

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/53

C12N 15/54 C12N 9/02

C12N 9/04 C12N 9/10

C12P 13/04 C12P 41/00

C12N 1/21 C12N 15/63



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821216.6

[43] 公开日 2004 年 3 月 17 日

[11] 公开号 CN 1483080A

[22] 申请日 2001.10.22 [21] 申请号 01821216.6

[30] 优先权

[32] 2000.10.27 [33] US [31] 09/697,769

[86] 国际申请 PCT/NL01/00772 2001.10.22

[87] 国际公布 WO02/34921 英 2002.5.2

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.23

[71] 申请人 DSM 有限公司

地址 荷兰海尔伦

共同申请人 DSM 生物技术股份有限公司

约翰斯霍普金斯大学

[72] 发明人 C·A·汤森 M·冈斯奥

U·米勒 F·B·J·阿塞马范

T·桑科

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 32 页 序列表 20 页

[54] 发明名称 发酵生产 D - 对羟基苯基甘氨酸和
D - 苯基甘氨酸

[57] 摘要

本发明公开了一种新的制备对映体纯形式 D - 对羟基苯基甘氨酸(D - HPG)或 D - 苯甘氨酸(D - PG)的发酵方法。形成 D - HPG 和 D - PG 的前体取自普通的芳香族氨基酸途径,这些前体转变为对羟基苯乙醛酸或苯乙醛酸,最后通过立体转化 D - 转氨酶的作用转变为 D - HPG 或 D - PG。

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

1. 一种重组微生物生产 D-苯甘氨酸(D-PG)或 D-对羟基苯基甘氨酸(D-HPG)的发酵方法, 其中:
 - 5 a) 分别用于生产 D-PG 和 D-HPG 的丙酮酸苯酯和对羟基丙酮酸苯酯分别取自芳香族氨基酸途径;
 - b) 并分别转变为扁桃酸或对羟基扁桃酸;
 - c) 此后分别转变为苯乙醛酸或对羟基苯乙醛酸;
 - d) 此后通过立体转化 D-转氨酶的作用苯乙醛酸或对羟基苯乙醛酸分别转变为 D-苯甘氨酸或 D-对羟基苯基甘氨酸。
- 10 2. 权利要求 1 的方法, 其中所应用的微生物高效产生丙酮酸苯酯和对羟基丙酮酸苯酯。
3. 权利要求 2 的方法, 其中分别通过供给苯丙氨酸(对于丙酮酸苯酯而言)或酪氨酸(对于对羟基丙酮酸苯酯而言)高效产生丙酮酸苯酯或对羟基丙酮酸苯酯。
- 15 4. 权利要求 1-3 任一项的方法, 其中所述丙酮酸苯酯转变为扁桃酸或对羟基丙酮酸苯酯转变为对羟基扁桃酸经由对羟基扁桃酸合酶催化的一步酶反应实现。
5. 权利要求 1-3 任一项的方法, 其中所述丙酮酸苯酯转变为扁桃酸或对羟基丙酮酸苯酯转变为对羟基扁桃酸经由多步反应实现, 所述多步反应包括以下步骤: PP 或 HPP 分别转变为苯乙醛或对羟基苯乙醛, 然后分别转变为乙酸苯酯或对羟基乙酸苯酯, 最后分别转变为 MA 或 HMA。
- 20 6. 权利要求 1-5 任一项的方法, 其中在酶存在下催化对羟基扁桃酸和扁桃酸分别转变为对羟基苯乙醛酸和苯乙醛酸, 所述酶选自扁桃酸脱氢酶、对羟基扁桃酸脱氢酶、氧依赖性扁桃酸氧化酶和氧依赖性对羟基扁桃酸氧化酶。
- 25 7. 一种能够分泌可检测量 D-HPG 或 D-PG 的重组细胞, 该细

胞包含:

- a) 催化对羟基丙酮酸苯酯转变为对羟基扁桃酸或催化丙酮酸苯酯转变为扁桃酸的酶的编码基因;
- b) 催化对羟基扁桃酸转变为对羟基苯乙醛酸或催化扁桃酸转变为苯乙醛酸的酶的编码基因;
- c) 催化对羟基苯乙醛酸转变为 D-HPG 或催化苯乙醛酸转变为 D-PG 的立体转化 D-转氨酶的编码基因。

8. 一种重组质粒, 它包含至少一种下述基因, 所述基因的序列对应于本申请公开的[SEQ ID: No.9]和/或[SEQ ID: No.15]和/或[SEQ ID: No.21]中的任一种或者与这些序列中的任一种至少 80%同源、优选至少 90%同源、最优选至少 95%同源的同源物。

发酵生产 D-对羟基苯基甘氨酸和 D-苯基甘氨酸

5 本发明领域

本发明涉及制备对映体纯形式的 D-对羟基苯基甘氨酸(D-HPG)和 D-苯基甘氨酸(D-PG)的生化方法。本发明还涉及生产 D-HPG 和 D-PG 的重组微生物。下文的缩写(H)PG 是指 HPG 和/或 PG; 需要的情况下提及(H)PG 的特定对映异构体。本发明由德国政府和美国政府资助, 德国 Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) BioRegio 计划授予的资助号为 0311644 号, 美国国立卫生研究院授予的资助号为 RO1 A114937。美国政府对本发明拥有一定权利。

本发明背景

15 除甘氨酸之外, 每种普通的天然氨基酸都以两种可能对映体的其中一种形态存在。氨基酸的两种对映体形式可称为 D-型和 L-型对映体。可以两种对映体形式存在的化合物的对映体纯度通常以其对映体过量(经常缩写为“e.e.”)表示; e.e.可定义为两种对映体量差值除以量的总和, 其商乘以 100 得到百分比值。对本申请而言, 对映体纯是指 e.e.至少为 90%, 优选超过 95%, 或者甚至更优选超过 98%。

D-型和 L-型对映体之间的区别在于氨基酸 α -碳构象是 L-型或 D-型甘油醛(一种评价标准)。大多数作用于氨基酸的酶都具有 L-特异性结合域, 因此, 大多数天然蛋白质都只含有 L-氨基酸。

25 但也有些例外, D-氨基酸为微生物细胞所利用而且构成微生物细胞。例如, 细菌细胞生产胞壁质前体物质 D-谷氨酸和 D-丙氨酸, 胞壁质是一种典型的细胞壁组分。D-氨基酸通常不是直接产生, 而是利用氨基酸特异性消旋酶将 L-氨基酸转变为对应的 D-氨基酸。消旋酶催化 L-氨基酸向 D-氨基酸转变, 反之亦然。在平衡状态, 人们

发现了 L-对映体和 D-对映体的外消旋(50%/50%)混合物, 因此, 消旋酶不能用作生产对映体纯形式 D-氨基酸的最终反应步骤。

对抗菌药物的需求增加导致半合成抗生素的大量生产, 其中许多都掺入了旋光性 D-氨基酸作为结构单元。例如将 D-HPG 和 D-PG 掺入到某些 β -内酰胺抗生素(例如阿莫西林和头孢氨苄)中。

为低成本有效地生产这些抗生素, 需要利用有商业吸引力方法制备对映体纯形式的 D-(H)PG。但是, 由于 D-(H)PG 的复杂结构以及分子中存在手性中心, 所以用常规化学方法生产 D-(H)PG 一般包括多个用于生产 D-型和 L-型(H)PG 外消旋混合物的步骤, 然后需要另外的旋光拆开步骤, 以获得对映体纯形式的产物。额外的工艺步骤增加了工艺成本, 使整个方法失去了商业吸引力。

生产精细化学药品的发酵法通常以能够将相对廉价的原料转变为产物而具有商业吸引力为人所知。发酵法包括的反应通常具有高度的区域选择性和立体选择性。因此, 这些反应能以相对简单的工艺生产复杂的对映体纯产物。为此, 在先有技术中对发酵生产各种精细化学药品已进行了无数的尝试。

已经描述了以使用大肠杆菌菌株的发酵法生产 D-苯丙氨酸的方法(EP 0736604A2), 所述大肠杆菌包含球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)立体保守 D-转氨酶。“立体保守 D-转氨酶”应当理解为专一地由 D-型氨基供体生产 D-型氨基酸的 D-转氨酶。另一方面, “立体转化 D-转氨酶”应当定义为使用 L-型氨基供体并专一生产 D-型氨基酸的转氨酶。例如, L-Glu 或 L-Asp 可用作生产 D-PG 或 D-HPG 的氨基供体。

为了提供用于体内立体-保守 D-特异性转氨酶反应的 D-型氨基供体, 细胞中必须存在催化 L-氨基酸转变为 D-氨基酸的消旋酶编码基因, 反之亦然。因此, D-型氨基供体由 L-型对映体胞内产生。D-型氨基供体的胞内浓度是所述分子(D-型+L-型)总胞内浓度的一半或一半以下。因为 D-型氨基供体(离析物)浓度的降低导致转氨反应平

衡向离析物一侧移动，所以氨基供体的外消旋混合物(即组合使用消旋酶和立体保守转氨酶)不适于有效生产需要的 D-氨基酸。

另外，将消旋酶克隆入细胞劳动力昂贵，增加了细胞的“代谢负担”，因为细胞不得不合成其它的酶。用于生物合成消旋酶所消耗的前体代谢物和能量不能再用于细胞生长、产物形成等。

本发明的目标是使改进的发酵方法可用于生产 D-HPG 和 D-PG，这种方法克服了上述缺点。

该目标令人惊奇地实现了，其中发酵方法中的丙酮酸苯酯(PP)或对羟基丙酮酸苯酯(HPP)取自芳香族氨基酸途径，分别转变为扁桃酸(MA)或对羟基扁桃酸(HMA)，MA 或 HMA 分别转变为苯乙醛酸(PGL)或对羟基苯乙醛酸(HPGL)，最后通过立体转化转氨酶的作用分别转变为 D-PG 或 D-HPG。

立体转化转氨酶在发酵方法中的应用提供了明显的优势：不需要消旋酶活性，立体转化转氨酶使用天然 L-型氨基供体(当通过消旋酶由 L-对映体产生对应的 D-对映体时，胞内存在的 L-型氨基供体的浓度至少是所述 D-对映体的两倍)。发酵法的应用使得可以利用廉价原料(例如葡萄糖和其它糖)生产 D-(H)PG。

在本发明的含义中，发酵(和发酵法)应当理解为以下的过程：以合适的培养基培养微生物、通过细胞组分的催化活性或自发性化学反应将合适的培养基组分转变为产物，并由培养液和/或生物体本身获得产物。

在本发明的含义中，合适的培养基应当理解为微生物可以在其上生长、增殖的物质混合物和/或可以转变为目的产物的物质混合物。

在本发明的一个优选实施方案中，用于发酵的微生物选自一组比通常观察到的野生型菌株更有效供给 HPP 和/或 PP (在 HPP 和/或 PP 取自各自代谢库的情况下)的微生物。选自所述微生物组的微生物应当被认为是对 HPP 和/或 PP 具有“改进的生产能力”，并“提供 HPP 和/或 PP 的效率更高”。

应用提供 HPP 和/或 PP 的效率更高的微生物对有效生产 D-HPG 或 D-PG 很重要，因为在一系列反应中，不仅是系列中最慢的反应控制反应速率，而且每个酶反应都在某种程度上控制反应速率。因此，葡萄糖转化为 HPP 和/或 PP 也对最终产物 D-HPG 或 D-PG 的总产量有影响。

适于增加 HPP 和 PP 在所述微生物中效率的方法包括选择显示有益自发突变的微生物、选择由经典菌株改进程序(包括随机诱变)演化出的微生物以及选择由应用重组 DNA 技术产生的生产能力改进的微生物。例如，适于增加 HPP 和 PP 效率的方法可为引入关键酶的反馈抗性突变体或过表达一种或几种途径酶，如 Berry 综述(1996, TIBTECH, 14: 250-256)。应用重组 DNA 技术也可以直接引入磷酸烯醇丙酮酸非依赖性糖吸收系统(WO 98/18936)、去除磷酸转移酶系统(PTS) (Berry, 1996, TIBTECH, 14: 250-256)和/或通过修饰对胞内磷酸烯醇丙酮酸浓度起作用的反应而增加磷酸烯醇丙酮酸的效率(Berry, 1996, TIBTECH, 14: 250-256)。应用重组 DNA 技术也可以直接引入增加的胞内转酮酶和/或转醛酶活性(WO 98/18936)。

另一种适于提供 HPP 和/或 PP 的效率更高的方法是在发酵培养基中分别提供 L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸。在单步转氨酶反应中微生物容易将 L-酪氨酸转变为 HPP，而容易将 L-苯丙氨酸转变为 PP。

在一个优选的实施方案中，按照本发明的微生物在对羟基扁桃酸合酶(*p*-HmaS)催化的单步酶转化中将 PP 转变为 MA 和/或将 HPP 转变为 HMA。Choroba 等(2000, J. Am. Chem. Soc., 122(22): 5389-90)描述了用称为 *p*-HmaS 的酶将 HPP 转化为 HMA。

使用单个酶将 HPP 或 PP 转化为 HMA 或 MA 的优势在于：在进行相同的整体转化时，单个酶的克隆和体内活性确定通常比多个酶的克隆和活性确定容易。

另一方面，按照本发明的微生物以一系列反应将 PP 转变为 MA 和/或将 HPP 转化为 HMA，所述反应包括由 PP 或 HPP 分别例如转

化为苯乙醛或对羟基苯乙醛、再分别转化为乙酸苯酯或对羟基乙酸苯酯、再分别转化为 MA 或 HMA 的反应。相信该系列反应是一条可能的代谢途径, 因为 Krings 等(1996, *Journal of Biotechnology*, 51: 123-129))在担子菌的苯丙氨酸降解中观察到该途径。

5 按照本发明的微生物, 不考虑其生产 HMA 或 MA 的途径, 分别通过扁桃酸脱氢酶和/或对羟基扁桃酸脱氢酶的酶活性将 MA 转化为 PGL 和/或将 HMA 转化为 HPGL。或者, 所述微生物分别通过氧依赖性扁桃酸氧化酶和/或氧依赖性对羟基扁桃酸氧化酶的酶活性将 MA 转化为 PGL 和/或将 HMA 转化为 HPGL。按照本发明的微生物
10 还能够通过立体转化转氨酶的作用将 HPGL 和 PGL 分别转化为 D-HPG 和 D-PG。

本发明还涉及通过在合适的培养基中培养所述重组细胞, 并由培养液或微生物自身获得产物, 产生 D-(H)PG。

15 本发明还涉及能够分泌可检测量的 D-HPG 和/或 D-PG 并包含酶编码基因的重组微生物(即重组细胞), 其中所述酶在单一步骤中和/或通过组合和序贯作用催化 HPP 转变为 HMA 和/或 PP 转变为 MA、HMA 转变为 HPGL 和/或 MA 转变为 PGL, 以及 HPGL 转变为 D-HPG 和/或 PGL 转变为 D-PG, 最后一步由立体转化 D-氨基转移酶作用催化。

20 值得注意的是, Wiyakrutta 和 Meevootisom (1997, *Journal of Biotechnology*, 55: 193-203)描述了使用立体转化氨基转移酶生产 D-PG 和 D-HPG。但是, 他们未考虑全细胞发酵法。相反, 这些作者提及使用纯化酶的反应。此外, Taylor 等(1998, *TIBTECH*, 16: 412-418)提及 PGL 和 HPGL 离析物与终产物 D-PG 和 D-HPG 的价值相比非常昂贵。因此, 这些参考文献未提出立体转化氨基转移酶对生产 D-HPG
25 或 D-PG 的任何切实可行的应用。

而且, 应该预期到的是, 将 HPGL 或 PGL 的发酵途径和立体转化 D-氨基转移酶的体内酶活性组合在一起限制了成功的机会, 因为各个酶的最优 pH 不匹配。据报道大肠杆菌细胞的胞内 pH 在 7.4-7.8

的范围内(Neidhardt 等, 1996, 大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌, Cellular and molecular biology, 第 1 卷, 96 章, 1539 页, ASM Press, Washington, D.C.)。但是, 据 Wiyakrutta 和 Meevootisom (参见上文)报道, 立体转化氨基转移酶的最优 pH 为 9-10, 于中性 pH 时活性非常低。因此, 人们预期立体转化氨基转移酶在大肠杆菌细胞中的体内活性不足以有效生产 D-HPG 或 D-PG。

除了最优 pH 不匹配之外, 当不同生物的酶在宿主细胞中组合成新代谢途径时还可预见到其它几个问题。新引入酶的亲和性可能与胞内代谢物浓度非常不同。而且, 外源酶的稳定性可能由于外源蛋白对胞内蛋白酶的高度敏感性而非常低。新构建途径的中间体自身可能不稳定或被宿主细胞原有酶代谢。正确翻译的氨基酸链的不合适折叠或可能阻碍外源酶有效功能性表达的密码子选择差异也可以引起外源酶功能性表达的问题。

尽管预计在构建新代谢途径时有众多问题, 但令人惊奇的是, 我们发现以本发明方法通过重组微生物可以生产 D-HPG 和 D-PG。

最后, 本发明还涉及包含至少一种基因的重组质粒, 所述基因序列对应于本申请下文公开的[SEQ ID: NO.9]和/或[SEQ ID: NO.15]和/或[SEQ ID: NO.21]中的任一种, 或者与这些序列中的任一种至少 80%、优选至少 90%、最优选至少 95%同源的同源序列。

在以下实施例描述过程中, 本发明的其它特征将更会显而易见。

一般方法

标准分子克隆技术如质粒 DNA 分离、凝胶电泳、核酸的酶促限制修饰、大肠杆菌转化等, 都按照 Sambrook 等, 1989, "Molecular Cloning: a laboratory manual", Cold spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY 所述实施。合成寡脱氧核苷酸得自 MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany)、Sigma-Genosys (The Woodlands, TX, USA) 和 LifeTechnologies (Paisley, Scotland, UK)。DNA 序列分析使用染料

标记双脱氧终止子的链终止法，由 BaseClear (Leiden, The Netherlands)、GATC Biotech AG (Konstanz, Germany)和 Johns Hopkins University School of Medicine Biosynthesis and Sequencing Facility (Baltimore, MD, USA)进行。粗提物的蛋白浓度用 Bradford 试剂按照
5 供应商的说明于 595 nm (Roth, Karlsruhe, Germany)测定。

实验部分 I (实施例 1-19): 编码活性的相关单个基因的克隆和确定

实施例 1: 构建质粒 pBAD-Ao-HmaS、pBAD-Ao-HmaO、pBAD-Sc-HmaS、pBAD-Sc-HmaO

10 东方诺卡氏菌(*Ammycolatopsis orientalis*) NRRL 18098 (美国专利第 5,843,437 号)得自 ARS (农业研究局)专利培养物保藏中心, Peoria, Illinois, USA。

在 1%葡萄糖、0.5%酵母提取物(Difco, Detroit, Michigan, USA)、2%淀粉、0.1%酪蛋白氨基酸(Difco)、NaOH 调节至 pH 7.5 的溶液中
15 于 28℃培养东方诺卡氏菌。在含 3 g/l 酵母提取物(Difco)、5 g/l 蛋白胨(Difco)、3 g/l 麦芽提取物(Oxoid, Basingstoke, UK)、10 g/l 葡萄糖、340 g/l 蔗糖的 YE-ME 培养基中于 28℃培养 John Innes Institute, Norwich (UK) 的 M.J. Bibb 教授惠赠的天蓝色链霉菌 A3(2) (*Streptomyces coelicolor*)。灭菌后加入 10 g/l 甘氨酸和 5 mM MgCl₂。

20 通过盐析法(Pospiech and Neumann, 1995, Trends Genet. 11: 217-218)分离东方诺卡氏菌和天蓝色链霉菌的基因组 DNA。

将天蓝色链霉菌和东方诺卡氏菌的 HmaS 和 HmaO 基因克隆在表达载体 pBAD/Myc-HisC (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) 中。通过翻译起始(ATG)融合和利用其原有的终止密码子克隆基因。

25

1.1 构建质粒 pBAD-Ao-HmaS

使 用 以 下 引 物 : 5'-
GTCCACGGTCTCCCATGCAGAATTTCGAGAT-3' [SEQ ID: No.1]

(下划线为 *Bsa* I 识别切割位点) 和 5'-ACATCCCAAGCTTCACGTTTCGAGGTC-3' [SEQ ID: No.2] (下划线为 *Hind* III 切割位点), 通过 PCR 由东方诺卡氏菌 NRRL 18098 染色体 DNA (保藏号 AJ223998 的核苷酸 14957-16030; 扩增区为核苷酸 14957-16060) 扩增含对羟基扁桃酸合酶可读框(ORF)的 1131 bp 片段。

本申请上下文中使用的所有寡核苷酸序列表见本文附件 4。

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小, 并由该凝胶纯化所述片段。用酶 *Bsa* I 和 *Hind* III 消化所述片段, 以产生粘性末端。用 *Nco* I 和 *Hind* III 消化质粒 pBAD/Myc-HisC。随后连接两种片段, 并用于转化化学感受态大肠杆菌 Top10 细胞(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒命名为 pBAD-Ao-HmaS, 该质粒按照布达佩斯条约已于 2000 年 10 月 23 日保藏于 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany (DSMZ), 保藏号为 DSM 13786, 将该质粒用于进一步的研究。

1.2 构建质粒 pBAD-Ao-HmaO

使用以下引物: 5'-CGCTCGGTCATGACGTACGTTTCCCTG-3' [SEQ ID: No.3] (下划线为 *Bsp*H I 切割位点) 和 5'-ACGAAGAAGCTTATCAAACAACCCCCAG-3' [SEQ ID: No.4] (下划线为 *Hind* III 切割位点), 通过 PCR 由东方诺卡氏菌 NRRL 18098 染色体 DNA (保藏号 AJ223998 的核苷酸 16027-17100; 扩增区为核苷酸 16027-17101) 扩增含对羟基扁桃酸氧化酶 ORF 的 1096 bp 片段。

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小, 并由该凝胶纯化所述片段。

用酶 *Bsp*H I 和 *Hind* III 消化所述片段, 用 *Nco* I 和 *Hind* III 消化质粒 pBAD/Myc-HisC。连接两种片段, 并引入大肠杆菌 Top10 细胞。

在含 100 mg/l 羧苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒称作 pBAD-Ao-HmaO, 该质粒按照布达佩斯条约已于 2000 年 10 月 23 日保藏于 DSMZ, 保藏号为 DSM 13791, 将该质粒用于进一步的研究。

5

1.3 构建质粒 pBAD-Sc-HmaS

使用以下引物: 5'-ATGCCGCCCAGTGACATCGCGTACGC-3' [SEQ ID : No.5] 和 5'-CCCTCGGTACCAGGTCATCGGCCGGCCACTTCC-3' [SEQ ID: No.6] (下划线为 *Kpn* I 限制位点), 通过 PCR 由天蓝色链霉菌 A3(2) 菌株 M145 染色体 DNA (由保藏号 AL035640 的核苷酸 1418-2533 编码; 扩增区为核苷酸 1415-2494) 扩增含对羟基扁桃酸合酶 ORF 的 1091 bp 片段。

10

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小, 并由该凝胶纯化所述片段。按照 Dietmaier 等(1993, Nucleic Acids Res. 21, 3603-3604) 所述将扩增片段克隆入载体 pBAD/*Myc*-HisC 的 *Nco* I/*Kpn* I 位点。

15

通过电穿孔将获得的质粒导入大肠杆菌 Top10 细胞中。在含 100 mg/l 羧苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。

收集所有由转化体产生的菌落, 并将获得的细胞悬浮液用于质粒 DNA 分离。用 *Hind* III 消化总质粒 DNA, 并在琼脂糖凝胶上分离。由凝胶中分离出线性形式的为目标质粒的 5 kb DNA 片段, 再连接并通过电穿孔导入化学感受态大肠杆菌 Top10 细胞中。

20

在含 100 mg/l 羧苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。

显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒称作 pBAD-Sc-HmaS, 该质粒按照布达佩斯条约于 2000 年 10 月 23 日保藏于 DSMZ, 保藏号为 DSM 13790, 将该质粒用于进一步的研究。

25

1.4 构建质粒 pBAD-Sc-HmaO

使用以下引物: 5'-ATGCGGGAGCCGCTCACGCTCGAC-3' [SEQ

ID : No.7] 和 5'-
CCAACTGGTACCTGGTCATCCGTGGCTCCTGTCTCG-3' [SEQ
ID: No.8] (下划线为 *Kpn* I 限制位点), 通过 PCR 由天蓝色链霉菌 A3(2)
菌株 M145 染色体 DNA (保藏号 AL035640 的核苷酸 135-1268; 扩增
5 区为核苷酸 132-1267) 扩增含对羟基扁桃酸氧化酶 ORF 的 1149 bp 片
段。

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小, 并由该凝胶纯
化所述片段。按照 Dietmaier 等(1993, Nucleic Acids Res. 21, 3603-3604)
所述将扩增片段克隆入载体 pBAD/Myc-HisC 的 *Nco* I/*Kpn* I 位点, 随
10 后将获得的质粒导入大肠杆菌 Top10 细胞中。在含 100 mg/l 羧苄
青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。

分离所有转化体的质粒 DNA, 用 *Hind* III 消化, 并在琼脂糖凝
胶上分离。由凝胶中分离出线性形式的为目标质粒的 5.2 kb DNA 片
段, 再连接并导入化学感受态大肠杆菌 Top10 细胞中。在含 100 mg/l
15 羧苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。

显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒称作 pBAD-Sc-HmaO,
该质粒按照布达佩斯条约已于 2000 年 10 月 23 日保藏于 DSMZ, 保
藏号为 DSM 13789, 将该质粒用于进一步的研究。

20 实施例 2: 由东方诺卡氏菌和天蓝色链霉菌表达对羟基扁桃酸合酶和 对羟基扁桃酸氧化酶

在含 100 mg/l 羧苄青霉素的 50 ml LB 培养基中于 30℃ 培养携带
质粒 pBAD-Ao-HmaS 或 pBAD-Sc-HmaS (对于对羟基扁桃酸合酶)和
质粒 pBAD-Ao-HmaO 或 pBAD-Sc-HmaO (对于对羟基扁桃酸氧化酶)
25 的大肠杆菌 Top10 菌株的单菌落。于 OD_{620nm} 为 1.2 时加入 0.002% (终
浓度) 阿拉伯糖诱导所述细胞。3.5 小时后收获细胞, 并用 pH 7.4 的 1
mM MgSO₄ 清洗。于 -20℃ 冷冻等份的清洗细胞待以后使用。作为对
照, 相应地处理携带质粒 pBAD/Myc-HisC 的大肠杆菌 Top10。

临用前用 pH 7.5 的 200 mM 磷酸钾缓冲液超声处理制备粗提物。

实施例 3: 分析东方诺卡氏菌和天蓝色链霉菌的对羟基扁桃酸合酶

3.1 对对羟基丙酮酸苯酯的活性

5 3 ml 的测定混合物包含 200 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.5、5 mM 对羟基丙酮酸苯酯、10%乙醇(使用 50 mM 对羟基丙酮酸苯酯母液的 96%乙醇溶液)、44 mM 抗坏血酸盐、0.3 mM FeSO₄ 和至终浓度为 0.6 mg/ml 可溶性蛋白的无细胞提取物。对照实验使用煮沸的提取物。

10 通过加入 HPP 开始测定,于 28℃ 1 小时后通过加入 0.1 ml 1 N HCl 至 0.5 ml 等份的反应系统中终止测定。通过 HPLC 分析样品并于 215 nm 检测。使用 Nucleosil-120-5-C18 柱(250 × 4 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany)。用洗脱液 A (50 mM H₃PO₄)和洗脱液 B (100%甲醇)洗脱该柱。梯度: 0-5 分钟, 0% B; 5-37 分钟, 0%-90% B; 37-42 分钟, 90% B; 42-50 分钟, 90%-0% B; 50-55 分钟, 0% B。流速为
15 1.0 ml/分钟, 柱温设定在 30℃。

 得自大肠杆菌/pBAD-Ao-HmaS 的无细胞提取物在 1 小时内生产 65 mg/l 的对羟基扁桃酸,而得自大肠杆菌/pBAD-Sc-HmaS 的提取物生产 35.6 mg/l 的对羟基扁桃酸。对照实验(大肠杆菌/pBAD/Myc-HisC 的粗提物和煮沸的提取物)未产生对羟基扁桃酸。

20

3.2 对丙酮酸苯酯活性

 3 ml 的测定混合物包含 200 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.5、5 mM 丙酮酸苯酯、44 mM 抗坏血酸盐和 0.3 mM FeSO₄ 以及终浓度为 0.6 mg/ml 可溶性蛋白的无细胞提取物。

25 通过加入无细胞提取物于 28℃ 开始测定,通过加入 0.1 ml 1 N HCl 至 0.5 ml 等份的反应系统中终止测定。如上所述通过 HPLC 分析样品。煮沸的提取物和大肠杆菌/pBAD/Myc-HisC 的粗提物都用于对照实验。

使用得自大肠杆菌/pBAD-Ao-HmaS 的无细胞提取物在 1 小时内生产 63 mg/l 的扁桃酸。得自大肠杆菌/pBAD-Sc-HmaS 的无细胞提取物在 6 小时内生产 25 mg/l 的扁桃酸。对照实验未检测到扁桃酸。

5 实施例 4: 分析东方诺卡氏菌和天蓝色链霉菌的对羟基扁桃酸氧化酶

4.1 对 D,L-对羟基扁桃酸的活性

将含 0.5-0.8 mg 蛋白的 100 μ l 粗提物与总体积 1 ml 的 200 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.5、2 mM D,L-对羟基扁桃酸、20 mg/l 过氧化氢酶温育。用分光光度计于 340 nm 监测对羟基扁桃酸的氧化。为消除对羟基扁桃酸的非特异性氧化, 使用没有无细胞提取物的测定混合物进行对照测定。

大肠杆菌 Top10/pBAD-Sc-HmaO 提取物的比活为 30 nmol/分钟/mg 总蛋白, 而大肠杆菌 Top10/pBAD-Ao-HmaO 的比活为 5 nmol/分钟/mg 总蛋白。

4.2 对(S)-或(R)-扁桃酸的活性

3 ml 测定混合物包含 100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.5、2 mM (S)-或(R)-扁桃酸、20 mg/l 过氧化氢酶以及终浓度为 0.6 mg/ml 可溶性蛋白的无细胞提取物。

通过加入无细胞提取物开始测定, 并通过向 0.5 ml 等份的反应系统中加入 0.1 ml 1 N HCl 终止测定。以实施例 3 的方法通过 HPLC 分析样品。对照实验使用煮沸的提取物。

使用(R)-扁桃酸作为底物, 得自大肠杆菌/pBAD-Ao-HmaO 或大肠杆菌/pBAD-Sc-HmaO 的无细胞提取物未生产苯乙醛酸。用(S)-扁桃酸作为底物, 使用大肠杆菌/pBAD-Ao-HmaO 的无细胞提取物在 1 小时内生产 9 mg/l 的苯乙醛酸, 而用得自大肠杆菌/pBAD-Sc-HmaO 的无细胞提取物在 1 小时内生产 27 mg/ml 的苯乙醛酸。

实施例 5: 构建质粒 pMAL-Nu-HmaS 和 pMAL-Nu-HmaO

由美国典型培养物保藏中心(Manassas, VA, USA)获得均匀诺卡氏菌津山亚种(*Nocardia uniformis* subsp. *tsuyamanensis*) ATCC 21806。培养均匀诺卡氏菌津山亚种, 按照 *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 30695-30703 所述分离基因组 DNA。将基因及其原有终止密码子克隆入 pMAL-c2 表达载体(New England BioLabs, Beverly, MA, USA), 获得麦芽糖结合蛋白融合蛋白。还将 HmaS 克隆入 pET-29b (Novagen, Madison, WI, USA)作为 C-末端 His-6 标记融合体。

5.1 构建质粒 pMAL-Nu-HmaS

使用以下引物: 5'-AGAATTCGCGGCACAGGCAGGCAGCG-3' [SEQ ID: No.11] (下划线为 *EcoR* I 切割位点)和 5'-TTATAAGCTTTCAGCGCTCGGTCCGGTGGC-3' [SEQ ID: No.12] (下划线为 *Hind* III 切割位点), 通过 PCR 由均匀诺卡氏菌津山亚种染色体 DNA (附件 1 给出的 SEQ ID: No.9 的核苷酸 52-1086, 编码 SEQ ID: No.10 的蛋白; 扩增区为核苷酸 55-1089)扩增含对羟基扁桃酸合酶可读框(ORF)的 1052 bp 片段。

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小, 并由该凝胶纯化所述片段。用 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化所述片段。用 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化质粒 pMAL-c2, 随后连接两种片段, 并通过电穿孔转化入大肠杆菌 TB1 细胞(New England BioLabs, Beverly, MA, USA)。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒命名为 pMAL-Nu-HmaS, 该质粒按照布达佩斯条约已于 2000 年 10 月 27 日保藏于 ATCC, 专利保藏物名称为 PTA-2639, 将该质粒用于进一步的研究。

5.2 构建质粒 pET-Nu-HmaS

使用以下引物: 5'-TATACCATGGCGGCACAGGCAGGC-3' [SEQ

ID : No.13] (下划线为 *Nco* I 切割位点) 和 5'-TTATAAGCTTGCGCTCGGTCCGGTGGC-3' [SEQ ID: No.14] (下划线为 *Hind* III 切割位点), 通过 PCR 由均匀诺卡氏菌津山亚种染色体 DNA (附件 1 给出的 SEQ ID: No.9 的核苷酸 52-1086, 编码 SEQ ID: No.10 的蛋白; 扩增区为核苷酸 52-1086) 扩增含对羟基扁桃酸合酶可读框(ORF)的 1051 bp 片段。

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小, 并由该凝胶纯化所述片段。用 *Nco* I 和 *Hind* III 消化所述片段。用 *Nco* I 和 *Hind* III 消化质粒 pET-29b, 随后连接两种片段, 并通过电穿孔转化入大肠杆菌 BL21(DE3)细胞(Novagen, Madison, WI, USA)中。在含 50 mg/l 卡那霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒命名为 pET-Nu-HmaS, 该质粒按照布达佩斯条约已于 2000 年 10 月 27 日保藏于 ATCC, 专利保藏物命名号为 PTA-2638, 将该质粒用于进一步的研究。

5.3 构建质粒 pMAL-Nu-HmaO

使用以下引物: 5'-AGAATTCGGCGTCCGCAACTCCGCAG-3' [SEQ ID: No.17] (下划线为 *Eco*R I 切割位点) 和 5'-AATAAGCTTTTCAGGGCGCACCTCGCC-3' [SEQ ID: No.18] (下划线为 *Hind* III 限制位点), 通过 PCR 由均匀诺卡氏菌染色体 DNA (附件 2 给出的 SEQ ID: No.15 的核苷酸 50-1177, 编码 SEQ ID: No.16 的蛋白; 扩增区为核苷酸 53-1180) 扩增含对羟基扁桃酸氧化酶 ORF 的 1144 bp 片段。

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小, 并由该凝胶纯化所述片段。用 *Eco*R I 和 *Hind* III 消化所述片段和质粒 pMAL-c2。连接两种片段, 并通过电穿孔转化入大肠杆菌 TB1 细胞。在含 100 mg/l 氯苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒命名为 pMAL-Nu-HmaO, 该质粒按照布达佩斯条

约已于2000年10月27日保藏于ATCC, 专利保藏物命名号为PTA-2637, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 6: 由均匀诺卡氏菌制备对羟基扁桃酸合酶和对羟基扁桃酸氧化酶

6.1 对羟基扁桃酸合酶(第一种方法)和对羟基扁桃酸氧化酶的表达

用含100 mg/l 氨苄青霉素的100 ml LB培养基(+0.02%葡萄糖)于37℃培养携带质粒 pMAL-Nu-HmaS 或 pMAL-Nu-HmaO 的大肠杆菌 TB1 菌株的单菌落。于 OD_{600nm} 为 0.6 时加入 0.3 mM (终浓度)的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导所述细胞。3 小时后收获细胞, 并重悬浮在缓冲液(HmaO 为 20 mM Tris-HCl pH 7.4、200 mM NaCl、1 mM EDTA, 而 HmaS 为 20 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM EDTA、1% Triton X-100)中, 于-20℃冷冻待以后使用。作为对照, 同样地处理含质粒 pMAL-c2 的大肠杆菌 TB1 细胞。

6.2 对羟基扁桃酸合酶(第一种方法)和对羟基扁桃酸氧化酶的纯化

在临使用前通过超声处理制备重悬浮沉淀的粗提物。通过离心去除提取物中的不溶性细胞碎片, 将获得的无细胞提取物上样于直链淀粉树脂柱。通过用含 10 mM 麦芽糖的缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 7.4、200 mM NaCl、1 mM EDTA)洗脱获得纯度≥80%的目的蛋白。将部分纯化的提取物用于进一步的研究。

6.3 对羟基扁桃酸合酶的表达(第二种方法)

用含 50 mg/l 卡那霉素的 100 ml LB 培养基于 37℃培养携带质粒 pET-Nu-HmaS 的大肠杆菌 BL21(DE3)菌株的单菌落。于 OD_{600nm} 为 0.6 时加入 1 mM (终浓度)的 IPTG 诱导所述细胞。4 小时后收获细胞, 并重悬浮在缓冲液(50 mM 磷酸钠 pH 8、300 mM NaCl、10 mM 咪唑)中, 于-20℃冷冻待以后使用。

6.4 对羟基扁桃酸合酶的纯化(第二种方法)

在临使用前通过超声处理制备粗提物。通过离心去除提取物中的不溶性细胞碎片，将获得的无细胞提取物分批与 Ni-NTA 树脂 (Qiagen, Valencia, CA, USA) 以 200 rpm 温育 1 小时。将 CFE-树脂浆
5 倾注到柱中，通过用含浓度递增的咪唑的缓冲液(50 mM 磷酸钠 pH 8、300 mM NaCl)洗脱获得纯度 $\geq 90\%$ 的目的蛋白。将部分纯化的提取物用于进一步的研究。

实施例 7: 均匀诺卡氏菌对羟基扁桃酸合酶活性

10 0.4 ml 测定混合物包含 50 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0、5 mM 对羟基丙酮酸苯酯、0.7%乙醇(使用 50 mg/ml 对羟基丙酮酸苯酯母液)、0.5 mM 二硫苏糖醇(DTT)、0.1 mM 抗坏血酸盐、0.025 mM FeSO₄ 和部分纯化的 HmaS。通过加入 HmaS 开始测定，于 30℃ 1 小时后通过
15 于 100℃ 热失活 5 分钟终止测定。通过离心去除变性蛋白，在用 HmaO 的相应测定中使用 0.35 ml 的反应系统。该测定通过加入 0.1 mg/ml 的 HmaO 开始，并根据对羟基扁桃酸氧化为 HPGL 而观测 332 nm 的吸光度增加。对照实验未产生 HPGL。

实施例 8: 均匀诺卡氏菌对羟基扁桃酸氧化酶活性

20 0.5 ml 测定混合物包含 50 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0 和 2 mM (R,S)-对羟基扁桃酸。加入终浓度为 0.1 mg/ml 的部分纯化的 HmaO 开始测定。用分光光度计于 332 nm 监测对羟基苯乙醛酸(HPGL)的形成。在没有底物时未观测到 HPGL 形成。HmaO 比活测定为 240 $\mu\text{mol}/$
分钟/mg。

25 在使用由均匀诺卡氏菌纯化的野生型酶的单独实验中，所述氧化酶显示出黄素依赖性和(S)-扁桃酸特异性。

实施例 9: 构建质粒 pGEM-mdlB 和 pGEM-Bldm

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) ATCC 12633 得自美国典型

培养物保藏中心(Manassas, VA, USA)。用 LB 培养基(10 g/l 胰蛋白胨(Difco)、5 g/l 酵母提取物(Difco)、5 g/l NaCl)于 28℃培养恶臭假单胞菌。在过夜培养后使用 Ausubel 等(1990, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 2、3、4 章, 1-9 步, Wiley-Interscience, New York)描述的标准方法分离这种恶臭假单胞菌菌株的基因组 DNA。用 RNA 酶(20 mg/l)处理粗染色体 DNA, 随后用苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)处理, 以去除蛋白。

使用 Taq DNA-聚合酶以及以下引物: 5'-ACTCGCCAAGGGCTATGGTGTCC-3' [SEQ ID: No.19] 和 5'-GCCAACAGTTCCAACAGCGGTGTG-3' [SEQ ID: No.20], 通过 PCR 由恶臭假单胞菌 ATCC 12633 染色体 DNA (由保藏号 J05293 的核苷酸 2251-3432 编码; 扩增区为核苷酸 2110-3518)扩增含(S)-扁桃酸脱氢酶 ORF 的 1409 bp 片段。

通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的大小。

将扩增片段克隆入载体 pGEM-T (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 以其转化大肠杆菌 XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, CA, USA)。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。

对 4 种不同克隆的插入片段测序, 结果揭示全部克隆都以 GC 代替了位置 2291/2292 的 CG。其中一个没有其它突变的克隆命名为 pGEM-Bldm, 按照布达佩斯条约已于 2000 年 10 月 23 日保藏于 DSMZ, 保藏号 DSM 13787。该原始保藏物已错误地命名为 pGEM-mdlB, 但正确地应命名为 pGEM-Bldm, 将该保藏物用于进一步的克隆实验。另一个克隆具有一个另外的沉默突变, 命名为 pGEM-mdlB, 用于证实目的活性。要指出的是, 在所述后一种质粒中, 扁桃酸脱氢酶基因的方向与载体携带的 lac 启动子的方向相匹配。

实施例 10: 由恶臭假单胞菌表达(S)-扁桃酸脱氢酶

用含 100 mg/l 羧苄青霉素和 1 mM IPTG 的 LB 培养基培养大肠

杆菌 XL-1 MRF'/pGEM-mdlB。于 37℃培养 16 小时后，离心收获细胞，并重悬浮在 50 mM 磷酸钾缓冲液 pH 6.8 中。通过超声处理破碎细胞，离心(5,000 g, 10 分钟, 4℃)去除未破碎的细胞和细胞碎片。最后，通过超离心步骤(1 小时, 200,000 g, 4℃)收集细胞膜，然后重
5 悬浮在 4 ml 50 mM 磷酸钾缓冲液 pH 6.8 中，并保存在冰上。

通过改良 Lowry 蛋白测定法(Sandermann and Strominger, 1972, J. Biol. 247: 5123-5131)测定细胞膜蛋白浓度，在所述测定中向 Lowry 试剂 A 中加入 1% SDS。细胞膜部分包含约 1 mg/ml 的蛋白。

10 实施例 11: (S)-扁桃酸脱氢酶活性证明

利用 Hegeman 法(1996, J. Bacteriol. 91: 1140-1154)，使用 2,6-二氯苯酚-靛酚作为受体染料以分光光度计测定(S)-扁桃酸脱氢酶活性。使用(S)-或(R)-扁桃酸作为底物检测(S)-扁桃酸脱氢酶的立体选择性。而且还分析(S)-扁桃酸脱氢酶是否也可以把羟基扁桃酸作为底物。

15 用(S)-扁桃酸和(R,S)-对羟基扁桃酸作为底物，大肠杆菌 XL-1 MRF'/pGEM-mdlB 的细胞膜部分 600 nm 的吸光度在 5 分钟内产生可检测的变化。用(R)-扁桃酸未观测到吸光度变化。

实施例 12: 分离 D-对羟基苯基甘氨酸转氨酶(HpgAT)基因

20 由恶臭假单胞菌 NCIMB 12565 (国立工业和海洋微生物保藏中心, Aberdeen, Scotland, UK)分离 D-对羟基苯基甘氨酸转氨酶基因。使用 Ausubel 等(1990, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 2、3、4 章, 1-9 步, Wiley-Interscienc, New York)描述的标准方法由指数生长细胞(OD_{620nm} 1.9)提取 DNA。用 RNA 酶(20 mg/l)处理粗染色体
25 DNA，随后用苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)处理，以去除蛋白。然后用 *Sau3A* I 部分消化染色体 DNA。将消化的 DNA 上 0.6%的琼脂糖凝胶，分离出 4-10 kb 大小的 DNA 片段。

按照 Invitrogen 的方法通过用 *BamH* I 消化 1 μ g pZErO-2

(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)制备载体 DNA。

用 T4 DNA 连接酶连接载体 DNA 和恶臭假单胞菌染色体 DNA 片段。连接混合物用于转化化学感受态大肠杆菌 Top10 细胞。将转化体平板接种在含 50 mg/l 卡那霉素的 LB 培养基上。总共获得 5000 个菌落, 它们构成原始基因文库。将全部 5000 个菌落倒入补加 50 mg/l 卡那霉素的 LB 培养基中。加入甘油至终浓度为 15% 后, 将原始基因库以 1 ml 等份储存于 -80℃。

在微量滴定板中用 150 μ l 补加 50 mg/l 卡那霉素的 LB 培养基制备 1800 个菌落的培养物。将培养物于 28℃ 过夜培养, 用 Eppendorf 5804 R 离心机(Eppendorf, Hamburg, Germany)离心收获培养物。用 50 mM KPO_4 缓冲液 pH 7.0 清洗细胞, 并重悬浮在 180 μ l 反应混合物(100 mM 磷酸钾 pH 7.0、15 mM α -酮戊二酸盐、0.1 mM 吡哆醛磷酸和 0.5% v/v Triton X-100)中。

通过加入 D-对羟基苯基甘氨酸至终浓度为 5 mM 开始反应。使用 Optimax 微量滴定板读数器(Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)监测 20 分钟内每个孔的 OD_{340nm} 。相应地处理阴性对照(未转化的大肠杆菌 Top10)和阳性对照(恶臭假单胞菌 NCIMB 12565)。

在筛选的 1800 个克隆中, 一个克隆由于形成 HPGL 而显示相对于阴性对照 OD_{340nm} 显著增加。该克隆包含的恶臭假单胞菌 D-HpgAT 基因位于一个 12 kb 质粒 pZErOTagp 上。对 pZErOTagp 测序显示出 D-HpgAT 基因的完整核苷酸序列。如附件 3 所示, [SEQ ID : No.21, 编码 SEQ ID : No.22 的蛋白]的核苷酸 51-1376 列出了该基因序列。

实施例 13: 构建质粒 pBAD-HpgAT

使用 PCR 将恶臭假单胞菌 D-对羟基苯基甘氨酸转氨酶基因亚克隆入 pBAD/Myc-HisC。使用 5'-GTGCACGGTCTCGCATGTCTATTTATAGCGATTATGAACGTAAAAC-3' [SEQ ID : No.23] 和 5'-

GTGCACGGTCTCCTCGAGTTAGCCCAGGAGGTTTTCTTCAGC-3'
[SEQ ID: No.24]作为引物(下划线为 *Bsa* I 识别切割位点), 使用恶臭假单胞菌 NCIMB 12565 染色体 DNA 作为模板, 扩增 HpgAT ORF。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的大小(1361 bp)。

5 用 *Bsa* I 消化所述片段。用 *Xho* I 和 *Nco* I 消化载体 pBAD/Myc-HisC。用 T4 DNA 连接酶连接纯化的消化 pBAD/Myc-HisC 载体和消化的插入 DNA。

用重组质粒通过电穿孔转化大肠杆菌 Top10 细胞, 并平板接种在补加 100 mg/l 羧苄青霉素的 LB 培养基上。

10 进行菌落 PCR, 并在有或没有 0.002%阿拉伯糖作为诱导物的情况下, 用补加 100 mg/l 羧苄青霉素的 LB 培养基培养 8 个 PCR 阳性菌落以及大肠杆菌 Top10/pBAD/Myc-HisC (阴性对照)。收获细胞, 并按实施例 12 所述测试细胞的 HpgAT 活性。在阿拉伯糖作为诱导物的情况下, 全部 8 个菌落都显示出 HpgAT 活性。在这些菌落中,
15 有一个菌落携带显示正确插入序列(通过测序确定)的质粒, 该菌落命名为大肠杆菌 pBAD-HpgAT, 按照布达佩斯条约于 2000 年 10 月 23 日保藏于 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany (DSMZ), 保藏号为 DSM 13788。

20 **实施例 14: 制备无细胞提取物**

用补加阿拉伯糖(0.002%)和羧苄青霉素(100 mg/l)的 LB 培养基于 28℃ 过夜培养大肠杆菌 Top10/pBAD-HpgAT。离心收获细胞, 通过超声处理然后离心由悬浮液(1 g 细胞 + 7 ml 50 mM KPO₄ pH 7.0)制备无细胞提取物。

25

实施例 15.a: D-HpgAT 对对羟基苯乙醛酸的活性

用小玻璃管于 20℃ 温育 3 ml 反应混合物, 该混合物含有 100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.0、60 mM L-谷氨酸、0.1 mM 磷酸吡哆醛和无细

胞提取物(0.27 mg 蛋白, 实施例 14)。该混合物在 340 nm 的分光光度计活性检测中用作空白。通过向反应混合物中加入对羟基苯乙醛酸(0.67 mM 终浓度)开始反应。该反应 20℃ 的最大比活为 110 nmole/分钟/mg 蛋白。

5

实施例 15.b: D-HpgAT 对 D-PG 和 D-HPG 的活性

于 30℃ 温育 4 ml 反应混合物, 该混合物含有 100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 8.0、15 mM α -酮戊二酸、0.1 mM 磷酸吡哆醛和无细胞提取物(0.01 mg 蛋白, 实施例 14)。通过加入底物 D-PG (4 mM) 开始测定。
10 以一定的时间间隔吸取 1 ml 等份并转移至 0.4 ml 1 M H_3PO_4 , 以终止反应。通过 HPLC 分析样品(Astec Chirobiotic T 250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μ m 柱, Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, 20 μ l 注样体积, 柱温 22℃、1.0 ml/分钟 80% 15 mM 乙酸铵 pH 4.1 和 20% 甲醇, 于 215 nm 检测)。在 20 分钟内, 7% 的 D-PG 转化为苯乙醛酸, 而在用 D-HPG
15 作为底物的相似实验中, 12% 的 D-HPG 转变为对羟基苯乙醛酸。

实施例 16: D-HpgAT 的最优 pH

用 5 ml 反应混合物测定所述酶的最优 pH, 所述反应混合物包含 100 mM 一定 pH 的缓冲液、6.5 mM 对羟基苯乙醛酸、0.05 mM 磷酸
20 吡哆醛和 100 μ l 无细胞提取物(1.35 mg 蛋白, 实施例 14)。通过加入 300 μ mole L-谷氨酸(合适 pH、60 mM 终浓度)开始反应。于 35℃ 一定的时间间隔后, 吸取样品并通过加入相同体积的 0.2 M H_3PO_4 终止反应。通过 HPLC (Biorad HPX-87C 300 mm $\times$ 7.8 mm, 20 μ l 注样体积, 柱温 80℃、1 ml/分钟 5 mM 磷酸钙)分析样品并于 210 nm 检测。

25 在 pH 5-11 的范围内测试酶活性。分别应用 KH_2PO_4/Na_2HPO_4 缓冲液(pH 5-8)、TRIC-HCl 缓冲液(pH 8-9)、CHES-NaOH 缓冲液(pH 9-10)和 CAPS-NaOH 缓冲液(pH 10-11)。

发现所述酶的最优 pH 在 8.5-9 之间。在 pH 6-7.5 观察到显著活

性。这与 Wiyakrutta 和 Meevootisom (1997, J. Biotechnol., 55: 193-203) 相反, 他们在 pH 7.5 以下未观测到施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) 的任何 D-HpgAT 活性。

5 **实施例 17: 丙酮酸作为 D-HpgAT 的氨基受体**

应用实施例 12 的分光光度计测定(但在测定混合物中没有 Triton), 用丙酮酸代替 α -酮戊二酸作为氨基受体。由于形成 HPGL, 所以可观测到吸光度增加。因此, 恶臭假单胞菌 D-HpgAT 能够利用丙酮酸作为氨基受体。Wiyakrutta 和 Meevootisom (1997, J. Biotechnol., 55: 193-203)描述的施氏假单胞菌转氨酶利用 α -酮戊二酸作为唯一的氨基受体。

10 **实施例 18: D-HpgAT 的对映选择性(I)**

使用实施例 12 的分光光度计测定测试 D-HpgAT 对 L-HPG 的活性。当使用 L-HPG 作为底物时未观测到吸光度增加。加入 D-HPG 后, 吸光度开始增加。因此, 所述 D-HpgAT 对 D-对羟基苯基甘氨酸具有选择性。

为测试 L-谷氨酸的对映选择性, 于 20℃温育 3 ml 反应混合物, 该混合物含有 100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.0、60 mM D-谷氨酸和 0.1 mM 磷酸吡哆醛。该混合物在 340 nm 的分光光度计活性检测中用作空白。向反应混合物中加入对羟基苯乙醛酸(0.5 mM 终浓度)。温育 2 分钟后, 通过向反应混合物中加入 20 μ l 无细胞提取物(0.27 mg 蛋白, 实施例 14)开始反应。当使用 D-谷氨酸作为底物时未能鉴定出吸光度降低。加入 L-谷氨酸后, 吸光度开始下降。因此, 所述 D-HpgAT 对 L-谷氨酸具有选择性。

25 **实施例 19: D-HpgAT 的对映选择性(II)**

为进一步证实严格的对映选择性, 于 35℃预温育两种反应混合

物(50 ml 终体积)10 分钟,这两种混合物含有 100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 8.0、13 mM 对羟基苯乙醛酸、0.05 mM 磷酸吡哆醛和无细胞提取物(13.5 或 1.35 mg 蛋白,实施例 14)。通过加入 34.8 mmol L-谷氨酸 pH 8.0 (终浓度 0.7 M)开始反应。

5 一定间隔后吸取样品(1 ml), 通过加入 2 ml 0.2 M H_3PO_4 终止反应, 以实施例 15 的方法通过 HPLC 分析。在反应中仅产生 D-HPG (没有 L-HPG)。

实验部分 II (实施例 20-35): 构建和测试人工 D-(H)PG 生物合成操纵子

实施例 20-35 的一般性考虑因素

选择质粒 pJF119EH 作为人工 D-(H)PG 生物合成操纵子的表达载体。这种宿主范围广泛的载体由 Fürste 等(1986, Gene, 48: 119-131)构建, 适于在各种革兰氏阴性菌中进行蛋白表达。pJF119EH 表达系统使用 IPTG 诱导型 *tac* 启动子, 并携带 *lac* 阻遏蛋白(*lac I^q* 基因), *lac* 阻遏蛋白在没有诱导物的情况下使克隆外源基因的表达保持在极低的水平。

在所有情况下，都通过 PCR 由实施例 1、实施例 9 和实施例 13 描述的合适质粒扩增属于 D-(H)PG 操纵子的不同基因。为确保在这些基因前存在最佳的核糖体结合位点(RBS)，包括实际上存在于 pBAD/Myc-HisC 中的 RBS。

实施例 20: 构建质粒 pJU-Sc-HmaS

使用 PCR 将天蓝色链霉菌对羟基扁桃酸合酶基因亚克隆入 pJF119EH 质粒。使用 5'-GGGAATTCAGGAGGAATTAACCATGCCGCGAGcGAC-3' [SEQ ID: No.25] (下划线为 *Eco*RI 限制位点, 双下划线为起始密码子, 将非大写字母表示的密码子 3 和 4 更改为大肠杆菌更常使用的密码子)

和 5'-GAATTCCCATATTCTAGAAGGTCATCGGCCGGCCACT-3'
[SEQ ID: No.26] (下划线为 *Xba* I 限制位点, 双下划线为终止密码子)
作为引物, 使用 pBAD-Sc-HmaS (参见实施例 1.3) 质粒 DNA 作为模
板, 扩增包含 RBS 的 HmaS ORF。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片
段的正确大小(1120 bp)。

用 *Eco*RI 和 *Xba* I 消化所述片段和质粒 pJF119EH。连接两种片
段, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 中。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼
脂平板上选择转化体。显示正确插入序列(通过测序证实)的质粒叫做
pJF-Sc-HmaS。

10

实施例 21: 构建质粒 pJF-Ao-HmaS

使用 PCR 将东方诺卡氏菌对羟基扁桃酸合酶基因亚克隆入
pJF119EH。使用 5'-TGGGAATTCAGGAGGAATTAACCATGCAG-3'
[SEQ ID: No.27] (下划线为 *Eco*RI 限制位点, 双下划线为起始密码
子)和 5'-GCCGGACCTCTAGATACGTCATCGCCG-3' [SEQ ID: No.28]
(下划线为 *Xba* I 限制位点, 双下划线为终止密码子)作为引物, 使用
pBAD-Ao-HmaS (参见实施例 1.1) 质粒 DNA 作为模板, 扩增包含 RBS
的 HmaS ORF。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小(1115
bp)。

20

用 *Eco*RI 和 *Xba* I 消化所述片段和质粒 pJF119EH。连接两种片
段, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 中。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼
脂平板上选择转化体。显示正确插入序列(通过测序证实)的质粒叫做
pJF-Ao-HmaS。

25

实施例 22: 构建质粒 pJF-Sc-HmaO

使用 PCR 将天蓝色链霉菌对羟基扁桃酸氧化酶基因亚克隆入
pJF119EH。使用 5'-TGGGTCTAGAGGAGGAATTAACCATGCGcGAGCCG-3' [SEQ ID:

No.29] (下划线为 *Xba*I 限制位点, 双下划线为起始密码子, 将非大写字母表示的密码子 2 更改为大肠杆菌更常使用的密码子)和 5'-GAATTCCCATAGCATGCCTGGTCAATCCGTGGCTCC-3' [SEQ ID: No.30] (下划线为 *Sph*I 限制位点, 双下划线为终止密码子)作为引物, 使用 pBAD-Sc-HmaO (参见实施例 1.4)质粒 DNA 作为模板, 扩增包含 RBS 的 HmaO ORF。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的大小(1178 bp)。

用 *Xba*I 和 *Sph*I 消化所述片段和质粒 pJF119EH。连接两种片段, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 中。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。显示正确插入序列(通过测序证实)的质粒叫做 pJF-Sc-HmaO, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 23: 构建质粒 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO

在该实施例中, 将实施例 20 和 22 的克隆 Sc-HmaS 和 Sc-HmaO 组合在表达载体 pJF119EH 中。通过用 *Xba*I 和 *Sph*I 消化切除表达载体中 pJF-Sc-HmaO 上的 Sc-HmaO 基因, 通过凝胶电泳纯化包含 Sc-HmaO 的该 DNA 片段。用 *Xba*I 和 *Sph*I 消化质粒 pJF-Sc-HmaS, 将其与 Sc-HmaO *Xba*I/*Sph*I 片段连接在一起, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 中。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。选择不同的转化体, 小量制备质粒, 通过限制酶切作图分析质粒 DNA。在 pJF119EH 中以正确的顺序包含所述两种基因的质粒命名为 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 24: 构建质粒 pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO

在该实施例中, 以和实施例 23 描述的 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO 构建相同的方式将实施例 21 和 22 的克隆 Ao-HmaS 和 Sc-HmaO 组合在表达载体 pJF119EH 中。在 pJF119EH 中以正确的顺序包含所述两种基因的质粒命名为 pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO, 将该质粒用于进一

步的研究。

实施例 25: 构建质粒 pJF-HpgAT

使用 PCR 将恶臭假单胞菌 D-对羟基苯基甘氨酸转氨酶基因亚克
5 隆 入 pJF119EH 。 使 用 5'-
TTTCCCAAGCTTACAGGAGGAATTAACCATG-3' [SEQ ID: No.31]
(下划线为 *Hind* III 限制位点, 双下划线为起始密码子)和 5'-
GTACCAGCTGCAAAGCTTGAGTTAGCCCAG-3' [SEQ ID: No.32]
(下划线为 *Hind* III 限制位点, 双下划线为终止密码子)作为引物, 使
10 用 pBAD-HpgAT (参见实施例 13)质粒 DNA 作为模板, 扩增包含 RBS
的 HpgAT ORF。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小(1378
bp)。

用 *Hind* III 消化所述片段和质粒 pJF119EH。连接两种片段, 并
转化入大肠杆菌 DH5 α 中。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板
15 上选择转化体。使用限制酶切分析确认目的片段以和 *tac* 启动子相同
的方向插入。除了一个沉默突变(密码子 46 由 GCG 变为 GCA)以外,
显示正确插入序列的质粒叫做 pJF-HpgAT, 将该质粒用于进一步的
研究。

实施例 26: 构建质粒 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT

在该实施例中, 将实施例 25 的克隆 HpgAT 亚克隆入实施例 23
的质粒 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO。通过用 *Hind* III 消化切除表达载体中
pJF-HpgAT 上的 HpgAT 基因, 通过凝胶电泳纯化含 HpgAT 基因的
该 DNA 片段。用 *Hind* III 消化质粒 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO。去磷酸
25 化后, 将该片段与 HpgAT *Hind* III 片段连接在一起, 并转化入大肠
杆菌 DH5 α 中。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化
体。选择不同的转化体, 小量制备质粒, 通过限制酶切作图分析质
粒 DNA。在 pJF119EH 中以正确的顺序和方向包含所述三个基因的

质粒命名为 pJF-Sc-HmaS-ScHmaO-HpgAT, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 27: 构建质粒 pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT

在该实施例中, 以和实施例 26 描述的 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT 构建相同的方式将实施例 25 的克隆 HpgAT 亚克隆入实施例 24 的质粒 pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO。在 pJF119EH 中以正确的顺序包含所述三个基因的质粒命名为 pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 28: 构建质粒 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT

在该实施例中, 将存在于 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT (实施例 26) 中的克隆 Sc-HmaO 与恶臭假单胞菌的 *mdlB* 基因互换, 获得质粒 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT。使用 5'-GGGTCTAGAGGAGGAATTAACCATGAGCCAGAATCTCTTT-3' [SEQ ID: No.33] (下划线为 *Xba* I 限制位点, 双下划线为起始密码子) 和 5'-CTGCAGAACCCAGCATGGTGGTCAGTACTTCACTCATGCG-3' [SEQ ID: No.34] (下划线为 *BstX* I 限制位点, 双下划线为终止密码子) 作为引物, 并使用 pGEM-Bldm (参见实施例 9) 质粒 DNA 作为模板, 通过 PCR 扩增包含 RBS 序列的恶臭假单胞菌扁桃酸脱氢酶基因, 所述 RBS 序列实际上存在于质粒 pBAD/Myc-His 中。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小(1236 bp)。

用 *Xba* I 和 *BstX* I 消化所述片段。用 *Xba* I 和 *Sph* I 消化质粒 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT, 产生一个无 HmaO 基因的 7692 bp 质粒片段。将纯化的 7692 bp *Xba* I/*Sph* I 片段与含 *Xba* I/*BstX* I 片段的 *mdlB* ORF 连接在一起, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 中。在含 100 mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。选择不同的转化体, 小量制备质粒, 通过限制酶切作图分析质粒 DNA。在 pJF119EH 中以正

确的顺序包含所述三个基因的质粒命名为 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 29: 构建质粒 pJF-Ao-HmaS-mdlB-HpgAT

5 在该实施例中, 以和实施例 28 描述的 pJF-Sc-HmaS-Sc-mdlB-HpgAT 构建相同的方式将存在于 pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT (实施例 27) 中的克隆 Sc-HmaO 与恶臭假单胞菌的 *mdlB* 基因互换, 产生质粒 pJF-Ao-HmaS-mdlB-HpgAT。

10 将在 pJF119EH 中以正确的顺序包含所述三个基因的质粒命名为 pJF-Ao-HmaS-mdlB-HpgAT, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 30: 人工 D-(H)PG 簇在质粒 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT、pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT、pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT 和 pJF-Ao-HmaS-mdlB-HpgAT 上的表达

15 用携带质粒 pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT、pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT、pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT 或 pJF-Ao-HmaS-mdlB-HpgAT 的大肠杆菌 DH5 α 菌株的单菌落接种含氨苄青霉素(100 μ g/ml) 的 10 ml LB 培养基, 并于 30 $^{\circ}$ C 温育 16 小时。

20 随后用 1 ml 这些培养物接种 50 ml 同样的培养基。于 30 $^{\circ}$ C、180 rpm 培养细胞。在 OD_{620nm} 0.8 时, 通过加入 0.1 mM IPTG 诱导细胞。4 小时后, 收获细胞, 并用 100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.5 清洗。于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻等份的清洗细胞待以后使用。作为对照, 同样处理携带质粒 pJF119EH 的大肠杆菌 DH5 α 。

25 临使用前用 B-PERTM(在磷酸缓冲液中)(Pierce, Rockford, Illinois, USA)制备粗提物。

实施例 31: 由对羟基丙酮酸苯酯体外生产 D-HPG

3 ml 的测定混合物包含 200 mM 磷酸钾缓冲液 pH 8.0、5 mM 对

羟基丙酮酸苯酯(HPP)、10%乙醇(使用 50 mM 对羟基丙酮酸苯酯母液的 96%乙醇溶液)、44 mM 抗坏血酸、40 mM L-谷氨酸、40 mM NAD^+ 、0.1 mM 磷酸吡哆醛和至终浓度为 0.6 mg/ml 可溶性蛋白的实施例 30 的无细胞提取物。

5 通过加入 HPP 开始测定,于 30℃、65 小时后通过加入 0.1 ml 1 N HCl 至 0.5 ml 等份的反应系统中终止测定。按实施例 3 所述的 HPLC 分析样品。

表 1 概述了所产生的对羟基扁桃酸(HMA)、对羟基苯乙醛酸(HPGL)和 D-HPG 的 mg/l 量。

10

表 1:

质粒	HMA	HPGL	D-HPG
pJF-Sc-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT	17	67	9
pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO-HpgAT	0	166	11
pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT	37	73	24
pJF-Ao-HmaS-mdlB-HpgAT	0	97	26
PJF119EH	0	0	0

由表可见,在使用得自大肠杆菌 DH5 α /pJF119EH 的无细胞提取物的对照实验中未检测到这些化合物(HMA、HPGL 和 D-HPG)。

15

实施例 32: 由丙酮酸苯酯体外生产 D-PG

3 ml 测定混合物包含 200 mM 磷酸钾缓冲液 pH 8.0、5 mM 丙酮酸苯酯(PP)、44 mM 抗坏血酸、40 mM L-谷氨酸、40 mM NAD^+ 、0.1 mM 磷酸吡哆醛和至终浓度为 0.3 mg/ml 可溶性蛋白的实施例 30 的无细胞提取物。

20

通过加入 PP 开始测定,于 30℃、39 小时后通过加入 0.1 ml 1 N HCl 至 0.5 ml 等份的反应系统中终止测定。按实施例 3 所述的 HPLC 分析样品。

在 39 小时内,用得自大肠杆菌 DH5 α /pJF-Ao-HmaS-Sc-HmaO-

HpgAT 的无细胞提取物生产 32 mg/l 的 D-PG, 而用得自大肠杆菌 DH5 α /pJF-Ao-HmaS-mdlB-HpgAT 的无细胞提取物生产 27 mg/l 的 D-PG。在使用得自大肠杆菌 DH5 α /pJF119EH 的无细胞提取物的对照实验中未检测到 D-PG。

5

实施例 33: 构建质粒 pCR-BI-tyrA

使

用

5'-

GCGTGGAAGCTTAAGAGGTTTATTATGGTTGCTGAA-3' [SEQ ID: No.35] (下划线为 *Hind* III 限制位点, 双下划线为起始密码子)和
10 5'-GTGCACGGTCTCGAGCTGAATTCTTACTGGCGATTGTCAT-3' [SEQ ID: No.36] (下划线为 *Bsa* I 识别切割位点, 双下划线为终止密码子)作为引物, 并使用野生型大肠杆菌菌株 LJ110 (Zeppenfeld 等 2000) 染色体 DNA 作为模板, 扩增含大肠杆菌原有 RBS 的编码大肠杆菌分支酸变位酶-预苯酸脱氢酶的 *tyrA* ORF (保藏号 AE000346 的核苷酸 4740-5877)。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段的正确大小(1169
15 bp)。

按照供应商的说明书, 将扩增片段直接插入载体 pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), 并转化入化学感受态大肠杆菌 Top10 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands)。在含 50
20 mg/l 卡那霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。显示正确插入序列(通过测序证实)的质粒叫做 pCR-BI-tyrA, 将该质粒用于进一步的研究。

实施例 34: 构建质粒 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT-tyrA

选择大肠杆菌 KB532 ($\Delta(pheA-tyrA)$, $\Delta tyrR$, *aroF*^{fbr}, *thiA*, *hsdR17*,
25 *endA1*, *supE44*)作为 D-HPG 的生产宿主菌株。KB532 是 L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸营养缺陷型菌株。该菌株没有 *tyrA* 基因(分支酸变位酶/预苯酸脱氢酶)、*pheA* 基因(分支酸变位酶/预苯酸脱水酶)和全局调节子 *tyrR*, 并携带有编码反馈(L-酪氨酸)抗性 DAHP 合酶的 *aroF*^{fbr}。 *tyrA*

基因在 KB532 中过表达导致大肠杆菌宿主产生酪氨酸，随之也产生传递大量对羟基丙酮酸苯酯的菌株。

为能够过表达 *tyrA* 和人工 D-(H)PG 操纵子，将实施例 33 的克隆 *tyrA* 基因亚克隆入实施例 28 的质粒 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT。

5 通过用 *Hind* III 和 *Bsa* I 消化切除表达载体中 pCR-BI-*tyrA* 上的 *tyrA* 基因及其 RBS，并通过凝胶电泳纯化含 *tyrA* ORF 的 DNA 片段。

因为 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT 含有三个 *Hind* III 位点，所以用 *Hind* III 部分消化质粒 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT，以获得线性化质粒片段。通过琼脂糖凝胶电泳确认限制性片段的正确大小，并由该凝胶纯化对应于该线性化质粒的 8912 bp 片段。用碱性磷酸酶处理以
10 防止质粒再环化后，将这些 8912 bp 片段与 *tyrA Hind* III/*Bsa* I 片段连接在一起。

通过转化 *tyrA* 缺陷型大肠杆菌宿主 KB532 (参见上文)并在补加 50 mg/l L-苯丙氨酸和 0.01 mM IPTG 的基本培养基上生长，根据互补性选择重组质粒。选择不同的转化体，小量制备质粒，并通过限制酶切作图分析质粒 DNA。在 pJF119EH 中以正确的顺序和方向包含所述四个基因的质粒命名为 pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT-*tyrA*，相应菌株叫做 KB532/pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT-*tyrA*，将其用于进一步研究。

20

实施例 35: 发酵生产 D-HPG

用矿质培养基研究大肠杆菌 KB532/pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT-*tyrA* 由葡萄糖生产 D-HPG。该矿质培养基包含柠檬酸钠·3H₂O (1.0 g/l)、MgSO₄·7H₂O (0.3 g/l)、KH₂PO₄ (3.0 g/l)、K₂HPO₄ (12.0 g/l)、NaCl (0.1 g/l)、(NH₄)₂SO₄ (5.0 g/l)、CaCl₂·2H₂O (15.0 mg/l)、FeSO₄·7H₂O (75.0 mg/l)、盐酸硫胺素(维生素 B1)(5.0 mg/l)和 L-苯丙氨酸(0.05 g/l)。其它矿物质以痕量元素溶液(1 ml/l)形式加入，所述痕量元素溶液包括
25 Al₂(SO₄)₃·18H₂O (2.0 g/l)、CoCl₂·6H₂O (0.7 g/l)、CuSO₄·5H₂O (2.5 g/l)、

H_3BO_3 (0.5 g/l)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (20.0 g/l)、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.0 g/l)、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.0 g/l)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (15.0 g/l)。葡萄糖母液(30 g/l)单独高压蒸汽灭菌，并加入到无菌培养基中至终浓度为 4 g/l。

5 使用大肠杆菌 KB532/pJF-Sc-HmaS-mdlB-HpgAT-tyrA 单菌落接种 10 ml 含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g/ml}$)的基本培养基，并于 30℃培养 16 小时。随后用 4 ml 该培养物接种 50 ml 相同培养基，并于 33℃、180 rpm 培养 24 小时。12 小时后 $\text{OD}_{620\text{nm}}$ 约为 0.6 时，通过加入 0.1 mM IPTG 诱导细胞。将培养物上清液样品调节至 pH 5.8，冻干，并再溶解于 D_2O 中。323 K 的 600 MHz ^1H -NMR 显示预期的谐振频谱，形成少量 HPG
10 尖峰证实存在 HPG。由 2-D COSY 实验获得了大量证据。存在量测定为 5 mg/l。(除了 HPG 之外，还存在 80 mg/l 的其前体对羟基苯乙醛酸，但没有对羟基扁桃酸)。

序 列 表

5	<110> DSM N. V. DSM Biotech GmbH Johns Hopkins University	
10	<120> 发酵生产 D-对羟基苯基甘氨酸和 D-苯基甘氨酸 <130> 发酵生产 D-PG 和 D-HPG <140> 美国 <141> 2000-10-27	
15	<160> 36 <170> PatentIn Ver. 2.1	
20	<210> 1 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列	
25	<220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸 <400> 1 gtccaacggtc tcccatgcag aatttcgaga t	31
30	<210> 2 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
40	<400> 2 acatcccaag cttcacgttc gaggtc	26
45	<210> 3 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸		
	<400> 3		
5	cgctcgggtca tgacgtacgt ttccctg	27	
	<210> 4		
	<211> 28		
10	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸		
15	<400> 4		
	acgaagaagc ttatcaaaca acccccag	28	
	<210> 5		
20	<211> 26		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
25	<220>		
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸		
	<400> 5		
30	atgccgccca gtgacatcgc gtacgc	26	
	<210> 6		
	<211> 33		
	<212> DNA		
35	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸		
40	<400> 6		
	ccctcgggtac caggtcatcg gccggccact tcc	33	
	<210> 7		
45	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 7	
5	atgcgggagc cgctcacgct cgac	24
	<210> 8	
	<211> 36	
	<212> DNA	
10	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
15	<400> 8	
	ccaactggta cctggtcata cgtggctcct gtctcg	36
	<210> 9	
20	<211> 1140	
	<212> DNA	
	<213> 均匀诺卡氏菌	
	<220>	
25	<221> CDS	
	<222> (52).. (1086)	
	<223> 均匀诺卡氏菌津山亚种 ATCC 21806 对羟基扁桃酸合酶 CDS	
	<400> 9	
30	aaaccgtcta taaatgctgc cggaggcgga tcccacggct ggaggttcgt g atg gcg	57
		Met Ala
		1
	gca cag gca ggc agc gtg ttc gac ggc atg acg ctc gac cac acc gtg	105
35	Ala Gln Ala Gly Ser Val Phe Asp Gly Met Thr Leu Asp His Thr Val	
	5 10 15	
	ttc tac gtc ggc gac gcg gac cgc gcg gcg ggc gag ctc acc gac aag	153
	Phe Tyr Val Gly Asp Ala Asp Arg Ala Ala Gly Glu Leu Thr Asp Lys	
40	20 25 30	
	tac ggg ctg gtg gtg ctc ggc acg tcc gag acc tcg tcg gtg cgc tcg	201
	Tyr Gly Leu Val Val Leu Gly Thr Ser Glu Thr Ser Ser Val Arg Ser	
	35 40 45 50	
45	gtc gcg gtg ggc ggc ggc tcc atc cgg ctg gtg ttc tcc cag gcc atc	249
	Val Ala Val Gly Gly Gly Ser Ile Arg Leu Val Phe Ser Gln Ala Ile	
	55 60 65	

	gcc gac gac acc ccg gct gcc gcg tac gtg aag gtg cac ggc gac ggc	297
	Ala Asp Asp Thr Pro Ala Ala Ala Tyr Val Lys Val His Gly Asp Gly	
	70 75 80	
5	gtg gcc gac ctc gcg ctg ggc gtc gcc gac gcc cgc gcc gcg ttc gcc	345
	Val Ala Asp Leu Ala Leu Gly Val Ala Asp Ala Arg Ala Ala Phe Ala	
	85 90 95	
10	gag gcg gtg cgg cgg ggc gcg cgg ccg gtg gcc gag ccc acc gag gcc	393
	Glu Ala Val Arg Arg Gly Ala Arg Pro Val Ala Glu Pro Thr Glu Ala	
	100 105 110	
15	gac ggc gcg gtg ctc gcc acg atc atg ggc ttc ggc gac gtg gtg cac	441
	Asp Gly Ala Val Leu Ala Thr Ile Met Gly Phe Gly Asp Val Val His	
	115 120 125 130	
20	acc ttc gtc cag cgc ccc ggc ggc gcg ccc ggc gag gac ccg gag agc	489
	Thr Phe Val Gln Arg Pro Gly Gly Ala Pro Gly Glu Asp Pro Glu Ser	
	135 140 145	
25	gcg ggc ggc ctg cgc gtg ctg gac cac ttc gcg gtc tgc ctc gag gcg	537
	Ala Gly Gly Leu Arg Val Leu Asp His Phe Ala Val Cys Leu Glu Ala	
	150 155 160	
30	ggc ggg ctg gag ccg acc gtg gcg ttc tac cag gag gtg ctg gac ttc	585
	Gly Gly Leu Glu Pro Thr Val Ala Phe Tyr Gln Glu Val Leu Asp Phe	
	165 170 175	
35	cgg gtg gtc ttc gag gag aag atc gtc gtc ggg gcg cag gcg atg aac	633
	Arg Val Val Phe Glu Glu Lys Ile Val Val Gly Ala Gln Ala Met Asn	
	180 185 190	
40	tcc aag gtc gtg cag agc acg tcc ggc gcg gtc acg ctg acc ctc atc	681
	Ser Lys Val Val Gln Ser Thr Ser Gly Ala Val Thr Leu Thr Leu Ile	
	195 200 205 210	
45	gaa ccg gac acc tcg cgc aag ccc ggt cag atc gac gac ttc atc aag	729
	Glu Pro Asp Thr Ser Arg Lys Pro Gly Gln Ile Asp Asp Phe Ile Lys	
	215 220 225	
50	aac cac ggt ggc gcg ggc gtg cag cac atc gcc ttc gcc acc gac ggc	777
	Asn His Gly Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala Phe Ala Thr Asp Gly	
	230 235 240	
55	atc gtg gac gcg gtg cgc cgg ttg cgc gag cgg ggc gtg gag ctg ctc	825
	Ile Val Asp Ala Val Arg Arg Leu Arg Glu Arg Gly Val Glu Leu Leu	
	245 250 255	
60	acc acg ccc gcc gcc tac tac gac ctg ctg gcg gac cgc ctc gga ccg	873

	Thr Thr Pro Ala Ala Tyr Tyr Asp Leu Leu Ala Asp Arg Leu Gly Pro	
	260 265 270	
5	acc cgg tac tcc acg gcc gag ctg gcc gag ctg aac ctg ctg gtc gac Thr Arg Tyr Ser Thr Ala Glu Leu Ala Glu Leu Asn Leu Leu Val Asp	921
	275 280 285 290	
10	gag gac cag gac ggc aag ctg tac cag atc ttc gcc cgg tcc acc cac Glu Asp Gln Asp Gly Lys Leu Tyr Gln Ile Phe Ala Arg Ser Thr His	969
	295 300 305	
15	ccc agg ggc acg ttc ttc ttc gag atc atc gag cgc gcg ggc gcg cac Pro Arg Gly Thr Phe Phe Phe Glu Ile Ile Glu Arg Ala Gly Ala His	1017
	310 315 320	
	acc ttc ggc agc ggc aac atc aag gcc ctc tac gag gcc gtc gag gcc Thr Phe Gly Ser Gly Asn Ile Lys Ala Leu Tyr Glu Ala Val Glu Ala	1065
	325 330 335	
20	gag cgc cac cgg acc gag cgc tgagcgcggg gcacggcgat ggacccgctg Glu Arg His Arg Thr Glu Arg	1116
	340 345	
25	cgcgcgggtg acctgcacgg ctcg	1140
	<210> 10 <211> 345 <212> 蛋白质 <213> 均匀诺卡氏菌	
30	<400> 10 Met Ala Ala Gln Ala Gly Ser Val Phe Asp Gly Met Thr Leu Asp His	
	1 5 10 15	
35	Thr Val Phe Tyr Val Gly Asp Ala Asp Arg Ala Ala Gly Glu Leu Thr	
	20 25 30	
40	Asp Lys Tyr Gly Leu Val Val Leu Gly Thr Ser Glu Thr Ser Ser Val	
	35 40 45	
	Arg Ser Val Ala Val Gly Gly Gly Ser Ile Arg Leu Val Phe Ser Gln	
	50 55 60	
45	Ala Ile Ala Asp Asp Thr Pro Ala Ala Ala Tyr Val Lys Val His Gly	
	65 70 75 80	
	Asp Gly Val Ala Asp Leu Ala Leu Gly Val Ala Asp Ala Arg Ala Ala	
	85 90 95	

	Phe Ala Glu Ala Val Arg Arg Gly Ala Arg Pro Val Ala Glu Pro Thr	
	100	105 110
5	Glu Ala Asp Gly Ala Val Leu Ala Thr Ile Met Gly Phe Gly Asp Val	
	115	120 125
	Val His Thr Phe Val Gln Arg Pro Gly Gly Ala Pro Gly Glu Asp Pro	
	130	135 140
10	Glu Ser Ala Gly Gly Leu Arg Val Leu Asp His Phe Ala Val Cys Leu	
	145	150 155 160
	Glu Ala Gly Gly Leu Glu Pro Thr Val Ala Phe Tyr Gln Glu Val Leu	
15	165	170 175
	Asp Phe Arg Val Val Phe Glu Glu Lys Ile Val Val Gly Ala Gln Ala	
	180	185 190
20	Met Asn Ser Lys Val Val Gln Ser Thr Ser Gly Ala Val Thr Leu Thr	
	195	200 205
	Leu Ile Glu Pro Asp Thr Ser Arg Lys Pro Gly Gln Ile Asp Asp Phe	
	210	215 220
25	Ile Lys Asn His Gly Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala Phe Ala Thr	
	225	230 235 240
	Asp Gly Ile Val Asp Ala Val Arg Arg Leu Arg Glu Arg Gly Val Glu	
30	245	250 255
	Leu Leu Thr Thr Pro Ala Ala Tyr Tyr Asp Leu Leu Ala Asp Arg Leu	
	260	265 270
35	Gly Pro Thr Arg Tyr Ser Thr Ala Glu Leu Ala Glu Leu Asn Leu Leu	
	275	280 285
	Val Asp Glu Asp Gln Asp Gly Lys Leu Tyr Gln Ile Phe Ala Arg Ser	
	290	295 300
40	Thr His Pro Arg Gly Thr Phe Phe Phe Glu Ile Ile Glu Arg Ala Gly	
	305	310 315 320
	Ala His Thr Phe Gly Ser Gly Asn Ile Lys Ala Leu Tyr Glu Ala Val	
45	325	330 335
	Glu Ala Glu Arg His Arg Thr Glu Arg	
	340	345

5	<210> 11 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
10	<220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 11 agaattcgcg gcacaggcag gcagcg	26
15	<210> 12 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
20	<220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
25	<400> 12 ttataagctt tcagcgctcg gtccggtggc	30
30	<210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
35	<220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 13 tataccatgg cggcacaggc aggc	24
40	<210> 14 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
45	<220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 14 ttataagctt ggcgcggcgc cggtggc	27

```

<210> 15
<211> 1227
<212> DNA
5 <213> 均匀诺卡氏菌

<220>
<221> CDS
<222> (50)..(1177)
10 <223> 均匀诺卡氏菌津山亚种 ATCC 21806 对羟基扁桃酸氧化酶 CDS

<400> 15
ccccgcgcgt ggggagggcgg cgtgcccgac ggacaggagg caacgagcc atg ggc gtc 58
Met Gly Val
15 1

cgc aac tcc gca ggg ggc ggc gcg gaa gac ccc gag gac ctg gct gag 106
Arg Asn Ser Ala Gly Gly Gly Ala Glu Asp Pro Glu Asp Leu Ala Glu
5 10 15

20 gtc gaa cgg gcc gcc gcc gcc cgg ctg ccg ggg gac gtc cgc gac ttc 154
Val Glu Arg Ala Ala Ala Ala Arg Leu Pro Gly Asp Val Arg Asp Phe
20 25 30 35

25 atc gcg ggc ggc agc ggc gac gag gtg acg ctg gcc gcc aac cgc gcg 202
Ile Ala Gly Gly Ser Gly Asp Glu Val Thr Leu Ala Ala Asn Arg Ala
40 45 50

30 gcg ctc gac gac gtg gcc ctg ctc ccc agg gtg ctc gcg ggt gtc cag 250
Ala Leu Asp Asp Val Ala Leu Leu Pro Arg Val Leu Ala Gly Val Gln
55 60 65

35 gcg gcc gac acg agc acc tcg ctc gtg ggc acg gcg gcc acg ctg ccc 298
Ala Ala Asp Thr Ser Thr Ser Leu Val Gly Thr Ala Ala Thr Leu Pro
70 75 80

40 gtc gcc gtg gcg ccg atg ggc tac cag tgc ctc gtc cac ccc gac ggc 346
Val Ala Val Ala Pro Met Gly Tyr Gln Cys Leu Val His Pro Asp Gly
85 90 95

45 gag gtc gcg gct gcc gcc gcg gcg ggc gcc gcc ggc gtc ccc ttc acc 394
Glu Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Val Pro Phe Thr
100 105 110 115

gtc ggc acg ctg agc agc cgg tcg gtc gag gag atc gcc gag acc ggc 442
Val Gly Thr Leu Ser Ser Arg Ser Val Glu Glu Ile Ala Glu Thr Gly
120 125 130

gcg tcg ctg tgg ttc cag ctc tac tgg ctg cgc gat cgc ggc ctg gtc 490

```

	Ala Ser Leu Trp Phe Gln Leu Tyr Trp Leu Arg Asp Arg Gly Leu Val	
	135 140 145	
5	gcc gaa ctc gtg gcg cgg gcc gag gcg gcg ggc tgc cgg gcg ctg gtg Ala Glu Leu Val Ala Arg Ala Glu Ala Ala Gly Cys Arg Ala Leu Val	538
	150 155 160	
10	atc acc gtg gac gtg cgg gtg atg ggc cgc agg ctc cgg gac gtg cgc Ile Thr Val Asp Val Pro Val Met Gly Arg Arg Leu Arg Asp Val Arg	586
	165 170 175	
15	aac ggg atc acc ctg ccc cgg acc gtc cgg gcc gtc cac ctc gcc gac Asn Gly Ile Thr Leu Pro Arg Thr Val Arg Ala Val His Leu Ala Asp	634
	180 185 190 195	
	ggc cgg tca tcc gcg cac gag cgg cgc cag gtc ggc tcc ggc gtc gcc Gly Pro Ser Ser Ala His Glu Pro Arg Gln Val Gly Ser Gly Val Ala	682
	200 205 210	
20	cag cac acg agc gcg gtc ttc gac ccc gcg ttc ggg tgg cgc gac ctg Gln His Thr Ser Ala Val Phe Asp Pro Ala Phe Gly Trp Arg Asp Leu	730
	215 220 225	
25	gag tgg ctg cgg gcg cgc acc agg ctc ccc ctg gtg gtc aag ggc gtg Glu Trp Leu Arg Ala Arg Thr Arg Leu Pro Leu Val Val Lys Gly Val	778
	230 235 240	
30	ctc gac cgg cgc gac gcc acc agg tgc gtc gag ctg ggc gcc tgg gcg Leu Asp Pro Arg Asp Ala Thr Arg Cys Val Glu Leu Gly Ala Ser Ala	826
	245 250 255	
35	gtg gtg gtg tcc aac cac ggc ggg cgg cag ctc gac ggc gcg gcg ccc Val Val Val Ser Asn His Gly Gly Arg Gln Leu Asp Gly Ala Ala Pro	874
	260 265 270 275	
	agc gcg gtg gcc ctg cgg cgc gtc gtc gac gcg gtg gcg ggc gcg gcc Ser Ala Val Ala Leu Pro Arg Val Val Asp Ala Val Ala Gly Ala Ala	922
	280 285 290	
40	gag gtg ctg ttc gac agc ggc gtc cgc ggc ggc gtc gac gtg ctg cgc Glu Val Leu Phe Asp Ser Gly Val Arg Gly Gly Val Asp Val Leu Arg	970
	295 300 305	
45	gcc ctc gcg ctc ggc gcg acc ggc gtg ctg ctc ggc cgc cca atc ctg Ala Leu Ala Leu Gly Ala Thr Gly Val Leu Leu Gly Arg Pro Ile Leu	1018
	310 315 320	
	tgg ggg ctc gcg gtc ggc ggc gag cgc ggc gcg gcg cgg gtg ctg gaa Trp Gly Leu Ala Val Gly Gly Glu Arg Gly Ala Ala Arg Val Leu Glu	1066

	325	330	335	
5	ctg ctg cgc acc gag ttc gcg cag gcc ctg ctg ctc gcc ggg tgc gcc Leu Leu Arg Thr Glu Phe Ala Gln Ala Leu Leu Leu Ala Gly Cys Ala 340 345 350 355			1114
10	gac gtc gac gcg gcc agg gga ctc gcg acc gcg cag gcc gcg ccg acc Asp Val Asp Ala Ala Arg Gly Leu Ala Thr Ala Gln Ala Ala Pro Thr 360 365 370			1162
15	cgg cga ggt gcg ccc tgaccgcctc ggggaccgcg atcggggccc gggcgcgggg Arg Arg Gly Ala Pro 375			1217
20	tcagggaag			1227
25	<210> 16 <211> 376 <212> 蛋白质 <213> 均匀诺卡氏菌			
30	<400> 16 Met Gly Val Arg Asn Ser Ala Gly Gly Gly Ala Glu Asp Pro Glu Asp 1 5 10 15			
35	Leu Ala Glu Val Glu Arg Ala Ala Ala Arg Leu Pro Gly Asp Val 20 25 30			
40	Arg Asp Phe Ile Ala Gly Gly Ser Gly Asp Glu Val Thr Leu Ala Ala 35 40 45			
45	Asn Arg Ala Ala Leu Asp Asp Val Ala Leu Leu Pro Arg Val Leu Ala 50 55 60			
50	Gly Val Gln Ala Ala Asp Thr Ser Thr Ser Leu Val Gly Thr Ala Ala 65 70 75 80			
55	Thr Leu Pro Val Ala Val Ala Pro Met Gly Tyr Gln Cys Leu Val His 85 90 95			
60	Pro Asp Gly Glu Val Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Val 100 105 110			
65	Pro Phe Thr Val Gly Thr Leu Ser Ser Arg Ser Val Glu Glu Ile Ala 115 120 125			
70	Glu Thr Gly Ala Ser Leu Trp Phe Gln Leu Tyr Trp Leu Arg Asp Arg 130 135 140			

	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
5	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 17	
10	agaattcggc gtccgcaact ccgcag	26
	<210> 18	
	<211> 26	
	<212> DNA	
15	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
20	<400> 18	
	aataagcttt caggcgccac ctcgcc	26
	<210> 19	
25	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
30	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 19	
	actcgccaag ggctatggtg tcc	23
35	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
40	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 20	
45	gccaacagtt ccaacagcgg tgtg	24
	<210> 21	
	<211> 1427	

	<212> DNA	
	<213> 恶臭假单胞菌	
	<220>	
5	<221> CDS	
	<222> (51)..(1376)	
	<223> 恶臭假单胞菌 NCIMB 12565 D-对羟基苯基甘氨酸转氨酶 CDS	
	<400> 21	
10	tcagttaact gccatgtaat ctcaaaaacc agtccaatag aggcacacgc atg tct	56
	Met Ser	
	1	
15	att tat agc gat tat gaa cgt aaa acg gtg ggc tcc gcg cat tgg gcg	104
	Ile Tyr Ser Asp Tyr Glu Arg Lys Thr Val Gly Ser Ala His Trp Ala	
	5 10 15	
20	gat cgg gca cga gct gta atg cca gat ggc gta acg gct gat aca cgt	152
	Asp Arg Ala Arg Ala Val Met Pro Asp Gly Val Thr Ala Asp Thr Arg	
	20 25 30	
25	gtt ttt gat ccg cat ggg ctg tac atc tgt gac gcg caa ggt gtt cac	200
	Val Phe Asp Pro His Gly Leu Tyr Ile Cys Asp Ala Gln Gly Val His	
	35 40 45 50	
30	aag acc gat gtt gat ggc aac gta tac ctg gat ttt ttt ggt ggg cat	248
	Lys Thr Asp Val Asp Gly Asn Val Tyr Leu Asp Phe Phe Gly Gly His	
	55 60 65	
35	ggc gct tta gtg ctt ggt cat gga cat cca cgt att aac aag gca atc	296
	Gly Ala Leu Val Leu Gly His Gly His Pro Arg Ile Asn Lys Ala Ile	
	70 75 80	
40	tct gca gcg ctg acg cat ggc gtc caa tac ggt gca agc cat ccg ctt	344
	Ser Ala Ala Leu Thr His Gly Val Gln Tyr Gly Ala Ser His Pro Leu	
	85 90 95	
45	gaa gtg cga tgg gcc gag cgc ttg gtc aac gcc ttc cct tcg atg cat	392
	Glu Val Arg Trp Ala Glu Arg Leu Val Asn Ala Phe Pro Ser Met His	
	100 105 110	
50	aaa gtg cgc ttt gcc ggc agc ggc act gag ggc act tta ttg gca ctg	440
	Lys Val Arg Phe Ala Gly Ser Gly Thr Glu Ala Thr Leu Leu Ala Leu	
	115 120 125 130	
55	cga atg gcg cgg gcg ttt act ggc agg tcg aaa ata cta cgt att gcc	488
	Arg Met Ala Arg Ala Phe Thr Gly Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ile Ala	
	135 140 145	

	acc cac tat cat ggc tgg cat gac ttc tcc gcc tct ggt tac aac agt	536
	Thr His Tyr His Gly Trp His Asp Phe Ser Ala Ser Gly Tyr Asn Ser	
	150 155 160	
5	cac ttc gac ggc cag cca gca cgg ggc gtc ctt gct gaa att gca cag	584
	His Phe Asp Gly Gln Pro Ala Pro Gly Val Leu Ala Glu Ile Ala Gln	
	165 170 175	
10	agc aca cta ctg gtt cgc cca gat gac ttc gaa gga tta cgc gca cta	632
	Ser Thr Leu Leu Val Arg Pro Asp Asp Phe Glu Gly Leu Arg Ala Leu	
	180 185 190	
15	ttc gct caa tac ggc ggt gag att gcg acc att att gcg gag cca gtc	680
	Phe Ala Gln Tyr Gly Gly Glu Ile Ala Thr Ile Ile Ala Glu Pro Val	
	195 200 205 210	
20	ggc tct cat ttc ggt atc act cgg gtc agc gac gat ttc ttg cta gaa	728
	Gly Ser His Phe Gly Ile Thr Pro Val Ser Asp Asp Phe Leu Leu Glu	
	215 220 225	
25	ggc gcc gcg ctg gct cga aag cac ggt gca ata ttc att ctt gac gaa	776
	Gly Ala Ala Leu Ala Arg Lys His Gly Ala Ile Phe Ile Leu Asp Glu	
	230 235 240	
30	gtg ata acc ggt ttt cgc gtg ggt aac cac ggt atg cag ggg ctt ctc	824
	Val Ile Thr Gly Phe Arg Val Gly Asn His Gly Met Gln Gly Leu Leu	
	245 250 255	
35	gac att gca cgg gat ctt acg tgc ttg gcc aag gcc agt gct gga ggt	872
	Asp Ile Ala Pro Asp Leu Thr Cys Leu Ala Lys Ala Ser Ala Gly Gly	
	260 265 270	
40	ctt cct gga ggc gta gtc gga gga agg gcg gat gtc atg gcg gta ctg	920
	Leu Pro Gly Gly Val Val Gly Gly Arg Ala Asp Val Met Ala Val Leu	
	275 280 285 290	
45	gat cgc ggt tca gac cgt aag gtt ctg cat caa ggc acc ttc acc gga	968
	Asp Arg Gly Ser Asp Arg Lys Val Leu His Gln Gly Thr Phe Thr Gly	
	295 300 305	
50	aac cca att acg gcg gcg gca gca atc gcg gcg atc gat acc att atc	1016
	Asn Pro Ile Thr Ala Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ile Asp Thr Ile Ile	
	310 315 320	
55	gaa gat gac gtg tgc aca cac atc aat gcc ctc ggt caa tac gcc cgg	1064
	Glu Asp Asp Val Cys Thr His Ile Asn Ala Leu Gly Gln Tyr Ala Arg	
	325 330 335	
60	gac tcg atg aac gaa ctc ttc gct cgt aag cat ttg gac tgg ttg gct	1112

	Asp Ser Met Asn Glu Leu Phe Ala Arg Lys His Leu Asp Trp Leu Ala	
	340 345 350	
5	tat ggc cgc ttt tcc ggc ttc cac ctg atg ccg gga tta tct ccg ctg Tyr Gly Arg Phe Ser Gly Phe His Leu Met Pro Gly Leu Ser Pro Leu	1160
	355 360 365 370	
10	acc act gac acg ggt gtg atc act cgc gga gaa gtt gca cgg ccc gca Thr Thr Asp Thr Gly Val Ile Thr Arg Gly Glu Val Ala Arg Pro Ala	1208
	375 380 385	
15	gta aaa atg att gcc gct atg cgc atg gca tta atc ctt gag ggc atc Val Lys Met Ile Ala Ala Met Arg Met Ala Leu Ile Leu Glu Gly Ile	1256
	390 395 400	
20	gat att ggt ggc cgt gga tct gtg ttt ctc tct gcg cag cat gat cgc Asp Ile Gly Gly Arg Gly Ser Val Phe Leu Ser Ala Gln His Asp Arg	1304
	405 410 415	
25	gga cat gtc gac caa ctg gtg tog acc ttt gat tcc att ctt ggc cgc Gly His Val Asp Gln Leu Val Ser Thr Phe Asp Ser Ile Leu Gly Arg	1352
	420 425 430	
30	ctg gct gaa gaa aac ctc ctg ggc taagccctta cacatctgtc tggaatatga Leu Ala Glu Glu Asn Leu Leu Gly	1406
	435 440	
35	atcatgaaaa ctagcctgaa a	1427
	<210> 22 <211> 442 <212> 蛋白质 <213> 恶臭假单胞菌	
40	Met Ser Ile Tyr Ser Asp Tyr Glu Arg Lys Thr Val Gly Ser Ala His 1 5 10 15	
45	Trp Ala Asp Arg Ala Arg Ala Val Met Pro Asp Gly Val Thr Ala Asp 20 25 30	
	Thr Arg Val Phe Asp Pro His Gly Leu Tyr Ile Cys Asp Ala Gln Gly 35 40 45	
	Val His Lys Thr Asp Val Asp Gly Asn Val Tyr Leu Asp Phe Phe Gly 50 55 60	
	Gly His Gly Ala Leu Val Leu Gly His Gly His Pro Arg Ile Asn Lys	

	65	70	75	80
	Ala Ile Ser Ala Ala Leu Thr His Gly Val Gln Tyr Gly Ala Ser His			
		85	90	95
5	Pro Leu Glu Val Arg Trp Ala Glu Arg Leu Val Asn Ala Phe Pro Ser			
		100	105	110
	Met His Lys Val Arg Phe Ala Gly Ser Gly Thr Glu Ala Thr Leu Leu			
10		115	120	125
	Ala Leu Arg Met Ala Arg Ala Phe Thr Gly Arg Ser Lys Ile Leu Arg			
		130	135	140
15	Ile Ala Thr His Tyr His Gly Trp His Asp Phe Ser Ala Ser Gly Tyr			
	145	150	155	160
	Asn Ser His Phe Asp Gly Gln Pro Ala Pro Gly Val Leu Ala Glu Ile			
		165	170	175
20	Ala Gln Ser Thr Leu Leu Val Arg Pro Asp Asp Phe Glu Gly Leu Arg			
		180	185	190
	Ala Leu Phe Ala Gln Tyr Gly Gly Glu Ile Ala Thr Ile Ile Ala Glu			
25		195	200	205
	Pro Val Gly Ser His Phe Gly Ile Thr Pro Val Ser Asp Asp Phe Leu			
		210	215	220
30	Leu Glu Gly Ala Ala Leu Ala Arg Lys His Gly Ala Ile Phe Ile Leu			
	225	230	235	240
	Asp Glu Val Ile Thr Gly Phe Arg Val Gly Asn His Gly Met Gln Gly			
		245	250	255
35	Leu Leu Asp Ile Ala Pro Asp Leu Thr Cys Leu Ala Lys Ala Ser Ala			
		260	265	270
	Gly Gly Leu Pro Gly Gly Val Val Gly Gly Arg Ala Asp Val Met Ala			
40		275	280	285
	Val Leu Asp Arg Gly Ser Asp Arg Lys Val Leu His Gln Gly Thr Phe			
		290	295	300
45	Thr Gly Asn Pro Ile Thr Ala Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ile Asp Thr			
	305	310	315	320
	Ile Ile Glu Asp Asp Val Cys Thr His Ile Asn Ala Leu Gly Gln Tyr			
		325	330	335

	Ala Arg Asp Ser Met Asn Glu Leu Phe Ala Arg Lys His Leu Asp Trp	
	340 345 350	
5	Leu Ala Tyr Gly Arg Phe Ser Gly Phe His Leu Met Pro Gly Leu Ser	
	355 360 365	
	Pro Leu Thr Thr Asp Thr Gly Val Ile Thr Arg Gly Glu Val Ala Arg	
10	370 375 380	
	Pro Ala Val Lys Met Ile Ala Ala Met Arg Met Ala Leu Ile Leu Glu	
	385 390 395 400	
15	Gly Ile Asp Ile Gly Gly Arg Gly Ser Val Phe Leu Ser Ala Gln His	
	405 410 415	
	Asp Arg Gly His Val Asp Gln Leu Val Ser Thr Phe Asp Ser Ile Leu	
	420 425 430	
20	Gly Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu Leu Gly	
	435 440	
25	<210> 23 <211> 46 <212> DNA <213> 人工序列	
30	<220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 23 gtgcacggtc tcgcatgtct atttatagcg attatgaacg taaaac	46
35		
	<210> 24 <211> 42 <212> DNA <213> 人工序列	
40	<220> <223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
45	<400> 24 gtgcacggtc tcctcgagtt agcccaggag gttttcttca gc	42
	<210> 25	

	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
5	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 25	
10	gggaattcag gaggaattaa ccatgccgcc gagcgac	37
	<210> 26	
	<211> 37	
	<212> DNA	
15	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
20	<400> 26	
	gaattcccat attctagaag gtcatcggcc ggccact	37
	<210> 27	
25	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
30	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 27	
	tggaattca ggaggaatta accatgcag	29
35	<210> 28	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
40	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 28	
45	cggccaggtc tagatacgtc atcgccg	27
	<210> 29	
	<211> 35	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
5	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 29	
	tgggtctaga ggaggaatta accatgcgcg agccg	35
10	<210> 30	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
15	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 30	
20	gaattcccat agcatgcctg gtcacccgtg gctcc	35
	<210> 31	
	<211> 31	
25	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
30	<400> 31	
	tttcccaagc ttacaggagg aattaacccat g	31
35	<210> 32	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
40	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 32	
45	gtaccagctg caaagcttga gttagcccag	30
	<210> 33	
	<211> 40	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
5	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 33	
	gggtctagag gaggaattaa ccatgagcca gaatctcttt	40
10	<210> 34	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
15	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 34	
20	ctgcagaacc agcatggtgg tcagtacttc actcatgcg	39
	<210> 35	
	<211> 36	
	<212> DNA	
25	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
30	<400> 35	
	gcgtggaagc ttaagaggtt tattatggtt gctgaa	36
35	<210> 36	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
40	<223> 人工序列描述: 用于 PCR 的基因特异性寡核苷酸	
	<400> 36	
	gtgcacggtc tcgagctgaa ttcttactgg cgattgtcat	40
45		