棒杆菌(Corynebacterium melassecola) 菌种和有效棒杆菌(Corynebacterium efficiens)菌种；或短杆菌属细菌，特别是黄色短杆菌(Brevibacterium flavum)菌种、乳糖发酵短杆菌(Brevibacterium lactofermentum)菌种及叉开短杆菌(Brevibacterium divaricatum)菌种。

特别优选的棒杆菌属与短杆菌属细菌选自：谷氨酸棒杆菌ATCC 13032、乙酰谷氨酸棒杆菌ATCC 15806、嗜乙酰乙酸棒杆菌ATCC 13870、热产氨棒杆菌FERM BP-1539、栖糖蜜棒杆菌ATCC 17965、有效棒杆菌DSM 44547、有效棒杆菌DSM 44548、有效棒杆菌DSM 44549、黄色短杆菌ATCC 14067、乳糖发酵短杆菌ATCC 13869、叉开短杆菌ATCC 14020、谷氨酸棒杆菌KFCC 10065及谷氨酸棒杆菌ATCC 21608，还有，例如通过传统突变和选择或通过定向突变从其衍生的菌株。

缩写KFCC意指韩国联邦菌物保藏中心(Korean Federation of Culture

Collection)，缩写ATCC意指美国模式培养和保藏所，缩写DSM意指德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikrorganismen)。

其它特别优选的棒杆菌属与短杆菌属细菌列于表3中：

细菌		保藏号							
属	种	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
短杆菌属	产氨短杆菌(ammoniagenes)	21054							
短杆菌属	产氨短杆菌	19350							
短杆菌属	产氨短杆菌	19351							
短杆菌属	产氨短杆菌	19352							
短杆菌属	产氨短杆菌	19353							
短杆菌属	产氨短杆菌	19354							
短杆菌属	产氨短杆菌	19355							
短杆菌属	产氨短杆菌	19356							
短杆菌属	产氨短杆菌	21055							
短杆菌属	产氨短杆菌	21077							
短杆菌属	产氨短杆菌	21553							
短杆菌属	产氨短杆菌	21580							
短杆菌属	产氨短杆菌	39101							
短杆菌属	丁酸短杆菌(butanicum)	21196							
短杆菌属	叉开短杆菌(divaricatum)	21792	P928						
短杆菌属	黄色短杆菌(flavum)	21474							
短杆菌属	黄色短杆菌	21129							
短杆菌属	黄色短杆菌	21518							
短杆菌属	黄色短杆菌			B11474					
短杆菌属	黄色短杆菌			B11472					
短杆菌属	黄色短杆菌	21127							
短杆菌属	黄色短杆菌	21128							
短杆菌属	黄色短杆菌	21427							
短杆菌属	黄色短杆菌	21475							
短杆菌属	黄色短杆菌	21517							
短杆菌属	黄色短杆菌	21528							
短杆菌属	黄色短杆菌	21529							
短杆菌属	黄色短杆菌			B11477					
短杆菌属	黄色短杆菌			B1147					

				8					
短杆菌属	黄色短杆菌	21127							
短杆菌属	黄色短杆菌			B11474					
短杆菌属	希氏短杆菌(healii)	15527							
短杆菌属	酮基谷氨酸短杆菌(ketoglutamicum)	21004							
短杆菌属	酮基谷氨酸短杆菌	21089							
短杆菌属	ketosoreductum	21914							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌(lactofermentum)				70				
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌				74				
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌				77				
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	21798							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	21799							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	21800							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	21801							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌			B11470					
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌			B11471					
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	21086							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	21420							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	21086							
短杆菌属	乳糖发酵短杆菌	31269							
短杆菌属	亚麻短杆菌(linens)	9174							
短杆菌属	亚麻短杆菌	19391							

短杆菌属	亚麻短杆菌	8377							
短杆菌属	paraffinolyticum					11160			
短杆菌属	短杆菌属某种						717.73		
短杆菌属	短杆菌属某种						717.73		
短杆菌属	短杆菌属某种	14604							
短杆菌属	短杆菌属某种	21860							
短杆菌属	短杆菌属某种	21864							
短杆菌属	短杆菌属某种	21865							
短杆菌属	短杆菌属某种	21866							
短杆菌属	短杆菌属某种	19240							
棒杆菌属	嗜乙酰乙酸棒杆菌(acetoacidophilum)	21476							
棒杆菌属	嗜乙酰乙酸棒杆菌	13870							
棒杆菌属	乙酰谷氨酸棒杆菌(acetoglutamicum)			B11473					
棒杆菌属	乙酰谷氨酸棒杆菌			B11475					
棒杆菌属	乙酰谷氨酸棒杆菌	15806							
棒杆菌属	乙酰谷氨酸棒杆菌	21491							
棒杆菌属	乙酰谷氨酸棒杆菌	31270							
棒杆菌属	嗜乙酰棒杆菌(acetophilum)			B3671					
棒杆菌属	产氨短杆菌	6872						2399	
棒杆菌属	产氨短杆菌	15511							
棒杆菌属	fujiokense	21496							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌(glutamicum)	14067							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	39137							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21254							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21255							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	31830							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	13032							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	14305							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	15455							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	13058							

棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	13059							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	13060							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21492							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21513							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21526							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21543							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	13287							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21851							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21253							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21514							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21516							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21299							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21300							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	39684							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21488							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21649							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21650							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19223							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	13869							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21157							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21158							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21159							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21355							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	31808							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21674							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21562							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21563							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21564							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21565							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21566							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21567							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21568							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21569							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21570							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21571							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21572							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21573							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21579							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19049							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19050							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19051							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19052							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19053							

棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19054							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19055							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19056							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19057							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19058							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19059							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19060							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	19185							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	13286							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21515							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21527							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21544							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21492							
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌			B8183					
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌			B8182					
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌			B12416					
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌			B12417					
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌			B12418					
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌			B11476					
棒杆菌属	谷氨酸棒杆菌	21608							
棒杆菌属	百合棒杆菌(lilium)		P973						
棒杆菌属	嗜氮棒杆菌(nitrilophilus)	21419				11594			
棒杆菌属	棒杆菌属某种		P4445						
棒杆菌属	棒杆菌属某种		P4446						
棒杆菌属	棒杆菌属某种	31088							
棒杆菌属	棒杆菌属某种	31089							
棒杆菌属	棒杆菌属某种	31090							
棒杆菌属	棒杆菌属某种	31090							
棒杆菌属	棒杆菌属某种	31090							
棒杆菌属	棒杆菌属某种	15954							20145
棒杆菌属	棒杆菌属某种	21857							
棒杆菌属	棒杆菌属某种	21862							
棒杆菌属	棒杆菌属某种	21863							

这些缩写具有以下含义:

ATCC: 美国模式培养和保藏所，Rockville, MD, 美国

FERM: 发酵研究所，Chiba, 日本

NRRL: ARS保藏中心，北方地区研究所(Northern Regional Research Laboratory), Peoria, IL, 美国

CECT: 西班牙典型培养物保藏中心(Coleccion Espanola de Cultivos Tipo), Valencia, 西班牙

NCIMB: 国家工业和海洋微生物保藏有限公司, Aberdeen, 英国

CBS: 真菌菌种保藏中心(Centraalbureau voor Schimmelcultures), Baarn, 荷兰

NCTC: 国家典型培养物保藏中心，伦敦, 英国

DSMZ: 德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Brunswick，德国。

这里给出棒杆菌属细菌微生物，特别是已经能够产生 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸和/或 L-苏氨酸的那些的具体参考。这些特别是例如其中天冬氨酸激酶的编码基因(ask 基因)被下调或反馈抑制已经被消除或降低的棒杆菌。例如，这样的细菌具有 ask 基因的突变，其导致反馈抑制的降低或消除，例如 T311I 突变。

本发明的表达单元使能够在本发明的上述遗传修饰的微生物中调节特异性生物合成产物的代谢途径。

为此目的，例如，通过影响或增加此生物合成途径基因的转录速率或表达速率来增强产生特异性生物合成产物的代谢途径，在所述代谢途径中，蛋白质量的增加导致目的生物合成途径的这些蛋白质的总活性增加，且因此额外导致向目的生物合成产物的代谢通量增加。

此外，可通过降低某分支的生物合成途径的基因转录速率或表达速率来减弱从特定生物合成产物分支的代谢途径，其中降低的蛋白质量导致非需要的目的生物合成途径的蛋白质总活性降低，且因此额外导致向目的生物合成产物的代谢通量增加。

本发明的遗传修饰的微生物能够产生，例如来自葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉、纤维素或来自甘油与乙醇的生物合成产物。

因此，本发明涉及通过培养本发明的遗传修饰的微生物来产生生物合成产物的方法。

由目的生物合成产物决定，必须增加或降低多种基因的转录速率或表达速率。通常，最好改变多个基因的转录速率或表达速率，即，增加基因组合的转录速率或表达速率和/或降低基因组合的转录速率或表达速率。

在本发明的遗传修饰的微生物中，至少一种基因的改变的(即增加的或降低的)转录速率或表达速率是归因于具有启动子活性的本发明的核酸或本发明的表达单元。

而且，在遗传修饰微生物中其它基因的额外改变的(即额外提高的或额外降低的)转录速率或表达速率可以(但不是必需)来自具有启动子活性的本发明的核酸或本发明的表达单元。

因此，本发明还涉及通过培养本发明的遗传修饰微生物来产生生物合成产物的方法。

V.本发明的应用领域

可以如下所述，在生物合成产物发酵生产的改良方法中特别有利地使用本发明的包含多启动子的表达单元、表达盒和载体。

本发明的包含多启动子的表达单元或包含其的表达盒具有特定优势，能够调节功能连接的结构基因的表达。

可以将本发明的包含多启动子的表达单元或包含其的表达盒用于在微生物中改变(即增加或降低)或影响基因的表达速率(与野生型相比)。这为增加表达速率、使研究基因的表达最大化提供了可能。另一方面，通过选择合适的表达单元，还能够以低于由不同表达单元可获得的最大强度，但是同时更适于表达微生物的量来生产表达产物。当表达产物浓度过高对表达微生物有害时，这是特别有利的。因此，特别是对于长期表达，通过在各个情况下选择具有不同表达强度的表达单元，从而使本发明的表达单元能够精细的调节表达至最佳值。

本发明的表达单元或包含所述表达单元的表达盒还可以在微生物，特

别是棒杆菌菌种中，调节和增加多种生物合成产物(例如精细化学品、蛋白质，特别是氨基酸)的形成。

因此，本发明涉及本发明的包含多启动子的表达单元在调节产物生物合成中的用途。这里，将涉及产物生物合成调节蛋白质的基因置于这样的表达单元控制之下。所述产物生物合成依赖于所选择的包含多启动子的表达单元转录速率的影响。或者，可以在微生物中将涉及产物生物合成蛋白质的基因作为本发明的表达盒的组分表达，并且由此可以通过表达的蛋白质调节所述产物生物合成。如果多启动子的活性弱于内源启动子，还可以使用多启动子以减弱特定的不需要的生物合成途径。

还可以通过一个或多个组成所述多启动子的单个启动子的特异性突变来调节本发明包含多启动子表达单元的转录速率。可以通过替换 RNA 聚合酶全酶结合位点(对技术人员也称为－10 区和－35 区)的结合位点之中的核苷酸获得增加的或降低的启动子活性。还可以这样进一步地施加影响：通过核苷酸缺失或核苷酸插入减少或延长在所述 RNA 聚合酶全酶结合位点之间的距离；此外，通过将调节蛋白质(技术人员称为阻遏蛋白或激活蛋白)的结合位点(技术人员也称为操纵基因)置于与 RNA 聚合酶全酶结合位点空间邻近的位置，使这些调节物在与启动子序列结合后减弱或增强 RNA 聚合酶全酶的结合和转录活性，或还使所述结合和转录活性受到新的调节影响。也可以通过突变本发明包含多启动子的表达单元之中单个启动子 P_y 的介导核糖体结合的 3'末端序列区影响翻译活性。

VI.生物合成产物和优选的生产方法

优选的根据本发明制备的生物合成产物为精细化学品。

术语“精细化学品”为技术人员所熟知并且包括由生物产生且用于多种工业领域中的化合物，所述工业领域例如(但不限于)医药业、农业、化妆品业、食品业及饲料业。这些化合物包括有机酸(例如乳酸、琥珀酸、酒石酸、衣康酸及二氨基庚二酸)、和生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸、嘌呤碱及嘧啶碱、核苷及核苷酸(例如，Kuninaka, A. (1996)在 Nucleotides and

related compounds，第 561-612 页，Biotechnology 第 6 卷，Rehm 等人，编者，VCH: Weinheim 中及其中出现的参考文献中所述的)、类脂、饱和与不饱和脂肪酸(例如花生四烯酸)、二元醇(例如丙二醇及丁二醇)、碳水化合物(例如透明质酸及海藻糖)、芳香化合物(例如芳香胺、香草醛及靛蓝)、维生素及辅因子(如 Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry，第 A27 卷，" Vitamins"，第 443-613 页 (1996) VCH: Weinheim 及其中出现的参考文献中及 Ong, A.S.、Niki, E.和 Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia，1994 年 9 月 1-3 日于马来西亚槟城举行，AOCS Press (1995)中所述)、酶及所有其它化学品(由 Gutcho (1983)在 Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 及其中提到的参考文献中所述)。

特别优选的生物合成产物选自：有机酸、蛋白质、核苷酸及核苷、生蛋白氨基酸及非生蛋白氨基酸、类脂及脂肪酸、二元醇、碳水化合物、芳香化合物、维生素及辅因子、酶及蛋白质。

优选的有机酸为乳酸、琥珀酸、酒石酸、衣康酸及二氨基庚二酸。

优选的核苷及核苷酸描述于，例如Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds，第561-612页，Biotechnology，第6卷，Rehm等人，编者，VCH: Weinheim及其中提到的参考文献中。

其它优选的生物合成产物是类脂、饱和及不饱和脂肪酸(例如花生四烯酸)、二元醇(例如丙二醇及丁二醇)、碳水化合物(例如透明质酸及海藻糖)、芳香化合物(例如芳香胺、香草醛及靛蓝)、维生素及辅因子(例如Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry，第A27卷，"Vitamins"，第443-613页 (1996) VCH: Weinheim与其中出现的参考文献；以及Ong, A.S.、Niki, E.与Packer, L.(1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia, 1994年9月1-3日

于马来西亚槟城举行, AOCS Press (1995))中所述)、酶、聚酮化合物(Cane等人(1998) Science 282: 63-68)以及由Gutcho(1983)在Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086及其中提到的参考文献所述的所有其它化学品。

特别优选的生物合成产物为氨基酸，特别优选必需氨基酸，特别是L-甘氨酸、L-丙氨酸、L-亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-色氨酸、L-赖氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、L-半胱氨酸、L-酪氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸以及 L-苏氨酸、L-高丝氨酸，尤其是 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸和L-苏氨酸。例如赖氨酸、甲硫氨酸及苏氨酸的氨基酸在下文的各种情况下意指L及D型氨基酸二者，优选L型，即例如 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸及L-苏氨酸。

以下部分对特别优选的赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸的制备方法进行具体描述。

a)赖氨酸的制备

具体地,本发明涉及通过培养遗传修饰的微生物来生产赖氨酸的方法，与野生型相比，所述遗传修饰微生物的至少一种基因具有提高或受影响的速率，其中

-微生物中至少一种内源基因的表达活性受到本发明表达单元的调节，或

-微生物中至少一种基因的表达受到导入所述微生物中的包含所述基因的本发明表达盒的影响或被其改变。

这里这些基因具体选自：编码天冬氨酸激酶的核酸、编码天冬氨酸半醛脱氢酶的核酸、编码二氨基庚二酸脱氢酶的核酸、编码二氨基庚二酸脱羧酶的核酸、编码二氢吡啶二羧酸合成酶的核酸、编码二氢吡啶二羧酸还原酶的核酸、编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的核酸、编码3-磷酸甘油酸激酶的核酸、编码丙酮酸羧化酶的核酸、编码丙糖磷酸异构酶的核酸、编码转录调节物 LuxR 的核酸、编码转录调节物 LysR1 的核酸、编码转录调节物

LysR2 的核酸、编码苹果酸-醌氧化还原酶的核酸、编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的核酸、编码 6-磷酸葡糖酸脱氢酶的核酸、编码转酮酶的核酸、编码转醛酶的核酸、编码赖氨酸输出子的核酸、编码生物素连接酶的核酸、编码精氨酰-tRNA 合成酶的核酸、编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的核酸、编码果糖-1,6-二磷酸酶的核酸、编码蛋白质 OpcA 的核酸、编码 1-磷酸果糖激酶的核酸、编码 6-磷酸果糖激酶的核酸、编码四氢吡啶羧酸琥珀酰酶的核酸、编码琥珀酰氨基酮庚二酸氨基转移酶的核酸、编码琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶的核酸、编码二氨基庚二酸差向异构酶的核酸、编码 6-磷酸葡糖酸脱氢酶的核酸、编码葡萄糖磷酸异构酶的核酸、编码磷酸甘油酸变位酶的核酸、编码烯醇化酶的核酸、编码丙酮酸激酶的核酸、编码天冬氨酸转氨酶的核酸以及编码苹果酸酶的核酸。

上述制备赖氨酸方法的另一优选实施方案包含遗传修饰的微生物，其与野生型相比，额外具有至少一种增加的活性，该活性选自天冬氨酸激酶活性、天冬氨酸半醛脱氢酶活性、二氨基庚二酸脱氢酶活性、二氨基庚二酸脱羧酶活性、二氢吡啶二羧酸合成酶活性、二氢吡啶二羧酸还原酶活性、甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性、3-磷酸甘油酸激酶活性、丙酮酸羧化酶活性、丙糖磷酸异构酶活性、转录调节物LuxR的活性、转录调节物LysR1的活性、转录调节物LysR2的活性、苹果酸-醌氧化还原酶活性、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性、6-磷酸葡糖酸脱氢酶活性、转酮酶活性、转醛酶活性、赖氨酸输出子活性、精氨酰-tRNA合成酶活性、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶活性、果糖-1,6-二磷酸酶活性、蛋白质OpcA活性、1-磷酸果糖激酶活性、6-磷酸果糖激酶活性、生物素连接酶活性以及四氢吡啶羧酸琥珀酰酶活性、琥珀酰氨基酮庚二酸氨基转移酶活性、琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶活性、二氨基庚二酸差向异构酶活性、6-磷酸葡糖酸脱氢酶活性、葡萄糖磷酸异构酶活性、磷酸甘油酸变位酶活性、烯醇化酶活性、丙酮酸激酶活性、天冬氨酸转氨酶活性及苹果酸酶活性。

上述制备赖氨酸方法的另一特别优选的实施方案包含遗传修饰微生物，其与野生型相比，额外具有至少一种降低的活性，该活性选自苏氨酸

脱水酶活性、高丝氨酸O-乙酰转移酶活性、O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶活性、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶活性、丙酮酸氧化酶活性、高丝氨酸激酶活性、高丝氨酸脱氢酶活性、苏氨酸输出子活性、苏氨酸排出蛋白活性、天冬酰胺酶活性、天冬氨酸脱羧酶活性以及苏氨酸合酶活性。

b)甲硫氨酸的制备

本发明还涉及通过培养遗传修饰的微生物来制备甲硫氨酸的方法，所述遗传修饰的微生物与野生型相比，有至少一种基因的表达速率提高或受影响，其中

－微生物中至少一种内源基因的表达活性受到本发明的表达单元调节，或

－微生物中至少一种基因的表达受到导入所述微生物的本发明包含所述基因的表达单元的影响或被其改变。

其中这些基因具体选自编码天冬氨酸激酶的核酸、编码天冬氨酸半醛脱氢酶的核酸、编码高丝氨酸脱氢酶的核酸、编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的核酸、编码3-磷酸甘油酸激酶的核酸、编码丙酮酸羧化酶的核酸、编码丙糖磷酸异构酶的核酸、编码高丝氨酸O-乙酰转移酶的核酸、编码胱硫醚γ合酶的核酸、编码胱硫醚β裂合酶的核酸、编码丝氨酸羟甲基转移酶的核酸、编码O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶的核酸、编码亚甲基四氢叶酸还原酶的核酸、编码磷酸丝氨酸氨基转移酶的核酸、编码磷酸丝氨酸磷酸酶的核酸、编码丝氨酸乙酰转移酶的核酸、编码半胱氨酸合酶I活性的核酸、编码半胱氨酸合酶II活性的核酸、编码辅酶B12依赖型甲硫氨酸合酶的核酸、编码非辅酶B12依赖型甲硫氨酸合酶的核酸、编码硫酸腺苷酰转移酶的核酸、编码磷酸腺苷磷酰硫酸还原酶的核酸、编码铁氧还蛋白亚硫酸盐还原酶的核酸、编码铁氧还蛋白NADPH-还原酶的核酸、编码铁氧还蛋白的核酸、编码硫酸盐还原作用的蛋白质RXA077的核酸、编码硫酸盐还原作用的蛋白质RXA248的核酸、编码硫酸盐还原作用的蛋白质RXA247的核酸、编码RXA0655调节物的核酸以及编码RXN2910调节物的核酸、编码6-磷酸葡糖酸脱氢酶、葡萄糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇化酶、丙酮酸激

酶、天冬氨酸转氨酶或苹果酸酶的核酸。

上述制备甲硫氨酸方法的另一优选实施方案包含遗传修饰微生物，其与野生型相比，额外具有至少一种增加的活性，该活性选自天冬氨酸激酶活性、天冬氨酸半醛脱氢酶活性、高丝氨酸脱氢酶活性、甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性、3-磷酸甘油酸激酶活性、丙酮酸羧化酶活性、丙糖磷酸异构酶活性、高丝氨酸O-乙酰转移酶活性、胱硫醚γ合酶活性、胱硫醚β裂合酶活性、丝氨酸羟甲基转移酶活性、O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶活性、亚甲基四氢叶酸还原酶活性、磷酸丝氨酸氨基转移酶活性、磷酸丝氨酸磷酸酶活性、丝氨酸乙酰转移酶活性、半胱氨酸合酶I活性、半胱氨酸合酶II活性、辅酶B12依赖型甲硫氨酸合酶活性、非辅酶B12依赖型甲硫氨酸合酶活性、硫酸腺苷酰转移酶活性、磷酸腺苷磷酰硫酸还原酶活性、铁氧还蛋白亚硫酸盐还原酶活性、铁氧还蛋白NADPH-还原酶活性、铁氧还蛋白活性、硫酸盐还原作用的蛋白质RXA077的活性、硫酸盐还原作用的蛋白质RXA248的活性、硫酸盐还原作用的蛋白质RXA247的活性、RXA655调节物的活性以及RXN2910调节物的活性、6-磷酸葡糖酸脱氢酶活性、葡萄糖磷酸异构酶活性、磷酸甘油酸变位酶活性、烯醇化酶活性、丙酮酸激酶活性、天冬氨酸转氨酶活性和苹果酸酶活性。

上述制备甲硫氨酸方法的另一特别优选的实施方案包含遗传修饰的微生物，其与野生型相比，额外具有至少一种降低的活性，该活性选自高丝氨酸激酶活性、苏氨酸脱水酶活性、苏氨酸合酶活性、内消旋二氨基庚二酸 D-脱氢酶活性、烯醇丙酮酸磷酸羧激酶活性、丙酮酸氧化酶活性、二氢吡啶二羧酸合酶活性、二氢吡啶二羧酸还原酶活性及二氨基吡啶羧酸脱羧酶活性。

c)苏氨酸的制备

本发明还涉及通过培养遗传修饰的微生物来制备苏氨酸的方法，所述遗传修饰的微生物与野生型相比，有至少一种基因的表达速率提高或受影响，其中

－微生物中至少一种内源基因的表达活性受到本发明表达单元的调

节，或

－微生物中至少一种基因的表达受到导入所述微生物的本发明包含所述基因的表达单元的影响或被其改变。

其中这些基因具体选自编码天冬氨酸激酶的核酸、编码天冬氨酸半醛脱氢酶的核酸、编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的核酸、编码3-磷酸甘油酸激酶的核酸、编码丙酮酸羧化酶的核酸、编码丙糖磷酸异构酶的核酸、编码高丝氨酸激酶的核酸、编码苏氨酸合酶的核酸、编码苏氨酸输出子载体的核酸、编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的核酸、编码转醛酶的核酸、编码转酮酶的核酸、编码苹果酸-醌氧化还原酶的核酸、编码6-磷酸葡糖酸脱氢酶的核酸、编码赖氨酸输出子的核酸、编码生物素连接酶的核酸、编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的核酸、编码苏氨酸排出蛋白的核酸、编码果糖-1,6-二磷酸酶的核酸、编码OpcA蛋白质的核酸、编码1-磷酸果糖激酶的核酸、编码6-磷酸果糖激酶的核酸及编码高丝氨酸脱氢酶的核酸，以及编码6-磷酸葡糖酸脱氢酶、葡萄糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇化酶、丙酮酸激酶、天冬氨酸转氨酶和苹果酸酶的核酸。

上述制备苏氨酸方法的另一优选实施方案包含遗传修饰微生物，其与野生型相比，额外具有至少一种增加的活性，该活性选自天冬氨酸激酶活性、天冬氨酸半醛脱氢酶活性、甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性、3-磷酸甘油酸激酶活性、丙酮酸羧化酶活性、丙糖磷酸异构酶活性、苏氨酸合酶活性、苏氨酸输出子载体活性、转醛酶活性、转酮酶活性、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性、苹果酸-醌氧化还原酶活性、高丝氨酸激酶活性、生物素连接酶活性、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶活性、苏氨酸排出蛋白活性、蛋白质OpcA活性、1-磷酸果糖激酶活性、6-磷酸果糖激酶活性、果糖-1,6-二磷酸酶活性、6-磷酸葡糖酸脱氢酶活性和高丝氨酸脱氢酶活性、以及6-磷酸葡糖酸脱氢酶活性、葡萄糖磷酸异构酶活性、磷酸甘油酸变位酶活性、烯醇化酶活性、丙酮酸激酶活性、天冬氨酸转氨酶活性和苹果酸酶活性。

上述制备苏氨酸方法的另一特别优选的实施方案包含遗传修饰微生物，其与野生型相比，额外具有至少一种降低的活性，该活性选自苏氨酸

脱水酶活性、高丝氨酸 O-乙酰转移酶活性、丝氨酸羟甲基转移酶活性、O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶活性、内消旋二氨基庚二酸 D-脱氢酶活性、烯醇丙酮酸磷酸羧激酶活性、丙酮酸氧化酶活性、二氢吡啶二羧酸合成酶活性、二氢吡啶二羧酸还原酶活性、天冬酰胺酶活性、天冬氨酸脱羧酶活性、赖氨酸输出子活性、乙酰乳酸合酶活性、乙酮醇-酸还原异构酶活性、支链氨基转移酶活性、辅酶 B12 依赖型甲硫氨酸合酶活性、非辅酶 B12 依赖型甲硫氨酸合酶活性、二羟基-酸脱水酶活性以及二氨基吡啶羧酸脱羧酶活性。

d) 制备本发明生物产品的更多信息

可以(但非必需)通过本发明的表达单元或本发明的表达盒引起至少一种上述活性的额外增加或降低。

术语蛋白质的“活性”在酶的情况下意指相应蛋白质的酶活性，且在其它蛋白质(如结构蛋白或转运蛋白)的情况下意指蛋白质的生理活性。

酶通常能将底物转化为产物，或催化该转化步骤。因此，酶的“活性”意指在特定时间内由酶转化的底物量，或形成的产物量。

因此，当与野生型相比活性增加时，在特定时间内由酶转化的底物量或所形成的产物量与野生型相比增加。

例如，就本文中所述的所有活性而言，“活性”的增加总计为“野生型活性”的至少1-5%，例如“野生型活性”的至少20%、至少50%、至少100%、至少300%、或至少500%、或至少600%。

因此，当与野生型相比活性降低时，在特定时间内由酶转化的底物量或形成的产物量与野生型相比减少。

降低的活性优选意指基于多种细胞生物学机制，在微生物中部分或基本完全的抑制或阻断该酶功能。

活性的降低包含酶的数量减少直至基本上完全丧失(即，缺乏相应活性的可检测性或缺乏该酶的免疫可检测性)。与野生型相比，微生物中活性优选降低至少5%，例如至少20%、至少50%、或约100%。 “降低”也特别意指完全丧失相应活性。

通过已知的方法，例如酶测定可测量遗传修饰的微生物及野生型中特定酶的活性，并由此可以测量酶活性的增加或降低。

可以以多种方式额外增加活性，例如通过关闭在表达及蛋白质水平上的抑制性调节机制，或通过增加(与野生型相比)编码上述蛋白质的核酸的基因表达。

同样地，可以以多种方式增加(与野生型相比)编码上述蛋白质的核酸的基因表达，例如通过激活物诱导基因，或如上所述，通过增加启动子活性或增加表达活性或通过将一个或多个基因拷贝导入微生物。

根据本发明，增加蛋白质编码核酸的基因表达也意指对微生物固有内源蛋白质的表达的操纵。如上所述，这可通过例如改变基因的启动子序列、导入用于调节性控制基因的本发明的表达单元和改变导入的本发明的表达单元来实现。例如，可通过缺失或插入DNA序列来进行这样的改变，其导致基因表达速率增加。

如上所述，通过施加外源刺激来改变内源蛋白质的表达是可能的。这可以通过特定的生理条件，即通过外源物质的使用而进行。

本领域的技术人员可借助于更多的不同操作(单独或组合地)实现基因表达的增加。因此，例如可以增加合适基因的拷贝数，或突变启动子及调节区或位于结构基因上游的核糖体结合位点。另外，可以通过诱导型启动子增加发酵生产过程中的表达。延长mRNA存在时间的操作同样增加表达。通过阻止酶蛋白质的降解同样也可增强酶活性。基因或基因构建体可以以不同拷贝数存在于质粒中，或在染色体中整合并扩增。或者，也可通过改变培养基的组成及对培养物的管理来获得相关基因的过表达。

技术人员可尤其在Martin等人(Biotechnology 5, 137-146 (1987))、Guerrero 等 人 (Gene 138, 35-41 (1994)) 、 Tsuchiya 和 Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988))、Eikmanns等人(Gene 102, 93-98 (1991))、在EP-A 0472869、US-A 4,601,893、在Schwarzer和Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)) 、 Reinscheid 等 人 (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994))、LaBarre等人(Journal of

Bacteriology 175, 1001-1007 (1993))、在WO 96/15246、在Malumbres等人(Gene 134, 15-24 (1993))、在JP-A-10-229891、在Jensen和Hammer(Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998))、Makrides(Microbiological Reviews 60：512-538 (1996))及众所周知的遗传与分子生物学教科书中发现对此的指导。

此外，除了基因的表达或增强作用，消除不需要的副反应对产生生物合成产物，尤其是L-赖氨酸、L-甲硫氨酸及L-苏氨酸是额外有利的(Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek(编者), Academic Press, London, 英国, 1982)。

在优选的实施方案中，通过将至少一种编码相应蛋白质的核酸导入微生物中来增加编码上述蛋白质之一的核酸的基因表达。核酸的导入可在染色体上或染色体外发生，即通过增加染色体上的拷贝数和/或增加在宿主微生物中复制的质粒的基因拷贝。

核酸的导入(例如，以包含该核酸的本发明的表达盒形式)优选在染色体上发生，特别是通过上述SacB方法进行。原则上，为此目的，可能使用编码上述蛋白质之一的任何基因。

在包含内含子的真核来源的基因组核酸序列情况下，若宿主微生物不能表达相应蛋白质或不能使其表达相应蛋白质，优选使用已经处理过的核酸序列，例如相应的cDNA。

相应基因的实例列于表1和表2中。

优选通过以下方法中的至少一种降低微生物中的上述活性：

- 导入至少一种诱导共抑制的有义核糖核酸序列或确保其表达的表达盒
- 导入至少一种针对相应基因、RNA或蛋白质的DNA结合因子或蛋白质结合因子或确保其表达的表达盒
- 导入至少一种引起RNA降解的病毒核酸序列或确保其表达的表达盒
- 导入至少一种产生功能丧失的构建体，所述功能缺失是例如通过在

基因中产生插入、缺失、倒置或突变产生基因的终止密码子或阅读框移位。可能并优选通过同源重组使靶向插入片段进入目的靶基因中，或导入针对靶基因的序列特异性核酸酶来产生敲除突变体。

• 导入具有降低的启动子活性的启动子或导入具有降低的表达活性的表达单元。

• 导入减少有义RNA (mRNA)翻译的反义RNA。

本领域的技术人员知道在本发明的范畴内还可使用其它方法来降低其活性或功能。例如，导入蛋白质的显性失活变体或确保其表达的表达盒也是有利的。

此外，可以使用这些方法中的每一种引起蛋白质量、mRNA 量和/或蛋白质活性的降低。也可以想到将这些方法组合使用。其它方法是本领域的技术人员已知的，其可以包括阻止或抑制蛋白质加工、蛋白质或其 mRNA 转运、抑制染色体附着、抑制 RNA 剪接、诱导降解 RNA 的酶和/或抑制翻译延伸或终止。

VII. 微生物培养及产物分离

在制备生物合成产物的本发明方法中，优选在培养遗传修饰的微生物步骤之后从微生物和/或发酵肉汤中分离生物合成产物。这些步骤可以同时发生和/或优选在培养步骤之后进行。

可以连续或间断地以分批法(分批培养)或补料分批法或重复补料分批法培养本发明的遗传修饰的微生物，产生生物合成产物，特别是L-赖氨酸、L-甲硫氨酸及L-苏氨酸。已知培养方法的概述可在Chemiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991))的教科书或在Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994))的教科书中发现。

使用的培养基必须以适当地方式满足各个菌株的要求。在“Manual of Methods for General Bacteriology” of the American Society for

Bacteriology (Washington D.C., 美国, 1981)手册中描述了用于多种微生物的培养基。

根据本发明，这些可使用的培养基通常包含一种或多种碳源、氮源、无机盐、维生素和/或微量元素。

优选的碳源为例如单糖、二糖或多糖的糖。非常好的碳源的实例为葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、核糖、山梨糖、核酮糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、淀粉或纤维素。也可以经由例如糖蜜的复合物或糖精制中的其它副产物将糖加入培养基中。添加多种碳源的混合物也是有益的。其它可能的碳源为油和脂肪，例如大豆油、葵花子油、花生油及椰子脂肪；脂肪酸，例如棕榈酸、硬脂酸或亚油酸；醇，例如甘油、甲醇或乙醇以及有机酸，例如乙酸或乳酸。

氮源通常为有机或无机氮化合物或含有这些化合物的物质。氮源的实例包括氨气或例如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵或硝酸铵的铵盐、硝酸盐、尿素、氨基酸或例如玉米浆、大豆粉、大豆蛋白、酵母提取物、肉膏及其它物质的复合氮源。氮源可单独使用或作为混合物使用。

可存在于培养基中的无机盐化合物包含钙、镁、钠、钴、钼、钾、锰、锌、铜及铁的氯化物、磷酸盐或硫酸盐。

为了制备精细化学品，尤其是甲硫氨酸，可能使用以下物质作为硫源：无机化合物，例如硫酸盐、亚硫酸盐、连二亚硫酸盐、四硫酸盐、硫代硫酸盐、硫化物，以及有机硫化合物，例如硫醇及某硫醇(thiol)。

可以使用以下物质作为磷源：磷酸、磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应的含钠盐。

为了保持溶液中的金属离子，可将螯合剂添加到培养基中。特别适合的螯合剂包括二羟基酚类(dihydroxyphenol)，例如儿茶酚或原儿茶酸盐，或有机酸，例如柠檬酸。

根据本发明，使用的发酵培养基通常也包含例如维生素或生长促进剂的其它生长因子，其包括，例如生物素、核黄素、硫胺素、叶酸、烟酸、泛酸及吡哆醇。生长因子及盐通常来自例如酵母提取物、糖蜜、玉米浆等

培养基的复合成份。也可将合适的前体添加至培养基中。培养基中化合物的精确组成很大程度上视具体实验而定，且将由各具体状况分别确定。优化的培养基的信息获自教科书“Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach”(编者为P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) 第53-73页，ISBN 0 19 963577 3)。也可从例如 Standard 1(Merck)或BHI(脑心浸出液, DIFCO)等商业供应商购买生长培养基。

将培养基的所有成分通过加热(在 1.5 巴和 121℃，20 分钟)或无菌过滤灭菌。可将成分一起灭菌或视需要分开灭菌。所有培养基成分可在培养开始即存在或任选连续或分批加入。

培养物的温度通常在15℃与45℃之间，优选在25℃至40℃，且在实验过程中可保持恒定或变化。培养基的pH值应处于5至8.5的范围内，优选为7.0左右。在培养期间可通过添加例如氢氧化钠、氢氧化钾、氨或氨水的碱性化合物或例如磷酸或硫酸的酸性化合物来控制培养需要的pH值。可通过使用例如脂肪酸聚乙二醇酯的防泡剂来控制泡沫的形成。可通过向培养基中添加具有选择作用的合适物质，例如抗生素来维持质粒的稳定性。通过向培养基中导入氧或含氧的气体混合物(例如周围的空气)来维持需氧条件。培养物的温度通常为20℃至45℃。持续培养直至目的产物的形成达到最大。通常在10小时至160小时内达到该目标。

以这一方式获得的发酵肉汤的干物质含量通常为7.5至25% (以重量计)。

此外，最好还至少在发酵末期进行糖限制(sugar limitation)，但具体地，在超过发酵时间的至少30%时进行。这意指在此期间发酵培养基中可利用的糖浓度保持在0至3 g/l，或是降低的。

根据目的生物合成产物及生物合成副产物的物理/化学特性，以本身已知方式从发酵肉汤和/或微生物中分离生物合成产物。

例如，可接着进一步处理发酵肉汤。视需要而定，可通过分离方法(例如离心、过滤、倾析或这些方法的组合)从发酵肉汤中全部或部分地移出生物质或将其全部保留于其中。

接着可用已知方法，例如借助于旋转蒸发器、薄膜蒸发器、降膜式蒸发器浓缩发酵肉汤通过逆渗透或纳米过滤来浓缩发酵肉汤。然后通过冷冻干燥、喷雾干燥、喷雾制粒或其它方法来处理该浓缩的发酵肉汤。

另外，也可以进一步纯化生物合成产物，尤其是L-赖氨酸、L-甲硫氨酸及L-苏氨酸。为此目的，在除去生物质之后，使用适合的树脂对含有产物的肉汤进行层析，目的产物或杂质被全部或部分地保留于层析树脂上。若需要，则可使用相同或不同的层析树脂重复进行这些层析步骤。本领域的技术人员精通于选择适合的层析树脂及其最有效的使用方法。可通过过滤或超滤来浓缩纯化的产物，并保存于产物稳定性最大的温度。

生物合成产物可以各种形式产生，例如以其盐或酯的形式。

可用现有技术测定分离的化合物的特性及纯度。这些现有技术包括高效液相层析法(HPLC)、光谱法、染色法、薄层层析法、NIRS、酶测定或微生物测定。这些分析方法概述于：Patek等人(1994)Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova等人(1996)Biotekhnologiya 11 27-32及Schmidt 等 人 (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996)第A27卷，VCH: Weinheim，第89-90页、第521-540页、第540-547页、第559-566页、575-581页及第581-587页; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. 等 人 (1987)Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology，第17卷中。

现通过以下非限定性实施例更详细地描述本发明：

具体实施方式

实施例 1:

载体pCLiK5MCS的制备

首先，使用寡核苷酸引物SEQ ID NO: 5与SEQ ID NO: 6，通过聚合酶链式反应(PCR)来扩增载体pBR322的氨苄青霉素(ampicillin)抗性及复制

起点。

SEQ ID NO: 5

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACAG-3'

SEQ ID NO: 6

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTCG-3'

除了pBR322的互补序列外，寡核苷酸引物SEQ ID NO: 5沿5'-3'方向含有限制性内切核酸酶SmaⅠ、BamHⅠ、NheⅠ及AscⅠ的酶切位点，寡核苷酸引物SEQ ID NO: 6沿5'-3'方向含有限制性内切核酸酶XbaⅠ、XhoⅠ、NotⅠ及DraⅠ的酶切位点。通过例如Innis等人(PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990))的标准方法，用PfuTurbo聚合酶(Stratagene, La Jolla, 美国)进行PCR反应。根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Gel Band Purification Kit)(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约2.1 kb大小的DNA片段。根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将该DNA片段的平末端连接在一起，且通过如Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌 XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有氨苄青霉素(50 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

根据产品说明书使用Qiaprep离心式小量制备试剂盒(Qiaprep Spin mniprep Kit) (Qiagen, Hilden，德国)分离单个克隆的质粒DNA，且通过限制性内切酶消化来检查。以该方式得到的质粒命名为pCLiK1。

从作为PCR反应模板的质粒pWLT1 (Liebl等人, 1992)开始，使用寡核苷酸引物SEQ ID NO: 7与SEQ ID NO: 8扩增卡那霉素抗性盒。

SEQ ID NO: 7:

5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAG

GAAGCGGA-3'

SEQ ID NO: 8

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

除了与pWLT1互补的序列外，寡核苷酸引物SEQ ID NO: 7沿5'-3'方向含有限制性内切核酸酶XbaⅠ、SmaⅠ、BamHⅠ、NheⅠ的酶切位点，寡核苷酸引物SEQ ID NO: 8沿5'-3'方向含有限制性内切核酸酶AscⅠ及NheⅠ的酶切位点。通过例如Innis等人(PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990))的标准方法，用PfuTurbo聚合酶(Stratagene, La Jolla, 美国)进行PCR反应。根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约1.3 kb大小的DNA片段。根据产品说明书以限制性内切核酸酶XbaⅠ及AscⅠ(New England Biolabs, Beverly, 美国)切割DNA片段，且随后使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)再次纯化。同样地，以限制性内切核酸酶XbaⅠ及AscⅠ切割载体pCLiK1，且根据产品说明书用碱性磷酸酶(I(Roche Diagnostics, Mannheim))去磷酸化。在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳之后，根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)分离线性化的载体(约2.1 kb)。根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将该载体片段与经切割的PCR片段连接，且通过如Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有氨苄青霉素(50 μg/ml)及卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

根据产品说明书使用Qiaprep离心式小量制备试剂盒(Qiagen, Hilden，德国)分离单个克隆的质粒DNA，且通过限制性内切酶消化来检查。以该方式得到的质粒命名为pCLiK2。

以限制性内切核酸酶DraⅠ(New England Biolabs, Beverly, 美国)切割

载体pCLiK2。在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳之后，根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)分离约2.3 kb大小的载体片段。根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)重新连接该载体片段，且通过如Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

根据产品说明书使用Qiaprep离心式小量制备试剂盒(Qiagen, Hilden，德国)分离单个克隆的质粒DNA，且通过限制性内切酶消化来检查。以该方式得到的质粒命名为pCLiK3。

从作为PCR反应模板的质粒pWLQ2 (Liebl等人，1992)开始，使用寡核苷酸引物SEQ ID NO: 9与SEQ ID NO: 10扩增pHM1519复制起点。

SEQ ID NO: 9:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO: 10:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

除了与pWLQ2互补的序列外，寡核苷酸引物SEQ ID NO: 9及SEQ ID NO: 10含有限制性内切核酸酶Not Ⅰ的酶切位点。通过例如Innis等人(PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990))的标准方法，用PfuTurbo聚合酶(Stratagene, La Jolla, 美国)进行PCR反应。根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约2.7 kb大小的DNA片段。根据产品说明书以限制性内切核酸酶Not Ⅰ(New England Biolabs, Beverly, 美国)切割该DNA片段，且以GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)再次进行纯化。同样地，以限制性内切核酸酶Not Ⅰ切割载体pCLiK3，且根据产品说明书用碱性磷酸酶(I(Roche Diagnostics, Mannheim))去磷酸化。在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳之后，根据产品说

明书以GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)分离线性化的载体(约2.3 kb)。根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将该载体片段与经切割的PCR片段连接，且通过如Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

根据产品说明书使用Qiaprep离心式小量制备试剂盒(Qiagen, Hilden，德国)分离单个克隆的质粒DNA，且通过限制性内切酶消化来检查。以该方式得到的质粒命名为pCLiK5。

为了通过“多克隆位点”(MCS)延伸pCLiK5，将两条合成的基本互补的寡核苷酸SEQ ID NO: 11与SEQ ID NO: 12混合，一起加热至95℃，接着缓慢冷却从而得到双链DNA片段，所述寡核苷酸SEQ ID NO: 11与SEQ ID NO: 12含有限制性内切核酸酶Swa Ⅰ、Xho Ⅰ、Aat Ⅰ、Apa Ⅰ、Asp718、Mlu Ⅰ、Nde Ⅰ、Spe Ⅰ、EcoR Ⅴ、Sal Ⅰ、Cla Ⅰ、BamH Ⅰ、Xba Ⅰ及Sma Ⅰ的酶切位点。

SEQ ID NO: 11:

5’-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCGGTACCACGCGTCATATGACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAACAATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTTAAAT-3’

SEQ ID NO: 12:

5’-GATCATTTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAGCATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAACTAGTCATATGACGCGTGGTACCGGGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTTAAAT-3’

以限制性内切核酸酶XhoⅠ及BamHⅠ(New England Biolabs, Beverly, 美国)切割载体pCLiK5，并根据产品说明书用碱性磷酸酶(I(Roche Diagnostics, Mannheim))去磷酸化。在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳之后，根据产品说明书以GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)分离线性化的载体(约5.0 kb)。根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将载体片段与合成的双链DNA片段连接，且通过如Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

根据产品说明书使用Qiaprep离心式小量制备试剂盒(Qiagen, Hilden，德国)分离单个克隆的质粒DNA，且通过限制性内切酶消化来检查。以该方式得到的质粒命名为pCLiK5MCS。

根据Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI Prism 377(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。

将得到的质粒 pCLiK5MCS 列为 SEQ ID NO: 13。

实施例 2:

质粒 PmetA metA 的制备

根据 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 染色体 DNA 。通过如 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 所述标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增包括非编码5'区的metA基因，该PCR反应使用寡核苷酸引物SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)。

SEQ ID NO: 14

5‘-GCGCGGTACCTAGACTCACCCCAGTGCT –3‘

和

SEQ ID NO: 15

5‘-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT –3‘

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约 1.3 kb 大小的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Asp718 和 Spe Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化 DNA 片段。

以限制性内切核酸酶 Asp718 和 Spe Ⅰ切割载体 pClik5MCS SEQ ID NO: 13，并且在电泳分级之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒分离出 5 kb 片段。

根据产品说明书使用快速 DNA 连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将载体片段与 PCR 片段连接，且通过如 Sambrook 等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌 XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的 LB 琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。根据Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。

将产生的质粒 pCLiK5MCS PmetA metA 列为 SEQ ID NO: 16。

实施例 3:

质粒 pCLiK5MCS Psod metA 的制备

根据 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 染色体

DNA 。通过如 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 所述标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增从超氧化物歧化酶(Psod)的非编码 5'区(表达单元区)起约 200 碱基对的 DNA 片段,该 PCR 反应使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)。

SEQ ID NO: 17

5'-GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG–3'

和

SEQ ID NO: 18

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGGGTAAAAAATCCTTTCG –3'

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的 DNA 片段。

以 PmetA metA SEQ ID NO: 16 质粒作为 PCR 反应模板开始，使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 部分的扩增 metA。

SEQ ID NO: 19

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG –3'

和

SEQ ID NO: 20

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC –3'

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化得到的约 470 碱基对大小的 DNA 片段。

在下一步的 PCR 反应中将以上获得的两个片段一起用作模板。在 PCR 反应期间，寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 18 引入的 metA 同源序列使两个片段彼此相连，并且通过所用的聚合酶使其延伸得到连续的 DNA 链。

修改标准方法，从而仅在第 2 次循环的开始向反应混合物加入使用的寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 20。

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化

得到的约 675 碱基对大小的扩增的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Nco Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化出约 620 碱基对的 DNA 片段。

以限制性内切核酸酶 Nco Ⅰ和 Spe Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割 PmetA metA SEQ ID NO: 16 质粒。在凝胶电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒从琼脂糖纯化约 0.7 kb 的 metA 片段。

以限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Spe Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割 pClik5MCS SEQ ID NO: 13 载体，且在凝胶电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒分离出 5 kb 片段。

根据产品说明书使用快速 DNA 连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将载体片段与 PCR 片段以及 metA 片段连接在一起，且通过如 Sambrook 等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌 XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的 LB 琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。根据 Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。

将得到的质粒 pCLiK5MCS PSODmetA 列为 SEQ ID NO: 21。

实施例 4:

质粒 pCLiK5MCS P EF-TU metA 的制备

根据 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 染色体

DNA 。通过如 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 所述标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增从超氧化物歧化酶(Psod)的非编码 5'区(启动子区)起约 200 碱基对的 DNA 片段，该 PCR 反应使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)。

SEQ ID NO: 22

5'-GAGACTCGAGGGCCGTTACCCTGCGAATG –3'

和

SEQ ID NO: 23

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATTGTATGTCCTCCTGGAC –3'

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化得到的 DNA 片段。

以 PmetA metA SEQ ID NO: 16 质粒作为 PCR 反应模板起始，使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25，部分扩增 metA。

SEQ ID NO: 24

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG –3'

和

SEQ ID NO: 25

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC –3'

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化得到的约 470 碱基对的 DNA 片段

在下一步的 PCR 反应中将以上获得的两个片段一起用作模板。在 PCR 反应期间，寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 18 引入的 metA 同源序列使两个片段彼此相连，并且通过所用的聚合酶使其延伸得到连续的 DNA 链。修改标准方法，从而仅在第 2 次循环的开始向反应混合物加入使用的寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 25。

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化

约 675 碱基对大小的扩增的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Nco Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化出约 620 碱基对的 DNA 片段。

以限制性内切核酸酶 Nco Ⅰ和 Spe Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割 PmetA metA SEQ ID NO: 16 质粒。在凝胶电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒从琼脂糖纯化出约 0.7 kb 的 metA 片段。

以限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Spe Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割载体 pClik5MCS SEQ ID NO: 13，且在凝胶电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒分离出 5 kb 片段。

根据产品说明书使用快速 DNA 连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将载体片段与 PCR 片段以及 metA 片段连接，且通过如 Sambrook 等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌 XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的 LB 琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。根据Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。

将得到的质粒 pCLiK5MCS P_EFTUmetA 列为 SEQ ID NO: 26。

实施例 5:

质粒 pCLiK5MCS Pgro metA 的制备

根据 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 染色体 DNA。

通过如 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 所述标准方法，以聚合酶链式反应(PCR)扩增从 GroES 基因(Pgro)的非编码 5'区(启动子区)起约 200 碱基对的 DNA 片段，该 PCR 反应使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 28，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)。

SEQ ID NO: 27

5'-GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC –3'

SEQ ID NO: 28

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGATGAATCCCTCCATGAG –3'

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化得到的 DNA 片段。

以 PmetA metA 质粒作为 PCR 反应模板起始，使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 部分扩增 metA。

SEQ ID NO: 29

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG –3'

SEQ ID NO: 30

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC –3'

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化得到的约 470 碱基对的 DNA 片段

在下一步的 PCR 反应中将以上获得的两个片段一起用作模板。在 PCR 反应期间，寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 28 引入的 metA 同源序列使两个片段彼此相连，并且通过所用的聚合酶使其延伸得到连续的 DNA 链。修改标准方法，从而仅在第 2 次循环的开始向反应混合物加入使用的寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 30。

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化

约 675 碱基对大小的扩增的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Xho I 和 Nco I (Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化出约 620 碱基对的 DNA 片段。

以限制性内切核酸酶 Nco I 和 Spe I (Roche Diagnostics, Mannheim)切割质粒 PmetA metA SEQ ID NO: 16。在凝胶电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒从琼脂糖纯化出约 0.7 kb 的 metA 片段。

以限制性内切核酸酶 Xho I 和 Spe I (Roche Diagnostics, Mannheim)切割载体 pClik5MCS SEQ ID NO: 13，且在凝胶电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒分离出 5 kb 片段。

根据产品说明书使用快速 DNA 连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将载体片段与 PCR 片段以及 metA 片段连接，且通过如 Sambrook 等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌 XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素 (20 μg/ml)的 LB 琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。根据Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。

将得到的质粒 pCLiK5MCS Pgro metA 列为 SEQ ID NO: 31。

实施例6

制备质粒P EF-TS metA

如 Tauch 等人 (1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人 (1994) Microbiology 140:1817-1828所述，制备谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的染色

体DNA。使用寡核苷酸引物 BK 1849 (SEQ ID NO: 32)及BK 1862 (SEQ ID NO: 33)，染色体DNA作为模板并且使用Pfu Turbo聚合酶(Stratagene)，通过Innis等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增编码高丝氨酸O-乙酰转移酶的MetaA基因。

BK 1849 (SEQ ID NO: 32)

5‘- GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG –3‘

和

BK 1862 (SEQ ID NO: 33)

5‘-ATGCCCACCCTCGCGCC –3‘

根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约1134 bp大小的DNA片段。

使用寡核苷酸引物 Haf 26 (SEQ ID NO: 34)及Haf 27 (SEQ ID NO: 35)，染色体DNA作为模板并且使用Pfu Turbo聚合酶(Stratagene)，通过Innis等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增延伸因子TS编码基因的非编码5’区(表达单元区)约200个碱基对的DNA片段。

Haf 26 (SEQ ID NO: 34)

5‘-GAGAGGATCCCCCCCACGACAATGGAAC–3‘

和

Haf 27 (SEQ ID NO:35)

5‘-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATTACGGGGCGATCCTCC TTATG –3‘

根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约195 bp大小的DNA片段。

引物Haf 27和BK 1862包含重叠序列，且彼此的5’末端是同源的。

使用以上得到的PCR产物作为另一轮PCR的模板，其中使用引物BK 1849 (SEQ ID NO: 32)和Haf 26 (SEQ ID NO: 34)。

使用这个方法，扩增相应于期望大小1329 bp的DNA片段。然后，经由限制性切割位点BamH Ⅰ和Sal Ⅰ将该P EF-TS/metA融合克隆入载体pClik 5a MCS (SEQ ID NO: 13)。

根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将载体片段与PCR片段连接在一起，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。如Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。使用ABI prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级及评估。

将得到的质粒命名为 pClik 5a MCS P EF-TS metA (SEQ ID NO: 36)。

实施例 7:

质粒 P EF-Tu pSOD metA (H473)的制备

如 Tauch 等人 (1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人 (1994) Microbiology 140:1817-1828所述，制备谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的染色体DNA。使用寡核苷酸引物 BK 1753 (SEQ ID NO: 37)及BK 1754 (SEQ ID NO: 38)，染色体DNA作为模板并且使用Pfu Turbo聚合酶(Stratagene)，通过Innis等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增GroEL终止子。

BK 1753 (SEQ ID NO: 37)

GGATCTAGAGTTCTGTGAAAAACACCGTG

BK 1754 (SEQ ID NO: 38)

GCGACTAGTGCCCCACAAATAAAAAACAC

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约 77 bp 大小的 DNA 片段，用限制性内切核酸酶 Xba Ⅰ和 Bcu Ⅰ切割并且再次纯化。

根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将线性化的载体与PCR片段连接在一起，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。如Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。使用ABI prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级及评估。

将得到的质粒命名为 H247 (SEQ ID NO: 39)。

用限制性内切核酸酶 Bcu Ⅰ和 Sal Ⅰ处理该质粒并且根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化。

使用寡核苷酸引物 BK 1848 (SEQ ID NO: 40)及 BK 1849 (SEQ ID NO: 41)，质粒 pClik5MCS Psod metA (SEQ ID NO: 21)作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法进行 PCR。扩增片段的预期长度为约 1350 bp，并且根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的片段，用限制性内切核酸酶 Bcu Ⅰ和 Sal Ⅰ切割并且再次纯化。

根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将这一片段与H247质粒连接，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方

法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla,美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。如Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。使用ABI prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级及评估。

将得到的质粒命名为 pG A4 (H344)，并列为 SEQ ID NO: 42。

SEQ ID NO: 40 (BK 1848)

GAGAACTAGTAGCTGCCAATTATTCCGGG

SEQ ID NO: 41 (BK 1849)

GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG

用限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Bcu Ⅰ切割质粒 pG A4 (SEQ ID NO: 42)并且根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化。

H473 的构建

如 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 所述，制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的染色体 DNA。使用寡核苷酸引物 BK 1695 (SEQ ID NO: 43)及 Haf 16 (SEQ ID NO: 44)，染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过Innis等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增 EF Tu 基因(Peftu)非编码 5'区(表达单元区)的约 182 个碱基对的 DNA 片段。

SEQ ID NO: 43 (BK1695)

GAGACTCGAGGGCCGTTACCCTGCGAATG

SEQ ID NO: 44 (Haf16)

GAGAACTAGTGTGGCTACGACTTTCGCAGC

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约 200 bp 的 DNA 片段，用限制性内切核酸酶 XhoⅠ和 BcuⅠ切割并且再次纯化。

根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)连接此片段与pG A4 (H344)质粒(XhoⅠ和BcuⅠ切割位点)，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

将得到的质粒命名为 pClik5MCS PeftuPsod metA (H473)。将其列为 SEQ ID NO: 45。其包括(从 5'到 3'方向) Peftu 启动子、Psod 表达单元和紧接其下游的 metA 开放阅读框。

实施例 8:

质粒 PsodPeftu metA (H505)的制备

如 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 所述，制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的染色体 DNA。使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 46 (Haf64)及 SEQ ID NO: 47 (Haf65)，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增 EF Tu 基因(Peftu)非编码 5'区(表达单元区)的约 200 个碱基对的 DNA 片段。

SEQ ID NO: 46 (Haf64)

GAGAACTAGTGGCCGTTACCCTGCGAATG

SEQ ID NO: 47 (Haf65)

GCGCGAGGGTGGGCATTGTATGTCCTCCTGGACTTC

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约 200 bp 的 DNA 片段。

在第二轮 PCR 中，使用寡核苷酸引物 BK1862 (SEQ ID NO: 48)及 BK1849 (SEQ ID NO: 49)，以 H344 (SEQ ID NO: 42)质粒作为模板，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法扩增 metA 开放阅读框。根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化得到的约 1140 bp 片段。

SEQ ID NO: 48 (BK1862)

ATGCCCACCCTCGCGCC

SEQ ID NO: 49 (BK1849)

GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG

在下一步的PCR反应中将以上获得的两个片段一起用作模板。在PCR反应期间，用寡核苷酸引物 Haf 65 SEQ ID NO: 47 引入的 metA 同源序列使两个片段彼此相连，并且通过所用的聚合酶使其延伸得到连续的 DNA 链。修改标准方法，从而仅在第 2 次循环的开始向反应混合物加入使用的寡核苷酸引物 Haf 64 和 BK1849 (SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 49)。

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化扩增的约 1350 碱基对的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Bcu Ⅰ和 Sal Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化出约 1340 碱基对的 DNA 片段。这一片段包括融合至 metA ORF 的 Peftu 表达单元(= Peftu-metA 片段)。

使用寡核苷酸引物 BK 1697 (SEQ ID NO: 50)和 Haf17 (SEQ ID NO: 51)，染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过

Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增 SOD 基因(Psod)非编码 5'区(表达单元区)的 DNA 片段(总长度: 193 bp，其中 173 个为 pSOD)。

SEQ ID NO: 50 (BK 1697)

GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG

SEQ ID NO: 51 (Haf 17)

GAGAACTAGTTAGGTTTCCGCACCGAGC

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化扩增的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Bcu Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化出约 180 碱基对的 DNA 片段(=Psod 片段)。

用限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Sal Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割(H344) pG A4 SEQ ID NO: 42 质粒并且通过凝胶电泳分离。接着，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化线性化的载体。

根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将线性化的载体与两个片段(Peftu-metA片段和Psod片段)连接，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。如Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。使用ABI prism 377 (PE Applied

Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级及评估。

将得到的质粒命名为 pClik5MCS PsodPeftu metA，列为 SEQ ID NO: 52。

实施例 9:

质 粒pClik5MCS Pgro Psod metA (H472)的制备

如 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 所述，制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的染色体 DNA。使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 53 (BK1701)及 SEQ ID NO: 54 (Haf18)，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增约 175 个核苷酸的 DNA 片段。其包括 GRO EL 基因(Pgro)非编码 5'区(表达单元区)的155个碱基对和分别在5'和3'末端的一个限制性内切酶切割位点(分别为 Xho Ⅰ和 Bcu Ⅰ)。

SEQ ID NO: 53 (BK1701)

GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC

SEQ ID NO: 54 (Haf018)

GAGAACTAGTATTTTGTGTGTGCCGGTTGTG

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化获得的约 175 bp DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Bcu Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化 DNA 片段。

用限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Bcu Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割 H344 (SEQ ID NO: 42)质粒并且在电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)分离约 6.4 kb 的片段。

根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将PCR产物与切开的H344质粒连接，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。如Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。

通过ABI prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级及评估。

产生的质粒包括Pgro启动子紧接着一个Psod表达单元和metA ORF。

将其命名为 pCLiK5MCS PgroPsod metA (H472)，列为 SEQ ID NO: 55。

实施例 10:

质粒 PgroPsod Pefts metA (H501)的制备

使用寡核苷酸引物 BK 1782 (SEQ ID NO: 56)和 Haf63 (SEQ ID NO: 57)，质粒 pCLiK5MCS Pgro Psod metA (SEQ ID NO: 55 (H472))作为模板，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法进行 PCR。扩增的片段包括约 474 个碱基对和在 3'末端带有 Acc65 I 切割位点的 Pgro－Psod 盒。根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化获得的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Xho I 和 Acc65 I 切割，且使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化 DNA 片段(333 碱基对)。

SEQ ID NO: 56 (BK1782)

TCGAGAGATTGGATTCTTAC

SEQ ID NO: 57 (Haf 63)

TCTCGGTACCCCGCACCGAGCATATACATC

质粒 H479 (SEQ ID NO: 58)包括融合于 metA ORF 的 Pefts 表达单元盒。使用限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Acc65 Ⅰ切割(紧接 Pefts 的上游)，且在电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒分离出约 6.4 kb 的片段。

接着，根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将其与PCR片段(Pgro-Psod盒)连接，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。如Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级及评估。

产生的质粒包括融合于metA ORF的3个启动子，Pgro、Psod和PEF-Ts。

将其命名为pCLiK5MCS Pgro Psod Pefts metA (H501)，列为SEQ ID NO: 59。

实施例11:

质粒Peftu Psod Pefts metA (H502)的制备

使用寡核苷酸引物BK 1782 (SEQ ID NO: 56)和Haf63 (SEQ ID NO: 57)，质粒pCLiK5MCS Peftu Psod (SEQ ID NO: 45 (H473))作为模板，通过Innis等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press描述的标准方法进行PCR。扩增的片段包括约495个碱基对和在3'末端带有Acc65 Ⅰ切割位点的Peftu－Psod盒。根据产品说明书使用

GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒纯化获得的DNA片段。接着以限制性内切核酸酶Xho Ⅰ和Acc65 Ⅰ切割，且使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒纯化DNA片段(354碱基对)。

SEQ ID NO: 56 (BK1782)

TCGAGAGATTGGATTCTTAC

SEQ ID NO: 57 (Haf 63)

TCTCGGTACCCCGCACCGAGCATATACATC

质粒 H479 (SEQ ID NO: 58)包括融合于 metA ORF 的 Pefts 表达单元。使用限制性内切核酸酶 Xho Ⅰ和 Acc65 Ⅰ切割(紧接 Pefts 的上游)，且在电泳分离之后，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒分离出约 6.4 kb 的片段。

接着，根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将其与PCR片段(Peftu-Psod盒)连接，且通过Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。如Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级及评估。

产生的质粒包括融合于metA ORF的3个调节序列，Peftu、Psod和PEF-Ts。将其命名为pCLiK5MCS Peftu Psod Pefts metA (H502)，列为SEQ ID NO: 60。

实施例12

MetA活性的测量

根据(Liebl等人(1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303)描述的方法，在每种情况下用质粒pClik5 MCS、pClik MCS Psod metA、pClik MCS Peftu metA、pClik5 MCS Pefts metA、pClik5 MCS Peftu Psod metA、pClik5 MCS Psod Peftu metA、pClik5 MCS Pgro Psod meta、pClik5 MCS Pgro Psod Pefts metA、pClik5 MCS Peftu Psod Pefts metA转化谷氨酸棒杆菌菌株ATCC 13032。将转化混合物涂布在另外含有20 mg/l卡那霉素的CM平板上来筛选含有质粒的细胞。挑取且分离得到的卡那霉素抗性克隆。

在30℃下将含有任何所述质粒构建体的谷氨酸棒杆菌菌株在MMA培养基(40 g/l蔗糖、20 g/l $(NH_4)_2SO_4$、1 g/l KH_2PO_4、1 g/l K_2HPO_4、0.25 g/l $MgSO_4 \times 7\ H_2O$、54 g Aces、1 ml $CaCl_2$(10 g/l)、1 ml原儿茶酸盐(300 mg/10 ml)、1 ml微量元素溶液(10 g/l $FeSO_4 \times 7H_2O$、10 g/l $MnSO_4 \times H_2O$、2 g/l $ZnSO_4 \times 7H_2O$、0.2 g/l $CuSO_4$、0.02 g/l $NiCl_2 \times 6H_2O$)、100 μg/l维生素B_{12}、0.3 mg/l硫胺素、1 mM亮氨酸、1 mg/l吡哆醛HCl、1 ml生物素(100 mg/l)，pH 7.0)中于30℃培养过夜。在4℃下离心移取细胞，接着用冷的Tris-HCl缓冲液(0.1%，pH 8.0)洗涤两次。重新离心之后，将细胞溶解在冷的Tris-HCl缓冲液(0.1%, pH 8.0)中，并将OD_{600}调节至160。为了使细胞破裂，将1 ml该细胞悬浮液转移至2 ml的Hybaid Ribolyser管中，且在Hybaid Ribolyser中以6.0的旋转设定值裂解三次，每次30秒。通过4℃下在Eppendorf离心机中15,000 转/分钟离心30分钟使裂解产物澄清，且将上清液转移至新的Eppendorf杯中。根据Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254中所述，测定蛋白质的含量。

以如下方式测定MetA的酶活性。1 ml反应混合物含有100 mM磷酸钾缓冲液(pH 7.5)、5 mM $MgCl_2$、100 μM乙酰辅酶A、5 mM L-高丝氨酸、500 μM DTNB (Ellman's试剂)及细胞提取物。通过加入相应的蛋白质裂解液开始检测，并在室温下孵育。接着在412 nm处记录动力学10分钟。

这些结果显示于表1a中。

表 1a

菌株	内部构建体名称	比活性
ATCC 13032 pClik5MCS	H356 (metZ)	3.1

ATCC 13032 pCLiK5MCS Psod metA	H144	1308.7
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu metA	H146	1233.0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pefts metA	H479	2339.0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu Psod metA	H473	2308.1
ATCC 13032 pCLiK5MCS Psod Peftu metA	H505	2061.9
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro Psod metA	H472	1501.6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro Psod Pefts metA	H501	1773.4
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu Psod Pefts metA	H502	2262.2

可以通过使用多种启动子/表达单元的组合来调节 MetA 的活性。

实施例 13:

质粒 pCIS lysC 的构建

为了产生生产赖氨酸的菌株，在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中进行 lysC 野生型基因的等位替代。这涉及 lysC 基因上的核苷酸替代，使产生的蛋白质中位置 311 的苏氨酸被异亮氨酸代替。根据产品说明书，使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 61 和 SEQ ID NO: 62 以 PfuTurbo PCR 系统(Stratagene 美国)扩增 lysC。

SEQ ID NO: 61

5‘- GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC -3‘

SEQ ID NO: 62

5‘- CTCTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG -3‘

如 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 所述，制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的染色体 DNA。扩增的片段在其侧翼 5’端有 SalⅠ限制酶切割位点和在 3’端有 MluⅠ限制酶切割位点。在克隆之前，用这两种限制性内切核酸酶消化扩增的片段，并且使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化。

经由SalⅠ和MluⅠ限制酶切割将获得的多核苷酸克隆入pCLIK5 MCS整合的SacB，以下称为pCIS (SEQ ID NO: 63)，且转化进入大肠杆菌 XL-1 blue。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质

粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。分离质粒，且通过测序确定期望的核苷酸序列。通过多种方法及使用Quiagen的材料制备质粒DNA。根据Sanger等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国74:5463-5467的描述进行测序反应。通过ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。将得到的质粒pCIS lysC列为SEQ ID NO: 64。

实施例 14:

谷氨酸棒杆菌 lysC 基因的诱变

根据产品说明书，使用 Quick-Change Kit (Stratagene/美国)进行谷氨酸棒杆菌 lysC 基因的定向诱变。在质粒 pCIS lysC，SEQ ID NO: 64 中进行诱变。为了借助 Quick-Change 方法(Stratagene)用 311 位的异亮氨酸替代 311 位的苏氨酸，合成下列寡核苷酸引物:

SEQ ID NO: 65

5‘-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG –3‘

SEQ ID NO: 66

5‘-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG –3‘

在 Quick-Change 反应中使用这些寡核苷酸引物产生在 lysC 基因 SEQ ID NO: 67 的位置 932 (从 C 至 T)核苷酸的替代。在转化进入大肠杆菌 XL1-blue 以及质粒制备之后，通过测序反应确定 lysC 基因中产生的氨基酸替代(苏氨酸 311 异亮氨酸(thr311ile))。将该质粒命名为 pCIS lysC thr311ile，列为 SEQ ID NO: 68。

通过如 Liebl 等人(1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 所述电穿孔方法，将 pCIS lysC thr311ile 质粒转化进入谷氨酸棒杆菌 ATCC13032。对操作方法的修改如在 DE 10046870 所述。如 Sambrook 等人(1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

所述，通过标准方法使用 Southern 印迹和杂交法检测单个转化体 lysC 基因座的染色体排列。这确保转化体在 lysC 基因座具有通过同源重组整合的转化质粒。使这样的克隆在不含任何抗生素的培养基中生长过夜之后，将细胞涂布在蔗糖 CM-琼脂培养基(10%蔗糖、10 g/l 葡萄糖、2.5 g/l NaCl、2 g/l 尿素、10 g/l 细菌用蛋白胨(Difco)、10 g/l 酵母提取物、22.0 g/L 琼脂(Difco))并于 30°C 孵育 24 小时。

由于在 pCIS lysC thr311ile 载体中存在的 sacB 基因将蔗糖转化为毒性产物，仅其中通过野生型 lysC 基因和突变的 lysC thr311ile 基因之间的第二次同源重组使 sacB 基因缺失的那些克隆可以生长。在同源重组中，野生型基因或突变基因都可能与 sacB 基因一起缺失。如果将 sacB 基因与野生型基因一起除去，产生的是突变的转化体。

挑出生长的克隆并检测对卡那霉素敏感的表型。带有 sacB 基因缺失的克隆必然同时呈现卡那霉素敏感的生长行为。在摇瓶中检测这样的对卡那霉素敏感克隆的赖氨酸生产力(见实施例 19)。未处理的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 生长用作对照。选出与对照相比具有增加的赖氨酸产量的克隆，重新获得染色体 DNA，且通过 PCR 反应扩增 lysC 基因的相应区域并测序。将具有赖氨酸合成增加的特性且在 lysC 位置 932 具有检测到的突变的这类克隆命名为 ATCC13032 $lysC^{fbr}$。

实施例 15:

质粒 pCIS Peftu ddh 的制备

如 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 所述，从谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 制备染色体 DNA。使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 69 (Old38)及 SEQ ID NO: 70 (Old 39)，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增 EFTu 基因(Peftu)的非编码 5'区(表达单元区)约 200 个碱基对的 DNA 片段。

SEQ ID NO: 69 (Old38)

ACATCCATGGTGGCCGTTACCCTGCGAAT

SEQ ID NO: 70 (Old 39)

TGTATGTCCTCCTGGACTTC

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化获得的约 200 bp 的 DNA 片段。

在第二轮 PCR 中，使用寡核苷酸引物 Old40 (SEQ ID NO: 71)及 SEQ ID NO: 72 (Old 37)，以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 染色体 DNA 作为模板，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法扩增 ddh 的开放阅读框。根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化获得的约 1017 bp 的片段。

Old40 (SEQ ID NO: 71)

GAAGTCCAGGAGGACATACAATGACCAACATCCGCGTAGC

Old 37 (SEQ ID NO: 72)

GAAACCACACTGTTTCCTTGC

在进一步的 PCR 反应中，将以上获得的两条片段一起用作模板。在 PCR 反应中，寡核苷酸引物 Old40 SEQ ID NO: 71 引入的 Peftu 同源序列使两个片段彼此相连，并且通过所用的聚合酶使其延伸得到连续的 DNA 链。修改标准方法，从而仅在第 2 次循环的开始向反应混合物加入使用的寡核苷酸引物 Old37 和 Old 38 (SEQ ID NO: 72 和 SEQ ID NO: 69)。

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化得到的约 1207 碱基对大小的扩增的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶和 Nco Ⅰ和 Xho Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化出约 1174 碱基对的 DNA 片段。此片段

包括与 ddh ORF 融合的 Peftu 表达单元(= Peftu-ddh 片段)。

使用寡核苷酸引物 Old 32 (SEQ ID NO: 73)及 Old 33 (SEQ ID NO: 74)，以染色体 DNA 作为模板且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法使用聚合酶链式反应(PCR)扩增 ddh 基因非编码 5'区的 DNA 片段。

SEQ ID 73 (Old32)

ATCAACGCGTCGACACCACATCATCAATCAC

SEQ ID 74 (Old33)

ATCACCATGGGTTCTTGTAATCCTCCAAAATTG

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化扩增的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 Mlu Ⅰ和 Nco Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化约 720 碱基对的 DNA 片段(= 5' ddh 片段)。

以限制性内切核酸酶 Mlu Ⅰ和 Xho Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割质粒 pCIS (SEQ ID NO: 63)，且通过凝胶电泳分离。接着，使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化线性化的载体。

根据产品说明书使用快速 DNA 连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将线性化的载体与两个片段(Peftu-ddh 片段和 5'ddh 片段)连接，且通过如 Sambrook 等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌 XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的 LB 琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

通过多种方法及使用 Quiagen 的材料制备质粒 DNA。根据 Sanger 等

人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467 的描述进行测序反应。通过 ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。

将产生的质粒 pCIS Peftu ddh 列为 SEQ ID NO: 75。

实施例 16:

pCIS PeftuPsod ddh 的制备

如 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 所述，制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的染色体 DNA。使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 76 及 SEQ ID NO: 77，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增 ddh 基因 5'区的约 677 个碱基对的 DNA 片段。

SEQ ID NO: 76 (CK461)

CCTGACGTCGCAATATAGGCAGCTGAATC

SEQ ID NO : 77 (CK466)

GCCCAATTGGTTCTTGTAATCCTCCAAAA

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化获得的 DNA 片段。接着以限制性内切核酸酶 AatⅡ和 Mun Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化约 661 碱基对的 DNA 片段。产生的片段包括 ddh ORF 的 5'区。

使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 78 和 SEQ ID NO: 79，以 P EF-Tu pSOD metA (H473) (SEQ ID 45)质粒作为 PCR 反应的模板起始，扩增 PeftuPsod 盒。

SEQ ID NO: 78 (CK426)

CGCCAATTGTCGAGGGCCGTTACCCT

SEQ ID NO: 79 (CK463)

GCTACGCGGATGTTGGTCATGGGTAAAAAATCCTTTCGTA

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)纯化获得的约 378 个碱基对的 DNA 片段。

接着在 PCR 中扩增 ddh ORF。为此目的，根据 Tauch 等人(1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns 等人(1994) Microbiology 140:1817-1828 制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 染色体 DNA。使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 80 (CK464)及 SEQ ID NO: 81 (CK467)，以染色体 DNA 作为模板并且使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)，通过 Innis 等人(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 描述的标准方法以聚合酶链式反应(PCR)扩增约 992 个碱基对的 DNA 片段(ddh ORF)。根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化扩增的 DNA 片段。

SEQ ID NO: 80 (CK464)

TACGAAAGGATTTTTTACCCATGACCAACATCCGCGTAGC

SEQ ID NO: 81 (CK467)

AGACCCGGGTTAGACGTCGCGTGCGATCA

在进一步的 PCR 反应中，将以上获得的两条片段(PeftuPsod 盒和 ddh ORF)一起用作模板。在 PCR 反应期间，寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 80 (CK464)引入的 Psod 同源序列使两个片段彼此相连，并且通过所用的聚合酶使其延伸得到连续的 DNA 链。修改标准方法，使仅在第 2 次循环的开始向反应混合物加入使用的寡核苷酸引物 SEQ ID NO: 79 (CK426)和 SEQ ID NO: 81 (CK467)。

根据产品说明书使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒纯化得到的约 1359 碱基对的扩增的 DNA 片段。

接着以限制性内切核酸酶和 Mun Ⅰ和 Sma Ⅰ(Roche Diagnostics, Mannheim)对其切割，且通过凝胶电泳分离。随后使用 GFX™PCR、DNA 及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)从琼脂糖纯化约 1359 碱基对的 DNA 片段。

产生的片段包括(从 5'至 3') Peftu 启动子、Psod 表达单元和紧接其下游的 ddh 开放阅读框(PeftuPsod ddh)。

以限制性内切核酸酶AatⅡ及Sma Ⅰ切割载体pCIS，并且根据产品说明书用碱性磷酸酶(Roche Diagnostics, Mannheim)去磷酸化。在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳之后，根据产品说明书使用GFX™PCR、DNA及凝胶条带纯化试剂盒(Amersham Pharmacia, Freiburg)分离线性化的载体(约4.2 kb)。根据产品说明书使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics, Mannheim)将该载体片段与两条经切割的PCR片段(5'ddh 和 PeftuPsod ddh)连接，且通过如Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))描述的标准方法将连接混合物转化进入感受态的大肠杆菌XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, 美国)中。通过涂布在含有卡那霉素(20 μg/ml)的LB琼脂上来筛选含有质粒的细胞(Lennox, 1955, Virology, 1:190)。

根据产品说明书使用 Qiaprep 离心式小量制备试剂盒(Qiagen, Hilden，德国)分离单个克隆的质粒 DNA，且通过限制性内切酶消化来检查。对两个正确的质粒进行测序。根据 Sanger 等人(1977) Proceedings of the National Academy of Sciences 美国 74:5463-5467 的描述进行测序反应。通过 ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)对测序反应进行分级和评估。产生的质粒 pClik Peftu Psod ddh 适用于通过两个连续的重组事件与 ddh ORF 上游 PeftuPsod 盒染色体整合。

将pCIS PeftuPsod ddh质粒列为SEQ ID NO: 82。

实施例17:

产生菌株ATCC13032 $lysC^{fbr}$ Peftu ddh和ATCC13032 $lysC^{fbr}$ PeftuPsod ddh

根据Liebl等人(1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303所述，使用质粒pCIS Peftu ddh和pCIS PeftuPsod ddh两者之一与质粒pTc15AcglM一起转化大肠杆菌菌株Mn522细胞(Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)。质粒pTc1 5AcglM能够按照谷氨酸棒杆菌甲基化的方式使DNA甲基化(DE 10046870)。这一甲基化增加了pCIS Peftu ddh和pCIS PeftuPsod ddh质粒在谷氨酸棒杆菌细胞中的稳定性。接着通过标准方法从Mn522细胞分离质粒DNA，并使用电穿孔将其导入上述谷氨酸棒杆菌菌株ATCC 13032 ask (fbr)。所述电穿孔和继之在含有卡那霉素(25 μg/ml)的CM平板上的筛选产生多个转接合子。为了筛选应该切开载体的第二次重组事件，使所述转接合子在不含卡那霉素的CM培养基生长过夜并接着在含有10％蔗糖的CM平板上涂板筛选。在pCIS载体上存在的sacB基因编码果聚糖蔗糖酶，并且在蔗糖生长时产生果聚糖的合成。由于果聚糖对谷氨酸棒杆菌有害，仅由于第二次重组步骤而丢失了整合质粒的谷氨酸棒杆菌细胞在含有蔗糖的培养基上生长(Jäger等人, Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466)。检查100个蔗糖抗性克隆的卡那霉素敏感性。在测试的多个克隆中，除了检测对蔗糖的抗性，也检测对卡那霉素的敏感性(其为能够通过载体序列的目的切割而预期的)。使用聚合酶链式反应(PCR)来检查是否也发生Peftu或PeftuPsod表达单元的目的整合。为此，使用牙签从琼脂平板移取特定克隆，并悬浮于100 μl的水中，在95°C煮沸10分钟。将在每种情况下获得的10 μl溶液作为PCR的模板。使用与导入的表达单元和ddh基因同源的寡核苷酸引物。PCR条件选择如下：初始变性：于95°C 5分钟；于95°C变性30秒、55°C杂交30秒、72°C扩增2分钟，进行30个循环；最后于72°C延伸5分钟。选择的寡核苷酸在含有初始菌株DNA的反应混合物中不产生任何PCR产物。仅其中Peftu或PeftuPsod表达单元作为第二次重组结果在紧接ddh基因的5'整合的克隆有预期的条带。还可以通过Southern印迹

分析(通过例如Sambrook等人(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)所述的标准方法)确定测试为阳性的克隆的成功整合。这里对每一产生的菌株使用限制性核酸内切酶进行2种不同的水解，该水解能够清楚地区分初始菌株(ATCC13032 ask (fbr))和目的菌株。此外，使用与卡那霉素抗性基因同源的探针来确认获得的菌株在染色体上没有任何卡那霉素基因这一事实。

由此产生下列菌株:

ATCC13032 $lysC^{fbr}$ Peftu ddh

ATCC13032 $lysC^{fbr}$ PeftuPsod ddh

所有这些菌株包含解除反馈调节的 ask 基因并因此产生赖氨酸。它们仅由控制 ddh 基因转录的调节单元而彼此不同。

实施例18:

双启动子产生的 ddh 增加对赖氨酸产量的影响。

为了研究通过双启动子使 ddh 基因增加的影响，测试下列菌株的赖氨酸产量:

ATCC13032 lysCfbr

ATCC13032 lysCfbr Peftu ddh

ATCC13032 lysCfbr Peftu Psod ddh

为此目的，使菌株在 CM 平板(10.0 g/L D-葡萄糖、2.5 g/L NaCl、2.0 g/L 尿素、10.0 g/L 细菌用蛋白胨(Difco)、5.0 g/L 酵母提取物(Difco)、5.0 g/L 牛肉膏(Difco)、22.0 g/L 琼脂(Difco)，高压灭菌(20 min，121°C))于 30°C 生长 3 天。接着，从平板刮下细胞并重悬于盐水中。对于主要的培养物，在 100 ml 锥形瓶中用细胞悬液对 10 ml 的培养基 I 和 0.5 g 高压灭菌的 $CaCO_3$ (Riedel de Haen)接种至 OD_{600} 为 1.5，并且在 Infors AJ118 (Infors, Bottmingen, Switzerland)以 220 转/分钟孵育 40 小时。接着，测定分泌到培养基的赖氨酸的浓度。

培养基 I:

40 g/l 蔗糖

60 g/l 糖蜜(基于 100%蔗糖含量)

10 g/l $(NH_4)_2SO_4$

0.4 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$

0.6 g/l KH_2PO_4

0.3 mg/l 硫胺素 × HCl

1 mg/l 生物素(从 1 mg/ml 母液配制，该母液经过滤除菌并用 NH_4OH 调节至 pH 8.0)

2 mg/l $FeSO_4$

2 mg/l $MnSO_4$

用 NH_4OH 调节至 pH7.8，高压灭菌(121°C，20 min)。

此外，取维生素 B12 (羟钴氨素，Sigma Chemicals)母液(200 μg/ml，经过滤除菌)加至终浓度为 100 μg/l。

根据在 Agilent 1100 系列 LC 系统 HPLC 上的 Agilent，通过高压液相层析测定氨基酸浓度。用带有邻苯二醛的保护柱衍生化方法对形成的氨基酸定量，且在 Hypersil 氨基酸柱(Agilent)分离氨基酸混合物。

研究结果描述于下表。

菌株	相对赖氨酸浓度(%)
ATCC13032 $lysC^{fbr}$	100
ATCC13032 $lysC^{fbr}$ Peftu ddh	102.9
ATCC13032 $lysC^{fbr}$ PeftuPsod ddh	106.9

<110> 巴斯福股份公司

<120> 多启动子

<130> M/45256

<160> 84

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 177
<212> DNA
<213> 谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)

<220>
<221> misc_feature
<223> pGRO

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(177)
<223> 启动子序列，若无另外的下游启动子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(155)
<223> 启动子序列，若另有启动子连接于下游

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(75)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (165)..(172)
<223> 假定的核糖体结合序列

<400> 1
cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60

tctcgggggt agagtgccaa ataggttgtt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120

ctgtgctgga aacccacaac cggcacacac aaaatttttc tcatggaggg attcatc 177

<210> 2
<211> 195
<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>
<221> misc_feature
<223> pEFTS

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(195)
<223> 启动子序列，若无另外的下游启动子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(178)
<223> 启动子序列，若另有启动子连接于下游

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)..(152)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (162)..(167)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (179)..(185)
<223> 假定的核糖体结合序列

<400> 2
cccccacgac aatggaactt tgacttttaa aatttcatcg ccgtgggggc tttttgggca 60

gccagcccgc cgtgtcgcaa cgtaatcgac tgaatacctg tacgatcact ttttagacgg 120

gcgggtaggg ctactgtgcc ctaacctaag cttgtaaagc attaattatc catacataag 180

gaggatcgcc ccgta 195

<210> 3
<211> 199
<212> DNA
<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>
<221> misc_feature
<223> pEFTU

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(199)

<223> 启动子序列，若无另外的下游启动子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(176)
<223> 启动子序列，若另有启动子连接于下游

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(41)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(68)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (92)..(97)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (187)..(193)
<223> 假定的核糖体结合序列

<400> 3
ggccgttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa cgccgttgcc 60

cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct cagtcttcca 120

ggctgcttat cacagtgaaa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt agccaccacg 180

aagtccagga ggacataca 199

<210> 4
<211> 191
<212> DNA
<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>
<221> misc_feature
<223> pSOD

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(191)
<223> 启动子序列，若无另外的下游启动子

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(173)
<223> 启动子序列，若另有启动子连接于下游

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(70)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (86)..(92)
<223> 假定的-10区

<220>
<221> misc_feature
<222> (175)..(181)
<223> 假定的核糖体结合序列

<400> 4
agctgccaat tattccgggc ttgtgacccg ctacccgata aataggtcgg ctgaaaaatt 60

tcgttgcaat atcaacaaaa aggcctatca ttgggaggtg tcgcaccaag tacttttgcg 120

aagcgccatc tgacggattt tcaaaagatg tatatgctcg gtgcggaaac ctacgaaagg 180

atttttacc c 191

<210> 5
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 5
cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 6
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 6
tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 7
<211> 47
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 7
gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 8
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 8
gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 9
gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaa 34

<210> 10
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 10
gagagggcgg ccgctcaagt cggtcaagcc acgc 34

<210> 11
<211> 140
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸

<400> 11
tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60

tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120

tctagacccg ggatttaaat 140

<210> 12
<211> 140
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸

<400> 12
gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60

tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120

aggcctctcg agatttaaat 140

<210> 13
<211> 4323
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 质粒 pCLiK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (457)..(1248)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3840)..(4302)
<223> PsacB (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2418)..(3839)
<223> SacB (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-Ec (pMB) (互补)

<400> 13

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60

tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120

tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180

cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240

gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 300

ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360

ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420

agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480

gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540

atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600

gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660

tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720

agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780

cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840

gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg 900

gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960

gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020

ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac 1080

tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140

gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200

cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260

tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320

ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380

tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg 1440

gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500

gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560

cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680

cataggctcc gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800

cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1860

gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1920

ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 1980

cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040

aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100

tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220

tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280

ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2340

agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400

cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460

ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520

tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580

ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgttagg atcaagatcc 2640

atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700

acataaccaa gcatgtaaat atcgttagac gtaatgccgt caatcgtcat ttttgatccg 2760

cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820

tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca ctttttttcag tgtgtaatca 2880

tcgtttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940

ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000

ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060

actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg 3120

cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180

ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240

gatacgttaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300

gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt 3360

gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420

ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaatc 3480

gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatgcaa agacgatgtg gtagccgtga 3540

tagtttgcga cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600

tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660

ttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720

gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780

agcagtgcgg tagtaaaggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcatc 3840

gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcggtctgc ttcttccagc cctcctgttt 3900

gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960

caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020

ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080

attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140

actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200

gcataaagtt gccttttaa tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260

taatagtgaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320

atc 4323

<210> 14
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 14

gcgcggtacc tagactcacc ccagtgct 28

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 15
ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30

<210> 16
<211> 6349
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> pCLiK5MCS PmetA metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1727)..(2518)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4799)..(5920)
<223> Rep 蛋白

<220>
<221> misc_feature
<222> (3791)..(4465)
<223> Ori-Ec (pMB) (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2785)..(3645)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(177)
<223> PmetA

<220>
<221> misc_feature

<222> (178)..(1311)
<223> metA

<400> 16
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac ctagactcac cccagtgctt 60

aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120

tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccacccag aacaggcggt tattttcatg 180

cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa 240

gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctggggtga ataccgcgta 300

gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360

gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggt cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420

tgcgtgatct gtaccaacgt catcggtggt tgcaacggtt ccaccggacc tggctccatg 480

catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc ttccccgcca cgtccattcg tgatcaggta 540

aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggt 600

ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtacccaga aactgttggc 660

gcagctgctg ttcttgcagt ttctgcacgc gccagcgcct ggcaaatcgg cattcaatcc 720

gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780

ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt 840

ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaacccactc 900

ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttgga ctaccaagca 960

gacaagctag tacagcgttt cgacgccggc tcctacgtct tgctcaccga cgccctcaac 1020

cgccacgaca ttggtcgcga ccgcggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080

ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140

ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgtcggccac 1200

gatgctttcc tcaccgaaag ccgccaaatg gatcgcatcg tgaggaactt cttcagcctc 1260

atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagttcg 1320

gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380

agacccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1440

tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga 1500

aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560

ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620

ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1680

caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga 1740

tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800

acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 1860

ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920

gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 1980

tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2040

tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100

gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg 2160

tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220

cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2280

cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg 2340

attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2400

ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460

tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520

agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580

ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2640

ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc 2700

gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 2760

gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 2820

ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880

aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940

ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000

gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060

cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120

gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 3180

tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 3240

cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300

cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 3360

gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 3420

agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480

cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 3540

tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 3600

tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg 3660

ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt 3720

aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780

atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 3840

cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900

acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 3960

ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020

cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcgc 4080

aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4140

cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200

aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260

ggtgcccgca ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4320

gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4380

cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440

gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa 4500

aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc 4560

tgttcgacac ccatcccgag ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620

gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680

ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg 4740

ttcaaaatcg cttgcccggt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800

gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860

ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920

cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcattgatc cggtgtatgc 4980

cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040

ccgcgttttc ggcgctgacc aggctttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100

ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160

tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220

ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280

agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340

cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt 5400

tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460

caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520

tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580

ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640

gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700

gaaagaccca aacagtgagt acgcccgagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760

acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggt ttatgactgt 5820

tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880

acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940

gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttccccc gtagggtctc 6000

tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060

accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6120

aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180

tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240

gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6300

gtcggtgccg ctggttgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 17
gagactcgag agctgccaat tattccggg 29

<210> 18
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 18
cctgaaggcg cgagggtggg catgggtaaa aaatcctttc g 41

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 19
cccaccctcg cgccttcag 19

<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 20
ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 21
<211> 6386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> pCLiK5MCS PSODmetA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1752)..(2543)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4824)..(5945)
<223> Rep 蛋白

<220>
<221> misc_feature
<222> (2810)..(3670)
<223> Ori-Ec (pMB) (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (3816)..(4490)
<223> orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(196)
<223> Psod

<220>
<221> misc_feature
<222> (197)..(1330)
<223> metA

<400> 21
tcgagagctg ccaattattc cgggcttgtg acccgctacc cgataaatag gtcggctgaa 60

aaatttcgtt gcaatatcaa caaaaaggcc tatcattggg aggtgtcgca ccaagtactt 120

ttgcgaagcg ccatctgacg gattttcaaa agatgtatat gctcggtgcg gaaacctacg 180

aaaggatttt ttacccatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat 240

cggtgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac gctgaaatcg cctatcaccg 300

ctggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat gtcgttctca tcgaacacgc 360

cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac ttgctcggtc ccggcaaagc 420

catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc atcggtggtt gcaacggttc 480

caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg ggtaatcgct tccccgccac 540

gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc gacgcactcg gcatcaccac 600

ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgcccgc accctagagt gggccgcaat 660

gtacccagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgcagtt tctgcacgcg ccagcgcctg 720

gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa aacgaccacc actggcacga 780

aggcaactac tacgaatccg gctgcaaccc agccaccgga ctcggcgccg cccgacgcat 840

cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa cgcttcggca ccaaagccca 900

aaagaacgaa aacccactcg gtccctaccg caagcccgac cagcgcttcg ccgtggaatc 960

ctacttggac taccaagcag acaagctagt acagcgtttc gacgccggct cctacgtctt 1020

gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac cgcggaggcc tcaacaaggc 1080

actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta gataccgata ttttgtaccc 1140

ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat ctactggcaa tggcaaaaat 1200

cgtatcccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc cgccaaatgg atcgcatcgt 1260

gaggaacttc ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac ccttcgacct acatcgagtt 1320

ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg 1380

cgttaattaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa 1440

ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg ctgaccccgg atgaatgtca 1500

gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca 1560

gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat 1620

tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt 1680

tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag 1740

gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 1800

agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 1860

tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc 1920

tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt 1980

gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag 2040

tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg 2100

ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag 2160

cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggtcttgtc gatcaggatg 2220

atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc 2280

gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca 2340

tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc 2400

gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg 2460

ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc atcgccttct 2520

atcgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc 2580

gacgcccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg 2640

cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct 2700

ggagttcttc gcccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat 2760

gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc 2820

gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 2880

ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2940

ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 3000

atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 3060

aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 3120

gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 3180

ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccccg 3240

ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac 3300

acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 3360

gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 3420

ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 3480

ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 3540

gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 3600

ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 3660

agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcg caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc 3720

cgcgtgattt tccgccaaaa actttaacga acgttcgtta taatggtgtc atgaccttca 3780

cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg 3840

agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc 3900

tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa 3960

ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag 4020

gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cggtggcctg attcctcccc 4080

ggcctgaccc gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca 4140

gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga ggcggctagg tcgcaaatgg 4200

cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg 4260

cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg 4320

cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg 4380

gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat 4440

acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca gggcgtcggc taacccccag 4500

tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca 4560

ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca 4620

cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttcctcgctc acctgggcag agaaaatttc 4680

cagggcagca agacccgcga cttcgccagc gcttggatca aagacccgga cacggagaaa 4740

cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc 4800

tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg 4860

ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccccg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac 4920

gcctggaaaa agcgccagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca 4980

tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 5040

tggctgcaac gaccgaggaa atgacccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 5100

ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc 5160

acaatcgcgt ggatcgccta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgatc tcaggcacag 5220

aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 5280

caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 5340

ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc 5400

gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag 5460

cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg 5520

tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 5580

cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc 5640

gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 5700

gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 5760

gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga 5820

ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctcgtggccg acaatcaatg 5880

aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg 5940

ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca 6000

gaaaacggtt cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct 6060

cttgaagctc tctaggggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct 6120

cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc 6180

gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacaccccta tgccaagctt 6240

ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 6300

ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact 6360

tgatcagcgg ccgctcgatt taaatc 6386

<210> 22
<211> 29
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 22
gagactcgag ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 23
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 23
cctgaaggcg cgagggtggg cattgtatgt cctcctggac 40

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 24
cccaccctcg cgccttcag 19

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 25
ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 26
<211> 6394
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> pCLiK5MCS P EFTUmetA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1772)..(2563)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4844)..(6965)
<223> Rep 蛋白

<220>
<221> misc_feature
<222> (2830)..(3690)
<223> Ori-Ec (pMB) (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (3836)..(4510)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(216)
<223> Peftu

<220>
<221> misc_feature
<222> (217)..(1350)
<223> metA

<400> 26
tcgatttaaa tctcgagggc cgttaccctg cgaatgtcca cagggtagct ggtagtttga 60

aaatcaacgc cgttgccctt aggattcagt aactggcaca ttttgtaatg cgctagatct 120

gtgtgctcag tcttccaggc tgcttatcac agtgaaagca aaaccaattc gtggctgcga 180

aagtcgtagc caccacgaag tccaggagga catacaatgc ccaccctcgc gccttcaggt 240

caacttgaaa tccaagcgat cggtgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac 300

gctgaaatcg cctatcaccg ctggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat 360

gtcgttctca tcgaacacgc cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac 420

ttgctcggtc ccggcaaagc catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc 480

atcggtggtt gcaacggttc caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg 540

ggtaatcgct tccccgccac gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc 600

gacgcactcg gcatcaccac ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgcccgc 660

accctagagt gggccgcaat gtacccagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgcagtt 720

tctgcacgcg ccagcgcctg gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa 780

aacgaccacc actggcacga aggcaactac tacgaatccg gctgcaaccc agccaccgga 840

ctcggcgccg cccgacgcat cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa 900

cgcttcggca ccaaagccca aaagaacgaa aacccactcg gtccctaccg caagcccgac 960

cagcgcttcg ccgtggaatc ctacttggac taccaagcag acaagctagt acagcgtttc 1020

gacgccggct cctacgtctt gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac 1080

cgcggaggcc tcaacaaggc actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta 1140

gataccgata ttttgtaccc ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat 1200

ctactggcaa tggcaaaaat cgtatcccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc 1260

cgccaaatgg atcgcatcgt gaggaacttc ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac 1320

ccttcgacct acatcgagtt ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg 1380

tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa 1440

atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg 1500

ctgaccccgg atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa 1560

gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg 1620

gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg ggaagccctg 1680

caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc 1740

tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg 1800

ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg 1860

ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa 1920

gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct 1980

ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga 2040

ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc 2100

cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac 2160

ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc 2220

cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact 2280

gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga 2340

tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg 2400

ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga 2460

agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga 2520

ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg 2580

ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc 2640

gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatcctc 2700

cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg 2760

gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc 2820

ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc 2880

aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 2940

aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag 3000

gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc 3060

gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt 3120

tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 3180

ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg 3240

ctgtgtgcac gaacccccgg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 3300

tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat 3360

tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg 3420

ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa 3480

aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt 3540

ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 3600

tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt 3660

atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcg caaagtcccg 3720

cttcgtgaaa attttcgtgc cgcgtgattt tccgccaaaa actttaacga acgttcgtta 3780

taatggtgtc atgaccttca cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga 3840

tctctctgat gtcgcgctgg agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt 3900

gatcggattt ttccgagctc tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag 3960

tgccgcgagc gacctagaaa ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg 4020

tgctcggcca gcgccaggag gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg 4080

cggtggcctg attcctcccc ggcctgaccc gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga 4140

tgcgtgtcgt gccgcagcca gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga 4200

ggcggctagg tcgcaaatgg cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggt 4260

cgtcacagag ctggaagcgg cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat 4320

gacaaacatc gtaaatgccg cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg 4380

ccaccacctg caccgaatcg gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag 4440

aagcgataag ctgcacgaat acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca 4500

gggcgtcggc taacccccag tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg 4560

attcacgaga cattgacaca ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacacccatc 4620

ccgagctcgc gctgcgatca cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttcctcgctc 4680

acctgggcag agaaaatttc cagggcagca agacccgcga cttcgccagc gcttggatca 4740

aagacccgga cacggagaaa cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc 4800

ccggtgccag tatgttgctc tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat 4860

tgatgtgccg agccaccagg ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccccg aggtctacgc 4920

gattttggag cgctgggcac gcctggaaaa agcgccagct tggatcggcg tgaatccact 4980

gagcgggaaa tgccagctca tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag 5040

cagcccgaat atgcgcctgc tggctgcaac gaccgaggaa atgacccgcg ttttcggcgc 5100

tgaccaggct ttttcacata ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc 5160

gtaccgctgg catgcccagc acaatcgcgt ggatcgccta gctgatctta tggaggttgc 5220

tcgcatgatc tcaggcacag aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg 5280

acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct 5340

tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt 5400

cctctggact gctccagggc gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac 5460

tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc 5520

ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc 5580

gccggactgt gaccgccaga cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg 5640

ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct 5700

ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag 5760

tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa 5820

agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg 5880

ctcgtggccg acaatcaatg aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa 5940

tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta 6000

aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt 6060

tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctaggggggg ctcacaccat aggcagataa 6120

cgttccccac cggctcgcct cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc 6180

actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg 6240

cacaccccta tgccaagctt ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga 6300

aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt 6360

tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg ccgc 6394

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 27
gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

<210> 28
<211> 41
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 28
cctgaaggcg cgagggtggg catgatgaat ccctccatga g 41

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 29
cccaccctcg cgccttcag 19

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 30
ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 31
<211> 6372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> pCLiK5MCS PGroESmetA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1735)..(2526)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4807)..(5928)
<223> Rep 蛋白

<220>
<221> misc_feature
<222> (2793)..(3653)
<223> Ori-EC (pMB) (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (3799)..(4473)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(179)
<223> Pgro

<220>
<221> misc_feature
<222> (180)..(1313)
<223> metA

<400> 31
agcggcttaa agtttggctg ccatgtgaat ttttagcacc ctcaacagtt gagtgctggc 60

actctcgggg gtagagtgcc aaataggttg tttgacacac agttgttcac ccgcgacgac 120

ggctgtgctg gaaacccaca accggcacac acaaaatttt tctcatggag ggattcatca 180

tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat gtctccaccg 240

aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt gaataccgcg 300

tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact ggagattcca 360

acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt 420

actgcgtgat ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga cctggctcca 480

tgcatccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg 540

taaacgccga aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac cacggtcgcc gcagtacttg 600

gtggttccat gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtaccca gaaactgttg 660

gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaatc ggcattcaat 720

ccgcccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat 780

ccggctgcaa cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg catcgcccac ctcacctacc 840

gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac gaaaacccac 900

tcggtcccta ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga atcctacttg gactaccaag 960

cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt cttgctcacc gacgccctca 1020

accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa tccatcaaag 1080

ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac cagcaagaac 1140

acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgtatcc cctgtcggcc 1200

acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaac ttcttcagcc 1260

tcatctcccc agacgaagac aacccttcga cctacatcga gttctacatc taacatatga 1320

ctagttcgga cctagggata tcgtcgacat cgatgctctt ctgcgttaat taacaattgg 1380

gatcctctag acccgggatt taaatcgcta gcgggctgct aaaggaagcg gaacacgtag 1440

aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg 1500

acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct tacatggcga 1560

tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc 1620

tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaggatc 1680

tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt 1740

gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat 1800

gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgcag 1860

gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac 1920

gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac 1980

gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg gcaggatctc 2040

ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg 2100

ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag 2160

cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat 2220

caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgag 2280

gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc 2340

ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg 2400

ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg 2460

ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct tctatcgcct tcttgacgag 2520

ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat 2580

cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc 2640

gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgcccacg 2700

ctagcggcgc gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 2760

cgcatcaggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg 2820

cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat 2880

aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 2940

gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc 3000

tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 3060

agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 3120

ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 3180

taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 3240

gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 3300

gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 3360

ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 3420

ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 3480

gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 3540

caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 3600

taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc 3660

ggccgcggcc gcgcaaagtc ccgcttcgtg aaaattttcg tgccgcgtga ttttccgcca 3720

aaaactttaa cgaacgttcg ttataatggt gtcatgacct tcacgacgaa gtactaaaat 3780

tggcccgaat catcagctat ggatctctct gatgtcgcgc tggagtccga cgcgctcgat 3840

gctgccgtcg atttaaaaac ggtgatcgga tttttccgag ctctcgatac gacggacgcg 3900

ccagcatcac gagactgggc cagtgccgcg agcgacctag aaactctcgt ggcggatctt 3960

gaggagctgg ctgacgagct gcgtgctcgg ccagcgccag gaggacgcac agtagtggag 4020

gatgcaatca gttgcgccta ctgcggtggc ctgattcctc cccggcctga cccgcgagga 4080

cggcgcgcaa aatattgctc agatgcgtgt cgtgccgcag ccagccgcga gcgcgccaac 4140

aaacgccacg ccgaggagct ggaggcggct aggtcgcaaa tggcgctgga agtgcgtccc 4200

ccgagcgaaa ttttggccat ggtcgtcaca gagctggaag cggcagcgag aattatcgcg 4260

atcgtggcgg tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaatg ccgcgtttcg tgtgccgtgg 4320

ccgcccagga cgtgtcagcg ccgccaccac ctgcaccgaa tcggcagcag cgtcgcgcgt 4380

cgaaaaagcg cacaggcggc aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttgaa 4440

cgccccgtga gcggtaactc acagggcgtc ggctaacccc cagtccaaac ctgggagaaa 4500

gcgctcaaaa atgactctag cggattcacg agacattgac acaccggcct ggaaattttc 4560

cgctgatctg ttcgacaccc atcccgagct cgcgctgcga tcacgtggct ggacgagcga 4620

agaccgccgc gaattcctcg ctcacctggg cagagaaaat ttccagggca gcaagacccg 4680

cgacttcgcc agcgcttgga tcaaagaccc ggacacggag aaacacagcc gaagttatac 4740

cgagttggtt caaaatcgct tgcccggtgc cagtatgttg ctctgacgca cgcgcagcac 4800

gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg gaaaatcgag 4860

cacgtaaacc ccgaggtcta cgcgattttg gagcgctggg cacgcctgga aaaagcgcca 4920

gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcatctggct cattgatccg 4980

gtgtatgccg cagcaggcat gagcagcccg aatatgcgcc tgctggctgc aacgaccgag 5040

gaaatgaccc gcgttttcgg cgctgaccag gctttttcac ataggctgag ccgtggccac 5100

tgcactctcc gacgatccca gccgtaccgc tggcatgccc agcacaatcg cgtggatcgc 5160

ctagctgatc ttatggaggt tgctcgcatg atctcaggca cagaaaaacc taaaaaacgc 5220

tatgagcagg agttttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg 5280

gaagcaaaag cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgccgctga agcgtctgga 5340

gagctgatcg acggcgtccg tgtcctctgg actgctccag ggcgtgccgc ccgtgatgag 5400

acggcttttc gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg tgagcgccta 5460

aaagacacca agggtcatcg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca ggcggtcgga 5520

ggaggccgtg agcctgatct gccgccggac tgtgaccgcc agacggattg gccgcgacgt 5580

gtgcgcggct acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctcgtcagac agagacgcag 5640

agccagccga ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa aaaggccgca 5700

gaacgctgga aagacccaaa cagtgagtac gcccgagcac agcgagaaaa actagctaag 5760

tccagtcaac gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt 5820

atgactgttg agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt 5880

agcgtgtcac gtcagaccgt gaatagagca cttaaggtct gcgggcattg aacttccacg 5940

aggacgccga aagcttccca gtaaatgtgc catctcgtag gcagaaaacg gttcccccgt 6000

agggtctctc tcttggcctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg 6060

gggctcacac cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac 6120

tgctcccaaa gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaagcct tgccccgcgg 6180

aaatttcctc caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaag cttctttcac cctaaattcg 6240

agagattgga ttcttaccgt ggaaattctt cgcaaaaatc gtcccctgat cgcccttgcg 6300

acgttggcgt cggtgccgct ggttgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgctcg 6360

atttaaatct cg 6372

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

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK 1849

<400> 32
gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 33
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature

<223> 内部名称: BK 1862

<400> 33
atgcccaccc tcgcgcc 17

<210> 34
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf 26

<400> 34
gagaggatcc cccccacgac aatggaac 28

<210> 35
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf 27)

<400> 35
cctgaaggcg cgagggtggg cattacgggg cgatcctcct tatg 44

<210> 36
<211> 6389
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> pCLiK5MCS P EF-TS metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1767)..(2558)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4839)..(5960)
<223> Rep 蛋白

<220>
<221> misc_feature
<222> (2825)..(3685)
<223> Ori-Ec (pMB) (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (3831)..(4505)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1217)..(1411)
<223> P EF-TS (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(1216)
<223> metA (互补)

<400> 36
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagtt 60

cggacctagg gatatcgtcg acttagatgt agaactcgat gtaggtcgaa gggttgtctt 120

cgtctgggga gatgaggctg aagaagttcc tcacgatgcg atccatttgg cggctttcgg 180

tgaggaaagc atcgtggccg acaggggata cgatttttgc cattgccagt agatttccca 240

ggtttctgga gaggtgttct tgctggtggt aggggtacaa aatatcggta tctacgcctg 300

cgacaaggac tggaactttg atggattcga gtgccttgtt gaggcctccg cggtcgcgac 360

caatgtcgtg gcggttgagg gcgtcggtga gcaagacgta ggagccggcg tcgaaacgct 420

gtactagctt gtctgcttgg tagtccaagt aggattccac ggcgaagcgc tggtcgggct 480

tgcggtaggg accgagtggg ttttcgttct tttgggcttt ggtgccgaag cgttcgtcga 540

tttctagttc gccacggtag gtgaggtggg cgatgcgtcg ggcggcgccg agtccggtgg 600

ctgggttgca gccggattcg tagtagttgc cttcgtgcca gtggtggtcg ttttcaatcg 660

ccttaatttg ggcggattga atgccgattt gccaggcgct ggcgcgtgca gaaactgcaa 720

gaacagcagc tgcgccaaca gtttctgggt acattgcggc ccactctagg gtgcgggcac 780

cacccatgga accaccaagt actgcggcga ccgtggtgat gccgagtgcg tcgaggaatt 840

gtttttcggc gtttacctga tcacgaatgg acgtggcggg gaagcgatta ccccagaaat 900

ttccatctgg atgcatggag ccaggtccgg tggaaccgtt gcaaccaccg atgacgttgg 960

tacagatcac gcagtaaata tcagtgttga tggctttgcc gggaccgagc aagtcagccc 1020

accaatcggc tgcgttggaa tctccagtga gggcgtgttc gatgagaacg acattgctgc 1080

gtccttcttt atctacgcgg tattcacccc agcggtgata ggcgatttca gcgtttgtaa 1140

tgattgctcc ggcttcggtg gagacatcac cgatcgcttg gatttcaagt tgacctgaag 1200

gcgcgagggt gggcattacg gggcgatcct ccttatgtat ggataattaa tgctttacaa 1260

gcttaggtta gggcacagta gccctacccg cccgtctaaa aagtgatcgt acaggtattc 1320

agtcgattac gttgcgacac ggcgggctgg ctgcccaaaa agcccccacg gcgatgaaat 1380

tttaaaagtc aaagttccat tgtcgtgggg gggatcctct agacccggga tttaaatcgc 1440

tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cggtgctgac 1500

cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa 1560

agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag 1620

caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag 1680

taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc 1740

aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 1800

cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 1860

ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 1920

acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 1980

cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 2040

tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 2100

aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 2160

cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc 2220

ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 2280

ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 2340

gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 2400

tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 2460

ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc 2520

agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 2580

aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 2640

ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 2700

cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg 2760

aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc 2820

tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 2880

cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag 2940

gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc 3000

gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag 3060

gactataaag ataccaggcg tttcccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 3120

ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc 3180

atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg 3240

tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt 3300

ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 3360

gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca 3420

ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag 3480

ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca 3540

agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg 3600

ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa 3660

aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg 3720

tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg 3780

gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga atcatcagct atggatctct 3840

ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg 3900

gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg 3960

cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc 4020

ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg 4080

gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt 4140

gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg 4200

ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca 4260

cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc ggtgcccgca ggcatgacaa 4320

acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc 4380

acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg 4440

ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg 4500

tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa aaatgactct agcggattca 4560

cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc tgttcgacac ccatcccgag 4620

ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg 4680

ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac 4740

ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggt 4800

gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg 4860

tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt 4920

tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg 4980

ggaaatgcca gctcatctgg ctcattgatc cggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc 5040

cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc 5100

aggctttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc 5160

gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga tcttatggag gttgctcgca 5220

tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca ggagttttct agcggacggg 5280

cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag 5340

caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct 5400

ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg 5460

gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac caagggtcat cgagcctacg 5520

agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg 5580

actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc 5640

cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc gaggcgaaaa gctctggcca 5700

ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg gaaagaccca aacagtgagt 5760

acgcccgagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta 5820

aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggt ttatgactgt tgagggagag actggctcgt 5880

ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag 5940

cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaatgt 6000

gccatctcgt aggcagaaaa cggttccccc gtagggtctc tctcttggcc tcctttctag 6060

gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc 6120

cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca aagatcttca aagccactgc 6180

cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac 6240

ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc 6300

ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgcgc 6360

ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6389

<210> 37
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK 1753

<400> 37
ggatctagag ttctgtgaaa aacaccgtg 29

<210> 38
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK 1754

<400> 38
gcgactagtg ccccacaaat aaaaaacac 29

<210> 39
<211> 5156
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> H247

<400> 39
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagtt 60

cggacctagg gatatcgtcg acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggatcct 120

ctagagttct gtgaaaaaca ccgtggggca gtttctgctt cgcggtgttt tttatttgtg 180

gggcactaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 240

aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 300

caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 360

agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 420

ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 480

gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 540

aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 600

actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 660

ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 720

aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 780

ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 840

tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 900

tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 960

gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 1020

aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 1080

atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 1140

tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 1200

tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 1260

tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 1320

tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc 1380

acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 1440

ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 1500

tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 1560

gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 1620

ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 1680

acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1740

cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1800

caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 1860

gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 1920

tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 1980

aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 2040

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 2100

cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 2160

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 2220

tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 2280

ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 2340

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 2400

aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 2460

gccgcggccg cgcaaagtcc cgcttcgtga aaattttcgt gccgcgtgat tttccgccaa 2520

aaactttaac gaacgttcgt tataatggtg tcatgacctt cacgacgaag tactaaaatt 2580

ggcccgaatc atcagctatg gatctctctg atgtcgcgct ggagtccgac gcgctcgatg 2640

ctgccgtcga tttaaaaacg gtgatcggat ttttccgagc tctcgatacg acggacgcgc 2700

cagcatcacg agactgggcc agtgccgcga gcgacctaga aactctcgtg gcggatcttg 2760

aggagctggc tgacgagctg cgtgctcggc cagcgccagg aggacgcaca gtagtggagg 2820

atgcaatcag ttgcgcctac tgcggtggcc tgattcctcc ccggcctgac ccgcgaggac 2880

ggcgcgcaaa atattgctca gatgcgtgtc gtgccgcagc cagccgcgag cgcgccaaca 2940

aacgccacgc cgaggagctg gaggcggcta ggtcgcaaat ggcgctggaa gtgcgtcccc 3000

cgagcgaaat tttggccatg gtcgtcacag agctggaagc ggcagcgaga attatcgcga 3060

tcgtggcggt gcccgcaggc atgacaaaca tcgtaaatgc cgcgtttcgt gtgccgtggc 3120

cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc gtcgcgcgtc 3180

gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa aatgttgaac 3240

gccccgtgag cggtaactca cagggcgtcg gctaaccccc agtccaaacc tgggagaaag 3300

cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg gaaattttcc 3360

gctgatctgt tcgacaccca tcccgagctc gcgctgcgat cacgtggctg gacgagcgaa 3420

gaccgccgcg aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag caagacccgc 3480

gacttcgcca gcgcttggat caaagacccg gacacggaga aacacagccg aagttatacc 3540

gagttggttc aaaatcgctt gcccggtgcc agtatgttgc tctgacgcac gcgcagcacg 3600

cagccgtgct tgtcctggac attgatgtgc cgagccacca ggccggcggg aaaatcgagc 3660

acgtaaaccc cgaggtctac gcgattttgg agcgctgggc acgcctggaa aaagcgccag 3720

cttggatcgg cgtgaatcca ctgagcggga aatgccagct catctggctc attgatccgg 3780

tgtatgccgc agcaggcatg agcagcccga atatgcgcct gctggctgca acgaccgagg 3840

aaatgacccg cgttttcggc gctgaccagg ctttttcaca taggctgagc cgtggccact 3900

gcactctccg acgatcccag ccgtaccgct ggcatgccca gcacaatcgc gtggatcgcc 3960

tagctgatct tatggaggtt gctcgcatga tctcaggcac agaaaaacct aaaaaacgct 4020

atgagcagga gttttctagc ggacgggcac gtatcgaagc ggcaagaaaa gccactgcgg 4080

aagcaaaagc acttgccacg cttgaagcaa gcctgccgag cgccgctgaa gcgtctggag 4140

agctgatcga cggcgtccgt gtcctctgga ctgctccagg gcgtgccgcc cgtgatgaga 4200

cggcttttcg ccacgctttg actgtgggat accagttaaa agcggctggt gagcgcctaa 4260

aagacaccaa gggtcatcga gcctacgagc gtgcctacac cgtcgctcag gcggtcggag 4320

gaggccgtga gcctgatctg ccgccggact gtgaccgcca gacggattgg ccgcgacgtg 4380

tgcgcggcta cgtcgctaaa ggccagccag tcgtccctgc tcgtcagaca gagacgcaga 4440

gccagccgag gcgaaaagct ctggccacta tgggaagacg tggcggtaaa aaggccgcag 4500

aacgctggaa agacccaaac agtgagtacg cccgagcaca gcgagaaaaa ctagctaagt 4560

ccagtcaacg acaagctagg aaagctaaag gaaatcgctt gaccattgca ggttggttta 4620

tgactgttga gggagagact ggctcgtggc cgacaatcaa tgaagctatg tctgaattta 4680

gcgtgtcacg tcagaccgtg aatagagcac ttaaggtctg cgggcattga acttccacga 4740

ggacgccgaa agcttcccag taaatgtgcc atctcgtagg cagaaaacgg ttcccccgta 4800

gggtctctct cttggcctcc tttctaggtc gggctgattg ctcttgaagc tctctagggg 4860

ggctcacacc ataggcagat aacgttcccc accggctcgc ctcgtaagcg cacaaggact 4920

gctcccaaag atcttcaaag ccactgccgc gactgccttc gcgaagcctt gccccgcgga 4980

aatttcctcc accgagttcg tgcacacccc tatgccaagc ttctttcacc ctaaattcga 5040

gagattggat tcttaccgtg gaaattcttc gcaaaaatcg tcccctgatc gcccttgcga 5100

cgttggcgtc ggtgccgctg gttgcgcttg gcttgaccga cttgatcagc ggccgc 5156

<210> 40
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK 1848

<400> 40
gagaactagt agctgccaat tattccggg 29

<210> 41
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK 1849

<400> 41
gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 42
<211> 6464
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: pG A4 (H344)

<400> 42
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagta 60

gctgccaatt attccgggct tgtgacccgc tacccgataa ataggtcggc tgaaaaattt 120

cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga 180

agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga 240

ttttttaccc atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga 300

tgtctccacc gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg 360

tgaataccgc gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac 420

tggagattcc aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa 480

cactgatatt tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg 540

acctggctcc atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat 600

tcgtgatcag gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc 660

cgcagtactt ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc 720

agaaactgtt ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat 780

cggcattcaa tccgcccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa 840

ctactacgaa tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgac gcatcgccca 900

cctcacctac cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa 960

cgaaaaccca ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt 1020

ggactaccaa gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac 1080

cgacgccctc aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga 1140

atccatcaaa gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt acccctacca 1200

ccagcaagaa cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc 1260

ccctgtcggc cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa 1320

cttcttcagc ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat 1380

ctaagtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agagttctgt 1440

gaaaaacacc gtggggcagt ttctgcttcg cggtgttttt tatttgtggg gcactagacc 1500

cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc 1560

agaaacggtg ctgaccccgg atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg 1620

caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg 1680

cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg 1740

ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg 1800

gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat 1860

tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac 1920

agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc 1980

tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc 2040

tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag 2100

cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc 2160

ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg 2220

atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc 2280

ggatggaagc cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc 2340

cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga 2400

cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca 2460

tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg 2520

atattgctga agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg 2580

ccgctcccga ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgagcgg 2640

gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac ctgccatcac gagatttcga 2700

ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg 2760

gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccacgcta gcggcgcgcc 2820

ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct 2880

cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 2940

cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 3000

acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 3060

ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 3120

ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 3180

gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 3240

gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 3300

ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 3360

actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 3420

gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 3480

ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 3540

ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 3600

gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 3660

tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 3720

tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcg 3780

caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc cgcgtgattt tccgccaaaa actttaacga 3840

acgttcgtta taatggtgtc atgaccttca cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat 3900

cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt 3960

taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag 4020

actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg 4080

acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt 4140

gcgcctactg cggtggcctg attcctcccc ggcctgaccc gcgaggacgg cgcgcaaaat 4200

attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg 4260

aggagctgga ggcggctagg tcgcaaatgg cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt 4320

tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc 4380

ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt 4440

gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac 4500

aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg 4560

gtaactcaca gggcgtcggc taacccccag tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg 4620

actctagcgg attcacgaga cattgacaca ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc 4680

gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa 4740

ttcctcgctc acctgggcag agaaaatttc cagggcagca agacccgcga cttcgccagc 4800

gcttggatca aagacccgga cacggagaaa cacagccgaa gttataccga gttggttcaa 4860

aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg 4920

tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccccg 4980

aggtctacgc gattttggag cgctgggcac gcctggaaaa agcgccagct tggatcggcg 5040

tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag 5100

caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc tggctgcaac gaccgaggaa atgacccgcg 5160

ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata ggctgagccg tggccactgc actctccgac 5220

gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc acaatcgcgt ggatcgccta gctgatctta 5280

tggaggttgc tcgcatgatc tcaggcacag aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt 5340

tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac 5400

ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg 5460

gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc 5520

acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg 5580

gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc 5640

ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg 5700

tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc 5760

gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag 5820

acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac 5880

aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg 5940

gagagactgg ctcgtggccg acaatcaatg aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc 6000

agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag 6060

cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt cccccgtagg gtctctctct 6120

tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctaggggggg ctcacaccat 6180

aggcagataa cgttccccac cggctcgcct cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat 6240

cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac 6300

cgagttcgtg cacaccccta tgccaagctt ctttcaccct aaattcgaga gattggattc 6360

ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg 6420

tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg ccgc 6464

<210> 43
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature

<223> 内部名称: BK 1695

<400> 43
gagactcgag ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf16

<400> 44
gagaactagt gtggctacga ctttcgcagc 30

<210> 45
<211> 6604
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: pCliK5MCS PeftuPsod metA (H473)

<400> 45
tcgatttaaa tctcgagggc cgttaccctg cgaatgtcca cagggtagct ggtagtttga 60

aaatcaacgc cgttgccctt aggattcagt aactggcaca ttttgtaatg cgctagatct 120

gtgtgctcag tcttccaggc tgcttatcac agtgaaagca aaaccaattc gtggctgcga 180

aagtcgtagc cacactagta gctgccaatt attccgggct tgtgacccgc tacccgataa 240

ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt 300

cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg 360

tgcggaaacc tacgaaagga ttttttaccc atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt 420

gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc gaagccggag caatcattac aaacgctgaa 480

atcgcctatc accgctgggg tgaataccgc gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt 540

ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc 600

ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt 660

ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc atgcatccag atggaaattt ctggggtaat 720

cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca 780

ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta 840

gagtgggccg caatgtaccc agaaactgtt ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca 900

cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa tccgcccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac 960

caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa tccggctgca acccagccac cggactcggc 1020

gccgcccgac gcatcgccca cctcacctac cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc 1080

ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc 1140

ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc 1200

ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga 1260

ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc 1320

gatattttgt acccctacca ccagcaagaa cacctctcca gaaacctggg aaatctactg 1380

gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa 1440

atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg 1500

acctacatcg agttctacat ctaagtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt 1560

gggatcctct agagttctgt gaaaaacacc gtggggcagt ttctgcttcg cggtgttttt 1620

tatttgtggg gcactagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcggaa 1680

cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg ctgaccccgg atgaatgtca gctactgggc 1740

tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac 1800

atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg 1860

ggcgccctct ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc 1920

aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg 1980

catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt 2040

cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc 2100

agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact 2160

gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt 2220

gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca 2280

ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat 2340

gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg 2400

catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga 2460

agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga 2520

cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa 2580

tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga 2640

catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt 2700

cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct 2760

tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac 2820

ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc 2880

gttttccggg acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc 2940

gcccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 3000

aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt 3060

tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 3120

aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 3180

aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 3240

tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 3300

ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 3360

cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 3420

ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga 3480

ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc 3540

gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 3600

agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 3660

cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca 3720

aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 3780

aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 3840

ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 3900

aaaggccggc cgcggccgcg caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc cgcgtgattt 3960

tccgccaaaa actttaacga acgttcgtta taatggtgtc atgaccttca cgacgaagta 4020

ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg agtccgacgc 4080

gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc tcgatacgac 4140

ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa ctctcgtggc 4200

ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag gacgcacagt 4260

agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cggtggcctg attcctcccc ggcctgaccc 4320

gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca gccgcgagcg 4380

cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga ggcggctagg tcgcaaatgg cgctggaagt 4440

gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg cagcgagaat 4500

tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg cgtttcgtgt 4560

gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg gcagcagcgt 4620

cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat acctgaaaaa 4680

tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca gggcgtcggc taacccccag tccaaacctg 4740

ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca ccggcctgga 4800

aattttccgc tgatctgttc gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca cgtggctgga 4860

cgagcgaaga ccgccgcgaa ttcctcgctc acctgggcag agaaaatttc cagggcagca 4920

agacccgcga cttcgccagc gcttggatca aagacccgga cacggagaaa cacagccgaa 4980

gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc tgacgcacgc 5040

gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg ccggcgggaa 5100

aatcgagcac gtaaaccccg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac gcctggaaaa 5160

agcgccagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca tctggctcat 5220

tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc tggctgcaac 5280

gaccgaggaa atgacccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata ggctgagccg 5340

tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc acaatcgcgt 5400

ggatcgccta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgatc tcaggcacag aaaaacctaa 5460

aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc 5520

cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc 5580

gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc gtgccgcccg 5640

tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga 5700

gcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc 5760

ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga cggattggcc 5820

gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga 5880

gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa 5940

ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact 6000

agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg 6060

ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctcgtggccg acaatcaatg aagctatgtc 6120

tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac 6180

ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt 6240

ccccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc 6300

tctaggggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct cgtaagcgca 6360

caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc 6420

cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacaccccta tgccaagctt ctttcaccct 6480

aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc 6540

ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg 6600

ccgc 6604

<210> 46
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf64

<400> 46
gagaactagt ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 47
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf65

<400> 47
gcgcgagggt gggcattgta tgtcctcctg gacttc 36

<210> 48
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK1862)

<400> 48
atgcccaccc tcgcgcc 17

<210> 49
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK1849

<400> 49
gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 50
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK 1697

<400> 50
gagactcgag agctgccaat tattccggg 29

<210> 51
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf17

<400> 51
gagaactagt taggtttccg caccgagc 28

<210> 52
<211> 6609
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: pCLiK5MCS Psod Peft metA (H505)

<400> 52
tcgatttaaa tctcgagagc tgccaattat tccgggcttg tgacccgcta cccgataaat 60

aggtcggctg aaaaatttcg ttgcaatatc aacaaaaagg cctatcattg ggaggtgtcg 120

caccaagtac ttttgcgaag cgccatctga cggattttca aaagatgtat atgctcggtg 180

cggaaaccta actagtggcc gttaccctgc gaatgtccac agggtagctg gtagtttgaa 240

aatcaacgcc gttgccctta ggattcagta actggcacat tttgtaatgc gctagatctg 300

tgtgctcagt cttccaggct gcttatcaca gtgaaagcaa aaccaattcg tggctgcgaa 360

agtcgtagcc accacgaagt ccaggaggac atacaatgcc caccctcgcg ccttcaggtc 420

aacttgaaat ccaagcgatc ggtgatgtct ccaccgaagc cggagcaatc attacaaacg 480

ctgaaatcgc ctatcaccgc tggggtgaat accgcgtaga taaagaagga cgcagcaatg 540

tcgttctcat cgaacacgcc ctcactggag attccaacgc agccgattgg tgggctgact 600

tgctcggtcc cggcaaagcc atcaacactg atatttactg cgtgatctgt accaacgtca 660

tcggtggttg caacggttcc accggacctg gctccatgca tccagatgga aatttctggg 720

gtaatcgctt ccccgccacg tccattcgtg atcaggtaaa cgccgaaaaa caattcctcg 780

acgcactcgg catcaccacg gtcgccgcag tacttggtgg ttccatgggt ggtgcccgca 840

ccctagagtg ggccgcaatg tacccagaaa ctgttggcgc agctgctgtt cttgcagttt 900

ctgcacgcgc cagcgcctgg caaatcggca ttcaatccgc ccaaattaag gcgattgaaa 960

acgaccacca ctggcacgaa ggcaactact acgaatccgg ctgcaaccca gccaccggac 1020

tcggcgccgc ccgacgcatc gcccacctca cctaccgtgg cgaactagaa atcgacgaac 1080

gcttcggcac caaagcccaa aagaacgaaa acccactcgg tccctaccgc aagcccgacc 1140

agcgcttcgc cgtggaatcc tacttggact accaagcaga caagctagta cagcgtttcg 1200

acgccggctc ctacgtcttg ctcaccgacg ccctcaaccg ccacgacatt ggtcgcgacc 1260

gcggaggcct caacaaggca ctcgaatcca tcaaagttcc agtccttgtc gcaggcgtag 1320

ataccgatat tttgtacccc taccaccagc aagaacacct ctccagaaac ctgggaaatc 1380

tactggcaat ggcaaaaatc gtatcccctg tcggccacga tgctttcctc accgaaagcc 1440

gccaaatgga tcgcatcgtg aggaacttct tcagcctcat ctccccagac gaagacaacc 1500

cttcgaccta catcgagttc tacatctaag tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa 1560

caattgggat cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcggtg 1620

ttttttattt gtggggcact agacccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag 1680

cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac 1740

tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg 1800

cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca 1860

gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg 1920

ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg 1980

tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg 2040

ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg 2100

ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 2160

gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca 2220

gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg 2280

gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat 2340

gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa 2400

catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg 2460

gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg 2520

cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg 2580

gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat 2640

caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac 2700

cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc 2760

cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc 2820

ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg 2880

gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt 2940

tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta 3000

aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg 3060

gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 3120

gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 3180

cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 3240

aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 3300

tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 3360

ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 3420

ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 3480

cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 3540

ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 3600

gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 3660

atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 3720

aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 3780

aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 3840

gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 3900

cttttaaagg ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt 3960

gattttccgc caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg 4020

aagtactaaa attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc 4080

gacgcgctcg atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat 4140

acgacggacg cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc 4200

gtggcggatc ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc 4260

acagtagtgg aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct 4320

gacccgcgag gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc 4380

gagcgcgcca acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg 4440

gaagtgcgtc ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg 4500

agaattatcg cgatcgtggc ggtgcccgca ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt 4560

cgtgtgccgt ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc 4620

agcgtcgcgc gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg 4680

aaaaatgttg aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa 4740

acctgggaga aagcgctcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc 4800

ctggaaattt tccgctgatc tgttcgacac ccatcccgag ctcgcgctgc gatcacgtgg 4860

ctggacgagc gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg 4920

cagcaagacc cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag 4980

ccgaagttat accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggt gccagtatgt tgctctgacg 5040

cacgcgcagc acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc 5100

gggaaaatcg agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg 5160

gaaaaagcgc cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg 5220

ctcattgatc cggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct 5280

gcaacgaccg aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggcttttc acataggctg 5340

agccgtggcc actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat 5400

cgcgtggatc gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa 5460

cctaaaaaac gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga 5520

aaagccactg cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct 5580

gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc 5640

gcccgtgatg agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct 5700

ggtgagcgcc taaaagacac caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct 5760

caggcggtcg gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat 5820

tggccgcgac gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag 5880

acagagacgc agagccagcc gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt 5940

aaaaaggccg cagaacgctg gaaagaccca aacagtgagt acgcccgagc acagcgagaa 6000

aaactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt 6060

gcaggttggt ttatgactgt tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct 6120

atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat 6180

tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa 6240

cggttccccc gtagggtctc tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga 6300

agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa 6360

gcgcacaagg actgctccca aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc 6420

cttgccccgc ggaaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc 6480

accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg 6540

atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgcgc ttggcttgac cgacttgatc 6600

agcggccgc 6609

<210> 53
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK1701

<400> 53
gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

<210> 54
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf018

<400> 54
gagaactagt attttgtgtg tgccggttgt g 31

<210> 55
<211> 6583
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: pCLiK5MCS PgroPsod metA (H472)

<400> 55
tcgatttaaa tctcgagcgg cttaaagttt ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa 60

cagttgagtg ctggcactct cgggggtaga gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg 120

ttcacccgcg acgacggctg tgctggaaac ccacaaccgg cacacacaaa atactagtag 180

ctgccaatta ttccgggctt gtgacccgct acccgataaa taggtcggct gaaaaatttc 240

gttgcaatat caacaaaaag gcctatcatt gggaggtgtc gcaccaagta cttttgcgaa 300

gcgccatctg acggattttc aaaagatgta tatgctcggt gcggaaacct acgaaaggat 360

tttttaccca tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat 420

gtctccaccg aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt 480

gaataccgcg tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact 540

ggagattcca acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac 600

actgatattt actgcgtgat ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga 660

cctggctcca tgcatccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt 720

cgtgatcagg taaacgccga aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac cacggtcgcc 780

gcagtacttg gtggttccat gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtaccca 840

gaaactgttg gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaatc 900

ggcattcaat ccgcccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac 960

tactacgaat ccggctgcaa cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg catcgcccac 1020

ctcacctacc gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac 1080

gaaaacccac tcggtcccta ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga atcctacttg 1140

gactaccaag cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt cttgctcacc 1200

gacgccctca accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa 1260

tccatcaaag ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac 1320

cagcaagaac acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgtatcc 1380

cctgtcggcc acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaac 1440

ttcttcagcc tcatctcccc agacgaagac aacccttcga cctacatcga gttctacatc 1500

taagtcgaca tcgatgctct tctgcgttaa ttaacaattg ggatcctcta gagttctgtg 1560

aaaaacaccg tggggcagtt tctgcttcgc ggtgtttttt atttgtgggg cactagaccc 1620

gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca 1680

gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc 1740

aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc 1800

ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg 1860

gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg 1920

atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 1980

gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 2040

gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 2100

ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 2160

atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc 2220

gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 2280

tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 2340

tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 2400

gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 2460

agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 2520

ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 2580

cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga 2640

tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 2700

cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 2760

actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat 2820

tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg 2880

atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg 2940

gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc 3000

ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 3060

agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 3120

catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 3180

tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 3240

gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 3300

ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 3360

cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 3420

caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 3480

ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 3540

taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc 3600

taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 3660

cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg 3720

ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 3780

gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 3840

catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcgc 3900

aaagtcccgc ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt ccgccaaaaa ctttaacgaa 3960

cgttcgttat aatggtgtca tgaccttcac gacgaagtac taaaattggc ccgaatcatc 4020

agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg ctcgatgctg ccgtcgattt 4080

aaaaacggtg atcggatttt tccgagctct cgatacgacg gacgcgccag catcacgaga 4140

ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg gatcttgagg agctggctga 4200

cgagctgcgt gctcggccag cgccaggagg acgcacagta gtggaggatg caatcagttg 4260

cgcctactgc ggtggcctga ttcctccccg gcctgacccg cgaggacggc gcgcaaaata 4320

ttgctcagat gcgtgtcgtg ccgcagccag ccgcgagcgc gccaacaaac gccacgccga 4380

ggagctggag gcggctaggt cgcaaatggc gctggaagtg cgtcccccga gcgaaatttt 4440

ggccatggtc gtcacagagc tggaagcggc agcgagaatt atcgcgatcg tggcggtgcc 4500

cgcaggcatg acaaacatcg taaatgccgc gtttcgtgtg ccgtggccgc ccaggacgtg 4560

tcagcgccgc caccacctgc accgaatcgg cagcagcgtc gcgcgtcgaa aaagcgcaca 4620

ggcggcaaga agcgataagc tgcacgaata cctgaaaaat gttgaacgcc ccgtgagcgg 4680

taactcacag ggcgtcggct aacccccagt ccaaacctgg gagaaagcgc tcaaaaatga 4740

ctctagcgga ttcacgagac attgacacac cggcctggaa attttccgct gatctgttcg 4800

acacccatcc cgagctcgcg ctgcgatcac gtggctggac gagcgaagac cgccgcgaat 4860

tcctcgctca cctgggcaga gaaaatttcc agggcagcaa gacccgcgac ttcgccagcg 4920

cttggatcaa agacccggac acggagaaac acagccgaag ttataccgag ttggttcaaa 4980

atcgcttgcc cggtgccagt atgttgctct gacgcacgcg cagcacgcag ccgtgcttgt 5040

cctggacatt gatgtgccga gccaccaggc cggcgggaaa atcgagcacg taaaccccga 5100

ggtctacgcg attttggagc gctgggcacg cctggaaaaa gcgccagctt ggatcggcgt 5160

gaatccactg agcgggaaat gccagctcat ctggctcatt gatccggtgt atgccgcagc 5220

aggcatgagc agcccgaata tgcgcctgct ggctgcaacg accgaggaaa tgacccgcgt 5280

tttcggcgct gaccaggctt tttcacatag gctgagccgt ggccactgca ctctccgacg 5340

atcccagccg taccgctggc atgcccagca caatcgcgtg gatcgcctag ctgatcttat 5400

ggaggttgct cgcatgatct caggcacaga aaaacctaaa aaacgctatg agcaggagtt 5460

ttctagcgga cgggcacgta tcgaagcggc aagaaaagcc actgcggaag caaaagcact 5520

tgccacgctt gaagcaagcc tgccgagcgc cgctgaagcg tctggagagc tgatcgacgg 5580

cgtccgtgtc ctctggactg ctccagggcg tgccgcccgt gatgagacgg cttttcgcca 5640

cgctttgact gtgggatacc agttaaaagc ggctggtgag cgcctaaaag acaccaaggg 5700

tcatcgagcc tacgagcgtg cctacaccgt cgctcaggcg gtcggaggag gccgtgagcc 5760

tgatctgccg ccggactgtg accgccagac ggattggccg cgacgtgtgc gcggctacgt 5820

cgctaaaggc cagccagtcg tccctgctcg tcagacagag acgcagagcc agccgaggcg 5880

aaaagctctg gccactatgg gaagacgtgg cggtaaaaag gccgcagaac gctggaaaga 5940

cccaaacagt gagtacgccc gagcacagcg agaaaaacta gctaagtcca gtcaacgaca 6000

agctaggaaa gctaaaggaa atcgcttgac cattgcaggt tggtttatga ctgttgaggg 6060

agagactggc tcgtggccga caatcaatga agctatgtct gaatttagcg tgtcacgtca 6120

gaccgtgaat agagcactta aggtctgcgg gcattgaact tccacgagga cgccgaaagc 6180

ttcccagtaa atgtgccatc tcgtaggcag aaaacggttc ccccgtaggg tctctctctt 6240

ggcctccttt ctaggtcggg ctgattgctc ttgaagctct ctagggggc tcacaccata 6300

ggcagataac gttccccacc ggctcgcctc gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc 6360

ttcaaagcca ctgccgcgac tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat ttcctccacc 6420

gagttcgtgc acacccctat gccaagcttc tttcacccta aattcgagag attggattct 6480

taccgtggaa attcttcgca aaaatcgtcc cctgatcgcc cttgcgacgt tggcgtcggt 6540

gccgctggtt gcgcttggct tgaccgactt gatcagcggc cgc 6583

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: BK1782

<400> 56
tcgagagatt ggattcttac 20

<210> 57
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Haf63

<400> 57
tctcggtacc ccgcaccgag catatacatc 30

<210> 58
<211> 6450
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: H479 (pCliK5MCS PEF-Ts metA)

<400> 58

aaatctcgag cttggtctat agtggctagg tacccccca cgacaatgga actttgactt 60

ttaaaatttc atcgccgtgg gggctttttg ggcagccagc ccgccgtgtc gcaacgtaat 120

cgactgaata cctgtacgat cacttttag acgggcgggt agggctactg tgccctaacc 180

taagcttgta aagcattaat tatccataca taaggaggat cgccccgtaa tgcccaccct 240

cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat gtctccaccg aagccggagc 300

aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt gaataccgcg tagataaaga 360

aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact ggagattcca acgcagccga 420

ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt actgcgtgat 480

ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga cctggctcca tgcatccaga 540

tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg taaacgccga 600

aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac cacggtcgcc gcagtacttg gtggttccat 660

gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtaccca gaaactgttg gcgcagctgc 720

tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaatc ggcattcaat ccgcccaaat 780

taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat ccggctgcaa 840

cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg catcgcccac ctcacctacc gtggcgaact 900

agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac gaaaacccac tcggtcccta 960

ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga atcctacttg gactaccaag cagacaagct 1020

agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt cttgctcacc gacgccctca accgccacga 1080

cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa tccatcaaag ttccagtcct 1140

tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac cagcaagaac acctctccag 1200

aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgtatcc cctgtcggcc acgatgcttt 1260

cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaac ttcttcagcc tcatctcccc 1320

agacgaagac aacccttcga cctacatcga gttctacatc taagtcgaca tcgatgctct 1380

tctgcgttaa ttaacaattg ggatcctcta gagttctgtg aaaaacaccg tggggcagtt 1440

tctgcttcgc ggtgtttttt atttgtgggg cactagaccc gggatttaaa tcgctagcgg 1500

gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca gaaacggtgc tgaccccgga 1560

tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc aagcgcaaag agaaagcagg 1620

tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg 1680

aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact 1740

ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagatct gatcaagaga 1800

caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg 1860

cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg 1920

ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt 1980

ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg 2040

gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc gggaagggac tggctgctat 2100

tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat 2160

ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg 2220

accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg 2280

atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc 2340

tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc 2400

cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg 2460

tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg 2520

gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca 2580

tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac 2640

cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg ccttctatga 2700

aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga 2760

tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg gccggcccgg tgtgaaatac 2820

cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 2880

actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa 2940

tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 3000

aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc 3060

ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat 3120

aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc 3180

cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct 3240

cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg 3300

aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc 3360

cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 3420

ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa 3480

ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta 3540

gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg ttttttttgtt tgcaagcagc 3600

agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg 3660

acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 3720

tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcgc aaagtcccgc ttcgtgaaaa 3780

ttttcgtgcc gcgtgatttt ccgccaaaaa ctttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca 3840

tgaccttcac gacgaagtac taaaattggc ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg 3900

tcgcgctgga gtccgacgcg ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt 3960

tccgagctct cgatacgacg gacgcgccag catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg 4020

acctagaaac tctcgtggcg gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gctcggccag 4080

cgccaggagg acgcacagta gtggaggatg caatcagttg cgcctactgc ggtggcctga 4140

ttcctccccg gcctgacccg cgaggacggc gcgcaaaata ttgctcagat gcgtgtcgtg 4200

ccgcagccag ccgcgagcgc gccaacaaac gccacgccga ggagctggag gcggctaggt 4260

cgcaaatggc gctggaagtg cgtcccccga gcgaaatttt ggccatggtc gtcacagagc 4320

tggaagcggc agcgagaatt atcgcgatcg tggcggtgcc cgcaggcatg acaaacatcg 4380

taaatgccgc gtttcgtgtg ccgtggccgc ccaggacgtg tcagcgccgc caccacctgc 4440

accgaatcgg cagcagcgtc gcgcgtcgaa aaagcgcaca ggcggcaaga agcgataagc 4500

tgcacgaata cctgaaaaat gttgaacgcc ccgtgagcgg taactcacag ggcgtcggct 4560

aacccccagt ccaaacctgg gagaaagcgc tcaaaaatga ctctagcgga ttcacgagac 4620

attgacacac cggcctggaa attttccgct gatctgttcg acacccatcc cgagctcgcg 4680

ctgcgatcac gtggctggac gagcgaagac cgccgcgaat tcctcgctca cctgggcaga 4740

gaaaatttcc agggcagcaa gacccgcgac ttcgccagcg cttggatcaa agacccggac 4800

acggagaaac acagccgaag ttataccgag ttggttcaaa atcgcttgcc cggtgccagt 4860

atgttgctct gacgcacgcg cagcacgcag ccgtgcttgt cctggacatt gatgtgccga 4920

gccaccaggc cggcgggaaa atcgagcacg taaaccccga ggtctacgcg attttggagc 4980

gctgggcacg cctggaaaaa gcgccagctt ggatcggcgt gaatccactg agcgggaaat 5040

gccagctcat ctggctcatt gatccggtgt atgccgcagc aggcatgagc agcccgaata 5100

tgcgcctgct ggctgcaacg accgaggaaa tgacccgcgt tttcggcgct gaccaggctt 5160

tttcacatag gctgagccgt ggccactgca ctctccgacg atcccagccg taccgctggc 5220

atgcccagca caatcgcgtg gatcgcctag ctgatcttat ggaggttgct cgcatgatct 5280

caggcacaga aaaacctaaa aaacgctatg agcaggagtt ttctagcgga cgggcacgta 5340

tcgaagcggc aagaaaagcc actgcggaag caaaagcact tgccacgctt gaagcaagcc 5400

tgccgagcgc cgctgaagcg tctggagagc tgatcgacgg cgtccgtgtc ctctggactg 5460

ctccagggcg tgccgcccgt gatgagacgg cttttcgcca cgctttgact gtgggatacc 5520

agttaaaagc ggctggtgag cgcctaaaag acaccaaggg tcatcgagcc tacgagcgtg 5580

cctacaccgt cgctcaggcg gtcggaggag gccgtgagcc tgatctgccg ccggactgtg 5640

accgccagac ggattggccg cgacgtgtgc gcggctacgt cgctaaaggc cagccagtcg 5700

tccctgctcg tcagacagag acgcagagcc agccgaggcg aaaagctctg gccactatgg 5760

gaagacgtgg cggtaaaaag gccgcagaac gctggaaaga cccaaacagt gagtacgccc 5820

gagcacagcg agaaaaacta gctaagtcca gtcaacgaca agctaggaaa gctaaaggaa 5880

atcgcttgac cattgcaggt tggtttatga ctgttgaggg agagactggc tcgtggccga 5940

caatcaatga agctatgtct gaatttagcg tgtcacgtca gaccgtgaat agagcactta 6000

aggtctgcgg gcattgaact tccacgagga cgccgaaagc ttcccagtaa atgtgccatc 6060

tcgtaggcag aaaacggttc ccccgtaggg tctctctctt ggcctccttt ctaggtcggg 6120

ctgattgctc ttgaagctct ctaggggggc tcacaccata ggcagataac gttccccacc 6180

ggctcgcctc gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac 6240

tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat ttcctccacc gagttcgtgc acacccctat 6300

gccaagcttc tttcacccta aattcgagag attggattct taccgtggaa attcttcgca 6360

aaaatcgtcc cctgatcgcc cttgcgacgt tggcgtcggt gccgctggtt gcgcttggct 6420

tgaccgactt gatcagcggc cgctcgattt 6450

<210> 59
<211> 6759
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: H501 (pCliK5MCS Pgro Psod Pefts metA)

<400> 59
aaatctcgag cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga 60

gtgctggcac tctcgggggt agagtgccaa ataggttgtt tgacacacag ttgttcaccc 120

gcgacgacgg ctgtgctgga aacccacaac cggcacacac aaaatactag tagctgccaa 180

ttattccggg cttgtgaccc gctacccgat aaataggtcg gctgaaaaat ttcgttgcaa 240

tatcaacaaa aaggcctatc attgggaggt gtcgcaccaa gtacttttgc gaagcgccat 300

ctgacggatt ttcaaaagat gtatatgctc ggtgcggggt acccccccac gacaatggaa 360

ctttgacttt taaaatttca tcgccgtggg ggctttttgg gcagccagcc cgccgtgtcg 420

caacgtaatc gactgaatac ctgtacgatc actttttaga cgggcgggta gggctactgt 480

gccctaacct aagcttgtaa agcattaatt atccatacat aaggaggatc gccccgtaat 540

gcccaccctc gcgccttcag gtcaacttga aatccaagcg atcggtgatg tctccaccga 600

agccggagca atcattacaa acgctgaaat cgcctatcac cgctggggtg aataccgcgt 660

agataaagaa ggacgcagca atgtcgttct catcgaacac gccctcactg gagattccaa 720

cgcagccgat tggtgggctg acttgctcgg tcccggcaaa gccatcaaca ctgatattta 780

ctgcgtgatc tgtaccaacg tcatcggtgg ttgcaacggt tccaccggac ctggctccat 840

gcatccagat ggaaatttct ggggtaatcg cttccccgcc acgtccattc gtgatcaggt 900

aaacgccgaa aaacaattcc tcgacgcact cggcatcacc acggtcgccg cagtacttgg 960

tggttccatg ggtggtgccc gcaccctaga gtgggccgca atgtacccag aaactgttgg 1020

cgcagctgct gttcttgcag tttctgcacg cgccagcgcc tggcaaatcg gcattcaatc 1080

cgcccaaatt aaggcgattg aaaacgacca ccactggcac gaaggcaact actacgaatc 1140

cggctgcaac ccagccaccg gactcggcgc cgcccgacgc atcgcccacc tcacctaccg 1200

tggcgaacta gaaatcgacg aacgcttcgg caccaaagcc caaaagaacg aaaacccact 1260

cggtccctac cgcaagcccg accagcgctt cgccgtggaa tcctacttgg actaccaagc 1320

agacaagcta gtacagcgtt tcgacgccgg ctcctacgtc ttgctcaccg acgccctcaa 1380

ccgccacgac attggtcgcg accgcggagg cctcaacaag gcactcgaat ccatcaaagt 1440

tccagtcctt gtcgcaggcg tagataccga tattttgtac ccctaccacc agcaagaaca 1500

cctctccaga aacctgggaa atctactggc aatggcaaaa atcgtatccc ctgtcggcca 1560

cgatgctttc ctcaccgaaa gccgccaaat ggatcgcatc gtgaggaact tcttcagcct 1620

catctcccca gacgaagaca acccttcgac ctacatcgag ttctacatct aagtcgacat 1680

cgatgctctt ctgcgttaat taacaattgg gatcctctag agttctgtga aaaacaccgt 1740

ggggcagttt ctgcttcgcg gtgtttttta tttgtggggc actagacccg ggatttaaat 1800

cgctagcggg ctgctaaagg aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct 1860

gaccccggat gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga 1920

gaaagcaggt agcttgcagt gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga 1980

cagcaagcga accggaattg ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca 2040

aagtaaactg gatggctttc ttgccgccaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg 2100

atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt 2160

ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct 2220

gctctgatgc cgccgtgttc cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga 2280

ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg 2340

ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact 2400

ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg 2460

agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct 2520

gcccattcga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg 2580

gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt 2640

tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg 2700

cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc 2760

ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag 2820

agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt 2880

cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt 2940

cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc 3000

cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca 3060

gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccacgctagc ggcgcgccgg ccggcccggt 3120

gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttcct 3180

cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa 3240

aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 3300

aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc 3360

tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga 3420

caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 3480

cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 3540

ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 3600

gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 3660

agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 3720

gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 3780

acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 3840

gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt 3900

gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 3960

cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat 4020

caaaaaggat cttcacctag atccttttaa aggccggccg cggccgcgca aagtcccgct 4080

tcgtgaaaat tttcgtgccg cgtgattttc cgccaaaaac tttaacgaac gttcgttata 4140

atggtgtcat gaccttcacg acgaagtact aaaattggcc cgaatcatca gctatggatc 4200

tctctgatgt cgcgctggag tccgacgcgc tcgatgctgc cgtcgattta aaaacggtga 4260

tcggattttt ccgagctctc gatacgacgg acgcgccagc atcacgagac tgggccagtg 4320

ccgcgagcga cctagaaact ctcgtggcgg atcttgagga gctggctgac gagctgcgtg 4380

ctcggccagc gccaggagga cgcacagtag tggaggatgc aatcagttgc gcctactgcg 4440

gtggcctgat tcctccccgg cctgacccgc gaggacggcg cgcaaaatat tgctcagatg 4500

cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg 4560

cggctaggtc gcaaatggcg ctggaagtgc gtcccccgag cgaaattttg gccatggtcg 4620

tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta tcgcgatcgt ggcggtgccc gcaggcatga 4680

caaacatcgt aaatgccgcg tttcgtgtgc cgtggccgcc caggacgtgt cagcgccgcc 4740

accacctgca ccgaatcggc agcagcgtcg cgcgtcgaaa aagcgcacag gcggcaagaa 4800

gcgataagct gcacgaatac ctgaaaaatg ttgaacgccc cgtgagcggt aactcacagg 4860

gcgtcggcta acccccagtc caaacctggg agaaagcgct caaaaatgac tctagcggat 4920

tcacgagaca ttgacacacc ggcctggaaa ttttccgctg atctgttcga cacccatccc 4980

gagctcgcgc tgcgatcacg tggctggacg agcgaagacc gccgcgaatt cctcgctcac 5040

ctgggcagag aaaatttcca gggcagcaag acccgcgact tcgccagcgc ttggatcaaa 5100

gacccggaca cggagaaaca cagccgaagt tataccgagt tggttcaaaa tcgcttgccc 5160

ggtgccagta tgttgctctg acgcacgcgc agcacgcagc cgtgcttgtc ctggacattg 5220

atgtgccgag ccaccaggcc ggcgggaaaa tcgagcacgt aaaccccgag gtctacgcga 5280

ttttggagcg ctgggcacgc ctggaaaaag cgccagcttg gatcggcgtg aatccactga 5340

gcgggaaatg ccagctcatc tggctcattg atccggtgta tgccgcagca ggcatgagca 5400

gcccgaatat gcgcctgctg gctgcaacga ccgaggaaat gacccgcgtt ttcggcgctg 5460

accaggcttt ttcacatagg ctgagccgtg gccactgcac tctccgacga tcccagccgt 5520

accgctggca tgcccagcac aatcgcgtgg atcgcctagc tgatcttatg gaggttgctc 5580

gcatgatctc aggcacagaa aaacctaaaa aacgctatga gcaggagttt tctagcggac 5640

gggcacgtat cgaagcggca agaaaagcca ctgcggaagc aaaagcactt gccacgcttg 5700

aagcaagcct gccgagcgcc gctgaagcgt ctggagagct gatcgacggc gtccgtgtcc 5760

tctggactgc tccagggcgt gccgcccgtg atgagacggc ttttcgccac gctttgactg 5820

tgggatacca gttaaaagcg gctggtgagc gcctaaaaga caccaagggt catcgagcct 5880

acgagcgtgc ctacaccgtc gctcaggcgg tcggaggagg ccgtgagcct gatctgccgc 5940

cggactgtga ccgccagacg gattggccgc gacgtgtgcg cggctacgtc gctaaaggcc 6000

agccagtcgt ccctgctcgt cagacagaga cgcagagcca gccgaggcga aaagctctgg 6060

ccactatggg aagacgtggc ggtaaaaagg ccgcagaacg ctggaaagac ccaaacagtg 6120

agtacgcccg agcacagcga gaaaaactag ctaagtccag tcaacgacaa gctaggaaag 6180

ctaaaggaaa tcgcttgacc attgcaggtt ggtttatgac tgttgaggga gagactggct 6240

cgtggccgac aatcaatgaa gctatgtctg aatttagcgt gtcacgtcag accgtgaata 6300

gagcacttaa ggtctgcggg cattgaactt ccacgaggac gccgaaagct tcccagtaaa 6360

tgtgccatct cgtaggcaga aaacggttcc cccgtagggt ctctctcttg gcctcctttc 6420

taggtcgggc tgattgctct tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg 6480

ttccccaccg gctcgcctcg taagcgcaca aggactgctc ccaaagatct tcaaagccac 6540

tgccgcgact gccttcgcga agccttgccc cgcggaaatt tcctccaccg agttcgtgca 6600

cacccctatg ccaagcttct ttcaccctaa attcgagaga ttggattctt accgtggaaa 6660

ttcttcgcaa aaatcgtccc ctgatcgccc ttgcgacgtt ggcgtcggtg ccgctggttg 6720

cgcttggctt gaccgacttg atcagcggcc gctcgattt 6759

<210> 60
<211> 6780
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>

<221> misc_feature
<223> 内部名称: H502 (pCliK5MCS Peftu Psod Pefts metA)

<400> 60
aaatctcgag ggccgttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa 60

cgccgttgcc cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct 120

cagtcttcca ggctgcttat cacagtgaaa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt 180

agccacacta gtagctgcca attattccgg gcttgtgacc cgctacccga taaataggtc 240

ggctgaaaaa tttcgttgca atatcaacaa aaaggcctat cattgggagg tgtcgcacca 300

agtacttttg cgaagcgcca tctgacggat tttcaaaaga tgtatatgct cggtgcgggg 360

taccccccca cgacaatgga actttgactt ttaaaatttc atcgccgtgg gggctttttg 420

ggcagccagc ccgccgtgtc gcaacgtaat cgactgaata cctgtacgat cacttttag 480

acgggcgggt agggctactg tgccctaacc taagcttgta aagcattaat tatccataca 540

taaggaggat cgccccgtaa tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc 600

gatcggtgat gtctccaccg aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca 660

ccgctggggt gaataccgcg tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca 720

cgccctcact ggagattcca acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa 780

agccatcaac actgatattt actgcgtgat ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg 840

ttccaccgga cctggctcca tgcatccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc 900

cacgtccatt cgtgatcagg taaacgccga aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac 960

cacggtcgcc gcagtacttg gtggttccat gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc 1020

aatgtaccca gaaactgttg gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc 1080

ctggcaaatc ggcattcaat ccgcccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca 1140

cgaaggcaac tactacgaat ccggctgcaa cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg 1200

catcgcccac ctcacctacc gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc 1260

ccaaaagaac gaaaacccac tcggtcccta ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga 1320

atcctacttg gactaccaag cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt 1380

cttgctcacc gacgccctca accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa 1440

ggcactcgaa tccatcaaag ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta 1500

cccctaccac cagcaagaac acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa 1560

aatcgtatcc cctgtcggcc acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat 1620

cgtgaggaac ttcttcagcc tcatctcccc agacgaagac aacccttcga cctacatcga 1680

gttctacatc taagtcgaca tcgatgctct tctgcgttaa ttaacaattg ggatcctcta 1740

gagttctgtg aaaaacaccg tggggcagtt tctgcttcgc ggtgtttttt atttgtgggg 1800

cactagaccc gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag 1860

ccagtccgca gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa 1920

gggaaaacgc aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc 1980

tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg 2040

gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat 2100

ggcgcagggg atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac 2160

aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact 2220

gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc 2280

gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg 2340

cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg 2400

tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt 2460

catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc 2520

atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag 2580

cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg 2640

ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc 2700

tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt 2760

ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg 2820

ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt 2880

acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct 2940

tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg 3000

agatttcgat tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga 3060

cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag 3120

cggcgcgccg gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 3180

tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc 3240

gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 3300

caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 3360

tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 3420

gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 3480

ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 3540

cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 3600

tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 3660

tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag 3720

cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga 3780

agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga 3840

agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg 3900

gtagcggtgg ttttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag 3960

aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 4020

ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc 4080

gcggccgcgc aaagtcccgc ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt ccgccaaaaa 4140

ctttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca tgaccttcac gacgaagtac taaaattggc 4200

ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg ctcgatgctg 4260

ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt tccgagctct cgatacgacg gacgcgccag 4320

catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg gatcttgagg 4380

agctggctga cgagctgcgt gctcggccag cgccaggagg acgcacagta gtggaggatg 4440

caatcagttg cgcctactgc ggtggcctga ttcctccccg gcctgacccg cgaggacggc 4500

gcgcaaaata ttgctcagat gcgtgtcgtg ccgcagccag ccgcgagcgc gccaacaaac 4560

gccacgccga ggagctggag gcggctaggt cgcaaatggc gctggaagtg cgtcccccga 4620

gcgaaatttt ggccatggtc gtcacagagc tggaagcggc agcgagaatt atcgcgatcg 4680

tggcggtgcc cgcaggcatg acaaacatcg taaatgccgc gtttcgtgtg ccgtggccgc 4740

ccaggacgtg tcagcgccgc caccacctgc accgaatcgg cagcagcgtc gcgcgtcgaa 4800

aaagcgcaca ggcggcaaga agcgataagc tgcacgaata cctgaaaaat gttgaacgcc 4860

ccgtgagcgg taactcacag ggcgtcggct aacccccagt ccaaacctgg gagaaagcgc 4920

tcaaaaatga ctctagcgga ttcacgagac attgacacac cggcctggaa attttccgct 4980

gatctgttcg acacccatcc cgagctcgcg ctgcgatcac gtggctggac gagcgaagac 5040

cgccgcgaat tcctcgctca cctgggcaga gaaaatttcc agggcagcaa gacccgcgac 5100

ttcgccagcg cttggatcaa agacccggac acggagaaac acagccgaag ttataccgag 5160

ttggttcaaa atcgcttgcc cggtgccagt atgttgctct gacgcacgcg cagcacgcag 5220

ccgtgcttgt cctggacatt gatgtgccga gccaccaggc cggcgggaaa atcgagcacg 5280

taaaccccga ggtctacgcg attttggagc gctgggcacg cctggaaaaa gcgccagctt 5340

ggatcggcgt gaatccactg agcgggaaat gccagctcat ctggctcatt gatccggtgt 5400

atgccgcagc aggcatgagc agcccgaata tgcgcctgct ggctgcaacg accgaggaaa 5460

tgacccgcgt tttcggcgct gaccaggctt tttcacatag gctgagccgt ggccactgca 5520

ctctccgacg atcccagccg taccgctggc atgcccagca caatcgcgtg gatcgcctag 5580

ctgatcttat ggaggttgct cgcatgatct caggcacaga aaaacctaaa aaacgctatg 5640

agcaggagtt ttctagcgga cgggcacgta tcgaagcggc aagaaaagcc actgcggaag 5700

caaaagcact tgccacgctt gaagcaagcc tgccgagcgc cgctgaagcg tctggagagc 5760

tgatcgacgg cgtccgtgtc ctctggactg ctccagggcg tgccgcccgt gatgagacgg 5820

cttttcgcca cgctttgact gtgggatacc agttaaaagc ggctggtgag cgcctaaaag 5880

acaccaaggg tcatcgagcc tacgagcgtg cctacaccgt cgctcaggcg gtcggaggag 5940

gccgtgagcc tgatctgccg ccggactgtg accgccagac ggattggccg cgacgtgtgc 6000

gcggctacgt cgctaaaggc cagccagtcg tccctgctcg tcagacagag acgcagagcc 6060

agccgaggcg aaaagctctg gccactatgg gaagacgtgg cggtaaaaag gccgcagaac 6120

gctggaaaga cccaaacagt gagtacgccc gagcacagcg agaaaaacta gctaagtcca 6180

gtcaacgaca agctaggaaa gctaaaggaa atcgcttgac cattgcaggt tggtttatga 6240

ctgttgaggg agagactggc tcgtggccga caatcaatga agctatgtct gaatttagcg 6300

tgtcacgtca gaccgtgaat agagcactta aggtctgcgg gcattgaact tccacgagga 6360

cgccgaaagc ttcccagtaa atgtgccatc tcgtaggcag aaaacggttc ccccgtaggg 6420

tctctctctt ggcctccttt ctaggtcggg ctgattgctc ttgaagctct ctaggggggc 6480

tcacaccata ggcagataac gttccccacc ggctcgcctc gtaagcgcac aaggactgct 6540

cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat 6600

ttcctccacc gagttcgtgc acacccctat gccaagcttc tttcacccta aattcgagag 6660

attggattct taccgtggaa attcttcgca aaaatcgtcc cctgatcgcc cttgcgacgt 6720

tggcgtcggt gccgctggtt gcgcttggct tgaccgactt gatcagcggc cgctcgattt 6780

<210> 61
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 61
gagagagaga cgcgtcccag tggctgagac gcatc 35

<210> 62
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 62
ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg 34

<210> 63
<211> 4323
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>

<221> misc_feature
<223> 内部名称: pCLiK5 MCS integrativ SacB (又称为 pCIS)

<220>
<221> misc_feature
<222> (457)..(1248)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3840)..(4302)
<223> PsacB (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2418)..(3839)
<223> SacB (互补)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-Ec (pMB) (互补)

<400> 63
tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60

tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120

tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180

cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240

gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 300

ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360

ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420

agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480

gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540

atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600

gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660

tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720

agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780

cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840

gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg 900

gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960

gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020

ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac 1080

tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140

gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200

cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260

tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320

ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380

tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg 1440

gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500

gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560

cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680

cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800

cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1860

gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1920

ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 1980

cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040

aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100

tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220

tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280

ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2340

agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400

cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460

ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520

tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580

ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgttagg atcaagatcc 2640

atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700

acataaccaa gcatgtaaat atcgttagac gtaatgccgt caatcgtcat ttttgatccg 2760

cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820

tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca ctttttttcag tgtgtaatca 2880

tcgtttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940

ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000

ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060

actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg 3120

cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180

ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240

gatacgttaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300

gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt 3360

gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420

ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaatc 3480

gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatgcaa agacgatgtg gtagccgtga 3540

tagtttgcga cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600

tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660

ttttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720

gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780

agcagtgcgg tagtaaaggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcatc 3840

gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcggtctgc ttcttccagc cctcctgttt 3900

gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960

caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020

ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080

attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140

actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200

gcataaagtt gccttttaa tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260

taatagtgaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320

atc 4323

<210> 64
<211> 5860
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<222> (155)..(1420)
<223> lysC

<220>
<221> misc_feature
<222> (3935)..(5356)
<223> sacB (枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis))

<220>
<221> misc_feature
<222> (5357)..(5819)
<223> 启动子 sacB 互补

<220>
<221> misc_feature
<222> (1974)..(2765)
<223> kanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3032)..(3892)
<223> Ori-EC 互补

<220>
<221> misc_feature
<222> (3913)..(3934)
<223> sacB 下游区(互补)

<400> 64

cccggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60

agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120

aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180

cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240

caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300

acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360

cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420

cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480

aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540

gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600

gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660

gtgtgagatt tactcggacg ttgacggtgt gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa 720

tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggctc 780

caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840

acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900

tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960

tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaaggtt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020

agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080

catcaccttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140

tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200

cgtgggtgct ggcatgaagt ctcacccagg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260

cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320

ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380

cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt 1440

acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccaggt tatgcgcacc 1500

cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560

gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620

atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680

aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740

caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800

agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 1860

ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920

gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 1980

aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040

actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100

ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160

aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220

ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280

tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340

tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 2400

gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460

aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520

atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580

tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640

tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700

tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 2760

tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc 2820

acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2880

ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940

tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000

gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3060

ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 3120

acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180

cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240

caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccccctggaa 3300

gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360

tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 3420

aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 3540

cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 3600

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660

tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720

ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840

aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900

gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960

gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020

tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080

tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140

cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200

cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa 4260

tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320

cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggt ttcatcactt 4380

ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440

ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500

ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560

cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620

tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcatc gatgaactgc tgtacatttt 4680

gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740

aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800

gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860

aacctgacca ttcttgtgtt tggtctttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc 4920

tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980

gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040

cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100

cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160

aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220

tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280

gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340

acttttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400

ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460

tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgcctg 5520

ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580

tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640

gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700

tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760

tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820

gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 65
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 65
cggcaccacc gacatcatct tcacctgccc tcgttccg 38

<210> 66

<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 66
cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tggtgccg 38

<210> 67
<211> 1263
<212> DNA
<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>
<221> misc_feature
<223> lysC基因

<400> 67
gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggt tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60

aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120

tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180

ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc 240

gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300

ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggtcgt 360

gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca gggtgttaat 420

aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg 480

ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cggtgtgtat 540

accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600

atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgct 660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720

attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780

gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840

aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900

tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960

cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080

accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140

tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200

ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260

cgc 1263

<210> 68
<211> 5860
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: pCIS sysC thr311ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (155)..(1420)
<223> lysC

<220>
<221> misc_feature
<222> (3935)..(5356)
<223> sacB (枯草芽孢杆菌)互补

<220>
<221> misc_feature
<222> (5357)..(5819)
<223> 启动子 sacB 互补

<220>
<221> misc_feature
<222> (1974)..(2765)
<223> kanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3032)..(3892)
<223> ori-EC 互补

<400> 68
cccggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60

agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120

aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180

cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240

caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300

acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360

cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420

cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480

aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540

gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600

gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660

gtgtgagatt tactcggacg ttgacggtgt gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa 720

tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggctc 780

caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840

acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900

tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960

tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaaggtt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020

agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080

catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140

tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200

cgtgggtgct ggcatgaagt ctcacccagg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260

cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320

ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380

cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt 1440

acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccaggt tatgcgcacc 1500

cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560

gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620

atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680

aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740

caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800

agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 1860

ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920

gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 1980

aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040

actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100

ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160

aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220

ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280

tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340

tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 2400

gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460

aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520

atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580

tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640

tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700

tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 2760

tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc 2820

acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2880

ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940

tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000

gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3060

ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 3120

acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180

cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240

caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 3300

gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360

tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 3420

aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 3540

cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 3600

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660

tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720

ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840

aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900

gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960

gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020

tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080

tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140

cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200

cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa 4260

tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320

cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggt ttcatcactt 4380

ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440

ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500

ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560

cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620

tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcatc gatgaactgc tgtacatttt 4680

gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740

aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800

gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860

aacctgacca ttcttgtgtt tggtctttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc 4920

tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980

gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040

cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100

cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160

aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220

tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280

gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340

acttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400

ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460

tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgcctg 5520

ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580

tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640

gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700

tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760

tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820

gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 69
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Old38

<400> 69
acatccatgg tggccgttac cctgcgaat 29

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Old 39

<400> 70
tgtatgtcct cctggacttc 20

<210> 71
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Old40

<400> 71
gaagtccagg aggacataca atgaccaaca tccgcgtagc 40

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Old 37

<400> 72
gaaaccacac tgtttccttg c 21

<210> 73
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Old 32

<400> 73
atcaacgcgt cgacaccaca tcatcaatca c 31

<210> 74
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: Old33

<400> 74
atcaccatgg gttcttgtaa tcctccaaaa ttg 33

<210> 75
<211> 6187
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: pCIS Peftu ddh (pCLiK int sacB Peftu ddh)

<400> 75
tcgagctaaa ttagacgtcg cgtgcgatca gatcgtccaa gttctctggg gagagcaggt 60

atggagcaac ttcgaggacg gtgaaagctc cgctttggcc ctgctgcttc atgcggtgag 120

ctgcgcgacc gaaagcgatc tgtgaggaag cggtgaaatc tgggtttcgg tccagcttga 180

ggatgtattc cacggtgtgg ttgaagccac cggtgtcgcc ggtggtaatc acgtggccac 240

cgtgtggcat gccggtgtgc tcggagtcga aggttgcttc gtcgatgaag ttgacttcga 300

cttcgtagcc aacgaagtaa tcaggcatgg tgcggatgtc gttttcgatg cgctcgtgat 360

cggccgcgtc ggcaaccacg aagcattggc gcttgtgggt ttgctttccg gtaaggtcgc 420

cggcttcgcc gcggcgggcc ttttccaggg cgtcttcgga tgggagggtg tactggactg 480

cctttgaac gccagggatg cgtcgcaaag catcggagtg gccctgtgac aaacctgggc 540

cccagaaggt gtgctgctgg tgctcggcta agactgccgc tgcgtagacg cggttgatgg 600

agaacattcc tggatcccag ccggtagaga ccagtgcaac gttgccggct gcggtggcgg 660

cttcgttcat gacctggcgg tggcgtggga tgtcgcggtg gttgtcgtag gtgtctacgg 720

tgcaggcgaa ctgcgcgaac tttggtgcct gctcagggat gtcggtggcg gagcccatgc 780

acaggaacag cacgtccacg tcgtcggcgt gcttgtccac gtcggcgaca tcaaagactg 840

gcgtctttgt gtcgagggtg gcccggcgcg agaagattcc tacaaggtcc atgtcgggct 900

gcttggcaat aagcttttcg acgctgcgtc ccaggtttcc gtagcccacg atagctacgc 960

ggatgttggt cattgtatgt cctcctggac ttcgtggtgg ctacgacttt cgcagccacg 1020

aattggtttt gctttcactg tgataagcag cctggaagac tgagcacaca gatctagcgc 1080

attacaaaat gtgccagtta ctgaatccta agggcaacgg cgttgatttt caaactacca 1140

gctaccctgt ggacattcgc agggtaacgg ccaccatggg ttcttgtaat cctccaaaat 1200

tgtggtggca ctgtcctggt cgagcttacc gagatgcata cttagatgat gattcaggga 1260

catctctttc atcaggaccg aaagcgaacg tttcgtattg ttgagccttt tggttccacc 1320

acggatgcgc tgatctattt tcatggctcc cagcagtcag gatctgtggg gcgcagcttc 1380

accaacagga cttttgatcc gttgccgttc atggtggttt atccggatgg ggtggatcag 1440

cattggaatg atgcgcggtt gggtttggat gaaaataccc gccatttagg cattgatgat 1500

gtggggttct ttgtaaaact cgccacgcac ttgggcaaca cgtatggcat caagaggatc 1560

tttattgttg gctattccaa cggtgggcag atggtgttgc ggctcatgca tgaggttccc 1620

aagatgctca gtggcgctgc aaccattgca tccaacatgc cagttgcaga gaatacgctg 1680

ccgcaggtga aaaccttcaa gacacatccg gtgccttatt tggcgatggc tggaactgcc 1740

gatacttttt caccgtatga gggtggcgat gccggtattg gtcgcgaaca ccgccgtggc 1800

gtgggcatgt ccgcctttga ttcagctgcc tatattgccg cccgaaacgg actgaccgaa 1860

caccgccacg acgtgattga tgatgtggtg tcgacgcgtc atatgactag ttcggaccta 1920

gggatatcgt cgacatcgat gctcttctgc gttaattaac aattgggatc ctctagaccc 1980

gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca 2040

gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc 2100

aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc 2160

ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg 2220

gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg 2280

atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 2340

gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 2400

gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 2460

ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 2520

atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc 2580

gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 2640

tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 2700

tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 2760

gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 2820

agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 2880

ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 2940

cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga 3000

tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 3060

cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 3120

actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat 3180

tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg 3240

atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg 3300

gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc 3360

ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 3420

agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 3480

catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 3540

tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 3600

gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 3660

ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 3720

cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 3780

caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 3840

ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 3900

taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc 3960

taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 4020

cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg 4080

ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 4140

gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 4200

catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttta aaggccggcc gcggccgcca 4260

tcggcatttt cttttgcgtt tttatttgtt aactgttaat tgtccttgtt caaggatgct 4320

gtctttgaca acagatgttt tcttgccttt gatgttcagc aggaagctcg gcgcaaacgt 4380

tgattgtttg tctgcgtaga atcctctgtt tgtcatatag cttgtaatca cgacattgtt 4440

tcctttcgct tgaggtacag cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt taggatcaag 4500

atccattttt aacacaaggc cagttttgtt cagcggcttg tatgggccag ttaaagaatt 4560

agaaacataa ccaagcatgt aaatatcgtt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga 4620

tccgcgggag tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt tcgcgcgttc 4680

aatttcatct gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt tcagtgtgta 4740

atcatcgttt agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg tgcgtttttt 4800

atcgctttgc agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt tgccatagta 4860

tgctttgtta aataaagatt cttcgccttg gtagccatct tcagttccag tgtttgcttc 4920

aaatactaag tatttgtggc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca gcgtatggtt 4980

gtcgcctgag ctgtagttgc cttcatcgat gaactgctgt acattttgat acgttttcc 5040

gtcaccgtca aagattgatt tataatcctc tacaccgttg atgttcaaag agctgtctga 5100

tgctgatacg ttaacttgtg cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatgtt taccggagaa 5160

atcagtgtag aataaacgga tttttccgtc agatgtaaat gtggctgaac ctgaccattc 5220

ttgtgtttgg tcttttagga tagaatcatt tgcatcgaat ttgtcgctgt ctttaaagac 5280

gcggccagcg tttttccagc tgtcaataga agtttcgccg acttttttgat agaacatgta 5340

aatcgatgtg tcatccgcat ttttaggatc tccggctaat gcaaagacga tgtggtagcc 5400

gtgatagttt gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc aaacgtccag 5460

gccttttgca gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa cttgatattt 5520

ttcatttttt tgctgttcag ggatttgcag catatcatgg cgtgtaatat gggaaatgcc 5580

gtatgtttcc ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag ttgcgcctcc 5640

tgccagcagt gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact ttttgatgtt 5700

catcgttcat gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggt ctgcttcttc cagccctcct 5760

gtttgaagat ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaaga cctaaaatat gtaaggggtg 5820

acgccaaagt atacactttg ccctttacac attttaggtc ttgcctgctt tatcagtaac 5880

aaacccgcgc gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg attgcaactg 5940

gtctattttc ctcttttgtt tgatagaaaa tcataaaagg atttgcagac tacgggccta 6000

aagaactaaa aaatctatct gtttcttttc attctctgta ttttttatag tttctgttgc 6060

atgggcataa agttgccttt ttaatcacaa ttcagaaaat atcataatat ctcatttcac 6120

taaataatag tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg gccgctcgat 6180

ttaaatc 6187

<210> 76
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: CK461

<400> 76
cctgacgtcg caatataggc agctgaatc 29

<210> 77

<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: CK466

<400> 77
gcccaattgg ttcttgtaat cctccaaaa 29

<210> 78
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: CK426

<400> 78
cgccaattgt cgagggccgt taccct 26

<210> 79
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: CK463

<400> 79
gctacgcgga tgttggtcat gggtaaaaaa tcctttcgta 40

<210> 80
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: CK464

<400> 80
tacgaaagga ttttttaccc atgaccaaca tccgcgtagc 40

<210> 81
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: CK467

<400> 81
agacccgggt tagacgtcgc gtgcgatca 29

<210> 82
<211> 6233
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒

<220>
<221> misc_feature
<223> 内部名称: pCIS PeftuPsod ddh = pClik int sacB PeftuPsod ddh

<400> 82
gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca 60

gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc 120

aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc 180

ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg 240

gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg 300

atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 360

gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 420

gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 480

ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 540

atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc 600

gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 660

tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 720

tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 780

gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 840

agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 900

ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 960

cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga 1020

tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 1080

cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 1140

actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat 1200

tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg 1260

atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg 1320

gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc 1380

ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 1440

agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 1500

catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 1560

tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 1620

gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 1680

ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 1740

cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 1800

caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 1860

ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 1920

taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc 1980

taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 2040

cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg 2100

ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 2160

gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 2220

catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcca 2280

tcggcatttt cttttgcgtt tttatttgtt aactgttaat tgtccttgtt caaggatgct 2340

gtctttgaca acagatgttt tcttgccttt gatgttcagc aggaagctcg gcgcaaacgt 2400

tgattgtttg tctgcgtaga atcctctgtt tgtcatatag cttgtaatca cgacattgtt 2460

tcctttcgct tgaggtacag cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt taggatcaag 2520

atccattttt aacacaaggc agttttgtt cagcggcttg tatgggccag ttaaagaatt 2580

agaaacataa ccaagcatgt aaatatcgtt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga 2640

tccgcgggag tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt tcgcgcgttc 2700

aatttcatct gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt tcagtgtgta 2760

atcatcgttt agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg tgcgtttttt 2820

atcgctttgc agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt tgccatagta 2880

tgctttgtta aataaagatt cttcgccttg gtagccatct tcagttccag tgtttgcttc 2940

aaatactaag tatttgtggc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca gcgtatggtt 3000

gtcgcctgag ctgtagttgc cttcatcgat gaactgctgt acattttgat acgtttttcc 3060

gtcaccgtca aagattgatt tataatcctc tacaccgttg atgttcaaag agctgtctga 3120

tgctgatacg ttaacttgtg cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatgtt taccggagaa 3180

atcagtgtag aataaacgga tttttccgtc agatgtaaat gtggctgaac ctgaccattc 3240

ttgtgtttgg tcttttagga tagaatcatt tgcatcgaat ttgtcgctgt ctttaaagac 3300

gcggccagcg tttttccagc tgtcaataga agtttcgccg acttttttgat agaacatgta 3360

aatcgatgtg tcatccgcat ttttaggatc tccggctaat gcaaagacga tgtggtagcc 3420

gtgatagttt gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc aaacgtccag 3480

gccttttgca gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa cttgatattt 3540

ttcatttttt tgctgttcag ggatttgcag catatcatgg cgtgtaatat gggaaatgcc 3600

gtatgtttcc ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag ttgcgcctcc 3660

tgccagcagt gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact ttttgatgtt 3720

catcgttcat gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggt ctgcttcttc cagccctcct 3780

gtttgaagat ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaaga cctaaaatat gtaaggggtg 3840

acgccaaagt atacactttg ccctttacac attttaggtc ttgcctgctt tatcagtaac 3900

aaacccgcgc gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg attgcaactg 3960

gtctatttc ctcttttgtt tgatagaaaa tcataaaagg atttgcagac tacgggccta 4020

aagaactaaa aaatctatct gtttcttttc attctctgta ttttttatag tttctgttgc 4080

atgggcataa agttgccttt ttaatcacaa ttcagaaaat atcataatat ctcatttcac 4140

taaataatag tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg gccgctcgat 4200

ttaaatctcg agaggcctga cgtcgcaata taggcagctg aatcaaaggc ggacatgccc 4260

acgccacggc ggtgttcgcg accaataccg gcatcgccac cctcatacgg tgaaaaagta 4320

tcggcagttc cagccatcgc caaataaggc accggatgtg tcttgaaggt tttcacctgc 4380

ggcagcgtat tctctgcaac tggcatgttg gatgcaatgg ttgcagcgcc actgagcatc 4440

ttgggaacct catgcatgag ccgcaacacc atctgcccac cgttggaata gccaacaata 4500

aagatcctct tgatgccata cgtgttgccc aagtgcgtgg cgagttttac aaagaacccc 4560

acatcatcaa tgcctaaatg gcgggtattt tcatccaaac ccaaccgcgc atcattccaa 4620

tgctgatcca ccccatccgg ataaaccacc atgaacggca acggatcaaa agtcctgttg 4680

gtgaagctgc gccccacaga tcctgactgc tgggagccat gaaaatagat cagcgcatcc 4740

gtggtggaac caaaaggctc aacaatacga aacgttcgct ttcggtcctg atgaaagaga 4800

tgtccctgaa tcatcatcta agtatgcatc tcggtaagct cgaccaggac agtgccacca 4860

caattttgga ggattacaag aaccaattgt cgagggccgt taccctgcga atgtccacag 4920

ggtagctggt agtttgaaaa tcaacgccgt tgcccttagg attcagtaac tggcacattt 4980

tgtaatgcgc tagatctgtg tgctcagtct tccaggctgc ttatcacagt gaaagcaaaa 5040

ccaattcgtg gctgcgaaag tcgtagccac actagtagct gccaattatt ccgggcttgt 5100

gacccgctac ccgataaata ggtcggctga aaaatttcgt tgcaatatca acaaaaaggc 5160

ctatcattgg gaggtgtcgc accaagtact tttgcgaagc gccatctgac ggattttcaa 5220

aagatgtata tgctcggtgc ggaaacctac gaaaggattt tttacccatg accaacatcc 5280

gcgtagctat cgtgggctac ggaaacctgg gacgcagcgt cgaaaagctt attgccaagc 5340

agcccgacat ggaccttgta ggaatcttct cgcgccgggc caccctcgac acaaagacgc 5400

cagtctttga tgtcgccgac gtggacaagc acgccgacga cgtggacgtg ctgttcctgt 5460

gcatgggctc cgccaccgac atccctgagc aggcaccaaa gttcgcgcag ttcgcctgca 5520

ccgtagacac ctacgacaac caccgcgaca tcccacgcca ccgccaggtc atgaacgaag 5580

ccgccaccgc agccggcaac gttgcactgg tctctaccgg ctgggatcca ggaatgttct 5640

ccatcaaccg cgtctacgca gcggcagtct tagccgagca ccagcagcac accttctggg 5700

gcccaggttt gtcacagggc cactccgatg ctttgcgacg catccctggc gttcaaaagg 5760

cagtccagta caccctccca tccgaagacg ccctggaaaa ggcccgccgc ggcgaagccg 5820

gcgaccttac cggaaagcaa acccacaagc gccaatgctt cgtggttgcc gacgcggccg 5880

atcacgagcg catcgaaaac gacatccgca ccatgcctga ttacttcgtt ggctacgaag 5940

tcgaagtcaa cttcatcgac gaagcaacct tcgactccga gcacaccggc atgccacacg 6000

gtggccacgt gattaccacc ggcgacaccg gtggcttcaa ccacaccgtg gaatacatcc 6060

tcaagctgga ccgaaaccca gatttcaccg cttcctcaca gatcgctttc ggtcgcgcag 6120

ctcaccgcat gaagcagcag ggccaaagcg gagctttcac cgtcctcgaa gttgctccat 6180

acctgctctc cccagagaac ttggacgatc tgatcgcacg cgacgtctaa ccc 6233

<210> 83
<211> 7
<212> DNA
<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>
<221> misc_feature
<223> 核糖体结合序列

<400> 83
aggagga 7

<210> 84

<211> 1365
<212> DNA
<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>
<221> misc_feature
<223> RAX077

<400> 84
atgaatgatg agaatattca aagctccaac tatcagccat tcccgagttt tgacgattgg 60

aaacagatcg aggtgtcgct cttagatgtc atcgaatcct cacgccattt ttctgatttg 120

aaagatagca ctgatcgttc tgcgttagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180

gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcggttt tacccataca 240

gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300

cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360

actccaatct ctcagcaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420

agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480

aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540

gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600

gcagccgaga aggttattca agctgcctat gcccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660

tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat 720

cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780

gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840

actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaatc tggttcggct 900

aagctttcgg atgcgctacg ccccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960

aggctccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020

aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt ccccattcaa tctgccagag 1080

ggctataacg ctttccctga tagctattgt ctgaccttag ctttcaatag caactctcca 1140

aaacaaatct tccacccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200

agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260

gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320

gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

A) pEFTu

>EFTU\rxa01284\
ggccgttaccctgcgaatgtccacagggtagctggtagtttgaaaatcaacgccgttgccctaggattca
gtaactggcacattttgtaatgcgctagatctgtgtgctcagtcttcaggctgcttatcacagtgaaagc
aaaaccaattcgtggctgcgaaagtcgtagccaccacgaagtcc[redacted]cataca

ggccgttaccctgcgaatgtccacagggtagctggtagtttgaaaatcaacgccgttgccctaggattca
gtaactggcacattttgtaatgcgctagatctgtgtgctcagtcttcaggctgcttatcacagtgaaagc
aaaaccaattcgtggctgcgaaagtcgtagccac**CACGAAGTCC**

B) pGRO

>groES\rxa00497\
cggcttaaagtttggctgccatgtgaatttttagcaccctcaacagttgagtgctggcactctcggggg
tagagtgccaaataggttgtttgacacacagttgttcacccgcgacgacggctgtgctggaaacccacaa
ccggcacacacaaaatttttctcatggaggga[redacted]ttcatc

cggcttaaagtttggctgccatgtgaatttttagcaccctcaacagttgagtgctggcactctcggggg
tagagtgccaaataggttgtttgacacacagttgttcacccgcgacgacggctgtgctggaaacccacaa
ccggcacacacaaaat**TTTTCTCAT**

C) pEFTs

>elongationsfaktor \rxa01913\
cccccacgacaatggaactttgacttttaaaatttcatcgccgtgggggctttttgggcacagcccgc
cgtgtcgcaacgtaatcgactgaatacctgtacgatcacttttagacgggcggtagggctactgtgcc
ctaacctaagcttgtaaagcattaatttatccatacataaggaggatcgccccgta

cccccacgacaatggaactttgacttttaaaatttcatcgccgtgggggctttttgggcagccagcccgc
cgtgtcgcaacgtaatcgactgaatacctgtacgatcacttttagacgggcgggtagggctactgtgcc
ctaacctaagcttgtaaagcattaatttatccatacata

D) pSOD

>superoxid\dismutase\rxa03119\
agctgccaattattccgggcttgtgacccgctacccgataaataggtcggctgaaaatttcgttgcaat
atcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgtcgcaccaagtacttttggaagcgccatctgacggattt
tcaaaagatgtatatgctcggtgcggaaacctacgaaaggattttttaccc

agctgccaattattccgggcttgtgacccgctacccgataaataggtcggctgaaaaatttcgttgcaat
atcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgtcgcaccaagtacttttgcgaagcgccatctgacggattt
tcaaaagatgtatatgctcggtgcggaaacctaC

图 1