


 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008120708/13, 25.10.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.10.2006(30) Конвенционный приоритет:
26.10.2005 US 60/730,290

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2009

(45) Опубликовано: 20.07.2010 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: YOSHIMOTO H. et al. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 2002 Aug; 59(4-5):501-8. Epub 2002 Jun 22. DICKINSON J.R. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 1998 Oct 2; 273(40):25751-6. WO 0050624 A, 31.08.2000. RU 2215782 C2, 10.06.2003.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 26.05.2008

(86) Заявка РСТ:
US 2006/041602 (25.10.2006)(87) Публикация РСТ:
WO 2007/050671 (03.05.2007)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ДОНАЛЬДСОН Гейл К. (US),
ЭЛИОТ Эндрю К. (US),
ФЛИНТ Деннис (US),
МЭДЖИО-ХОЛЛ Лори Энн (US),
НАГАРАЯН Васантха (US)

(73) Патентообладатель(и):

Е.И.ДЮПОН ДЕ НЕМУР ЭНД
КОМПАНИ (US)

(54) ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЧЕТЫРЕХУГЛЕРОДНЫХ СПИРТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения изобутанола, включающий получение рекомбинантной микробной клетки-хозяина, содержащей ферментативный путь изобутанола, включающий молекулы ДНК, кодирующие набор полипептидов, которые катализируют

следующие превращения субстрата в продукт: i) пирувата в ацетолактат; ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат; iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α-кетоизовалерат; iv) α-кетоизовалерата в изобутиральдегид; и v) изобутиральдегида в изобутанол, и контактирование клетки-хозяина с ферментируемым углеродным субстратом в

среде ферментации в условиях, при которых
продуцируется изобутанол. Изобретение
позволяет получать изобутанол с высокой

степенью эффективности. 3 н. и 51 з.п. ф-лы, 1
ил., 13 табл.

RU 2 3 9 4 9 1 3 C 2

RU 2 3 9 4 9 1 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 394 913** (13) **C2**
(51) Int. Cl.
C12P 7/16 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2008120708/13, 25.10.2006**

(24) Effective date for property rights:
25.10.2006

(30) Priority:
26.10.2005 US 60/730,290

(43) Application published: **27.12.2009**

(45) Date of publication: **20.07.2010 Bull. 20**

(85) Commencement of national phase: **26.05.2008**

(86) PCT application:
US 2006/041602 (25.10.2006)

(87) PCT publication:
WO 2007/050671 (03.05.2007)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**DONAL'DSON Gejl K. (US),
EhLIOT Ehndrju K. (US),
FLINT Dennis (US),
MEhDZhIO-KhOLL Lori Ehnn (US),
NAGARAJaN Vasantkha (US)**

(73) Proprietor(s):

E.I.DJuPON DE NEMUR EhND KOMPANI (US)

(54) FERMENTATIVE PRODUCTION OF TETRACARBON ALCOHOLS

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method of producing isobutanol involves obtaining a recombinant microbial host cell which contains a fermentative isobutanol channel which contains DNA molecules which code a set of polypeptides which catalyse the following substrate conversions to a product: i) pyruvate to acetolactate; ii) acetolactate to 2,3-dihydroxyisovalerate; iii)

2,3-dihydroxyisovalerate to α -ketoisovalerate; iv) α -ketoisovalerate to isobutyraldehyde; and v) isobutyraldehyde to isobutanol, and bringing the host cell into contact with the fermented carbon substrate in a fermentation medium under conditions at which isobutanol is produced.

EFFECT: isobutanol with high efficiency.

54 cl, 1 dwg, 13 tbl, 22 ex

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно своду законов США 35 § 119 предварительной заявки с порядковым No. 60/730290, поданной 26 октября 2005 г.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области промышленной микробиологии и получения спиртов. Более конкретно, изобутанол получают путем промышленной ферментации рекомбинантного микроорганизма.

Предшествующий уровень техники

Бутанол является важным промышленным химическим соединением, пригодным в качестве присадки к топливу, химического сырья для промышленного получения пластмасс и в качестве экстрагирующего средства в пищевой промышленности и производстве ароматизаторов. Каждый год от 10 до 12 миллиардов фунтов бутанола получают с помощью нефтехимических способов и потребность в этом химическом продукте массового спроса будет, очевидно, расти.

Известны способы химического синтеза изобутанола, такие как оксосинтез, каталитическая гидрогенизация монооксида углерода (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th edition, 2003, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., Weinheim, Germany, Vol. 5, pp. 716-719) и конденсация метанола с н-пропанолом по Guerbet (Carlini et al., J. Mol. Catal. A:Chem. 220:215-220 (2004)). В этих способах применяют исходные реагенты, происходящие из нефтехимических продуктов, и они обычно дороги и не приемлемы с экологической точки зрения. Получение изобутанола из сырья растительного происхождения должно свести к минимуму выделение тепличного газа и должно представлять собой достижение в данной области техники.

Изобутанол получают биологически как побочный продукт ферментации дрожжей. Он является компонентом «сивушного масла», которое образуется в результате неполного метаболизма аминокислот этой группой грибов. Изобутанол специфически продуцируется в результате катаболизма L-валина. После того как аминокислоту L-валина собирают в качестве источника азота, оставшуюся α -кетокислоту декарбоксилируют и восстанавливают до изобутанола с помощью ферментов так называемого пути Эрлиха (Dickinson et al., J. Biol. Chem. 273(40):25752-25756 (1998)). Выходы сивушного масла и/или его компонентов, достигаемые в процессе ферментации напитков, обычно являются низкими. Например, концентрация изобутанола, получаемая при ферментации пива, как сообщается, составляет менее 16 частей на миллион (Garcia et al., Process Biochemistry 29:303-309 (1994)). Добавление экзогенного L-валина в систему ферментации повышает выход изобутанола, как описано Dickinson et al., выше, где сообщается, что выход изобутанола в 3 г/л получают при внесении L-валина в концентрации 20 г/л в систему ферментации. Однако применение валина в качестве промышленного сырья должно характеризоваться чрезвычайно высокой стоимостью для получения изобутанола в промышленном масштабе. Биосинтез изобутанола непосредственно из сахаров должен быть экономически целесообразным и должен представлять достижение в данной области техники. Сообщения о создании рекомбинантного микроорганизма, продуцирующего изобутанол, отсутствуют.

Следовательно, существует потребность в приемлемом для окружающей среды, рентабельном способе получения изобутанола в качестве единственного продукта. Настоящее изобретение обращено на эту потребность путем обеспечения рекомбинантным микробным хозяином-продуцентом, который экспрессирует

компоненты пути биосинтеза изобутанола.

Краткое изложение сущности изобретения

В изобретении предлагается рекомбинантный микроорганизм, обладающий сконструированным путем биосинтеза изобутанола. Сконструированный микроорганизм может быть использован для промышленного получения изобутанола. Соответственно в одном осуществлении в изобретении предлагается рекомбинантная микробная клетка-хозяин, включающая по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, выбранное из группы, состоящей из

- i) пирувата в ацетолактат (стадия а пути)
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат (стадия b пути)
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат (стадия с пути)
- iv) α -кетоизовалерата в изобутиральдегид (стадия d пути) и

v) изобутиральдегид в изобутанол (стадия e пути), где по меньшей мере одна молекула ДНК является гетерологичной по отношению к указанной микробной клетке-хозяину и где указанная микробная клетка-хозяин продуцирует изобутанол.

В другом осуществлении в изобретении предлагается рекомбинантная микробная клетка-хозяин, включающая по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, выбранное из группы, состоящей из

- i) пирувата в ацетолактат, (стадия а пути)
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, (стадия b пути)
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат, (стадия с пути)
- iv) α -кетоизовалерата в изобутирил-КоА, (стадия f пути),
- v) изобутирил-КоА в изобутиральдегид, (стадия g пути), и
- vi) изобутиральдегид в изобутанол; (стадия e пути),

где по меньшей мере одна молекула ДНК является гетерологичной по отношению к указанной микробной клетке-хозяину и где указанная микробная клетка-хозяин продуцирует изобутанол.

В другом осуществлении в изобретении предлагается рекомбинантная микробная клетка-хозяин, включающая по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, выбранное из группы, состоящей из

- i) пирувата в ацетолактат, (стадия а пути)
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, (стадия b пути)
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат, (стадия с пути)
- iv) α -кетоизовалерата в валин, (стадия h пути)
- v) валина в изобутиламин, (стадия i пути)
- vi) изобутиламина в изобутиральдегид, (стадия j пути), и
- vii) изобутиральдегида в изобутанол; (стадия e пути),

где по меньшей мере одна молекула ДНК является гетерологичной по отношению к указанной микробной клетке-хозяину и где указанная микробная клетка-хозяин продуцирует изобутанол.

В другом осуществлении в изобретении предлагается способ получения изобутанола, включающий

- 1) получение рекомбинантной микробной клетки-хозяина, включающей по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, который

катализирует превращение субстрата в продукт, выбранное из группы, состоящей из

- i) пирувата в ацетолактат (стадия а пути)
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат (стадия b пути)
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат (стадия с пути)
- iv) α -кетоизовалерата в изобутиральдегид (стадия d пути), и
- v) изобутиральдегида в изобутанол; (стадия е пути),

где по меньшей мере одна молекула ДНК является гетерологичной по отношению к указанной микробной клетке-хозяину; и

2) контактирование клетки-хозяина (1) с ферментируемым углеродным субстратом в ферментационной среде в условиях, при которых продуцируется изобутанол.

В другом осуществлении в изобретении предлагается способ получения изобутанола, включающий

1) получение рекомбинантной микробной клетки-хозяина, включающей по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, выбранное из группы, состоящей из

- i) пирувата в ацетолактат, (стадия а пути)
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, (стадия b пути)
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат, (стадия с пути)
- iv) α -кетоизовалерата в изобутирил-КоА, (стадия f пути)
- v) изобутирил-КоА в изобутиральдегид, (стадия g пути), и
- vi) изобутиральдегида в изобутанол; (стадия е пути),

где по меньшей мере одна молекула ДНК является гетерологичной по отношению к указанной микробной клетке-хозяину; и

2) контактирование клетки-хозяина (1) с ферментируемым углеродным субстратом в ферментационной среде в условиях, при которых продуцируется изобутанол.

В другом осуществлении в изобретении предлагается способ получения изобутанола, включающий

1) получение рекомбинантной микробной клетки-хозяина, включающей по меньшей мере одну молекулу ДНК, кодирующую полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, выбранное из группы, состоящей из

- i) пирувата в ацетолактат, (стадия а пути)
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, (стадия b пути)
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат, (стадия с пути)
- iv) α -кетоизовалерата в валин, (стадия h пути)
- v) валина в изобутиламин, (стадия i пути)
- vi) изобутиламина в изобутиральдегид; (стадия j пути), и
- vii) изобутиральдегида в изобутанол; (стадия е пути),

где по меньшей мере одна молекула ДНК является гетерологичной по отношению к указанной микробной клетке-хозяину; и

2) контактирование клетки-хозяина (1) с ферментируемым углеродным субстратом в ферментационной среде в условиях, при которых продуцируется изобутанол.

В альтернативном осуществлении в изобретении предлагается ферментационная среда, содержащая изобутанол, продуцируемая с помощью способов изобретения.

Краткое описание фигур и описание последовательностей

Изобретение может быть понято более полно из последующего подробного

описания, фигур и сопровождающего описания последовательностей, которые составляют часть этой заявки.

На чертеже представлено четыре различных пути биосинтеза изобутанола. Стадии, обозначенные «a», «b», «c», «d», «e», «f», «g», «h», «i», «j» и «k», представляют собой превращения субстрата в продукт, описанные ниже.

Следующие последовательности согласуются с 37 C.F.R. 1.821-1.825 («Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules») и совместимы со стандартом ST.25 (1998) Всемирной организации интеллектуальной собственности (WIPO), и с требованиями перечня последовательностей ЕРО и РСТ (правила 5.2 и 49.5(а-бис) и раздел 208 и приложение С административных инструкций). Символы и формат, применяемые для данных по нуклеотидной и аминокислотной последовательностям, подчиняются правилам, установленным в 37 C.F.R. §1.822.

Таблица 1

Обзор номеров SEQ ID генов и белков

Описание	SEQ ID NO:нуклеиновая кислота	SEQ ID NO:пептид
Klebsiella pneumoniae budD (ацетолактатсинтаза)	1	2
Bacillus subtilis alsS (ацетолактатсинтаза)	78	178
Lactococcus lactis als (ацетолактатсинтаза)	179	180
E. coli ilvC (редуктоизомераза ацетогидроксикислот)	3	4
S. cerevisiae ILV5 (редуктоизомераза ацетогидроксикислот)	80	181
M. maripaludis ilvC (редуктоизомераза кетокислот)	182	183
B. subtilis ilvC (редуктоизомераза ацетогидроксикислот)	184	185
E. coli ilvD (дегидратаза ацетогидроксикислот)	5	6
S. cerevisiae ILV3 (дегидратаза дигидроксикислот)	83	186
M. maripaludis ilvD (дегидратаза дигидроксикислот)	187	188
B. subtilis ilvD (дегидратаза дигидроксикислот)	189	190
Lactococcus lactis kivD (декарбоксилаза α-кетокислоты с разветвленной цепью), с оптимизированными кодонами	7	8
Lactococcus lactis kivD (декарбоксилаза α-кетокислоты с разветвленной цепью)	191	8
Lactococcus lactis kdcA (декарбоксилаза α-кетокислоты с разветвленной цепью)	192	193
Salmonella typhimurium (индолпируватдекарбоксилаза)	194	195
Clostridium acetobutylicum pdc (пируватдекарбоксилаза)	196	197
E. coli yqhD (дегидрогеназа спиртов с разветвленной цепью)	9	10
S. cerevisiae YPR1 (2-метилбутиральдегидредуктаза)	198	199
S. cerevisiae ADH6 (НАДФН-зависимая циннамилалкогольдегидрогеназа)	200	201
Clostridium acetobutylicum bdhA (НАДН-зависимая бутанолдегидрогеназа А)	202	203
Clostridium acetobutylicum bdhB (бутанолдегидрогеназа)	158	204
B. subtilis bkdAA (субъединица E1 дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью)	205	206
B. subtilis bkdAB (субъединица E1 дегидрогеназы альфа-кетокислот с разветвленной цепью)	207	208
B. subtilis bkdB (субъединица E2 дегидрогеназы альфа-кетокислот с разветвленной цепью)	209	210
B. subtilis lpdV (субъединица E3 дегидрогеназы альфа-кетокислот с разветвленной цепью)	211	212
P. putida bkdA1 (субъединица E1-альфа дегидрогеназы кетокислот)	213	214
P. putida bkdA2 (субъединица E1-бета дегидрогеназы кетокислот)	215	216
P. putida bkdB аланин-пируват-трансацилаза	217	218
P. putida lpdV (липоамиддегидрогеназа)	219	220
C. beijerinckii ald (коэнзим А-ацилирующая альдегиддегидрогеназа)	221	222
C. acetobutylicum adhe1 (альдегиддегидрогеназа)	223	224
C. acetobutylicum adhe (алкогольальдегиддегидрогеназа)	225	226
P. putida nahO (ацетальдегиддегидрогеназа)	227	228

	T. thermophilus (ацетальдегиддегидрогеназа)	229	230
	E. coli avtA (валин-пируват-трансаминаза)	231	232
	B. licheniformis avtA (валин-пируват-трансаминаза)	233	234
	E. coli ilvE (аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью)	235	236
5	S. cerevisiae BAT2 (аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью)	237	238
	M. thermoautotrophicum (аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью)	239	240
	S. coelicolor (валиндегидрогеназа)	241	242
	B. subtilis bcd (лейциндегидрогеназа)	243	244
	S. viridifaciens (валиндекарбоксилаза)	245	246
10	A. denitrificans aptA (омега-аминокислота:пируват-трансаминаза)	247	248
	R. eutropha (аланин-пируват-трансаминаза)	249	250
	S. oneidensis (бета-аланин-пируват-трансаминаза)	251	252
	P. putida (бета-аланин-пируват-трансаминаза)	253	254
	S. cinnamomensis icm (изобутирил-КоА-мутаза)	255	256
	S. cinnamomensis icmB (изобутирил-КоА-мутаза)	257	258
15	S. coelicolor SCO5415 (изобутирил-КоА-мутаза)	259	260
	S. coelicolor SCO4800 (изобутирил-КоА-мутаза)	261	262
	S. avermitilis icmA (изобутирил-КоА-мутаза)	263	264
	S. avermitilis icmB (изобутирил-КоА-мутаза)	265	266

20 SEQ ID NO:11-38, 40-69, 72-75, 85-138, 144, 145, 147-157, 159-176 представляют собой нуклеотидные последовательности клонированных олигонуклеотидов, скрининга или последовательностей праймеров, используемых в описанных здесь примерах.

25 SEQ ID NO:39 представляет собой нуклеотидную последовательность кластера генов cscBKA, описанную в примере 16.

SEQ ID NO:70 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора глюкозоизомеразы 1.6Gl, описанную в примере 13.

30 SEQ ID NO:71 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора 1.5Gl, описанную в примере 13.

SEQ ID NO:76 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора GPD, описанную в примере 17.

SEQ ID NO:77 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора CYC1, описанную в примере 17.

35 SEQ ID NO:79 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора FBA, описанную в примере 17.

SEQ ID NO:81 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора ADH1, описанную в примере 17.

40 SEQ ID NO:82 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора ADH1, описанную в примере 17.

SEQ ID NO:84 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора GPM, описанную в примере 17.

45 SEQ ID NO:139 представляет собой аминокислотную последовательность сахарозогидролазы (CscA).

SEQ ID NO:140 представляет собой аминокислотную последовательность D-фруктокиназы (CscK).

50 SEQ ID NO:141 представляет собой аминокислотную последовательность сахарозопермеазы (CscB).

SEQ ID NO:142 представляет собой нуклеотидную последовательность плазмиды pFP988DssPspac, описанную в примере 20.

SEQ ID NO:143 представляет собой нуклеотидную последовательность

плазмиды pFP988DssPgroE, описанную в примере 20.

SEQ ID NO:146 представляет собой нуклеотидную последовательность фрагмента вектора pFP988Dss, описанную в примере 20.

5 SEQ ID NO:177 представляет собой нуклеотидную последовательность суммарного вектора pFP988, описанную в примере 21.

SEQ ID NO:267 представляет собой нуклеотидную последовательность плазмиды pC194, описанную в примере 21.

Подробное описание изобретения

10 Настоящее изобретение относится к способам получения изобутанола с применением рекомбинантных микроорганизмов. Настоящее изобретение удовлетворяет ряду коммерческих и промышленных потребностей. Бутанол является важным промышленным химическим продуктом с разнообразным применением, где его потенциал в качестве топлива или присадки к топливу особенно важен. Являясь
15 только четырехуглеродным спиртом, бутанол обладает запасом энергии, сходным с таковым бензина, и может быть смешан с ископаемым топливом. Бутанол предпочтителен в качестве топлива или присадки к топливу, так как он дает выход только CO₂ и не дает или дает мало SO_x или NO_x при сгорании в двигателе
20 внутреннего сгорания. Дополнительно бутанол является менее коррозионным, чем этанол, наиболее предпочтительная присадка к топливу в настоящее время.

В дополнение к его применимости в качестве биотоплива или присадки к топливу бутанол обладает потенциалом влияния на проблемы распределения водорода в
25 появляющейся индустрии топливных элементов. Топливные элементы в настоящее время представляют собой проблему для безопасности, связанную с транспортом и распределением водорода. Бутанол может быть легко перестроен в отношении его содержания водорода и может быть распределен между существующими бензозаправочными станциями в чистоте, требуемой либо для топливных элементов,
30 либо для носителей.

Наконец, в настоящем изобретении изобутанол продуцируется из источников углерода, происходящих из растений, избегая воздействия на окружающую среду, связанного с нефтехимическими процессами получения бутанола.

35 Следующие определения и сокращения предназначены для применения при интерпретации формулы изобретения и описания.

Как здесь применяется, термин «изобретение» или «настоящее изобретение» представляет собой нелимитирующий термин и не предназначен для отнесения
40 любого простого осуществления конкретного изобретения, но охватывает все возможные осуществления, как описано в описании и формуле изобретения.

Термин «путь биосинтеза изобутанола» относится к ферментативным путям получения изобутанола.

Термины «ацетолактатсинтаза» и «ацетолактатсинтетаза» применяются здесь взаимозаменяемо в отношении фермента, который катализирует превращение
45 пирувата в ацетолактат и CO₂. Предпочтительные ацетолактатсинтазы известны под номером EC 2.2.1.6 9 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego). Эти ферменты доступны из ряда источников, включая, но не ограничиваясь этим, *Bacillus subtilis* (GenBank NO: CAB15618 (SEQ ID NO:178), Z99122 (SEQ ID NO:78),
50 аминокислотная последовательность NCBI (National Center for Biotechnology Information), нуклеотидная последовательность NCBI соответственно), *Klebsiella pneumoniae* [GenBank NO: AAA25079 (SEQ ID NO:2), M73842 (SEQ ID NO:1)) и *Lactococcus lactis* (GenBank NO: AAA25161 (SEQ ID NO:180), L16975; SEQ ID NO:179)).

Термины «изомероредуктаза ацетогидроксикислот» и «редуктоизомераза ацетогидроксикислот» применяются здесь взаимозаменяемо в отношении к ферменту, который катализирует превращение ацетолактата в 2,3-

дигидроксиизовалерат с использованием НАДФН (восстановленного

никотинамидадениндинуклеотид-фосфата) в качестве донора электронов.

Предпочтительные изомероредуктазы ацетогидроксикислот известны под номером ЕС 1.1.1.86 и последовательности доступны из большого спектра микроорганизмов, включая, но не ограничиваясь этим, *Escherichia coli* (GenBank NO: NP_418222 (SEQ ID NO:4), NC_000913 (SEQ ID NO:3)), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank NO: NP_013459 (SEQ ID NO:181), NC_001144 (SEQ ID NO:80)), *Methanococcus maripaludis* (GenBank NO: CAF30210 (SEQ ID NO:183), BX957220 (SEQ ID NO:182)) и *Bacillus subtilis* (GenBank NO: CAB 14789 (SEQ ID NO:185), Z99118 (SEQ ID NO:184)).

Термин «дегидратаза ацетогидроксикислот» относится к ферменту, который катализирует превращение 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетонизовалерат.

Предпочтительные дегидратазы ацетогидроксикислот известны под номером ЕС 4.2.1.9. Эти ферменты доступны из большого спектра микроорганизмов, включая, но не ограничиваясь этим, *E. coli* (GenBank NO: YP_026248 (SEQ ID NO:6), NC_000913 (SEQ ID NO:5)), *S. cerevisiae* (GenBank NO: NP_012550 (SEQ ID NO:186), NC_001142 (SEQ ID NO:83)), *M. maripaludis* (GenBank NO: CAF29874 (SEQ ID NO:188), BX957219 (SEQ ID NO:187)) и *B. subtilis* (GenBank NO: CAB14105 (SEQ ID NO:190), Z99115 (SEQ ID NO:189)).

Термин «декарбоксилаза α -кетокислоты с разветвленной цепью» относится к ферменту, который катализирует превращение α -кетонизовалерата в изобутиральдегид и CO_2 . Предпочтительные декарбоксилазы α -кетокислот с разветвленной цепью известны под номером ЕС 4.1.1.72 и доступны из ряда источников, включая, но не ограничиваясь этим, *Lactococcus lactis* (GenBank NO:

AAS49166 (SEQ ID NO:193), AY548760 (SEQ ID NO:192); CAG34226 (SEQ ID NO:8), AJ746364 (SEQ ID NO:191), *Salmonella typhimurium* (GenBank NO: NP_461346 (SEQ ID NO:195), NC_003197 (SEQ ID NO:194)) и *Clostridium acetobutylicum* (GenBank NO: NP_149189 (SEQ ID NO:197), NC_001988 (SEQ ID NO:196)).

Термин «дегидрогеназа спиртов с разветвленной цепью» относится к ферменту, который катализирует превращение изобутиральдегида в изобутанол.

Предпочтительные дегидрогеназы спиртов с разветвленной цепью известны под номером ЕС 1.1.1.265, но могут также классифицироваться как другие алкогольдегидрогеназы (конкретно, ЕС 1.1.1.1 или 1.1.1.2). Эти ферменты

используют НАДН (восстановленный никотинамидадениндинуклеотид) и/или НАДФН в качестве донора электронов, и они доступны из ряда источников,

включая, но не ограничиваясь этим, *S. cerevisiae* (GenBank NO: NP_010656 (SEQ ID NO: 199), NC_001136 (SEQ ID NO:198); NP_0314051 (SEQ ID NO:201) NC_001145 (SEQ ID NO:200)), *E. coli* (GenBank NO: NP_417484 (SEQ ID NO:10), NC_000913 (SEQ ID NO:9)) и *C. acetobutylicum* (GenBank NO: NP_349892 (SEQ ID NO:203), NC_003030 (SEQ ID NO: 202); NP_349891 (SEQ ID NO:204), NC_003030 (SEQ ID NO:158)).

Термин «дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью» относится к ферменту, который катализирует превращение α -кетонизовалерата в изобутирил-

КоА (изобутирил-коэнзим А) с использованием НАД⁺

(никотинамидадениндинуклеотида) в качестве акцептора электронов.

Предпочтительные дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью известны под номером ЕС 1.2.4.4. Эти дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью включают

четыре субъединицы и последовательности всех субъединиц доступны от большого набора микроорганизмов, включая, но не ограничиваясь этим, *B. subtilis* (GenBank NO: CAB14336 (SEQ ID NO:206), Z99116 (SEQ ID NO:205); CAB14335 (SEQ ID NO:208), Z99116 (SEQ ID NO:207); CAB14334 (SEQ ID NO:210), Z99116 (SEQ ID NO:209);
 5 и CAB14337 (SEQ ID NO:212), Z99116 (SEQ ID NO:211)) и *Pseudomonas putida* (GenBank NO: AAA65614 (SEQ ID NO:214), M57613 (SEQ ID NO:213); AAA65615 (SEQ ID NO:216), M57613 (SEQ ID NO:215); AAA65617 (SEQ ID NO:218), M57613 (SEQ ID NO:217); и AAA65618 (SEQ ID NO:220), M57613 (SEQ ID NO:219)).

10 Термин «ацилирующая альдегиддегидрогеназа» относится к ферменту, который катализирует превращение изобутирил-КоА в изобутиральдегид с использованием либо НАДН, либо НАДФН в качестве донора электронов. Предпочтительные ацилирующие альдегиддегидрогеназы известны под номерами ЕС 1.2.1.10 и 1.2.1.57. Эти ферменты доступны из множества источников, включая, но не ограничиваясь
 15 этим, *Clostridium beijerinckii* (GenBank NO: AAD31841 (SEQ ID NO:222), AF157306 (SEQ ID NO:221)), *C. acetobutylicum* (GenBank NO: NP_149325 (SEQ ID NO:224), NC_001988 (SEQ ID NO:223); NP_149199 (SEQ ID NO:226), NC_001988 (SEQ ID NO:225)), *P. putida* (GenBank NO: AAA89106 (SEQ ID NO:228), U13232 (SEQ ID NO:227)) и *Thermus thermophilus* (GenBank NO: YP_145486 (SEQ ID NO:230), NC_006461 (SEQ ID NO:229)).

20 Термин «трансаминаза» относится к ферменту, который катализирует превращение α -кетоизовалерата в L-валин с использованием либо аланина, либо глутамата в качестве донора амина. Предпочтительные трансаминазы известны под номерами ЕС 2.6.1.42 и 2.6.1.66. Эти ферменты доступны из ряда источников.

25 Примеры источников для ферментов, зависящих от аланина, включают, но не ограничиваются этим, *E. coli* (GenBank NO: YP_026231 (SEQ ID NO:232), NC_000913 (SEQ ID NO:231)) и *Bacillus licheniformis* (GenBank NO: YP_093743 (SEQ ID NO:234), NC_006322 (SEQ ID NO:233)). Примеры источников для ферментов, зависящих от глутамата, включают, но не ограничиваются этим, *E. coli* (GenBank NO: YP_026247 (SEQ ID NO:236), NC_000913 (SEQ ID NO:235)), *S. cerevisiae* (GenBank NO: NP_012682 (SEQ ID NO:238), NC_001142 (SEQ ID NO:237)) и *Methanobacterium thermoautotrophicum* (GenBank NO: NP_276546 (SEQ ID NO:240), NC_000916 (SEQ ID NO:239)).

35 Термин «валиндегидрогеназа» относится к ферменту, который катализирует превращение α -кетоизовалерата в L-валин с использованием НАД(Ф)Н в качестве донора электронов и аммиака в качестве донора амина. Предпочтительные валиндегидрогеназы известны под номерами ЕС 1.4.1.8 и 1.4.1.9 и доступны из ряда источников, включая, но не ограничиваясь этим, *Streptomyces coelicolor* (GenBank NO: NP_628270 (SEQ ID NO:242), NC_003888 (SEQ ID NO:241)) и *B. subtilis* (GenBank NO: CAB14339 (SEQ ID NO:244), Z99116 (SEQ ID NO:243)).

45 Термин «валиндекарбоксилаза» относится к ферменту, который катализирует превращение L-валина в изобутиламин и CO₂. Предпочтительные валиндекарбоксилазы известны под номером ЕС 4.1.1.14. Эти ферменты найдены в *Streptomyces*, таких как, например, *Streptomyces viridifaciens* (GenBank NO: AAN10242 (SEQ ID NO:246), AY116644 (SEQ ID NO:245)).

50 Термин «омега-трансаминаза» относится к ферменту, который катализирует превращение изобутиламина в изобутиральдегид с использованием подходящей аминокислоты в качестве донора амина. Предпочтительные омега-трансаминазы известны под номером ЕС 2.6.1.18 и доступны из ряда источников, включая, но не ограничиваясь этим, *Alcaligenes denitrificans* (AAP92672 (SEQ ID NO:248), AY330220 (SEQ ID NO:247)), *Ralstonia eutropha* (GenBank NO: YP_294474 (SEQ ID NO:250),

NC_007347 (SEQ ID NO:249)), *Shewanella oneidensis* (GenBank NO: NP_719046 (SEQ ID NO:252), NC_004347 (SEQ ID NO:251)) и *P. putida* (GenBank NO: AAN66223 (SEQ ID NO:254), AE016776 (SEQ ID NO:253)).

5 Термин «изобутирил-КоА-мутаза» относится к ферменту, который катализирует превращение бутирил-КоА- в изобутирил-КоА. Этот фермент использует коэнзим В₁₂ в качестве кофактора. Предпочтительные изобутирил-КоА-мутазы известны под номером ЕС 5.4.99.13. Эти ферменты найдены в ряде *Streptomyces*, включая, но не ограничиваясь этим, *Streptomyces cinnamonensis* (GenBank NO: AAC08713 (SEQ ID NO:256), U67612 (SEQ ID NO:255); CAB59633 (SEQ ID NO:258), AJ246005 (SEQ ID NO:257)), *S. coelicolor* (GenBank NO: CAB70645 (SEQ ID NO:260), AL939123 (SEQ ID NO:259); CAB92663 (SEQ ID NO:262), AL939121 (SEQ ID NO:261)) и *Streptomyces avermitilis* (GenBank NO: NP_824008 (SEQ ID NO:264), NC_003155 (SEQ ID NO:263); NP_824637 (SEQ ID NO:266), NC_003155 (SEQ ID NO:265)).

15 Термин «факультативный анаэроб» относится к микроорганизму, который может расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Термин «углеродный субстрат» или «ферментируемый углеродный субстрат» относится к источнику углерода, способному метаболизироваться организмами-хозяевами настоящего изобретения, и особенно к источникам углерода, выбранным из группы, состоящей из моносахаридов, олигосахаридов, полисахаридов и одноуглеродных субстратов или их смесей.

Термин «ген» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который способен экспрессироваться в виде конкретного белка, необязательно включая регуляторные последовательности перед (5'-некодирующие последовательности) и после (3'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности. «Природный ген» относится к гену, в том виде как он находится в природе, с его собственными регуляторными последовательностями. «Химерный ген» относится к любому гену, который не является природным геном, включающему регуляторные и кодирующие последовательности, которые вместе не находят в природе. Соответственно химерный ген может включать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят от одного и того же источника, но располагаются отличным от природного образом. «Эндогенный ген» относится к природному гену в своей природной локализации в геноме организма. «Чужеродный ген» или «гетерологичный ген» относится к гену, не обнаруживаемому в организме-хозяине в норме, но введенному в организм-хозяин с помощью переноса гена. Чужеродные гены могут включать природные гены, вставленные в неприродный организм или химерные гены. «Трансген» представляет собой ген, который введен в геном с помощью метода трансформации.

Используемый здесь термин «кодирующая последовательность» относится к последовательности ДНК, которая кодирует конкретную аминокислотную последовательность. «Подходящие регуляторные последовательности» относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), внутри или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, которые влияют на транскрипцию, процессинг, или стабильность РНК, или трансляцию связанной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, лидирующие последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания

полиаденилирования, сайт процессинга РНК, эффекторный связывающий сайт и структуру основа-петля.

Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, способной регулировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. В целом, кодирующая последовательность расположена на 3'-конце по отношению к промоторной последовательности. Промоторы могут происходить целиком из природного гена или состоять из различных элементов, происходящих из различных промоторов, существующих в природе, или даже включать синтетические сегменты ДНК. Специалистам в данной области техники понятно, что различные промоторы могут направлять экспрессию гена в разных тканях или клеточных типах, или на разных стадиях развития, или в ответ на различные условия окружающей среды или физиологические условия. Промоторы, которые заставляют ген экспрессироваться в большинстве клеточных типах большую часть времени, обозначают как «конститутивные промоторы». Очевидно также, что, так как в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей полностью не определены, фрагменты ДНК различной длины могут иметь идентичную промоторную активность.

Термин «оперативно связанный» относится к связи последовательностей нуклеиновой кислоты на одиночном фрагменте нуклеиновой кислоты, так что функция одной влияет на другую. Например, промотор оперативно связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. когда кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). Кодированные последовательности могут быть оперативно связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

Используемый здесь термин «экспрессия» относится к транскрипции и стабильной аккумуляции смысловой (мРНК) или антисмысловой РНК, происходящей от фрагмента нуклеиновой кислоты изобретения. Экспрессия может также относиться к трансляции мРНК в полипептид.

Используемый здесь термин «трансформация» относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в организм-хозяин, что приводит к генетически стабильному наследованию. Организмы-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновой кислоты, обозначаются как «трансгенные», или «рекомбинантные», или «трансформированные» организмы.

Термины «плазмида», «вектор» и «кассета» относятся к внехромосомному элементу, часто несущему гены, которые не являются частью центрального метаболизма клетки, и обычно в форме кольцевых фрагментов двуспиральной ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, интегрирующиеся в геном последовательности, фаг или нуклеотидные последовательности, линейные или кольцевые, одно- или двуспиральные ДНК или РНК, происходящие из любого источника, в котором ряд нуклеотидных последовательностей соединен или рекомбинирован в единую конструкцию, которая способна вводить в клетку промоторный фрагмент и последовательность ДНК для выбранного продукта гена совместно с подходящей 3'-нетранслируемой последовательностью. «Трансформационная кассета» относится к конкретному вектору, содержащему чужеродный ген и обладающему элементами в дополнение к чужеродному гену, которые облегчают трансформацию конкретной клетки-хозяина. «Экспрессионная кассета» относится к конкретному вектору,

содержащему чужеродный ген и обладающему элементами в дополнение к чужеродному гену, которые позволяют усиливать экспрессию гена в чужеродном хозяине.

Используемый здесь термин «вырожденность кодона» относится к природе генетического кода, допускающей вариацию нуклеотидной последовательности без влияния на аминокислотную последовательность кодируемого полипептида.

Специалист в данной области техники хорошо осведомлен о «предпочтительности кодона», проявляемом конкретной клеткой-хозяином при использовании кодонов нуклеотидов для определения данной аминокислоты. Следовательно, при синтезе гена для улучшенной экспрессии в клетке-хозяине желательно создавать ген так, чтобы частота использования его кодонов приближалась к частоте использования предпочтительных кодонов клеткой-хозяином.

Термин «кодон-оптимизированный», когда это относится к генам или кодирующим областям молекул нуклеиновой кислоты для трансформации различных хозяев, относится к изменению кодонов в гене или кодирующих областях молекул нуклеиновой кислоты, отражающих типичное использование кодонов организмом-хозяином без изменения полипептида, кодируемого ДНК.

Стандартные способы рекомбинантной ДНК и молекулярного клонирования, применяемые здесь, хорошо известны в данной области техники и описаны Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) (здесь далее "Maniatis"); и Silhavy, T.J., Bannan, M.L. and Enquist, L.W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984); и Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, опубликованной Greene Publishing Assoc., and Wiley-Interscience (1987).

Пути биосинтеза изобутанола

Микроорганизмы, использующие углеводы, осуществляют путь Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), путь Entner-Doudoroff и пентозофосфатный цикл в качестве центральных метаболических путей обеспечения энергией и клеточными предшественниками для роста и поддержания жизнеспособности. Эти пути имеют общий промежуточный продукт глицеральдегид-3-фосфат и в конечном итоге образуется пируват, прямо или в сочетании с путем EMP. В последующем пируват трансформируется в ацетил-коэнзим А (ацетил-КоА) с помощью различных способов. Ацетил-КоА служит в качестве ключевого промежуточного соединения, например, при получении жирных кислот, аминокислот и вторичных метаболитов. Сочетанные реакции превращения сахаров в пируват дают энергию (например, аденозин-5'-трифосфат, АТФ) и восстановленные эквиваленты (например, восстановленный никотинамидадениндинуклеотид, НАДН, и восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат, НАДФН). НАДН и НАДФН могут быть рециклизованы до их окисленных форм (НАД⁺ и НАДФ⁺ соответственно). В присутствии неорганических акцепторов электронов (например, O₂, NO₃⁻ и SO₄²⁻) восстанавливающие эквиваленты могут быть использованы для пополнения пула энергии; альтернативно может быть образован восстановленный углеродный побочный продукт.

Изобретение дает возможность получать изобутанол из углеводных источников с помощью рекомбинантных микроорганизмов путем предоставления четырех полных путей реакций, как показано на чертеже. Три из этих путей включают превращение пирувата в изобутанол через серии ферментативных стадий.

Предпочтительный путь биосинтеза изобутанола (чертеж, стадии а-е) включает следующие превращения субстрата в продукт:

- а) пирувата в ацетолактат, катализируемого, например, ацетолактатсинтазой,
- б) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, катализируемого, например,
- 5 изомероредуктазой ацетогидроксикислот,
- с) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетонизовалерат, катализируемого, например, дегидратазой ацетогидроксикислот,
- д) α -кетонизовалерата в изобутиральдегид, катализируемого, например,
- 10 декарбоксилазой кетокислот с разветвленной цепью, и
- е) изобутиральдегида в изобутанол, катализируемого, например, дегидрогеназой спиртов с разветвленной цепью.

В этом пути сочетаются ферменты, известные как вовлеченные в хорошо охарактеризованные пути биосинтеза валина (пируват в α -кетонизовалерат) и катаболизма валина (α -кетонизовалерат в изобутанол). Так как многие ферменты биосинтеза валина также катализируют аналогичные реакции в пути биосинтеза изолейцина, при выборе источников гена главным соображением является специфичность субстрата. По этой причине главными интересующими генами для фермента ацетолактатсинтазы являются таковые от *Bacillus* (*alsS*) и *Klebsiella* (*budB*). Эти конкретные ацетолактатсинтазы известны как участвующие в ферментации бутандиола в этих организмах и демонстрируют повышенное сродство к пирувату по сравнению с кетобутиратом (Gollop et al., J. Bacteriol. 172(6):3444-3449 (1990); Holtzclaw et al., J. Bacteriol. 121(3):917-922 (1975)). Вторая и третья стадии пути катализируются редуктоизомеразой и дегидратазой ацетогидроксикислот соответственно. Эти ферменты охарактеризованы из ряда источников, таких как, например, *E. coli* (Chunduru et al., Biochemistry 28(2):486-493 (1989); Flint et al., J. Biol. Chem. 268(29): 14732-14742 (1993)). Две конечные стадии предпочтительного пути биосинтеза изобутанола известны как встречающиеся у дрожжей, которые могут использовать валин в качестве источника азота и в процессе секретируют изобутанол. α -Кетонизовалерат может быть превращен в изобутиральдегид рядом ферментов декарбоксилаз кетокислот, таких как, например, пируватдекарбоксилаза. Для предотвращения выхода пирувата из продукции изобутанола желательна декарбоксилаза с пониженной аффинностью к пирувату. К настоящему времени два таких фермента известны в данной области техники (Smit et al., Appl. Environ. Microbiol. 71 (1):303-311 (2005); de la Plaza et al., FEMS Microbiol. Lett. 238(2):367-374 (2004)). Оба фермента происходят от штаммов *Lactococcus lactis* и в 50-200 раз предпочитают кетонизовалерат по сравнению с пируватом. Наконец, ряд альдегидредуктаз идентифицирован у дрожжей, причем многие с перекрывающейся субстратной специфичностью. Известные как предпочитающие субстраты с разветвленной цепью над ацетальдегидом включают, но не ограничиваются этим, алкогольдегидрогеназу VI (АДГ6) и Ypr1p (Larroy et al., Biochem. J. 361(Pt 1):163-172 (2002); Ford et al., Yeast 19(12): 1087-1096 (2002)), обе из которых используют НАДФН в качестве донора электронов. НАДФН-зависимая редуктаза YqhD, активная на субстратах с разветвленной цепью, также недавно была идентифицирована у *E. coli* (Sulzenbacher et al., J. Mol. Biol. 342(2):489-502 (2004)).

Другой путь превращения пирувата в изобутанол включает следующие превращения субстрата в продукт (чертеж, стадии а, b, c, f, g, e):

- а) пирувата в ацетолактат, катализируемого, например, ацетолактатсинтазой,
- б) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, катализируемого, например,

изомероредуктазой ацетогидроксикислот,

с) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетонизовалерат, катализируемого, например, дегидратазой ацетогидроксикислот,

5 ф) α -кетонизовалерата в изобутирил-КоА, катализируемого, например, дегидрогеназой кетокислот с разветвленной цепью,

г) изобутирил-КоА в изобутиральдегид, катализируемого, например, ацилирующей альдегиддегидрогеназой, и

е) изобутиральдегида в изобутанол, катализируемого, например, дегидрогеназой спиртов с разветвленной цепью.

Первые три стадии этого пути (а, б, с) являются такими же, что и описанные выше. α -Кетонизовалерат превращается в изобутирил-КоА под действием дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью. В то время как дрожжи могут использовать только валин в качестве источника азота, многие другие организмы (как эукариоты, так и прокариоты) могут использовать валин также как источник углерода. Эти организмы обладают дегидрогеназой кетокислот с разветвленной цепью (Sokatch et al. J. Bacteriol. 148(2):647-652 (1981)), которая генерирует изобутирил-КоА.

Изобутирил-КоА может быть превращен в изобутиральдегид с помощью ацилирующей альдегиддегидрогеназы. Дегидрогеназы, активные на субстрате с разветвленной цепью, описаны, но не клонированы в *Leuconostoc* and *Propionibacterium* (Kazahaya et al., J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55 (1972); Hosoi et al., J. Ferment. Technol. 57:418-427 (1979)). Однако возможно также, что ацилирующие альдегиддегидрогеназы, известные как функционирующие на ацил-КоА с линейной цепью (т.е. бутирил-КоА), могут также работать с изобутирил-КоА.

Изобутиральдегид затем превращают в изобутанол с помощью дегидрогеназы спиртов с разветвленной цепью, как описано выше для первого пути.

Другой путь превращения пирувата в изобутанол включает следующие превращения субстрата в продукт (фиг.1, стадии а, б, с, h, i, j, е):

а) пирувата в ацетолактат, катализируемого, например, ацетолактатсинтазой,

б) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, катализируемого, например, изомероредуктазой ацетогидроксикислот,

с) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетонизовалерат, катализируемого, например, дегидратазой ацетогидроксикислот,

h) α -кетонизовалерата в валин, катализируемого, например, валиндегидрогеназой или трансаминазой,

i) валина в изобутиламин, катализируемого, например, валиндекарбоксилазой,

40 j) изобутиламина в изобутиральдегид, катализируемого, например, омега-трансаминазой, и

е) изобутиральдегида в изобутанол, катализируемого, например, дегидрогеназой спиртов с разветвленной цепью.

Первые три стадии этого пути (а, б, с) являются такими же, что и описанные выше. Этот путь требует добавления валиндегидрогеназы или подходящей трансаминазы. Валин (и/или лейцин)-дегидрогеназа катализирует восстановительное аминирование и использует аммиак; величины K_m аммиака находятся в миллимолярном диапазоне (Priestly et al., Biochem J. 261(3):853-861 (1989); Vancura et al., J. Gen. Microbiol. 134(12):3213- 3219 (1988), Zink et al., Arch. Biochem. Biophys. 99:72-77 (1962); Sekimoto et al. J. Biochem (Japan) 116(1):176-182 (1994)). Трансаминазы обычно используют либо глутамат, либо аланин в качестве доноров амина и охарактеризованы из ряда организмов (Lee-Peng et al., J. Bacteriol. 139(2):339-345

(1979); Berg et al., J. Bacteriol. 155(3):1009-1014 (1983)). Может быть желательным аланин-специфический фермент, так как образование пирувата на этой стадии может сочетаться с потреблением пирувата позже в этом пути, когда удаляют

аминогруппу (см. ниже). Следующей стадией является декарбоксилирование валина,

реакция, которая осуществляется при биосинтезе валанимицина у *Streptomyces* (Garg et al., Mol. Microbiol. 46(2):505-517 (2002)). Полученный изобутиламин может быть превращен в изобутиральдегид в зависимой от пиридоксаль-5'-фосфата реакции с помощью, например, фермента семейства омега-аминотрансфераз. Такой фермент из *Vibrio fluvialis* демонстрирует активность на изобутиламине (Shin et al., Biotechnol. Bioeng. 65(2):206-211 (1999)). Другая омега-аминотрансфераза из *Alcaligenes denitrificans* клонирована и обладает некоторой активностью на бутиламине (Yun et al., Appl. Environ. Microbiol. 70(4):2529-2534 (2004)). В этом направлении эти ферменты используют пируват в качестве акцептора амина, давая аланин. Как указывалось выше, неблагоприятные эффекты на пул пирувата могут быть компенсированы более ранним использованием на этом пути пируват-продуцирующей трансаминазы. Изобутиральдегид затем превращают в изобутанол с помощью дегидрогеназы спиртов с разветвленной цепью, как описано выше для первого пути.

Четвертый путь биосинтеза изобутанола включает превращения субстрата в продукт, показанные как стадии k, g, e на чертеже. Ряд организмов известны как продуцирующие бутират и/или бутанол через бутирил-КоА промежуточное соединение (Dürre et al., FEMS Microbiol. Rev. 17(3):251-262 (1995); Abbad-Andaloussi et al., Microbiology 142(5):1149-1158 (1996)). Продукция изобутанола в этих организмах может быть создана добавлением мутаза, способной превращать бутирил-КоА в изобутирил-КоА (фиг.1, стадия k). Гены для обеих субъединиц изобутирил-КоА мутаза, коэнзим B₁₂-зависимого фермента, клонированы из *Streptomyces* (Ratnatilleke et al., J. Biol. Chem. 274(44):31679-31685 (1999)). Изобутирил-КоА превращают в изобутиральдегид (стадия g на чертеже), который превращают в изобутанол (стадия e на чертеже).

Таким образом, при обеспечении множественными рекомбинантными путями от пирувата до изобутанола существует ряд источников для осуществления индивидуальных стадий превращения и специалист в данной области техники должен быть способен применить открыто доступные последовательности для создания релевантных путей. Перечень представителей ряда генов, известных в данной области техники и пригодных для создания путей биосинтеза изобутанола, представлен ниже в таблице 2.

Источники генов путей биосинтеза изобутанола		Таблица 2
Ген	Список генбанка	
Ацетолактатсинтаза	Z99122, полный геном <i>Bacillus subtilis</i> (раздел 19 из 21): от 360898 до 3809670 gi32468830 embl Z99122.2 BSUB0019[32468830]	
	M73842, ген ацетолактатсинтазы (iluk) <i>Klebsiella pneumoniae</i> , полная cds gi149210 gb M73842.1 KPNILUK[149210]	
	L16975, ген альфа-ацетолактатсинтазы (als) <i>Lactococcus lactis</i> , полная cds gi473900 gb L16975.1 LACALS[473900]	
Изомероредуктаза ацетогидроксикислот	NC_000913, <i>Escherichia coli</i> K12, полный геном gi49175990 ref NC_000913.2 [49175990]	
	NC_001144, хромосома XII <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , полная хромосомная последовательность gi42742286 ref NC_001144.3 [42742286]	
	BX957220, полный геном <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; сегмент 2/5 gi44920669 embl BX957220.1 [44920669]	

		Z99118, полный геном <i>Bacillus subtilis</i> (раздел 15 из 21): от 2812801 до 3013507 gi32468802 embl Z99118.2 BSUB0015[32468802]
5	Дегидратаза ацетогидроксикислот	NC_000913, <i>Escherichia coli</i> K12, полный геном gi49175990 ref NC_000913.2 [49175990]
		NC_001142, хромосома X <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , полная хромосомная последовательность gi42742252 ref NC_001142.5 [42742252]
		BX957219, полный геном <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; сегмент 1/5 gi45047123 embl BX957219.1 [45047123]
		Z99115, полный геном <i>Bacillus subtilis</i> (раздел 12 из 21): от 2207806 до 2409180 gi32468778 embl Z99115.2 BSUB0012[32468778]
10	Декарбоксилаза α-кетокислот с разветвленной цепью	AY548760, ген декарбоксилазы альфа-кетокислот с разветвленной цепью (kdcA) <i>Lactococcus lactis</i> , полная cds gi44921616 gb AY548760.1 [44921616]
		AJ746364, ген декарбоксилазы альфа-кетоиовалерата <i>Lactococcus lactis</i> subsp. kivd, штамм IFPL730 gi51870501 embl AJ746364.1 [51870501]
15		NC_003197, <i>Salmonella typhimurium</i> LT2, полный геном gi16763390 ref NC_003197.1 [16763390]
		NC_001988, <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 плазмида pSOL1, полная последовательность gi15004705 ref NC_001988.2 [15004705]
	Дегидрогеназа спиртов с разветвленной цепью	NC_001136, хромосома IV <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , полная хромосомная последовательность gi50593138 ref NC_001136.6 [50593138]
20		NC_001145, хромосома XIII <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , полная хромосомная последовательность gi44829554 ref NC_001145.2 [44829554]
		NC_000913, <i>Escherichia coli</i> K12, полный геном gi49175990 ref NC_000913.2 [49175990]
		NC_003030, <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, полный геном gi15893298 ref NC_003030.1 [15893298]
25	Дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью	Z99116, полный геном <i>Bacillus subtilis</i> (раздел 13 из 21): от 2409151 до 2613687 gi32468787 embl Z99116.2 BSUB0013[32468787]
		M57613, оперон дегидрогеназы кетокислоты с разветвленной цепью <i>Pseudomonas putida</i> (bkdA1, bkdA1 и bkdA2), гены трансацетилазы E2 (bkdB), bkdR и липоамиддегидрогеназы (lpdV), полная cds gi790512 gb M57613.1 PSEB KDPG2[790512]
30	Ацилирующая альдегиддегидрогеназа	AF157306, гены гипотетического белка, коэнзим А-ацилирующей альдегиддегидрогеназы (ald), ацетолатат:бутират/ацетат-коэнзим А-трансферазы (ctfA) и ацетоацетатдекарбоксилазы (adc) штамма NPRL B593 <i>Clostridium beijerinckii</i> , полная cds gi47422980 gb AF157306.2 [47422980]
		NC_001988, <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 плазмида pSOL1, полная последовательность gi15004705 ref NC_001988.2 [15004705]
35	Трансаминаза	U13232, гены ацетальдегиддегидрогеназы (nahO) и 4-гидрокси-2-оксвалератальдолазы (nahM), полные cds, и 4-оксалохлоронатдекарбоксилазы (nahK) и 2-оксопент-4-еноатгидратазы (nahL), частичные cds, <i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816 gi595671 gb U13232.1 PPU13232[595671]
		NC_000913, <i>Escherichia coli</i> K12, полный геном gi49175990 ref NC_000913.2 [49175990]
		NC_006322, <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580, полный геном gi52783855 ref NC_006322.1 [52783855]
40		NC_001142, хромосома X <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , полная хромосомная последовательность gi42742252 ref NC_001142.5 [42742252]
		NC_000916, <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> str. Delta H, полный геном gi15678031 ref NC_000916.1 [15678031]
	Валиндегидрогеназа	NC_003888, <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), полный геном gi32141095 ref NC_003888.3 [32141095]
45		Z99116, полный геном <i>Bacillus subtilis</i> (раздел 13 из 21): от 2409151 до 2613687 gi32468787 embl Z99116.2 BSUB0013[32468787]
	Валиндекарбоксилаза	AY116644, <i>Streptomyces viridifaciens</i> , ген аминотрансферазы аминокислот, частичная cds; редуктоизомераза кетокислот, малая субъединица ацетолататсинтетазы, большая субъединица ацетолататсинтазы, полные cds; кластер генов азокси антибиотика валанимицина, полная последовательность; и предполагаемая трансфераза, и предполагаемые гены секретируемых белков, полные cds gi27777548 gb AY116644.1 [27777548]
50	Омега-трансаминаза	AY330220, ген омега-аминокислота:пируват-трансаминазы (aptA) <i>Achromobacter denitrificans</i> , полная cds gi33086797 gb AY330220.1 [33086797]
		NC_007347, хромосома 1 <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134, полная последовательность gi73539706 ref NC_007347.1 [73539706]

	NC_004347, <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1, полный геном gi 24371600 ref NC_004347.1 [24371600]
	NZ-AAAG02000002, <i>Rhodospirillum rubrum</i> Rrub02_2, полная последовательность генома при секвенировании по принципу дробовика gi 48764549 ref NZ_AAAG02000002.1 [48764549]
5	AE016776, <i>Pseudomonas putida</i> KT2440, раздел 3 из 21 полного генома gi 26557019 gb AE016776.1 [26557019]
	Изобутирил-КоА-мутаза U67612, ген B12-зависимой изобутирил-КоА-мутазы (icm) <i>Streptomyces cinnamonensis</i> , полная cds gi 3002491 gb U67612.1 SCU67612[3002491]
	AJ246005, ген icmB малой субъединицы изобутирил-КоА-мутазы <i>Streptomyces cinnamonensis</i> gi 6137076 emb AJ246005.1 SC1246005[6137076]
10	AL939123, полный геном <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2); сегмент 20/29 gi 24430032 emb AL939123.1 SCO939123[24430032]
	AL9939121, полный геном <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2); сегмент 18/29 gi 24429533 emb AL939121.1 SCO939121[24429533]
	NC_003155, полный геном <i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680, полный геном gi 57833846 ref NC_003155.3 [57833846]

15

Микробные хозяева для получения изобутанола

Микробные хозяева для получения изобутанола могут быть выбраны из бактерий, цианобактерий, нитчатых грибов и дрожжей. Микробный хозяин, применяющийся для получения изобутанола, предпочтительно толерантен к изобутанолу, так что выход не лимитируется токсичностью бутанола. Микробы, которые метаболически активны при высоких уровнях титров изобутанола, не известны хорошо в данной области техники. Хотя мутанты, толерантные к бутанолу, выделены из производящих данный продукт *Clostridia*, мало информации доступно в отношении толерантности к бутанолу других потенциально пригодных бактериальных штаммов. Большинство исследований по сравнению толерантности к спиртам у бактерий предполагает, что бутанол является более токсичным, чем этанол (de Cavalho et al., *Microsc. Res. Tech.* 64:215-22 (2004) и Kabelitz et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 220:223-227 (2003)). Tomas et al. (*J. Bacteriol.* 186:2006-2018 (2004)) сообщает, что выход 1-бутанола при ферментации у *Clostridium acetobutylicum* может быть ограничен токсичностью 1-бутанола. Первичным эффектом 1-бутанола на *Clostridium acetobutylicum* является нарушение функций мембран (Hermann et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1238-1243 (1985)).

Микробные хозяева, выбранные для продукции изобутанола, предпочтительно толерантны к изобутанолу и должны быть способными превращать углеводы в изобутанол. Критерии для отбора подходящих микробных хозяев включают следующее: присущую толерантность к изобутанолу, высокую скорость утилизации глюкозы, доступность генетических способов для манипуляции с генами и способность генерировать стабильные хромосомные изменения.

Штаммы подходящих хозяев с толерантностью к изобутанолу могут быть идентифицированы путем скрининга, основанного на присущей толерантности штамма. Присущая толерантность микробов к изобутанолу может быть измерена путем измерения концентрации изобутанола, которая ответственна за 50%-ное ингибирование скорости роста (IC50), при росте на минимальной среде. Величины IC50 могут быть определены с применением методов, известных в данной области техники. Например, интересующие микробы могут выращиваться в присутствии различных количеств изобутанола, и скорость роста прослеживаться с помощью измерения оптической плотности при 600 нанометрах. Время удвоения может быть рассчитано из логарифмической части кривой роста и использовано как мера скорости роста. Концентрация изобутанола, которая дает 50% ингибирование роста, может быть определена из кривой процента ингибирования роста

относительно концентрации изобутанола. Предпочтительно штамм хозяев должен иметь IC50 для изобутанола выше приблизительно 0,5%.

Микробный хозяин для продукции изобутанола должен также утилизировать глюкозу с высокой скоростью. Большинство микробов способно утилизировать углеводы. Однако определенные микробы окружающей среды не могут утилизировать углеводы с высокой эффективностью и, следовательно, не должны подходить в качестве хозяев.

Способность хозяина к генетической модификации существенна для получения любого рекомбинантного микроорганизма. Вариантом способа переноса генов может быть электропорация, конъюгация, трансдукция или природная трансформация. Доступен широкий диапазон плазмид, конъюгирующихся с хозяином, и маркеров устойчивости к лекарствам. Клонирование векторы приспособливают к организмам-хозяевам по природе маркеров устойчивости к антибиотикам, которые функционируют у этого хозяина.

С микробным хозяином также должны быть проведены манипуляции для инактивации конкурирующих путей движения углерода путем делеции различных генов. Это требует доступности либо транспозонов к прямой инактивации, либо хромосомных интеграционных векторов. Дополнительно хозяин-продуцент должен быть склонен к химическому мутагенезу, так чтобы можно было получить эти мутации с улучшенной присущей толерантностью к изобутанолу.

На основе критериев, описанных выше, подходящие микробные хозяева для продукции изобутанола включают, но не ограничиваются этим, члены родов *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* и *Saccharomyces*.

Предпочтительные хозяева включают *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Конструирование хозяина-продуцента

Рекомбинантные организмы, содержащие необходимые гены, которые будут кодировать ферментативный путь превращения ферментируемого углеродного субстрата в изобутанол, могут быть сконструированы с применением способов, хорошо известных в данной области техники. В настоящем изобретении гены, кодирующие ферменты одного из путей биосинтеза изобутанола изобретения, например ацетолактатсинтаза, изомероредуктаза ацетогидроксикислот, дегидратаза ацетогидроксикислот, декарбоксилаза α -кетокислот с разветвленной цепью и дегидрогеназа спиртов с разветвленной цепью, могут быть выделены из различных источников, как описано выше.

Способы получения желаемых генов из бактериального генома обычны и хорошо известны в области молекулярной биологии. Например, если последовательность гена известна, подходящие геномные библиотеки могут быть созданы с помощью гидролиза рестрикционной эндонуклеазой и может быть сделан скрининг с зондами, комплементарными желаемой последовательности гена. Поскольку последовательность выделена, ДНК может быть амплифицирована с применением стандартных способов направляемой праймером амплификации, таких как полимеразная цепная реакция (патент США 4683202), с получением количеств ДНК, подходящих для трансформации с применением подходящих векторов. Способы

оптимизации кодонов для экспрессии в гетерологичном хозяине легко доступны. Некоторые способы для оптимизации кодонов доступны на основе содержания GC в организме-хозяине. Содержание GC в некоторых примерах микробных хозяев представлено в таблице 3.

Таблица 3	
Содержание GC у микробных хозяев	
Штамм	%GC
<i>B. licheniformis</i>	46
<i>B. subtilis</i>	42
<i>C. acetobutylicum</i>	37
<i>E. coli</i>	50
<i>P. putida</i>	61
<i>A. eutrophus</i>	61
<i>Paenibacillus macerans</i>	51
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	62
<i>Brevibacillus</i>	50
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	50

Поскольку гены релевантного пути идентифицированы и выделены, они могут быть трансформированы в подходящих экспрессионных хозяевах с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Векторы или кассеты, пригодные для трансформации разнообразных клеток-хозяев, общеизвестны и коммерчески доступны от таких компаний, как EPICENTRE® (Madison, WI), Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA), Stratagene (La Jolla, CA) и New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Обычно вектор или кассета содержит последовательности, направляющие транскрипцию и трансляцию релевантного гена, селективируемого маркера, и последовательности, позволяющие автономную репликацию или хромосомную интеграцию. Подходящие векторы включают 5'-область гена, которая осуществляет контроль инициации транскрипции, и 3'-область фрагмента ДНК, которая контролирует терминацию транскрипции. Обе контролируемые области могут происходить от генов, гомологичных трансформированной клетке-хозяину, хотя должно быть понятно, что такие контролируемые области могут также происходить от генов, которые не являются нативными по отношению к конкретным штаммам, выбранным в качестве хозяев-продуцентов.

Области, контролируемые инициацию, или промоторы, которые пригодны для управления экспрессией кодирующих областей релевантного пути в желаемой клетке-хозяине, многочисленны и знакомы специалистам в данной области техники. Фактически любой промотор, способный управлять этими генетическими элементами, подходит для настоящего изобретения, включая, но не ограничиваясь этим, CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI, CUP1, FBA, GPD и GPM (пригодные для экспрессии в *Saccharomyces*); AOX1 (пригодный для экспрессии в *Pichia*); и lac, ara, tet, trp, IP_L, IP_R, T7, tac и trc (пригодные для экспрессии в *Escherichia coli*, *Alcaligenes* и *Pseudomonas*); промоторы amy, arg, npr и различные промоторы фагов пригодны для экспрессии в *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Paenibacillus macerans*; nisA (пригодный для экспрессии в грамположительных бактериях, Eichenbaum et al. Appl. Environ. Microbiol. 64(8):2763-2769 (1998)); и синтетический промотор P11 (пригодный для экспрессии в *Lactobacillus plantarum*, Rud et al., Microbiology 152:1011-1019 (2006)).

Области, контролируемые терминацию, также могут происходить от различных генов, нативных для предпочтительных хозяев. Необязательно сайт терминации

может быть ненужным, однако наиболее предпочтительно его включение.

Определенные векторы способны реплицироваться в широком спектре бактерий-хозяев и могут быть перенесены с помощью конъюгации. Доступны полная и аннотированная последовательность pRK404 и трех родственных векторов - pRK437, pRK442 и pRK442(H). Эти производные, как доказано, являются ценными средствами для генетической манипуляции у грамотрицательных бактерий (Scott et al., Plasmid 50(1):74-79 (2003)). Некоторые плазмидные производные с широким спектром хозяев Inc P4 плазмиды RSF1010 доступны также с промоторами, которые могут функционировать в диапазоне грамотрицательных бактерий. Плазмиды pAYC36 и pAYC37 имеют активные промоторы вместе с множественными сайтами клонирования для допущения экспрессии гетерологичных генов у грамотрицательных бактерий.

Способы замены хромосомных генов также широко доступны. Например, термочувствительный вариант репликона для широкого спектра хозяев pWV101 модифицирован для создания плазмиды pVE6002, которая может быть использована для влияния на замену генов в диапазоне грамположительных бактерий (Maguin et al., J. Bacteriol. 174(17):5633-5638 (1992)). Кроме того, *in vitro* транспозомы для создания случайных мутаций во множестве геномов доступны из коммерческих источников, таких как EPICENTRE®.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в различных предпочтительных микробных хозяевах описана более подробно ниже.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *E. coli*

Векторы или кассеты для трансформации *E. coli* общеизвестны и коммерчески доступны от компаний, перечисленных выше. Например, гены пути биосинтеза изобутанола могут быть выделены из различных источников, клонированы в модифицированный вектор pUC19 и трансформированы в *E. coli* NM522, как описано в примерах 6 и 7.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Rhodococcus erythropolis*

Серии челночных векторов *E. coli*-*Rhodococcus* доступны для экспрессии в *R. erythropolis*, включая, но не ограничиваясь этим, pRhBR17 и pDA71 (Kostichka et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 62:61-68 (2003)). Кроме того, серии промоторов доступны для экспрессии гетерологичных генов в *R. erythropolis* (см., например, Nakashima et al., Appl. Environ. Microbiol. 70:5557-5568 (2004) и Tao et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005, DOI 10.1007/s00253-005-0064). Направленное генное разрушение хромосомных генов в *R. erythropolis* может быть создано с применением метода, описанного Tao et al., выше, и Brans et al. (Appl. Environ. Microbiol. 66: 2029-2036 (2000)).

Гетерологичные гены, требуемые для получения изобутанола, как описано выше, могут быть клонированы исходно в pDA71 или pRhBR71 и трансформированы в *E. coli*. Векторы можно затем трансформировать в *R. erythropolis* с помощью электропорации, как описано Kostichka et al., выше. Рекомбинанты могут расти в синтетической среде, содержащей глюкозу, и продукция изобутанола может быть отслежена с применением методов, известных в данной области техники.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *B. Subtilis*

Методы генной экспрессии и создания мутаций в *B. subtilis* хорошо известны в данной области техники. Например, гены пути биосинтеза изобутанола могут быть выделены из различных источников, клонированы в модифицированный вектор pUC19 и трансформированы в *Bacillus subtilis* BE1010, как описано в примере 8. Кроме того, пять генов пути биосинтеза изобутанола могут быть разбиты

в два оперона для экспрессии, как описано в примере 20. Три гена пути (bubB, ilvD и kivD) интегрировали в хромосому *Bacillus subtilis* BE 1010 (Payne and Jackson, J. Bacteriol. 173:2278-2282 (1991)). Оставшиеся два гена (ilvC и bdhB) клонировали в экспрессионный вектор и трансформировали в штамм *Bacillus*, несущий

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *B. licheniformis*

Большинство плазмид и челночных векторов, которые реплицируются в *B. subtilis*, может быть использовано для трансформации *B. licheniformis* с помощью либо трансформации протопластов, либо электропорации. Гены, требуемые для

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Paenibacillus macerans*

Плазмиды могут быть созданы, как описано выше для экспрессии в *B. subtilis*, и использованы для трансформации *Paenibacillus macerans* с помощью трансформации протопластов с получением рекомбинантного микробного хозяина, который продуцирует изобутанол.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus*

Методы генной экспрессии и создания мутаций в *Alcaligenes eutrophus* известны в данной области техники (см., например, Taghavi et al., Appl. Environ. Microbiol, 60(10): 3585-3591 (1994)). Гены пути биосинтеза изобутанола могут быть клонированы в любые векторы из широкого спектра хозяев, описанные выше, и перенесены с помощью электропорации для создания рекомбинантов, продуцирующих изобутанол. Поли(гидроксibuтират)ный путь в *Alcaligenes* описан подробно, разнообразные генетические способы модификации генома *Alcaligenes eutrophus* известны, и эти способы могут быть применены для создания пути биосинтеза изобутанола.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Pseudomonas putida*

Методы генной экспрессии в *Pseudomonas putida* известны в данной области техники (см., например, Ben-Bassat et al., патент США № 6586229, который включен здесь в качестве ссылки). Гены пути биосинтеза бутанола могут быть вставлены в pPCU18, и эта лигированная ДНК может быть электропорирована в электрокомпетентные C5aAR1 клетки *Pseudomonas putida* DOT-T1 с созданием рекомбинантов, которые продуцируют изобутанол.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Saccharomyces cerevisiae*

Методы генной экспрессии в *Saccharomyces cerevisiae* известны в данной области техники (см., например, Methods in Enzymology, Volume 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Part A, 2004, Christine Guthrie and Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA). Экспрессия генов в дрожжах обычно требует промотора перед интересующим геном и терминатора транскрипции. При создании экспрессионных кассет для генов, кодирующих путь биосинтеза изобутанола, может быть использован ряд промоторов дрожжей, включая, но не ограничиваясь этим, конститутивные промоторы FBA, GPD, ADH1 и GPM и индуцибельные промоторы GAL1, GAL10 и CUP1. Подходящие терминаторы транскрипции включают, но не ограничиваются этим, FBA_t, GPD_t, GPM_t, ERG10_t, GAL1_t, CYC1

и ADH1. Например, подходящие промоторы, терминаторы транскрипции и гены пути биосинтеза изобутанола могут быть клонированы в челночные векторы *E. coli*-дрожжи, как описано в примере 17.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Lactobacillus plantarum*

Род *Lactobacillus* принадлежит к семейству *Lactobacillales* и многие плазмиды и векторы, применяемые для трансформации *Bacillus subtilis* и *Streptococcus*, могут быть использованы для *lactobacillus*. Неограничивающие примеры подходящих векторов включают pAM β 1 и его производные (Renault et al., Gene 183:175-182 (1996); и O'Sullivan et al., Gene 137:227-231 (1993)); pMBB1 и pHW800, производное pMBB1 (Wyckoff et al. Appl. Environ. Microbiol. 62:1481-1486 (1996)); pMG1, конъюгирующаяся плаزمида (Tanimoto et al., J. Bacteriol. 184:5800-5804 (2002)); pNZ9520 (Kleerebezem et al., Appl. Environ. Microbiol. 63:4581-4584 (1997)); pAM401 (Fujimoto et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:1262-1267 (2001)); и pAT392 (Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38:1899-1903 (1994)). Сообщалось также о некоторых плазмидах из *Lactobacillus plantarum* (например, van Kranenburg R, Golic N, Bongers R, Leer RJ, de Vos WM, Siezen RJ, Kleerebezem M. Appl. Environ. Microbiol. 2005 Mar; 71(3): 1223-1230). Например, экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Lactobacillus plantarum* описана в примере 21.

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus faecalis*

Род *Enterococcus* принадлежит к семейству *Lactobacillales*, и многие плазмиды и векторы, применяемые для трансформации *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis* и *Streptococcus*, могут быть применены для *Enterococcus*. Неограничивающие примеры подходящих векторов включают pAM β 1 и его производные (Renault et al., Gene 183:175-182 (1996); и O'Sullivan et al., Gene 137:227-231 (1993)); pMBB1 и pHW800, производное pMBB1 (Wyckoff et al. Appl. Environ. Microbiol. 62:1481-1486 (1996)); pMG1, конъюгирующаяся плазмида (Tanimoto et al., J. Bacteriol. 184:5800-5804 (2002)); pNZ9520 (Kleerebezem et al., Appl. Environ. Microbiol. 63:4581-4584 (1997)); pAM401 (Fujimoto et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:1262-1267 (2001)); и pAT392 (Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38:1899-1903 (1994)). Экспрессионные векторы для *E. faecalis*, использующие ген *nisA* из *Lactococcus*, также могут быть использованы (Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:2763-2769 (1998)). Дополнительно, векторы для замены генов в хромосоме *E. faecium* chromosome могут быть использованы (Nallaapareddy et al., Appl. Environ. Microbiol. 72:334-345 (2006)). Например, экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Enterococcus faecalis* описана в примере 22.

Ферментационные среды

Ферментационные среды настоящего изобретения должны содержать подходящие углеродные субстраты. Подходящие субстраты могут включать, но не ограничиваться этим, моносахариды, такие как глюкоза и фруктоза, олигосахариды, такие как лактоза или сахароза, полисахариды, такие как крахмал или целлюлоза, или их смеси и неочищенные смеси из возобновляемого сырья, такого как отфильтрованная сыворотка от сыра, кукурузный экстракт, черная патока из сахарной свеклы и ячменный солод. Дополнительно, углеродные субстраты могут также представлять собой одноуглеродные субстраты, такие как диоксид углерода или метанол, для которых продемонстрировано метаболическое превращение в ключевые биохимические промежуточные продукты. В дополнение к одному или двум углеродным субстратам известны также метилотрофные организмы,

использующие для метаболической активности ряд других содержащих углерод соединений, таких как метиламин, глюкозамин и разнообразные аминокислоты. Например, известны метилотрофные дрожжи, использующие углерод из метиламина для образования трегалозы или глицерина (Bellion et al., Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp.], 7th (1993), 415-32. Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK). Сходно, различные штаммы *Candida* будут метаболизировать аланин или олеиновую кислоту (Sulter et al., Arch. Microbiol. 153:485-489 (1990)). Следовательно, рассматривается, что источник углерода, используемый в настоящем изобретении, может охватывать широкое разнообразие углеродсодержащих субстратов и должен ограничиваться только выбором организма.

Хотя рассматривается, что все указанные выше углеродные субстраты и их смеси подходят для настоящего изобретения, предпочтительные углеродные субстраты представляют собой глюкозу, фруктозу и сахарозу.

В дополнение к подходящему источнику углерода, ферментационные среды должны содержать подходящие минералы, соли, кофакторы, буферы и другие компоненты, известные специалистам в данной области техники, подходящие для роста культур и стимуляции ферментативного пути, необходимого для продукции изобутанола.

Условия культивирования

Обычно клетки выращивают при температуре в диапазоне от приблизительно 25°C до приблизительно 40°C в подходящей среде. Подходящие ростовые среды настоящего изобретения представляют собой обычные коммерчески получаемые среды, такие как бульон Luria Bertani (LB), бульон Sabouraud Dextrose (SD) или бульон дрожжевой среды (YM). Могут быть также использованы другие ростовые среды, определенного состава или синтетические, и подходящая среда для роста конкретного микроорганизма должна быть известна специалисту в данной области микробиологии или науки о ферментации. Применение агентов, известных как прямо или косвенно модулирующих подавление катаболизма, например, циклического аденозин-2',3'-монофосфата, может также включаться в среду ферментации.

Подходящие диапазоны pH для ферментации находятся между pH 5,0 и pH 9,0, где от pH 6,0 до pH 8,0 предпочтителен в качестве исходного условия.

Ферментации могут быть осуществлены в аэробных или анаэробных условиях, где анаэробные или микроаэробные условия предпочтительны.

Количество изобутанола, продуцируемого в среде ферментации, может быть определено с применением ряда методов, известных в данной области техники, например, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или газовой хроматографии (ГХ).

Промышленные периодическая и непрерывная ферментации

В настоящем способе применяется периодический способ ферментации.

Классическая периодическая ферментация представляет собой закрытую систему, в которой композиция среды устанавливается в начале ферментации и не подвергается искусственным изменениям в процессе ферментации. Таким образом, в начале ферментации среда инокулируется с желаемым организмом или организмами и дается возможность осуществления ферментации без добавления чего-либо в систему. Обычно, однако, «периодическая» ферментация является периодической в отношении добавления источника углерода, и часто делаются попытки контроля таких факторов, как pH и концентрация кислорода. В периодических системах композиции метаболита и биомассы системы изменяются постоянно до времени

остановки ферментации. В периодических культурах клетки проходят через умеренный статический лаг-период к логарифмической фазе усиленного роста и, наконец, к стационарной фазе, когда скорость роста снижается или останавливается. Если не обрабатывать, клетки в стационарной фазе будут в конечном итоге погибать. Клетки в логарифмической фазе обычно ответственны за основную продукцию конечного продукта или промежуточного соединения.

Вариантом стандартной периодической системы является подпитываемая периодическая система. Процессы подпитываемой периодической ферментации также подходят для настоящего изобретения и включают обычную периодическую систему с тем исключением, что субстрат добавляют поэтапно в процессе ферментации. Подпитываемые периодические системы полезны, когда подавление катаболита способно ингибировать метаболизм клеток и когда желательно иметь ограниченные количества субстрата в средах. Измерение действительной концентрации субстрата в подпитываемых периодических системах затруднено и, следовательно, оценивается на основе изменений поддающихся измерению факторов, таких как pH, растворенный кислород и парциальное давление отходящего газа, такого как CO₂. Периодическая и подпитываемая периодическая ферментации общеприняты и хорошо известны в данной области техники, и примеры можно найти в Thomas D. Brock in *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology: Second Edition* (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. или Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36:227, (1992), включенных здесь в качестве ссылки.

Хотя настоящее изобретение осуществляется по типу периодического способа, рассматривается, что способ должен быть адаптирован к методам непрерывной ферментации. Непрерывная ферментация представляет собой открытую систему, где среда ферментации определенного состава непрерывно добавляется в биореактор и равное количество кондиционированных сред удаляется одновременно для процессинга. Непрерывная ферментация обычно поддерживает культуры при постоянной высокой плотности, когда клетки находятся в основном в логарифмической фазе роста.

Непрерывная ферментация позволяет модулировать один фактор или любое количество факторов, которые влияют на клеточный рост или концентрацию конечного продукта. Например, один метод будет поддерживать лимитирующее питательное вещество, такое как источник углерода или уровень азота, при фиксированной скорости и позволять всем другим параметрам поддерживаться. В других системах ряд факторов, влияющих на рост, может непрерывно изменяться, в то время как концентрация клеток, измеряемая по помутнению, поддерживается на постоянном уровне. Непрерывные системы борются за поддержание условий роста в устойчивом состоянии и, таким образом, потеря клеток, обусловленная откачкой среды, должна быть сбалансирована относительно скорости клеточного роста при ферментации. Методы модуляции питательных веществ и ростовых факторов для непрерывных процессов ферментации, а также способов максимализации скорости образования продукта хорошо известны в области промышленной микробиологии и разнообразные методы детализированы Brock, выше.

Подразумевается, что настоящее изобретение может быть осуществлено на практике с применением либо периодических, подпитываемых периодических, либо непрерывных процессов и что любой известный способ ферментации должен подходить. Кроме того, подразумевается, что клетки могут быть иммобилизованы на субстрате в виде целых клеток-катализаторов и подвергаться условиям

ферментации для получения изобутанола.

Методы выделения изобутанола из ферментационной среды

Продуцируемый биологически изобутанол может быть выделен из ферментационной среды с применением способов, известных в данной области техники. Например, твердые соединения могут быть удалены из ферментационной среды с помощью центрифугирования, фильтрации, декантирования или тому подобного. Затем изобутанол может быть выделен из ферментационной среды, которая обработана для удаления твердых соединений, как описано выше, с применением таких методов, как перегонка, экстракция жидкость-жидкость или разделение с помощью мембран. Так как изобутанол образует азеотропную смесь с водой с низкой точкой кипения, только перегонка может быть использована для разделения смеси до ее азеотропных компонентов. Перегонка может быть использована в сочетании с другим методом разделения для получения разделения вокруг азеотропа. Методы, которые могут быть использованы в сочетании с перегонкой, для выделения и очистки изобутанола включают, но не ограничиваются этим, декантирование, экстракцию жидкость-жидкость, адсорбцию и способы с использованием мембран. Кроме того, изобутанол может быть выделен с применением азеотропной перегонки с использованием азеотропообразователя (в качестве примера см. Doherty and Malone, Conceptual Design of Distillation Systems, McGraw Hill, New York, 2001).

Смесь изобутанола с водой образует гетерогенный азеотроп так, что перегонка может быть использована в сочетании с декантированием для выделения и очистки изобутанола. В этом способе содержащий изобутанол ферментационный бульон перегоняют до примерно азеотропной композиции. Затем азеотропную смесь конденсируют и изобутанол отделяют от ферментационной среды с помощью декантирования. Декантированная водная фаза может быть возвращена на первую дистилляционную колонку в виде оттока. Обогащенная изобутанолом декантированная органическая фаза может быть дополнительно очищена с помощью перегонки во второй дистилляционной колонке.

Изобутанол может быть также выделен из ферментационной среды с применением экстракции жидкость-жидкость в сочетании с перегонкой. При этом способе изобутанол экстрагируют из ферментационного бульона с применением экстракции жидкость-жидкость в подходящем растворителе. Содержащую изобутанол органическую фазу затем перегоняют для отделения изобутанола от растворителя.

Для выделения изобутанола из ферментационной среды может быть также использована перегонка в сочетании с адсорбцией. При этом способе ферментационный бульон, содержащий изобутанол, перегоняют до приблизительно азеотропной композиции и затем оставшуюся воду удаляют с помощью применения адсорбента, такого как молекулярные сита (Aden et al. Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, Report NREL/TP-510-32438, National Renewable Energy Laboratory, June 2002).

Кроме того, для выделения и очистки изобутанола из ферментационной среды может быть использована перегонка в сочетании с испарением через полупроницаемую перегородку. При этом способе ферментационный бульон, содержащий изобутанол, перегоняют до приблизительно азеотропной композиции и затем оставшуюся воду удаляют испарением через гидрофильную мембрану (Guo et

al., J. Membr. Sci. 245, 199-210 (2004)).

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно определяется в следующих примерах.

Должно быть понятно, что эти примеры несмотря на иллюстрацию предпочтительных осуществлений изобретения даны только в качестве иллюстрации. Из представленного выше обсуждения и этих примеров специалист в данной области техники может выяснить существенные характеристики этого изобретения, не отступая от его духа и объема, может сделать различные изменения и модификации изобретения для адаптации его к различным потребностям и условиям.

Общие методы

Стандартные способы рекомбинантной ДНК и молекулярного клонирования, применяемые в примерах, хорошо известны в данной области техники и описаны в Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY (1989) (Maniatis); и T.J. Silhavy, M.L. Bannan, and L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984); и Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, опубликованной Greene Publishing Assoc. и Wiley-Interscience (1987).

Материалы и методы, подходящие для поддержания и роста бактериальных культур, хорошо известны в данной области техники. Способы, подходящие для применения в последующих примерах, могут быть найдены, как изложено в *Manual of Methods for General Bacteriology* (Phillipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, eds), American Society for Microbiology, Washington, DC. (1994)) или в Thomas D. Brock in *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Second Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989). Все реагенты, ферменты рестрикции и материалы, применяемые для роста и поддержания бактериальных клеток, получены от Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), BD Diagnostic Systems (Sparks, MD), Life Technologies (Rockville, MD) или Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), если не указано иначе.

Микробиологические штаммы получены от The American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, если не указано иначе.

Олигонуклеотидные праймеры для использования в последующих примерах приведены в таблице 4. Все олигонуклеотидные праймеры синтезированы Sigma-Genosys (Woodlands, TX).

Таблица 4

Праймеры для олигонуклеотидного клонирования, скрининга и секвенирования			
Наименование	Последовательность	Description	SEQ ID NO:
N80	CACCATGGACAAACAGTATCCGGTACGCC	прямой budB	11
N81	CGAAGGGCGATAGCTTTACCAATCC	обратный budB	12
N100	CACCATGGCTAACTACTTCAATACACTGA	прямой ilvC	13
N101	CCAGGAGAAGGCCTTGAGTGTTTTCTCC	обратный ilvC	14
N102	CACCATGCCTAAGTACCGTTCCGCCACCA	прямой ilvD	15
N103	CGCAGCACTGCTCTTAATATTTCGGC	обратный ilvD	16
N104	CACCATGAACAACCTTTAATCTGCACACCC	прямой uqhD	17
N105	GCTTAGCGGGCGGCTTCGTATATACGGC	обратный uqhD	18
N110	GCATGCCTTAAGAAAGGAGGGGGTTCACATGGACAAA CAGTATCC	прямой budB	19
N111	ATGCATTTAATTAATTACAGAATCTGACTCAGATGCAG C	обратный budB	20

5	N112	GTCGACGCTAGCAAAGGAGGGAATCACCATGGCTAAC TACTTCAA	прямой ilvC	21
	N113	TCTAGATTAACCCGCAACAGCAATACGTTTC	обратный ilvC	22
	N114	TCTAGAAAAGGAGGAATAAAGTATGCCTAAGTACCGT TC	прямой ilvD	23
	N115	GGATCCTTATTAACCCCCAGTTTCGATTTA	обратный ilvD	24
	N116	GGATCCAAAGGAGGCTAGACATATGTATACTGTGGGG GA	прямой kivD	25
10	N117	GAGCTCTTAGCTTTTATTTTGCTCCGCAAAC	обратный kivD	26
	N118	GAGCTCAAAGGAGGAGCAAGTAATGAACAACTTAAT CT	прямой yqhD	27
	N119	GAATTCAGTCTAGGTTAGCGGGCGGCTTCGTATA TACGG	обратный yqhD	28
	BenNF	CAACATTAGCGATTTTCTTTTCTCT	прямой Npr	29
	BenASR	CATGAAGCTTACTAGTGGGCTTAAGTTTGGAAAATAAT GAAAACT	обратный Npr	30
15	N110.2	GAGCTCACTAGTCAATTGTAAGTAAGTAAAAGGAGGT GGTCCACATGGACAAACAGTATCC	прямой budB	31
	N111.2	GGATCCGATCGACTTAAGCCTCAGCTTACAGAATCTGA CTCAGATGCAGC	обратный budB	32
	N112.2	GAGCTCCTTAAGAAGGAGGTAATCACCATGGCTAACT ACTTCAA	прямой ilvC	33
	N113.2	GGATCCGATCGAGCTAGCGCGGCCGCTTAACCCGCAA CAGCAATACGTTTC	обратный ilvC	34
	N114.2	GAGCTCGCTAGCAAGGAGGTATAAAGTATGCCTAAGT ACCGTTC	прямой ilvD	35
20	N115.2	GGATCCGATCGATTAATTAACCTAAGGTTATTAACCCC CCAGTTTCGATTTA	обратный ilvD	36
	N116.2	GAGCTCTTAATTAAGGAGGTTAGACATATGTATAC TGTGGGGGA	прямой kivD	37
	N117.2	GGATCCAGATCTCCTAGGACATGTTAGCTTTTATTTT GCTCCGCAAAC	обратный kivD	38
	N130SeqF1	TGTTCCAACCTGATCACCG	праймер секвенирования	40
	N130SeqF2	GGAAAACAGCAAGCGCT	праймер секвенирования	41
30	N130SeqF3	CAGCTGAACCAAGTTGCC	праймер секвенирования	42
	N130SeqF4	AAAATACCAGCGCTGTCC	праймер секвенирования	43
	N130SeqR1	TGAATGGCCACCATGTTG	праймер секвенирования	44
	N130SeqR2	GAGGATCTCCGCCGCTG	праймер секвенирования	45
	N130SeqR3	AGGCCGAGCAGGAAGATC	праймер секвенирования	46
35	N130SeqR4	TGATCAGGTTGGAACAGCC	праймер секвенирования	47
	N131SeqF1	AAGAACTGATCCACAGGC	праймер секвенирования	48
	N131SeqF2	ATCCTGTGCGGTATGTTGC	праймер секвенирования	49
	N131SeqF3	ATTGCGATGGTGAAGCG	праймер секвенирования	50
	N131SeqR1	ATGGTGTGGCAATCAGCG	праймер секвенирования	51
40	N131SeqR2	GTGCTTCGGTGATGGTTT	праймер секвенирования	52
	N131SeqR3	TTGAAACCGTGCAGTAGC	праймер секвенирования	53
	N132SeqF1	TATTCAGTCCATCTCGCG	праймер секвенирования	54
	N132SeqF2	CCGTAAGCAGCTGTTTCCT	праймер секвенирования	55
	N132SeqF3	GCTGGAACAATACGACGTTA	праймер секвенирования	56
45	N132SeqF4	TGCTCTACCCAACCAGTTTC	праймер секвенирования	57
	N132SeqR1	ATGGAAGACCAGAGGTGCC	праймер секвенирования	58
	N132SeqR2	TGCCTGTGTGGTACGAAT	праймер секвенирования	59
	N132SeqR3	TATTACGCGCAGTGCCT	праймер секвенирования	60
50	N132SeqR4	GGTGATTTTGTGCGAGTTAGAG	праймер секвенирования	61
	N133SeqF1	TCGAAATTGTTGGGTGCG	праймер секвенирования	62
	N133SeqF2	GGTCACGCAGTTCATTTCTAAG	праймер секвенирования	63
	N133SeqF3	TGTGGCAAGCCGTAGAAA	праймер секвенирования	64
	N133SeqF4	AGGATCGCGTGGTGAGTAA	праймер секвенирования	65

	N133SeqR1	GTAGCCGTCGTTATTGATGA	праймер секвенирования	66
	N133SeqR2	GCAGCGAACTAATCAGAGATTC	праймер секвенирования	67
	N133SeqR3	TGGTCCGATGTATTGGAGG	праймер секвенирования	68
	N133SeqR4	TCTGCCATATAGCTCGCGT	праймер секвенирования	69
5	Scr1	CCTTCTTTGTGAATCGG	праймер секвенирования	72
	Scr2	AGAAACAGGGTGTGATCC	праймер секвенирования	73
	Scr3	AGTGATCATCACCTGTTGCC	праймер секвенирования	74
	Scr4	AGCACGGCGAGAGTCGACGG	праймер секвенирования	75
	T-budB (BamHI)	AGATAGATGGATCCGGAGGTGG GTCACATGGACAAACAGT	прямой budB	144
10	B-kivD (BamHI)	CTCTAGAGGATCCAGACTCCTAGGACATG	обратный kivD	145
	T-groE (XhoI)	AGATAGATCTCGAGAGCTATTGTAACATAATCGGTAC GGGGGTG	прямой PgroE	147
	B-groEL (SpeI, BamHI)	ATTATGTCAGGATCCACTAGTTTCTCCTTTAATTGGG AATTGTTATCCGC	обратный PgroE	148
	T-groEL	AGCTATTGTAACATAATCGGTACGGGGGTG	прямой PgroE	149
15	T-ilvCB.s. (BamHI)	ACATTGATGGATCCCATAAACAAGGGAGAGATTGAAAT GGTAAAG	прямой ilvC	150
	B-ilvCB.s. (SpeIBamHI)	TAGACAACGGATCCACTAGTTTAATTTTGCACAACGG AGACCACCGC	обратный ilvC	151
	T-BD64 (DraIII)	TTACCGTGGACTCACCGAGTGGGTAACTAGCCTCGCCG GAAAGAGCG	прямой pBD64	152
20	B-BD64 (DraIII)	TCACAGTTAAGACACCTGGTGCCGTTAATGCGCCATGA CAGCCATGAT	обратный pBD64	153
	T-lacIq (DraIII)	ACAGATAGATCACAGGTGCAAGCTAATTCGGTGGA AACGAGGTCATC	прямой lacIq	154
	B-lacIq (DraIII)	ACAGTACGATACACGGGGTGTCACTGCCCCGCTTTCCAG TCGGGAAACC	обратный lacIq	155
25	T-groE (DraIII)	TCGGATTACGCACCCCGTGAGCT ATTGTAACATAATCGGTACGGGGGTG	прямой PgroE	156
	B-B.s.ilvC (DraIII)	CTGCTGATCTCACACCGTGTGTTAATTTTGCACAACGG AGACCACCGC	обратный ilvC	157
	T-bdhB (DraIII)	TCGATAGCATACACACGGTGGTTAACAAGGAGGGGT TAAAATGGTTGATTTCG	прямой bdhB	159
30	B-bdhB (rrnBT1 DraIII)	ATCTACGCACTCGGTGATAAAACGAAAGGCCAGTCT TTCGACTGAGCCTTTCTGTTTATCTTACACAGATTTT GAATATTTGTAGGAC	обратный bdhB	160
	LDH EcoRV F	GACGTCATGACCACCCGCCGATCCCTTTT	прямой IdhL	161
	LDH AatIIIR	GATATCCAACACCAGCGACCGACGTATTAC	обратный IdhL	162
35	CmF	ATTTAAATCTCGAGTAGAGGATCCCAACAAACGAAAA TTGGATAAAG	прямой Cm	163
	CmR	ACGCGTTATTATAAAAGCCAGTCATTAGG	обратный Cm	164
	P11 F-StuI	CCTAGCGCTATAGTTGTTGACAGAATGGACATACTATG ATATATTGTTGCTATAGCGA	прямой промотор P11	165
	P11 R-SpeI	CTAGTCGCTATAGCAACAATATATCATAGTATGTCCAT TCTGTCAACAATATAGCGCTAGG	обратный промотор P11	166
40	PldhL F-HindIII	AAGCTTGTGACAAAACCAATTATGACGTGTCTGGG C	прямой IdhL	167
	PldhL R-BamHI	GGATCCTCATCTCTCGTAGTGAAAATT	обратный IdhL	168
	F-bdhB-AvrII	TTCTAGGAAGGAGGTGGTTAAAATGGTTGATTTCG	прямой bdhB	169
	R-bdhB-BamHI	TTGGATCCTTACACAGATTTTTTGAATAT	обратный bdhB	170
45	F-ilvC(B.s.)-AflIII	AACTTAAGAAGGAGGTGATTGAAATGGTAAAAGTATA TT	прямой ilvC	171
	R-ilvC(B.s.)-NotI	AAGCGCCGCTTAATTTTGCACAACGGAGACC	обратный ilvC	172
	F-PnisA(HindIII)	TTAAGCTTGACATACCTGAATGACCTAGTC	прямой промотор nisA	173
	R-PnisA(SpeI BamHI)	TTGGATCCAACTAGTATAATTTATTTGTAGTTCCTT C	обратный промотор nisA	174

Способы определения концентрации изобутанола в культуральных средах
 Концентрация изобутанола в культуральных средах может быть определена с помощью ряда способов, известных в данной области техники. Например,

конкретного способа высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением колонки Shodex SH-1011 с защитной колонкой Shodex SH-G, обе которые продаются Waters Corporation (Milford, MA), с определением коэффициента преломления (RI). Хроматографическое разделение достигалось при применении 0,01 М H₂SO₄ в качестве подвижной фазы при скорости тока 0,5 мл/мин и температуре колонки 50°C. При использованных условиях изобутанол имел время задержки 46,6 мин. Альтернативно, пригодны способы газовой хроматографии (ГХ). Например, в конкретном способе ГХ применяют колонку HP-INNOWax (30 м × 0,53 мм внутр. диам., толщина пленки 1 мкм, Agilent Technologies, Wilmington, DE) с детектором пламенной ионизации (FID). В качестве газа-носителя служил гелий при скорости тока 4,5 мл/мин, измеряемой при 150°C при постоянном давлении наконечника; зазор инжектора составлял 1:25 при 200°C, температура печи составляла 45°C в течение 1 мин, от 45 до 220°C при 10°C/мин и 220°C в течение 5 мин; и детекцию FID использовали при 240°C с кондиционированным газом гелия 26 мл/мин. Время задержки изобутанола составляло 4,5 мин.

Значения аббревиатур являются следующими: «сек» означает секунду(ы), «мин» означает минуту(ы) «час» означает час(ы), «psi» означает фунты на квадратный дюйм, «нм» означает нанометры, «день» означает день(дни), «мкл» означает микролитр(ы), «мл» означает миллилитр(ы), «л» означает литр(ы), «мм» означает миллиметр(ы), «нм» означает нанометры, «мМ» означает миллимолярный, «мкМ» означает микромолярный, «М» означает молярный, «ммоль» означает миллимоль(и), «мкмоль» означает микромоль(и), «г» означает грамм(ы), «мкг» означает микрограмм(ы) и «нг» означает нанограмм(ы), «ПЦР» означает полимеразную цепную реакцию, «ОП» означает оптическую плотность, «ОП₆₀₀» означает оптическую плотность, измеренную при длине волны 600 нм, «кДа» означает килодальтоны, «g» означает постоянную гравитации, «п.н.» означает пару(ы) нуклеотидов, «т.п.н.» означает тысячу(и) пар нуклеотидов, «% мас./об.» означает процентное отношение масса/объем, «% об./об.» означает процентное отношение объем/объем, «IPTG» означает изопропил-β-D-тиогалактопиранозид, «RBS» означает сайт связывания с рибосомой, «ВЭЖХ» означает высокоэффективную жидкостную хроматографию и «ГХ» означает газовую хроматографию. Термин «молярная избирательность» представляет собой количество молей продукта, получаемых на моль потребленного сахарного субстрата и представленное в виде процента.

Пример 1

Клонирование и экспрессия ацетолактатсинтазы

Цель данного примера состояла в клонировании гена budB из *Klebsiella pneumoniae* и его экспрессии в *E. coli* BL21-AI. Ген budB амплифицировали из геномной ДНК штамма ATCC 25955 *Klebsiella pneumoniae* с помощью ПЦР с получением продукта 1,8 т.п.н.

Геномную ДНК получали с помощью набора Gentra Puregene (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN; каталожный номер D-5000A). Ген budB амплифицировали из геномной ДНК *Klebsiella pneumoniae* с помощью ПЦР с применением праймеров N80 и N81 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:11 и 12 соответственно. Другие реагенты амплификации ПЦР были получены в наборах производителей, например Finnzymes PhusionTM High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; каталожный № F-531), и использовались в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию проводили в аппарате DNA Thermocycler GeneAmp

9700 (PE Applied Biosystems, Foster city, CA).

Для исследований экспрессии применяли переходный способ клонирования (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Вводный вектор pENTRSDD-TOPO обеспечивал направленное клонирование и служил последовательностью Шайна-Дальгарно для интересующего гена. Целевой вектор pDEST14 использовал промотор T7 для экспрессии гена без метки. Прямой праймер включал четыре основания (CACC), непосредственно примыкавших к кодону старта трансляции, для обеспечения направленного клонирования в pENTRSDD-TOPO (Invitrogen) с получением плазмиды pENTRSDD-TOPObudB. Конструктом pENTR трансформировали клетки E. coli Top10 (Invitrogen), которые высевали в соответствии с рекомендациями производителя. Трансформанты выращивали в течение ночи и плазмидную ДНК получали с помощью набора QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA; каталожный № 27106) в соответствии с рекомендациями производителя. Клоны секвенировали для подтверждения того, что гены были вставлены в правильной ориентации, и для подтверждения последовательности. Нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания (ORF) для данного гена и предсказанная аминокислотная последовательность фермента представлены в виде SEQ ID No:1 и SEQ ID No:2 соответственно.

Для создания экспрессионного клона ген budB переносили на вектор pDEST 14 путем рекомбинации с получением pDEST14budB. Вектором pDEST14budB трансформировали клетки E. coli BL21-AI (Invitrogen). Трансформанты инокулировали в среду Luria Bertani (LB) с добавкой 50 мкг/мл ампициллина и выращивали в течение ночи. Аликвоту ночной культуры использовали для инокуляции 50 мл LB с добавкой 50 мкг/мл ампициллина. Культуру инкубировали при 37°C при перемешивании до достижения ОП₆₀₀ значения 0,6-0,8. Культуру разделяли на две 25-мл культуры, и в один из сосудов добавляли арабинозу в конечной концентрации 0,2% мас./об. Сосуд отрицательного контроля не индуцировали арабинозой. Сосуды инкубировали в течение 4 часов при 37°C при перемешивании. Клетки собирали центрифугированием и осадки клеток ресуспендировали в буфере 50 мМ MOPS, pH 7,0. Клетки разрушали либо обработкой ультразвуком, либо пропусканием через French Pressure Cell. Весь клеточный лизат центрифугировали с получением супернатанта, или бесклеточного экстракта и осадка, или нерастворимой фракции. Аликвоту каждой фракции (общего клеточного лизата, бесклеточного экстракта и нерастворимой фракции) ресуспендировали в ДДС-Na (MES) буфере для нанесения (Invitrogen), нагревали до 85°C в течение 10 минут и подвергали анализу ДДС-Na-ПААГ (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, каталожный № NP0322Box, Invitrogen). Белок с ожидаемой молекулярной массой приблизительно 60 кДа, рассчитанной на основании нуклеотидной последовательности, имелся в индуцированной культуре, но не в неиндуцированном контроле.

Активность ацетолактатсинтазы в бесклеточных экстрактах измеряли способом, описанным Bauerle et al. (Biochim. Biophys. Acta 92(1):142-149 (1964)).

Пример 2 (предсказательный)

Клонирование и экспрессия редуктоизомеразы ацетогидроксикислоты

Цель данного предсказательного примера заключается в описании клонирования гена ilvC из E. coli K12 и его экспрессии в E. coli BL21-AI. Ген ilvC амплифицируют из геномной ДНК E. coli с помощью ПЦР.

Ген ilvC клонируют и экспрессируют тем же способом, что и ген budB, описанным

в примере 1. Геномную ДНК из *E. coli* получают с помощью набора Gentra Puregene (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN; каталожный номер D-5000A). Ген *ilvC* амплифицируют с помощью ПЦР с использованием праймеров N100 и N101 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:13 и 14 соответственно, с получением продукта 1,5 т.п.н. Прямой праймер включает четыре основания (CCAC), непосредственно примыкающие к кодону старта трансляции, что обеспечивает направленное клонирование в pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen) с получением плазмиды pENTRSDD-TOPOilvC. Клоны секвенируют для подтверждения того, что гены вставлены в правильной ориентации, и для подтверждения последовательности. Нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания (ORF) для данного гена и предсказанная аминокислотная последовательность фермента представлены в виде SEQ ID No:3 и SEQ ID No:4 соответственно.

Для создания экспрессионного клона ген *ilvC* переносили на вектор pDEST 14 путем рекомбинации с получением pDEST14ilvC. Вектором pDEST14ilvC трансформировали клетки *E. coli* BL21-AI и экспрессию с промотора T7 индуцировали добавлением арабинозы. Белок с ожидаемой молекулярной массой приблизительно 54 кДа, рассчитанной на основании нуклеотидной последовательности, имелся в индуцированной культуре, но не в неиндуцированном контроле.

Активность редуктоизомеразы ацетогидроксикислоты в бесклеточных экстрактах измеряют способом, описанным Arfin and Umbarger (J. Biol. Chem. 244(5): 1118-1127 (1969)).

Пример 3 (предсказательный)

Клонирование и экспрессия дегидратазы ацетогидроксикислоты

Цель данного предсказательного примера заключается в описании клонирования гена *ilvD* из *E. coli* K12 и его экспрессии в *E. coli* BL21-AI. Ген *ilvD* амплифицируют из геномной ДНК *E. coli* с помощью ПЦР.

Ген *ilvD* клонируют и экспрессируют тем же способом, что и ген *budB*, описанным в примере 1. Геномную ДНК из *E. coli* получают с помощью набора Gentra Puregene (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN; каталожный номер D-5000A). Ген *ilvD* амплифицируют с помощью ПЦР с использованием праймеров N102 и N103 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:15 и 16 соответственно с получением продукта 1,9 т.п.н. Прямой праймер включает четыре основания (CCAC), непосредственно примыкающие к кодону старта трансляции, что обеспечивает направленное клонирование в pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen) с получением плазмиды pENTRSDD-TOPOilvD. Клоны секвенируют для подтверждения того, что гены вставлены в правильной ориентации, и для подтверждения последовательности. Нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания (ORF) для данного гена и предсказанная аминокислотная последовательность фермента представлены в виде SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно.

Для создания экспрессионного клона ген *ilvD* переносят на вектор pDEST 14 (Invitrogen) путем рекомбинации с получением pDEST14ilvD. Вектором pDEST14ilvC трансформируют клетки *E. coli* BL21-AI и экспрессию с промотора T7 индуцируют добавлением арабинозы. Белок с ожидаемой молекулярной массой приблизительно 66 кДа, рассчитанной на основании нуклеотидной последовательности, имеется в индуцированной культуре, но не в неиндуцированном контроле.

Активность дегидратазы ацетогидроксикислоты в бесклеточных экстрактах

измеряют способом, описанным Flint et al. (J. Biol. Chem. 268(20):14732-14742 (1993)).

Пример 4 (предсказательный)

Клонирование и экспрессия декарбоксилазы кетокислот с разветвленной цепью

Цель данного предсказательного примера заключается в описании клонирования гена *kivD* из *Lactococcus lactis* и его экспрессии в *E. coli* BL21-AI.

Последовательность ДНК, кодирующей декарбоксилазу кетокислот с разветвленной цепью (*kivD*) из *L. lactis*, получена от GenScript (Piscataway, NJ).

Полученная последовательность оптимизирована по кодонам для экспрессии и в *E. coli*, и в *B. subtilis* и клонируется в pUC57 с получением pUC57-*kivD*.

Оптимизированная по кодонам нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания (ORF) для данного гена и предсказанная аминокислотная последовательность фермента представлены в виде SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8 соответственно.

Для создания экспрессионного клона используют сайты рестрикции *NdeI* и *BamHI* для клонирования 1,7 т.п.н. фрагмента *kivD* из pUC57-*kivD* в вектор 3ET-3a (Novagen, Madison, WI). Это обеспечивает экспрессию клона pET-3a-*kivD*. Вектором pET-3a-*kivD* трансформируют клетки *E. coli* BL21-AI и экспрессию с промотора T7 индуцируют добавлением арабинозы. Белок с ожидаемой молекулярной массой приблизительно 61 кДа, рассчитанной на основании нуклеотидной последовательности, имеется в индуцированной культуре, но не в неиндуцированном контроле.

Активность декарбоксилазы кетокислот с разветвленной цепью в бесклеточных экстрактах измеряют способом, описанным Smit et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 396-402 (2003)).

Пример 5 (предсказательный)

Клонирование и экспрессия дегидрогеназы спиртов с разветвленной цепью

Цель данного предсказательного примера заключается в описании клонирования гена *yqhD* из *E. coli* K12 и его экспрессии в *E. coli* BL21-AI. Ген *yqhD* амплифицируют из геномной ДНК *E. coli* с помощью ПЦР.

Ген *yqhD* клонируют и экспрессируют тем же способом, что и ген *budB*, описанным в примере 1. Геномную ДНК из *E. coli* получают с помощью набора Gentra Puregene (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN; каталожный номер D-5000A). Ген *yqhD* амплифицируют с помощью ПЦР с использованием праймеров N104 и N105 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:17 и 18 соответственно, с получением продукта 1,2 т.п.н. Прямой праймер включает четыре основания (CCAC), непосредственно примыкающие к кодону старта трансляции, что обеспечивает направленное клонирование в pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen) с получением плазмиды pENTRSSD-TOPOyqhD. Клоны секвенируют для подтверждения того, что гены вставлены в правильной ориентации, и для подтверждения последовательности. Нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания (ORF) для данного гена и предсказанная аминокислотная последовательность фермента представлены в виде SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10 соответственно.

Для создания экспрессионного клона ген *yqhD* переносят на вектор pDEST 14 (Invitrogen) путем рекомбинации с получением pDEST14yqhD. Вектором pDEST14yqhD трансформируют клетки *E. coli* BL21-AI и экспрессию с промотора T7 индуцируют добавлением арабинозы. Белок с ожидаемой молекулярной массой приблизительно 42 кДа, рассчитанной на основании нуклеотидной

последовательности, имеется в индуцированной культуре, но не в неиндуцированном контроле.

Активность дегидрогеназы спиртов с разветвленной цепью в бесклеточных экстрактах измеряют способом, описанным Sulzenbacher et al. (J. Mol. Biol. 342(2):489-502 (2004)).

Пример 6 (предсказательный)

Конструирование трансформирующего вектора для генов пути биосинтеза изобутанола

Цель данного предсказательного примера заключается в описании конструирования трансформирующего вектора, содержащего гены, кодирующие пять стадий пути биосинтеза изобутанола. Все гены помещали в единый оперон под контролем единого промотора. Отдельные гены амплифицируют с помощью ПЦР с праймерами, которые включают сайты рестрикции для последующего клонирования, и прямые праймеры содержат оптимизированный сайт связывания (AAAGGAGG) с рибосомой *E. coli*. Продукты ПЦР клонируют ТОРО в вектор pCR 4Blunt-ТОРО и трансформируют им клетки *E. coli* Top10 (Invitrogen). Из клонов ТОРО получают плазмидную ДНК и проверяют последовательность генов. Ферменты рестрикции и T4 ДНК-лигазу (New England Biolabs, Beverly, MA) используют в соответствии с рекомендациями производителя. Для экспериментов по клонированию фрагменты рестрикции очищают в геле с помощью набора QIAquick Gel Extraction (Qiagen). После подтверждения последовательности гены субклонируют в модифицированный вектор pUC19 в качестве основы клонирования. Вектор pUC19 модифицируют гидролизом HindIII/SapI с созданием pUC19dHS. Гидролиз удаляет lac промотор, примыкающий к MCS (сайту множественного клонирования), что предотвращает транскрипцию оперонов в векторе.

Ген *budB* амплифицируют из геномной ДНК *K. pneumoniae* ATCC 25955 с помощью ПЦР с использованием пары праймеров N110 и N111 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:19 и 20 соответственно, с получением продукта 1,8 т.п.н. Прямой праймер включает сайты рестрикции SphI и AflII и сайт связывания с рибосомой (RBS). Обратный праймер включает сайты рестрикции PacI и NsiI. Продукт ПЦР клонируют в pCR4 Blunt-ТОРО с созданием pCR4 Blunt-ТОРО-*budB*. Из клонов ТОРО получают плазмидную ДНК и проверяют последовательность гена.

Ген *ilvC* амплифицируют из геномной ДНК *E. coli* K12 с помощью ПЦР с использованием пары праймеров N112 и N113 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:21 и 22 соответственно, с получением продукта 1,5 т.п.н. Прямой праймер включает сайты рестрикции SalI и NheI и RBS. Обратный праймер включает сайт рестрикции XbaI. Продукт ПЦР клонируют в pCR4 Blunt-ТОРО с созданием pCR4 Blunt-ТОРО-*ilvC*. Из клонов ТОРО получают плазмидную ДНК и проверяют последовательность гена.

Ген *ilvD* амплифицируют из геномной ДНК *E. coli* K12 с помощью ПЦР с использованием пары праймеров N114 и N115 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:23 и 24 соответственно, с получением продукта 1,9 т.п.н. Прямой праймер включает сайт рестрикции XbaI и RBS. Обратный праймер включает сайт рестрикции BamHI. Продукт ПЦР клонируют в pCR4 Blunt-ТОРО с созданием pCR4 Blunt-ТОРО-*ilvD*. Из клонов ТОРО получают плазмидную ДНК и проверяют последовательность гена.

Ген *kivD* амплифицируют из pUC57-*kivD* (описанной в примере 4) с помощью ПЦР с использованием пары праймеров N116 и N117 (см. таблицу 2), представленных

как SEQ ID NO:25 и 26 соответственно, с получением продукта 1,7 т.п.н. Прямой праймер включает сайт рестрикции BamHI и RBS. Обратный праймер включает сайт рестрикции SacI. Продукт ПЦР клонируют в pCR4 Blunt-TOPO с созданием pCR4 Blunt-TOPO-kivD. Из клонов TOPO получают плазмидную ДНК и проверяют последовательность гена.

Ген yqhD амплифицируют из геномной ДНК *E. coli* K12 с помощью ПЦР с использованием пары праймеров N118 и N119 (см. таблицу 2), представленных как SEQ ID NO:27 и 28 соответственно, с получением продукта 1,2 т.п.н. Прямой праймер включает сайт рестрикции SacI. Обратный праймер включает сайты рестрикции SpeI и EcoRI. Продукт ПЦР клонируют в pCR4 Blunt-TOPO с созданием pCR4 Blunt-TOPO-yqhD. Из клонов TOPO получают плазмидную ДНК и проверяют последовательность гена.

Для конструирования оперона пути изобутанола ген yqhD вырезают из pCR4 Blunt-TOPO-yqhD с помощью SacI и EcoRI с получением фрагмента 1,2 т.п.н. Его лигируют с pUC19dHS, которую предварительно гидролизуют SacI и EcoRI. Полученный клон pUC19dHS-yqhD подтверждают гидролитической рестрикцией. Затем из pCR4 Blunt-TOPO-ilvC вырезают ген ilvC с помощью SalI и XbaI с получением фрагмента 1,5 т.п.н. Его лигируют с pUC19dHS-yqhD, которую предварительно гидролизуют SalI и XbaI. Полученный клон pUC19dHS-ilvC-yqhD подтверждают гидролитической рестрикцией. Затем из pCR4 Blunt-TOPO-budB вырезают ген budB с помощью SphI и NsiI с получением фрагмента 1,8 т.п.н. pUC19dHS-ilvC-yqhD гидролизуют SphI и PstI и лигируют с фрагментом SphI/NsiI budB (NsiI и PstI образуют совместимые концы) с образованием pUC19dHS-budB-ilvC-yqhD. Фрагмент 1,9 т.п.н., содержащий ген ilvD, вырезают из pCR4 Blunt-TOPO-ilvD с помощью XbaI и BamHI и лигируют с pUC19dHS-budB-ilvC-yqhD, которую гидролизуют теми же ферментами, с получением pUC19dHS-budB-ilvC-ilvD-yqhD. Наконец, из pCR4 Blunt-TOPO-kivD с помощью BamHI and SacI вырезают kivD с получением фрагмента 1,7 т.п.н. Данный фрагмент лигируют с pUC19dHS-budB-ilvC-ilvD-yqhD, которую предварительно гидролизуют с помощью BamHI and SacI, с образованием pUC19dHS-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD.

Вектор pUC19dHS-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD гидролизуют AflII и SpeI с получением оперонного фрагмента 8,2 т.п.н., который клонируют в pBenAS, челночный вектор *E. coli*-*B. Subtilis*. Плазмиду pBenAS создают путем модификации вектора pBE93, описанного Nagarajan, (WO 93/24631, пример 4). Для получения pBenAS промотор нейтральной протеазы (*NPR*) *Bacillus amyloliquefaciens*, сигнальную последовательность и ген *phoA* удаляют гидролизом pBE93 с помощью NcoI/HindIII. Промотор *NPR* амплифицируют с помощью ПЦР из pBE93 с применением праймеров BenNF и BenASR, представленных SEQ ID NO:29 и 30 соответственно. Праймер BenASR включает сайты AflII, SpeI и HindIII ниже промотора. Продукт ПЦР гидролизуют NcoI и HindIII и фрагмент клонируют в соответствующие сайты вектора с получением pBenAS. Оперонный фрагмент клонируют в сайты AflII и SpeI в pBenAS с получением pBen-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD.

Пример 7 (предсказательный)

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *E. coli*

Цель данного предсказательного примера заключается в описании экспрессии пути биосинтеза изобутанола в *E. coli*.

Плазмидой pBen-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD, сконструированной, как описано в примере 6, трансформируют *E. coli* NM522 (ATCC No. 47000) с получением

штамма *E. coli* NM522/pBen-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD и экспрессию генов оперона отслеживают с помощью анализа ДДС-На-ПАГЭ, ферментативного анализа и анализа Вестерн-блоттингом. Для иммуноблоттинга получают антитела против синтетических пептидов с помощью Sigma-Genosys (The Woodlands, TX).

5 Штамм *E. coli* NM522/pBen-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD инокулируют в 250-мл перемешиваемый сосуд, содержащий 50 мл среды, и перемешивают при 250 об/мин и 35°C. Среда состоит из глюкозы (5 г/л), MOPS (0,05M), сульфата аммония (0,01M), фосфата калия, одноосновного (0,005M), смеси металлов S10 (1% (об./об.),
10 дрожжевого экстракта (0,1% (мас./об.), казаминовых кислот (0,1% (мас./об.), тиамина (0,1 мг/л), пролина (0,05 мг/л) и биотина (0,002 мг/л) и титруется до pH 7,0 с помощью КОН. Смесь металлов S10 содержит MgCl₂ (200 мМ), CaCl₂ (70 мМ), MnCl₂ (5 мМ), FeCl₃ (0,1 мМ), ZnCl₂ (0,1 мМ), тиамина гидрохлорид (0,2 мМ),
15 CuSO₄ (172 мкМ), CoCl₂ (253 мкМ) и Na₂MoO₄ (242 мкМ). Через 18 час изобутанол определяют с помощью ВЭЖХ или ГХ-анализа с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, например описанных в разделе «Общие способы» выше.

Пример 8 (предсказательный)

20 Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Bacillus subtilis*

Цель данного предсказательного примера заключается в описании экспрессии пути биосинтеза изобутанола в *Bacillus subtilis*. Применяют тот же подход, что и описанный в примере 7.

25 Используют плазмиду pBen-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD, сконструированную, как описано в примере 6. Плазмидой трансформируют *Bacillus subtilis* BE1010 (J. Bacteriol. 173:2278-2282 (1991)) с получением штамма *B. subtilis* BE1010/pBen-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD и экспрессию генов каждого оперона отслеживают, как описано в примере 7.

30 Штамм *B. subtilis* BE1010/pBen-budB-ilvC-ilvD-kivD-yqhD инокулируют в 250 мл перемешиваемый сосуд, содержащий 50 мл среды, и перемешивают при 250 об/мин и 35°C в течение 18 час. Среда состоит из декстрозы (5 г/л), MOPS (0,05M), глутаминовой кислоты (0,02M), сульфата аммония (0,01M), фосфата калия, одноосновного буфера (0,005M), смеси металлов S10 (как описано в примере 11, 1% (об./об.)), дрожжевого экстракта (0,1% (мас./об.), казаминовых кислот (0,1% (мас./об.), триптофана (50 мг/л), метионина (50 мг/л) и лизина (50 мг/л) и титруется до pH 7,0 с помощью КОН. Через 18 час изобутанол определяют с помощью ВЭЖХ или ГХ-анализа с использованием способов, хорошо известных в данной области
40 техники, например, описанных в разделе «Общие способы» выше.

Пример 9

Клонирование и экспрессия ацетолактатсинтазы

Для создания другого экспрессирующего ацетолактатсинтазу клона ген budB клонировали в вектор pTrc99A. Ген budB сначала амплифицировали из pENTRSDD-
45 TOPObudB (описанной в примере 1) с использованием праймеров (N110.2 и N111.2, представленных в виде SEQ ID NO:31 и 32 соответственно), вводящих сайты SacI, SpeI и MfeI с 5'-конца и сайты BbvCI, AflIII и BamHI с 3'-конца. Полученный 1,75 т.п.н. продукт ПЦР клонировали в pCR4-Blunt TOPO (Invitrogen) и подтверждали
50 последовательность ДНК (с использованием секвенирующих праймеров N130Seq F1-F4 и R1-R4, представленных в виде SEQ ID NO:40-47 соответственно). Ген budB затем вырезали из этого вектора с помощью SacI и BamHI и клонировали в pTrc99A (Amann et al. Gene 69(2):301-315 (1988)) с получением pTrc99A::budB. Вектором pTrc99A::budB

трансформировали клетки *E. coli* TOP10 и трансформанты инокулировали в среду LB с добавкой 50 мкг/мл ампициллина и выращивали в течение ночи при 37°C. Аликвоту ночной культуры использовали для инокуляции 50 мл среды LB с добавкой 50 мкг/мл ампициллина. Культуру инкубировали при 37°C с перемешиванием до достижения ОП₆₀₀ значения от 0,6 до 0,8. Экспрессию budV с промотора Trc индуцировали добавлением 0,4 mM IPTG. Готовили также сосуды отрицательного контроля, которые не индуцировали IPTG. Сосуды инкубировали в течение 4 час при 37°C с перемешиванием. Бесклеточные экстракты получали, как описано в примере 1.

Активность ацетолактатсинтазы в бесклеточных экстрактах измеряли, как описано в примере 1. Через три часа после индукции IPTG измеренная активность ацетолактатсинтазы составила 8 единиц/мг. Контрольный штамм, несущий лишь плазмиду pTrc99A, проявлял активность ацетолактатсинтазы 0,03 единицы/мг.

Пример 10

Клонирование и экспрессия редуктоизомеразы ацетогидроксикислоты

Цель данного примера состояла в клонировании гена *ilvC* из *E. coli* K12 и его экспрессии в *E. coli* TOP10. Ген *ilvC* амплифицировали из геномной ДНК штамма FM5 (ATCC 53911) *E. coli* K12 с помощью ПЦР.

Ген *ilvC* клонировали и экспрессировали способом, сходным с описанным для клонирования и экспрессии *ilvC* в примере 2 выше. ПЦР использовали для амплификации *ilvC* из генома *E. coli* FM5 с применением праймеров N112.2 и N113.2 (SEQ ID NO:33 и 34 соответственно). Праймеры создавали сайты SacI и AflII и оптимальный RBS на 5'-конце и сайты NotI, NheI и BamHI на 3'-конце *ilvC*. Продукт ПЦР 1,5 т.п.н. клонировали в pCR4Blunt TOPO в соответствии с протоколом производителя (Invitrogen) с получением pCR4Blunt TOPO::*ilvC*. Последовательность продукта ПЦР была подтверждена с помощью секвенирующих праймеров (N131SeqF1-F3 и N131SeqR1-R3, представленных как SEQ ID NO:48-53 соответственно). Для создания экспрессионного клона ген *ilvC* вырезали из pCR4Blunt TOPO::*ilvC* с помощью SacI и BamHI и клонировали в pTrc99A. Вектором pTrc99A::*ilvC* трансформировали клетки *E. coli* TOP10 и экспрессию с промотора Trc индуцировали добавлением IPTG, как описано в примере 9. Бесклеточные экстракты получали, как описано в примере 1.

Активность редуктоизомеразы ацетогидроксикислоты в бесклеточных экстрактах измеряли, как описано в примере 2. Через три часа после индукции IPTG измеренная активность редуктоизомеразы ацетогидроксикислоты составила 0,026 единиц/мг. Контрольный штамм, несущий лишь плазмиду pTrc99A, проявлял активность редуктоизомеразы ацетогидроксикислоты менее 0,001 единицы/мг.

Пример 11

Клонирование и экспрессия дегидратазы ацетогидроксикислоты

Цель данного примера состояла в клонировании гена *ilvD* из *E. coli* K12 и его экспрессии в *E. coli* TOP10. Ген *ilvD* амплифицировали из геномной ДНК штамма FM5 (ATCC 53911) *E. coli* K12 с помощью ПЦР.

Ген *ilvD* клонировали и экспрессировали способом, сходным с описанным для клонирования и экспрессии гена *ilvC* в примере 10. ПЦР использовали для амплификации *ilvD* из генома *E. coli* FM5 с применением праймеров N114.2 и N115.2 (SEQ ID NO:35 и 36 соответственно). Праймеры создавали сайты SacI и NheI и оптимальный RBS на 5'-конце и сайты Bsu36I, PacI и BamHI на 3'-конце *ilvD*. Продукт ПЦР 1,9 т.п.н. клонировали в pCR4Blunt TOPO в соответствии с протоколом

производителя (Invitrogen) с получением pCR4Blunt TOPO::ilvD. Последовательность продукта ПЦР была подтверждена (секвенирующие праймеры N132SeqF1-F3 и N132SeqR1-R3, представленные как SEQ ID NO:54-61 соответственно). Для создания экспрессионного клона ген ilvD вырезали из pCR4Blunt TOPO::ilvD с помощью SacI и BamHI и клонировали в pTrc99A. Вектором pTrc99A::ilvD трансформировали клетки E. coli TOP10 и экспрессию с промотора Trc индуцировали добавлением IPTG, как описано в примере 9. Бесклеточные экстракты получали, как описано в примере 1.

Активность дегидратазы ацетогидроксикислоты в бесклеточных экстрактах измеряли, как описано в примере 3. Через три часа после индукции IPTG измеренная активность дегидратазы ацетогидроксикислоты составила 46 единиц/мг. Контрольный штамм, несущий лишь плазмиду pTrc99A, не проявлял выявляемой активности дегидратазы ацетогидроксикислоты.

Пример 12

Клонирование и экспрессия декарбоксилазы кетокислот с разветвленной цепью

Цель данного примера состояла в клонировании гена kivD из Lactococcus lactis и его экспрессии в E. coli TOP10.

Ген kivD клонировали и экспрессировали способом, сходным с описанным для ilvC в примере 10 выше. ПЦР использовали для амплификации kivD из плазмиды pUC57-kivD (см. пример 4 выше) с применением праймеров N116.2 и N117.2 (SEQ ID NO:37 и 38 соответственно). Праймеры создавали сайты SacI и PacI и оптимальный RBS на 5'-конце и сайты PciI, AvrII, BglII и BamHI на 3'-конце kivD.

Продукт ПЦР 1,7 т.п.н. клонировали в pCR4Blunt TOPO в соответствии с протоколом производителя (Invitrogen) с получением pCR4Blunt TOPO::kivD. Последовательность продукта ПЦР была подтверждена с помощью праймеров N133SeqF1-F4 и N133SeqR1-R4 (представленных как SEQ ID NO:62-69 соответственно). Для создания экспрессионного клона ген kivD вырезали из плазмиды pCR4Blunt TOPO::kivD с помощью SacI и BamHI и клонировали в pTrc99A. Вектором pTrc99A::kivD трансформировали клетки E. coli TOP10 и экспрессию с промотора Trc индуцировали добавлением IPTG, как описано в примере 9. Бесклеточные экстракты получали, как описано в примере 1.

Активность декарбоксилазы кетокислот с разветвленной цепью в бесклеточных экстрактах измеряли, как описано в примере 4, за исключением того, что для выявления и количественного определения продуктов альдегидной реакции использовали реагент Purpald® (Aldrich, каталожный No. 162892). Через три часа после индукции IPTG измеренная активность декарбоксилазы кетокислот с разветвленной цепью была выше 3,7 единиц/мг. Контрольный штамм, несущий лишь плазмиду pTrc99A, не проявлял выявляемой активности декарбоксилазы кетокислот с разветвленной цепью.

Пример 13

Экспрессия дегидрогеназы спиртов с разветвленной цепью

E. coli содержит природный ген (yqhD), который был идентифицирован как 1,3-пропандиолдегидрогеназа (патент США № 6514733). Белок YqhD на 40% идентичен AdhB (кодируемому adhB) из Clostridium, предполагаемой НАДН-зависимой бутанолдегидрогеназе. Ген yqhD конститутивно экспрессировали, поместив под вариант промотора 1.6GI глюкозоизомеразы (SEQ ID NO:70) в штамме MG1655 1.6yqhD::Cm E. coli (WO 2004/033646) с использованием способа λ Red (Datsenko and Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 97:6640 (2000)). MG1655

1.6yqhD::Cm содержит кассету FRT-CmR-FRT так, что маркер антибиотика может быть удален. Сходным образом природный промотор заменяли промотором 1.5GI (WO 2003/089621) (SEQ ID NO:71) с получением штамма MG1655 1.5GI-yqhD::Cm, заменив таким образом промотор 1.6GI MG1655 1.6yqhD::Cm промотором 1.5GI.

Штамм MG1655 1.5GI-yqhD::Cm выращивали в среде LB до середины логарифмического роста и получали бесклеточные экстракты, как описано в примере 1. Было обнаружено, что штамм обладает НАДФН-зависимой изобутиральдегидредуктазной активностью при анализе клеточных экстрактов путем отслеживания снижения поглощения при 340 нм при pH 7,5 и 35°C.

Для создания второго экспрессионного штамма, содержащего 1.5GI yqhD::Cm, получали P1 лизат из MG1655 1.5GI-yqhD::Cm и кассету переносили на BL21 (DE3) (Invitrogen) путем трансдукции с получением BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm.

Пример 14

Конструирование трансформирующего вектора для первых четырех генов пути биосинтеза изобутанола

Цель настоящего примера состояла в конструировании трансформирующего вектора для первых четырех генов (т.е. budB, ilvC, ilvD и kivD) пути биосинтеза изобутанола.

Для конструирования трансформирующего вектора первый ген, ilvC, получали из pTrc99A::ilvC (описанной в примере 10) путем гидролиза с помощью AflIII и BamHI и клонировали в pTrc99A::budB (описанную в примере 9), которую гидролизировали AflIII и BamHI с получением плазмиды pTrc99A::budB-ilvC. Затем получали гены ilvD и kivD из pTrc99A::ilvD (описанной в примере 11) и pTrc99A::kivD (описанной в примере 12) соответственно путем гидролиза с помощью NheI и PacI (ilvD) и PacI и BamHI (kivD). Эти гены вводили в pTrc99A::budB-ilvC, которую сначала гидролизировали с помощью NheI и BamHI путем трехстороннего лигирования. Наличие всех четырех генов в конечной плазмиде, pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD, подтверждали скринингом ПЦР и рестрикционным гидролизом.

Пример 15

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в E. coli, выращиваемой на глюкозе

Для создания продуцирующих изобутанол штаммов E. coli pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD (описанной в примере 14) трансформировали E. coli MG1655 1.5GI yqhD::Cm и E. coli BL21 (DE3) 1.5GI yqhD::Cm (описанные в примере 13). Трансформанты сначала выращивали в среде LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина и 100 мкг/мл карбенициллина. Клетки из этих культур использовали для инокуляции перемешиваемых сосудов (суммарный объем приблизительно 175 мл), содержащих 50 или 170 мл среды TM3a/глюкоза (с соответствующими антибиотиками) для экспозиции в условиях высокого и низкого содержания кислорода соответственно. Среда TM3a/глюкоза содержала (на литр): глюкозу (10 г), KH_2PO_4 (13,6 г), моногидрат лимонной кислоты (2,0 г), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,0 г), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,0 г), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 г), аммонийцитрат железа (0,33 г), тиамин-HCl (1,0 мг), дрожжевой экстракт (0,50 г) и 10 мл раствора микроэлементов. pH довели до 6,8 с помощью NH_4OH . Раствор микроэлементов содержал: лимонная кислота- H_2O (4,0 г/л), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3,0 г/л), NaCl (1,0 г/л), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,10 г/л), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,10 г/л), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,10 г/л), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,010 г/л), H_3BO_4 (0,010 г/л) и $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,010 г/л).

Сосуды инокулировали при начальной $\text{OP}_{600} \leq 0,01$ единицы и инкубировали при 34°C с перемешиванием при 300 об/мин. Сосуды, содержащие 50 мл среды,

закрывали крышками из фильтра 0,2 мкм; сосуды, содержащие 150 мл среды, закрывали запаиваемыми крышками. IPTG добавляли до конечной концентрации 0,04 мМ при достижении клетками ОП₆₀₀ ≥ 0,4 единицы.

Приблизительно через 18 час после индукции аликвоту бульона анализировали с помощью ВЭЖХ (колонка Shodex Sugar SH1011 (Showa Denko America, Inc. NY) с детекцией коэффициента преломления (RI)) и ГХ (Varian CP-WAX 58(FFAP) CB, 0,25 мм × 0,2 мкм × 25 м (Varian, Inc., Palo Alto, CA) с детекцией пламенной ионизации (FID)) на предмет содержания изобутанола, как описано в разделе «Общие способы». Изобутанол не был обнаружен в контрольных штаммах, несущих лишь вектор pTrc99A (результаты не показаны). Молярная избирательность и титры изобутанола, продуцируемого штаммами, несущими pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD, представлены в таблице 5. Значительно более высокие титры изобутанола были получены в культурах, выращиваемых в условиях низкого содержания кислорода.

Продукция изобутанола штаммами E. coli, выращиваемыми на глюкозе				Таблица 5
Штамм	Условия O ₂	Изобутанол мМ*	Молярная избирательность (%)	
MG1655 1.5GI yqhD/pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD	Высокое содержание	0,4	4,2	
MG1655 1.5GI yqhD/pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD	Низкое содержание	9,9	39	
BL21 (DE3) 1.5GI yqhD/pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD	Высокое содержание	0,3	3,9	
BL21 (DE3) 1.5GI yqhD/pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD	Низкое содержание	1,2	12	
* Определено ВЭЖХ				

Пример 16

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в E. coli, выращиваемой на сахарозе

Поскольку штаммы, описанные в примере 15, не были способны расти на сахарозе, была сконструирована дополнительная плазида для обеспечения утилизации сахарозы для получения изобутанола. Кластер генов утилизации сахарозы cscBKA, представленный в виде SEQ ID NO:39, был выделен из геномной ДНК утилизирующего сахарозу штамма E. coli, полученного из штамма ATCC 13281. Гены утилизации сахарозы (cscA, cscK и cscB) кодируют сахарозогидролазу (CscA), представленную в виде SEQ ID NO:139, D-фруктокиназу (CscK), представленную в виде SEQ ID NO:140, и сахарозопермеазу (CscB), представленную в виде SEQ ID NO:141. Специфичный в отношении сахарозы репрессорный ген cscR не включали, в результате чего три гена cscBKA экспрессировались конститутивно со своих природных промоторов в E. coli.

Геномную ДНК из утилизирующего сахарозу штамма E. coli гидролизovali до конца с помощью BamHI и EcoRI. Фрагменты, имеющие средний размер приблизительно 4 т.п.н., выделяли из агарозного геля и лигировали в плазмиду pLitmus28 (New England Biolabs), гидролизованную BamHI и EcoRI, и трансформировали ей сверхкомпетентные клетки E. coli TOP10F' (Invitrogen). Трансформанты наносили полосами на чашки агара MacConkey, содержащие 1% сахарозы и ампициллин (100 мкг/мл), и подвергали скринингу на появление пурпурных колоний. Плазмидную ДНК выделяли из пурпурных трансформантов и секвенировали с помощью M13 прямого и обратного праймеров (Invitrogen) и Scr1-4 (представленных как SEQ ID NO:72-75 соответственно). Плазида, содержащая гены cscB, cscK и cscA (cscBKA), была обозначена как pScr1.

Для создания плазмиды утилизации сахарозы, которая была бы совместима с плазмидой пути изобутанола (пример 14), оперон из pScr1 субклонировали в pBHR1 (MoBiTec, Goettingen, Германия). Гены cscBKA выделяли гидролизом pScr1 с помощью XhoI (с последующей инкубацией с ферментом Кленова для получения тупых концов) и затем гидролизом AgeI. Полученный фрагмент 4,2 т.п.н. лигировали в pBHR1, которую перед этим гидролизировали NaeI и AgeI, что дало плазмиду pBHR1::cscBKA.

Сахарозной плазмидой pBHR1::cscBKA трансформировали *E. coli* BL21 (DE3) 1.5 yqhD /pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD и *E. coli* MG1655 1.5yqhD /pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD (описанные в примере 15) электропорацией. Трансформанты сначала подвергали селекции на среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина, и затем подвергали скринингу на чашках сахарозы (1%) MacConkey для подтверждения функциональной экспрессии сахарозного оперона. Для получения изобутанола штаммы выращивали в минимальной описанной среде ТМ3а (описанной в примере 15), содержащей 1% сахарозу вместо глюкозы, и культуральную среду анализировали на количество образованного изобутанола, как описано в примере 15, за исключением того, что образцы отбирали через 14 часов после индукции. И вновь изобутанол не определялся в контрольных штаммах, несущих лишь вектор pTrc99A (результаты не показаны). Молярная избирательность и титры изобутанола, продуцируемого MG1655 1.5yqhD, несущим pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD, представлены в таблице 6. Сходные результаты были получены с аналогичным штаммом BL21 (DE3).

Таблица 6			
Продукция изобутанола штаммом <i>E. coli</i> MG1655 1.5yqhD/pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD/pBHR1::cscBKA, выращиваемым на сахарозе			
Условия O ₂	IPTG, mM	Изобутанол, mM*	Молярная избирательность, %
Высокое содержание	0,04	0,17	2
Высокое содержание	0,4	1,59	21
Низкое содержание	0,04	4,03	26
Низкое содержание	0,4	3,95	29
* Определено ВЭЖХ			

Пример 17

Экспрессия генов пути изобутанола в *Saccharomyces Cerevisiae*

Для экспрессии генов пути изобутанола в *Saccharomyces Cerevisiae* был сконструирован ряд челночных векторов *E. coli*-дрожжи. Для соединения генов с промоторами и терминаторами дрожжей использовали подход ПЦР (Yu, et al. Fungal Genet. Biol. 41:973-981 (2004)). Конкретно, промотор GPD (SEQ ID NO:76) и терминатор CYC1 (SEQ ID NO:77) соединяли с геном alsS из *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:78), промотор FBA (SEQ ID NO:79) и терминатор CYC1 соединяли с геном ILV5 из *S. cerevisiae* (SEQ ID NO:80), промотор ADH1 (SEQ ID NO:81) и терминатор ADH1 (SEQ ID NO:82) соединяли с геном ILV3 из *S. cerevisiae* (SEQ ID NO:83) и промотор GPM (SEQ ID NO:84) и терминатор ADH1 соединяли с геном kivD из *Lactococcus lactis* (SEQ ID NO:7). Праймеры, показанные в таблице 7, были разработаны так, чтобы они включали сайты рестрикции для клонирования продуктов промотор/ген/терминатор в челночные векторы *E. coli*-дрожжи серии pRS400 (Christianson et al. Gene 110:119-122 (1992)) и для обмена промоторами между конструктами. Праймеры для 5'-концов ILV5 и ILV3 (N138 и N155 соответственно, представленные как SEQ ID NO:95 и 107 соответственно) создавали новые стартовые кодоны для предотвращения направления этих ферментов в

митохондрии.

Все гибридные продукты ПЦР сначала клонировали в pCR-Blunt с помощью реакции клонирования TOPO (Invitrogen), и последовательности были подтверждены (с помощью M13 прямых и обратных праймеров (Invitrogen) и секвенирующих праймеров, представленных в таблице 7. Два дополнительных промотора (CUP1 и GAL1) были клонированы с помощью реакции TOPO в pCR4-Blunt и подтверждены секвенированием; последовательности праймеров показаны в таблице 7.

Сконструированные плазмиды описаны в таблице 8. Плазмидами трансформировали либо *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 (ATCC 201390), либо YJR148w (ATCC 4036939) для оценки удельной активности ферментов с помощью ферментативных анализов, описанных в примерах 1-4 и примерах 9-12. Для определения активности ферментов культуры выращивали до ОП₆₀₀, равной 1,0, в синтетической полной среде (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202), не содержащей каких(ого)-либо метаболитов(а), необходимых(ого) для селекции экспрессионных(ой) плазмид(ы), собирали центрифугированием (2600g в течение 8 мин при 4°C), промывали буфером, вновь центрифугировали и замораживали при -80°C. Клетки оттаивали, ресуспендировали в 20 mM трис-HCl, pH 8,0 до конечного объема 2 мл и затем разрушали шариковой взбивалкой с 1,2 г стеклянных шариков (размером 0,5 мм). Каждый образец обрабатывали при высокой скорости в течение в общей сложности 3 минут (с инкубацией на льду после каждой минуты взбивания). Экстракты осветляли от фрагментов клеток центрифугированием (20000g в течение 10 мин при 4°C).

Таблица 7

Последовательности праймеров для клонирования и секвенирования экспрессионных векторов *S. cerevisiae*

Наименование	Последовательность	Описание	SEQ ID NO:
N98SeqF1	CGTGTAGTCACATCAGGAC	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	85
N98SeqF2	GGCCATAGCAAAAATCCAAACAGC	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	86
N98SeqF3	CCACGATCAATCATATCGAACACG	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	87
N98SeqF4	GGTTTCTGTCTCTGGTGACG	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	88
N99SeqR1	GTCTGGTGATTCTACGCGCAAG	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	89
N99SeqR2	CATCGACTGCATTACGCAACTC	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	90
N99SeqR3	CGATCGTCAGAACAAATCTGTC	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	91
N99SeqR4	CCTTCAGTGTTCGCTGTCAG	Секвенирующий праймер alsS B. subtilis	92
N136	CCGCGGATAGATCTGAAATGAATAACAA TACTGACA	Прямой праймер промотора FBA с SacII/BglIII	93
N137	TACCACCGAAGTTGATTGCTTCAACATC CTCAGCTCTAGATTGAATATGTATTACT TGGTTAT	Обратный праймер промотора FBA с сайтом BbvCI и областью отжига с ILV5	94
N138	ATGTTGAAGCAAATCAACTTCGGTGGTA	Прямой праймер ILV5 (создает альтернативный стартовый кодон)	95
N139	TTATTGGTTTTCTGGTCTCAAC	Обратный праймер ILV5	96
N140	AAGTTGAGACCAGAAAACCAATAATTA TTAATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTT	Прямой праймер терминатора CYC с сайтом PacI и областью отжига с ILV5	97
N141	GCGGCCGCCGCAAATTAAGCCTTCGAG C	Обратный праймер терминатора CYC с сайтом NotI	98
N142	GGATCCGCATGCTTGCATTAGTCGTGC	Прямой праймер промотора GPM с сайтом BamHI	99
N143	CAGGTAATCCCCACAGTATACATCCTCA GCTATTGTAATATGTGTGTTTGTGG	Обратный праймер промотора GPM с сайтом BbvCI и областью отжига с kivD	100
N144	ATGTATACTGTGGGGGATTACC	Прямой праймер kivD	101
N145	TTAGCTTTTATTTTGTCTCCGCA	Обратный праймер kivD	102

5	N146	TTTGCGGAGCAAAATAAAAGCTAATTAAT TAAGAGTAAGCGAATTTCTTATGATTTA	Прямой праймер терминатора ADH с сайтом PacI и областью отжига с kivD	103
	N147	ACTAGTACCACAGGTGTTGCTCTGAG	Обратный праймер терминатора ADH с сайтом SpeI	104
	N151	CTAGAGAGCTTTCGTTTTCATG	Обратный праймер alsS	105
	N152	CTCATGAAAACGAAAGCTCTCTAGTTAAT TAATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTT	Прямой праймер терминатора CYC с сайтом PacI и областью отжига с alsS	106
	N155	ATGGCAAAGAAGCTCAACAAGTACT	Прямой праймер ILV3 (альтернативный стартовый кодон)	107
10	N156	TCAAGCATCTAAAAACAACCG	Обратный праймер ILV3	108
	N157	AACGGTTGTGTTTTAGATGCTTGATTAAT TAAGAGTAAGCGAATTTCTTATGATTTA	Прямой праймер терминатора ADH с сайтом PacI и областью отжига с ILV3	109
	N158	GGATCCTTTTCTGGCAACCAACCCATA	Прямой праймер промотора ADH с сайтом BamHI	110
15	N159	CGAGTACTTGTGAGCTTCTTTGCCATCCT CAGCGAGATAGTTGATTGTATGCTTG	Обратный праймер промотора ADH с сайтом BbvCI и областью отжига с ILV3	111
	N160SeqF1	GAAAACGTGGCATCCTCTC	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	112
	N160SeqF2	GCTGACTGGCCAAGAGAAA	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	113
	N160SeqF3	TGTACTTCTCCCACGGTTTC	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	114
	N160SeqF4	AGTACCCAATCTCTATACCCA	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	115
20	N160SeqF5	CCTGAAGTCTAGGTCCCTATTT	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	116
	N160SeqR1	GCGTGAATGTAAGCGTGAC	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	117
	N160SeqR2	CGTCGTATTGAGCCAAGAAC	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	118
	N160SeqR3	GCATCGGACAACAAGTTCAT	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	119
	N160SeqR4	TCGTTCTTGAAGTAGTCCAACA	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	120
25	N160SeqR5	TGAGCCCCGAAAGAGAGGAT	Секвенирующий праймер FBA::ILV5::CYC	121
	N161SeqF1	ACGGTATACGGCCTTCCTT	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	122
	N161SeqF2	GGGTTTGAAAGCTATGCAGT	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	123
	N161SeqF3	GGTGGTATGTATACTGCCAACA	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	124
	N161SeqF4	GGTGGTACCCAATCTGTGATTA	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	125
30	N161SeqF5	CGGTTTGGGTAAAGATGTTG	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	126
	N161SeqF6	AAACGAAAATTCTTATTCTTGA	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	127
	N161SeqR1	TCGTTTTAAAACCTAAGAGTCA	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	128
	N161SeqR2	CCAAACCGTAACCCATCAG	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	129
	N161SeqR3	CACAGATTGGGTACCACCA	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	130
35	N161SeqR4	ACCACAAGAACCAGGACCTG	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	131
	N161SeqR5	CATAGCTTTCAAACCCGCT	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	132
	N161SeqR6	CGTATACCGTTGCTCATTAGAG	Секвенирующий праймер ADH::ILV3::ADH	133
	N162	ATGTTGACAAAAGCAACAAAAGA	Прямой праймер alsS	134
	N189	ATCCGCGGATAGATCTAGTTCGAGTTTAT CATTATCAA	Прямой праймер GPD с сайтами SacII/BglII	135
40	N190.1	TTCTTTTGTGCTTTTGTCAACATCCTCAG CGTTTATGTGTGTTTATTCGAAA	Обратный праймер промотора GPD с сайтом BbvCI и областью отжига с alsS	136
	N176	ATCCGCGGATAGATCTATTAGAAGCCGCC GAGCGGGCG	Прямой праймер промотора GAL1 с сайтами SacII/BglII	137
	N177	ATCCTCAGCTTTTCTCCTTGACGTAAAGT A	Обратный праймер промотора GAL1 с сайтом BbvCI	138
45	N191	ATCCGCGGATAGATCTCCCATACCGACA TTTGGGCGC	Прямой праймер промотора CUP1 с сайтами SacII/BglII	175
	N192	ATCCTCAGCGATGATTGATTGATTGATTG TA	Обратный праймер промотора CUP1 с сайтом BbvCI	176

50	Челночные векторы E. coli-дрожжи, несущие гены пути изобутанола		Таблица 8
	Наименование плазмиды	Конструкция	
	pRS426 [ATCC No. 77107], селекция URA3	-	
	pRS426::GPD::alsS::CYC	Продукт ПЦР GPD::alsS::CYC, гидролизированный SacII/NotI, клонированный в pRS426, гидролизованную таким же образом	
	pRS426::FBA::ILV5::CYC	Продукт ПЦР FBA::ILV5::CYC, гидролизированный SacII/NotI, клонированный в pRS426, гидролизованную таким же образом	

	pRS425 [ATCC No. 77106], селекция LEU2	-
	pRS425::ADH::ILV3::ADH	Продукт ПЦР ADH::ILV3::ADH, гидролизированный BamHI/SpeI, клонированный в pRS425, гидролизованную таким же образом
	pRS425::GPM::kivD::ADH	Продукт ПЦР GPM::kivD::ADH, гидролизированный BamHI/SpeI, клонированный в pRS425, гидролизованную таким же образом
5	pRS426::CUP1::alsS	Фрагмент 7,7 т.п.н. SacII/BbvCI из pRS426::GPD::alsS::CYC, лигированный с фрагментом CUP1 SacII/BbvCI
	pRS426::GAL1::ILV5	Фрагмент 7 т.п.н. SacII/BbvCI из pRS426::FBA::ILV5::CYC, лигированный с фрагментом GAL1 SacII/BbvCI
	pRS425::FBA::ILV3	Фрагмент 8,9 т.п.н. BamHI/BbvCI из pRS425::ADH::ILV3::ADH, лигированный с фрагментом 0,65 т.п.н. FBA BglII/BbvCI из pRS426::FBA::ILV5::CYC
10	pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3	Фрагмент 2,4 т.п.н. SacII/NotI из pRS426::CUP1::alsS, клонированный в pRS425::FBA::ILV3, вырезанную с помощью SacII/NotI
	pRS426::FBA-ILV5+GPM-kivD	Фрагмент 2,7 т.п.н. BamHI/SpeI из pRS425::GPM::kivD::ADH, клонированный в pRS426::FBA::ILV5::CYC, вырезанную с помощью BamHI/SpeI
	pRS426::GAL1-FBA+GPM-kivD	Фрагмент 8,5 т.п.н. SacII/NotI из pRS426::FBA-ILV5+GPM-kivD, лигированный с 1,8 т.п.н. фрагментом SacII/NotI из pRS426::GAL1::ILV5
15	pRS423 [ATCC No. 77104], селекция HIS3	-
	pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3	Фрагмент 5,2 т.п.н. SacI/SalI из pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3, лигированный в pRS423, разрезанную с помощью SacI/SalI
	pHR81 [ATCC No. 87541], селекция URA3 и leu2-d	-
20	pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD	Фрагмент 4,7 т.п.н. SacI/BamHI из pRS426::FBA-ILV5+GPM-kivD, лигированный в pHR81, разрезанную с помощью SacI/BamHI

Пример 18

Продукция изобутанола рекомбинантным *Saccharomyces cerevisiae*

Плазмидами pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3 и pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD

(описанными в примере 17) трансформировали *Saccharomyces cerevisiae* YJR148w с получением штамма YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/ pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD. Контрольный штамм получали трансформацией векторами pRS423 и pHR81 (описанными в примере 17) *Saccharomyces cerevisiae* YJR148w (штамм YJR148w/pRS423/pHR81). Штаммы вели на стандартной для *S. cerevisiae* синтетической полной среде (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202), содержащей 2% либо глюкозы, либо сахарозы, но не содержащей урацил и гистидин для обеспечения сохранения плазмид.

Для продукции изобутанола клетки переносили на синтетическую полную среду, не содержащую урацил, гистидин и лейцин. Удаление лейцина из среды было направлено на инициацию увеличения количества копий плазмиды на основе pHR81 из-за низкой транскрипции аллеля leu2-d (Erhart and Hollenberg, J. Bacteriol. 156:625-635 (1983)). Аэробные культуры выращивали в сосудах емкостью 175 мл, содержащих 50 мл среды, в инкубаторе Innova4000 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) при 30°C и 200 об/мин. Культуры с низким содержанием кислорода получали добавлением 45 мл среды в 60-мл сосуды для сыворотки, которые закрывали гофрированными крышками после инокуляции и хранили при 30°C. Для отбора образцов и добавления индуктора при необходимости использовали стерильные шприцы. Приблизительно через 24 час после инокуляции добавляли индуктор CuSO₄ до конечной концентрации 0,03 мМ. Получали также контрольные культуры для каждого штамма без добавления CuSO₄. Культуральные супернатанты анализировали через 18 или 19 час и 35 час после добавления CuSO₄ на содержание изобутанола с помощью ИГХ, и ВЭЖХ, как описано выше в примере 15. Результаты для *S. cerevisiae* YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD, выращенной на глюкозе, представлены в таблице 9. Для получения показанных в таблице 9 результатов образцы аэробных культур отбирали через 35 час, а образцы

из культур с низким содержанием кислорода отбирали через 19 час и анализировали с помощью ВЭЖХ.

Результаты для *S. cerevisiae* YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD, выращенной на сахарозе, представлены в таблице 10. Результаты данной таблицы были получены для образцов, отобранных через 18 час и анализированных с помощью ВЭЖХ.

Таблица 9

Продукция изобутанола *S.cerevisiae* YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD, выращенной на глюкозе

Штамм	Уровень O ₂	Изобутанол, мМ	Молярная избирательность %
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Аэробный	0,12	0,04
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Аэробный	0,11	0,04
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD a	Аэробный	0,97	0,34
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD b	Аэробный	0,93	0,33
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD c	Аэробный	0,85	0,30
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Низкий	0,11	0,1
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Низкий	0,08	0,1
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD a	Низкий	0,28	0,5
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD b	Низкий	0,20	0,3
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD c	Низкий	0,33	0,6

Таблица 10

Продукция изобутанола *S.cerevisiae* YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD, выращенной на сахарозе

Штамм	Уровень O ₂	Изобутанол, мМ	Молярная избирательность %
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Аэробный	0,32	0,6
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Аэробный	0,17	0,3
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD a	Аэробный	0,68	1,7
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD b	Аэробный	0,54	1,2
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD c	Аэробный	0,92	2,0
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Низкий	0,18	0,3
YJR148w/pRS423/pHR81 (контроль)	Низкий	0,15	0,3
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD a	Низкий	0,27	1,2
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD b	Низкий	0,30	1,1
YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD c	Низкий	0,21	0,8

приставки “a”, “b” и “c” обозначают отдельные изоляты.

Результаты показывают, что при выращивании на глюкозе или сахарозе и при аэробных условиях, и в условиях низкого содержания кислорода штамм YJR148w/pRS423::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pHR81::FBA-ILV5+GPM-kivD продуцирует воспроизводимо большее количество изобутанола, чем контрольный штамм.

Пример 19

Продукция изобутанола рекомбинантным *Saccharomyces cerevisiae*

Плазмидами pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3 и pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivD

(описанными в примере 17) трансформировали *Saccharomyces cerevisiae* YJR148w с получением штамма YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivD. Контрольный штамм получали трансформацией векторами pRS425 и pRS426 (описанными в примере 17) *Saccharomyces cerevisiae* YJR148w (штамм YJR148w/pRS425/pRS426). Штаммы поддерживали на синтетической полной среде, как описано в примере 18.

Для продукции изобутанола клетки переносили на синтетическую полную среду, содержащую 2% галактозы и 1% раффинозы и не содержащую урацил и лейцин.

Аэробную культуру и культуру с низким содержанием кислорода получали, как описано в примере 18. Приблизительно через 18 час после инокуляции добавляли индуктор CuSO₄ до конечной концентрации 0,5 мМ. Получали также контрольные культуры для каждого штамма без добавления CuSO₄. Через 23 час после добавления CuSO₄ отбирали образцы культуральных супернатантов для определения изобутанола с помощью ВЭЖХ, как описано в примере 18. Результаты представлены в таблице 11. Из-за наблюдаемой сильно варьирующей конечной оптической плотности и связанного с количественным определением остаточным источником углерода концентрация изобутанола в таблице выражена в единицах на ОП₆₀₀ (вместо молярной избирательности), что позволяет сравнивать штаммы, содержащие гены пути биосинтеза изобутанола, с контрольными.

Таблица 11				
Продукция изобутанола <i>S. cerevisiae</i> YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivD, выращиваемой на галактозе и раффинозе				
Штамм	Уровень O ₂	CuSO ₄ , мМ	Изобутанол мМ	мМ изобутанола на единицу ОП
YJR148w/pRS425/pRS426 (контроль)	Аэробный	0,1	0,12	0,01
YJR148w/pRS425/pRS426 (контроль)	Аэробный	0,5	0,13	0,01
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDa	Аэробный	0	0,20	0,03
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+kivDb	Аэробный	0,03	0,82	0,09
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDc	Аэробный	0,1	0,81	0,09
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDd	Аэробный	0,5	0,16	0,04
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDe	Аэробный	0,5	0,18	0,01
YJR148w/pRS425/pRS426 (контроль)	Низкий	0,1	0,042	0,007
YJR148w/pRS425/pRS426 (контроль)	Низкий	0,5	0,023	0,006
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDa	Низкий	0	0,1	0,04
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDb	Низкий	0,03	0,024	0,02
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDc	Низкий	0,1	0,030	0,04
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDd	Низкий	0,5	0,008	0,02
YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivDe	Низкий	0,5	0,008	0,004
Приставки "a", "b", "c", "d" и "e" штаммов обозначают отдельные изоляты.				

Результаты показывают, что в целом штамм YJR148w/pRS425::CUP1-alsS+FBA-ILV3/pRS426::GAL1-ILV5+GPM-kivD продуцировал большее количество изобутанола на единицу оптической плотности по сравнению с контрольным штаммом и в аэробных условиях, и в условиях низкого содержания кислорода.

Пример 20**Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Bacillus subtilis***

Цель данного примера состояла в экспрессии пути биосинтеза изобутанола в *Bacillus subtilis*. Пять генов пути изобутанола (этапы пути с (а) по (е) на чертеже) были разделены на два оперона для экспрессии. Три гена *budD*, *ilvD* и *kivD*, кодирующие ацетолактатсинтазу, дегидратазу ацетогидроксикислоты и декарбоксилазу кетокислот с разветвленной цепью соответственно, были интегрированы в хромосому *B. subtilis* BE1010 (Payne and Jackson, J. Bacteriol. 173:2278-2282 (1991)). Два гена *ilvC* и *bdhB*, кодирующие изомероредуктазу ацетогидроксикислоты и бутанолдегидрогеназу соответственно, клонировали в экспрессионный вектор и трансформировали им штамм *Bacillus*, несущий интегрированные гены изобутанола.

Интеграция трех генов, *budD*, *ilvD* и *kivD*, в хромосому *B. subtilis* BE1010.

Для хромосомной интеграции трех генов, *budB* (SEQ ID NO:1), *ilvD* (SEQ ID NO:5) и *kivD* (SEQ ID NO:7), использовали векторы интеграции *Bacillus* pFP988DssPspac и pFP988DssPgroE. Обе плазмиды содержат репликон *E. coli* из pBR322, маркер антибиотика ампициллина для селекции в *E. coli* и два участка гомологии с геном *sacB* в хромосоме *Bacillus*, которые направляют интеграцию вектора и вставочной последовательности путем гомологичной рекомбинации. Между участками гомологии *sacB* находится промотор *spac* (PgroE) на pFP988DssPspac или промотор *groEL* (PgroE) на pFP988DssPgroE и маркер селекции для *Bacillus*, эритромицин. Промоторная область также содержит последовательность *lacO* для регуляции экспрессии белковым репрессором *lacI*. Последовательности pFP988DssPspac (6341 п.н.) и pFP988DssPgroE (6221 п.н.) представлены в виде SEQ ID NO:142 и SEQ ID NO:143 соответственно.

Кассету с тремя генами *budB-ilvD-kivD* конструировали путем делеции гена *ilvC* из плазмиды pTrc99a *budB-ilvC-ilvD-kivD*. Конструирование плазмиды pTrc99A::*budB-ilvC-ilvD-kivD* описано в примере 14. Плазмиду pTrc99A::*budB-ilvC-ilvD-kivD* гидролизировали *AflII* и *NheI*, обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы для получения тупых концов и полученный фрагмент 9,4 т.п.н., содержащий вектор pTrc99a, *budB*, *ilvD* и *kivD*, очищали в геле. Векторный фрагмент 9,4 т.п.н. аутолигировали с созданием pTrc99A::*budB-ilvD-kivD* и трансформировали ей компетентные клетки DH5 α (Invitrogen). Делецию гена *ilvC* в клоне pTrc99A *budB-ilvD-kivD* подтверждали рестрикционным картированием. Полученную плазмиду pTrc99A::*budB-ilvD-kivD* гидролизировали *SacI* и обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы для получения тупых концов. Плазмиду затем гидролизировали *BamHI* и полученный фрагмент 5297 п.н. *budB-ilvD-kivD* очищали в геле. Фрагмент 5297 п.н. *budB-ilvD-kivD* лигировали в сайты *SmaI* и *BamHI* интегрирующего вектора pFP988DssPspac. Смесью лигирования трансформировали компетентные клетки DH5 α . Трансформанты подвергали скринингу путем амплификации ПЦР фрагмента 5,3 т.п.н. *budB-ilvD-kivD* с праймерами T-*budB*(*BamHI*) (SEQ ID NO:144) и B-*kivD*(*BamHI*) (SEQ ID NO:145). Правильный клон был назван pFP988DssPspac-*budB-ilvD-kivD*.

Плазмиду pFP988DssPspac-*budB-ilvD-kivD* получали из трансформанта *E. coli* и трансформировали ей компетентные клетки *B. subtilis* BE1010, которые получали, как описано Doyle et al. (J. Bacteriol. 144:957 (1980)). Компетентные клетки собирали центрифугированием и клеточные осадки ресуспендировали в небольшом объеме супернатанта. К одному объему компетентных клеток добавляли два объема

среды SPII-EGTA (Methods for General and Molecular Bacteriology, P. Gerhardt et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, DC (1994)). Аликвоты (0,3 мл) клеток разносили в пробирки для тестирования, после чего в пробирки добавляли от 2 до 3 мкг плазмиды rFP988DssPspac-budB-ilvD-kivD. Пробирки инкубировали в течение 30 мин при 37°C с перемешиванием, затем в каждую пробирку добавляли 0,1 мл 10% дрожжевого экстракта и пробирки инкубировали еще в течение 60 мин.

Трансформанты выращивали для селекции на чашках LB, содержащих эритромицин (1,0 мкг/мл), используя способ двойного наложения агара (Methods for General and Molecular Bacteriology, выше). Трансформанты подвергали скринингу амплификацией ПЦР с праймерами N130SeqF1 (SEQ ID NO:40) и N130SeqR1 (SEQ ID NO:44) для budB, и N133SeqF1 (SEQ ID NO:62) и N133SeqR1 (SEQ ID NO:66) для kivD. В позитивных по интеграции клонах были обнаружены ожидаемые продукты ПЦР 1,7 т.п.н. budB и 1,7 т.п.н. kivD. Было идентифицировано два позитивных по интеграции клона, названных *B. subtilis* BE1010 Δ*sacB*::Pspac-budB-ilvD-kivD #2-3-2 и *B. subtilis* BE1010 Δ*sacB*::Pspac-budB-ilvD-kivD #6-12-7.

Анализ ферментативной активности в клонах с интеграцией *B. subtilis* BE1010 Δ*sacB*::Pspac-budB-ilvD-kivD #2-3-2 и *B. subtilis* BE1010 Δ*sacB*::Pspac-budB-ilvD-kivD #6-12-7 показал, что активность BudB, IlvD и KivD была низкой под контролем промотора *spac* (Pspac). Для улучшения экспрессии функциональных ферментов промотор Pspac был заменен промотором PgroE из плазмиды pHT01 (MoBites, Goettingen, Германия).

Фрагмент 6039 п.н. вектора rFP988Dss, представленный в виде SEQ ID NO:146, вырезали из неродственной плазмиды рестрикционным гидролизом XhoI и BamHI и очищали в геле. Промотор PgroE амплифицировали ПЦР из плазмиды pHT01 с праймерами T-groE(XhoI) (SEQ ID NO:147) и B-groEL(SpeI, BamHI) (SEQ ID NO:148). Продукт ПЦР гидролизовали XhoI и BamHI, лигировали с фрагментом 6039 п.н. вектора rFP988Dss и трансформировали им компетентные клетки DH5α. Трансформанты подвергали скринингу амплификацией ПЦР с праймерами T-groE(XhoI) и B-groEL(SpeI, BamHI). В позитивных клонах был обнаружен ожидаемый продукт ПЦР 174 п.н. PgroE, и они были названы rFP988DssPgroE.

Плазмида rFP988DssPgroE была подтверждена секвенированием ДНК.

Плазмиду rFP988DssPspac-budB-ilvD-kivD гидролизовали SpeI и PmeI и полученный фрагмент 5313 п.н. budB-ilvD-kivD очищали в геле. Фрагмент budB-ilvD-kivD лигировали в сайты SpeI и PmeI rFP988DssPgroE и трансформировали ей компетентные клетки DH5α. Позитивные клоны скринировали на наличие продукта ПЦР 1690 п.н. путем амплификации ПЦР с праймерами T-groEL (SEQ ID NO:149) и N111 (SEQ ID NO:20). Позитивный клон был назван rFP988DssPgroE-budB-ilvD-kivD.

Плазмиду rFP988DssPgroE-budB-ilvD-kivD получали из трансформанта *E. coli* и трансформировали ей компетентные клетки *Bacillus subtilis* BE1010, как описано выше. Трансформанты подвергали скринингу амплификацией ПЦР с праймерами N130SeqF1 (SEQ ID NO:40) и N130SeqR1 (SEQ ID NO:44) для budB и N133SeqF1 (SEQ ID NO:62) и N133SeqR1 (SEQ ID NO:66) для kivD. В позитивных по интеграции клонах были обнаружены ожидаемые продукты ПЦР 1,7 т.п.н. budB и 1,7 т.п.н. kivD. Было выделено два позитивных по интеграции клона, названных *B. subtilis* BE1010 Δ*sacB*::PgroE-budB-ilvD-kivD #1-7 и *B. subtilis* BE1010 Δ*sacB*::PgroE-budB-ilvD-kivD #8-16.

Плазмидная экспрессия генов *ilvC* и *bdhB*.

Два остальных гена изобутанола, *ilvC* и *bdhB*, экспрессировали с плазмиды.

Плазмиду рНТ01 (MoBitec), челночный вектор *Bacillus-E. coli*, использовали для присоединения гена *ilvC* из *B. subtilis* к промотору PgroE, так что ген *ilvC* экспрессировался с промотора PgroE, содержащего последовательность *lacO*.

Ген *ilvC*, представленный последовательностью SEQ ID NO:186, амплифицировали ПЦР с геномной ДНК *B. subtilis* BR151 (ATCC 33677) с праймерами T-*ilvCB.s.*(*Bam*HI) (SEQ ID NO:150) и B-*ilvCB.s.*(*Spe*I *Bam*HI) (SEQ ID NO:151). Продукт ПЦР 1067 п.н. *ilvC* гидролизовали *Bam*HI и лигировали в сайт *Bam*HI рНТ01. Смесью лигирования трансформировали компетентные клетки DH5α. Позитивные клоны подвергали скринингу на наличие 1188 п.н. продукта ПЦР с помощью амплификации ПЦР с праймерами T-*groEL* и B-*ilvB.s.*(*Spe*I *Bam*HI). Позитивный клон был назван рНТ01-*ilvC*(B.s.). Плазмиду рНТ01-*ilvC*(B.s.) использовали в качестве матрицы для амплификации ПЦР объединенного фрагмента PgroE-*ilvC*.

Плаزمида рBD64 (Minton et al., *Nucleic Acids Res.* 18:1651(1990)) представляет собой весьма стабильный вектор для экспрессии чужеродных генов в *B. subtilis* и содержит гены устойчивости к хлорамфениколу и канамицину для селекции в *B. subtilis*. Данную плазмиду использовали для экспрессии *ilvC* и *bdhB* под контролем промотора PgroE. Для клонирования PgroE-*ilvC*, *bdhB* и гена репрессора *lacI* в плазмиду рBD64 использовали одноступенчатый способ сборки (Tsuge et al., *Nucleic Acids Res.* 31:e133 (2003)). Фрагмент 3588 п.н. рBD64, содержащий ген *repB*, который включал функцию репликации, и маркер антибиотика канамицина, амплифицировали ПЦР с рBD64 с праймерами T-BD64(*Dra*III) (SEQ ID NO:152), который вводил последовательность *Dra*III (CACCGAGTG), и B-BD64(*Dra*III) (SEQ ID NO:153), который вводил последовательность *Dra*III (CACCTGGTG). Ген репрессора *lacI* 1327 п.н. амплифицировали ПЦР с рMUTIN4 (Vagner et al., *Microbiol.* 144:3097-3104 (1998)) с T-*lacIq*(*Dra*III) (SEQ ID NO:154), который вводил последовательность *Dra*III (CACCGAGTG), и B-*lacIq*(*Dra*III) (SEQ ID NO:155), который вводил последовательность *Dra*III (CACGGGGTG). Соединенную кассету 1224 п.н. PgroE-*ilvC* амплифицировали ПЦР с рНТ01-*ilvC*(B.s) с T-*groE*(*Dra*III) (SEQ ID NO:156), который вводил последовательность *Dra*III (CACCCCCGTG), и B-B.s.*ilvC*(*Dra*III) (SEQ ID NO:157), который вводил последовательность *Dra*III (CACCGTGTG). Ген *bdhB* 1,2 т.п.н. (SEQ ID NO:158) амплифицировали ПЦР с геномной ДНК *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) с праймерами T-*bdhB*(*Dra*III) (SEQ ID NO:159), который вводил последовательность *Dra*III (CACACGGTG), и B-*bdhB*(*rmBT1Dra*III) (SEQ ID NO:160), который вводил последовательность *Dra*III (CACTCGGTG). Три подчеркнутые буквы в вариабельной области узнаваемых *Dra*III последовательностей были разработаны для специфического спаривания оснований при сборке четырех фрагментов в порядке рBD64-*lacI*-PgroE-*ilvC*-*bdhB*. Каждый продукт ПЦР с сайтами *Dra*III на обоих концах гидролизовали отдельно *Dra*III и полученные фрагменты *Dra*III, 3588 п.н. рBD64, *lacI*, PgroE-*ilvC* и *bdhB* очищали в геле с использованием набора QIAGEN для экстракции геля (QIAGEN). Готовили для лигирования смесь, содержащую эквимольную концентрацию каждого фрагмента с общей концентрацией ДНК от 30 до 50 мкг/100 мкл. Раствор лигирования затем инкубировали при 16°C в течение ночи. Лигирование дало тандемный повтор ДНК с высокой молекулярной массой. Смесью лигирования с длинной линейной ДНК прямо трансформировали компетентную *B. subtilis* BE1010, полученную, как описано выше. *B. subtilis* предпочтительно использует длинные повторяющиеся линейные формы ДНК, а не кольцевую ДНК для формирования плазмиды. После трансформации культуру высевали на чашку LB, содержащую 10 мкг/мл канамицина для селекции.

Позитивные рекомбинантные плазмиды подвергали скринингу гидролизом DraIII с получением четырех фрагментов ожидаемого размера 3588 п.н. (pBD64), 1327 п.н. (lacI), 1224 п.н. (PgroE-*ilvC*) и 1194 п.н. (*bdhB*). Позитивная плазида была названа pBDPgroE-*ilvC*(B.s.)-*bdhB*.

Демонстрация продукции изобутанола из глюкозы или сахарозы *B. subtilis* BE1010 Δ sacB::PgroE-*budB-ilvD-kivD*/pBDPgroE-*ilvC*(B.s.)-*bdhB*.

Для конструирования рекомбинантной *B. subtilis*, экспрессирующей пять генов пути биосинтеза изобутанола, получали, как описано выше, компетентные клетки двух штаммов с интегрированной ДНК *B. subtilis* BE1010 Δ sacB-PgroE-*budB-ilvD-kivD* #1-7 и *B. subtilis* BE1010 Δ sacB::PgroE-*budB-ilvD-kivD* #8-16 и трансформировали их плазмидой pBDPgroE-*ilvC*(B.s.)-*bdhB* с получением *B. subtilis* BE1010 Δ sacB::PgroE-*budB-ilvD-kivD* #1-7/pBDPgroE-*ilvC*(B.s.)-*bdhB* и *B. subtilis* BE1010 Δ sacB::PgroE-*budB-ilvD-kivD* #8-16/pBDPgroE-*ilvC*(B.s.)-*bdhB*.

Два рекомбинантных штамма инокулировали либо в 25 мл, либо 100 мл глюкозной среды, содержащей канамицин (10 мкг/мл) в 125-мл сосудах для моделирования условий с высоким и низким содержанием кислорода соответственно и аэробно выращивали при 37°C с перемешиванием при 200 об/мин. Среда состояла из 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 5 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0), 100 мМ MOPS/КОН буфера (pH 7,0), 20 мМ глутаминовая кислота/КОН (pH 7,0), 2% смеси металлов S10, 1% глюкозы, 0,01% дрожжевого экстракта, 0,01% казаминовых кислот и 50 мкг/мл каждого из L-триптофана, L-метионина и L-лизина. Смесь металлов S10 состояла из 200 мМ MgCl₂, 70 мМ CaCl₂, 5 мМ MnCl₂, 0,1 мМ FeCl₃, 0,1 мМ ZnCl₂, 0,2 мМ тиамингидрохлорида, 0,172 мМ CuSO₄, 0,253 мМ CoCl₂ и 0,242 мМ Na₂MoO₄. Клетки индуцировали 1,0 мМ изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом (IPTG) в раннюю лог-фазу (ОП₆₀₀ приблизительно 0,2). Через 24 час после инокуляции аликвоту бульона анализировали ВЭЖХ (колонка Shodex Sugar SH1011) с детекцией коэффициента преломления (RI) для определения содержания изобутанола, как описано в разделе «Общие способы». Результаты ВЭЖХ показаны в таблице 12.

Таблица 12			
Продукция изобутанола из глюкозы штаммами <i>B. subtilis</i> BE1010 Δ sacB::PgroE- <i>budB-ilvD-kivD</i> /pBDPgroE- <i>ilvC</i> (B.s.)- <i>bdhB</i>			
Штамм	Уровень O ₂	Изобутанол, мМ	Молярная избирательность, %
<i>B. subtilis</i> a (индуцированный)	высокий	1,00	1,8
<i>B. subtilis</i> b (индуцированный)	высокий	0,87	1,6
<i>B. subtilis</i> a (индуцированный)	низкий	0,06	0,1
<i>B. subtilis</i> b (индуцированный)	низкий	0,14	0,3
<i>B. subtilis</i> a представляет собой <i>B. subtilis</i> BE1010 Δ sacB::PgroE- <i>budB-ilvD-kivD</i> #1-7/pBDPgroE- <i>ilvC</i> (B.s.)- <i>bdhB</i>			
<i>B. subtilis</i> b представляет собой <i>B. subtilis</i> BE1010 Δ sacB::PgroE- <i>budB-ilvD-kivD</i> #8-16/pBDPgroE- <i>ilvC</i> (B.s.)- <i>bdhB</i>			

Изолят *B. subtilis* BE1010 Δ sacB::PgroE-*budB-ilvD-kivD* #1-7/ pBDPgroE-*ilvC*(B.s.)-*bdhB* также проверяли на продукцию изобутанола из сахарозы, по существу как описано выше. Рекомбинантный штамм инокулировали либо в 25 мл, либо 75 мл сахарозной среды, содержащей канамицин (10 мкг/мл) в 125 мл сосудах для моделирования условий с высоким и низким содержанием кислорода и выращивали при 37°C с перемешиванием при 200 об/мин. Сахарозная среда была идентична глюкозной среде за исключением того, что глюкоза (10 г/л) была заменена 10 г/л сахарозы. Клетки либо не индуцировали, либо индуцировали 1,0 мМ изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом (IPTG) в раннюю лог-фазу (ОП₆₀₀ приблизительно 0,2). Через 24 час после инокуляции аликвоту бульона анализировали ВЭЖХ (колонка Shodex Sugar SH1011) с детекцией коэффициента преломления (RI) для

определения содержания изобутанола, как описано в разделе Общие способы. Результаты ВЭЖХ показаны в таблице 13.

Таблица 13			
Продукция изобутанола из сахарозы штаммом <i>B. subtilis</i> BE1010 Δ sacB::PgroE-budB-ilvD-kivD/pBDPgroE-ilvC(B.s.)-bdhB			
Штамм	Уровень O ₂	Изобутанол, мМ	Молярная избирательность, %
<i>B. subtilis</i> a (неиндуцированный)	высокий	Не выявлялся	Не выявлялся
<i>B. subtilis</i> a (индуцированный)	высокий	0,44	4,9
<i>B. subtilis</i> a (индуцированный)	средний	0,83	8,6
<i>B. subtilis</i> a представляет собой <i>B. subtilis</i> BE1010 Δ sacB::PgroE-budB-ilvD-kivD#1-7/pBDPgroE-ilvC(B.s.)-bdhB			

Пример 21 (предсказательный)

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Lactobacillus plantarum*

Цель данного предсказательного примера заключается в описании того, как экспрессировать путь биосинтеза изобутанола в *Lactobacillus plantarum*. Пять генов пути изобутанола, кодирующие пять ферментативных активностей, разделяют на два оперона для экспрессии. Гены *budB*, *ilvD* и *kivD*, кодирующие ферменты ацетолактатсинтазу, дегидратазу ацетогидроксикислоты и декарбоксилазу α -кетокислот с разветвленной цепью соответственно, интегрируют в хромосому *Lactobacillus plantarum* гомологичной рекомбинацией с помощью способа, описанного Hols et al. (Appl. Environ. Microbiol. 60:1401-1413 (1994)). Два остальных гена (*ilvC* и *bdhB*, кодирующие ферменты редуктоизомеразу ацетогидроксикислоты и бутанолдегидрогеназу соответственно) клонируют в экспрессионную плазмиду и трансформируют ей штамм *Lactobacillus*, несущий интегрированные гены изобутанола. *Lactobacillus plantarum* выращивают на среде MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI) при 37°C и хромосомную ДНК выделяют как описано Moreira et al. (BMC Microbiol. 5:15 (2005)).

Интеграция.

Кассеты *budB-ilvD-kivD* под контролем синтетического промотора P11 (Rud et al., Microbiology 152:1011-1019 (2006)) интегрируют в хромосому *Lactobacillus plantarum* ATCC BAA-793 (NCIMB 8826) в локус *IdhL1* гомологичной рекомбинацией. Для создания направляющего вектора интеграции *IdhL* фрагмент ДНК из *Lactobacillus plantarum* (Genbank NC_004567) с гомологией *IdhL* амплифицируют ПЦР с праймерами LDH EcoRV F (SEQ ID NO:161) и LDH AatII R (SEQ ID NO:162). Фрагмент ПЦР 1986 п.н. клонируют в pCR4Blunt-TOPO и секвенируют. Клон pCR4Blunt-TOPO-*IdhL1* гидролизуют EcoRV и AatII с выделением фрагмента 1982 п.н. *IdhL1*, который очищают в геле. Вектор интеграции pFP988, представленный в виде SEQ ID NO:177, гидролизуют HindIII и обрабатывают ДНК-полимеразой Кленова для получения тупых концов. Линеаризованную плазмиду затем гидролизуют AatII и фрагмент вектора 2931 п.н. очищают в геле. Фрагмент EcoRV/AatII *IdhL1* лигируют с фрагментом вектора pFP988 и трансформируют этим клетки *E. coli* Top10. Трансформанты подвергают селекции на чашках агара LB, содержащих ампициллин (100 мкг/мл), и скринингу ПЦР колоний для подтверждения конструкции pFP988-*IdhL*.

Для добавления маркера селекции к интегрируемой ДНК амплифицируют ПЦР ген *Cm* со своим промотором из pC194-(GenBank NC_002013, SEQ ID NO:267) с праймерами *Cm* F (SEQ ID NO:163) и *Cm* R (SEQ ID NO:164), что дает амплифицированный ПЦР продукт 836 п.н. Данный продукт ПЦР клонируют в pCR4Blunt-TOPO и трансформируют ей клетки *E. coli* Top10 с созданием pCR4Blunt-TOPO-*Cm*. После секвенирования для подтверждения того, что ПЦР не внесла

ошибок, кассету Cm гидролизуют из pCR4Blunt-TOPO-Cm в виде фрагмента 828 п.н. MluI/SwaI и очищают в геле. Вектор интеграции pFP988-IdhL, содержащий гомологию IdhL, гидролизуют MluI и SwaI и фрагмент вектора 4740 п.н. очищают в геле. Фрагмент кассеты Cm лигируют с вектором pFP988-IdhL с созданием pFP988-DldhL::Cm.

Наконец, кассету budB-ilvD-kivD из pFP988DssPspac-budB-ilvD-kivD, описанной в примере 20, модифицируют заменой амилазного промотора синтетическим промотором P11. Затем целый оперон перемещают в pFP988-DldhL::Cm.

Промотор P11 строят отжигом олигонуклеотида с праймером P11 F-StuI (SEQ ID NO: 165) и P11 R-SpeI (SEQ ID NO:166). Отожженный олигонуклеотид очищают в 6% геле Ultra PAGE (Embi Tec, San Diego, CA). Плазмиду pFP988DssPspac-budB-ilvD-kivD, содержащую амилазный промотор, гидролизуют StuI и SpeI и полученный фрагмент вектора 10,9 т.п.н. очищают в геле. Выделенный фрагмент P11 лигируют с гидролизованной pFP988DssPspac-budB-ilvD-kivD с созданием pFP988-P11-budB-ilvD-kivD. Плазмиду pFP988-P11-budB-ilvD-kivD затем гидролизуют StuI и BamHI и полученный фрагмент вектора 5,4 т.п.н. P11-budB-ilvD-kivD очищают в геле. pFP988-DldhL::Cm гидролизуют HpaI и BamHI, и фрагмент вектора 5,5 т.п.н. выделяют. Оперон budB-ilvD-kivD лигируют с вектором интеграции pFP988-DldhL::Cm с созданием pFP988-DldhL-P11-budB-ilvD-kivD::Cm.

Интеграция pFP988-DldhL-P11-budB-ilvD-kivD::Cm в *L. plantarum* ВАА-793 с образованием *L. plantarum* ΔIdhL1::budB-ilvD-kivD::Cm, включающей экзогенные гены budB, ilvD и kivD.

Электрокомпетентные клетки *L. plantarum* получают, как описано Aukrust, T.W., et al. (In: Electroporation Protocols for Microorganisms; Nickoloff, J.A., Ed.; Methods in Molecular Biology, Vol. 47; Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 1995, pp 201-208). После электропорации клетки наращивают в среде MRSSM (среда MRS с добавлением 0,5М сахарозы и 0,1М MgCl₂), как описано Aukrust et al., выше, в течение 2 час при 37°C без перемешивания. Электропорированные клетки высевают для селекции на чашки MRS, содержащие хлорамфеникол (10 мкг/мл) и инкубируют при 37°C. Трансформанты сначала подвергают скринингу амплификацией ПЦР колоний для подтверждения интеграции и исходно позитивные клоны подвергают затем более тщательному скринингу амплификацией ПЦР с набором праймеров.

Плазмидная экспрессия генов ilvC и bdhB.

Остальные два гена изобутанола экспрессируют с плазмиды pTRKH3 (O'Sullivan DJ and Klaenhammer TR, Gene 137:227-231 (1993)) под контролем промотора IdhL *L. plantarum* (Ferain et al., J. Bacteriol. 176:596-601 (1994)). Промотор IdhL амплифицируют ПЦР с генома *L. plantarum* ATCC ВАА-793 с использованием праймеров PldhL F-HindIII (SEQ ID NO:167) и PldhL R-BamHI (SEQ ID NO:168). Продукт ПЦР 411 п.н. клонируют в pCR4Blunt-TOPO и секвенируют. Полученную плазмиду pCR4Blunt-TOPO-PldhL гидролизуют HindIII и BamHI с выделением фрагмента PldhL.

Плазмиду pTRKH3 гидролизуют HindIII и SphI и очищенный в геле фрагмент вектора лигируют с фрагментом PldhL и очищенным в геле фрагментом 2,4 т.п.н. BamHI/SphI, содержащим ilvC(B.s.)-bdhB из экспрессионной плазмиды *Bacillus* pBDPgroE-ilvC(B.s.)-bdhB (пример 20) трехсторонним лигированием. Смесь лигирования трансформируют клетки *E. coli* Top 10 и трансформанты выращивают на чашках Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI), содержащих эритромицин (150 мг/л). Трансформанты подвергают скринингу ПЦР для подтверждения конструкции. Полученной экспрессионной плазмидой pTRKH3-

ilvC(B.s.)-bdhB трансформируют *L. plantarum* Δ ldhL1::budB-ilvD-kivD::Cm электропорацией, как описано выше.

L. plantarum Δ ldhL1::budB-ilvD-kivD::Cm, содержащую pTRKH3-ilvC(B.s.)-bdhB, инокулируют в 250 мл перемешиваемый сосуд, содержащий 50 мл среды MRS плюс эритромицин (10 мкг/мл), и выращивают при 37°C в течение от 18 до 24 час без перемешивания, после чего определяют изобутанол с помощью анализа ВЭЖХ или ГХ, как описано в разделе «Общие способы».

Пример 22 (предсказательный)

Экспрессия пути биосинтеза изобутанола в *Enterococcus faecalis*

Цель данного предсказательного примера заключается в описании того, как экспрессировать путь биосинтеза изобутанола в *Enterococcus faecalis*. Полная геномная последовательность штамма V583 *Enterococcus faecalis*, который используют в качестве штамма-хозяина для экспрессии пути биосинтеза изобутанола в данном примере, была опубликована (Paulsen et al., Science 299:2071-2074 (2003)). Челночный вектор *E. coli*-грамположительные бактерии, плазмиду pTRKH3 (O'Sullivan DJ and Klaenhammer TR, Gene 137:227-231 (1993)) используют для экспрессии пяти генов (budB, ilvC, ilvD, kivD, bdhB) пути изобутанола в одном опероне. pTRKH3 содержит *E. coli* плазмидный p15A ориджин репликации, репликон pAM β 1 и два маркера селекции по устойчивости к антибиотикам тетрациклину и эритромицину. Устойчивость к тетрациклину экспрессируется только в *E. coli*, а устойчивость к эритромицину экспрессируется и в *E. coli*, и в грамположительных бактериях. Производные плазмиды pAM β 1 способны реплицироваться в *E. faecalis* (Poyart et al., FEMS Microbiol. Lett. 156:193-198 (1997)). Индуцируемый промотор nisA (PnisA), который ранее использовался для эффективного контроля экспрессии генов нисином во многих грамположительных бактериях, включая *Enterococcus faecalis* (Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:2763-2769 (1998)), применяют для контроля экспрессии пяти желаемых генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза изобутанола.

Плазмиду pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD (описанную в примере 14), которая содержит оперон пути изобутанола, модифицируют заменой гена ilvC *E. coli* (SEQ ID NO:3) геном ilvC *B. subtilis* (SEQ ID NO:??). Кроме того, к концу оперона добавляют ген bdhB (SEQ ID NO:158) из *Clostridium acetobutylicum*. Сначала ген bdhB из pBDPgroE-ilvC(B.s.)-bdhB (описанной в примере 20) амплифицируют с помощью праймеров F-bdhB-AvrII (SEQ ID NO:169) и R-bdhB-BamHI (SEQ ID NO:170) и затем клонируют ТОРО и секвенируют. Выделяют фрагмент 1194 п.н. bdhB гидролизом AvrII и BamHI и затем очищают в геле. Этот фрагмент bdhB лигируют с pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD, которую предварительно гидролизовали AvrII и BamHI, и полученный фрагмент очищают в геле. Смесь лигирования трансформируют клетки *E. coli* Top10 путем электропорации и трансформанты подвергают селекции выращиванием в течение ночи при 37°C на чашках агара LB, содержащих ампициллин (100 мкг/мл). Трансформанты затем подвергают скринингу ПЦР колоний для подтверждения правильного клона, содержащего pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-bdhB.

Затем ilvC(B.s.) амплифицируют с pBDPgroE-ilvC(B.s.)-bdhB (описанной в примере 20) с использованием праймеров F-ilvC(B.s.)-AflIII (SEQ ID NO:171) и R-ilvC(B.s.)-NotI (SEQ ID NO:172). Продукт ПЦР клонируют ТОРО и секвенируют. Фрагмент 1051 п.н. ilvC(B.s.) выделяют гидролизом AflIII и NotI и затем очищают в геле. Данный фрагмент лигируют с pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-bdhB, которую предварительно разрезали AflIII и NotI с выделением ilvC *E. coli* (полосу вектора 10,7

т.п.н. очищают перед лигированием с *ilvC*(B.s.)). Смесью лигирования трансформируют клетки *E. coli* Top10 электропорацией, и трансформанты подвергают селекции выращиванием в течение ночи при 37°C на чашках агара LB, содержащих ампициллин (100 мкг/мл). Трансформанты затем подвергают скринингу ПЦР колоний для подтверждения правильного клона, содержащего *pTrc99A::budB-ilvC*(B.s.)-*ilvD-kivD-bdhB*.

Для получения промотора для челночного вектора DTRKH3 *E. coli*/грамположительные бактерии промотор *nisA* (Chandrapati et al., Mol. Microbiol. 46(2): 467-477 (2002)) амплифицируют ПЦР с геномной ДНК *Lactococcus lactis* с праймерами F-P*nisA*(HindIII) (SEQ ID NO:173) и R-P*nisA*(SpeI BamHI) SEQ ID NO:174) и затем клонируют ТОРО. После секвенирования выделяют фрагмент 213 п.н. промотора *nisA* гидролизом HindIII и BamHI с последующее очисткой в геле. Плазмиду pTRKH3 гидролизуют HindIII и BamHI и фрагмент вектора очищают в геле. Линеаризованную pTRKH3 лигируют с фрагментом P*nisA* и трансформируют этим клетки *E. coli* Top10 электропорацией. Трансформанты подвергают селекции выращиванием в течение ночи при 37°C на чашках агара LB, содержащих эритромицин (25 мкг/мл). Трансформанты затем подвергают скринингу ПЦР колоний для подтверждения правильного клона pTRKH3-P*nisA*.

Плазмиду pTRKH3-P*nisA* гидролизуют SpeI и BamHI и вектор очищают в геле. Плазмиду pTrc99A::*budB-ilvC*(B.s.)-*ilvD-kivD-bdhB*, описанную выше, гидролизуют SpeI и BamHI и фрагмент 7,5 т.п.н. очищают в геле. Фрагмент 7,5 т.п.н. *budB-ilvC*(B.s.)-*ilvD-kivD-bdhB* лигируют в вектор pTRKH3-P*nisA* по сайтам SpeI и BamHI. Смесью лигирования трансформируют клетки *E. coli* Top10 электропорацией и трансформанты подвергают селекции выращиванием в течение ночи на чашках агара LB, содержащих эритромицин (25 мкг/мл) при 37°C. Трансформанты затем подвергают скринингу ПЦР колоний. Полученная плазида названа pTRKH3-P*nisA-budB-ilvC*(B.s.)-*ilvD-kivD-bdhB*. Данную плазмиду получают из трансформантов *E. coli* и трансформируют ей электрокомпетентные клетки *E. faecalis* V583 электропорацией с помощью способов, известных в данной области техники (Aukrust, T.W., et al. In: Electroporation Protocols for Microorganisms; Nickoloff, J.A., Ed.; Methods in Molecular Biology, Vol. 47; Humana Press, Inc., Totowa, NJ., 1995, pp 217-226), что дает *E. faecalis* V583/ pTRKH3-P*nisA-budB-ilvC*(B.s.)-*ilvD-kivD-bdhB*.

Второй плазмидой, содержащей регуляторные гены *nisA*, *nisR* и *nisK*, ген *add9* резистентности к спектиномицину и ориджин репликации pSH71, трансформируют *E. faecalis* V583/ pTRKH3-P*nisA-budB-ilvC*(B.s.)-*ilvD-kivD-bdhB* электропорацией.

Плазида, содержащая ориджин репликации pSH71, совместима с производными pAMβ1 в *E. faecalis* (Eichenbaum et al., выше). Трансформанты, резистентные к двум лекарствам, отбирают на чашках агара LB, содержащих эритромицин (25 мкг/мл) и спектиномицин (100 мкг/мл), выращиваемых при 37°C.

Полученный штамм V583B *E. faecalis*, несущий две плазмиды, т.е. экспрессионную плазмиду (pTRKH3-P*nisA-budB-ilvC*(B.s.)-*ilvD-kivD-bdhB*) и регуляторную плазмиду (pSH71-*nisRK*), инокулируют в 250-мл встряхиваемый сосуд, содержащий 50 мл бульона Тодда-Хьюитта с добавлением дрожжевого экстракта (0,2%), (Fischetti et al., J. Exp. Med. 161:1384-1401 (1985)), нисина (20 мкг/мл) (Eichenbaum et al., выше), эритромицина (25 мкг/мл) и спектиномицина (100 мкг/мл). Сосуд инкубируют без перемешивания при 37°C в течение 18-24 час, после чего измеряют продукцию изобутанола анализом ВЭЖХ или ГХ, как описано в разделе «Общие способы».

Формула изобретения

1. Рекомбинантная микробная клетка-хозяин, содержащая ферментативный путь изобутанола, включающий молекулы ДНК, кодирующие набор полипептидов, которые катализируют следующие превращения субстрата в продукт:

- i) пирувата в ацетолактат;
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат;
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат;
- iv) α -кетоизовалерата в изобутиральдегид; и
- v) изобутиральдегида в изобутанол,

где по меньшей мере одна из молекул ДНК гетерологична указанной микробной клетке-хозяину, и где указанная микробная клетка-хозяин продуцирует изобутанол.

2. Клетка-хозяин по п.1, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, пирувата в ацетолактат, представляет собой ацетолактатсинтазу.

3. Клетка-хозяин по п.1, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, представляет собой изомероредуктазу ацетогидроксикислоты.

4. Клетка-хозяин по п.1, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат, представляет собой дегидратазу ацетогидроксикислоты.

5. Клетка-хозяин по п.1, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, изобутиральдегида в изобутанол, представляет собой дегидрогеназу спиртов с разветвленной цепью.

6. Клетка-хозяин по п.1, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, α -кетоизовалерата в изобутиральдегид, представляет собой декарбоксилазу α -кетокислот с разветвленной цепью.

7. Клетка-хозяин по п.1, где клетка выбрана из группы, состоящей из бактерии, цианобактерии, нитчатого гриба и дрожжей.

8. Клетка-хозяин по п.7, где клетка является членом рода, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* и *Saccharomyces*.

9. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Escherichia coli*.

10. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Alcaligenes eutrophus*.

11. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Bacillus licheniformis*.

12. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Paenibacillus macerans*.

13. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Rhodococcus erythropolis*.

14. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Pseudomonas putida*.

15. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Bacillus subtilis*.

16. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Lactobacillus plantarum*.

17. Клетка-хозяин по п.8, где клетка выбрана из группы, состоящей из *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus faecalis*.

18. Клетка-хозяин по п.8, где клетка представляет собой *Saccharomyces cerevisiae*.

19. Клетка-хозяин по п.2, где ацетолактатсинтаза имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:178 и SEQ ID NO:180.

20. Клетка-хозяин по п.3, где изомероредуктаза ацетогидроксикислоты имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO:43, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:183 и SEQ ID NO:185.

21. Клетка-хозяин по п.4, где дегидратаза ацетогидроксикислоты имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:188 и SEQ ID NO:190.

22. Клетка-хозяин по п.5, где дегидрогеназа спиртов с разветвленной цепью имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:203 и SEQ ID NO:204.

23. Клетка-хозяин по п.6, где декарбоксилаза α -кетокислот с разветвленной цепью имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:195 и SEQ ID NO:197.

24. Клетка-хозяин по п.1, где клетка-хозяин представляет собой факультативный анаэроб.

25. Способ получения изобутанола, включающий

1) получение рекомбинантной микробной клетки-хозяина, содержащей ферментативный путь изобутанола, включающий молекулы ДНК, кодирующие набор полипептидов, которые катализируют следующие превращения субстрата в продукт:

- i) пирувата в ацетолактат;
- ii) ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат;
- iii) 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат;
- iv) α -кетоизовалерата в изобутиральдегид; и
- v) изобутиральдегида в изобутанол,

где по меньшей мере одна из молекул ДНК гетерологична указанной микробной клетке-хозяину; и

2) контактирование клетки-хозяина (1) с ферментируемым углеродным субстратом в среде ферментации в условиях, при которых продуцируется изобутанол.

26. Способ по п.25, где ферментируемый углеродный субстрат выбран из группы, состоящей из моносахаридов, олигосахаридов и полисахаридов.

27. Способ по п.25, где углеродный субстрат выбран из группы, состоящей из глюкозы, сахарозы и фруктозы.

28. Способ по п.25, где условия, при которых продуцируется изобутанол, являются анаэробными.

29. Способ по п.25, где условия, при которых продуцируется изобутанол, являются микроаэробными.

30. Способ по п.25, где клетка-хозяин контактирует с углеродным субстратом в минимальной среде.

31. Способ по п.25, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, пирувата в ацетолактат, представляет собой ацетолактатсинтазу.

32. Способ по п.25, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, ацетолактата в 2,3-дигидроксиизовалерат, представляет собой изомероредуктазу ацетогидроксикислоты.

33. Способ по п.25, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, 2,3-дигидроксиизовалерата в α -кетоизовалерат, представляет собой дегидратазу ацетогидроксикислоты.

34. Способ по п.25, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, изобутиральдегида в изобутанол, представляет собой дегидрогеназу спиртов с разветвленной цепью.

35. Способ по п.25, где полипептид, который катализирует превращение субстрата в продукт, α -кетоизовалерата в изобутиральдегид, представляет собой декарбоксилазу α -кетокилот с разветвленной цепью.

36. Способ по п.25, где клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактерии, цианобактерии, нитчатого гриба и дрожжей.

37. Способ по п.36, где клетка-хозяин является членом рода, выбранного из группы, состоящей из *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* и *Saccharomyces*.

38. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Escherichia coli*.

39. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Alcaligenes eutrophus*.

40. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Bacillus licheniformis*.

41. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Paenibacillus macerans*.

42. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Rhodococcus erythropolis*.

43. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Pseudomonas putida*.

44. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Bacillus subtilis*.

45. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Lactobacillus plantarum*.

46. Способ по п.37, где клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus faecalis*.

47. Способ по п.37, где клетка-хозяин представляет собой *Saccharomyces cerevisiae*.

48. Способ по п.31, где ацетолактатсинтаза имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:178 и SEQ ID NO:180.

49. Способ по п.32, где изомероредуктаза ацетогидроксикислоты имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:183 и SEQ ID NO:185.

50. Способ по п.33, где дегидратаза ацетогидроксикислоты имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:188 и SEQ ID NO:190.

51. Способ по п.34, где дегидрогеназа спиртов с разветвленной цепью имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:203 и SEQ ID NO:204.

52. Способ по п.35, где декарбоксилаза α -кетокилот с разветвленной цепью имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:195 и SEQ ID NO:197.

53. Способ по п.25, где клетка-хозяин представляет собой факультативный анаэроб.

54. Содержащая изобутанол среда ферментации, полученная способом по п.25.

Перечень последовательностей

<110> E.I. du Pont de Nemours and Co.

<120> Ферментативное получение четырехуглеродных спиртов

<130> CL3243 РСТ

<160> 267

<170> Патент в версии 3.3

<210> 1

<211> 1680

<212> ДНК

<213> K. pneumoniae

<400> 1

```

atggacaaac agtatccggt acgccagtg ggcacggcg ccgatctcgt cgtcagtcag      60
ctggaagctc agggagtacg ccagggtgttc ggcattcccc gcgcaaaat cgacaaggtc      120
tttgattcac tgctggattc ctccattcgc attattccgg tacgccacga agccaacgcc      180
gcatttatgg ccgccgccgt cggacgcatt accggcaaag cgggcgtggc gctggtcacc      240
tccggtccgg gctgttccaa cctgatcacc ggcattggcca ccgcgaacag cgaaggcgac      300
ccggtggtgg ccctgggcgg cgcggtaaaa cgcccgata aagcgaagca ggtccaccag      360
agtatggata cgggtggcgt gttcagcccg gtcaccaaat acgccatcga ggtgacggcg      420
ccggatgcgc tggcgaagt ggtctccaac gccttcgcg ccgccgagca gggccggccg      480
ggcagcgcgt tcgttagcct gccgcaggat gtggtcgatg gcccggtcag cggcaaagtg      540
ctgccggcca gcggggcccc gcagatgggc gccgcgccgg atgatgccat cgaccagggtg      600
gcgaagctta tcgccaggc gaagaaccgg atcttcctgc tcggcctgat ggccagccag      660
ccggaaaaca gcaaggcgct gcgccgtttg ctggagacca gccatattcc agtcaccagc      720
acctatcagg ccgccggagc ggtgaatcag gataacttct ctgcttcgc cggccgggtt      780
gggctgttta acaaccaggc cggggaccgt ctgctgcagc tcgccgacct ggtgatctgc      840
atcggctaca gcccggtgga atacgaaccg gcgatgtgga acagcggcaa cgcgacgctg      900
gtgcacatcg acgtgctgcc cgcctatgaa gagcgcaact acaccccgga tgtcgagctg      960
gtgggcgata tcgccggcac tctcaacaag ctggcgcaaa atatcgatca tcgggtggtg     1020
ctctccccgc aggcggcgga gatctccgc gaccgccagc accagcgcga gctgctggac     1080
cgccgcggcg cgcagctcaa ccagtttgcc ctgcatcccc tgcgcatcgt tcgcgccatg     1140
caggatatcg tcaacagcga cgtcacgttg accgtggaca tgggcagctt ccatatctgg     1200
attgcccgtt acctgtacac gtccgcgcc cgtcagggtga tgatctcaa cggccagcag     1260
accatgggcg tcgccctgcc ctgggctatc ggcgcctggc tggatcaatc tgagcgcaaa     1320
gtggtctccg tctccggcga cggcggttc ctgcagtcga gcatggagct ggagaccgcc     1380
gtccgcctga aagccaacgt gctgcatctt atctgggtcg ataacggcta caacatggtc     1440

```

gctatccagg aagagaaaaa atatcagcgc ctgtccggcg tcgagtttgg gccgatggat 1500
 tttaaagcct atgccgaatc cttcggcgcg aaagggtttg ccgtggaaag cgccgaggcg 1560
 ctggagccga ccctgcgcgc ggcgatggac gtcgacggcc cggcggtagt ggccatcccg 1620
 gtggattatc gcgataaccc gctgctgatg ggccagctgc atctgagtca gattctgtaa 1680

<210> 2
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> K. pneumoniae

<400> 2

Met Asp Lys Gln Tyr Pro Val Arg Gln Trp Ala His Gly Ala Asp Leu
 1 5 10 15

Val Val Ser Gln Leu Glu Ala Gln Gly Val Arg Gln Val Phe Gly Ile
 20 25 30

Pro Gly Ala Lys Ile Asp Lys Val Phe Asp Ser Leu Leu Asp Ser Ser
 35 40 45

Ile Arg Ile Ile Pro Val Arg His Glu Ala Asn Ala Ala Phe Met Ala
 50 55 60

Ala Ala Val Gly Arg Ile Thr Gly Lys Ala Gly Val Ala Leu Val Thr
 65 70 75 80

Ser Gly Pro Gly Cys Ser Asn Leu Ile Thr Gly Met Ala Thr Ala Asn
 85 90 95

Ser Glu Gly Asp Pro Val Val Ala Leu Gly Gly Ala Val Lys Arg Ala
 100 105 110

Asp Lys Ala Lys Gln Val His Gln Ser Met Asp Thr Val Ala Met Phe
 115 120 125

Ser Pro Val Thr Lys Tyr Ala Ile Glu Val Thr Ala Pro Asp Ala Leu
 130 135 140

Ala Glu Val Val Ser Asn Ala Phe Arg Ala Ala Glu Gln Gly Arg Pro
 145 150 155 160

Gly Ser Ala Phe Val Ser Leu Pro Gln Asp Val Val Asp Gly Pro Val
 165 170 175

Ser Gly Lys Val Leu Pro Ala Ser Gly Ala Pro Gln Met Gly Ala Ala
 180 185 190

Pro Asp Asp Ala Ile Asp Gln Val Ala Lys Leu Ile Ala Gln Ala Lys
 195 200 205

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

Ala Ile Gln Glu Glu Lys Lys Tyr Gln Arg Leu Ser Gly Val Glu Phe
485 490 495

Gly Pro Met Asp Phe Lys Ala Tyr Ala Glu Ser Phe Gly Ala Lys Gly
500 505 510

Phe Ala Val Glu Ser Ala Glu Ala Leu Glu Pro Thr Leu Arg Ala Ala
515 520 525

Met Asp Val Asp Gly Pro Ala Val Val Ala Ile Pro Val Asp Tyr Arg
530 535 540

Asp Asn Pro Leu Leu Met Gly Gln Leu His Leu Ser Gln Ile Leu
545 550 555

<210> 3
<211> 1476
<212> ДНК
<213> E. coli

<400> 3
atggctaact acttcaatac actgaatctg cgccagcagc tggcacagct gggcaaatgt 60
cgctttatgg gccgcgatga attcgccgat ggcgcgagct accttcaggg taaaaaagta 120
gtcatcgtcg gctgtggcgc acaggggtctg aaccagggcc tgaacatgcg tgattctggt 180
ctcgatatct cctacgctct gcgtaaagaa gcgattgccg agaagcgcgc gtcctggcgt 240
aaagcgaccg aaaatgggtt taaagtgggt acttacgaag aactgatccc acaggcggat 300
ctggtgatta acctgacgcc ggacaagcag cactctgatg tagtgcgac cgtacagcca 360
ctgatgaaag acggcgcggc gctgggttac tcgcacgggt tcaacatcgt cgaagtgggc 420
gagcagatcc gtaaagatat caccgtagtg atggttgccg cgaaatgccc aggcaccgaa 480
gtgcgtgaag agtacaaacg tgggttcggc gtaccgacgc tgattgccgt tcaccgggaa 540
aacgatccga aaggcgaagg catggcgatt gccaaagcct gggcggctgc aaccggtggt 600
caccgtgcgg gtgtgctgga atcgtccttc gttgcggaag tgaaatctga cctgatgggc 660
gagcaaacca tcctgtgcgg tatgttgagc gctggctctc tgctgtgctt cgacaagctg 720
gtggaagaag gtaccgatcc agcatagca gaaaaactga ttcagttcgg ttgggaaacc 780
atcaccgaag cactgaaaca gggcggcatc accctgatga tggaccgtct ctctaaccgc 840
gcgaaactgc gtgcttatgc gctttctgaa cagctgaaag agatcatggc acccctgttc 900
cagaaacata tggacgacat catctccggc gaattctctt ccggtatgat ggcggactgg 960
gccaacgatg ataagaaact gctgacctgg cgtgaagaga ccggcaaac cgcgtttgaa 1020
accgcgccgc agtatgaagg caaaatcggc gagcaggagt acttcgataa aggcgtactg 1080
atgattgcga tggtgaaagc gggcgttgaa ctggcgttcg aaaccatggg cgattccggc 1140
atcattgaag agtctgcata ttatgaatca ctgcacgagc tgccgctgat tgccaacacc 1200

atcgcccgta agcgtctgta cgaaatgaac gtggttatct ctgataccgc tgagtacggt 1260
 aactatctgt tctcttacgc ttgtgtgccg ttgctgaaac cgtttatggc agagctgcaa 1320
 ccgggcgacc tgggtaaagc tattccggaa ggcgcggtag ataacgggca actgcgtgat 1380
 gtgaacgaag cgattcgcag ccatgcgatt gagcaggtag gtaagaaact gcgcggctat 1440
 atgacagata tgaaacgtat tgctgttgcg ggttaa 1476

<210> 4
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> E. coli

<400> 4

Met Ala Asn Tyr Phe Asn Thr Leu Asn Leu Arg Gln Gln Leu Ala Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Cys Arg Phe Met Gly Arg Asp Glu Phe Ala Asp Gly Ala
 20 25 30

Ser Tyr Leu Gln Gly Lys Lys Val Val Ile Val Gly Cys Gly Ala Gln
 35 40 45

Gly Leu Asn Gln Gly Leu Asn Met Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ser
 50 55 60

Tyr Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ile Ala Glu Lys Arg Ala Ser Trp Arg
 65 70 75 80

Lys Ala Thr Glu Asn Gly Phe Lys Val Gly Thr Tyr Glu Glu Leu Ile
 85 90 95

Pro Gln Ala Asp Leu Val Ile Asn Leu Thr Pro Asp Lys Gln His Ser
 100 105 110

Asp Val Val Arg Thr Val Gln Pro Leu Met Lys Asp Gly Ala Ala Leu
 115 120 125

Gly Tyr Ser His Gly Phe Asn Ile Val Glu Val Gly Glu Gln Ile Arg
 130 135 140

Lys Asp Ile Thr Val Val Met Val Ala Pro Lys Cys Pro Gly Thr Glu
 145 150 155 160

Val Arg Glu Glu Tyr Lys Arg Gly Phe Gly Val Pro Thr Leu Ile Ala
 165 170 175

Val His Pro Glu Asn Asp Pro Lys Gly Glu Gly Met Ala Ile Ala Lys
 180 185 190

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

Ile Arg Ser His Ala Ile Glu Gln Val Gly Lys Lys Leu Arg Gly Tyr
 465 470 475 480

Met Thr Asp Met Lys Arg Ile Ala Val Ala Gly
 485 490

<210> 5
 <211> 1851
 <212> ДНК
 <213> E. coli

<400> 5
 atgcctaagt accgttccgc caccaccact catggtcgtg atatggcggg tgctcgtgcg 60
 ctgtggcgcg ccaccggaat gaccgacgcc gatttcggta agccgattat cgcggttgtg 120
 aactcgttca cccaatttgt accgggtcac gtccatctgc gcgatctcgg taaactggtc 180
 gccgaacaaa ttgaagcggc tggcggcgtt gccaaagagt tcaacaccat tgcggtggat 240
 gatgggattg ccatgggcca cggggggatg ctttattcac tgccatctcg cgaactgac 300
 gctgattccg ttgagtatat ggtcaacgcc cactgcgccg acgccatggt ctgcatctct 360
 aactgcgaca aaatcacccc ggggatgctg atggcttccc tgcgcctgaa tattccggtg 420
 atctttgttt ccggcgcccc gatggaggcc gggaaaacca aactttccga tcagatcatc 480
 aagctcgatc tggttgatgc gatgatccag ggcgcagacc cgaaagtatc tgactcccag 540
 agcgatcagg ttgaacgttc cgcgtgtccg acctgcggtt cctgctccgg gatgtttacc 600
 gctaactcaa tgaactgcct gaccgaagcg ctgggcctgt cgcagccggg caacggctcg 660
 ctgctggcaa cccacgccga ccgtaagcag ctgttcctta atgctggtaa acgcattgtt 720
 gaattgacca aacgttatta cgagcaaac gacgaaagt cactgccgcg taatatcgcc 780
 agtaaggcgg cgtttgaaaa cgccatgacg ctggatatcg cgatgggtgg atcgactaac 840
 accgtacttc acctgctggc ggcggcgcag gaagcggaaa tcgacttcac catgagtgat 900
 atcgataagc tttcccga caa ggttccacag ctgtgtaaag ttgcgccgag caccagaaa 960
 taccatatgg aagatgttca ccgtgctggg ggtgttatcg gtattctcgg cgaactggat 1020
 cgcgcggggg tactgaaccg tgatgtgaaa aacgtacttg gcctgacgtt gccgcaaacg 1080
 ctggaacaat acgacgttat gctgacctag gatgacgcgg taaaaaatat gttccgcgca 1140
 ggtcctgcag gcattcgtac cacacaggca ttctcgcaag attgccgttg ggatacgtg 1200
 gacgacgatc gcgccaatgg ctgtatccgc tcgctggaac acgcctacag caaagacggc 1260
 ggcctggcgg tgctctacgg taactttgcg gaaaacggct gcatcgtgaa aacggcaggc 1320
 gtcgatgaca gcatcctcaa attcaccggc ccggcgaaag tgtacgaaag ccaggacgat 1380
 gcggtagaag cgattctcgg cggtaaagtt gtcgccggag atgtggtagt aattcgctat 1440
 gaaggcccga aaggcgggtc ggggatgcag gaaatgctct acccaaccag cttcctgaaa 1500
 tcaatgggtc tcggcaaagc ctgtgcgctg atcaccgacg gtcgtttctc tggtggcacc 1560

tctggtcttt ccacggcca cgtctcaccg gaagcggcaa gcggcggcag cattggcctg 1620
 attgaagatg gtgacctgat cgctatcgac atcccgaacc gtggcattca gttacaggta 1680
 agcgatgccg aactggcggc gcgtcgtgaa gcgcaggacg ctcgaggtga caaagcctgg 1740
 acgccgaaaa atcgtgaacg tcaggtctcc tttgccctgc gtgcttatgc cagcctggca 1800
 accagcgccg acaaaggcgc ggtgcgcgat aaatcgaaac tgggggggta a 1851

<210> 6
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> E. coli

<400> 6

Met Pro Lys Tyr Arg Ser Ala Thr Thr Thr His Gly Arg Asn Met Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Met Thr Asp Ala Asp Phe
 20 25 30

Gly Lys Pro Ile Ile Ala Val Val Asn Ser Phe Thr Gln Phe Val Pro
 35 40 45

Gly His Val His Leu Arg Asp Leu Gly Lys Leu Val Ala Glu Gln Ile
 50 55 60

Glu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Glu Phe Asn Thr Ile Ala Val Asp
 65 70 75 80

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

Arg Glu Leu Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Cys
 100 105 110

Ala Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly
 115 120 125

Met Leu Met Ala Ser Leu Arg Leu Asn Ile Pro Val Ile Phe Val Ser
 130 135 140

Gly Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Thr Lys Leu Ser Asp Gln Ile Ile
 145 150 155 160

Lys Leu Asp Leu Val Asp Ala Met Ile Gln Gly Ala Asp Pro Lys Val
 165 170 175

Ser Asp Ser Gln Ser Asp Gln Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr Cys
 180 185 190

Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu Thr

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

Ile Leu Gly Gly Lys Val Val Ala Gly Asp Val Val Val Ile Arg Tyr
 465 470 475 480

Glu Gly Pro Lys Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu Tyr Pro Thr
 485 490 495

Ser Phe Leu Lys Ser Met Gly Leu Gly Lys Ala Cys Ala Leu Ile Thr
 500 505 510

Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser Ile Gly His Val
 515 520 525

Ser Pro Glu Ala Ala Ser Gly Gly Ser Ile Gly Leu Ile Glu Asp Gly
 530 535 540

Asp Leu Ile Ala Ile Asp Ile Pro Asn Arg Gly Ile Gln Leu Gln Val
 545 550 555 560

Ser Asp Ala Glu Leu Ala Ala Arg Arg Glu Ala Gln Asp Ala Arg Gly
 565 570 575

Asp Lys Ala Trp Thr Pro Lys Asn Arg Glu Arg Gln Val Ser Phe Ala
 580 585 590

Leu Arg Ala Tyr Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val
 595 600 605

Arg Asp Lys Ser Lys Leu Gly Gly
 610 615

<210> 7
 <211> 1662
 <212> ДНК
 <213> Lactococcus lactis

<400> 7
 tctagacata tgtatactgt gggggattac ctgctggatc gcctgcacga actggggatt 60
 gaagaaattt tcggtgtgcc aggcgattat aacctgcagt tcctggacca gattatctcg 120
 cacaaagata tgaagtgggt cggtaacgcc aacgaactga acgcgagcta tatggcagat 180
 ggttatgccc gtacaaaaaa agctgctgcg tttctgacga cctttggcgt tggcgaactg 240
 agcgccgtca acggactggc aggaagctac gccgagaacc tgccagttgt cgaaattgtt 300
 gggctgccta cttctaaggt tcagaatgaa ggcaaatttg tgcaccatac tctggctgat 360
 ggggatttta aacattttat gaaaatgcat gaaccggtta ctgcggcccc cactgctgctg 420
 acagcagaga atgctacggt tgagatcgac cgcgtcctgt ctgcgctgct gaaagagcgc 480
 aagccggtat atatcaatct gcctgtcgat gttgccgcag cgaaagccga aaagccgtcg 540
 ctgccactga aaaaagaaaa cagcacctcc aatacatcgg accaggaaat tctgaataaa 600
 atccaggaat cactgaagaa tgcgaagaaa ccgatcgtca tcaccggaca tgagatcatc 660

tcttttggcc tggaaaaaac ggtcacgcag ttcatttcta agaccaaact gcctatcacc 720
 accctgaact tcggcaaata tagcgtcgat gaagcgctgc cgagttttct gggatatctat 780
 aatgggtaccc tgccgaacc gaacctgaaa gaattcgctc aaagcgcgga ctttatcctg 840
 atgctgggcg tgaaactgac ggatagctcc acaggcgcat ttaccaccca tctgaacgag 900
 aataaaatga tttccctgaa tatcgacgaa ggcaaaatct ttaacgagcg catccagaac 960
 ttcgattttg aatctctgat tagttcgctg ctggatctgt ccgaaattga gtataaagg 1020
 aaatatattg ataaaaaaca ggaggatttt gtgccgtcta atgcgctgct gattcaggat 1080
 cgtctgtggc aagccgtaga aaacctgaca cagtctaata aaacgattgt tgcggaacag 1140
 ggaacttcat ttttcggcgc ctcatccatt tttctgaaat ccaaaagcca tttcattggc 1200
 caaccgctgt ggggggagat tgggtataacc tttccggcgg cgctgggttc acagattgca 1260
 gataaggaat cacgccatct gctgtttatt ggtgacggca gcctgcagct gactgtccag 1320
 gaactggggc tggcgatccg tgaaaaaatc aatccgattt gctttatcat caataacgac 1380
 ggctacaccg tcgaacgcga aattcatgga ccgaatcaaa gttacaatga catcccgatg 1440
 tggaactata gcaaactgcc ggaatccttt ggcgcgacag aggatcgctg ggtgagtaaa 1500
 attgtgcgta cggaaaacga atttgtgtcg gttatgaaag aagcgagggc tgacccgaat 1560
 cgcattgatt ggattgaact gatcctggca aaagaaggcg caccgaaagt tctgaaaaag 1620
 atggggaaac tgtttgcgga gcaaaataaa agctaaggat cc 1662

<210> 8
 <211> 548
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

<400> 8

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1 5 10 15

Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
20 25 30

Asp Gln Ile Ile Ser His Lys Asp Met Lys Trp Val Gly Asn Ala Asn
35 40 45

Glu Leu Asn Ala Ser Tyr Met Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Thr Lys Lys
50 55 60

Ala Ala Ala Phe Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Val
65 70 75 80

Asn Gly Leu Ala Gly Ser Tyr Ala Glu Asn Leu Pro Val Val Glu Ile
85 90 95

Val Gly Ser Pro Thr Ser Lys Val Gln Asn Glu Gly Lys Phe Val His
 100 105 110
 His Thr Leu Ala Asp Gly Asp Phe Lys His Phe Met Lys Met His Glu
 115 120 125
 Pro Val Thr Ala Ala Arg Thr Leu Leu Thr Ala Glu Asn Ala Thr Val
 130 135 140
 Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Ala Leu Leu Lys Glu Arg Lys Pro Val
 145 150 155 160
 Tyr Ile Asn Leu Pro Val Asp Val Ala Ala Ala Lys Ala Glu Lys Pro
 165 170 175
 Ser Leu Pro Leu Lys Lys Glu Asn Ser Thr Ser Asn Thr Ser Asp Gln
 180 185 190
 Glu Ile Leu Asn Lys Ile Gln Glu Ser Leu Lys Asn Ala Lys Lys Pro
 195 200 205
 Ile Val Ile Thr Gly His Glu Ile Ile Ser Phe Gly Leu Glu Lys Thr
 210 215 220
 Val Thr Gln Phe Ile Ser Lys Thr Lys Leu Pro Ile Thr Thr Leu Asn
 225 230 235 240
 Phe Gly Lys Ser Ser Val Asp Glu Ala Leu Pro Ser Phe Leu Gly Ile
 245 250 255
 Tyr Asn Gly Thr Leu Ser Glu Pro Asn Leu Lys Glu Phe Val Glu Ser
 260 265 270
 Ala Asp Phe Ile Leu Met Leu Gly Val Lys Leu Thr Asp Ser Ser Thr
 275 280 285
 Gly Ala Phe Thr His His Leu Asn Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn
 290 295 300
 Ile Asp Glu Gly Lys Ile Phe Asn Glu Arg Ile Gln Asn Phe Asp Phe
 305 310 315 320
 Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Leu Asp Leu Ser Glu Ile Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Gly Lys Tyr Ile Asp Lys Lys Gln Glu Asp Phe Val Pro Ser Asn Ala
 340 345 350
 Leu Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Asn Leu Thr Gln
 355 360 365

Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala
370 375 380

Ser Ser Ile Phe Leu Lys Ser Lys Ser His Phe Ile Gly Gln Pro Leu
385 390 395 400

Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile
405 410 415

Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu
420 425 430

Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ala Ile Arg Glu Lys Ile Asn
435 440 445

Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu
450 455 460

Ile His Gly Pro Asn Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr
465 470 475 480

Ser Lys Leu Pro Glu Ser Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser
485 490 495

Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala
500 505 510

Gln Ala Asp Pro Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Ile Leu Ala Lys
515 520 525

Glu Gly Ala Pro Lys Val Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
530 535 540

Gln Asn Lys Ser
545

<210> 9

<211> 1164

<212> ДНК

<213> E. coli

<400> 9

atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct 60

ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc 120

gtgaaaaaaaa ccggcgttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg 180

gaatttggcg gtattgagcc aaaccggct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg 240

gttcgcgaac agaaagtgc tttcctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc 300

accaaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccggaaaata tcgatccgtg gcacattctg 360

```

caaacgggcg gtaaagagat taaaagcgcc atccccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca 420
gcaaccgggtt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag 480
caggcgttcc attctgcccc tgttcagccg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc 540
tacaccctgc cgccgctca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg 600
gaacagtatg ttaccaaacc ggttgatgce aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt 660
ttgctgacgc taatcgaaga tgggccgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg 720
cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta 780
ccgcaggact gggcaacgca tatgctgggc cacgaactga ctgcgatgca cggctctggat 840
cacgcgcaaa cactggctat cgtcctgcct gcactgtgga atgaaaaacg cgataccaag 900
cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat 960
gagcgtattg acgccgcatg tcccgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg 1020
acccacctct ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttgct gaaaaaactg 1080
gaagagcacg gcatgacca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttgga tgtcagccgc 1140
cgtatatacg aagccgccc ctaa 1164

```

```

<210> 10
<211> 387
<212> PRT
<213> E. coli
<400> 10

```

```

Met Asn Asn Phe Asn Leu His Thr Pro Thr Arg Ile Leu Phe Gly Lys
1          5          10          15

```

```

Gly Ala Ile Ala Gly Leu Arg Glu Gln Ile Pro His Asp Ala Arg Val
20          25          30

```

```

Leu Ile Thr Tyr Gly Gly Gly Ser Val Lys Lys Thr Gly Val Leu Asp
35          40          45

```

```

Gln Val Leu Asp Ala Leu Lys Gly Met Asp Val Leu Glu Phe Gly Gly
50          55          60

```

```

Ile Glu Pro Asn Pro Ala Tyr Glu Thr Leu Met Asn Ala Val Lys Leu
65          70          75          80

```

```

Val Arg Glu Gln Lys Val Thr Phe Leu Leu Ala Val Gly Gly Gly Ser
85          90          95

```

```

Val Leu Asp Gly Thr Lys Phe Ile Ala Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Glu
100          105          110

```

```

Asn Ile Asp Pro Trp His Ile Leu Gln Thr Gly Gly Lys Glu Ile Lys
115          120          125

```

Ser Ala Ile Pro Met Gly Cys Val Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser
 130 135 140

Glu Ser Asn Ala Gly Ala Val Ile Ser Arg Lys Thr Thr Gly Asp Lys
 145 150 155 160

Gln Ala Phe His Ser Ala His Val Gln Pro Val Phe Ala Val Leu Asp
 165 170 175

Pro Val Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val
 180 185 190

Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val
 195 200 205

Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu
 210 215 220

Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val
 225 230 235 240

Arg Ala Asn Val Met Trp Ala Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile
 245 250 255

Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Glu
 260 265 270

Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Val
 275 280 285

Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Asp Thr Lys Arg Ala Lys Leu
 290 295 300

Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp Asp
 305 310 315 320

Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln
 325 330 335

Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser
 340 345 350

Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu
 355 360 365

Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu
 370 375 380

Ala Ala Arg
 385

<210>	11	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	11	
	caccatggac aaacagtatc cggtagcgc	29
<210>	12	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	12	
	cgaagggcga tagctttacc aatcc	25
<210>	13	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	13	
	caccatggct aactacttca atacactga	29
<210>	14	
<211>	28	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	14	
	ccaggagaag gccttgagtg ttttctcc	28
<210>	15	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	15	
	caccatgcct aagtagcggt ccgscacca	29
<210>	16	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	

<220>			
<223>	Праймер		
<400>	16		26
	cgcagcactg ctcttaaata ttcggc		
<210>	17		
<211>	29		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер		
<400>	17		29
	caccatgaac aactttaatc tgcacaccc		
<210>	18		
<211>	29		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер		
<400>	18		29
	caccatgaac aactttaatc tgcacaccc		
<210>	19		
<211>	45		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер		
<400>	19		45
	gcattgcctta agaaaggagg ggggtcacat ggacaacag tatcc		
<210>	20		
<211>	39		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер		
<400>	20		39
	atgcatttaa ttaattacag aatctgactc agatgcagc		
<210>	21		
<211>	45		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер		
<400>	21		45
	gtcgacgcta gcaaaggagg gaatcaccat ggctaactac ttcaa		

<210>	22	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	22	31
	tctagattaa cccgcaacag caatacgttt c	
<210>	23	
<211>	39	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	23	39
	tctagaaaaag gaggaataaa gtatgcctaa gtaccgttc	
<210>	24	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	24	31
	ggatccttat taacccccca gtttcgattt a	
<210>	25	
<211>	39	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	25	39
	ggatccaaag gaggctagac atatgtatac tgtggggga	
<210>	26	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	26	31
	gagctcttag cttttatttt gctccgcaaa c	
<210>	27	
<211>	39	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	

<400> 27		
gagctcaaag gaggagcaag taatgaacaa ctttaattct		39
<210> 28		
<211> 43		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 28		
gaattcacta gtcctagggt agcgggcggc ttcgtatata cgg		43
<210> 29		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 29		
caacattagc gatttttcttt tctct		25
<210> 30		
<211> 45		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 30		
catgaagctt actagtgggc ttaagttttg aaaataatga aaact		45
<210> 31		
<211> 61		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер N110.2		
<400> 31		
gagctcacta gtcaattgta agtaagtaaa aggagggtggg tcacatggac aaacagtatc		60
с		61
<210> 32		
<211> 50		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер N111.2		
<400> 32		
ggatccgac gacttaagcc tcagcttaca gaatctgact cagatgcagc		50

<210> 33
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N112.2
 <400> 33
 gagctcctta agaaggaggt aatcaccatg gctaactact tcaa 44

<210> 34
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N113.2
 <400> 34
 ggatccgatc gagctagcgc ggccgcttaa cccgcaacag caatacgttt c 51

<210> 35
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N114.2
 <400> 35
 gagctcgccta gcaaggaggt ataaagtatg cctaagtacc gttc 44

<210> 36
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N115.2
 <400> 36
 ggatccgatc gattaattaa cctaagggtta ttaaccccc agtttcgatt ta 52

<210> 37
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N116.2
 <400> 37
 gagctcttaa ttaaaaggag gttagacata tgtatactgt ggggga 46

<210> 38
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N117.2

<400> 38
 ggatccagat ctcttaggac atgttttagct tttattttgc tccgcaaac 49

<210> 39
 <211> 3883
 <212> ДНК
 <213> Escherichia coli

<400> 39
 ctatattgct gaaggtacag gcgtttccat aactatttgc tcgctgtttt tactcaagaa 60
 gaaaatgcc aatagcaaca tcaggcagac aatacccgaa attgcaaga aaactgtctg 120
 gtagcctgcg tgggtcaaaga gtatcccagt cggcggttgaa agcagcacia tcccaagcga 180
 actggcaatt tgaaaaccaa tcagaaagat cgtcgacgac aggcgcttat caaagtttgc 240
 cagcgtgtat ttgaagacgg atatgacaca aagtggaaacc tcaatggcat gtaacaactt 300
 cactaatgaa ataatccagg ggttaacgaa cagcgcgag gaaaggatac gcaacgccat 360
 aatcacaaact ccgataagta atgcattttt tggccctacc cgattcacia agaaaggaat 420
 aatcgccatg cacagcgctt cgagtaccac ctggaatgag ttgagataac catacaggcg 480
 cgttcctaca tcgtgtgatt cgaataaacc tgaataaaag acaggaaaaa gttgttgatc 540
 aaaaatgtta tagaaagacc acgtccccac aataaatatg acgaaaaccc agaagtttcg 600
 atccttgaaa actgcgataa aatcctcttt ttttaccctt cccgcatctg ccgctacgca 660
 ctggtgatcc ttatctttaa aacgcatggt gatcatcata aatacagcgc caaatagcga 720
 gaccaaccag aagttgatat ggggactgat actaaaaaat atgccggcaa agaacgcgcc 780
 aatagcatag ccaaaagatc cccaggcgcg cgctgttcca tattcgaaat gaaaatttcg 840
 cgccattttt tcggtgaagc tatcaagcaa accgcatccc gccagatacc ccaagccaaa 900
 aaatagcgcc cccagaatta gacctacaga aaaattgctt tgcagtaacg gttcataaac 960
 gtaaatcata aacggtccgg tcaagaccag gatgaaactc atacaccaga tgagcggttt 1020
 cttcagaccg agtttatcct gaacgatgcc gtagaacatc ataaatagaa tgctggtaaa 1080
 ctggttgacc gaataaagtg tacctaattc cgtccctgtc aaccctagat gtcctttcag 1140
 ccaaatagcg tataacgacc accacagcga ccaggaaata aaaaagagaa atgagtaact 1200
 ggatgcaaaa cgatagtacg cttttctgaa tggaaatatt agtgccataa ttacctgcct 1260
 gtcgttaaaa aattcacgct ctatttagag ataagagcga cttcgccgtt tacttctcac 1320
 tattccagtt cttgtcgaca tggcagcgct gtcattgccc ctttcgccgt tactgcaagc 1380
 gtcctcgcaac gttgagcgag atcgataatt cgtcgcatct ctctctcatc tgtagataat 1440
 cccgtagagg acagacctgt gagtaaccgg gcaacgaacg catctccgc ccccgtagta 1500
 tcgacacaaat tcacagacat tccagcaaaa tgggtgaactt gtcctcgata acagaccacc 1560
 accccttctg cacccttagt caccaacagc atggcgatct catactcttt tgccaggcg 1620
 catatatcct gatcgttctg tgtttttcca ctgataagtc gccattcttc ttccgagagc 1680

ttgacgacat	ccgccagttg	tagcgcctgc	cgcaaacaca	agcggagcaa	atgctcgtct	1740
tgccatagat	cttcacgaat	attaggatcg	aagctgacaa	aacctccggc	atgccggatc	1800
gccgtcatcg	cagtaaattg	gctggtacgc	gaaggctcgg	cagacaacgc	aattgaacag	1860
agatgtaacc	attcgccatg	tcgccagcag	ggcaagtctg	tcgtctctaa	aaaaagatcg	1920
gcactggggc	ggaccataaa	cgtaaataaa	cgttccccct	gatcgttcag	atcgacaagc	1980
accgtggatg	tccggtgcc	ttcatcttgc	ttcagatacg	tgatatcgac	tccctcagtt	2040
agcagcgttc	tttgcattaa	cgcacaaaaa	ggatcatccc	ccacccgacc	tataaaccca	2100
cttgttccgc	ctaattctgg	gattcccacc	gcaacgttag	ctggcgcgcc	gccaggacaa	2160
ggcagtaggc	gcccgtctga	ttctggcaag	agatctacga	ccgcatcccc	taaaacccat	2220
actttggctg	acattttttt	cccttaaatt	catctgagtt	acgcatagtg	ataaacctct	2280
ttttcgcaa	atcgtcatgg	atttactaaa	acatgcatat	tcgatcacia	aacgtcatag	2340
ttaacgttaa	cattttgtgat	attcatcgca	tttatgaaag	taagggactt	tattttttata	2400
aaagttaacg	ttaacaattc	accaaatttg	cttaaccagg	atgattaaaa	tgacgcaatc	2460
tcgattgcat	gcggcgcaa	acgccctagc	aaaacttcat	gagcaccggg	gtaacacttt	2520
ctatccccat	tttcacctcg	cgcctcctgc	cgggtggatg	aacgatccaa	acggcctgat	2580
ctggtttaac	gatcgttatc	acgcgtttta	tcaacatcat	ccgatgagcg	aacactgggg	2640
gccaatgcac	tggggacatg	ccaccagcga	cgatatgatc	cactggcagc	atgagcctat	2700
tgcgctagcg	ccaggagacg	ataatgacaa	agacgggtgt	ttttcaggta	gtgctgtcga	2760
tgacaatggg	gtcctctcac	ttatctacac	cggacacgtc	tggctcgatg	gtgcaggtaa	2820
tgacgatgca	attcgcgaa	tacaatgtct	ggctaccagt	cgggatggta	ttcatttcga	2880
gaaacagggt	gtgatcctca	ctccaccaga	aggaatcatg	cacttccgcg	atcctaaagt	2940
gtggcgtgaa	gccgacacat	ggtggatggg	agtcggggcg	aaagatccag	gcaacacggg	3000
gcagatcctg	ctttatcgcg	gcagttcggt	gcgtgaatgg	accttcgatc	gcgtactggc	3060
ccacgctgat	gcgggtgaaa	gctatatgtg	ggaatgtccg	gactttttca	gccttggcga	3120
tcagcattat	ctgatgtttt	ccccgcaggg	aatgaatgcc	gagggatata	gttaccgaaa	3180
tcgctttcaa	agtggcgtaa	taccgggaat	gtggtcgcca	ggacgacttt	ttgcacaatc	3240
cgggcatttt	actgaacttg	ataacgggca	tgacttttat	gcaccacaaa	gcttttttagc	3300
gaaggatggg	cggcgatttg	ttatcggtcg	gatggatatg	tgggaatcgc	caatgccctc	3360
aaaacgtgaa	ggatgggcag	gctgcatgac	gctggcgcg	gagctatcag	agagcaatgg	3420
caaacttcta	caacgcccgg	tacacgaagc	tgagtcgtta	cgccagcagc	atcaatctgt	3480
ctctccccgc	acaatcagca	ataaatatgt	tttgaggaa	aacgcgcaag	cagttgagat	3540
tcagttgcag	tgggcgctga	agaacagtga	tgccgaacat	tacggattac	agctcggcac	3600
tgggaatgcg	ctgtatatgg	ataaccaatc	tgagcgactt	gtttttgtgg	gggtattacc	3660
acacgagaat	ttagacggct	accgtagtat	tccccctccg	cagcgtgaca	cgctcgccct	3720

aaggatattt atcgatacat catccgtgga agtattttatt aacgacgggg aagcggtgat 3780
gagtagtcga atctatccgc agccagaaga acgggaactg tcgctttatg cctcccacgg 3840
agtggctgtg ctgcaacatg gagcactctg gctactgggt taa 3883

<210> 40
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер N130SeqF1

<400> 40
tgttccaacc tgatcaccg 19

<210> 41
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер N130SeqF2

<400> 41
ggaaaacagc aagcgct 18

<210> 42
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер N130SeqF3

<400> 42
cagctgaacc agtttgcc 18

<210> 43
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер N130SeqF4

<400> 43
aaaataccag cgcctgtcc 19

<210> 44
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер N130SeqR1

<400> 44
tgaatggcca ccatgttg 18

<210> 45
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N130SeqR2

 <400> 45
 gaggatctcc gccgcctg 18

<210> 46
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N130SeqR3

 <400> 46
 aggccgagca ggaagatc 18

<210> 47
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N130SeqR4

 <400> 47
 tgatcagggtt ggaacagcc 19

<210> 48
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N131SeqF1

 <400> 48
 aagaactgat cccacaggc 19

<210> 49
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N131SeqF2

 <400> 49
 atcctgtgcg gtatgttgc 19

<210> 50
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> Праймер N131Seqf3	
<400> 50 attgcgatgg tgaagcgc	18
<210> 51 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N131SeqR1	
<400> 51 atggtgttgg caatcagcg	19
<210> 52 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N131SeqR2	
<400> 52 gtgcttcggt gatggttt	18
<210> 53 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N131SeqR3	
<400> 53 ttgaaaccgt gcgagtagc	19
<210> 54 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N132SeqF1	
<400> 54 tattcactgc catctcgcg	19
<210> 55 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N132SeqF2	
<400> 55 ccgtaagcag ctgttcct	18
<210> 56	

<211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N132SeqF3
 <400> 56
 gctggaacaac tacgacgtta 20

<210> 57
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N132SeqF4
 <400> 57
 tgctctacccc aaccagcttc 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N132SeqR1
 <400> 58
 atggaagac cagaggtgcc 20

<210> 59
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N132SeqR2
 <400> 59
 tgcctgtgtg gtacgaat 18

<210> 60
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N132SeqR3
 <400> 60
 tattacgcgg cagtgcact 19

<210> 61
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N132SeqR4

<400> 61 ggtgattttg tcgcagttag ag	22
<210> 62 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N133SeqF1	
<400> 62 tcgaaattgt tgggtcgc	18
<210> 63 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N133SeqF2	
<400> 63 ggtcacgcag ttcatttcta ag	22
<210> 64 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N133SeqF3	
<400> 64 tgtggcaagc cgtagaaa	18
<210> 65 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N133SeqF4	
<400> 65 aggatcgctg ggtgagtaa	19
<210> 66 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N133SeqR1	
<400> 66 gtagccgtcg ttattgatga	20
<210> 67 <211> 22 <212> ДНК	

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N133SeqR2
 <400> 67
 gcagcgaact aatcagagat tc 22

<210> 68
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N133SeqR3
 <400> 68
 tgggtccgatg tattggagg 19

<210> 69
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N133SeqR4
 <400> 69
 tctgccatat agctcgcgt 19

<210> 70
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариант промотора 1.6GI
 <400> 70
 gcccttgaca atgccacatc ctgagcaaat aattcaacca ct 42

<210> 71
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Промотор 1.5GI
 <400> 71
 gcccttgact atgccacatc ctgagcaaat aattcaacca ct 42

<210> 72
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер Scr1
 <400> 72
 cctttctttg tgaatcgg 18

<210> 73
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер Scr2

 <400> 73
 agaaacaggg tgtgatcc 18

 <210> 74
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер Scr3

 <400> 74
 agtgatcatc acctgttgcc 20

 <210> 75
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер Scr4

 <400> 75
 agcacggcga gagtcgacgg 20

 <210> 76
 <211> 672
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 76
 agttcgagtt tatcattatc aatactgcc a tttcaaagaa tacgtaaata attaatagta 60
 gtgattttcc taactttatt tagtcaaaaa attagccttt taattctgct gtaacccgta 120
 catgcccaaa atagggggcg ggttacacag aatatataac atcgtagggtg tctgggtgaa 180
 cagttttattc ctggcatcca ctaaatataa tggagcccg c tttttaagct ggcattccaga 240
 aaaaaaaga atcccagcac caaaatattg ttttcttcac caaccatcag ttcattaggtc 300
 cattctctta gcgcaactac agagaacagg ggcacaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc 360
 tcaatggagt gatgcaacct gcctggagta aatgatgaca caaggcaatt gacccacgca 420
 tgtatctatc tcattttctt acaccttcta ttaccttctg ctctctctga tttggaaaaa 480
 gctgaaaaaa aagggtgaaa ccagttccct gaaattattc ccctacttga ctaataagta 540
 tataaagacg gtaggtattg attgtaattc tgtaaactta tttcttaaac ttcttaaatt 600
 ctacttttat agttagtctt ttttttagtt ttaaaacacc aagaacttag tttcgaataa 660
 acacacataa ac 672

<210> 77
 <211> 270
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 77
 gacctcagat catgtaatta gttatgtcac gcttacattc acgccctccc cccacatccg 60
 ctctaaccga aaaggaagga gttagacaac ctgaagtcta ggtccctatt ttttttttta 120
 tagttatgtt agtattaaga acgttattta tttttcaaatt ttttcttttt tttctgtaca 180
 gacgcgtgta cgcattgtaac attatactga aaaccttgct tgagaagggtt ttgggacgct 240
 cgaaggcttt aatttgccgc cggtagccaa 270

<210> 78
 <211> 1716
 <212> ДНК
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 78
 atgttgacaa aagcaacaaa agaacaacaaa tcccttgatg aaaacagagg ggcggagctt 60
 gttgttgatt gcttagtgga gcaagggtgc acacatgtat ttggcattcc aggtgcaaaa 120
 attgatgcgg ttttgacgc ttacaagat aaaggacctg aaattatcgt tgcccggcac 180
 gaacaaaacg cagcattcat ggcccaagca gtcggccggt taactggaaa accgggagtc 240
 gtgttagtca catcaggacc ggggtgcctct aacttggaac caggcctgct gacagcgaac 300
 actgaaggag accctgtcgt tgcgcttgct ggaaacgtga tccgtgcaga tcgtttaaaa 360
 cggacacatc aatctttgga taatgcggcg ctattccagc cgattacaaa atacagtgtg 420
 gaagttcaag atgtaaaaaa tataccggaa gctgttacaa atgcatttag gatagcgtca 480
 gcagggcagg ctggggccgc ttttgtagc tttccgaag atgttgtaa tgaagtcaca 540
 aatacgaaaa acgtgcgtgc tgttgacgc ccaaaactcg gtcctgcagc agatgatgca 600
 atcagtgcgg ccatagcaaa aatccaaaca gcaaaacttc ctgtcgtttt ggtcggcatg 660
 aaaggcggaa gaccggaagc aattaaagcg gttcgcaagc ttttgaaaaa ggttcagctt 720
 ccatttggtt aaacatatca agctgccggt accctttcta gagatttaga ggatcaatat 780
 tttggccgta tcggtttggt ccgcaaccag cctggcgatt tactgctaga gcaggcagat 840
 gttgttctga cgatcggcta tgaccgatt gaatatgatc cgaaattctg gaatatcaat 900
 ggagaccgga caattatcca tttagacgag attatcgctg acattgatca tgcttaccag 960
 cctgatcttg aattgatcgg tgacattccg tccacgatca atcatatcga acacgatgct 1020
 gtgaaagtgg aatttgaga gcgtgagcag aaaatccttt ctgattttaa acaatatatg 1080
 catgaagggt agcagggtgc tgcagattgg aaatcagaca gagcgcaccc tcttgaaatc 1140
 gttaaagagt tgcgtaatgc agtcgatgat catgttacag taacttgca tatcggttcg 1200
 cagccattt ggatgtcacg ttatttccgc agctacgagc cgttaacatt aatgatcagt 1260

aacgggtatgc aaacactcgg cgttgcgctt ccttgggcaa tcggcgcttc attggtgaaa 1320
 ccgggagaaa aagtgggttc tgtctctggt gacggcggtt tcttattctc agcaatggaa 1380
 ttagagacag cagttcgact aaaagcacca attgtacaca ttgtatggaa cgacagcaca 1440
 tatgacatgg ttgcattcca gcaattgaaa aaatataacc gtacatctgc ggtcgatttc 1500
 ggaaatatcg atatcgtgaa atatgcggaa agcttcggag caactggctt gcgcgtagaa 1560
 tcaccagacc agctggcaga tggtctgcgt caaggcatga acgctgaagg tcctgtcatc 1620
 atcgatgtcc cggttgacta cagtataaac attaatctag caagtgacaa gcttccgaaa 1680
 gaattcgggg aactcatgaa aacgaaagct ctctag 1716

<210> 79
 <211> 643
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 79
 gaaatgaata acaatactga cagtactaaa taattgccta cttggcttca catacgttgc 60
 atacgtcgat atagataata atgataatga cagcaggatt atcgtataac gtaatagtgt 120
 aaaatctcaa aaatgtgtgg gtcattacgt aaataatgat aggaatggga ttcttctatt 180
 tttccttttt ccattctagc agccgtcggg aaaacgtggc atcctctctt tcgggctcaa 240
 ttggagtcac gctgccgtga gcacccctc tttccatata taacaactga gcacgtaacc 300
 aatggaaaag catgagctta gcgttgctcc aaaaaagtat tggatgggta ataccatttg 360
 tctgttctct tctgactttg actcctcaaa aaaaaaaat ctacaatcaa cagatcgctt 420
 caattacgcc ctcaaaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa ttttatccct 480
 catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga cataatactt 540
 ctctatcaat ttcagttatt gttcttcctt gcgttattct tctgttcttc tttttctttt 600
 gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaatct aga 643

<210> 80
 <211> 1188
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 80
 atgttgagaa ctcaagccgc cagattgatc tgcaactccc gtgtcatcac tgctaagaga 60
 acctttgctt tggccacccg tgctgtgct tacagcagac cagctgcccg tttcgtaag 120
 ccaatgatca ctacccgtgg tttgaagcaa atcaacttcg gtggtactgt tgaaaccgtc 180
 tacgaaagag ctgactggcc aagagaaaag ttgttggact acttcaagaa cgacactttt 240
 gctttgatcg gttacgggtc ccaagggttac ggtcaagggt tgaacttgag agacaacggt 300
 ttgaacgtta tcattggtgt ccgtaaagat ggtgcttctt ggaaggctgc catcgaagac 360
 gggtgggttc caggcaagaa cttgttcact gttgaagatg ctatcaagag aggtagttac 420
 gttatgaact tggtgtccga tgccgctcaa tcagaaacct ggcctgctat caagccattg 480

ttgaccaagg gtaagacttt gtacttctcc cacggtttct cccagtcctt caaggacttg 540
 actcacgttg aaccaccaa ggacttagat gttatcttgg ttgctccaaa gggttccggt 600
 agaactgtca gatctttgtt caaggaaggt cgtggtatta actcttctta cgccgtctgg 660
 aacgatgtca ccggttaagg tcacgaaaag gcccaagctt tggccgttgc cattggttcc 720
 gggtacgttt accaaaccac tttcgaaaga gaagtcaact ctgacttgta cggtgaaaga 780
 gggtgtttta tgggtggtat ccacggtatg ttcttggctc aatacgacgt cttgagagaa 840
 aacggtcact ccccatctga agctttcaac gaaaccgtcg aagaagctac ccaatctcta 900
 taccattga tcggttaagta cggtatggat tacatgtacg atgcttggtc caccaccgcc 960
 agaagagggtg ctttggactg gtaccaatc ttcaagaatg ctttgaagcc tgttttccaa 1020
 gacttgtagc aatctaccaa gaacggtagc gaaaccaaga gatctttgga attcaactct 1080
 caacctgact acagagaaaa gctagaaaag gaattagaca ccatcagaaa catggaaatc 1140
 tggaagggtg gtaagggaagt cagaaagttg agaccagaaa accaataa 1188

<210> 81
 <211> 760
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 81
 tcttttccga ttttttctta aaccgtggaa tatttcggat atccttttgt tgtttccggg 60
 tgtacaatat ggacttcctc ttttctggca accaaaccctac tacatcgagg ttcctataat 120
 accttcggtg gtctccctaa catgtagggt gcggaggagg gatatacaat agaacagata 180
 ccagacaaga cataatgggc taaacaagac tacaccaatt aactgcctc attgatgggtg 240
 gtacataacg aactaatact gtagccctag acttgatagc catcatcata tcgaagtttc 300
 actacccttt ttccatttgc catctattga agtaataata ggcgcatgca acttcttttc 360
 ttttttttct ttttctctct ccccggttgt tgtctcacca tatccgcaat gacaaaaaaa 420
 tgatggaaga cactaaagga aaaaattaac gacaaagaca gcaccaacag atgtcgttgt 480
 tccagagctg atgaggggta tctcgaagca cagaaactt tttccttctc tcattcacgc 540
 aactactct ctaatgagca acggtatacg gccttcctc cagttacttg aatttgaaat 600
 aaaaaaagt ttgctgtctt gctatcaagt ataaatagac ctgcaattat taatcttttg 660
 tttcctcgtc attgttctcg ttccctttct tccttgtttc ttttctgca caatatttca 720
 agctatacca agcatacaat caactatctc atatacaatg 760

<210> 82
 <211> 316
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 82
 gagtaagcga atttcttatg atttatgatt tttattatta aataagttat aaaaaaata 60

agtgtatataca aatttttaaag tgactcttag gttttaaaac gaaaattctt attcttgagt 120
 aactctttcc tgtaggtcag gttgctttct caggatatagc atgaggtcgc tcttattgac 180
 cacacctcta ccggcatgcc gagcaaatgc ctgcaaatcg ctccccattt cacccaattg 240
 tagatatgct aactccagca atgagttgat gaatctcggg gtgtatttta tgcctcaga 300
 ggacaacacc tgtggg 316

<210> 83
 <211> 1758
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 83
 atgggcttgt taacgaaagt tgctacatct agacaattct ctacaacgag atgcgttgca 60
 aagaagctca acaagtactc gtatatcatc actgaaccta agggccaagg tgcgtcccag 120
 gccatgcttt atgccaccgg tttcaagaag gaagatttca agaagcctca agtcgggggtt 180
 ggttcctgtt ggtgggtccg taaccatgt aacatgcac tattggactt gaataacaga 240
 tgttctcaat ccattgaaa agcggggttg aaagctatgc agttcaacac catcgggtgtt 300
 tcagacggta tctctatggg tactaaagg atgagatact cgttacaag tagagaaatc 360
 attgcagact ctttgaaac catcatgatg gcacaacact acgatgctaa catcgccatc 420
 ccatcatgtg acaaaaacat gcccggtgtc atgatggcca tgggtagaca taacagacct 480
 tccatcatgg tatatgggtg tactatcttg cccgggtcac caacatgtgg ttcttcgaag 540
 atctctaaaa acatcgatat cgtctctgcg ttccaatcct acggtgaata tatttccaag 600
 caattcactg aagaagaaag agaagatgtt gtggaacatg catgcccagg tcctgggttct 660
 tgtgggtgta tgtatactgc caacacaatg gcttctgccg ctgaagtgtt aggtttgacc 720
 attccaaact cctcttctt cccagccgtt tccaaggaga agttagctga gtgtgacaac 780
 attggtgaat acatcaagaa gacaatggaa ttgggtattt tacctcgtga tatcttcaca 840
 aaagaggctt ttgaaaacgc cattacttat gtcgttgcaa ccgggtgggtc cactaatgct 900
 gttttgcatt tgggtggctgt tgctcactct gcgggtgtca agttgtcacc agatgatttc 960
 caaagaatca gtgatactac accattgatc ggtgacttca aaccttctgg taaatacgtc 1020
 atggccgatt tgattaacgt tgggtgtacc caatctgtga ttaagtatct atatgaaaac 1080
 aacatgttgc acggtaacac aatgactgtt accggtgaca ctttggcaga acgtgcaaag 1140
 aaagaccaa gcctacctga aggacaagag attattaagc cactctccca cccaatcaag 1200
 gccaacggtc acttgcaa atctgtacggg tcattggcac cagggtggagc tgtgggtaaa 1260
 attaccggta aggaaggtag ttacttcaag ggtagagcac gtgtgttcga agaggaagg 1320
 gcctttattg aagccttgga aagagggtgaa atcaagaagg gtgaaaaaac cgttgttgtt 1380
 atcagatatg aagggtcaa aggtgcacca ggtatgcctg aaatgctaaa gccttctctt 1440
 gctctgatgg gttacgggtt gggtaaagat gttgcattgt tgactgatgg tagattctct 1500

ggtggttctc acgggttctt aatcggtccac attgttcccg aagccgctga aggtggtcct 1560
 atcgggttgg tcagagacgg cgatgagatt atcattgatg ctgataataa caagattgac 1620
 ctattagtct ctgataagga aatggctcaa cgtaaacaaa gttgggttgc acctccacct 1680
 cgttacacaa gaggtactct atccaagtat gctaagtggg tttccaacgc ttccaacggt 1740
 tgtgttttag atgcttga 1758

<210> 84
 <211> 753
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 84
 gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg 60
 gagaatcttc taacgataaa cccttgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct 120
 acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg atttaaggct aagggacgtg 180
 caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcggtgaagt gttcgccaaa cttttcggtt 240
 aacacatgca gtgatgcacg cgcgatggtg ctaagttaca tatatatata tatagccata 300
 gtgatgtcta agtaaccttt atggtatatt tcttaatgtg gaaagatact agcgcgcgca 360
 cccacacaca agcttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgctaaa tgggattcca 420
 ctttccgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgatgaaga ataaaaagag 480
 agatccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagtttca tgatcgtgat gaacaatggt 540
 aacgagttgt ggctgttgcc agggaggggtg gttctcaact tttaatgtat ggccaaatcg 600
 ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctctt cctccttctt 660
 gtcctttctt aattctgttg taattacctt cctttgtaat tttttttgta attattcttc 720
 ttaataatcc aaacaaacac acatattaca ata 753

<210> 85
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер N98SeqF1

<400> 85
 cgtgttagtc acatcaggac 20

<210> 86
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер N98SeqF2

<400> 86
 ggccatagca aaaatccaaa cagc 24

<210> 87
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N98SeqF3
 <400> 87
 ccacgatcaa tcatatcgaа сасg 24

<210> 88
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N98SeqF4
 <400> 88
 ggtttctgtc tctggtgacg 20

<210> 89
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N99SeqR1
 <400> 89
 gtctggtgat tctacgcga ag 22

<210> 90
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N99SeqR2
 <400> 90
 catcgactgc attacgcaac tc 22

<210> 91
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N99SeqR3
 <400> 91
 cgatcgtcag aacaacatct gc 22

<210> 92
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223>	Праймер N99SeqR4	
<400>	92	
	ccttcagtgt tcgctgtcag	20
<210>	93	
<211>	36	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N136	
<400>	93	
	ccgcgcatag atctgaaatg aataacaata ctgaca	36
<210>	94	
<211>	65	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N137	
<400>	94	
	taccaccgaa gttgatttgc ttcaacatcc tcagctctag atttgaatat gtattacttg	60
	gttat	65
<210>	95	
<211>	28	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N138	
<400>	95	
	atgttgaagc aaatcaactt cggtggta	28
<210>	96	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N139	
<400>	96	
	ttatttggtt tctggtctca ac	22
<210>	97	
<211>	57	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N140	
<400>	97	
	aagttgagac cagaaaacca ataattaatt aatcatgtaa ttagttatgt cagcgtt	57

<210> 98
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N141
 <400> 98
 gcggccgccc gcaaattaaa gccttcgagc 30

<210> 99
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N142
 <400> 99
 ggatccgcat gcttgcatTT agtcgtgc 28

<210> 100
 <211> 56
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> N143
 <400> 100
 caggtaatcc cccacagtat acatcctcag ctattgtaat atgtgtgttt gtttgg 56

<210> 101
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N144
 <400> 101
 atgtatactg tgggggatta cc 22

<210> 102
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N145
 <400> 102
 ttagctttta ttttgctccg ca 22

<210> 103
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Праймер N146

<400> 103

tttgcggagc aaaataaaaag ctaattaatt aagagtaagc gaatttctta tgattta 57

<210> 104

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер N147

<400> 104

actagtagc caggtgttgt cctctgag 28

<210> 105

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер N151

<400> 105

ctagagagct ttcgttttca tg 22

<210> 106

<211> 57

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер N152

<400> 106

ctcatgaaaa cgaagctct ctagttaatt aatcatgtaa ttagttatgt cagcgtt 57

<210> 107

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер N155

<400> 107

atggcacaaga agtcaacaа gtact 25

<210> 108

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер N156

<400> 108

tcaagcatct aaaacacaac cg 22

<210> 109

<211>	57	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N157	
<400>	109	
aacggttggtg ttttagatgc ttgattaatt aagagtaagc gaatttctta tgattta		57
<210>	110	
<211>	28	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N158	
<400>	110	
ggatcctttt ctggcaacca aaccata		28
<210>	111	
<211>	56	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N159	
<400>	111	
cgagtacttg ttgagcttct ttgccatcct cagcgagata gttgattgta tgcttg		56
<210>	112	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N160SeqF1	
<400>	112	
gaaaacgtgg catcctctc		19
<210>	113	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N160SeqF2	
<400>	113	
gctgactggc caagagaaa		19
<210>	114	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N160SeqF3	

<400> 114 tgtactttctc ccacgggtttc	20
<210> 115 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N160SeqF4	
<400> 115 agctaccsaa tctctatacc ca	22
<210> 116 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N160SeqF5	
<400> 116 cctgaagtct aggtccctat tt	22
<210> 117 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> N160SeqR1	
<400> 117 gcgtgaatgt aagcgtgac	19
<210> 118 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N160SeqR2	
<400> 118 cgtcgtattg agccaagaac	20
<210> 119 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Праймер N160SeqR3	
<400> 119 gcatcggaca acaagttcat	20
<210> 120 <211> 22 <212> ДНК	

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N160SeqR4
 <400> 120
 tcgttcttga agtagtccaa ca 22

<210> 121
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N160SeqR5
 <400> 121
 tgagcccgaa agagaggat 19

<210> 122
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N161SeqF1
 <400> 122
 acggtatacg gccttcctt 19

<210> 123
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N161SeqF2
 <400> 123
 ggggttgaaa gctatgcagt 20

<210> 124
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N161SeqF3
 <400> 124
 ggtggatatgt atactgcca ca 22

<210> 125
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер N161SeqF4
 <400> 125
 ggtgggtacc aatctgtgat ta 22

<210> 126
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N161SeqF5

 <400> 126 20
 cggtttgggt aaagatgttg

 <210> 127
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N161SeqF6

 <400> 127 22
 aaacgaaaat tcttattctt ga

 <210> 128
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N161SeqR1

 <400> 128 22
 tcgttttaaa acctaagagt ca

 <210> 129
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N161SeqR2

 <400> 129 19
 ccaaaccgta acccatcag

 <210> 130
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер N161SeqR3

 <400> 130 19
 cacagattgg gtaccacca

 <210> 131
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>		
<223>	Праймер N161Seqr4	
<400>	131	
	accacaagaa ccaggacctg	20
<210>	132	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N161SeqR5	
<400>	132	
	catagctttc aaaccgcgt	19
<210>	133	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N161SeqR6	
<400>	133	
	cgtataccgt tgctcattag ag	22
<210>	134	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N162	
<400>	134	
	atgttgacaa aagcaacaaa aga	23
<210>	135	
<211>	38	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N189	
<400>	135	
	atccgcggat agatctagtt cgagtttatc attatcaa	38
<210>	136	
<211>	53	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N190.1	
<400>	136	
	ttcttttggtt gcttttgta acatcctcag cgtttatgtg tgtttatcg aaa	53

<210> 137
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер N176

<400> 137
 atccgcgat agatctatta gaagccgccg agcgggcg

38

<210> 138
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер N177

<400> 138
 atcctcagct tttctccttg acgttaaagt a

31

<210> 139
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 139

Met Thr Gln Ser Arg Leu His Ala Ala Gln Asn Ala Leu Ala Lys Leu
 1 5 10 15

His Glu His Arg Gly Asn Thr Phe Tyr Pro His Phe His Leu Ala Pro
 20 25 30

Pro Ala Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Ile Trp Phe Asn Asp
 35 40 45

Arg Tyr His Ala Phe Tyr Gln His His Pro Met Ser Glu His Trp Gly
 50 55 60

Pro Met His Trp Gly His Ala Thr Ser Asp Asp Met Ile His Trp Gln
 65 70 75 80

His Glu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Gly Asp Asp Asn Asp Lys Asp Gly
 85 90 95

Cys Phe Ser Gly Ser Ala Val Asp Asp Asn Gly Val Leu Ser Leu Ile
 100 105 110

Tyr Thr Gly His Val Trp Leu Asp Gly Ala Gly Asn Asp Asp Ala Ile
 115 120 125

Arg Glu Val Gln Cys Leu Ala Thr Ser Arg Asp Gly Ile His Phe Glu
 130 135 140

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

Pro Gln Arg Asp Thr Leu Ala Leu Arg Ile Phe Ile Asp Thr Ser Ser
 420 425 430
 Val Glu Val Phe Ile Asn Asp Gly Glu Ala Val Met Ser Ser Arg Ile
 435 440 445
 Tyr Pro Gln Pro Glu Glu Arg Glu Leu Ser Leu Tyr Ala Ser His Gly
 450 455 460
 Val Ala Val Leu Gln His Gly Ala Leu Trp Leu Leu Gly
 465 470 475
 <210> 140
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 140
 Met Ser Ala Lys Val Trp Val Leu Gly Asp Ala Val Val Asp Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Glu Ser Asp Gly Arg Leu Leu Pro Cys Pro Gly Gly Ala Pro Ala
 20 25 30
 Asn Val Ala Val Gly Ile Ala Arg Leu Gly Gly Thr Ser Gly Phe Ile
 35 40 45
 Gly Arg Val Gly Asp Asp Pro Phe Gly Ala Leu Met Gln Arg Thr Leu
 50 55 60
 Leu Thr Glu Gly Val Asp Ile Thr Tyr Leu Lys Gln Asp Glu Trp His
 65 70 75 80
 Arg Thr Ser Thr Val Leu Val Asp Leu Asn Asp Gln Gly Glu Arg Ser
 85 90 95
 Phe Thr Phe Met Val Arg Pro Ser Ala Asp Leu Phe Leu Glu Thr Thr
 100 105 110
 Asp Leu Pro Cys Trp Arg His Gly Glu Trp Leu His Leu Cys Ser Ile
 115 120 125
 Ala Leu Ser Ala Glu Pro Ser Arg Thr Ser Ala Phe Thr Ala Met Thr
 130 135 140
 Ala Ile Arg His Ala Gly Gly Phe Val Ser Phe Asp Pro Asn Ile Arg
 145 150 155 160
 Glu Asp Leu Trp Gln Asp Glu His Leu Leu Arg Leu Cys Leu Arg Gln
 165 170 175

Ala Leu Gln Leu Ala Asp Val Val Lys Leu Ser Glu Glu Glu Trp Arg
 180 185 190
 Leu Ile Ser Gly Lys Thr Gln Asn Asp Gln Asp Ile Cys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Lys Glu Tyr Glu Ile Ala Met Leu Leu Val Thr Lys Gly Ala Glu Gly
 210 215 220
 Val Val Val Cys Tyr Arg Gly Gln Val His His Phe Ala Gly Met Ser
 225 230 235 240
 Val Asn Cys Val Asp Ser Thr Gly Ala Gly Asp Ala Phe Val Ala Gly
 245 250 255
 Leu Leu Thr Gly Leu Ser Ser Thr Gly Leu Ser Thr Asp Glu Arg Glu
 260 265 270
 Met Arg Arg Ile Ile Asp Leu Ala Gln Arg Cys Gly Ala Leu Ala Val
 275 280 285
 Thr Ala Lys Gly Ala Met Thr Ala Leu Pro Cys Arg Gln Glu Leu Glu
 290 295 300
 <210> 141
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 141
 Met Ala Leu Asn Ile Pro Phe Arg Asn Ala Tyr Tyr Arg Phe Ala Ser
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ser Phe Leu Phe Phe Ile Ser Trp Ser Leu Trp Trp Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Ala Ile Trp Leu Lys Gly His Leu Gly Leu Thr Gly Thr Glu Leu
 35 40 45
 Gly Thr Leu Tyr Ser Val Asn Gln Phe Thr Ser Ile Leu Phe Met Met
 50 55 60
 Phe Tyr Gly Ile Val Gln Asp Lys Leu Gly Leu Lys Lys Pro Leu Ile
 65 70 75 80
 Trp Cys Met Ser Phe Ile Leu Val Leu Thr Gly Pro Phe Met Ile Tyr
 85 90 95
 Val Tyr Glu Pro Leu Leu Gln Ser Asn Phe Ser Val Gly Leu Ile Leu
 100 105 110

Gly Ala Leu Phe Phe Gly Leu Gly Tyr Leu Ala Gly Cys Gly Leu Leu
 115 120 125

Asp Ser Phe Thr Glu Lys Met Ala Arg Asn Phe His Phe Glu Tyr Gly
 130 135 140

Thr Ala Arg Ala Trp Gly Ser Phe Gly Tyr Ala Ile Gly Ala Phe Phe
 145 150 155 160

Ala Gly Ile Phe Phe Ser Ile Ser Pro His Ile Asn Phe Trp Leu Val
 165 170 175

Ser Leu Phe Gly Ala Val Phe Met Met Ile Asn Met Arg Phe Lys Asp
 180 185 190

Lys Asp His Gln Cys Val Ala Ala Asp Ala Gly Gly Val Lys Lys Glu
 195 200 205

Asp Phe Ile Ala Val Phe Lys Asp Arg Asn Phe Trp Val Phe Val Ile
 210 215 220

Phe Ile Val Gly Thr Trp Ser Phe Tyr Asn Ile Phe Asp Gln Gln Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Val Phe Tyr Ser Gly Leu Phe Glu Ser His Asp Val Gly Thr
 245 250 255

Arg Leu Tyr Gly Tyr Leu Asn Ser Phe Gln Val Val Leu Glu Ala Leu
 260 265 270

Cys Met Ala Ile Ile Pro Phe Phe Val Asn Arg Val Gly Pro Lys Asn
 275 280 285

Ala Leu Leu Ile Gly Val Val Ile Met Ala Leu Arg Ile Leu Ser Cys
 290 295 300

Ala Leu Phe Val Asn Pro Trp Ile Ile Ser Leu Val Lys Leu Leu His
 305 310 315 320

Ala Ile Glu Val Pro Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Lys Tyr Ser Val
 325 330 335

Ala Asn Phe Asp Lys Arg Leu Ser Ser Thr Ile Phe Leu Ile Gly Phe
 340 345 350

Gln Ile Ala Ser Ser Leu Gly Ile Val Leu Leu Ser Thr Pro Thr Gly
 355 360 365

Ile Leu Phe Asp His Ala Gly Tyr Gln Thr Val Phe Phe Ala Ile Ser
 370 375 380

Gly Ile Val Cys Leu Met Leu Leu Phe Gly Ile Phe Phe Leu Ser Lys
 385 390 395 400

Lys Arg Glu Gln Ile Val Met Glu Thr Pro Val Pro Ser Ala Ile
 405 410 415

<210> 142
 <211> 6341
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pFP988DssPspac

<400> 142
 gatccaagtt taaactgtac actagatatt tcttctccgc ttaaatacatc aaagaaatct 60
 ttatcacttg taaccagtcc gtccacatgt cgaattgcat ctgaccgaat ttacggttc 120
 cctgaataat tctcatcaat cggttcatca attttatctt tatactttat attttgtg^gcg 180
 ttaatcaaat cataatTTTT atattgtttcc tcatgattta tgtctttatt attatagttt 240
 ttattctctc ttgattatg tctttgtatc ccgtttgtat tacttgatcc ttaactctg 300
 gcaaccctca aaattgaatg agacatgcta cacctccgga taataaatat atataaacgt 360
 atatagattt cataaagtct aacacactag acttatttac ttcgtaatta agtcgttaaa 420
 ccgtgtgctc tacgaccaa actataaaac ctttaagaac tttctttttt tacaagaaaa 480
 aagaaattag ataaatctct catatctttt attcaataat cgcattccgat tgcagtataa 540
 atttaacgat cactcatcat gttcatattt atcagagctc gtgctataat tatactaatt 600
 ttataaggag gaaaaaatat gggcattttt agtatttttg taatcagcac agttcattat 660
 caaccaaaaca aaaaataagt ggttataatg aatcgттаат aagcaaaatt catataacca 720
 aattaaagag ggttataatg aacgagaaaa atataaaaca cagtcaaaac ttattactt 780
 caaaacataa tatagataaa ataatgacaa atataagatt aaatgaacat gataatatct 840
 ttgaaatcgg ctcaggaaaa ggccatttta cccttgaaatt agtaaagagg tgtaatttcg 900
 taactgccat tgaaatagac cataaattat gcaaaactac agaaaataaa cttgttgatc 960
 acgataattt ccaagtttta aacaaggata tattgcagtt taaatttcct aaaaaccaat 1020
 cctataaaat atattgтаат ataccttata acataagtac ggatataata cgcaaaattg 1080
 tttttgatag tatagctaат gagatttatt таатcgtgga atacgggttt gctaaaagat 1140
 tattaаатac aaaacgctca ttggcattac ttttaatggc agaagttgat atttctatat 1200
 таagtatggt tccaagagaa tattttcatc ctaaacctaa agtгаатagc tcacttatca 1260
 gattaagtag aaaaaaatca agaatacac acaaagataa acaaaagtat aattatttcg 1320
 ttatgaaatg ggттааааа gaatacaaga aaatatttac aaaaaatcaa tttacaatt 1380
 ccttaaaaca tgcaggaatt gacgatttaa acaatattag ctttgaacaa ttcttatctc 1440

ttttcaatag	ctataaatta	tttaataagt	aagttaaggg	atgcagttca	tcgatgaagg	1500
caactacagc	tcaggcgaca	accatacgct	gagagatcct	cactacgtag	aagataaagg	1560
ccacaaatac	ttagtatttg	aagcaaacac	tggaaactgaa	gatggctacc	aaggcgaaga	1620
atctttat	ttt aacaaagcat	actatggcaa	aagcacatca	ttcttccgtc	aagaaagtca	1680
aaaacttctg	caaagcgata	aaaaacgcac	ggctgagtta	gcaaacggcg	ctctcggtat	1740
gattgagcta	aacgatgatt	acacactgaa	aaaagtgatg	aaaccgctga	ttgcatctaa	1800
cacagtaaca	gatgaaattg	aacgcgcgaa	cgtctttaaa	atgaacggca	aatggtacct	1860
gttactgac	tcccgcggat	caaaaatgac	gattgacggc	attacgtcta	acgatattta	1920
catgcttggg	tatgtttcta	attctttaac	tggcccatat	aagccgctga	acaaaactgg	1980
ccttgtgtta	aaaatggatc	ttgatcctaa	cgatgtaacc	ttacttact	cacacttcgc	2040
tgtacctcaa	gcgaaaggaa	acaatgtcgt	gattacaagc	tatatgacaa	acagaggatt	2100
ctacgcagac	aaacaatcaa	cgtttgcgcc	aagcttgcac	gcgagagtag	ggaactgcc	2160
ggcatcaa	aaaacgaaag	gctcagtcga	aagactgggc	ctttcgtttt	atctgttgtt	2220
tgtcggtgaa	cgctctcctg	agtaggacaa	atccgccggg	agcggatttg	aacgttgcca	2280
agcaacggcc	cggagggtgg	cgggcaggac	gcccgccata	aactgccagg	catcaaatta	2340
agcagaaggc	catcctgacg	gatggccttt	ttgcgtttct	acaaactctt	tttgtttatt	2400
tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgctccgg	atctgcatcg	caggatgctg	2460
ctggctaccc	tgtggaacac	ctacatctgt	attaacgaag	cgctggcatt	gacctgagt	2520
gatttttctc	tgggtcccgcc	gcatccatac	cgccagttgt	ttaccctcac	aacgttccag	2580
taaccgggca	tgttcatcat	cagtaaccgc	tatcgtgagc	atcctctctc	gtttcatcgg	2640
tatcattacc	cccatgaaca	gaaattcccc	cttacacgga	ggcatcaagt	gaccaaacag	2700
gaaaaaacgc	cccttaacat	ggcccgcctt	atcagaagcc	agacattaac	gcttctggag	2760
aaactcaacg	agctggacgc	ggatgaacag	gcagacatct	gtgaatcgct	tcacgaccac	2820
gctgatgagc	tttaccgcag	ctgcctcgcg	cgtttcggtg	atgacggtga	aaacctctga	2880
cacatgcagc	tcccggagac	ggtcacagct	tgtctgtaag	cggatgccgg	gagcagacaa	2940
gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	gcgcagccat	gacccagtca	3000
cgtagcgata	gcggagtgtg	tactggctta	actatgcggc	atcagagcag	attgtactga	3060
gagtgaccca	tatgcggtgt	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	3120
ggcgtctctc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	ctgcggcgag	3180
cggtatcagc	tcactcaaag	gcggtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	3240
gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	3300
tggcgttttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	3360
agagggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	3420
tcgtgcgctc	tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	3480

cggaagcgt ggcgcttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg	3540
tctgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat	3600
ccggttaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag	3660
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt	3720
ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc	3780
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggt	3840
gcggtggtt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag	3900
atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctacgtggaa cgaaaactca cgtaaggg	3960
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa	4020
gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa	4080
tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc	4140
ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga	4200
taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa	4260
gggcccagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattggt	4320
gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg	4380
ctgcaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc	4440
aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg	4500
gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag	4560
cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt	4620
actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgccccgcgt	4680
caatacggga taataaccgc ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac	4740
gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac	4800
ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag	4860
caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa	4920
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	4980
gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	5040
cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa	5100
ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct	5160
gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac	5220
aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgttc atgtgcgtaa ctaacttgcc atcttcaaac	5280
aggagggtg gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg	5340
aacatcaaaa agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca	5400
ggaggcgcaa ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaaccaa agccatataa ggaaacatac	5460

```

ggcattttccc atattacacg ccatgatatg ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa 5520
aaatatcaag ttcctgaatt cgattcgtcc acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc 5580
ctggacgttt gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gactgtcgc aaactatcac 5640
ggctaccaca tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaa atgcggatga cacatcgatt 5700
tacatgttct atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc 5760
gtcttttaaag acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa 5820
gaatgggtcag gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat 5880
ttctccggtg aacattacgg caaacaacaa ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca 5940
tcagacagct ctttgaacat caacgggtga gaggattata aatcaatctt tgacgggtgac 6000
ggaaaaacgt atcaaaatgt acagaattcg agctctcgag taattctaca cagcccagtc 6060
cagactattc ggcactgaaa ttatgggtga agtgggtcaag acctcactag gcaccttaaa 6120
aatagcgcac cctgaagaag atttatttga ggtagccctt gcctacctag cttccaagaa 6180
agatatccta acagcacaag agcggaaaaga tgttttgctt tacatccaga acaacctctg 6240
ctaaaattcc tgaaaaattt tgcaaaaagt tgttgacttt atctacaagg tgtggcataa 6300
tgtgtggaat tgtgagcgct cacaattaag cttgaattcc c 6341

```

<210> 143
 <211> 6221
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмида pFP988DssPgroE

```

<400> 143
tcgagagcta ttgtaacata atcgggtacgg ggggtgaaaaa gctaacggaa aagggagcgg 60
aaaagaatga tgtaagcgtg aaaaattttt tatcttatca cttgaaattg gaagggagat 120
tctttattat aagaattgtg gaattgtgag cggataacaa ttcccaatta aaggaggaaa 180
ctagtggatc caagtttaaa ctgtacacta gatatttctt ctccgcttaa atcatcaaag 240
aaatctttat cacttgtaac cagtccgtcc acatgtcgaa ttgcatctga ccgaatttta 300
cgtttccctg aataattctc atcaatcggt tcatcaattt tatctttata ctttatattt 360
tgtgcgttaa tcaaatcata atttttatat gtttcctcat gatttatgtc tttattatta 420
tagtttttat tctctctttg attatgtctt tgtatcccgt ttgtattact tgatccttta 480
actctggcaa ccctcaaaat tgaatgagac atgctacacc tccggataat aaatatatat 540
aaacgtatat agatttcata aagtctaaca cactagactt atttacttcg taattaagtc 600
gttaaaccgt gtgctctacg accaaaacta taaaaccttt aagaactttc tttttttaca 660
agaaaaaaga aattagataa atctctcata tcttttattc aataatcgca tccgattgca 720
gtataaattt aacgatcact catcatgttc atatttatca gagctcgtgc tataattata 780
ctaattttat aaggaggaaa aaatatgggc atttttagta tttttgtaat cagcacagtt 840

```

cattatcaac caaacaacaaa ataagtgggtt ataatgaatc gttaataagc aaaattcata	900
taaccaaatt aaagagggtt ataatgaacg agaaaaatat aaaacacagt caaaacttta	960
ttacttcaaa acataatata gataaaataa tgacaaatat aagattaaat gaacatgata	1020
atatctttga aatcggtcca ggaaaaggcc atttttaccct tgaattagta aagagggtga	1080
atctcgtaac tgccattgaa atagaccata aattatgcaa aactacagaa aataaacttg	1140
ttgatcacga taatttccaa gttttaaaca aggatatatt gcagtttaaa tttcctaaaa	1200
accaatccta taaaatatat ggtaatatat ctataacat aagtacggat ataatacgca	1260
aaattgtttt tgatagtata gctaatagaga tttatttaat cgtggaatac gggtttgcta	1320
aaagattatt aaatacaaaa cgctcattgg cattactttt aatggcagaa gttgatattt	1380
ctatattaag tatggttcca agagaatatt ttcactctaa acctaaagtg aatagctcac	1440
ttatcagatt aagtagaaaa aaatcaagaa tatcacacaa agataaaca aagtataatt	1500
atctcgttat gaaatgggtt aacaaagaat acaagaaaat atttcaaaa aatcaattta	1560
acaattcctt aaaacatgca ggaattgacg atttaacaa tatttagcttt gaacaattct	1620
tatctctttt caatagctat aaattattta ataagtaagt taagggatgc agttcatcga	1680
tgaaggcaac tacagctcag gcgacaacca tacgctgaga gatcctcact acgtagaaga	1740
taaaggccac aaatacttag tatttgaagc aaacactgga actgaagatg gctaccaagg	1800
cgaagaatct ttatttaaca aagcatacta tggcaaaagc acatcattct tccgtcaaga	1860
aagtcaaaaa cttctgcaaa gcgataaaaa acgcacggct gagttagcaa acggcgctct	1920
cggtatgatt gagctaaacg atgattacac actgaaaaaa gtgatgaaac cgctgattgc	1980
atctaacaca gtaacagatg aaattgaacg cgcgaacgct tttaaaatga acggcaaatg	2040
gtacctgttc actgactccc gcggatcaaa aatgacgatt gacggcatta cgtctaacga	2100
tatttacatg cttggttatg tttctaattc ttttaactggc ccatacaagc cgctgaacaa	2160
aactggcctt gtgttaaaaa tggatcttga tcctaacgat gtaaccttta ctactcaca	2220
cttcgctgta cctcaagcga aaggaaacaa tgctcgtgatt acaagctata tgacaaacag	2280
aggattctac gcagacaaac aatcaacggt tgcgccaagc ttgcatgcga gagtagggaa	2340
ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct	2400
gttgtttgtc ggtgaacgct ctcttgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg	2460
ttgcgaagca acggcccggg gggggggggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc	2520
aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actctttttg	2580
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg ctccggatct gcatcgagg	2640
atgctgctgg ctacctgtg gaacacctac atctgtatta acgaagcgct ggcattgacc	2700
ctgagtgatt tttctctggg cccgccgcat ccataccgcc agttgtttac cctcacaacg	2760
ttccagtaac cgggcatggt catcatcagt aaccggtatc gtgagcatcc tctctcgttt	2820

catcggatc attaccccca tgaacagaaa ttccccctta cacggaggca tcaagtgacc	2880
aaacaggaaa aaaccgccct taacatggcc cgctttatca gaagccagac attaacgctt	2940
ctggagaaac tcaacgagct ggacgcggat gaacaggcag acatctgtga atcgcttcac	3000
gaccacgctg atgagcttta ccgcagctgc ctgcgcgctt tcggtgatga cggtgaaaac	3060
ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct tgtaagcggg tgcggggagc	3120
agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc	3180
cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg	3240
tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc	3300
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgcctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc	3360
ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata	3420
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg	3480
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct	3540
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa	3600
gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc	3660
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg	3720
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg	3780
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg	3840
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcgggtgct acagagttct	3900
tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc	3960
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg	4020
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc	4080
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt	4140
aagggtatctt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa	4200
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat	4260
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct	4320
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggaggggctt accatctggc ccagtgctg	4380
caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag	4440
ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta	4500
attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg	4560
ccattgctgc aggcacgtg gtgtcacgct cgctgcttggt tatggcttca ttcagctccg	4620
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaa gcggttagct	4680
ccttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatgggtta	4740
tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg	4800
gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc	4860

cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 4920
 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 4980
 tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 5040
 ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat 5100
 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc 5160
 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 5220
 catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct 5280
 ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtctcgcgcg ttcgggtgat gacggtgaaa 5340
 acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga 5400
 gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttcatgt gcgtaactaa cttgccatct 5460
 tcaaacagga gggctggaag aagcagaccg ctaacacagt acataaaaaa ggagacatga 5520
 acgatgaaca tcaaaaagtt tgcaaaacaa gcaacagtat taacctttac taccgcactg 5580
 ctggcaggag gcgcaactca agcgttttgc aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa 5640
 acatacggca tttcccatat tacacgccat gatatgctgc aaatccctga acagcaaaaa 5700
 aatgaaaaat atcaagttcc tgaattcgat tcgtccacaa ttaaaaatat ctcttctgca 5760
 aaaggcctgg acgtttggga cagctggcca ttacaaaacg ctgacggcac tgctgcaaac 5820
 tatcacggct accacatcgt ctttgcatta gccggagatc ctaaaaatgc ggatgacaca 5880
 tcgatttaca tgttctatca aaaagtcggc gaaacttcta ttgacagctg gaaaaacgct 5940
 ggccgcgtct ttaaagacag cgacaaattc gatgcaaatg attctatcct aaaagaccaa 6000
 acacaagaat ggtcaggttc agccacattt acatctgacg gaaaaatccg tttattctac 6060
 actgatttct ccggtaaaca ttacggcaaa caaactga caactgcaca agttaacgta 6120
 tcagcatcag acagctcttt gaacatcaac ggtgtagagg attataaatc aatctttgac 6180
 ggtgacggaa aaacgtatca aaatgtacag aattcgagct c 6221

<210> 144
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер T-budВ (ВамНІ)

<400> 144
 agatagatgg atccggaggt ggtcacatg gacaaacagt 40

<210> 145
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер В-kivD (ВамНІ)

<400> 145
ctctagagga tccagactcc taggacatg

29

<210> 146
<211> 6039
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Фрагмент вектора pFP988Dss

<400> 146
gatccaagtt taaactgtac actagatatt tcttctccgc ttaaatacatc aaagaaatct 60
ttatcacttg taaccagtcc gtccacatgt cgaattgcat ctgaccgaat ttacgtttc 120
cctgaataat tctcatcaat cgtttcatca atttttatctt tatactttat attttgtgcg 180
ttaatcaaat cataatTTTT atagtgttcc tcatgattta tgtctttatt attatagttt 240
ttattctctc ttgattatg tctttgtatc ccgtttgtat tacttgatcc tttaaactctg 300
gcaaccctca aaattgaatg agacatgcta cacctccgga taataaatat atataaacgt 360
atatagattt cataaagtct aacacactag acttattttac ttcgtaatta agtcgttaaa 420
ccgtgtgctc tacgaccaa actataaaac ctttaagaac tttctttttt tacaagaaaa 480
aagaaattag ataaatctct catatctttt attcaataat cgcacccgat tgcagtataa 540
atttaacgat cactcatcat gttcatattt atcagagctc gtgctataat tatactaatt 600
ttataaggag gaaaaaatat gggcattttt agtatttttg taatcagcac agttcattat 660
caaccaaaca aaaaataagt ggttataatg aatcgtaat aagcaaaatt catataacca 720
aattaaagag ggttataatg aacgagaaaa atataaaaca cagtcaaaac tttattactt 780
caaaacataa tatagataaa ataatagaca atataagatt aaatgaacat gataatatct 840
ttgaaatcgg ctcaggaaaa ggccatttta cccttgaatt agtaaagagg tgtaatttcg 900
taactgccat tgaaatagac cataaattat gcaaaactac agaaaataaa ctgtttgatc 960
acgataattt ccaagtttta aacaaggata tattgcagtt taaatttcct aaaaaccaat 1020
cctataaaat atatggtaat ataccttata acataagtac ggatataata cgcaaaattg 1080
tttttgatag tatagctaatt gagattttatt taatcgtgga atacggggtt gctaaaagat 1140
tattaaatac aaaacgctca ttggcattac ttttaatggc agaagttgat atttctatat 1200
taagtatggt tccaagagaa tattttcatc ctaaacctaa agtgaatagc tcacttatca 1260
gattaagtag aaaaaaatca agaatacac acaaagataa acaaaagtat aattatttcg 1320
ttatgaaatg ggtaacaaa gaatacaaga aaatattttac aaaaaatcaa ttttaacaatt 1380
ccttaaaaca tgcaggaatt gacgatttaa acaatattag ctttgaacaa ttcttatctc 1440
ttttcaatag ctataaatta ttttaataagt aagttaaggg atgcagttca tcgatgaagg 1500
caactacagc tcaggcgaca accatacgct gagagatcct cactacgtag aagataaagg 1560
ccacaaatac ttagtatttg aagcaaacac tggaactgaa gatggctacc aaggcgaaga 1620

atctttat	ttt aacaaagcat	actatggcaa	aagcacatca	ttcttccgtc	aagaaagtca	1680
aaaacttctg	caaagcgata	aaaaacgcac	ggctgagtta	gcaaacggcg	ctctcgggat	1740
gattgagcta	aacgatgatt	acacactgaa	aaaagtgatg	aaaccgctga	ttgcatctaa	1800
cacagtaaca	gatgaaattg	aacgcgcgaa	cgtctttaa	atgaacggca	aatggtacct	1860
gttcaactgac	tcccgcgat	caaaaatgac	gattgacggc	attacgtcta	acgatattta	1920
catgcttgggt	tatgtttcta	attctttaac	tggccatac	aagccgctga	acaaaactgg	1980
ccttgtgtta	aaaatggatc	ttgatcctaa	cgatgtaacc	ttacttact	cacacttcgc	2040
tgtacctcaa	gcgaaaggaa	acaatgtcgt	gattacaagc	tatatgacaa	acagaggatt	2100
ctacgcagac	aaacaatcaa	cgtttgcgcc	aagcttgcac	gcgagagtag	ggaactgcc	2160
ggcatcaaat	aaaacgaaag	gctcagtcga	aagactgggc	ctttcgtttt	atctgttgtt	2220
tgtcgggtgaa	cgctctcctg	agtaggacaa	atccgccggg	agcggatttg	aacgttgcga	2280
agcaacggcc	cggagggtgg	cgggcaggac	gcccgccata	aactgccagg	catcaaatta	2340
agcagaaggc	catcctgacg	gatggccttt	ttgcgtttct	acaaactctt	tttgtttatt	2400
tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgctccgg	atctgcatcg	caggatgctg	2460
ctggctaccc	tgtggaacac	ctacatctgt	attaacgaag	cgctggcatt	gaccttgagt	2520
gatttttctc	tgggtcccgcc	gcattccatac	cgccagttgt	ttaccctcac	aacgttccag	2580
taaccgggca	tgttcatcat	cagtaacccg	tatcgtgagc	atcctctctc	gtttcatcgg	2640
tatcattacc	cccatgaaca	gaaattcccc	cttacacgga	ggcatcaagt	gaccaaacag	2700
gaaaaaacccg	cccttaacat	ggcccgcctt	atcagaagcc	agacattaac	gcttctggag	2760
aaactcaacg	agctggacgc	ggatgaacag	gcagacatct	gtgaatcgct	tcacgaccac	2820
gctgatgagc	tttaccgcag	ctgcctcgcg	cgtttcgggtg	atgacgggtga	aaacctctga	2880
cacatgcagc	tcccgagagc	ggtcacagct	tgtctgtaag	cggatgccgg	gagcagacaa	2940
gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	gcgcagccat	gacctcagtca	3000
cgtagcgata	gcggagtgtg	tactggctta	actatgcggc	atcagagcag	attgtactga	3060
gagtgcacca	tatgcgggtgt	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	3120
ggcgtctctt	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggcgttcggg	ctgcggcgag	3180
cggtatcagc	tactcaaaag	gcggtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	3240
gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	3300
tggcgttttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	3360
agagggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	3420
tcgtgcgctc	tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	3480
cgggaagcgt	ggcgttttct	caatgctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	3540
ttcgtcctaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	ccccggttca	gcccgaaccgc	tgcgccttat	3600

ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag	3660
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt	3720
gggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc	3780
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta	3840
gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag	3900
atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctacagtggaa cgaaaactca cgttaagggg	3960
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa	4020
gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa	4080
tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc	4140
ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga	4200
taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa	4260
gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattggt	4320
gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg	4380
ctgcaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc	4440
aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tggtgtgcaa aaaagcggtt agtccttcg	4500
gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag	4560
cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt	4620
actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgccccgct	4680
caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac	4740
gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac	4800
ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag	4860
caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa	4920
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	4980
gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	5040
cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa	5100
ataggcgat caccgagccc ttctcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct	5160
gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac	5220
aagcccgtca gggcgctca gcgggtgttc atgtgcgtaa ctaacttgcc atcttcaaac	5280
aggagggctg gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg	5340
aacatcaaaa agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca	5400
ggaggcgcaa ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaacaaa agccatataa ggaaacatac	5460
ggcatttccc atattacacg ccatgatatg ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa	5520
aaatatcaag ttctgaatt cgattcgtcc acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc	5580
ctggacgttt gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcactgtcgc aaactatcac	5640

ggctaccaca tcgtctttgc attagccgga gacctaataa atgcggatga cacatcgatt 5700
 tacatgttct atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc 5760
 gtcttttaaag acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa 5820
 gaatgggtcag gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat 5880
 ttctccggtg aacattacgg caaacaaca ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca 5940
 tcagacagct ctttgaacat caacggtgta gaggattata aatcaatctt tgacggtgac 6000
 ggaaaaacgt atcaaaatgt acagaattcg agctctcga 6039

<210> 147
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер T-groE(XhoI)

<400> 147
 agatagatct cgagagctat tgtaacataa tcggtacggg ggtg 44

<210> 148
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер B-groEL (SpeI BamHI)

<400> 148
 attatgtcag gatccactag tttcctcctt taattgggaa ttgttatccg c 51

<210> 149
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер T-groEL

<400> 149
 agctattgta acataatcgg tacgggggtg 30

<210> 150
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер T-*ilvCB.s.* (BamHI)

<400> 150
 acattgatgg atcccataac aaggagaga ttgaaatggt aaaag 45

<210> 151
 <211> 47
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер В-іІVCB.s.(SpeIВamHI)
 <400> 151
 tagacaacgg atccactagt ttaattttgc gcaacggaga ccaccgc 47
 <210> 152
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер Т-ВD64 (DraIII)
 <400> 152
 ttaccgtgga ctcaccgagt gggtaactag cctcgccgga aagagcg 47
 <210> 153
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер В-ВD64 (DraIII)
 <400> 153
 tcacagttaa gacacctggt gccgttaatg cgccatgaca gccatgat 48
 <210> 154
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер Т-ІacІq (DraIII)
 <400> 154
 acagatagat caccagggtgc aagctaattc cggtggaaac gaggtcatc 49
 <210> 155
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер В-ІacІq (DraIII)
 <400> 155
 acagtacgat acacggggtg tcactgcccg cttccagtc gggaaacc 48
 <210> 156
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер Т-groE (DraIII)
 <400> 156
 tcggattacg caccctgta gctattgtaa cataatcggt acgggggtg 49

<210> 157
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер В-В.s.11VC (DraIII)

<400> 157
 ctgctgatct cacaccgtgt gttaattttg cgcaacggag accaccgc 48

<210> 158
 <211> 1221
 <212> ДНК
 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 158
 cacacgggtg aaataataat ctaaacagga ggggttaaaa tgggtgattt cgaatattca 60
 ataccaacta gaatTTTTTt cggtaaagat aagataaatg tacttggaag agagcttaaa 120
 aaatatgggt ctaaagtgtt tatagtttat ggtggaggaa gtataaagag aatggaata 180
 tatgataaag ctgtaagtat acttgaaaaa aacagtatta aattttatga acttgcagga 240
 gtagagccaa atccaagagt aactacagtt gaaaaaggag ttaaaatatg tagagaaaat 300
 ggagttgaag tagtactagc tataggtgga ggaagtgcaa tagattgctg aaaggttata 360
 gcagcagcat gtgaatatga tggaaatcca tgggatattg tgtagatgg ctcaaaaata 420
 aaaaggggtg ttcttatagc tagtatatta accattgctg caacaggatc agaaatggat 480
 acgtgggcag taataaataa tatggataca aacgaaaaac taattgcggc acatccagat 540
 atggctccta agttttctat attagatcca acgtatacgt ataccgtacc taccaatcaa 600
 acagcagcag gaacagctga tattatgagt catatatttg aggtgtattt tagtaataca 660
 aaaacagcat atttgcagga tagaatggca gaagcgttat taagaacttg tattaatat 720
 ggaggaatag ctcttgagaa gccggatgat tatgaggcaa gagccaatct aatgtgggct 780
 tcaagtcttg cgataaatgg acttttaaca tatggtaaag aactaattg gagtgtacac 840
 ttaatggaac atgaattaag tgcttattac gacataacac acggcgtagg gcttgcaatt 900
 ttaacaccta attggatgga gtatatttta aataatgata cagtgtacaa gtttgttgaa 960
 tatggtgtaa atgtttggg aatagacaaa gaaaaaatc actatgacat agcacatcaa 1020
 gcaatacaaa aaacaagaga ttactttgta aatgtactag gtttaccatc tagactgaga 1080
 gatgttgga ttgaagaaga aaaattggac ataatggcaa aggaatcagt aaagcttaca 1140
 ggaggaacca taggaaacct aagaccagta aacgcctccg aagtcctaca aatattcaaa 1200
 aatctgtgt aacaccgagt g 1221

<210> 159
 <211> 54
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>			
<223>	Праймер T-bdhB (DraIII)		
<400>	159		
	tcgatagcac acacacggtg gttaacaaag gaggggttaa aatggttgat ttcg	54	
<210>	160		
<211>	91		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер B-bdhB (rrnBT1DraIII)		
<400>	160		
	atctacgcac tcggtgataa aacgaaaggc ccagtctttc gactgagcct ttcgttttat	60	
	cttacacaga ttttttgaat atttgtagga c	91	
<210>	161		
<211>	29		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер LDH EcoRV F		
<400>	161		
	gacgtcatga ccacccgccg atccctttt	29	
<210>	162		
<211>	30		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер LDH AatIIR		
<400>	162		
	gatatccaac accagcgacc gacgtattac	30	
<210>	163		
<211>	47		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер Cm F		
<400>	163		
	atttaaatct cgagtagagg atcccaaca acgaaaattg gataaag	47	
<210>	164		
<211>	29		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Праймер Cm R		
<400>	164		

acgcgttatt ataaaagcca gtcattagg	29
<210> 165	
<211> 58	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер P11 F-StuI	
<400> 165	
cctagcgccta tagttgttga cagaatggac atactatgat atattgttgc tatagcga	58
<210> 166	
<211> 62	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер P11 R-SpeI	
<400> 166	
ctagtcgccta tagcaacaat atatcatagt atgtccattc tgtcaacaac tatagcgccta	60
gg	62
<210> 167	
<211> 38	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер P1dhL F-HindIII	
<400> 167	
aagcttgtcg acaaaccaac attatgacgt gtctgggc	38
<210> 168	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер P1dhL R-BamHI	
<400> 168	
ggatcctcat cctctcgtag tgaaaatt	28
<210> 169	
<211> 36	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер F-bdhB-AvrII	
<400> 169	
ttcctaggaa ggaggtggtt aaaatggttg atttcg	36
<210> 170	
<211> 29	

<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер R-bdhB-BamHI	
<400>	170	
	ttggatcctt acacagattt tttgaatat	29
<210>	171	
<211>	39	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер F- <i>ilvC</i> (B.s.)-AflII	
<400>	171	
	aacttaagaa ggaggtgatt gaaatggtaa aagtatatt	39
<210>	172	
<211>	32	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер R- <i>ilvC</i> (B.s.)-NotI	
<400>	172	
	aagcggccgc ttaattttgc gcaacggaga cc	32
<210>	173	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер F-Pn1A(HindIII)	
<400>	173	
	ttaagcttga catacttgaa tgacctagtc	30
<210>	174	
<211>	39	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер R-Pn1A(SpeI BamHI)	
<400>	174	
	ttggatccaa actagtataa tttattttgt agttccttc	39
<210>	175	
<211>	38	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер N191	
<400>	175	

atccgcggat agatctccca ttaccgacat ttgggcgc

38

<210> 176
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер N192

<400> 176
 atcctcagcg atgattgatt gattgattgt a

31

<210> 177
 <211> 6509
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вектор pFP988

<400> 177
 tcgaggcccc gcacatacga aaagactggc tgaaaacatt gagcctttga tgactgatga 60
 tttggctgaa gaagtggatc gattgtttga gaaaagaaga agaccataaa aataccttgt 120
 ctgtcatcag acaggggtatt ttttatgctg tccagactgt ccgctgtgta aaaaatagga 180
 ataaaggggg gttgttatta ttttactgat atgtaaaata taatttgtat aaggaattgt 240
 gagcggataa caattcctac gaaaatgaga gggagaggaa acatgattca aaaacgaaag 300
 cggacagttt cgttcagact tgtgcttatg tgcacgctgt tatttgctag tttgccgatt 360
 acaaaaacat cagccggatc ccaccatcac catcaccatt aagaattcct agaaactcca 420
 agctatcttt aaaaaatcta gtaaatgcac gagcaacatc ttttgttgct cagtgcattt 480
 tttattttgt aactagata tttcttctcc gcttaaatca tcaaagaaat ctttatcact 540
 tgtaaccagt ccgtccacat gtcgaattgc atctgaccga attttacgtt tccctgaata 600
 atttctcatca atcgtttcat caattttatc tttatacttt atattttgtg cgттаатcaa 660
 atcataattt ttatatgttt cctcatgatt tatgtcttta ttattatagt ttttattctc 720
 tctttgatta tgtctttgta tcccgtttgt attacttgat cctttaactc tggcaaccct 780
 caaaattgaa tgagacatgc tacacctccg gataataaat atatataaac gtatatagat 840
 ttcataaagt ctaacacact agacttattt acttcgtaat taagtcgtta aaccgtgtgc 900
 tctacgacca aaactataaa acctttaaga actttctttt tttacaagaa aaaagaaatt 960
 agataaatct ctcatatctt ttattcaata atcgcatccg attgcagtat aaatttaacg 1020
 atcactcatc atgttcatat ttatcagagc tcgtgctata attatactaa ttttataagg 1080
 aggaaaaaat atgggcattt ttagtatttt tgtaatcagc acagttcatt atcaaccaaa 1140
 caaaaaataa gtgggttataa tgaatcgтта атааgcaaaa ttcatataac caaattaaag 1200
 agggttataa tgaacgagaa aaatataaaa cacagtcaaa actttattac ttcaaaacat 1260
 aatatagata aaataatgac aaatataaga ttaaatgaac atgataatat ctttgaaatc 1320

ggctcaggaa aaggccattt tacccttgaa ttagtaaaga ggtgtaattt cgtaactgcc	1380
attgaaatag accataaatt atgcaaaact acagaaaata aacttggtga tcacgataat	1440
ttccaagttt taaacaagga tatattgcag tttaaatttc ctaaaaacca atcctataaa	1500
atatatggta atatacctta taacataagt acggatataa tacgcaaaat tgtttttgat	1560
agtatagcta atgagattta tttaatcgtg gaatacgggt ttgctaaaag attattaaat	1620
acaaaacgct cattggcatt acttttaatg gcagaagttg atatttctat attaagtatg	1680
gtccaagag aatattttca tcctaaacct aaagtgaata gtcacttat cagattaagt	1740
agaaaaaat caagaatatc acacaaagat aaacaaaagt ataattattt cgttatgaaa	1800
tgggttaaca agaatacaa gaaaatattt acaaaaaatc aatttaacaa ttccttaaaa	1860
catgcaggaa ttgacgattt aaacaatatt agctttgaac aattcttatc tcttttcaat	1920
agctataaat tatttaataa gtaagttaag ggatgcagtt catcgatgaa ggcaactaca	1980
gctcaggcga caaccatacg ctgagagatc ctactacgt agaagataaa ggccacaaat	2040
acttagtatt tgaagcaaac actggaactg aagatggcta ccaaggcgaa gaatctttat	2100
ttaacaaagc atactatggc aaaagcacat cattcttccg tcaagaaagt caaaaacttc	2160
tgcaaaagcga taaaaaacgc acggctgagt tagcaaacgg cgctctcggg atgattgagc	2220
taaacgatga ttacacactg aaaaaagtga tgaaaccgct gattgcatct aacacagtaa	2280
cagatgaaat tgaacgcgcg aacgtcttta aaatgaacgg caaatggtag ctgttactg	2340
actcccgcgg atcaaaaatg acgattgacg gcattacgtc taacgatatt tacatgcttg	2400
gttatgtttc taattcttta actggcccat acaagccgct gaacaaaact ggccttggtg	2460
taaaaatgga tcttgatcct aacgatgtaa cttttactta ctacacttc gctgtacctc	2520
aagcgaaagg aaacaatgtc gtgattacaa gctatatgac aaacagagga ttctacgcag	2580
acaaacaatc aacgtttgcg ccaagcttgc atgcgagagt agggaaactgc caggcatcaa	2640
ataaaacgaa aggtcagtc gaaagactgg gcctttcggt ttatctgttg tttgtcggtg	2700
aacgctctcc tgagtaggac aaatccgcgg ggagcggatt tgaacgttgc gaagcaacgg	2760
cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcga taaactgccg ggcacaaat taagcagaag	2820
gccatcctga cggatggcct ttttgcggtt ctacaaaactc tttttgttta tttttctaaa	2880
tacattcaaa tatgtatccg ctcatgtccc ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac	2940
cctgtggaac acctacatct gtattaacga agcgctggca ttgaccctga gtgatttttc	3000
tctgggtccc cgcacccat accgccagtt gtttaccctc acaacgttcc agtaaccggg	3060
catgttcac atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcatc ggtatcatta	3120
cccccatgaa cagaaattcc cccttacacg gaggcacaa gtgaccaaac aggaaaaaac	3180
cgcccttaac atggcccgtt ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa	3240
cgagctggac gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcacgacc acgctgatga	3300

gctttaccgc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca 3360
 gctcccggag acgggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca 3420
 gggcgcgta gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgagcc atgaccagc cagtagcga 3480
 tagcggagt tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac 3540
 catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgtct 3600
 tccgcttctt cgctcactga ctcgctgcgc tcggctcgtt ggctgcggcg agcggatatca 3660
 gtcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac 3720
 atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt 3780
 ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg 3840
 cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc 3900
 tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc 3960
 gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc 4020
 aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac 4080
 tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt 4140
 aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct 4200
 aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 4260
 ttcggaaaaa gagtggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt 4320
 tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 4380
 atcttttcta cgggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 4440
 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa 4500
 tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag 4560
 gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgtg 4620
 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggccca gtgctgcaat gataccgcga 4680
 gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 4740
 cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa 4800
 gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc 4860
 atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtt ccaacgatca 4920
 aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg 4980
 atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 5040
 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc 5100
 aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 5160
 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg 5220
 gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 5280
 gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 5340

ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 5400
 ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 5460
 atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa 5520
 gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 5580
 atcacgaggc ctttctgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg 5640
 cagctccccg agacgggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt 5700
 cagggcgcggt cagcgggtgt tcatgtgcgt aactaacttg ccatcttcaa acaggagggc 5760
 tggaagaagc agaccgctaa cacagtacat aaaaaaggag acatgaacga tgaacatcaa 5820
 aaagtttgca aaacaagcaa cagtattaac ctttactacc gactgtctgg caggaggcgc 5880
 aactcaagcg tttgcgaaag aaacgaacca aaagccatat aaggaaacat acggcatttc 5940
 ccatattaca cgccatgata tgctgcaaat ccctgaacag caaaaaaatg aaaaatatca 6000
 agttcctgaa ttcgattcgt ccacaattaa aaatatctct tctgcaaaag gcctggacgt 6060
 ttgggacagc tggccattac aaaacgctga cggcactgtc gcaaaactatc acggctacca 6120
 catcgtcttt gcattagccg gagatcctaa aaatgcggat gacacatcga ttacatggt 6180
 ctatcaaaaa gtcggcgaaa cttctattga cagctggaaa aacgctggcc gcgtctttaa 6240
 agacagcgac aaattcgatg caaatgattc tatcctaaaa gaccaaacac aagaatggtc 6300
 aggttcagcc acatttacat ctgacggaaa aatccgttta ttctacactg atttctccgg 6360
 taaacattac ggcaaacaaa cactgacaac tgcacaagtt aacgtatcag catcagacag 6420
 ctctttgaac atcaacgggtg tagaggatta taaatcaatc tttgacgggt acggaaaaac 6480
 gtatcaaaat gtacagcatg ccacgcgtc 6509

<210> 178
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 178

Met Leu Thr Lys Ala Thr Lys Glu Gln Lys Ser Leu Val Lys Asn Arg
1 5 10 15

Gly Ala Glu Leu Val Val Asp Cys Leu Val Glu Gln Gly Val Thr His
20 25 30

Val Phe Gly Ile Pro Gly Ala Lys Ile Asp Ala Val Phe Asp Ala Leu
35 40 45

Gln Asp Lys Gly Pro Glu Ile Ile Val Ala Arg His Glu Gln Asn Ala
50 55 60

Ala Phe Met Ala Gln Ala Val Gly Arg Leu Thr Gly Lys Pro Gly Val
65 70 75 80

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

340 345 350
 Leu Ser Asp Leu Lys Gln Tyr Met His Glu Gly Glu Gln Val Pro Ala
 355 360 365
 Asp Trp Lys Ser Asp Arg Ala His Pro Leu Glu Ile Val Lys Glu Leu
 370 375 380
 Arg Asn Ala Val Asp Asp His Val Thr Val Thr Cys Asp Ile Gly Ser
 385 390 395 400
 His Ala Ile Trp Met Ser Arg Tyr Phe Arg Ser Tyr Glu Pro Leu Thr
 405 410 415
 Leu Met Ile Ser Asn Gly Met Gln Thr Leu Gly Val Ala Leu Pro Trp
 420 425 430
 Ala Ile Gly Ala Ser Leu Val Lys Pro Gly Glu Lys Val Val Ser Val
 435 440 445
 Ser Gly Asp Gly Gly Phe Leu Phe Ser Ala Met Glu Leu Glu Thr Ala
 450 455 460
 Val Arg Leu Lys Ala Pro Ile Val His Ile Val Trp Asn Asp Ser Thr
 465 470 475 480
 Tyr Asp Met Val Ala Phe Gln Gln Leu Lys Lys Tyr Asn Arg Thr Ser
 485 490 495
 Ala Val Asp Phe Gly Asn Ile Asp Ile Val Lys Tyr Ala Glu Ser Phe
 500 505 510
 Gly Ala Thr Gly Leu Arg Val Glu Ser Pro Asp Gln Leu Ala Asp Val
 515 520 525
 Leu Arg Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Pro Val Ile Ile Asp Val Pro
 530 535 540
 Val Asp Tyr Ser Asp Asn Ile Asn Leu Ala Ser Asp Lys Leu Pro Lys
 545 550 555 560
 Glu Phe Gly Glu Leu Met Lys Thr Lys Ala Leu
 565 570

<210> 179
 <211> 1665
 <212> ДНК
 <213> Lactococcus lactis

<400> 179
 atgtctgaga aacaatttgg ggcgaacttg gttgtcgata gtttgattaa ccataaagtg 60

aagtatgtat ttgggattcc aggagcaaaa attgaccggg tttttgattt attagaaaat 120
gaagaaggcc ctcaaattggc cgtgactcgt catgagcaag gagctgcttt catggctcaa 180
gctgtcggtc gtttaactgg cgaacctggg gtagtagttg ttacgagtgg gcctgggtgta 240
tcaaaccttg cgactccgct tttgaccgcg acatcagaag gtgatgctat tttggctatc 300
gggtggacaag ttaaaccgaag tgaccgtctt aaacgtgctc accaatcaat ggataatgct 360
ggaatgatgc aatcagcaac aaaatattca gcagaagttc ttgaccctaa tacactttct 420
gaatcaattg ccaacgctta tcgtattgca aaatcaggac atccagggtc aactttctta 480
tcaatcccc aagatgtaac ggatgccgaa gtatcaatca aagccattca accactttca 540
gaccctaaaa tggggaatgc ctctattgat gacattaatt atttagcaca agcaattaaa 600
aatgctgtat tgccagtaat tttggttggg gctgggtgctt cagatgctaa agtcgcttca 660
tccttgcgta atctattgac tcatgttaat attcctgtcg ttgaaacatt ccaagggtgca 720
ggggttattt cacatgattt agaacatact ttttatggac gtatcggctt tttccgcaat 780
caaccaggcg atatgcttct gaaacgttct gaccttgcta ttgctgttgg ttatgaccca 840
attgaatatg aagctcgtaa ctggaatgca gaaattgata gtcgaattat cgttattgat 900
aatgccattg ctgaaattga tacttactac caaccagagc gtgaattaat tggatgatc 960
gcagcaacat tggataatct tttaccagct gttcgtggct acaaaattcc aaaaggaaca 1020
aaagattatc tcgatggcct tcatgaagtt gctgagcaac acgaatttga tactgaaaat 1080
actgaagaag gtagaatgca cctcttgat ttggtcagca ctttccaaga aatcgtcaag 1140
gatgatgaaa cagtaaccgt tgacgtaggt tcaactctaca tttggatggc acgtcatttc 1200
aaatcatacg aaccacgtca tctctcttc tcaaacggaa tgcaaacact cggagttgca 1260
cttccttggg caattacagc cgcattgttg cgcccaggta aaaaagtta ttacactct 1320
ggatgatggg gcttcctttt cacagggcaa gaattggaaa cagctgtacg tttgaatctt 1380
ccaatcgttc aaattatctg gaatgacggc cattatgata tggttaaatt ccaagaagaa 1440
atgaaatatg gtcgttcagc agccgttgat tttggctatg ttgattacgt aaaatatgct 1500
gaagcaatga gagcaaaagg ttaccgtgca cacagcaaag aagaacttgc tgaaattctc 1560
aaatcaatcc cagatactac tggaccggtg gtaattgacg ttcctttgga ctattctgat 1620
aacattaaat tagcagaaaa attattgcct gaagagtttt attga 1665

<210> 180
<211> 554
<212> PRT
<213> Lactococcus lactis

<400> 180

Met Ser Glu Lys Gln Phe Gly Ala Asn Leu Val Val Asp Ser Leu Ile
1 5 10 15

Asn His Lys Val Lys Tyr Val Phe Gly Ile Pro Gly Ala Lys Ile Asp

20 25 30
 Arg Val Phe Asp Leu Leu Glu Asn Glu Glu Gly Pro Gln Met Val Val
 35 40 45
 Thr Arg His Glu Gln Gly Ala Ala Phe Met Ala Gln Ala Val Gly Arg
 50 55 60
 Leu Thr Gly Glu Pro Gly Val Val Val Val Thr Ser Gly Pro Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Asn Leu Ala Thr Pro Leu Leu Thr Ala Thr Ser Glu Gly Asp Ala
 85 90 95
 Ile Leu Ala Ile Gly Gly Gln Val Lys Arg Ser Asp Arg Leu Lys Arg
 100 105 110
 Ala His Gln Ser Met Asp Asn Ala Gly Met Met Gln Ser Ala Thr Lys
 115 120 125
 Tyr Ser Ala Glu Val Leu Asp Pro Asn Thr Leu Ser Glu Ser Ile Ala
 130 135 140
 Asn Ala Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Gly His Pro Gly Ala Thr Phe Leu
 145 150 155 160
 Ser Ile Pro Gln Asp Val Thr Asp Ala Glu Val Ser Ile Lys Ala Ile
 165 170 175
 Gln Pro Leu Ser Asp Pro Lys Met Gly Asn Ala Ser Ile Asp Asp Ile
 180 185 190
 Asn Tyr Leu Ala Gln Ala Ile Lys Asn Ala Val Leu Pro Val Ile Leu
 195 200 205
 Val Gly Ala Gly Ala Ser Asp Ala Lys Val Ala Ser Ser Leu Arg Asn
 210 215 220
 Leu Leu Thr His Val Asn Ile Pro Val Val Glu Thr Phe Gln Gly Ala
 225 230 235 240
 Gly Val Ile Ser His Asp Leu Glu His Thr Phe Tyr Gly Arg Ile Gly
 245 250 255
 Leu Phe Arg Asn Gln Pro Gly Asp Met Leu Leu Lys Arg Ser Asp Leu
 260 265 270
 Val Ile Ala Val Gly Tyr Asp Pro Ile Glu Tyr Glu Ala Arg Asn Trp
 275 280 285

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

<210> 181
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 181

Met Leu Arg Thr Gln Ala Ala Arg Leu Ile Cys Asn Ser Arg Val Ile
 1 5 10 15

Thr Ala Lys Arg Thr Phe Ala Leu Ala Thr Arg Ala Ala Ala Tyr Ser
 20 25 30

Arg Pro Ala Ala Arg Phe Val Lys Pro Met Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 35 40 45

Lys Gln Ile Asn Phe Gly Gly Thr Val Glu Thr Val Tyr Glu Arg Ala
 50 55 60

Asp Trp Pro Arg Glu Lys Leu Leu Asp Tyr Phe Lys Asn Asp Thr Phe
 65 70 75 80

Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Gly Leu Asn Leu
 85 90 95

Arg Asp Asn Gly Leu Asn Val Ile Ile Gly Val Arg Lys Asp Gly Ala
 100 105 110

Ser Trp Lys Ala Ala Ile Glu Asp Gly Trp Val Pro Gly Lys Asn Leu
 115 120 125

Phe Thr Val Glu Asp Ala Ile Lys Arg Gly Ser Tyr Val Met Asn Leu
 130 135 140

Leu Ser Asp Ala Ala Gln Ser Glu Thr Trp Pro Ala Ile Lys Pro Leu
 145 150 155 160

Leu Thr Lys Gly Lys Thr Leu Tyr Phe Ser His Gly Phe Ser Pro Val
 165 170 175

Phe Lys Asp Leu Thr His Val Glu Pro Pro Lys Asp Leu Asp Val Ile
 180 185 190

Leu Val Ala Pro Lys Gly Ser Gly Arg Thr Val Arg Ser Leu Phe Lys
 195 200 205

Glu Gly Arg Gly Ile Asn Ser Ser Tyr Ala Val Trp Asn Asp Val Thr
 210 215 220

Gly Lys Ala His Glu Lys Ala Gln Ala Leu Ala Val Ala Ile Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Tyr Val Tyr Gln Thr Thr Phe Glu Arg Glu Val Asn Ser Asp Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Glu Arg Gly Cys Leu Met Gly Gly Ile His Gly Met Phe Leu
 260 265 270
 Ala Gln Tyr Asp Val Leu Arg Glu Asn Gly His Ser Pro Ser Glu Ala
 275 280 285
 Phe Asn Glu Thr Val Glu Glu Ala Thr Gln Ser Leu Tyr Pro Leu Ile
 290 295 300
 Gly Lys Tyr Gly Met Asp Tyr Met Tyr Asp Ala Cys Ser Thr Thr Ala
 305 310 315 320
 Arg Arg Gly Ala Leu Asp Trp Tyr Pro Ile Phe Lys Asn Ala Leu Lys
 325 330 335
 Pro Val Phe Gln Asp Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
 340 345 350
 Lys Arg Ser Leu Glu Phe Asn Ser Gln Pro Asp Tyr Arg Glu Lys Leu
 355 360 365
 Glu Lys Glu Leu Asp Thr Ile Arg Asn Met Glu Ile Trp Lys Val Gly
 370 375 380
 Lys Glu Val Arg Lys Leu Arg Pro Glu Asn Gln
 385 390 395

<210> 182
 <211> 993
 <212> ДНК
 <213> Methanococcus maripaludis

<400> 182
 atgaagggtat tctatgactc agatttttaa ttagatgctt taaaagaaaa aacaattgca 60
 gtaatcgggtt atggaagtca aggtagggca cagtccttaa acatgaaaga cagcggatta 120
 aacgtttgttg ttggtttaag aaaaaacggt gcttcattgga acaacgctaa agcagacggt 180
 cacaatgtaa tgaccattga agaagctgct gaaaaagcgg acatcatcca catcttaata 240
 cctgatgaat tacaggcaga agtttatgaa agccagataa aaccatacct aaaagaagga 300
 aaaacactaa gcttttcaca tggttttaac atccactatg gattcattgt tccacaaaaa 360
 ggagttaacg tggttttagt tgctccaaaa tcacctggaa aaatgggttag aagaacatac 420
 gaagaagggtt tcggtgttcc aggtttaatc tgtattgaaa ttgatgcaac aaacaacgca 480
 tttgatattg tttcagcaat ggcaaaagga atcggtttat caagagctgg agttatccag 540
 acaactttca aagaagaaac agaaactgac cttttcggtg aacaagctgt tttatgcggt 600

ggagttaccg aattaatcaa ggcaggattt gaaacactcg ttgaagcagg atacgcacca 660
 gaaatggcat actttgaaac ctgccacgaa ttgaaattaa tcgttgactt aatctaccaa 720
 aaaggattca aaaacatgtg gaacgatgta agtaacactg cagaatacgg cggacttaca 780
 agaagaagca gaatcggttac agctgattca aaagctgcaa tgaaagaaat cttaagagaa 840
 atccaagatg gaagattcac aaaagaattc cttctcgaaa aacaggtaag ctatgctcat 900
 ttaaaatcaa tgagaagact cgaaggagac ttacaaatcg aagaagtcgg cgcaaaatta 960
 agaaaaatgt gcggtcttga aaaagaagaa taa 993

<210> 183
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Methanococcus maripaludis

<400> 183

Met Lys Val Phe Tyr Asp Ser Asp Phe Lys Leu Asp Ala Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Arg Ala Gln Ser
 20 25 30

Leu Asn Met Lys Asp Ser Gly Leu Asn Val Val Val Gly Leu Arg Lys
 35 40 45

Asn Gly Ala Ser Trp Asn Asn Ala Lys Ala Asp Gly His Asn Val Met
 50 55 60

Thr Ile Glu Glu Ala Ala Glu Lys Ala Asp Ile Ile His Ile Leu Ile
 65 70 75 80

Pro Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val Tyr Glu Ser Gln Ile Lys Pro Tyr
 85 90 95

Leu Lys Glu Gly Lys Thr Leu Ser Phe Ser His Gly Phe Asn Ile His
 100 105 110

Tyr Gly Phe Ile Val Pro Pro Lys Gly Val Asn Val Val Leu Val Ala
 115 120 125

Pro Lys Ser Pro Gly Lys Met Val Arg Arg Thr Tyr Glu Glu Gly Phe
 130 135 140

Gly Val Pro Gly Leu Ile Cys Ile Glu Ile Asp Ala Thr Asn Asn Ala
 145 150 155 160

Phe Asp Ile Val Ser Ala Met Ala Lys Gly Ile Gly Leu Ser Arg Ala
 165 170 175

Gly Val Ile Gln Thr Thr Phe Lys Glu Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe

180	185	190
Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys	Gly Gly Val Thr Glu	Leu Ile Lys Ala
195	200	205
Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala	Pro Glu Met Ala Tyr	
210	215	220
Phe Glu Thr Cys His Glu Leu Lys Leu Ile Val	Asp Leu Ile Tyr Gln	
225	230	235
Lys Gly Phe Lys Asn Met Trp Asn Asp Val	Ser Asn Thr Ala Glu Tyr	
245	250	255
Gly Gly Leu Thr Arg Arg Ser Arg Ile Val Thr Ala Asp	Ser Lys Ala	
260	265	270
Ala Met Lys Glu Ile Leu Arg Glu Ile Gln Asp Gly	Arg Phe Thr Lys	
275	280	285
Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gln Val Ser Tyr Ala His	Leu Lys Ser Met	
290	295	300
Arg Arg Leu Glu Gly Asp Leu Gln Ile Glu Glu Val Gly Ala Lys	Leu	
305	310	315
Arg Lys Met Cys Gly Leu Glu Lys Glu Glu		
325	330	

<210> 184
 <211> 1476
 <212> ДНК
 <213> Bacillus subtilis

<400> 184	
atggctaact acttcaatac actgaatctg cgccagcagc tggcacagct gggcaaagt	60
cgcttttatgg gccgcgatga attcgccgat ggcgcgagct accttcaggg taaaaaagta	120
gtcatcgctcg gctgtggcgc acaggggtctg aaccagggcc tgaacatgcg tgattctggt	180
ctcgatatct cctacgtctt gcgtaaagaa gcgattgccg agaagcgcgc gtcctggcgt	240
aaagcgaccg aaaatggttt taaagtgggt acttacgaag aactgatccc acaggcggat	300
ctgggtgatta acctgacgcc ggacaagcag cactctgatg tagtgcgac cgtacagcca	360
ctgatgaaag acggcgcggc gctgggctac tcgcacgggt tcaacatcgt cgaagtgggc	420
gagcagatcc gtaaagatat caccgtagtg atgggtgcgc cgaaatgccc aggcaccgaa	480
gtgcgtgaag agtacaaacg tgggttcggc gtaccgacgc tgattgccgt tcacccggaa	540
aacgatccga aaggcgaagg catggcgatt gccaaagcct gggcggctgc aaccggtggt	600
caccgtgcgg gtgtgctgga atcgtccttc gttgcggaag tgaaatctga cctgatgggc	660

gagcaaacca tcctgtgctg tatgttgcag gctggctctc tgctgtgctt cgacaagctg 720
 gtggaagaag gtaccgatcc agcatacgca gaaaaactga ttcagttcgg ttgggaaacc 780
 atcaccgaag cactgaaaca gggcggtatc accctgatga tggaccgtct ctctaaccgg 840
 gcgaaactgc gtgcttatgc gctttctgaa cagctgaaag agatcatggc acccctgttc 900
 cagaaacata tggacgacat catctccggc gaattctctt ccggtatgat ggcggactgg 960
 gccaacgatg ataagaaact gctgacctgg cgtgaagaga ccggcaaac cgcgtttgaa 1020
 accgcgccgc agtatgaagg caaatcggc gagcaggagt acttcgataa aggcgtactg 1080
 atgattgcga tgggtgaaagc gggcggtgaa ctggcggttcg aaaccatggc cgattccggc 1140
 atcattgaag agtctgcata ttatgaatca ctgcacgagc tgccgctgat tgccaacacc 1200
 atcgcccgtg agcgtctgta cgaaatgaac gtggttatct ctgataccgc tgagtacggt 1260
 aactatctgt tctcttacgc ttgtgtgccg ttgctgaaac cgtttatggc agagctgcaa 1320
 ccgggcgacc tgggtaaagc tattccggaa ggcgcggtag ataacgggca actgctgat 1380
 gtgaacgaag cgattcgag ccatgcgatt gagcaggtag gtaagaaact gcgcggctat 1440
 atgacagata tgaaacgtat tgctgttgcg ggttaa 1476

<210> 185
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 185

Met Val Lys Val Tyr Tyr Asn Gly Asp Ile Lys Glu Asn Val Leu Ala
1 5 10 15

Gly Lys Thr Val Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His
20 25 30

Ala Leu Asn Leu Lys Glu Ser Gly Val Asp Val Ile Val Gly Val Arg
35 40 45

Gln Gly Lys Ser Phe Thr Gln Ala Gln Glu Asp Gly His Lys Val Phe
50 55 60

Ser Val Lys Glu Ala Ala Ala Gln Ala Glu Ile Ile Met Val Leu Leu
65 70 75 80

Pro Asp Glu Gln Gln Gln Lys Val Tyr Glu Ala Glu Ile Lys Asp Glu
85 90 95

Leu Thr Ala Gly Lys Ser Leu Val Phe Ala His Gly Phe Asn Val His
100 105 110

Phe His Gln Ile Val Pro Pro Ala Asp Val Asp Val Phe Leu Val Ala
115 120 125

Pro Lys Gly Pro Gly His Leu Val Arg Arg Thr Tyr Glu Gln Gly Ala
 130 135 140
 Gly Val Pro Ala Leu Phe Ala Ile Tyr Gln Asp Val Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Arg Asp Lys Ala Leu Ala Tyr Ala Lys Gly Ile Gly Gly Ala Arg Ala
 165 170 175
 Gly Val Leu Glu Thr Thr Phe Lys Glu Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
 180 185 190
 Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Leu Ser Ala Leu Val Lys Ala
 195 200 205
 Gly Phe Glu Thr Leu Thr Glu Ala Gly Tyr Gln Pro Glu Leu Ala Tyr
 210 215 220
 Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
 225 230 235 240
 Glu Gly Leu Ala Gly Met Arg Tyr Ser Ile Ser Asp Thr Ala Gln Trp
 245 250 255
 Gly Asp Phe Val Ser Gly Pro Arg Val Val Asp Ala Lys Val Lys Glu
 260 265 270
 Ser Met Lys Glu Val Leu Lys Asp Ile Gln Asn Gly Thr Phe Ala Lys
 275 280 285
 Glu Trp Ile Val Glu Asn Gln Val Asn Arg Pro Arg Phe Asn Ala Ile
 290 295 300
 Asn Ala Ser Glu Asn Glu His Gln Ile Glu Val Val Gly Arg Lys Leu
 305 310 315 320
 Arg Glu Met Met Pro Phe Val Lys Gln Gly Lys Lys Lys Glu Ala Val
 325 330 335
 Val Ser Val Ala Gln Asn
 340

<210> 186
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 186

Met Gly Leu Leu Thr Lys Val Ala Thr Ser Arg Gln Phe Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Arg Cys Val Ala Lys Lys Leu Asn Lys Tyr Ser Tyr Ile Ile Thr Glu
 20 25 30
 Pro Lys Gly Gln Gly Ala Ser Gln Ala Met Leu Tyr Ala Thr Gly Phe
 35 40 45
 Lys Lys Glu Asp Phe Lys Lys Pro Gln Val Gly Val Gly Ser Cys Trp
 50 55 60
 Trp Ser Gly Asn Pro Cys Asn Met His Leu Leu Asp Leu Asn Asn Arg
 65 70 75 80
 Cys Ser Gln Ser Ile Glu Lys Ala Gly Leu Lys Ala Met Gln Phe Asn
 85 90 95
 Thr Ile Gly Val Ser Asp Gly Ile Ser Met Gly Thr Lys Gly Met Arg
 100 105 110
 Tyr Ser Leu Gln Ser Arg Glu Ile Ile Ala Asp Ser Phe Glu Thr Ile
 115 120 125
 Met Met Ala Gln His Tyr Asp Ala Asn Ile Ala Ile Pro Ser Cys Asp
 130 135 140
 Lys Asn Met Pro Gly Val Met Met Ala Met Gly Arg His Asn Arg Pro
 145 150 155 160
 Ser Ile Met Val Tyr Gly Gly Thr Ile Leu Pro Gly His Pro Thr Cys
 165 170 175
 Gly Ser Ser Lys Ile Ser Lys Asn Ile Asp Ile Val Ser Ala Phe Gln
 180 185 190
 Ser Tyr Gly Glu Tyr Ile Ser Lys Gln Phe Thr Glu Glu Glu Arg Glu
 195 200 205
 Asp Val Val Glu His Ala Cys Pro Gly Pro Gly Ser Cys Gly Gly Met
 210 215 220
 Tyr Thr Ala Asn Thr Met Ala Ser Ala Ala Glu Val Leu Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Ile Pro Asn Ser Ser Ser Phe Pro Ala Val Ser Lys Glu Lys Leu Ala
 245 250 255
 Glu Cys Asp Asn Ile Gly Glu Tyr Ile Lys Lys Thr Met Glu Leu Gly
 260 265 270
 Ile Leu Pro Arg Asp Ile Leu Thr Lys Glu Ala Phe Glu Asn Ala Ile
 275 280 285

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

Стр.: 140

attgaaaaag aaataaatgt tgatttagat gaatcagtca ttaaagaaag actctcaaaa 1560
 ctgggagaat ttgagcctaa aatcaaaaaa ggctatttat caagatactc aaaacttgtc 1620
 tcattctgctg acgaaggggc agttttaaaa taa 1653

<210> 188
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> Methanococcus maripaludis

<400> 188

Met Ile Ser Asp Asn Val Lys Lys Gly Val Ile Arg Thr Pro Asn Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Lys Ala Cys Gly Tyr Thr Asp Glu Asp Met Glu Lys Pro
 20 25 30

Phe Ile Gly Ile Val Asn Ser Phe Thr Glu Val Val Pro Gly His Ile
 35 40 45

His Leu Arg Thr Leu Ser Glu Ala Ala Lys His Gly Val Tyr Ala Asn
 50 55 60

Gly Gly Thr Pro Phe Glu Phe Asn Thr Ile Gly Ile Cys Asp Gly Ile
 65 70 75 80

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

Ile Ala Asp Ala Val Glu Ser Met Ala Arg Ala His Gly Phe Asp Gly
 100 105 110

Leu Val Leu Ile Pro Thr Cys Asp Lys Ile Val Pro Gly Met Ile Met
 115 120 125

Gly Ala Leu Arg Leu Asn Ile Pro Phe Ile Val Val Thr Gly Gly Pro
 130 135 140

Met Leu Pro Gly Glu Phe Gln Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Ile Ser Leu
 145 150 155 160

Phe Glu Gly Val Gly Glu Tyr Gln Val Gly Lys Ile Thr Glu Glu Glu
 165 170 175

Leu Lys Cys Ile Glu Asp Cys Ala Cys Ser Gly Ala Gly Ser Cys Ala
 180 185 190

Gly Leu Tyr Thr Ala Asn Ser Met Ala Cys Leu Thr Glu Ala Leu Gly
 195 200 205

Leu Ser Leu Pro Met Cys Ala Thr Thr His Ala Val Asp Ala Gln Lys

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

Ala Ala Ala Gly Gly Val Ile Ala Ala Ile Glu Asn Gly Asp Ile Ile
 485 490 495

Lys Ile Asp Met Ile Glu Lys Glu Ile Asn Val Asp Leu Asp Glu Ser
 500 505 510

Val Ile Lys Glu Arg Leu Ser Lys Leu Gly Glu Phe Glu Pro Lys Ile
 515 520 525

Lys Lys Gly Tyr Leu Ser Arg Tyr Ser Lys Leu Val Ser Ser Ala Asp
 530 535 540

Glu Gly Ala Val Leu Lys
 545 550

<210> 189
 <211> 1677
 <212> ДНК
 <213> Bacillus subtilis

<400> 189
 atggcagaat tacgcagtaa tatgatcaca caaggaatcg atagagctcc gcaccgcagt 60
 ttgcttcgtg cagcaggggt aaaagaagag gatttcggca agccgtttat tgcggtgtgt 120
 aattcataca ttgatatcgt tcccgggtcat gttcacttgc aggagtttgg gaaaatcgta 180
 aaagaagcaa tcagagaagc agggggcggt ccgtttgaat ttaataccat tggggtagat 240
 gatggcatcg caatggggca tatcggtatg agatattcgc tgccaagccg tgaaattatc 300
 gcagactctg tggaaacggt tgtatccgca cactggtttg acggaatggt ctgtattccg 360
 aactgcgaca aaatcacacc gggaaatgctt atggcggcaa tgcgcatcaa cattccgacg 420
 atttttgtca gcggcggacc gatggcggca ggaagaacaa gttacgggcg aaaaatctcc 480
 ctttcctcag tattcgaagg ggtaggcgcc taccaagcag ggaaaatcaa cgaaaacgag 540
 cttcaagaac tagagcagtt cggatgccc aagtgcggtt cttgctcagg catgtttacg 600
 gcgaactcaa tgaactgtct gtcagaagca cttgggtcttg ctttgccggg taatggaacc 660
 attctggcaa catctccgga acgcaaagag tttgtgagaa aatcggctgc gcaattaatg 720
 gaaacgattc gcaaagatat caaaccgcgt gatattgtta cagtaaaagc gattgataac 780
 gcgtttgcac tcgatatggc gctcggaggt tctacaaata ccgttcttca tacccttgcc 840
 cttgcaaacg aagccggcgt tgaatactct ttagaacgca ttaacgaagt cgctgagcgc 900
 gtgccgcact tggctaagct ggcgcctgca tcggatgtgt ttattgaaga tcttcacgaa 960
 gcgggcggcg tttcagcggc tctgaatgag ctttcgaaga aagaaggagc gcttcattta 1020
 gatgcgctga ctgttacagg aaaaactctt ggagaaacca ttgccggaca tgaagtaaag 1080
 gattatgacg tcattcaccg gctggatcaa ccattcactg aaaagggagg ccttgctgtt 1140
 ttattcggta atctagctcc ggacggcgct atcattaaaa caggcggcgt acagaatggg 1200
 attacaagac acgaagggcc ggctgtcgta ttcgattctc aggacgaggc gcttgacggc 1260

attatcaacc gaaaagtaaa agaaggcgac gttgtcatca tcagatacga agggccaaaa 1320
 ggcggacctg gcatgccgga aatgctggcg ccaacatccc aaatcggttg aatgggactc 1380
 gggccaaaag tggcattgat tacggacgga cgtttttccg gagcctcccg tggcctctca 1440
 atcggccacg tatcacctga ggccgctgag ggcggggccgc ttgcctttgt tgaaaacgga 1500
 gaccatatta tcgttgatat tgaaaaacgc atcttggatg tacaagtgcc agaagaagag 1560
 tgggaaaaac gaaaagcgaa ctggaaaggt tttgaaccga aagtgaaaac cggctacctg 1620
 gcacgttatt ctaaacttgt gacaagtgcc aacaccggcg gtattatgaa aatctag 1677

<210> 190
 <211> 558
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<400> 190

Met Ala Glu Leu Arg Ser Asn Met Ile Thr Gln Gly Ile Asp Arg Ala
 1 5 10 15

Pro His Arg Ser Leu Leu Arg Ala Ala Gly Val Lys Glu Glu Asp Phe
 20 25 30

Gly Lys Pro Phe Ile Ala Val Cys Asn Ser Tyr Ile Asp Ile Val Pro
 35 40 45

Gly His Val His Leu Gln Glu Phe Gly Lys Ile Val Lys Glu Ala Ile
 50 55 60

Arg Glu Ala Gly Gly Val Pro Phe Glu Phe Asn Thr Ile Gly Val Asp
 65 70 75 80

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

Arg Glu Ile Ile Ala Asp Ser Val Glu Thr Val Val Ser Ala His Trp
 100 105 110

Phe Asp Gly Met Val Cys Ile Pro Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly
 115 120 125

Met Leu Met Ala Ala Met Arg Ile Asn Ile Pro Thr Ile Phe Val Ser
 130 135 140

Gly Gly Pro Met Ala Ala Gly Arg Thr Ser Tyr Gly Arg Lys Ile Ser
 145 150 155 160

Leu Ser Ser Val Phe Glu Gly Val Gly Ala Tyr Gln Ala Gly Lys Ile
 165 170 175

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

Leu Ala Pro Thr Ser Gln Ile Val Gly Met Gly Leu Gly Pro Lys Val
450 455 460

Ala Leu Ile Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Ala Ser Arg Gly Leu Ser
465 470 475 480

Ile Gly His Val Ser Pro Glu Ala Ala Glu Gly Gly Pro Leu Ala Phe
485 490 495

Val Glu Asn Gly Asp His Ile Ile Val Asp Ile Glu Lys Arg Ile Leu
500 505 510

Asp Val Gln Val Pro Glu Glu Glu Trp Glu Lys Arg Lys Ala Asn Trp
515 520 525

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

Lys Leu Val Thr Ser Ala Asn Thr Gly Gly Ile Met Lys Ile
545 550 555

<210> 191
<211> 1647
<212> ДНК
<213> Lactococcus lactis

<400> 191
atgtatacag taggagatta cctattagac cgattacacg agttaggaat tgaagaaatt 60
tttggagtcc ctggagacta taacttaca tttttagatc aaattatttc ccacaaggat 120
atgaaatggg tcggaaatgc taatgaatta aatgcttcac atatggctga tggctatgct 180
cgtactaaaa aagctgccgc atttcttaca acctttggag taggtgaatt gagtgcagtt 240
aatggattag caggaagtta cgccgaaaat ttaccagtag tagaaatagt gggatcacct 300
acatcaaaag ttcaaaatga aggaaaattt gttcatcata cgctggctga cggtgatttt 360
aaacacttta tgaaaatgca cgaacctgtt acagcagctc gaactttact gacagcagaa 420
aatgcaaccg ttgaaattga ccgagtactt tctgcactat taaaagaaag aaaacctgtc 480
tatatcaact taccagttga tgttgctgct gcaaaagcag agaaaccctc actccctttg 540
aaaaaggaaa actcaacttc aaatacaagt gaccaagaaa ttttgaaca aattcaagaa 600
agcttgaaaa atgccaaaa accaatcgtg attacaggac atgaaataat tagttttggc 660
ttagaaaaaa cagtcactca atttatttca aagacaaaac tacctattac gacattaaac 720
tttggtaaaa gttcagttga tgaagccctc ctttcatttt taggaatcta taatggtaca 780
ctctcagagc ctaatcttaa agaattcgtg gaatcagccg acttcatctt gatgcttgga 840
gttaaaactca cagactcttc aacaggagcc ttactcatc atttaaatga aaataaaatg 900
atttactga atatagatga aggaaaaata ttttaacgaaa gaatccaaaa ttttgatttt 960

gaatccctca tctcctctct cttagaccta agcgaaatag aatacaaagg aaaatatatc 1020
 gataaaaagc aagaagactt tggtccatca aatgcgcttt tatcacaaga ccgcctatgg 1080
 caagcagttg aaaacctaac tcaaagcaat gaaacaatcg ttgctgaaca agggacatca 1140
 ttctttggcg cttcatcaat tttcttaaaa tcaaagagtc attttattgg tcaaccctta 1200
 tggggatcaa ttggatatac attcccagca gcattaggaa gccaaattgc agataaagaa 1260
 agcagacacc ttttatttat tggatgatgg tcacttcaac ttacagtgc agaattagga 1320
 ttagcaatca gagaaaaaat taatccaatt tgctttatta tcaataatga tggttatata 1380
 gtcgaaagag aaattcatgg accaaatcaa agctacaatg atattccaat gtggaattac 1440
 tcaaaattac cagaatcggt tggagcaaca gaagatcgag tagtctcaaa aatcgtaga 1500
 actgaaaatg aattttgtgc tgtcatgaaa gaagctcaag cagatccaaa tagaatgtac 1560
 tggattgagt taattttggc aaaagaaggt gcaccaaag tactgaaaaa aatgggcaaa 1620
 ctatttgctg aacaaaataa atcataa 1647

<210> 192
 <211> 1644
 <212> ДНК
 <213> Lactococcus lactis

<400> 192
 atgtatacag taggagatta cctgtagac cgattacacg agttgggaat tgaagaaatt 60
 tttggagttc ctggtgacta taacttaca ttttagatc aaattatttc acgcgaagat 120
 atgaaatgga ttggaaatgc taatgaatta aatgcttctt atatggctga tggttatgct 180
 cgtactaaaa aagctgccgc atttctcacc acatttgag tcggcgaatt gagtgcgac 240
 aatggactgg caggaagtta tgccgaaaat ttaccagtag tagaaattgt tggttcacca 300
 acttcaaaaag taaaaaatga cggaaaattt gtccatcata cactagcaga tggtgatttt 360
 aaacacttta tgaagatgca tgaacctgtt acagcagcgc ggactttact gacagcagaa 420
 aatgccacat atgaaattga ccgagtactt tctcaattac taaaagaaag aaaaccagtc 480
 tatattaact taccagtcga tgttgctgca gcaaaagcag agaagcctgc attatcttta 540
 gaaaaagaaa gctctacaac aaatacaact gaacaagtga ttttgagtaa gattgaagaa 600
 agtttgaaaa atgccccaaa accagtagtg attgcaggac acgaagtaat tagttttggt 660
 ttagaaaaaa cggttaactca gtttgtttca gaaacaaaac taccgattac gacactaaat 720
 tttggtaaaa gtgctgttga tgaatctttg ccctcatttt taggaatata taacgggaaa 780
 ctttcagaaa tcagtcttaa aaattttgtg gagtccgcag actttatcct aatgcttgga 840
 gtgaagctta cggactcctc aacaggtgca ttcacacatc atttagatga aaataaaatg 900
 atttcactaa acatagatga aggaataatt ttcaataaag tggtagaaga ttttgatttt 960
 agagcagtggt tttcttcttt atcagaatta aaaggaatag aatatgaagg acaatatatt 1020
 gataagcaat atgaagaatt tattccatca agtgctccct tatcacaaga ccgtctatgg 1080

caggcagttg aaagtttgac tcaaagcaat gaaacaatcg ttgctgaaca aggaacctca 1140
 ttttttgag cttcaacaat tttcttaaaa tcaaatagtc gttttattgg acaaccttta 1200
 tggggttcta ttggatatac ttttcagcg gctttaggaa gccaaattgc ggataaagag 1260
 agcagacacc ttttatttat tggatgatgt tcacttcaac ttaccgtaca agaattagga 1320
 ctatcaatca gagaaaaact caatccaatt tgttttatca taaataatga tggttatata 1380
 gttgaaagag aaatccacgg acctactcaa agttataacg acattccaat gtggaattac 1440
 tcgaaattac cagaaacatt tggagcaaca gaagatcgtg tagtatcaaa aattgttaga 1500
 acagagaatg aatttgtgtc tgtcatgaaa gaagcccaag cagatgtcaa tagaatgtat 1560
 tggatagaac tagttttgga aaaagaagat gcgccaaaat tactgaaaaa aatgggtaaa 1620
 ttatttgcgt agcaaaaataa atag 1644

<210> 193
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

<400> 193

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1 5 10 15

Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
20 25 30

Asp Gln Ile Ile Ser Arg Glu Asp Met Lys Trp Ile Gly Asn Ala Asn
35 40 45

Glu Leu Asn Ala Ser Tyr Met Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Thr Lys Lys
50 55 60

Ala Ala Ala Phe Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Ile
65 70 75 80

Asn Gly Leu Ala Gly Ser Tyr Ala Glu Asn Leu Pro Val Val Glu Ile
85 90 95

Val Gly Ser Pro Thr Ser Lys Val Gln Asn Asp Gly Lys Phe Val His
100 105 110

His Thr Leu Ala Asp Gly Asp Phe Lys His Phe Met Lys Met His Glu
115 120 125

Pro Val Thr Ala Ala Arg Thr Leu Leu Thr Ala Glu Asn Ala Thr Tyr
130 135 140

Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Gln Leu Leu Lys Glu Arg Lys Pro Val
145 150 155 160

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

Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ser Ile Arg Glu Lys Leu Asn
 435 440 445
 Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu
 450 455 460
 Ile His Gly Pro Thr Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr
 465 470 475 480
 Ser Lys Leu Pro Glu Thr Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser
 485 490 495
 Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala
 500 505 510
 Gln Ala Asp Val Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Val Leu Glu Lys
 515 520 525
 Glu Asp Ala Pro Lys Leu Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
 530 535 540
 Gln Asn Lys
 545

<210> 194
 <211> 1653
 <212> ДНК
 <213> Salmonella typhimurium

<400> 194
 ttatcccccg ttgcgggctt ccagcgcccg ggtcacggta cgcagtaatt ccggcagatc 60
 ggcttttggc aacatcactt caataaatga cagacgttgt gggcgcgcca accgttcgag 120
 gacctctgcc agttggatag cctgcgtcac ccgccagcac tccgcctgtt gcgccgcggt 180
 tagcgccggt ggtatctgcg tccagttcca gtcgcgatg tcgttatacc gctgggccgc 240
 gccgtgaatg gcgcgctcta cggatatagc gtcattgttg agcagcagga tgaccggcgc 300
 ctgcccgtcg cgtaacatcg agcccatctc ctgaatcgtg agctgcgccg cgccatcgcc 360
 gataatcaga atcacccgcc gatcgggaca ggcggtttgc gcgccaaaacg cggcgggcaa 420
 ggaatagccg atagaccccc acagcggctg taacacaact tccgcgccgt caggaagcga 480
 cagcgcgcca gcgccaaaag ctgctgtccc ctggtcgaca aggataatat ctccgggttt 540
 gagatactgc tgtaagggtt gccagaagct ttcctgggtc agttctcctt tatcaatccg 600
 cactggctgt ccggcggaac gcgtcggcgg cggcgcaaaa gcgcattcca ggcacagttc 660
 gcgcagcgta gacaccgcct gcgccatcgg gaggttgaac caggtttcgc cgatgcgcga 720
 cgcgtaaggc tgaatctcca gcgtgcgttc cgccggtaat tgttgggtaa atccggccgt 780
 aagggtatcg acaaaacggg tgccgacgca gataacccta tcggcgtcct ctatggcctg 840

```

acgcacttct ttgctgctgg cgccagcgct atagggtgcca acgaagttcg ggtgctgttc      900
atcaaaaagc cccttcccca tcagtagtgt cgcattgagcg atgggcgttt cgcctatcca      960
gcgctgcaac agtggtcgta aacaaaaacg cccggcaaga aagtcggcca atagcgcaat    1020
gcgccgactg ttcattcaggc actgacgggc gtgataacga aaggccgtct ccacgccgct    1080
ttgcgcttca tgcacgggca acgccagcgc ctgcgtaggt gggatggccg tttttttcgc    1140
cacatcggcg ggcaacatga tgtatcctgg cctgcgtgcg gcaagcattt caccacaacac    1200
gcggtcaatc tcgaaacagg cgttctgttc atctaataatt gcgctggcag cggatatcgc    1260
ctgactcatg cgataaaaat gacgaaaatc gccgtcaccg agggatatgt gcatcaattc    1320
gccacgctgc tgcgcagcgc tacagggcgc gccgacgata tgcaagaccg ggacatatc    1380
cgcgtaactg cccgcgatac cgtaaatagc gctaagttct cccacgcaa aggtggtgag    1440
tagcgctcca gcgcccgcata tgcgcgcata gccgtccgcg gcataagcgg cgttcagctc    1500
attggcgcac cccacccaac gcagggtcgg gtgggtcaatc acatgggtcaa gaaactgcaa    1560
gttataatcg cccggtacgc caaaaagatg gccaatgccg catcctgccg gtctgtccag    1620
caaatagtcg gccacggtat aggggttttg cat                                     1653

```

```

<210> 195
<211> 550
<212> PRT
<213> Salmonella typhimurium
<400> 195

```

```

Met Gln Asn Pro Tyr Thr Val Ala Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu Ala
1          5          10          15

```

```

Gly Cys Gly Ile Gly His Leu Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu
20          25          30

```

```

Gln Phe Leu Asp His Val Ile Asp His Pro Thr Leu Arg Trp Val Gly
35          40          45

```

```

Cys Ala Asn Glu Leu Asn Ala Ala Tyr Ala Ala Asp Gly Tyr Ala Arg
50          55          60

```

```

Met Ser Gly Ala Gly Ala Leu Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu
65          70          75          80

```

```

Ser Ala Ile Asn Gly Ile Ala Gly Ser Tyr Ala Glu Tyr Val Pro Val
85          90          95

```

```

Leu His Ile Val Gly Ala Pro Cys Ser Ala Ala Gln Gln Arg Gly Glu
100         105         110

```

```

Leu Met His His Thr Leu Gly Asp Gly Asp Phe Arg His Phe Tyr Arg
115        120        125

```

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

385 390 395 400

Leu Gln Pro Leu Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Ser Leu Pro Ala Ala Phe
405 410 415

Gly Ala Gln Thr Ala Cys Pro Asp Arg Arg Val Ile Leu Ile Ile Gly
420 425 430

Asp Gly Ala Ala Gln Leu Thr Ile Gln Glu Met Gly Ser Met Leu Arg
435 440 445

Asp Gly Gln Ala Pro Val Ile Leu Leu Leu Asn Asn Asp Gly Tyr Thr
450 455 460

Val Glu Arg Ala Ile His Gly Ala Ala Gln Arg Tyr Asn Asp Ile Ala
465 470 475 480

Ser Trp Asn Trp Thr Gln Ile Pro Pro Ala Leu Asn Ala Ala Gln Gln
485 490 495

Ala Glu Cys Trp Arg Val Thr Gln Ala Ile Gln Leu Ala Glu Val Leu
500 505 510

Glu Arg Leu Ala Arg Pro Gln Arg Leu Ser Phe Ile Glu Val Met Leu
515 520 525

Pro Lys Ala Asp Leu Pro Glu Leu Leu Arg Thr Val Thr Arg Ala Leu
530 535 540

Glu Ala Arg Asn Gly Gly
545 550

<210>	196
<211>	1665
<212>	ДНК
<213>	Clostridium acetobutylicum

<400>	196										
ttgaagagtg	aatacacaaat	tggaagatat	ttgttagacc	gtttatcaga	gttgggtatt						60
cggcatatct	ttggtgtacc	tggagattac	aatctatcct	ttttagacta	tataatggag						120
tacaaaggga	tagattgggt	tggaaattgc	aatgaattga	atgctgggta	tgctgctgat						180
ggatatgcaa	gaataaatgg	aattggagcc	atacttaca	catttggtgt	tggagaatta						240
agtgccatta	acgcaattgc	tggggcatac	gctgagcaag	ttccagttgt	taaaattaca						300
ggtatcccca	cagcaaaagt	tagggacaat	ggattatatg	tacaccacac	attaggtgac						360
ggaagggtttg	atcacttttt	tgaaatgttt	agagaagtaa	cagttgctga	ggcattacta						420
agcgaagaaa	atgcagcaca	agaaattgat	cgtgttctta	tttcatgctg	gagacaaaaa						480
cgtcctgttc	ttataaattt	accgattgat	gtatatgata	aaccaattaa	caaaccatta						540

aagccattac tcgattatac tatttcaagt aacaaagagg ctgcatgtga atttggtaca 600
gaaatagtag ctataataaa tagggcaaaa aagcctgtta ttcttgaga ttatggagta 660
tatcggtacc aagttcaaca tgtgcctaaa aacttgccg aaaaaaccgg atttcctgtg 720
gctacactaa gtatgggaaa aggtgttttc aatgaagcac accctcaatt taitgggtgtt 780
tataatgggtg atgtaagttc tccttattta aggcagcgag ttgatgaagc agactgcatt 840
attagcgttg gtgtaaaatt gacggattca accacagggg gattttctca tggattttct 900
aaaaggaatg taattcacat tgatcctttt tcaataaagg caaaaggtaa aaaatatgca 960
cctattacga tgaaagatgc tttacagaa ttaacaagta aaattgagca tagaaacttt 1020
gaggatttag atataaagcc ttacaaatca gataatcaaa agtattttgc aaaagagaag 1080
ccaattacac aaaaacgttt ttttgagcgt attgctcact ttataaaaga aaaagatgta 1140
ttattagcag aacagggtag atgctttttt ggtgcgtcaa ccatacaact acccaaagat 1200
gcaactttta ttggtcaacc tttatgggga tctattggat acacacttcc tgctttatta 1260
ggttcacaat tagctgatca aaaaaggcgt aatattcttt taattgggga tgggtgcattt 1320
caaagacag cacaagaaat ttcaacaatg cttcgtttac aaatcaaacc tattattttt 1380
ttaattaata acgatgggta tacaattgaa cggtctattc atggtagaga acaagtatat 1440
aacaatattc aaatgtggcg atatcataat gttccaaagg ttttaggtcc taaagaatgc 1500
agcttaacct ttaaagtaca aagtgaact gaacttgaaa aggtcttttt agtggcagat 1560
aaggattgtg aacatttgat ttttatagaa gttgttatgg atcggtatga taaacccgag 1620
cctttagaac gtctttcgaa acgttttgca aatcaaaata attag 1665

<210> 197
<211> 554
<212> PRT
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 197

Met Lys Ser Glu Tyr Thr Ile Gly Arg Tyr Leu Leu Asp Arg Leu Ser
1 5 10 15

Glu Leu Gly Ile Arg His Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu
20 25 30

Ser Phe Leu Asp Tyr Ile Met Glu Tyr Lys Gly Ile Asp Trp Val Gly
35 40 45

Asn Cys Asn Glu Leu Asn Ala Gly Tyr Ala Ala Asp Gly Tyr Ala Arg
50 55 60

Ile Asn Gly Ile Gly Ala Ile Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu
65 70 75 80

Ser Ala Ile Asn Ala Ile Ala Gly Ala Tyr Ala Glu Gln Val Pro Val

[illegible]

Gln Lys Tyr Phe Ala Lys Glu Lys Pro Ile Thr Gln Lys Arg Phe Phe
 355 360 365
 Glu Arg Ile Ala His Phe Ile Lys Glu Lys Asp Val Leu Leu Ala Glu
 370 375 380
 Gln Gly Thr Cys Phe Phe Gly Ala Ser Thr Ile Gln Leu Pro Lys Asp
 385 390 395 400
 Ala Thr Phe Ile Gly Gln Pro Leu Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Leu
 405 410 415
 Pro Ala Leu Leu Gly Ser Gln Leu Ala Asp Gln Lys Arg Arg Asn Ile
 420 425 430
 Leu Leu Ile Gly Asp Gly Ala Phe Gln Met Thr Ala Gln Glu Ile Ser
 435 440 445
 Thr Met Leu Arg Leu Gln Ile Lys Pro Ile Ile Phe Leu Ile Asn Asn
 450 455 460
 Asp Gly Tyr Thr Ile Glu Arg Ala Ile His Gly Arg Glu Gln Val Tyr
 465 470 475 480
 Asn Asn Ile Gln Met Trp Arg Tyr His Asn Val Pro Lys Val Leu Gly
 485 490 495
 Pro Lys Glu Cys Ser Leu Thr Phe Lys Val Gln Ser Glu Thr Glu Leu
 500 505 510
 Glu Lys Ala Leu Leu Val Ala Asp Lys Asp Cys Glu His Leu Ile Phe
 515 520 525
 Ile Glu Val Val Met Asp Arg Tyr Asp Lys Pro Glu Pro Leu Glu Arg
 530 535 540
 Leu Ser Lys Arg Phe Ala Asn Gln Asn Asn
 545 550

<210> 198

<211> 939

<212> ДНК

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 198

atgcctgcta cgtaaagaa ttcttctgct acattaaaac taaatactgg tgcctccatt	60
ccagtgttgg gtttcggcac ttggcggtcc gttgacaata acggttacca ttctgtaatt	120
gcagctttga aagctggata cagacacatt gatgctgcgg ctatctattt gaatgaagaa	180
gaagttggca gggctattaa agattccgga gtccctcgtg aggaaatttt tattactact	240
aagctttggg gtacggaaca acgtgatccg gaagctgctc taaacaagtc tttgaaaaga	300

ctaggcttgg attatgttga cctatatctg atgcattggc cagtgccttt gaaaaccgac 360
 agagttactg atggtaacgt tctgtgcatt ccaacattag aagatggcac tgttgacatc 420
 gatactaagg aatggaattt tatcaagacg tgggagttga tgcaagagtt gccaaagacg 480
 ggcaaaacta aagccgttgg tgtctctaatt ttttctatta acaacattaa agaattatta 540
 gaatctccaa ataacaaggt ggtaccagct actaatcaaa ttgaaattca tccattgcta 600
 ccacaagacg aattgattgc cttttgtaag gaaaagggtt ttgttggtga agcctactca 660
 ccatttggga gtgctaattgc tcctttacta aaagagcaag caattattga tatggctaaa 720
 aagcacggcg ttgagccagc acagcttatt atcagttgga gtattcaaag aggctacgtt 780
 gttctggcca aatcggttaa tcctgaaaga attgtatcca attttaagat tttcactctg 840
 cctgaggatg atttcaagac tattagtaac ctatccaaag tgcattgtac aaagagagtc 900
 gttgatatga agtggggatc cttcccaatt ttccaatga 939

<210> 199

<211> 312

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 199

Met Pro Ala Thr Leu Lys Asn Ser Ser Ala Thr Leu Lys Leu Asn Thr
1 5 10 15

Gly Ala Ser Ile Pro Val Leu Gly Phe Gly Thr Trp Arg Ser Val Asp
20 25 30

Asn Asn Gly Tyr His Ser Val Ile Ala Ala Leu Lys Ala Gly Tyr Arg
35 40 45

His Ile Asp Ala Ala Ala Ile Tyr Leu Asn Glu Glu Glu Val Gly Arg
50 55 60

Ala Ile Lys Asp Ser Gly Val Pro Arg Glu Glu Ile Phe Ile Thr Thr
65 70 75 80

Lys Leu Trp Gly Thr Glu Gln Arg Asp Pro Glu Ala Ala Leu Asn Lys
85 90 95

Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Leu Tyr Leu Met His
100 105 110

Trp Pro Val Pro Leu Lys Thr Asp Arg Val Thr Asp Gly Asn Val Leu
115 120 125

Cys Ile Pro Thr Leu Glu Asp Gly Thr Val Asp Ile Asp Thr Lys Glu
130 135 140

Trp Asn Phe Ile Lys Thr Trp Glu Leu Met Gln Glu Leu Pro Lys Thr
 145 150 155 160
 Gly Lys Thr Lys Ala Val Gly Val Ser Asn Phe Ser Ile Asn Asn Ile
 165 170 175
 Lys Glu Leu Leu Glu Ser Pro Asn Asn Lys Val Val Pro Ala Thr Asn
 180 185 190
 Gln Ile Glu Ile His Pro Leu Leu Pro Gln Asp Glu Leu Ile Ala Phe
 195 200 205
 Cys Lys Glu Lys Gly Ile Val Val Glu Ala Tyr Ser Pro Phe Gly Ser
 210 215 220
 Ala Asn Ala Pro Leu Leu Lys Glu Gln Ala Ile Ile Asp Met Ala Lys
 225 230 235 240
 Lys His Gly Val Glu Pro Ala Gln Leu Ile Ile Ser Trp Ser Ile Gln
 245 250 255
 Arg Gly Tyr Val Val Leu Ala Lys Ser Val Asn Pro Glu Arg Ile Val
 260 265 270
 Ser Asn Phe Lys Ile Phe Thr Leu Pro Glu Asp Asp Phe Lys Thr Ile
 275 280 285
 Ser Asn Leu Ser Lys Val His Gly Thr Lys Arg Val Val Asp Met Lys
 290 295 300
 Trp Gly Ser Phe Pro Ile Phe Gln
 305 310

<210> 200
 <211> 1083
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 200
 ctagtctgaa aattctttgt cgtagccgac taaggtaaatt ctatatctaa cgtcaccctt 60
 ttccatcctt tcgaaggctt catggacgcc ggcttcacca acaggtaattg ttccaccca 120
 aattttgata tctttttcag agactaattt caagagttgg ttcaattctt tgatggaacc 180
 taaagcactg taagaaatgg agacagcctt taagccatat ggcttttagcg ataacatttc 240
 gtgttgttct ggtatagaga ttgagacaat tctaccacca accttcatag cttttggcat 300
 aatgttgaag tcaatgtcgg taaggaggga agcacagact acaatcaggt cgaagggtgc 360
 aaagtacttt tcacccaat caccttcttc taatgtagca atgtagtgat cggcgcccat 420
 cttcattgca tcttctcttt ttctcgaaga acgagaaata acatacgtct ctgcccccat 480
 ggctttggaa atcaatgtac ccatactgcc gataccacca agaccaacta taccaacttt 540

```

tttacctgga ccgcaaccgt tacgaaccaa tggagagtac acagtcaaac caccacataa 600
tagtggagca gccaaatgtg atggaatatt ctctgggata ggcaccacaa aatgttcatg 660
aactctgacg tagtttgcag agccaccctg cgacacatag ccgtcttcat aaggctgact 720
gtatgtggta acaaacttgg tgcagtatgg ttcattatca ttcttacaac ggtcacattc 780
caagcatgaa aagacttgag cacctacacc aacacgttga ccgactttca acccactgtt 840
tgacttgggc cctagcttga caactttacc aacgatttca tgaccaacga ctagcggcat 900
cttcatattg cccaatgac cagctgcaca atgaatatca ctaccgcaga caccacatgc 960
ttcgatctta atgtcaatgt catgatcgta aaatggtttt gggtcatact ttgtcttctt 1020
tgggtttttc caatcttcgt gtgattgaat agcgatacct tcaaatttct caggataaga 1080
cat 1083

```

```

<210> 201
<211> 360
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 201

```

```

Met Ser Tyr Pro Glu Lys Phe Glu Gly Ile Ala Ile Gln Ser His Glu
1      5      10     15

```

```

Asp Trp Lys Asn Pro Lys Lys Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Pro Phe Tyr
20     25     30

```

```

Asp His Asp Ile Asp Ile Lys Ile Glu Ala Cys Gly Val Cys Gly Ser
35     40     45

```

```

Asp Ile His Cys Ala Ala Gly His Trp Gly Asn Met Lys Met Pro Leu
50     55     60

```

```

Val Val Gly His Glu Ile Val Gly Lys Val Val Lys Leu Gly Pro Lys
65     70     75     80

```

```

Ser Asn Ser Gly Leu Lys Val Gly Gln Arg Val Gly Val Gly Ala Gln
85     90     95

```

```

Val Phe Ser Cys Leu Glu Cys Asp Arg Cys Lys Asn Asp Asn Glu Pro
100    105    110

```

```

Tyr Cys Thr Lys Phe Val Thr Thr Tyr Ser Gln Pro Tyr Glu Asp Gly
115    120    125

```

```

Tyr Val Ser Gln Gly Gly Tyr Ala Asn Tyr Val Arg Val His Glu His
130    135    140

```

```

Phe Val Val Pro Ile Pro Glu Asn Ile Pro Ser His Leu Ala Ala Pro
145    150    155    160

```

Leu Leu Cys Gly Gly Leu Thr Val Tyr Ser Pro Leu Val Arg Asn Gly
 165 170 175
 Cys Gly Pro Gly Lys Lys Val Gly Ile Val Gly Leu Gly Gly Ile Gly
 180 185 190
 Ser Met Gly Thr Leu Ile Ser Lys Ala Met Gly Ala Glu Thr Tyr Val
 195 200 205
 Ile Ser Arg Ser Ser Arg Lys Arg Glu Asp Ala Met Lys Met Gly Ala
 210 215 220
 Asp His Tyr Ile Ala Thr Leu Glu Glu Gly Asp Trp Gly Glu Lys Tyr
 225 230 235 240
 Phe Asp Thr Phe Asp Leu Ile Val Val Cys Ala Ser Ser Leu Thr Asp
 245 250 255
 Ile Asp Phe Asn Ile Met Pro Lys Ala Met Lys Val Gly Gly Arg Ile
 260 265 270
 Val Ser Ile Ser Ile Pro Glu Gln His Glu Met Leu Ser Leu Lys Pro
 275 280 285
 Tyr Gly Leu Lys Ala Val Ser Ile Ser Tyr Ser Ala Leu Gly Ser Ile
 290 295 300
 Lys Glu Leu Asn Gln Leu Leu Lys Leu Val Ser Glu Lys Asp Ile Lys
 305 310 315 320
 Ile Trp Val Glu Thr Leu Pro Val Gly Glu Ala Gly Val His Glu Ala
 325 330 335
 Phe Glu Arg Met Glu Lys Gly Asp Val Arg Tyr Arg Phe Thr Leu Val
 340 345 350
 Gly Tyr Asp Lys Glu Phe Ser Asp
 355 360

<210> 202

<211> 1170

<212> ДНК

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 202

ttaataagat ttttaaata tctcaagaac atcctctgca tttattggtc ttaaacttcc	60
tattgttcct ccagaatttc taacagcttg ctttgccatt agttctagtt tatcttttcc	120
tattccaact tctctaagct ttgaaggaa acccaatgaa ttaaagtatt ctctcgtatt	180
tttaatagcc tctcgtgcta tttcatagtt atctttgttc ttgtctattc cccaaacatt	240

tattccataa gaaacaaatt tatgaagtgt atcgtcattt agaatatatt ccatccaatt 300
 aggtgttaaa attgcaagtc ctacaccatg tgttatatca taatatgcac ttaactcgtg 360
 ttccatagga tgacaactcc attttctatc cttaccaagt gataatagac cttttatagc 420
 taaacttgaa gcccacatca aattagctct agcctcgtaa tcatcagtct tctccattgc 480
 tatttttcca tactttatac atgttcttaa gattgcttct gctataccgt cctgcacata 540
 agcaccttca acaccactaa agtaagattc aaagggtgtga ctcataatgt cagctgttcc 600
 cgctgctggt tgatttttag gtactgtaaa agtatatgta ggatctaaca ctgaaaattt 660
 aggtctcata tcatcatgtc ctactccaag cttttcatta gtctccatat ttgaaattac 720
 tgcaatttga tccatttcag accctgttgc tgaaagagta agtatacttg caattggaag 780
 aacttttagtt attttagatg gatctttaac catgtcccat gtatcgccat cataataaac 840
 tccagctgca attaccttag aacagtctat tgcacttcct cccctattg ctaataactaa 900
 atccacatta ttttctctac atatttctat gccttttttt actgttggtta tcctaggatt 960
 tggctctact cctgaaagtt catagaaagc tatattgttt tcttttaata tagctgttgc 1020
 tctatcatat ataccgttcc tttttatact tcctccgcca taaactataa gcactcttga 1080
 gccatatttc ttaatttctt ctccaattac gtctattttt ccttttccaa aaaaaacttt 1140
 agttggtatt gaataatcaa aacttagcat 1170

<210> 203
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 203

Met Leu Ser Phe Asp Tyr Ser Ile Pro Thr Lys Val Phe Phe Gly Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Ile Asp Val Ile Gly Glu Glu Ile Lys Lys Tyr Gly Ser Arg
 20 25 30

Val Leu Ile Val Tyr Gly Gly Gly Ser Ile Lys Arg Asn Gly Ile Tyr
 35 40 45

Asp Arg Ala Thr Ala Ile Leu Lys Glu Asn Asn Ile Ala Phe Tyr Glu
 50 55 60

Leu Ser Gly Val Glu Pro Asn Pro Arg Ile Thr Thr Val Lys Lys Gly
 65 70 75 80

Ile Glu Ile Cys Arg Glu Asn Asn Val Asp Leu Val Leu Ala Ile Gly
 85 90 95

Gly Gly Ser Ala Ile Asp Cys Ser Lys Val Ile Ala Ala Gly Val Tyr
 100 105 110

Tyr Asp Gly Asp Thr Trp Asp Met Val Lys Asp Pro Ser Lys Ile Thr
 115 120 125
 Lys Val Leu Pro Ile Ala Ser Ile Leu Thr Leu Ser Ala Thr Gly Ser
 130 135 140
 Glu Met Asp Gln Ile Ala Val Ile Ser Asn Met Glu Thr Asn Glu Lys
 145 150 155 160
 Leu Gly Val Gly His Asp Asp Met Arg Pro Lys Phe Ser Val Leu Asp
 165 170 175
 Pro Thr Tyr Thr Phe Thr Val Pro Lys Asn Gln Thr Ala Ala Gly Thr
 180 185 190
 Ala Asp Ile Met Ser His Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Ser Gly Val Glu
 195 200 205
 Gly Ala Tyr Val Gln Asp Gly Ile Ala Glu Ala Ile Leu Arg Thr Cys
 210 215 220
 Ile Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Met Glu Lys Thr Asp Asp Tyr Glu Ala
 225 230 235 240
 Arg Ala Asn Leu Met Trp Ala Ser Ser Leu Ala Ile Asn Gly Leu Leu
 245 250 255
 Ser Leu Gly Lys Asp Arg Lys Trp Ser Cys His Pro Met Glu His Glu
 260 265 270
 Leu Ser Ala Tyr Tyr Asp Ile Thr His Gly Val Gly Leu Ala Ile Leu
 275 280 285
 Thr Pro Asn Trp Met Glu Tyr Ile Leu Asn Asp Asp Thr Leu His Lys
 290 295 300
 Phe Val Ser Tyr Gly Ile Asn Val Trp Gly Ile Asp Lys Asn Lys Asp
 305 310 315 320
 Asn Tyr Glu Ile Ala Arg Glu Ala Ile Lys Asn Thr Arg Glu Tyr Phe
 325 330 335
 Asn Ser Leu Gly Ile Pro Ser Lys Leu Arg Glu Val Gly Ile Gly Lys
 340 345 350
 Asp Lys Leu Glu Leu Met Ala Lys Gln Ala Val Arg Asn Ser Gly Gly
 355 360 365
 Thr Ile Gly Ser Leu Arg Pro Ile Asn Ala Glu Asp Val Leu Glu Ile

370

375

380

Phe Lys Lys Ser Tyr
385

<210> 204
<211> 390
<212> PRT
<213> Clostridium acetobutylicum
<400> 204

Met Val Asp Phe Glu Tyr Ser Ile Pro Thr Arg Ile Phe Phe Gly Lys
1 5 10 15

Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Arg Glu Leu Lys Lys Tyr Gly Ser Lys
20 25 30

Val Leu Ile Val Tyr Gly Gly Gly Ser Ile Lys Arg Asn Gly Ile Tyr
35 40 45

Asp Lys Ala Val Ser Ile Leu Glu Lys Asn Ser Ile Lys Phe Tyr Glu
50 55 60

Leu Ala Gly Val Glu Pro Asn Pro Arg Val Thr Thr Val Glu Lys Gly
65 70 75 80

Val Lys Ile Cys Arg Glu Asn Gly Val Glu Val Val Leu Ala Ile Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Ala Ile Asp Cys Ala Lys Val Ile Ala Ala Ala Cys Glu
100 105 110

Tyr Asp Gly Asn Pro Trp Asp Ile Val Leu Asp Gly Ser Lys Ile Lys
115 120 125

Arg Val Leu Pro Ile Ala Ser Ile Leu Thr Ile Ala Ala Thr Gly Ser
130 135 140

Glu Met Asp Thr Trp Ala Val Ile Asn Asn Met Asp Thr Asn Glu Lys
145 150 155 160

Leu Ile Ala Ala His Pro Asp Met Ala Pro Lys Phe Ser Ile Leu Asp
165 170 175

Pro Thr Tyr Thr Tyr Thr Val Pro Thr Asn Gln Thr Ala Ala Gly Thr
180 185 190

Ala Asp Ile Met Ser His Ile Phe Glu Val Tyr Phe Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Asp Arg Met Ala Glu Ala Leu Leu Arg Thr Cys

210	215	220
Ile Lys Tyr Gly Gly 225	Ile Ala Leu Glu Lys 230	Pro Asp Asp Tyr Glu Ala 235 240
Arg Ala Asn Leu Met 245	Trp Ala Ser Ser 250	Leu Ala Ile Asn Gly Leu Leu 255
Thr Tyr Gly Lys 260	Asp Thr Asn Trp Ser 265	Val His Leu Met Glu His Glu 270
Leu Ser Ala Tyr Tyr Asp Ile 275	Thr His Gly Val Gly 280	Leu Ala Ile Leu 285
Thr Pro Asn Trp Met Glu 290	Tyr Ile Leu Asn Asn 295	Asp Thr Val Tyr Lys 300
Phe Val Glu Tyr Gly Val 305	Asn Val Trp Gly Ile 310	Asp Lys Glu Lys Asn 315 320
His Tyr Asp Ile Ala His Gln Ala Ile 325	Gln Lys Thr Arg Asp Tyr Phe 330	335
Val Asn Val Leu Gly Leu Pro Ser 340	Arg Leu Arg Asp Val Gly Ile Glu 345	350
Glu Glu Lys Leu Asp Ile Met Ala Lys Glu Ser Val 355	Lys Leu Thr Gly 360	365
Gly Thr Ile Gly Asn Leu Arg Pro Val Asn Ala Ser Glu Val Leu Gln 370	375	380
Ile Phe Lys Lys Ser Val 385	390	

<210> 205
 <211> 993
 <212> ДНК
 <213> Bacillus subtilis

<400> 205	
atgagtacaa accgacatca agcactaggg ctgactgatc aggaagccgt tgatatgtat	60
agaaccatgc tgtagcaag aaaaatcgat gaaagaatgt ggctgttaaa ccgttctggc	120
aaaattccat ttgtaatctc ttgtcaagga caggaagcag cacaggtagg agcggctttc	180
gcacttgacc gtgaaatgga ttatgtattg ccgtactaca gagacatggg tgtcgtgctc	240
gcgtttggca tgacagcaaa ggacttaatg atgtccgggt ttgcaaaagc agcagatccg	300
aactcaggag gccgccagat gccgggacat ttcggacaaa agaaaaaccg cattgtgacg	360
ggatcatctc cggttacaac gcaagtgccg caccgagtcg gtattgcgct tgcgggacgt	420

atggagaaaa aggatatcgc agcctttggtt acattcgggg aagggtcttc aaaccaaggc 480
gatttccatg aaggggcaaa ctttgccgct gtccataagc tgccgggttat tttcatgtgt 540
gaaaacaaca aatacgcaat ctcaagtgcct tacgataagc aagtcgcatg tgagaacatt 600
tccgaccgtg ccataggcta tgggatgcct ggcgtaactg tgaatggaaa tgatccgctg 660
gaagtattatc aagcgggttaa agaagcacgc gaaagggcac gcagaggaga agggccgcaca 720
ttaattgaaa cgatttctta ccgccttaca ccacattcca gtgatgacga tgacagcagc 780
tacagaggcc gtgaagaagt agaggaagcg aaaaaaagt atccccctgct tacttatcaa 840
gcttacttaa aggaaacagg cctgctgtcc gatgagatag aacaaacat gctggatgaa 900
attatggcaa tcgtaaata agcgacggat gaagcggaga acgccccata tgcagctcct 960
gagtcagcgc ttgattatgt ttatgcgaag tag 993

<210> 206
<211> 330
<212> PRT
<213> *Bacillus subtilis*
<400> 206

Met Ser Thr Asn Arg His Gln Ala Leu Gly Leu Thr Asp Gln Glu Ala
1 5 10 15

Val Asp Met Tyr Arg Thr Met Leu Leu Ala Arg Lys Ile Asp Glu Arg
20 25 30

Met Trp Leu Leu Asn Arg Ser Gly Lys Ile Pro Phe Val Ile Ser Cys
35 40 45

Gln Gly Gln Glu Ala Ala Gln Val Gly Ala Ala Phe Ala Leu Asp Arg
50 55 60

Glu Met Asp Tyr Val Leu Pro Tyr Tyr Arg Asp Met Gly Val Val Leu
65 70 75 80

Ala Phe Gly Met Thr Ala Lys Asp Leu Met Met Ser Gly Phe Ala Lys
85 90 95

Ala Ala Asp Pro Asn Ser Gly Gly Arg Gln Met Pro Gly His Phe Gly
100 105 110

Gln Lys Lys Asn Arg Ile Val Thr Gly Ser Ser Pro Val Thr Thr Gln
115 120 125

Val Pro His Ala Val Gly Ile Ala Leu Ala Gly Arg Met Glu Lys Lys
130 135 140

Asp Ile Ala Ala Phe Val Thr Phe Gly Glu Gly Ser Ser Asn Gln Gly
145 150 155 160

Asp Phe His Glu Gly Ala Asn Phe Ala Ala Val His Lys Leu Pro Val
 165 170 175
 Ile Phe Met Cys Glu Asn Asn Lys Tyr Ala Ile Ser Val Pro Tyr Asp
 180 185 190
 Lys Gln Val Ala Cys Glu Asn Ile Ser Asp Arg Ala Ile Gly Tyr Gly
 195 200 205
 Met Pro Gly Val Thr Val Asn Gly Asn Asp Pro Leu Glu Val Tyr Gln
 210 215 220
 Ala Val Lys Glu Ala Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu Gly Pro Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Glu Thr Ile Ser Tyr Arg Leu Thr Pro His Ser Ser Asp Asp
 245 250 255
 Asp Asp Ser Ser Tyr Arg Gly Arg Glu Glu Val Glu Glu Ala Lys Lys
 260 265 270
 Ser Asp Pro Leu Leu Thr Tyr Gln Ala Tyr Leu Lys Glu Thr Gly Leu
 275 280 285
 Leu Ser Asp Glu Ile Glu Gln Thr Met Leu Asp Glu Ile Met Ala Ile
 290 295 300
 Val Asn Glu Ala Thr Asp Glu Ala Glu Asn Ala Pro Tyr Ala Ala Pro
 305 310 315 320
 Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Val Tyr Ala Lys
 325 330

<210> 207

<211> 984

<212> ДНК

<213> Bacillus subtilis

<400> 207

atgtcagtaa tgtcatatat tgatgcaatc aatttggcga tgaaagaaga aatggaacga	60
gattctcgcg ttttcgtcct tggggaagat gtaggaagaa aaggcgggtg gtttaaagcg	120
acagcgggac tctatgaaca atttggggaa gagcgcgtta tggatacgcc gcttgctgaa	180
tctgcaatcg caggagtcgg tatcgagcg gcaatgtacg gaatgagacc gattgctgaa	240
atgcagtttg ctgatttcat tatgccggca gtcaacaaaa ttatttctga agcgggctaaa	300
atccgctacc gcagcaacaa tgactggagc tgtccgattg tcgtcagagc gccatacggc	360
ggaggcgtgc acggagccct gtatcattct caatcagtcg aagcaatttt cgccaaccag	420
cccggactga aaattgtcat gccatcaaca ccatatgacg cgaaagggtt cttaaaagcc	480

gcagttcgtg acgaagaccc cgtgctgttt ttgagcaca agcgggcata ccgtctgata 540
 aagggcgagg ttccggctga tgattatgtc ctgccaatcg gcaaggcgga cgtaaaaagg 600
 gaaggcgacg acatcacagt gatcacatac ggcctgtgtg tccacttcgc cttacaagct 660
 gcagaacgtc tcgaaaaaga tggcatttca gcgcatgtgg tggatttaag aacagtttac 720
 ccgcttgata aagaagccat catcgaagct gcgtccaaaa ctggaaaggt tcttttggtc 780
 acagaagata caaagaagg cagcatcatg agcgaagtag ccgcaattat atccgagcat 840
 tgtctgttcg acttagacgc gccgatcaaa cggcttgtag gtcctgatat tccggctatg 900
 ccttatgcgc cgacaatgga aaaatacttt atgggtcaacc ctgataaagt ggaagcggcg 960
 atgagagaat tagcggagtt ttaa 984

<210> 208
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<400> 208

Met Ser Val Met Ser Tyr Ile Asp Ala Ile Asn Leu Ala Met Lys Glu
 1 5 10 15

Glu Met Glu Arg Asp Ser Arg Val Phe Val Leu Gly Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Arg Lys Gly Gly Val Phe Lys Ala Thr Ala Gly Leu Tyr Glu Gln Phe
 35 40 45

Gly Glu Glu Arg Val Met Asp Thr Pro Leu Ala Glu Ser Ala Ile Ala
 50 55 60

Gly Val Gly Ile Gly Ala Ala Met Tyr Gly Met Arg Pro Ile Ala Glu
 65 70 75 80

Met Gln Phe Ala Asp Phe Ile Met Pro Ala Val Asn Gln Ile Ile Ser
 85 90 95

Glu Ala Ala Lys Ile Arg Tyr Arg Ser Asn Asn Asp Trp Ser Cys Pro
 100 105 110

Ile Val Val Arg Ala Pro Tyr Gly Gly Gly Val His Gly Ala Leu Tyr
 115 120 125

His Ser Gln Ser Val Glu Ala Ile Phe Ala Asn Gln Pro Gly Leu Lys
 130 135 140

Ile Val Met Pro Ser Thr Pro Tyr Asp Ala Lys Gly Leu Leu Lys Ala
 145 150 155 160

Ala Val Arg Asp Glu Asp Pro Val Leu Phe Phe Glu His Lys Arg Ala

165 170 175
 Tyr Arg Leu Ile Lys Gly Glu Val Pro Ala Asp Asp Tyr Val Leu Pro
 180 185 190
 Ile Gly Lys Ala Asp Val Lys Arg Glu Gly Asp Asp Ile Thr Val Ile
 195 200 205
 Thr Tyr Gly Leu Cys Val His Phe Ala Leu Gln Ala Ala Glu Arg Leu
 210 215 220
 Glu Lys Asp Gly Ile Ser Ala His Val Val Asp Leu Arg Thr Val Tyr
 225 230 235 240
 Pro Leu Asp Lys Glu Ala Ile Ile Glu Ala Ala Ser Lys Thr Gly Lys
 245 250 255
 Val Leu Leu Val Thr Glu Asp Thr Lys Glu Gly Ser Ile Met Ser Glu
 260 265 270
 Val Ala Ala Ile Ile Ser Glu His Cys Leu Phe Asp Leu Asp Ala Pro
 275 280 285
 Ile Lys Arg Leu Ala Gly Pro Asp Ile Pro Ala Met Pro Tyr Ala Pro
 290 295 300
 Thr Met Glu Lys Tyr Phe Met Val Asn Pro Asp Lys Val Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Met Arg Glu Leu Ala Glu Phe
 325

<210> 209
 <211> 1275
 <212> ДНК
 <213> Bacillus subtilis

<400> 209
 atggcaattg aacaaatgac gatgccgcag cttggagaaa gcgtaacaga ggggacgatc 60
 agcaaatggc ttgtcgcccc cggtgataaa gtgaacaaat acgatccgat' cgcggaagtc 120
 atgacagata aggtaaatgc agaggttccg tcttctttta ctggtacgat aacagagctt 180
 gtgggagaag aaggccaaac cctgcaagtc ggagaaatga ttgcaaaat tgaaacagaa 240
 ggcgcgaaatc cggctgaaca aaaacaagaa cagccagcag catcagaagc cgctgagaac 300
 cctgttgcaa aaagtgcctg agcagccgat cagcccaata aaaagcgcta ctcgccagct 360
 gttctccgtt tggccggaga gcacggcatt gacctcgatc aagtgcagg aactgggtgcc 420
 ggcgggcgca tcacacgaaa agatattcag cgcttaattg aaacaggcgg cgtgcaagaa 480
 cagaatcctg aggagctgaa aacagcagct cctgcaccga agtctgcac aaaacctgag 540

```

ccaaaagaag agacgtcata tcctgctgtc gcagccggtg ataaagaaat ccctgtcaca    600
gggtgaagaa aagcaattgc ttccaatatg aagcgaagca aaacagaaat tccgcatgct    660
tggaacgatga tggaagtcga cgtcacaaat atggttgcat atcgcaacag tataaaagat    720
tcttttaaga agacagaagg ctttaattta acgttcttcg ctttttttgt aaaagcggtc    780
gctcaggcgt taaaagaatt cccgcaaatt aatagcatgt gggcggggga caaaattatt    840
cagaaaaagg atatcaatat ttcaattgca gttgccacag aggattcttt atttgttccg    900
gtgattaaaa acgctgatga aaaaacaatt aaaggcattg cgaaagacat taccggccta    960
gctaaaaaag taagagacgg aaaactcact gcagatgaca tgcagggagg cacgtttacc   1020
gtcaacaaca caggttcgtt cgggtctgtt cagtcgatgg gcattatcaa ctaccctcag   1080
gctgcgattc ttcaagtaga atccatcgct aaacgcccgg ttgtcatgga caatggcatg   1140
attgctgtca gagacatggt taatctgtgc ctgtcattag atcacagagt gcttgacggt   1200
ctcgtgtgcy gacgattcct cggacgagtg aaacaaattt tagaatcgat tgacgagaag   1260
acatctgttt actaa                                                    1275

```

```

<210> 210
<211> 424
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis
<400> 210

```

```

Met Ala Ile Glu Gln Met Thr Met Pro Gln Leu Gly Glu Ser Val Thr
1          5          10          15

Glu Gly Thr Ile Ser Lys Trp Leu Val Ala Pro Gly Asp Lys Val Asn
          20          25          30

Lys Tyr Asp Pro Ile Ala Glu Val Met Thr Asp Lys Val Asn Ala Glu
          35          40          45

Val Pro Ser Ser Phe Thr Gly Thr Ile Thr Glu Leu Val Gly Glu Glu
          50          55          60

Gly Gln Thr Leu Gln Val Gly Glu Met Ile Cys Lys Ile Glu Thr Glu
          65          70          75          80

Gly Ala Asn Pro Ala Glu Gln Lys Gln Glu Gln Pro Ala Ala Ser Glu
          85          90          95

Ala Ala Glu Asn Pro Val Ala Lys Ser Ala Gly Ala Ala Asp Gln Pro
          100          105          110

Asn Lys Lys Arg Tyr Ser Pro Ala Val Leu Arg Leu Ala Gly Glu His
          115          120          125

Gly Ile Asp Leu Asp Gln Val Thr Gly Thr Gly Ala Gly Gly Arg Ile

```

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

Leu Val Cys Gly Arg Phe Leu Gly Arg Val Lys Gln Ile Leu Glu Ser
 405 410 415

Ile Asp Glu Lys Thr Ser Val Tyr
 420

<210> 211
 <211> 1374
 <212> ДНК
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 211
 atggcaactg agtatgacgt agtcattctg ggcggcggta ccggcgggta tgttgcggcc 60
 atcagagccg ctcagctcgg cttaaaaaca gccgttgttg aaaaggaaaa actcggggga 120
 acatgtctgc ataaaggctg tatcccgagt aaagcgctgc ttagaagcgc agagggtatac 180
 cggacagctc gtgaagccga tcaattcggg gtggaaacgg ctggcgtgtc cctcaacttt 240
 gaaaaagtgc agcagcgtaa gcaagccgtt gttgataagc ttgcagcggg tgtaaatcat 300
 ttaatgaaaa aaggaaaaat tgacgtgtac accggatatg gacgtatcct tggaccgtca 360
 atcttctctc cgctgccggg aacaatttct gttgagcggg gaaatggcga agaaaatgac 420
 atgctgatcc cgaacaagt gatcattgca acaggatcaa gaccgagaat gcttccgggt 480
 cttgaagtgg acggtaagtc tgtactgact tcagatgagg cgctccaaat ggaggagctg 540
 ccacagtcaa tcatcattgt cggcggaggg gttatcggta tcgaatgggc gtctatgctt 600
 catgattttg gcgttaaggt aacggttatt gaatacgcgg atcgcatatt gccgactgaa 660
 gatctagaga tttcaaaaaga aatggaaagt cttcttaaga aaaaaggcat ccagttcata 720
 acaggggcaa aagtgtgcc tgacacaatg acaaaaacat cagacgatat cagcatataa 780
 gcggaaaaag acggagaaac cgttacctat tctgctgaga aaatgcttgt ttccatcggc 840
 agacaggcaa atatcgaagg catcggccta gagaacaccg atattgttac tgaaaatggc 900
 atgatttcag tcaatgaaag ctgccaaacg aaggaatctc atatttatgc aatcggagac 960
 gtaatcggtg gcctgcagtt agctcacgtt gcttcacatg aggaattat tgctgttgag 1020
 ctttttgag gtctcaatcc gcatccgctt gatccgacgc ttgtgccgaa gtgcatttac 1080
 tcaagccctg aagctgccag tgcggctta accgaagacg aagcaaaggc gaacgggcat 1140
 aatgtcaaaa tcggcaagtt cccatttatg gcgattggaa aagcgcttgt atacggtgaa 1200
 agcgacgggt ttgtcaaaat cgtggctgac cgagatacag atgatattct cggcgttcat 1260
 atgattggcc cgcattgtac cgacatgatt tctgaagcgg gtcttgccaa agtgctggac 1320
 gcaacaccgt gggaggctcg gcaaacgatt tcaccgcat ccaacgcttt ctga 1374

<210> 212
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 212

Met Ala Thr Glu Tyr Asp Val Val Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly Leu Lys Thr Ala Val
 20 25 30
 Val Glu Lys Glu Lys Leu Gly Gly Thr Cys Leu His Lys Gly Cys Ile
 35 40 45
 Pro Ser Lys Ala Leu Leu Arg Ser Ala Glu Val Tyr Arg Thr Ala Arg
 50 55 60
 Glu Ala Asp Gln Phe Gly Val Glu Thr Ala Gly Val Ser Leu Asn Phe
 65 70 75 80
 Glu Lys Val Gln Gln Arg Lys Gln Ala Val Val Asp Lys Leu Ala Ala
 85 90 95
 Gly Val Asn His Leu Met Lys Lys Gly Lys Ile Asp Val Tyr Thr Gly
 100 105 110
 Tyr Gly Arg Ile Leu Gly Pro Ser Ile Phe Ser Pro Leu Pro Gly Thr
 115 120 125
 Ile Ser Val Glu Arg Gly Asn Gly Glu Glu Asn Asp Met Leu Ile Pro
 130 135 140
 Lys Gln Val Ile Ile Ala Thr Gly Ser Arg Pro Arg Met Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Val Asp Gly Lys Ser Val Leu Thr Ser Asp Glu Ala Leu Gln
 165 170 175
 Met Glu Glu Leu Pro Gln Ser Ile Ile Ile Val Gly Gly Gly Val Ile
 180 185 190
 Gly Ile Glu Trp Ala Ser Met Leu His Asp Phe Gly Val Lys Val Thr
 195 200 205
 Val Ile Glu Tyr Ala Asp Arg Ile Leu Pro Thr Glu Asp Leu Glu Ile
 210 215 220
 Ser Lys Glu Met Glu Ser Leu Leu Lys Lys Lys Gly Ile Gln Phe Ile
 225 230 235 240
 Thr Gly Ala Lys Val Leu Pro Asp Thr Met Thr Lys Thr Ser Asp Asp
 245 250 255
 Ile Ser Ile Gln Ala Glu Lys Asp Gly Glu Thr Val Thr Tyr Ser Ala
 260 265 270

Glu Lys Met Leu Val Ser Ile Gly Arg Gln Ala Asn Ile Glu Gly Ile
 275 280 285
 Gly Leu Glu Asn Thr Asp Ile Val Thr Glu Asn Gly Met Ile Ser Val
 290 295 300
 Asn Glu Ser Cys Gln Thr Lys Glu Ser His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp
 305 310 315 320
 Val Ile Gly Gly Leu Gln Leu Ala His Val Ala Ser His Glu Gly Ile
 325 330 335
 Ile Ala Val Glu His Phe Ala Gly Leu Asn Pro His Pro Leu Asp Pro
 340 345 350
 Thr Leu Val Pro Lys Cys Ile Tyr Ser Ser Pro Glu Ala Ala Ser Val
 355 360 365
 Gly Leu Thr Glu Asp Glu Ala Lys Ala Asn Gly His Asn Val Lys Ile
 370 375 380
 Gly Lys Phe Pro Phe Met Ala Ile Gly Lys Ala Leu Val Tyr Gly Glu
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Phe Val Lys Ile Val Ala Asp Arg Asp Thr Asp Asp Ile
 405 410 415
 Leu Gly Val His Met Ile Gly Pro His Val Thr Asp Met Ile Ser Glu
 420 425 430
 Ala Gly Leu Ala Lys Val Leu Asp Ala Thr Pro Trp Glu Val Gly Gln
 435 440 445
 Thr Ile Ser Pro Ala Ser Asn Ala Phe
 450 455

<210> 213
 <211> 1233
 <212> ДНК
 <213> Pseudomonas putida

<400> 213
 atgaacgagt acgccccct gcgtttgcat gtgcccagagc ccaccggccg gccaggctgc 60
 cagaccgatt tttcctacct gcgcctgaac gatgcaggtc aagcccgtaa accccctgtc 120
 gatgtcgacg ctgccgacac cgccgacctg tctacagcc tgggtccgcgt gctcgacgag 180
 caaggcgacg cccaaggccc gtgggctgaa gacatcgacc cgcagatcct gcgccaaggc 240
 atgcgcgcca tgctcaagac gcggatcttc gacagccgca tgggtggttgcc ccagcgccag 300
 aagaagatgt ctttctacat gcagagcctg ggcgaagaag ccatcggcag cggccaggcg 360

ctggcgctta accgcaccga catgtgcttc cccacctacc gtcagcaaag catcctgatg 420
 gcccgcgacg tgctgctggt ggagatgacg tgccagttgc tgtccaacga acgcgacccc 480
 ctcaagggcc gccagctgcc gatcatgtac tcggtacgcg aggcgggctt ctccaccatc 540
 agcggcaacc tggcgaccca gtctgtgcag gcggtcggct gggccatggc ctcggcgatc 600
 aagggcgata ccaagattgc ctcggcctgg atcggcgacg gcgccactgc cgaatcggac 660
 ttccacaccg ccctcacctt tgcccacgtt taccgcgccc cggtgatcct caacgtggtc 720
 aacaaccagt gggccatctc aaccttcag gccatcgccg gtggcgagtc gaccaccttc 780
 gccggccgtg gcgtgggctg cggcatcgct tcgctgcccg tggacggcaa cgacttcgtc 840
 gccgtttacg ccgcttcgcg ctgggctgcc gaacgtgccc gccgtgggtt gggcccgagc 900
 ctgatcgagt gggtcaccta ccgtgccggc ccgcactcga cctcggacga cccgtccaag 960
 taccgcccctg ccgatgactg gagccacttc ccgctgggtg acccgatcgc ccgcctgaag 1020
 cagcacctga tcaagatcgg ccaactggtc gaagaagaac accaggccac cacggccgag 1080
 ttgaagcgg ccgtgattgc tgcgcaaaaa gaagccgagc agtacggcac cctggccaac 1140
 ggtcacatcc cgagcgccgc ctgatgttc gaggacgtgt acaaggagat gcccgaccac 1200
 ctgcgccgcc aacgccagga actgggggtt tga 1233

<210> 214
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida

<400> 214

Met Asn Glu Tyr Ala Pro Leu Arg Leu His Val Pro Glu Pro Thr Gly
1 5 10 15

Arg Pro Gly Cys Gln Thr Asp Phe Ser Tyr Leu Arg Leu Asn Asp Ala
20 25 30

Gly Gln Ala Arg Lys Pro Pro Val Asp Val Asp Ala Ala Asp Thr Ala
35 40 45

Asp Leu Ser Tyr Ser Leu Val Arg Val Leu Asp Glu Gln Gly Asp Ala
50 55 60

Gln Gly Pro Trp Ala Glu Asp Ile Asp Pro Gln Ile Leu Arg Gln Gly
65 70 75 80

Met Arg Ala Met Leu Lys Thr Arg Ile Phe Asp Ser Arg Met Val Val
85 90 95

Ala Gln Arg Gln Lys Lys Met Ser Phe Tyr Met Gln Ser Leu Gly Glu
100 105 110

Glu Ala Ile Gly Ser Gly Gln Ala Leu Ala Leu Asn Arg Thr Asp Met
 115 120 125
 Cys Phe Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Ser Ile Leu Met Ala Arg Asp Val
 130 135 140
 Ser Leu Val Glu Met Ile Cys Gln Leu Leu Ser Asn Glu Arg Asp Pro
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Arg Gln Leu Pro Ile Met Tyr Ser Val Arg Glu Ala Gly
 165 170 175
 Phe Phe Thr Ile Ser Gly Asn Leu Ala Thr Gln Phe Val Gln Ala Val
 180 185 190
 Gly Trp Ala Met Ala Ser Ala Ile Lys Gly Asp Thr Lys Ile Ala Ser
 195 200 205
 Ala Trp Ile Gly Asp Gly Ala Thr Ala Glu Ser Asp Phe His Thr Ala
 210 215 220
 Leu Thr Phe Ala His Val Tyr Arg Ala Pro Val Ile Leu Asn Val Val
 225 230 235 240
 Asn Asn Gln Trp Ala Ile Ser Thr Phe Gln Ala Ile Ala Gly Gly Glu
 245 250 255
 Ser Thr Thr Phe Ala Gly Arg Gly Val Gly Cys Gly Ile Ala Ser Leu
 260 265 270
 Arg Val Asp Gly Asn Asp Phe Val Ala Val Tyr Ala Ala Ser Arg Trp
 275 280 285
 Ala Ala Glu Arg Ala Arg Arg Gly Leu Gly Pro Ser Leu Ile Glu Trp
 290 295 300
 Val Thr Tyr Arg Ala Gly Pro His Ser Thr Ser Asp Asp Pro Ser Lys
 305 310 315 320
 Tyr Arg Pro Ala Asp Asp Trp Ser His Phe Pro Leu Gly Asp Pro Ile
 325 330 335
 Ala Arg Leu Lys Gln His Leu Ile Lys Ile Gly His Trp Ser Glu Glu
 340 345 350
 Glu His Gln Ala Thr Thr Ala Glu Phe Glu Ala Ala Val Ile Ala Ala
 355 360 365
 Gln Lys Glu Ala Glu Gln Tyr Gly Thr Leu Ala Asn Gly His Ile Pro
 370 375 380

Ser Ala Ala Ser Met Phe Glu Asp Val Tyr Lys Glu Met Pro Asp His
 385 390 395 400

Leu Arg Arg Gln Arg Gln Glu Leu Gly Val
 405 410

<210> 215
 <211> 1059
 <212> ДНК
 <213> Pseudomonas putida

<400> 215
 atgaacgacc acaacaacag catcaacccg gaaaccgccg tggccaccac taccatgacc 60
 atgatccagg ccctgcgctc ggccatggat gtcattgcttg agcgcgacga caatgtggtg 120
 gtgtacggcc aggacgtcgg ctacttcggc ggcgtgttcc gctgcaccga aggcctgcag 180
 accaagtacg gcaagtcccc cgtgttcgac gcgcccattc ctgaaagcgg catcgtcggc 240
 accgcccgtg gcatgggtgc ctacggcctg cgcgggtggtg tggaaatcca gtgcgtgac 300
 tacttctacc cggcctccga ccagatcggt tctgaaatgg cccgcctgcg ctaccgttcg 360
 gccggcgagt tcatcgcccc gctgaccctg cgtatgccct gcgggtggcg tatctatggc 420
 ggccagacac acagccagag cccggaagcg atgttcactc aggtgtgcgg cctgcgcacc 480
 gtaatgcat ccaacccgta cgacgccaaa ggcctgctga ttgcctcgat cgaatgcgac 540
 gacccggtga tcttcctgga gcccaagcgc ctgtacaacg gcccgctcga cggccaccat 600
 gaccgcccgg ttacgcccgtg gtcgaaacac ccgcacagcg ccgtgcccga tggctactac 660
 accgtgccac tggacaaggc cgccatcacc cgcggcgga atgacgtgag cgtgctcacc 720
 tatggcacca ccgtgtacgt ggcccagggt gccgcgaag aaagtggcgt ggatgccgaa 780
 gtgatcgacc tgccgagcct gtggccgcta gacctggaca ccatcgtcga gtcggtgaaa 840
 aagaccggcc gttgctgtgt agtacacgag gccacccgta cttgtggctt tggcgagaa 900
 ctggtgtcgc tgggtgcagga gcaactgctc caccacctgg aggcgccgat cgagcgcgtc 960
 accggttggg acacccccta ccctcacgcg caggaatggg cttacttccc agggccttcg 1020
 cgggtaggtg cggcattgaa aaaggatcatg gaggtctga 1059

<210> 216
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida

<400> 216

Met Asn Asp His Asn Asn Ser Ile Asn Pro Glu Thr Ala Met Ala Thr
 1 5 10 15

Thr Thr Met Thr Met Ile Gln Ala Leu Arg Ser Ala Met Asp Val Met
 20 25 30

Leu Glu Arg Asp Asp Asn Val Val Val Tyr Gly Gln Asp Val Gly Tyr
 35 40 45
 Phe Gly Gly Val Phe Arg Cys Thr Glu Gly Leu Gln Thr Lys Tyr Gly
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Phe Asp Ala Pro Ile Ser Glu Ser Gly Ile Val Gly
 65 70 75 80
 Thr Ala Val Gly Met Gly Ala Tyr Gly Leu Arg Pro Val Val Glu Ile
 85 90 95
 Gln Phe Ala Asp Tyr Phe Tyr Pro Ala Ser Asp Gln Ile Val Ser Glu
 100 105 110
 Met Ala Arg Leu Arg Tyr Arg Ser Ala Gly Glu Phe Ile Ala Pro Leu
 115 120 125
 Thr Leu Arg Met Pro Cys Gly Gly Gly Ile Tyr Gly Gly Gln Thr His
 130 135 140
 Ser Gln Ser Pro Glu Ala Met Phe Thr Gln Val Cys Gly Leu Arg Thr
 145 150 155 160
 Val Met Pro Ser Asn Pro Tyr Asp Ala Lys Gly Leu Leu Ile Ala Ser
 165 170 175
 Ile Glu Cys Asp Asp Pro Val Ile Phe Leu Glu Pro Lys Arg Leu Tyr
 180 185 190
 Asn Gly Pro Phe Asp Gly His His Asp Arg Pro Val Thr Pro Trp Ser
 195 200 205
 Lys His Pro His Ser Ala Val Pro Asp Gly Tyr Tyr Thr Val Pro Leu
 210 215 220
 Asp Lys Ala Ala Ile Thr Arg Pro Gly Asn Asp Val Ser Val Leu Thr
 225 230 235 240
 Tyr Gly Thr Thr Val Tyr Val Ala Gln Val Ala Ala Glu Glu Ser Gly
 245 250 255
 Val Asp Ala Glu Val Ile Asp Leu Arg Ser Leu Trp Pro Leu Asp Leu
 260 265 270
 Asp Thr Ile Val Glu Ser Val Lys Lys Thr Gly Arg Cys Val Val Val
 275 280 285
 His Glu Ala Thr Arg Thr Cys Gly Phe Gly Ala Glu Leu Val Ser Leu
 290 295 300

Val Gln Glu His Cys Phe His His Leu Glu Ala Pro Ile Glu Arg Val
305 310 315 320

Thr Gly Trp Asp Thr Pro Tyr Pro His Ala Gln Glu Trp Ala Tyr Phe
325 330 335

Pro Gly Pro Ser Arg Val Gly Ala Ala Leu Lys Lys Val Met Glu Val
340 345 350

<210> 217
<211> 1272
<212> ДНК
<213> Pseudomonas putida

<400> 217
atgggcacgc acgtcatcaa gatgccggac attggcgaag gcatcgcgca ggtcgaattg 60
gtggaatggt tcgtcaaggt gggcgacatc atcgccgagg accaagtggg agccgacgtc 120
atgaccgaca aggccaccgt ggaaatcccg tcgccggtca gcggcaagggt gctggccctg 180
ggtggccagc caggtgaagt gatggcggtc ggcagtgagc tgatccgcat cgaagtggaa 240
ggcagcggca accatgtgga tgtgccgcaa gccaaagccg ccgaagtgcc tgcggcaccg 300
gtagccgcta aacctgaacc acagaaagac gttaaaccgg cggcgtagca ggcgtcagcc 360
agccacgagg cagcgcccat cgtgccgcgc cagccgggag acaagccgct ggcctcgccg 420
gcgggtgcgca aacgcgccct cgatgccggc atcgaattgc gttatgtgca cggcagcggc 480
ccggccgggc gcatcctgca cgaagacctc gacgcgttca tgagcaaacc gcaaagcgct 540
gccggggcaaa cccccaatgg ctatgccagg cgcaccgaca gcgagcagggt gccggtgatc 600
ggcctgcgcc gcaagatcgc ccagcgcgtg caggacgcca agcgccgggt cgcgcacttc 660
agctatgtgg aagaaatcga cgtcaccgcc ctggaagccc tgcgccagca gctcaacagc 720
aagcacggcg acagccgcgg caagctgaca ctgctgccgt tcctggtgcg cgccctggtc 780
gtggcactgc gtgacttccc gcagataaac gccacctacg atgacgaagc gcagatcatc 840
acccgccatg gcgcggtgca tgtgggcatc gccacccaag gtgacaacgg cctgatggta 900
cccgtgctgc gccacgccga agcgggcagc ctgtgggcca atgccgggtga gatttcacgc 960
ctggccaacg ctgcgcgcaa caacaaggcc agccgcgaag agctgtccgg ttcgaccatt 1020
accctgacca gcctcggcgc cctgggcggc atcgtcagca cggcggtggg caacaccccg 1080
gaagtggcga tcgtcgggtg caaccgcatg gttgagcggc ccgtggtgat cgacggccag 1140
atcgtcgtgc gcaagatgat gaacctgtcc agctcgttcg accaccgct ggtcgatggc 1200
atggacgccg ccctgttcat ccaggccgtg cgtggcctgc tcgaacaacc cgctgcctg 1260
ttcgtggagt ga 1272

<210> 218
<211> 423
<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 218

Met Gly Thr His Val Ile Lys Met Pro Asp Ile Gly Glu Gly Ile Ala
 1 5 10 15

Gln Val Glu Leu Val Glu Trp Phe Val Lys Val Gly Asp Ile Ile Ala
 20 25 30

Glu Asp Gln Val Val Ala Asp Val Met Thr Asp Lys Ala Thr Val Glu
 35 40 45

Ile Pro Ser Pro Val Ser Gly Lys Val Leu Ala Leu Gly Gly Gln Pro
 50 55 60

Gly Glu Val Met Ala Val Gly Ser Glu Leu Ile Arg Ile Glu Val Glu
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Asn His Val Asp Val Pro Gln Ala Lys Pro Ala Glu Val
 85 90 95

Pro Ala Ala Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Pro Gln Lys Asp Val Lys
 100 105 110

Pro Ala Ala Tyr Gln Ala Ser Ala Ser His Glu Ala Ala Pro Ile Val
 115 120 125

Pro Arg Gln Pro Gly Asp Lys Pro Leu Ala Ser Pro Ala Val Arg Lys
 130 135 140

Arg Ala Leu Asp Ala Gly Ile Glu Leu Arg Tyr Val His Gly Ser Gly
 145 150 155 160

Pro Ala Gly Arg Ile Leu His Glu Asp Leu Asp Ala Phe Met Ser Lys
 165 170 175

Pro Gln Ser Ala Ala Gly Gln Thr Pro Asn Gly Tyr Ala Arg Arg Thr
 180 185 190

Asp Ser Glu Gln Val Pro Val Ile Gly Leu Arg Arg Lys Ile Ala Gln
 195 200 205

Arg Met Gln Asp Ala Lys Arg Arg Val Ala His Phe Ser Tyr Val Glu
 210 215 220

Glu Ile Asp Val Thr Ala Leu Glu Ala Leu Arg Gln Gln Leu Asn Ser
 225 230 235 240

Lys His Gly Asp Ser Arg Gly Lys Leu Thr Leu Leu Pro Phe Leu Val
 245 250 255

Arg Ala Leu Val Val Ala Leu Arg Asp Phe Pro Gln Ile Asn Ala Thr
 260 265 270
 Tyr Asp Asp Glu Ala Gln Ile Ile Thr Arg His Gly Ala Val His Val
 275 280 285
 Gly Ile Ala Thr Gln Gly Asp Asn Gly Leu Met Val Pro Val Leu Arg
 290 295 300
 His Ala Glu Ala Gly Ser Leu Trp Ala Asn Ala Gly Glu Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Leu Ala Asn Ala Ala Arg Asn Asn Lys Ala Ser Arg Glu Glu Leu Ser
 325 330 335
 Gly Ser Thr Ile Thr Leu Thr Ser Leu Gly Ala Leu Gly Gly Ile Val
 340 345 350
 Ser Thr Pro Val Val Asn Thr Pro Glu Val Ala Ile Val Gly Val Asn
 355 360 365
 Arg Met Val Glu Arg Pro Val Val Ile Asp Gly Gln Ile Val Val Arg
 370 375 380
 Lys Met Met Asn Leu Ser Ser Ser Phe Asp His Arg Val Val Asp Gly
 385 390 395 400
 Met Asp Ala Ala Leu Phe Ile Gln Ala Val Arg Gly Leu Leu Glu Gln
 405 410 415
 Pro Ala Cys Leu Phe Val Glu
 420

<210> 219

<211> 1380

<212> ДНК

<213> Pseudomonas putida

<400> 219

atgcaacaga ctatccagac aacctgttg atcatcggcg gcggccctgg cggtatgtg	60
gcggccatcc gcgccgggca actgggcatc cctaccgtgc tggtggaagg ccaggcgctg	120
ggcgggtacct gcctgaacat cggctgcatt ccgtccaagg cgctgatcca tgtggccgag	180
cagttccacc aggcctcgcg ctttaccgaa ccctcgccgc tgggcatcag cgtggcttcg	240
ccacgcctgg acatcggcca gagcgtggcc tggaaagacg gcatcgtcga tcgcctgacc	300
actggtgtcg ccgccctgct gaaaaagcac ggggtgaagg tgggtgcacgg ctgggccaag	360
gtgcttgatg gcaagcaggt cgaggtggat ggccagcgca tccagtgcga gcacctgttg	420
ctggccacgg gctccagcag tgtcgaactg ccgatgctgc cggtgggtgg gccggtgatt	480

tcctcgaccg aggccctggc accgaaagcc ctgccgcaac acctggtggt ggtgggcggt 540
 ggctacatcg gcctggagct gggatatgcc taccgcaagc tcggcgcgca ggtcagcgtg 600
 gtggaagcgc gcgagcgcat cctgccgact tacgacagcg aactgaccgc cccggtggcc 660
 gagtcgctga aaaagctggg tatcgccctg caccttggcc acagcgctga aggttacgaa 720
 aatggctgcc tgctggccaa cgatggcaag ggcggacaac tgcgcctgga agccgaccgg 780
 gtgctggtgg ccgtgggccg ccgcccacgc accaagggtc tcaacctgga atgcctggac 840
 ctgaagatga atggtgccgc gattgccatc gacgagcgct gccagaccag catgcacaac 900
 gtctgggcca tcggcgacgt ggccggcgaa ccgatgctgg cgcaccgggc catggcccag 960
 ggcgagatgg tggccgagat catcgccggc aaggcacgcc gcttcgaacc cgctgcgata 1020
 gccgccgtgt gcttcaccga cccggaagtg gtcgtggtcg gcaagacgcc ggaacaggcc 1080
 agtcagcaag gcctggactg catcgtcgcg cagttcccgct tcgccgcaa cggccgggccc 1140
 atgagcctgg agtcgaaaag cggtttcgtg cgcgtggtcg cgcggcgtga caaccacctg 1200
 atcctgggct ggcaagcggg tggcggtggc gtttccgagc tgtccacggc gtttggccag 1260
 tcgctggaga tgggtgcctg cctggaggat gtggccggta ccatccatgc ccacccgacc 1320
 ctgggtgaag cggtacagga agcggcactg cgtgccctgg gccacgccct gcatatctga 1380

<210> 220
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas putida*

<400> 220

Met Gln Gln Thr Ile Gln Thr Thr Leu Leu Ile Ile Gly Gly Gly Pro
1 5 10 15

Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Gly Gln Leu Gly Ile Pro Thr
20 25 30

Val Leu Val Glu Gly Gln Ala Leu Gly Gly Thr Cys Leu Asn Ile Gly
35 40 45

Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Ile His Val Ala Glu Gln Phe His Gln
50 55 60

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

Pro Arg Leu Asp Ile Gly Gln Ser Val Ala Trp Lys Asp Gly Ile Val
85 90 95

Asp Arg Leu Thr Thr Gly Val Ala Ala Leu Leu Lys Lys His Gly Val
100 105 110

Lys Val Val His Gly Trp Ala Lys Val Leu Asp Gly Lys Gln Val Glu

115	120	125
Val Asp Gly Gln Arg Ile Gln Cys Glu His Leu Leu Leu Ala Thr Gly 130 135 140		
Ser Ser Ser Val Glu Leu Pro Met Leu Pro Leu Gly Gly Pro Val Ile 145 150 155 160		
Ser Ser Thr Glu Ala Leu Ala Pro Lys Ala Leu Pro Gln His Leu Val 165 170 175		
Val Val Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Leu Glu Leu Gly Ile Ala Tyr Arg 180 185 190		
Lys Leu Gly Ala Gln Val Ser Val Val Glu Ala Arg Glu Arg Ile Leu 195 200 205		
Pro Thr Tyr Asp Ser Glu Leu Thr Ala Pro Val Ala Glu Ser Leu Lys 210 215 220		
Lys Leu Gly Ile Ala Leu His Leu Gly His Ser Val Glu Gly Tyr Glu 225 230 235 240		
Asn Gly Cys Leu Leu Ala Asn Asp Gly Lys Gly Gly Gln Leu Arg Leu 245 250 255		
Glu Ala Asp Arg Val Leu Val Ala Val Gly Arg Arg Pro Arg Thr Lys 260 265 270		
Gly Phe Asn Leu Glu Cys Leu Asp Leu Lys Met Asn Gly Ala Ala Ile 275 280 285		
Ala Ile Asp Glu Arg Cys Gln Thr Ser Met His Asn Val Trp Ala Ile 290 295 300		
Gly Asp Val Ala Gly Glu Pro Met Leu Ala His Arg Ala Met Ala Gln 305 310 315 320		
Gly Glu Met Val Ala Glu Ile Ile Ala Gly Lys Ala Arg Arg Phe Glu 325 330 335		
Pro Ala Ala Ile Ala Ala Val Cys Phe Thr Asp Pro Glu Val Val Val 340 345 350		
Val Gly Lys Thr Pro Glu Gln Ala Ser Gln Gln Gly Leu Asp Cys Ile 355 360 365		
Val Ala Gln Phe Pro Phe Ala Ala Asn Gly Arg Ala Met Ser Leu Glu 370 375 380		

Ser Lys Ser Gly Phe Val Arg Val Val Ala Arg Arg Asp Asn His Leu
385 390 395 400

Ile Leu Gly Trp Gln Ala Val Gly Val Ala Val Ser Glu Leu Ser Thr
405 410 415

Ala Phe Ala Gln Ser Leu Glu Met Gly Ala Cys Leu Glu Asp Val Ala
420 425 430

Gly Thr Ile His Ala His Pro Thr Leu Gly Glu Ala Val Gln Glu Ala
435 440 445

Ala Leu Arg Ala Leu Gly His Ala Leu His Ile
450 455

<210> 221

<211> 1407

<212> ДНК

<213> Clostridium beijerinckii

<400> 221

atgaataaag acacactaat acctacaact aaagatttaa aattaaaaac aaatgttgaa	60
aacattaatt taaagaacta caaggataat tcttcatgtt tcggagtatt cgaaaatgtt	120
gaaaatgcta taaacagcgc tgtacacgcg caaaagatat tatcccttca ttatacaaaa	180
gaacaaagag aaaaaatcat aactgagata agaaaggccg cattagaaaa taaagagggt	240
ttagctacca tgattctgga agaacacat atgggaagggt atgaagataa aatattaaag	300
catgaattag tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcttggtca	360
ggtgataatg gtcttacagt ttagaaaatg tctccatag gcgttatagg tgcaataact	420
ccttctacga atccaactga aactgtaata tgtaatagca tcggcatgat agctgctgga	480
aatgctgtag tatttaacgg acaccaggc gctaaaaaat gtgttgcttt tgctattgaa	540
atgataaata aagcaattat ttcattgtggc ggtcctgaga atttagtaac aactataaaa	600
aatccaacta tggaatccct agatgcaatt attagcatc ctttaataaa acttctttgc	660
ggaactggag gtccaggaat ggtaaaaacc ctcttaaatt ctggcaagaa agctataggt	720
gctggtgctg gaaatccacc agttattgta gatgataccg ctgatataga aaaggctggt	780
aagagtatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa	840
gtatttggtt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctaaa aaataatgct	900
gtaattataa atgaagatca agtatcaaaa ttaatagatt tagtattaca aaaaaataat	960
gaaactcaag aatactttat aaacaaaaaa tgggtaggaa aagatgcaa attattctca	1020
gatgaaatag atgttgagtc tccttcaaatt attaaatgca tagtctgcga agtaaatgca	1080
aatcatccat ttgtcatgac agaactcatg atgccaatat taccaattgt aagagttaaa	1140
gatatagatg aagctgttaa atatacaaag atagcagaac aaaatagaaa acatagtgcc	1200
tatatttatt ctaaaaatat agacaaccta aatagatttg aaagagaaat tgatactact	1260

atttttgtaa agaattgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagctga aggatttaca 1320
 acttttacta ttgctggatc tactgggtgaa ggcataacct ctgcaagaaa ttttacaaga 1380
 caaagaagat gtgtacttgc cggctaa 1407

<210> 222
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Clostridium beijerinckii
 <400> 222

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

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

<210> 223
 <211> 2589
 <212> ДНК
 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 223
 atgaaagtca caacagtaaa ggaattagat gaaaaactca aggtaattaa agaagctcaa 60
 aaaaaattct cttgttactc gcaagaaatg gttgatgaaa tcttttagaaa tgcagcaatg 120
 gcagcaatcg acgcaaggat agagctagca aaagcagctg ttttggaac cggtatgggc 180
 ttagttgaag acaaggttat aaaaaatcat tttgcaggcg aatacatcta taacaaatat 240
 aaggatgaaa aaacctgcgg tataattgaa cgaaatgaac cctacggaat tacaaaaata 300
 gcagaaccta taggagttgt agctgctata atccctgtaa caaaccacac atcaacaaca 360
 atattttaa atccttaatat ccttaaaact agaaatggaa ttttcttttc gcctcaccca 420
 agggcaaaaa aatccacaat actagcagct aaaacaatac ttgatgcagc cgттаagagt 480
 ggtgcccccg aaaatataat aggttgata gatgaacctt caattgaact aactcaatat 540
 ttaatgcaaa aagcagatat aacccttgca actggtggtc cctcactagt taaatctgct 600
 tattcttccg gaaaaccagc aataggtgtt ggtccgggta acacccagc aataattgat 660
 gaatctgctc atataaaaaat ggcagtaagt tcaattatat tatccaaaac ctatgataat 720
 ggtgttatat gtgcttctga acaatctgta atagtcttaa aatccatata taacaaggta 780
 aaagatgagt tccaagaaag aggagcttat ataataaaga aaaacgaatt ggataaagtc 840
 cgtgaagtga tttttaaaga tggatccgta aaccctaaaa tagtcggaca gtcagcttat 900
 actatagcag ctatggctgg cataaaagta cctaaaacca caagaatatt aataggagaa 960
 gttacctcct taggtgaaga agaacctttt gccacgaaa aactatctcc tgttttggt 1020
 atgtatgagg ctgacaattt tgatgatgct ttaaaaaaag cagtaactct aataaactta 1080
 ggaggcctcg gccatactc aggaatatat gcagatgaaa taaaagcacg agataaaata 1140
 gatagattta gtagtgccat gaaaaccgta agaacctttg taaatatccc aacctcacia 1200
 ggtgcaagtg gagatctata taattttaga ataccacctt ctttcacgct tggctgcgga 1260
 ttttggggag gaaattctgt ttccgagaat gttggtccaa aacatctttt gaattattaaa 1320
 accgtagctg aaaggagaga aaacatgctt tggtttagag ttccacataa agtatatttt 1380
 aagttcgggt gtcttcaatt tgctttaaaa gatttaaaag atctaaagaa aaaaagagcc 1440
 tttatagtta ctgatagtga cccctataat ttaaaactatg ttgattcaat aataaaaaata 1500
 cttgagcacc tagatattga ttttaaagta ttttaataagg ttggaagaga agctgatctt 1560
 aaaaccataa aaaaagcaac tgaagaaatg tcctccttta tgccagacac tataatagct 1620
 ttaggtggtg cccctgaaat gagctctgca aagctaattg ggtactata tgaacatcca 1680
 gaagtaaaat ttgaagatct tgcaataaaa tttatggaca taagaaagag aatatatact 1740
 ttcccaaaac tcggtaaaaa ggctatgtta gttgcaatta caacttctgc tggttccggt 1800

tctgagggtta ctcctttttgc ttttagtaact gacaataaca ctggaaataa gtacatgtta 1860
 gcagattatg aaatgacacc aaatatggca attgtagatg cagaacttat gatgaaaatg 1920
 ccaaagggat taaccgctta ttcaggtata gatgcactag taaatagtat agaagcatac 1980
 acatccgtat atgcttcaga atacacaaac ggactagcac tagaggcaat acgattaata 2040
 tttaaatatt tgcttgaggc ttacaaaaac ggaagaacca atgaaaaagc aagagagaaa 2100
 atggctcacg cttcaactat ggcaggtatg gcatccgcta atgcatttct aggtctatgt 2160
 cattccatgg caataaaatt aagttcagaa cacaatatcc ctagtgggcat tgccaatgca 2220
 ttactaatag aagaagtaat aaaatttaac gcagttgata atcctgtaaa acaagcccct 2280
 tgcccacaat ataagtatcc aaacaccata tttagatatg ctcgaattgc agattatata 2340
 aagcttgagg gaaataactga tgaggaaaag gtatagtctct taattaacaa aatacatgaa 2400
 ctaaaaaaag ctttaaatat accaacttca ataaaggatg caggtgtttt ggaggaaaac 2460
 ttctattcct cccttgatag aatatctgaa cttgcactag atgatcaatg cacaggcgct 2520
 aatcctagat ttctcttac aagttagata aaagaaatgt atataaattg ttttaaaaaa 2580
 caaccttaa 2589

<210> 224
 <211> 862
 <212> PRT
 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 224

Met Lys Val Thr Thr Val Lys Glu Leu Asp Glu Lys Leu Lys Val Ile
 1 5 10 15

Lys Glu Ala Gln Lys Lys Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Glu Met Val Asp
 20 25 30

Glu Ile Phe Arg Asn Ala Ala Met Ala Ala Ile Asp Ala Arg Ile Glu
 35 40 45

Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Glu Thr Gly Met Gly Leu Val Glu Asp
 50 55 60

Lys Val Ile Lys Asn His Phe Ala Gly Glu Tyr Ile Tyr Asn Lys Tyr
 65 70 75 80

Lys Asp Glu Lys Thr Cys Gly Ile Ile Glu Arg Asn Glu Pro Tyr Gly
 85 90 95

Ile Thr Lys Ile Ala Glu Pro Ile Gly Val Val Ala Ala Ile Ile Pro
 100 105 110

Val Thr Asn Pro Thr Ser Thr Thr Ile Phe Lys Ser Leu Ile Ser Leu
 115 120 125

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

Gly Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Arg Ile Pro Pro Ser Phe Thr
 405 410 415
 Leu Gly Cys Gly Phe Trp Gly Gly Asn Ser Val Ser Glu Asn Val Gly
 420 425 430
 Pro Lys His Leu Leu Asn Ile Lys Thr Val Ala Glu Arg Arg Glu Asn
 435 440 445
 Met Leu Trp Phe Arg Val Pro His Lys Val Tyr Phe Lys Phe Gly Cys
 450 455 460
 Leu Gln Phe Ala Leu Lys Asp Leu Lys Asp Leu Lys Lys Lys Arg Ala
 465 470 475 480
 Phe Ile Val Thr Asp Ser Asp Pro Tyr Asn Leu Asn Tyr Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Ile Lys Ile Leu Glu His Leu Asp Ile Asp Phe Lys Val Phe Asn
 500 505 510
 Lys Val Gly Arg Glu Ala Asp Leu Lys Thr Ile Lys Lys Ala Thr Glu
 515 520 525
 Glu Met Ser Ser Phe Met Pro Asp Thr Ile Ile Ala Leu Gly Gly Thr
 530 535 540
 Pro Glu Met Ser Ser Ala Lys Leu Met Trp Val Leu Tyr Glu His Pro
 545 550 555 560
 Glu Val Lys Phe Glu Asp Leu Ala Ile Lys Phe Met Asp Ile Arg Lys
 565 570 575
 Arg Ile Tyr Thr Phe Pro Lys Leu Gly Lys Lys Ala Met Leu Val Ala
 580 585 590
 Ile Thr Thr Ser Ala Gly Ser Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe Ala Leu
 595 600 605
 Val Thr Asp Asn Asn Thr Gly Asn Lys Tyr Met Leu Ala Asp Tyr Glu
 610 615 620
 Met Thr Pro Asn Met Ala Ile Val Asp Ala Glu Leu Met Met Lys Met
 625 630 635 640
 Pro Lys Gly Leu Thr Ala Tyr Ser Gly Ile Asp Ala Leu Val Asn Ser
 645 650 655
 Ile Glu Ala Tyr Thr Ser Val Tyr Ala Ser Glu Tyr Thr Asn Gly Leu

660 665 670

Ala Leu Glu Ala Ile Arg Leu Ile Phe Lys Tyr Leu Pro Glu Ala Tyr
675 685

Lys Asn Gly Arg Thr Asn Glu Lys Ala Arg Glu Lys Met Ala His Ala
690 695 700

Ser Thr Met Ala Gly Met Ala Ser Ala Asn Ala Phe Leu Gly Leu Cys
705 710 715 720

His Ser Met Ala Ile Lys Leu Ser Ser Glu His Asn Ile Pro Ser Gly
725 730 735

Ile Ala Asn Ala Leu Leu Ile Glu Glu Val Ile Lys Phe Asn Ala Val
740 745 750

Asp Asn Pro Val Lys Gln Ala Pro Cys Pro Gln Tyr Lys Tyr Pro Asn
755 760 765

Thr Ile Phe Arg Tyr Ala Arg Ile Ala Asp Tyr Ile Lys Leu Gly Gly
770 775 780

Asn Thr Asp Glu Glu Lys Val Asp Leu Leu Ile Asn Lys Ile His Glu
785 790 795 800

Leu Lys Lys Ala Leu Asn Ile Pro Thr Ser Ile Lys Asp Ala Gly Val
805 810 815

Leu Glu Glu Asn Phe Tyr Ser Ser Leu Asp Arg Ile Ser Glu Leu Ala
820 825 830

Leu Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Phe Pro Leu Thr Ser
835 840 845

Glu Ile Lys Glu Met Tyr Ile Asn Cys Phe Lys Lys Gln Pro
850 855 860

```

<210> 225
<211> 2577
<212> ДНК
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 225
atgaaagtta caaatcaaaa agaactaaaa caaaagctaa atgaattgag agaagcgcaa      60
aagaagtttg caacctatac tcaagagcaa gttgataaaa tttttaaaaca atgtgccata      120
gccgcagcta aagaaagaat aaacttagct aaattagcag tagaagaaac aggaataggt      180
cttgtagaag ataaaattat aaaaaatcat tttgcagcag aatatatata caataaatat      240
aaaaatgaaa aaacttggtg cataatagac catgacgatt ctttaggcac aacaaagggt      300

```

gctgaaccaa ttggaattgt tgcagccata gttcctacta ctaatccaac ttccacagca	360
attttcaaat cattaatttc tttaaaaaca agaaacgcaa tattcttttc accacatcca	420
cgtgcaaaaa aatctacaat tgctgcagca aaattaattt tagatgcagc tgttaaagca	480
ggagcaccta aaaatataat aggctggata gatgagccat caatagaact ttctcaagat	540
ttgatgagtg aagctgatat aatattagca acaggaggct cttcaatggt taaagcggcc	600
tattcatctg gaaaacctgc aattggtggt ggagcaggaa atacaccagc aataatagat	660
gagagtgcag atatagatat ggcagtaagc tccataattt tatcaaagac ttatgacaat	720
ggagtaatat gcgcttctga acaatcaata ttagttatga attcaatata cgaaaaagtt	780
aaagaggaat ttgtaaaacg aggatcatat atactcaatc aaaatgaaat agctaaaata	840
aaagaaacta tgtttaaaaa tggagctatt aatgctgaca tagttggaaa atctgcttat	900
ataattgcta aaatggcagg aattgaagtt cctcaaaacta caaagatact tataggcgaa	960
gtacaatctg ttgaaaaaag cgagctgttc tcacatgaaa aactatcacc agtacttgca	1020
atgtataaag ttaaggattt tgatgaagct ctaaaaaagg cacaaaggct aatagaatta	1080
ggtggaagtg gacacacgtc atctttatat atagattcac aaaacaataa ggataaagtt	1140
aaagaatttg gattagcaat gaaaacttca aggacattta ttaacatgcc ttcttcacag	1200
ggagcaagcg gagatttata caattttgcy atagcaccat catttactct tggatgcggc	1260
acttggggag gaaactctgt atcgcaaaat gtagagccta aacattttatt aaatattaaa	1320
agtgttgctg aaagaaggga aaatatgctt tggtttaaaag tgccacaaaa aatatatttt	1380
aaatatggat gtcttagatt tgcattaaaa gaattaaaag atatgaataa gaaaagagcc	1440
tttatagtaa cagataaaga tctttttaaa cttggatatg ttaataaaat aacaaaggta	1500
ctagatgaga tagatattaa atacagtata ttacagata ttaaatctga tccaactatt	1560
gattcagtaa aaaaagggtgc taaagaaatg cttaaactttg aacctgatac tataatctct	1620
attggtggtg gatcgccaat ggatgcagca aagggttatgc acttggtata tgaatatcca	1680
gaagcagaaa ttgaaaatct agctataaac ttatggata taagaaagag aatatgcaat	1740
ttccctaaat taggtacaaa ggcgatttca gtagctattc ctacaactgc tggtagcggt	1800
tcagaggcaa caccttttgc agttataact aatgatgaaa caggaatgaa atacctttta	1860
acttcttatg aattgacccc aaacatggca ataatagata ctgaattaat gttaaatatg	1920
cctagaaaat taacagcagc aactggaata gatgcattag ttcattgctat agaagcatat	1980
gtttcggtta tggctacgga ttatactgat gaattagcct taagagcaat aaaaatgata	2040
tttaaatatt tgcctagagc ctataaaaat gggactaacg acattgaagc aagagaaaaa	2100
atggcacatg cctctaatat tgcggggatg gcatttgcaa atgctttctt aggtgtatgc	2160
cattcaatgg ctcataaact tggggcaatg catcacgttc cacatggaat tgcttggtct	2220
gtattaatag aagaagttat taaatataac gctacagact gtccaacaaa gcaaacagca	2280
ttccctcaat ataaatctcc taatgctaag agaaaatatg ctgaaattgc agagtatttg	2340

aatttaaagg gtactagcga taccgaaaag gtaacagcct taatagaagc tatttcaaag 2400
 ttaaagatag atttgagtat tccacaaaat ataagtgccg ctggaataaa taaaaaagat 2460
 ttttataata cgctagataa aatgtcagag cttgcttttg atgaccaatg tacaacagct 2520
 aatcctaggt atccacttat aagtgaactt aaggatatct atataaaatc atttttaa 2577

<210> 226
 <211> 800
 <212> PRT
 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 226

Met Lys Val Thr Asn Gln Lys Glu Leu Lys Gln Lys Leu Asn Glu Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Ala Gln Lys Lys Phe Ala Thr Tyr Thr Gln Glu Gln Val Asp
 20 25 30

Lys Ile Phe Lys Gln Cys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Glu Arg Ile Asn
 35 40 45

Leu Ala Lys Leu Ala Val Glu Glu Thr Gly Ile Gly Leu Val Glu Asp
 50 55 60

Lys Ile Ile Lys Asn His Phe Ala Ala Glu Tyr Ile Tyr Asn Lys Tyr
 65 70 75 80

Lys Asn Glu Lys Thr Cys Gly Ile Ile Asp His Asp Asp Ser Leu Gly
 85 90 95

Ile Thr Lys Val Ala Glu Pro Ile Gly Ile Val Ala Ala Ile Val Pro
 100 105 110

Thr Thr Asn Pro Thr Ser Thr Ala Ile Phe Lys Ser Leu Ile Ser Leu
 115 120 125

Lys Thr Arg Asn Ala Ile Phe Phe Ser Pro His Pro Arg Ala Lys Lys
 130 135 140

Ser Thr Ile Ala Ala Ala Lys Leu Ile Leu Asp Ala Ala Val Lys Ala
 145 150 155 160

Gly Ala Pro Lys Asn Ile Ile Gly Trp Ile Asp Glu Pro Ser Ile Glu
 165 170 175

Leu Ser Gln Asp Leu Met Ser Glu Ala Asp Ile Ile Leu Ala Thr Gly
 180 185 190

Gly Pro Ser Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro Ala Ile
 195 200 205

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

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

Ile Ala Cys Ala Val Leu Ile Glu Glu Val Ile Lys Tyr Asn Ala Thr
740 745 750

Asp Cys Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Pro Gln Tyr Lys Ser Pro Asn
755 760 765

Ala Lys Arg Lys Tyr Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Leu Asn Leu Lys Gly
770 775 780

Thr Ser Asp Thr Glu Lys Val Thr Ala Leu Ile Glu Ala Ile Ser Lys
785 790 795 800

<210> 227
<211> 924
<212> ДНК
<213> Pseudomonas putida

<400> 227
atgagcaaga aactcaaggc ggccatcata ggccccggca atatcggtag cgatctggtg 60
atgaagatgc tccgttccga gtggattgag ccggtgtgga tggtcggcat cgacccaac 120
tccgacggcc tcaaacgcgc ccgcgatttc ggcatagaaga ccacagccga aggcgtcgac 180
ggcctgctcc cgcacgtgct ggacgacgac atccgcatcg ccttcgacgc cacctcggcc 240
tatgtgcatg ccgagaatag ccgcaagctc aacgcgcttg gcgtgctgat ggtcgacctg 300
accccgccgg ccacgcggcc ctactgcgtg ccgcccgtca acctcaagca gcatgtcggc 360
cgcctggaaa tgaacgtcaa catggtcacc tgcggcggcc aggcacccat ccccatggtc 420
gccgcggtgt cccgcgtgca gccggtggcc tacgccgaga tcgtcgccac cgtctcctcg 480
cgctcggctg gcccgggcac gcgcaagaac atcgacgagt tcacccgcac caccgccggc 540
gccatcgagc aggtcggcgg ccgaggggaa ggcaaggcga tcatcgtcat caacccggcc 600
gagccgccgc tgatgatgcg cgacaccatc cactgcctga ccgacagcga gccggaccag 660
gctgcgatca ccgcttcggt tcacgcgatg atcgccgagg tgcagaaata cgtgcccgcc 720
taccgcctga agaacggccc ggtgttcgac ggcaaccgcg tgatgatctt catggaagtc 780
gaaggcctgg gcgactacct gcccaagtac gccggcaacc tcgacatcat gaccgccgcc 840
gcgctgcgta ccggcgagat gttcgccgag gaaatcgccg ccggcaccat tcaactgccg 900
cgtcgcgaca tcgctgtggc ttga 924

<210> 228
<211> 307
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida

<400> 228

Met Ser Lys Lys Leu Lys Ala Ala Ile Ile Gly Pro Gly Asn Ile Gly
1 5 10 15

Thr Asp Leu Val Met Lys Met Leu Arg Ser Glu Trp Ile Glu Pro Val

	20		25		30
Trp Met Val Gly Ile Asp Pro Asn Ser Asp Gly Leu Lys Arg Ala Arg	35		40		45
Asp Phe Gly Met Lys Thr Thr Ala Glu Gly Val Asp Gly Leu Leu Pro	50		55		60
His Val Leu Asp Asp Asp Ile Arg Ile Ala Phe Asp Ala Thr Ser Ala	65		70		75
Tyr Val His Ala Glu Asn Ser Arg Lys Leu Asn Ala Leu Gly Val Leu	85		90		95
Met Val Asp Leu Thr Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Cys Val Pro Pro	100		105		110
Val Asn Leu Lys Gln His Val Gly Arg Leu Glu Met Asn Val Asn Met	115		120		125
Val Thr Cys Gly Gly Gln Ala Thr Ile Pro Met Val Ala Ala Val Ser	130		135		140
Arg Val Gln Pro Val Ala Tyr Ala Glu Ile Val Ala Thr Val Ser Ser	145		150		155
Arg Ser Val Gly Pro Gly Thr Arg Lys Asn Ile Asp Glu Phe Thr Arg	165		170		175
Thr Thr Ala Gly Ala Ile Glu Gln Val Gly Gly Ala Arg Glu Gly Lys	180		185		190
Ala Ile Ile Val Ile Asn Pro Ala Glu Pro Pro Leu Met Met Arg Asp	195		200		205
Thr Ile His Cys Leu Thr Asp Ser Glu Pro Asp Gln Ala Ala Ile Thr	210		215		220
Ala Ser Val His Ala Met Ile Ala Glu Val Gln Lys Tyr Val Pro Gly	225		230		235
Tyr Arg Leu Lys Asn Gly Pro Val Phe Asp Gly Asn Arg Val Ser Ile	245		250		255
Phe Met Glu Val Glu Gly Leu Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Tyr Ala Gly	260		265		270
Asn Leu Asp Ile Met Thr Ala Ala Ala Leu Arg Thr Gly Glu Met Phe	275		280		285

Ala Glu Glu Ile Ala Ala Gly Thr Ile Gln Leu Pro Arg Arg Asp Ile
 290 295 300

Ala Leu Ala
 305

<210> 229
 <211> 924
 <212> ДНК
 <213> *Thermus thermophilus*

<400> 229
 atgtccgaaa gggttaaggt agccatcctg ggctccggca acatcgggac ggacctgatg 60
 tacaagctcc tgaagaacct gggccacatg gagcttggtg cgggtggtggg gatagacccc 120
 aagtccgagg gcctggcccc ggcgcggggc ttaggggttag aggcgagcca cgaagggatc 180
 gcctacatcc tggagaggcc ggagatcaag atcgtctttg acgccaccag cgccaaggcc 240
 cacgtgcgcc acgccaagct cctgaggagg gcggggaaga tcgcataga cctcacgccg 300
 gcggccccgg gccccttacgt ggtgcccccg gtgaacctga aggaacacct ggacaaggac 360
 aacgtgaacc tcatcacctg cggggggag gccaccatcc ccctggtcta cgcggtgcac 420
 cgggtggccc ccgtgctcta cgcggagatg gtctccacgg tggcctcccg ctccgcgggc 480
 cccggcaccg ggcagaacat cgacgagttc accttcacca ccgcccgggg cctggaggcc 540
 atcggggggg ccaagaaggg gaaggccatc atcatcctga acccggcgga acccccatc 600
 ctcatgacca acaccgtgcg ctgcatcccc gaggacgagg gctttgaccg ggaggccgtg 660
 gtggcgagcg tccgggccat ggagcgggag gtccaggcct acgtgcccgg ctaccgcctg 720
 aaggcggacc cgggtgttga gaggttccc accccctggg gggagcgac cgtggtctcc 780
 atgctcctgg aggtggaggg ggcgggggac tatttgccca aatacgccgg caacctggac 840
 atcatgacgg cttctgcccg gaggggtggg gaggtcttcg ccagcacct cctggggaag 900
 cccgtggagg aggtggtggc gtga 924

<210> 230
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> *Thermus thermophilus*

<400> 230

Met Ser Glu Arg Val Lys Val Ala Ile Leu Gly Ser Gly Asn Ile Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Leu Met Tyr Lys Leu Leu Lys Asn Pro Gly His Met Glu Leu
 20 25 30

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

Arg Ala Leu Gly Leu Glu Ala Ser His Glu Gly Ile Ala Tyr Ile Leu

50	55	60
Glu Arg Pro Glu Ile Lys 65	Ile Val Phe Asp Ala Thr Ser Ala Lys Ala 70 75	
His Val Arg His Ala Lys Leu Leu Arg Glu Ala Gly Lys Ile Ala Ile 85	90	95
Asp Leu Thr Pro Ala Ala Arg Gly Pro Tyr Val Val Pro Pro Val Asn 100	105	110
Leu Lys Glu His Leu Asp Lys Asp Asn Val Asn Leu Ile Thr Cys Gly 115	120	125
Gly Gln Ala Thr Ile Pro Leu Val Tyr Ala Val His Arg Val Ala Pro 130	135	140
Val Leu Tyr Ala Glu Met Val Ser Thr Val Ala Ser Arg Ser Ala Gly 145	150	155 160
Pro Gly Thr Arg Gln Asn Ile Asp Glu Phe Thr Phe Thr Thr Ala Arg 165	170	175
Gly Leu Glu Ala Ile Gly Gly Ala Lys Lys Gly Lys Ala Ile Ile Ile 180	185	190
Leu Asn Pro Ala Glu Pro Pro Ile Leu Met Thr Asn Thr Val Arg Cys 195	200	205
Ile Pro Glu Asp Glu Gly Phe Asp Arg Glu Ala Val Val Ala Ser Val 210	215	220
Arg Ala Met Glu Arg Glu Val Gln Ala Tyr Val Pro Gly Tyr Arg Leu 225	230	235 240
Lys Ala Asp Pro Val Phe Glu Arg Leu Pro Thr Pro Trp Gly Glu Arg 245	250	255
Thr Val Val Ser Met Leu Leu Glu Val Glu Gly Ala Gly Asp Tyr Leu 260	265	270
Pro Lys Tyr Ala Gly Asn Leu Asp Ile Met Thr Ala Ser Ala Arg Arg 275	280	285
Val Gly Glu Val Phe Ala Gln His Leu Leu Gly Lys Pro Val Glu Glu 290	295	300
Val Val Ala 305		

<210> 231
 <211> 1254
 <212> ДНК
 <213> Escherichia coli

<400> 231
 atgacattct cccttttttg tgacaaattt acccgccact ccggcattac gctgttgatg 60
 gaagatctga acgacggttt acgcacgcct ggcgcgatta tgctcggcgg cggtaatccg 120
 gcgcagatcc cggaatgca ggactacttc cagacgctac tgaccgacat gctggaaagt 180
 ggcaaagcga ctgatgcact gtgtaactac gacggtccac aggggaaaac ggagctactc 240
 acactgcttg ccggaatgct gcgcgagaag ttgggttggg atatcgaacc acagaatatt 300
 gcactaacaac acggcagcca gagcgcgttt ttctacttat ttaacctgtt tgccggacgc 360
 cgtgccgatg gtcgggtcaa aaaagtgcgt ttcccgcctg caccggaata cattggctat 420
 gctgacgccg gactggaaga agatctgttt gtctctgcgc gtccgaatat tgaactgctg 480
 ccggaaggcc agtttaaata ccacgtcgat tttagcatc tgcatattgg cgaagaaacc 540
 gggatgattt gcgtctcccg gccgacgaat ccaacaggca atgtgattac tgacgaagag 600
 ttgtgaagc ttgacgcgct ggcgaatcaa caccgcattc cgctggtgat tgataacgct 660
 tatggcgctc cgttcccggg tatcatcttc agtgaagcgc gcccgcctatg gaatccgaat 720
 atcgtgctgt gcatgagtct ttccaagctg ggtctacctg gctcccgcctg cggcattatc 780
 atcgccaatg aaaaaatcat caccgccatc accaatatga acggcattat cagcctggca 840
 cctggcggtg ttggtccggc gatgatgtgt gaaatgatta agcgtaacga tctgctgcgc 900
 ctgtctgaaa cagtcatcaa accgttttac taccagcgtg ttcaggaaac tatcgccatc 960
 attcgccgct atttaccgga aaatcgctgc ctgattcata aaccggaagg agccattttc 1020
 ctctggctat ggtttaagga tttgccatt acgaccaagc agctctatca gcgcctgaaa 1080
 gcacgcggcg tgctgatggt gccggggcac aacttcttcc cagggctgga taaaccgtgg 1140
 ccgcatacgc atcaatgtat gcgcatgaac tacgtaccag agccggagaa aattgaggcg 1200
 ggggtgaaga ttctggcgga agagatagaa agagcctggg ctgaaagtca ctaa 1254

<210> 232
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 232

Met Thr Phe Ser Leu Phe Gly Asp Lys Phe Thr Arg His Ser Gly Ile
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Met Glu Asp Leu Asn Asp Gly Leu Arg Thr Pro Gly Ala
 20 25 30

Ile Met Leu Gly Gly Gly Asn Pro Ala Gln Ile Pro Glu Met Gln Asp
 35 40 45

Tyr Phe Gln Thr Leu Leu Thr Asp Met Leu Glu Ser Gly Lys Ala Thr
 50 55 60
 Asp Ala Leu Cys Asn Tyr Asp Gly Pro Gln Gly Lys Thr Glu Leu Leu
 65 70 75 80
 Thr Leu Leu Ala Gly Met Leu Arg Glu Lys Leu Gly Trp Asp Ile Glu
 85 90 95
 Pro Gln Asn Ile Ala Leu Thr Asn Gly Ser Gln Ser Ala Phe Phe Tyr
 100 105 110
 Leu Phe Asn Leu Phe Ala Gly Arg Arg Ala Asp Gly Arg Val Lys Lys
 115 120 125
 Val Leu Phe Pro Leu Ala Pro Glu Tyr Ile Gly Tyr Ala Asp Ala Gly
 130 135 140
 Leu Glu Glu Asp Leu Phe Val Ser Ala Arg Pro Asn Ile Glu Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Glu Gly Gln Phe Lys Tyr His Val Asp Phe Glu His Leu His Ile
 165 170 175
 Gly Glu Glu Thr Gly Met Ile Cys Val Ser Arg Pro Thr Asn Pro Thr
 180 185 190
 Gly Asn Val Ile Thr Asp Glu Glu Leu Leu Lys Leu Asp Ala Leu Ala
 195 200 205
 Asn Gln His Gly Ile Pro Leu Val Ile Asp Asn Ala Tyr Gly Val Pro
 210 215 220
 Phe Pro Gly Ile Ile Phe Ser Glu Ala Arg Pro Leu Trp Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Ile Val Leu Cys Met Ser Leu Ser Lys Leu Gly Leu Pro Gly Ser Arg
 245 250 255
 Cys Gly Ile Ile Ile Ala Asn Glu Lys Ile Ile Thr Ala Ile Thr Asn
 260 265 270
 Met Asn Gly Ile Ile Ser Leu Ala Pro Gly Gly Ile Gly Pro Ala Met
 275 280 285
 Met Cys Glu Met Ile Lys Arg Asn Asp Leu Leu Arg Leu Ser Glu Thr
 290 295 300
 Val Ile Lys Pro Phe Tyr Tyr Gln Arg Val Gln Glu Thr Ile Ala Ile
 305 310 315 320

Ile Arg Arg Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Cys Leu Ile His Lys Pro Glu
 325 330 335

Gly Ala Ile Phe Leu Trp Leu Trp Phe Lys Asp Leu Pro Ile Thr Thr
 340 345 350

Lys Gln Leu Tyr Gln Arg Leu Lys Ala Arg Gly Val Leu Met Val Pro
 355 360 365

Gly His Asn Phe Phe Pro Gly Leu Asp Lys Pro Trp Pro His Thr His
 370 375 380

Gln Cys Met Arg Met Asn Tyr Val Pro Glu Pro Glu Lys Ile Glu Ala
 385 390 395 400

Gly Val Lys Ile Leu Ala Glu Glu Ile Glu Arg Ala Trp Ala Glu Ser
 405 410 415

His

<210> 233
 <211> 1278
 <212> ДНК
 <213> Bacillus licheniformis

<400> 233
 ttataagtat tcaacctgtt tctcatatac acccttcgca atttttagcta aaacatcgat 60
 tccccttata atatcttcat ccgccgcggt taggctgatt cgtatacact ggtgtgaatg 120
 cgccaggcgc cgggattgac ggtgaaagaa agatgatccg ggaacgataa tgactccatc 180
 cgctttcata tactcataca gcgctgcatc ggtcaccggc aggtcttcaa accacagcca 240
 tccgaaaagc gatccttccc cttgatgcag ataccatttg atgtcttcag gcatcttgca 300
 taaaagcggt tccttgagca gcatgaattt attgcggtaa tatggcctga cttcattcag 360
 cgacacgtcg gcgaggcgcc cgtcattcaa tactgatgca gccatatact gccccagcct 420
 tgaagaatgg atcgccgcat tcgactgaaa agcttccatt gcctgaatat accgggacgg 480
 cccgatggcg attccgatcc ttccgccagg caggccggct ttgaaaggc tcatacagtg 540
 aatgatctgc tcgttgaaaa tcggttccat gtcgataaag tgaatcgccg gaaaaggcgg 600
 agcatatgcg gaatcaatga acagcggaac attcgcttct cggcatgcgt ctgaaatgaa 660
 tgctacatct tctttaggca agatgtttcc gcaaggattg ttccgggcgcg atagcaagac 720
 agcaccgatg cgcacctct ctaaaaaccc cttacggtcg agctcatatc gaaacgtatg 780
 atcatccaat ttcatatga gcggagggat cccctcaatc atctcccgt ccagtgccgc 840
 cccgctgtat cccgaatagt caggcagcat cgggatcaag gcttttttca tcacagatcc 900
 gcttcccatt ccgcaaaacg aattgatcgc cagaaaaaac agctgctggc ttccggctgt 960

aatcaacacg ttctcttttc gaatgccggc gctataccgc tctgaaaaga agcggacaac 1020
 acttgcaatc agttcatcgg ttccatagct cgatccgtat tggccgatca ccgaagaaaa 1080
 cctgtcatcg tcaaggagat cggcaagagc cgacttcac atggctgaca cgccgggcaa 1140
 aatcatcgga ttgcccgcac ttaaattaat gtatgaccgt tcaccgccgg ccaggacttc 1200
 ctgaatatcg ctcatcacag cctgacccc tgttttctca atcattttct ctccgatttt 1260
 gcttaatggc ggcttcac 1278

<210> 234
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis*

<400> 234

Met Lys Pro Pro Leu Ser Lys Ile Gly Glu Lys Met Ile Glu Lys Thr
1 5 10 15

Gly Val Arg Ala Val Met Ser Asp Ile Gln Glu Val Leu Ala Gly Gly
20 25 30

Glu Arg Ser Tyr Ile Asn Leu Ser Ala Gly Asn Pro Met Ile Leu Pro
35 40 45

Gly Val Ser Ala Met Trp Lys Ser Ala Leu Ala Asp Leu Leu Asp Asp
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Ser Val Ile Gly Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Thr
65 70 75 80

Asp Glu Leu Ile Ala Ser Val Val Arg Phe Phe Ser Glu Arg Tyr Ser
85 90 95

Ala Gly Ile Arg Lys Glu Asn Val Leu Ile Thr Ala Gly Ser Gln Gln
100 105 110

Leu Phe Phe Leu Ala Ile Asn Ser Phe Cys Gly Met Gly Ser Gly Ser
115 120 125

Val Met Lys Lys Ala Leu Ile Pro Met Leu Pro Asp Tyr Ser Gly Tyr
130 135 140

Ser Gly Ala Ala Leu Glu Arg Glu Met Ile Glu Gly Ile Pro Pro Leu
145 150 155 160

Ile Ser Lys Leu Asp Asp His Thr Phe Arg Tyr Glu Leu Asp Arg Lys
165 170 175

Gly Phe Leu Glu Arg Met Arg Ile Gly Ala Val Leu Leu Ser Arg Pro
180 185 190

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

<210> 235
 <211> 930
 <212> ДНК
 <213> Escherichia coli

<400> 235
 atgaccacga agaaagctga ttacatttgg ttcaatgggg agatggttcg ctgggaagac 60
 gcgaagggtgc atgtgatgtc gcacgcgctg cactatggca cticggtttt tgaaggcatc 120
 cgttgctacg actcgcacaa aggaccggtt gtattccgcc atcgtgagca tatgcagcgt 180
 ctgcatgact ccgccaaaat ctatcgcttc ccggtttcgc agagcattga tgagctgatg 240
 gaagcttgtc gtgacgtgat ccgcaaaaac aatctcacca gcgcctatat ccgtccgctg 300
 atcttcgctg gtgatgttgg catgggagta aaccgcccag cgggatactc aaccgacgtg 360
 attatcgctg ctttcccgtg gggagcgtat ctgggcgcag aagcgtgga gcaggggatc 420
 gatgcgatgg tttcctcctg gaaccgcgca gcaccaaaca ccatcccgcg ggcggcaaaa 480
 gccggtggta actacctctc ttccctgctg gtgggtagcg aagcgcgccg ccacggttat 540
 caggaaggta tcgcgctgga tgtgaacggt tatatctctg aaggcgcagg cgaaaacctg 600
 tttgaagtga aagatggtgt gctgttcacc ccaccgttca cctcctccgc gctgccgggt 660
 attaccctg atgccatcat caaactggcg aaagagctgg gaattgaagt acgtgagcag 720
 gtgctgtcgc gcgaatccct gtacctggcg gatgaagtgt ttatgtccgg tacggcggca 780
 gaaatcacgc cagtgcgcag cgtagacggt attcaggttg gcgaaggccg ttgtggcccc 840
 gttaccaaac gcattcagca agccttcttc ggcctcttca ctggcgaaac cgaagataaa 900
 tggggctggt tagatcaagt taatcaataa 930

<210> 236
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 236

Met Thr Thr Lys Lys Ala Asp Tyr Ile Trp Phe Asn Gly Glu Met Val
1 5 10 15

Arg Trp Glu Asp Ala Lys Val His Val Met Ser His Ala Leu His Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Val Phe Glu Gly Ile Arg Cys Tyr Asp Ser His Lys Gly
35 40 45

Pro Val Val Phe Arg His Arg Glu His Met Gln Arg Leu His Asp Ser
50 55 60

Ala Lys Ile Tyr Arg Phe Pro Val Ser Gln Ser Ile Asp Glu Leu Met
65 70 75 80

Glu Ala Cys Arg Asp Val Ile Arg Lys Asn Asn Leu Thr Ser Ala Tyr
85 90 95

Ile Arg Pro Leu Ile Phe Val Gly Asp Val Gly Met Gly Val Asn Pro
100 105 110

Pro Ala Gly Tyr Ser Thr Asp Val Ile Ile Ala Ala Phe Pro Trp Gly
 115 120 125
 Ala Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Glu Gln Gly Ile Asp Ala Met Val
 130 135 140
 Ser Ser Trp Asn Arg Ala Ala Pro Asn Thr Ile Pro Thr Ala Ala Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Gly Asn Tyr Leu Ser Ser Leu Leu Val Gly Ser Glu Ala Arg
 165 170 175
 Arg His Gly Tyr Gln Glu Gly Ile Ala Leu Asp Val Asn Gly Tyr Ile
 180 185 190
 Ser Glu Gly Ala Gly Glu Asn Leu Phe Glu Val Lys Asp Gly Val Leu
 195 200 205
 Phe Thr Pro Pro Phe Thr Ser Ser Ala Leu Pro Gly Ile Thr Arg Asp
 210 215 220
 Ala Ile Ile Lys Leu Ala Lys Glu Leu Gly Ile Glu Val Arg Glu Gln
 225 230 235 240
 Val Leu Ser Arg Glu Ser Leu Tyr Leu Ala Asp Glu Val Phe Met Ser
 245 250 255
 Gly Thr Ala Ala Glu Ile Thr Pro Val Arg Ser Val Asp Gly Ile Gln
 260 265 270
 Val Gly Glu Gly Arg Cys Gly Pro Val Thr Lys Arg Ile Gln Gln Ala
 275 280 285
 Phe Phe Gly Leu Phe Thr Gly Glu Thr Glu Asp Lys Trp Gly Trp Leu
 290 295 300
 Asp Gln Val Asn Gln
 305

<210> 237
 <211> 1131
 <212> ДНК
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 237
 atgaccttgg caccctaga cgcctccaaa gttaagataa ctaccacaca acatgcatct 60
 aagccaaaac cgaacagtga gttagtgttt ggcaagagct tcacggacca catgttaact 120
 gcggaatgga cagctgaaaa aggggtgggt accccagaga ttaaacccta tcaaaatctg 180
 tcttttagacc cttccgcggt ggttttccat tatgcttttg agctattcga agggatgaag 240

gcttacagaa cggtggacaa caaaattaca atgtttcgtc cagatatgaa tatgaagcgc 300
 atgaataagt ctgctcagag aatctgtttg ccaacgttcg acccagaaga gttgattacc 360
 ctaattggga aactgatcca gcaagataag tgcttagttc ctgaaggaaa aggttactct 420
 ttatatatca ggcctacatt aatcggcact acggccgggt taggggtttc cacgcctgat 480
 agagccttgc tatatgtcat ttgctgccct gtgggtcctt attacaaaac tggatttaag 540
 gcggtcagac tggaagccac tgattatgcc acaagagctt ggccaggagg ctgtggtgac 600
 aagaaactag gtgcaacta cgccccctgc gtcctgccac aattgcaagc tgcctcaagg 660
 ggttaccaac aaaatttatg gctatttgggt ccaaataaca acattactga agtcggcacc 720
 atgaatgctt ttttcgtgtt taaagatagt aaaacgggca agaaggaact agttactgct 780
 ccactagacg gtaccatttt ggaagggtgtt actagggatt ccatttttaa tcttgctaaa 840
 gaaagactcg aaccaagtga atggaccatt agtgaacgct acttcactat aggcgaagtt 900
 actgagagat ccaagaacgg tgaactactt gaagcctttg gttctggtac tgctgcgatt 960
 gtttctccca ttaaggaaat cggctggaaa ggcgaacaaa ttaatatcc gttgttgccc 1020
 ggcgaacaaa ccggtccatt ggccaaagaa gttgcacaat ggattaatgg aatccaatat 1080
 ggcgagactg agcatggcaa ttggtcaagg gttgttactg atttgaactg a 1131

<210> 238
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 238

Met Thr Leu Ala Pro Leu Asp Ala Ser Lys Val Lys Ile Thr Thr Thr
1 5 10 15

Gln His Ala Ser Lys Pro Lys Pro Asn Ser Glu Leu Val Phe Gly Lys
20 25 30

Ser Phe Thr Asp His Met Leu Thr Ala Glu Trp Thr Ala Glu Lys Gly
35 40 45

Trp Gly Thr Pro Glu Ile Lys Pro Tyr Gln Asn Leu Ser Leu Asp Pro
50 55 60

Ser Ala Val Val Phe His Tyr Ala Phe Glu Leu Phe Glu Gly Met Lys
65 70 75 80

Ala Tyr Arg Thr Val Asp Asn Lys Ile Thr Met Phe Arg Pro Asp Met
85 90 95

Asn Met Lys Arg Met Asn Lys Ser Ala Gln Arg Ile Cys Leu Pro Thr
100 105 110

Phe Asp Pro Glu Glu Leu Ile Thr Leu Ile Gly Lys Leu Ile Gln Gln
 115 120 125
 Asp Lys Cys Leu Val Pro Glu Gly Lys Gly Tyr Ser Leu Tyr Ile Arg
 130 135 140
 Pro Thr Leu Ile Gly Thr Thr Ala Gly Leu Gly Val Ser Thr Pro Asp
 145 150 155 160
 Arg Ala Leu Leu Tyr Val Ile Cys Cys Pro Val Gly Pro Tyr Tyr Lys
 165 170 175
 Thr Gly Phe Lys Ala Val Arg Leu Glu Ala Thr Asp Tyr Ala Thr Arg
 180 185 190
 Ala Trp Pro Gly Gly Cys Gly Asp Lys Lys Leu Gly Ala Asn Tyr Ala
 195 200 205
 Pro Cys Val Leu Pro Gln Leu Gln Ala Ala Ser Arg Gly Tyr Gln Gln
 210 215 220
 Asn Leu Trp Leu Phe Gly Pro Asn Asn Asn Ile Thr Glu Val Gly Thr
 225 230 235 240
 Met Asn Ala Phe Phe Val Phe Lys Asp Ser Lys Thr Gly Lys Lys Glu
 245 250 255
 Leu Val Thr Ala Pro Leu Asp Gly Thr Ile Leu Glu Gly Val Thr Arg
 260 265 270
 Asp Ser Ile Leu Asn Leu Ala Lys Glu Arg Leu Glu Pro Ser Glu Trp
 275 280 285
 Thr Ile Ser Glu Arg Tyr Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr Glu Arg Ser
 290 295 300
 Lys Asn Gly Glu Leu Leu Glu Ala Phe Gly Ser Gly Thr Ala Ala Ile
 305 310 315 320
 Val Ser Pro Ile Lys Glu Ile Gly Trp Lys Gly Glu Gln Ile Asn Ile
 325 330 335
 Pro Leu Leu Pro Gly Glu Gln Thr Gly Pro Leu Ala Lys Glu Val Ala
 340 345 350
 Gln Trp Ile Asn Gly Ile Gln Tyr Gly Glu Thr Glu His Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ser Arg Val Val Thr Asp Leu Asn
 370 375

<210> 239
 <211> 993
 <212> ДНК
 <213> *Methanobacterium thermoautotrophicum*
 <400> 239
 tcagatgtag gtgagccatc cgaagctgtc ctctgtctct gccctgatta tcctgaagaa 60
 ctcacccctgc agcagctttg taacgggacc ccttcgcccg gcacctatct ctataccatc 120
 aactgatctg atgggtgtta tctctgctgc tgtacctgtg aagaaggcct catctgcat 180
 gtagagcatc tccctgggta tgggttcctc atgcacggta acaccctcgg tcctggctat 240
 ctttattacg gagtcccttg ttatccccct cagaagggat gatgaaacag ggggggtgta 300
 aatttcaccc tcaactgacga ggaatatgtt ctccccgcta ccttcactta tgtagccatg 360
 gtagtccagc attatggcct catcatagcc gtgtctcaca gcctccatct tggcaagctg 420
 tgagttgagg tagttaccgc cggcctttgc catgttgggc attgtgtttg gtgccatcct 480
 ccgccagggt gaaacaccag catcgacacc aacctcaagg gcctctgcac ccagataggg 540
 cccccattcc caggcagcca cagcgacgtc cactgggcag ttcaccgggt gaacacccat 600
 ctcaccgtat cccctgaata ccacgggtct tatatagcac tcctcaagtc cgttctccct 660
 gacgggtctca actatggcat cacatatctg ctccctgggtg tagggatatgt ccatccggta 720
 tatctttgca gaatcaaaaa ggcgtttaac atgctccgc aaacggaaga tggctgaccc 780
 cttactgttc ctgtagcacc ttattccctc aaagacagat gatccataat gcacaacatg 840
 tgagagtacg tggacgggtg cttcttccca ttcaaccatt tcaccgttta accatatctt 900
 tccactggct tcgcatgaca tgataataac ctcagggtgat ttactaggat aggttatgg 960
 tggaggccta tataatgctc tccataaccg caa 993

<210> 240
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Methanobacterium thermoautotrophicum*

<400> 240

Met Arg Leu Trp Arg Ala Leu Tyr Arg Pro Pro Thr Ile Thr Tyr Pro
1 5 10 15

Ser Lys Ser Pro Glu Val Ile Ile Met Ser Cys Glu Ala Ser Gly Lys
20 25 30

Ile Trp Leu Asn Gly Glu Met Val Glu Trp Glu Glu Ala Thr Val His
35 40 45

Val Leu Ser His Val Val His Tyr Gly Ser Ser Val Phe Glu Gly Ile
50 55 60

Arg Cys Tyr Arg Asn Ser Lys Gly Ser Ala Ile Phe Arg Leu Arg Glu
65 70 75 80

His Val Lys Arg Leu Phe Asp Ser Ala Lys Ile Tyr Arg Met Asp Ile
 85 90 95
 Pro Tyr Thr Gln Glu Gln Ile Cys Asp Ala Ile Val Glu Thr Val Arg
 100 105 110
 Glu Asn Gly Leu Glu Glu Cys Tyr Ile Arg Pro Val Val Phe Arg Gly
 115 120 125
 Tyr Gly Glu Met Gly Val His Pro Val Asn Cys Pro Val Asp Val Ala
 130 135 140
 Val Ala Ala Trp Glu Trp Gly Ala Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Glu
 145 150 155 160
 Val Gly Val Asp Ala Gly Val Ser Thr Trp Arg Arg Met Ala Pro Asn
 165 170 175
 Thr Met Pro Asn Met Ala Lys Ala Gly Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gln
 180 185 190
 Leu Ala Lys Met Glu Ala Val Arg His Gly Tyr Asp Glu Ala Ile Met
 195 200 205
 Leu Asp Tyr His Gly Tyr Ile Ser Glu Gly Ser Gly Glu Asn Ile Phe
 210 215 220
 Leu Val Ser Glu Gly Glu Ile Tyr Thr Pro Pro Val Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Leu Arg Gly Ile Thr Arg Asp Ser Val Ile Lys Ile Ala Arg Thr Glu
 245 250 255
 Gly Val Thr Val His Glu Glu Pro Ile Thr Arg Glu Met Leu Tyr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Glu Ala Phe Phe Thr Gly Thr Ala Ala Glu Ile Thr Pro Ile
 275 280 285
 Arg Ser Val Asp Gly Ile Glu Ile Gly Ala Gly Arg Arg Gly Pro Val
 290 295 300
 Thr Lys Leu Leu Gln Asp Glu Phe Phe Arg Ile Ile Arg Ala Glu Thr
 305 310 315 320
 Glu Asp Ser Phe Gly Trp Leu Thr Tyr Ile
 325 330
 <210> 241

<211> 1095
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces coelicolor

 <400> 241
 tcacggccgg ggacgggcct ccgccatccg ctgctcggcg atccggtcgg ccgcccgggc 60
 cggcggaata ccgtcctcct tcgcacgtgc gaatatggcc agcgtggtgt cgtagatctt 120
 cgaggccttc gccttgacc ggtcgaagtc gaaccctgac agctcgtcgg cgacctggat 180
 gacaccggcg gcgttcacca catagtccgg cgcgtagagg atcccgcggg cggcgaggtc 240
 cttctcgacg cccgggtggg cgagctggtt gttggccgcg ccgcacacca ccttggcggt 300
 cagcaccggc acggtgtcgt cgttcagcgc gccgccgagc gcgcagggcg cgtagatgtc 360
 caggttctcc acccgatca gcgcgtcggg gtcggcgacg gcgaccaccg acgggtgccg 420
 ctccgtgatc ccgcgcacca cgtccttgcg cacgtccgtg acgacgacgt gggcgccctc 480
 ggcgagcagg tgctcgacca ggtggtggcc gaccttgccg acgcccgcga tgccgacggg 540
 gcggtcgcgc agcgtcgggt cgccccacag gtgctggggc gcggcccgcga tgccctggta 600
 gacgccgaag gaggtgagca cggaggagtc gcccgcgccg ccgttctccg gggaacgccc 660
 ggtcgtccag cggcactcgc gggccacgac gtccatgtcg gcgacgtagg tgccgacgtc 720
 gcacgcggtg acgtagcggc cgcccagcga ggcgacgaac cggccgtagg cgaggagcag 780
 ctctctgctc ttgatctgct ccggatcgcc gatgatcacg gccttgccgc caccgtggtc 840
 cagaccggcc atggcgttct tgtacgacat cccgcgggcg aggttcagcg cgtcggcgac 900
 ggccctccgc tcgctcgcgt acgggtagaa gcgggtaccg ccgagcgcg ggcccagggc 960
 ggtggagtgg agggcgatca cggccttgag gccgctggca cggtcctggc agagcacgac 1020
 ttgctcatgt cccccctgat ccgagtggaa caggggtgtg agtacatcag caggtgcgcc 1080
 gtttacgtcg gtcac 1095

<210> 242
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 242
 Met Thr Asp Val Asn Gly Ala Pro Ala Asp Val Leu His Thr Leu Phe
 1 5 10 15

 His Ser Asp Gln Gly Gly His Glu Gln Val Val Leu Cys Gln Asp Arg
 20 25 30

 Ala Ser Gly Leu Lys Ala Val Ile Ala Leu His Ser Thr Ala Leu Gly
 35 40 45

 Pro Ala Leu Gly Gly Thr Arg Phe Tyr Pro Tyr Ala Ser Glu Ala Glu
 50 55 60

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

Arg Ala Lys Glu Asp Gly Ile Pro Pro Ala Ala Ala Ala Asp Arg Ile
 340 345 350

Ala Glu Gln Arg Met Ala Glu Ala Arg Pro Arg Pro
 355 360

<210> 243
 <211> 1095
 <212> ДНК
 <213> Bacillus subtilis

<400> 243
 atggaacttt ttaaatatat ggagaaatac gattacgaac aattggtatt ctgccaggat 60
 gaacaatctg gattaaaagc gattatcgcc attcatgata caacgcttgg tccggcgctt 120
 ggcggaacga gaatgtggac atatgaaaat gaagaagcgg caattgaaga tgcgctcaga 180
 ttggcaagag gcatgaccta taagaacgcg gcggcaggct taaaccttgg cggcggaaaa 240
 acagtcatta tcggcgatcc gcgcaaagac aaaaatgagg aaatgttccg cgcggttggc 300
 cgctatattc aaggactgaa tggcagatac atcacggctg aagatgtggg cacaacggtc 360
 gaggatatgg atatcattca tgatgagaca gactatgtca cagggatttc tcctgctrtc 420
 ggctcttctg gaaatccgtc cccagtcaca gcgtacgggg tgtacagagg aatgaaggca 480
 gcagctaaag ctgctttcgg aaccgattct cttgaaggaa aaaccattgc tgtacagggg 540
 gttgggaacg tagcctataa cctttgccgc cacctgcatg aagaaggagc aaacttaatc 600
 gttacggata tcaacaaaca atctgtacag cgtgcagttg aagatttttg cgcccgtgcg 660
 gtagatcctg atgacattta ttcacaagac tgcgatattt atgcgccgtg tgcccttggt 720
 gcgactatta acgacgacac cattaaacag ctgaaggcga aagtgatcgc aggtgcggct 780
 aacaaccaat taaaagagac acgccatggt gatcaaattc acgaaatggg catcgtttat 840
 gcaccggatt acgtgattaa cgcgggcggt gtcacaaacg tggcagatga gctttacggc 900
 tataatgcag aacgtgcatt gaaaaaagtt gaaggcattt acggcaatat cgagcgtgta 960
 cttgagattt ctcagcgtga cggcattcct gcatatttag cggctgaccg cttagcagag 1020
 gaacggattg aacgcatgcg ccgctcaaga agccagtttt tgcaaaacgg ccacagtgtg 1080
 ttaagcagac gttaa 1095

<210> 244
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<400> 244

Met Glu Leu Phe Lys Tyr Met Glu Lys Tyr Asp Tyr Glu Gln Leu Val
 1 5 10 15

Phe Cys Gln Asp Glu Gln Ser Gly Leu Lys Ala Ile Ile Ala Ile His
 20 25 30

Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly Gly Thr Arg Met Trp Thr Tyr
 35 40 45
 Glu Asn Glu Glu Ala Ala Ile Glu Asp Ala Leu Arg Leu Ala Arg Gly
 50 55 60
 Met Thr Tyr Lys Asn Ala Ala Ala Gly Leu Asn Leu Gly Gly Gly Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Ile Ile Gly Asp Pro Arg Lys Asp Lys Asn Glu Glu Met Phe
 85 90 95
 Arg Ala Phe Gly Arg Tyr Ile Gln Gly Leu Asn Gly Arg Tyr Ile Thr
 100 105 110
 Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Val Glu Asp Met Asp Ile Ile His Asp
 115 120 125
 Glu Thr Asp Tyr Val Thr Gly Ile Ser Pro Ala Phe Gly Ser Ser Gly
 130 135 140
 Asn Pro Ser Pro Val Thr Ala Tyr Gly Val Tyr Arg Gly Met Lys Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Lys Ala Ala Phe Gly Thr Asp Ser Leu Glu Gly Lys Thr Ile
 165 170 175
 Ala Val Gln Gly Val Gly Asn Val Ala Tyr Asn Leu Cys Arg His Leu
 180 185 190
 His Glu Glu Gly Ala Asn Leu Ile Val Thr Asp Ile Asn Lys Gln Ser
 195 200 205
 Val Gln Arg Ala Val Glu Asp Phe Gly Ala Arg Ala Val Asp Pro Asp
 210 215 220
 Asp Ile Tyr Ser Gln Asp Cys Asp Ile Tyr Ala Pro Cys Ala Leu Gly
 225 230 235 240
 Ala Thr Ile Asn Asp Asp Thr Ile Lys Gln Leu Lys Ala Lys Val Ile
 245 250 255
 Ala Gly Ala Ala Asn Asn Gln Leu Lys Glu Thr Arg His Gly Asp Gln
 260 265 270
 Ile His Glu Met Gly Ile Val Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Ile Asn Ala
 275 280 285
 Gly Gly Val Ile Asn Val Ala Asp Glu Leu Tyr Gly Tyr Asn Ala Glu

290	295	300
Arg Ala Leu Lys Lys Val Glu Gly Ile Tyr Gly Asn Ile Glu Arg Val		
305	310	315 320
Leu Glu Ile Ser Gln Arg Asp Gly Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Ala Asp		
	325	330 335
Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ile Glu Arg Met Arg Arg Ser Arg Ser Gln		
	340	345 350
Phe Leu Gln Asn Gly His Ser Val Leu Ser Arg Arg		
355	360	

<210> 245
 <211> 1785
 <212> ДНК
 <213> *Streptomyces viridifaciens*

<400> 245
 gtgtcaactt cctccgcttc ttccggggccg gacctcccct tcggggcccga ggacacgcca 60
 tggcagaagg ccttcagcag gctgcgggcg gtggatggcg tgccgcgcgt caccgcgccg 120
 tccagtgatc cgcgtgaggt ctacatggac atccccgaga tcccccttctc caaggtccag 180
 atccccccgg acggaatgga cgagcagcag tacgcagagg ccgagagcct cttccgccgc 240
 tacgtagacg cccagacccg caacttcgcg ggataccagg tcaccagcga cctcgactac 300
 cagcacctca gtcactatct caaccggcat ctgaacaacg tcggcgatcc ctatgagtcc 360
 agctcctaca cgctgaactc caaggtcctt gagcgagccg ttctcgacta cttcgccctc 420
 ctgtggaacg ccaagtggcc ccatgacgca agcgatccgg aaacgtactg gggttacgtg 480
 ctgaccatgg gctccagcga aggcaacctg tacgggttgt ggaacgcacg ggactatctg 540
 tcgggcaagc tgctgcggcg ccagcaccgg gaggccggcg gcgacaaggc ctcggtcgtc 600
 tacacgcaag cgctgcgaca cgaagggcag agtccgcgtg cctacgagcc ggtggcgctt 660
 ttctcgcagg acacgcacta ctgcgtcacg aaggccgtgc gggttctggg catcgacacc 720
 ttccacagca tcggcagcag tcggtatccg gacgagaacc cgctggggcc cggcactccg 780
 tggccgaccg aagtgccctc ggttgacggt gccatcgatg tcgacaaact cgcctcgttg 840
 gtccgcttct tcgccagcaa gggctacccg atactggtca gcctcaacta cgggtcaacg 900
 ttcaagggcg cctacgacga cgtcccggcc gtggcacagg ccgtgcggga catctgcacg 960
 gaatacggtc tggatcggcg gcgggtatac cagcaccgca gtaaggacag tgacttcgac 1020
 gagcgacgcg gcttctggat ccacatcgat gccgccctgg gggcgggcta cgctccctac 1080
 ctgcagatgg cccgggatgc cggcatggtc gaggaggcgc cgcccgtttt cgacttccgg 1140
 ctccccgagg tgcaactcgt gaccatgagc ggccacaagt ggatgggaac accgtgggca 1200
 tgcggtgtct acatgacacg gaccgggctg cagatgaccc cgccgaagtc gtccgagtac 1260

atcggggcgg ccgacaccac cttcgcgggc tcccgcacg gcttctcgtc actgctgctg 1320
 tgggactacc tgtcccgga ttcgtatgac gatctggtgc gcctggccgc cgactgagac 1380
 cggctggccg gctacgcca cgaccggtt ctgaccttgc aggacaaact cggcatggat 1440
 ctgtgggtcg cccgcagccc gcagtccttc acggtgcgt tccgtcagcc atgtgcagac 1500
 atcgtccgca agtactcgt gtcgtgtgag acggtctacg aagacaacga gcaacggacc 1560
 tacgtacatc tctacgccgt tccccacctc actcgggaac tcgtggatga gctcgtgcgc 1620
 gatctgcgcc agcccgagc cttaccaac gctggtgcac tggaggggga ggcctgggcc 1680
 ggggtgatcg atgccctcgg ccgcccggac cccgacggaa cctatgccgg cgccttgagc 1740
 gctccggctt ccggcccccg ctccgaggac ggcggcggga gctga 1785

<210> 246
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces viridifaciens*

<400> 246

Met Ser Thr Ser Ser Ala Ser Ser Gly Pro Asp Leu Pro Phe Gly Pro
1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Trp Gln Lys Ala Phe Ser Arg Leu Arg Ala Val Asp
20 25 30

Gly Val Pro Arg Val Thr Ala Pro Ser Ser Asp Pro Arg Glu Val Tyr
35 40 45

Met Asp Ile Pro Glu Ile Pro Phe Ser Lys Val Gln Ile Pro Pro Asp
50 55 60

Gly Met Asp Glu Gln Gln Tyr Ala Glu Ala Glu Ser Leu Phe Arg Arg
65 70 75 80

Tyr Val Asp Ala Gln Thr Arg Asn Phe Ala Gly Tyr Gln Val Thr Ser
85 90 95

Asp Leu Asp Tyr Gln His Leu Ser His Tyr Leu Asn Arg His Leu Asn
100 105 110

Asn Val Gly Asp Pro Tyr Glu Ser Ser Ser Tyr Thr Leu Asn Ser Lys
115 120 125

Val Leu Glu Arg Ala Val Leu Asp Tyr Phe Ala Ser Leu Trp Asn Ala
130 135 140

Lys Trp Pro His Asp Ala Ser Asp Pro Glu Thr Tyr Trp Gly Tyr Val
145 150 155 160

Leu Thr Met Gly Ser Ser Glu Gly Asn Leu Tyr Gly Leu Trp Asn Ala

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

Asn Gly Phe Ser Ser Leu Leu Leu Trp Asp Tyr Leu Ser Arg His Ser
 435 440 445
 Tyr Asp Asp Leu Val Arg Leu Ala Ala Asp Cys Asp Arg Leu Ala Gly
 450 455 460
 Tyr Ala His Asp Arg Leu Leu Thr Leu Gln Asp Lys Leu Gly Met Asp
 465 470 475 480
 Leu Trp Val Ala Arg Ser Pro Gln Ser Leu Thr Val Arg Phe Arg Gln
 485 490 495
 Pro Cys Ala Asp Ile Val Arg Lys Tyr Ser Leu Ser Cys Glu Thr Val
 500 505 510
 Tyr Glu Asp Asn Glu Gln Arg Thr Tyr Val His Leu Tyr Ala Val Pro
 515 520 525
 His Leu Thr Arg Glu Leu Val Asp Glu Leu Val Arg Asp Leu Arg Gln
 530 535 540
 Pro Gly Ala Phe Thr Asn Ala Gly Ala Leu Glu Gly Glu Ala Trp Ala
 545 550 555 560
 Gly Val Ile Asp Ala Leu Gly Arg Pro Asp Pro Asp Gly Thr Tyr Ala
 565 570 575
 Gly Ala Leu Ser Ala Pro Ala Ser Gly Pro Arg Ser Glu Asp Gly Gly
 580 585 590

Gly Ser

<210> 247
 <211> 1323
 <212> ДНК
 <213> *Alcaligenes denitrificans*

<400> 247
 atgagcgtg ccaaactgcc cgacctgtcc cacctctgga tgccctttac cgccaaccgg 60
 cagttcaagg cgaacccccg cctgctggcc tcggccaagg gcatgtacta cacgtctttc 120
 gacggccgcc agatcctgga cggcacggcc ggctgtggt gcgtgaacgc cggccactgc 180
 cgcgaagaaa tcgtctccgc catcgccagc caggccggcg tcatggacta cgcgccgggg 240
 ttccagctcg gccacccgct ggccttcgag gccgccaccg ccgtggccgg cctgatgccg 300
 cagggccttg accgcgtgtt cttaccaat tcgggctccg aatcggtgga caccgcgctg 360
 aagatcgccc tggcctacca ccgcgcgcgc ggcgaggcgc agcgcacccg cctcatcggg 420
 cgcgagcgcg gctaccacgg cgtgggcttc ggcggcattt ccgtgggcgg catctcgccc 480
 aaccgcaaga ctttctccgg cgcgctgctg ccggccgtgg accacctgcc gcacaccac 540

```

agcctggaac acaacgcctt cacgcgcggc cagcccgagt ggggcgcgca cctggccgac 600
gagttggaac gcatcatcgc cctgcacgac gcctccacca tcgcggccgt gatcgtcgag 660
cccattggccg gctccaccgg cgtgctcgtc ccgcccgaagg gctatctcga aaaactgcgc 720
gaaatcaccg cccgccacgg cattctgctg atcttcgacg aagtcatcac cgcgtacggc 780
cgcctgggcg aggccaccgc cgcggcctat ttcggcgtaa cgcccgacct catcaccatg 840
gccaaaggcg tgagcaacgc cgcggttccg gccggcgccg tcgcggtgcg ccgcgaagtg 900
catgacgcca tcgtcaacgg accgcaaggc ggcacgcagt tcttcacgg ctacacctac 960
tcggcccacc cgctggccgc cgcgcgcgtg ctcgccacgc tggacatcta ccgccgcgaa 1020
gacctgttcg cccgcgcccg caagctgtcg gccgcgttcg aggaagccgc ccacagcctc 1080
aagggcgcgc cgcacgtcat cgacgtgcgc aacatcggcc tggtgggcgg catcgagctg 1140
tcggcgcgcg aaggcgcccc gggcgcgcgc gccgcggaag ccttcagaa atgcttcgac 1200
accggcctca tggcgcgcta cacggcgac atcctcgcg tgctgcctcc gctcatcgtc 1260
gacgaaaacc agatcggcca gatcttcgag ggcacggca aggtgctcaa ggaagtggct 1320
tag 1323

```

```

<210> 248
<211> 440
<212> PRT
<213> Омега-аминокислота:пируваттрансаминаза
<400> 248

```

```

Met Ser Ala Ala Lys Leu Pro Asp Leu Ser His Leu Trp Met Pro Phe
1          5          10          15

```

```

Thr Ala Asn Arg Gln Phe Lys Ala Asn Pro Arg Leu Leu Ala Ser Ala
          20          25          30

```

```

Lys Gly Met Tyr Tyr Thr Ser Phe Asp Gly Arg Gln Ile Leu Asp Gly
          35          40          45

```

```

Thr Ala Gly Leu Trp Cys Val Asn Ala Gly His Cys Arg Glu Glu Ile
          50          55          60

```

```

Val Ser Ala Ile Ala Ser Gln Ala Gly Val Met Asp Tyr Ala Pro Gly
65          70          75          80

```

```

Phe Gln Leu Gly His Pro Leu Ala Phe Glu Ala Ala Thr Ala Val Ala
          85          90          95

```

```

Gly Leu Met Pro Gln Gly Leu Asp Arg Val Phe Phe Thr Asn Ser Gly
          100          105          110

```

```

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ala Leu Lys Ile Ala Leu Ala Tyr His Arg
          115          120          125

```

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

385		390		395		400
Thr Gly Leu Met Val Arg Tyr Thr Gly Asp Ile Leu Ala Val Ser Pro						
		405		410		415
Pro Leu Ile Val Asp Glu Asn Gln Ile Gly Gln Ile Phe Glu Gly Ile						
		420		425		430
Gly Lys Val Leu Lys Glu Val Ala						
		435		440		

<210> 249
 <211> 1332
 <212> ДНК
 <213> *Ralstonia eutropha*

<400> 249
 atggacgccg cgaagaccgt gattcccgat ctcgatgccc tgtggatgcc ctttaccgcg 60
 aaccgccagt acaaggcggc gccgcgcctg ctggcctcgg ccagcggcat gtactacacc 120
 acccacgacg gacgccagat cctcgacggt tgcgcggggc tctggtgcgt agcggccggc 180
 cactgccgca aggagattgc cgaggccgtg gcccgccagg ccgccacgct cgactacgcg 240
 ccgccgttcc agatggggcca tccgctgtcg ttccaagccg ccaccaaggt ggccgcgac 300
 atgccgcagg gactggaccg catcttcttc acgaattccg gttcggaatc ggtggacacc 360
 gcgctgaaga ttgcgctggc ctaccaccgt gcgcgcggcg agggccagcg caccgcgttc 420
 atcggggcgcg aacgcggtta ccacggcgtg ggctttggcg gcatggctgt cggtggcac 480
 gggccgaacc gcaaggcggt ctcggccaac ctgatgccgg gcaccgacca tctgccggcg 540
 acgctgaata tcgccgaagc ggcgtttctc aagggtcagc cgacatgggg cgcgacctt 600
 gccgacgaac tcgagcgcat cgtcgcgctg catgatccgt ccacgattgc cgccgtcatc 660
 gtggaaccgc tggcgggctc cgccgggggt ctggtgcccg cggtcggcta cctcgacaag 720
 ctgcgcgaga tcacgaccaa gcacggcatc ctgctgatct tcgacgaggt catcacggcc 780
 tttggctcgcc tgggtaccgc caccgcggcg gaacgcttca aggtcacgcc ggacctgac 840
 accatggcca aggccatcaa caacgccgcc gtgccgatgg gtgccgtggc cgtgcgccgc 900
 gaagtccatg acaccgtggt caactcggcc gcgcggggcg cgatcgaact cgcgcatggc 960
 tacacctact cgggccaccc gctggccgcc gccgctgcc tgcgccacgt ggacctgtat 1020
 cagcgcgaga acctgttcgg ccgtgccgcg gagctgtcgc cgggtgttcga agcggccggt 1080
 cacagcgtag gcagcgcgcc gcatgtgaag gacatccgca acctcggcat ggtggccggc 1140
 atcgagctgg agccgcgtcc gggccagccc ggcgcacgcg cctacgaagc cttcctcaaa 1200
 tgccttgagc gtggcgtgct ggtgcgctac accggcgata tcctcgcgtt ctcgccgccg 1260
 ctgatcatca gcgaggcgca gattgccgag ctgttcgata cggtaagca ggccttgag 1320
 gaagtgcagt aa 1332

<210> 250
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> *Ralstonia eutropha*

<400> 250

```

Met Asp Ala Ala Lys Thr Val Ile Pro Asp Leu Asp Ala Leu Trp Met
1      5      10      15

Pro Phe Thr Ala Asn Arg Gln Tyr Lys Ala Ala Pro Arg Leu Leu Ala
      20      25      30

Ser Ala Ser Gly Met Tyr Tyr Thr Thr His Asp Gly Arg Gln Ile Leu
      35      40      45

Asp Gly Cys Ala Gly Leu Trp Cys Val Ala Ala Gly His Cys Arg Lys
      50      55      60

Glu Ile Ala Glu Ala Val Ala Arg Gln Ala Ala Thr Leu Asp Tyr Ala
      65      70      75      80

Pro Pro Phe Gln Met Gly His Pro Leu Ser Phe Glu Ala Ala Thr Lys
      85      90      95

Val Ala Ala Ile Met Pro Gln Gly Leu Asp Arg Ile Phe Phe Thr Asn
      100      105      110

Ser Gly Ser Glu Ser Val Asp Thr Ala Leu Lys Ile Ala Leu Ala Tyr
      115      120      125

His Arg Ala Arg Gly Glu Gly Gln Arg Thr Arg Phe Ile Gly Arg Glu
      130      135      140

Arg Gly Tyr His Gly Val Gly Phe Gly Gly Met Ala Val Gly Gly Ile
      145      150      155      160

Gly Pro Asn Arg Lys Ala Phe Ser Ala Asn Leu Met Pro Gly Thr Asp
      165      170      175

His Leu Pro Ala Thr Leu Asn Ile Ala Glu Ala Ala Phe Ser Lys Gly
      180      185      190

Gln Pro Thr Trp Gly Ala His Leu Ala Asp Glu Leu Glu Arg Ile Val
      195      200      205

Ala Leu His Asp Pro Ser Thr Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro Leu
      210      215      220

Ala Gly Ser Ala Gly Val Leu Val Pro Pro Val Gly Tyr Leu Asp Lys
      225      230      235      240

```

Leu Arg Glu Ile Thr Thr Lys His Gly Ile Leu Leu Ile Phe Asp Glu
 245 250 255
 Val Ile Thr Ala Phe Gly Arg Leu Gly Thr Ala Thr Ala Ala Glu Arg
 260 265 270
 Phe Lys Val Thr Pro Asp Leu Ile Thr Met Ala Lys Ala Ile Asn Asn
 275 280 285
 Ala Ala Val Pro Met Gly Ala Val Ala Val Arg Arg Glu Val His Asp
 290 295 300
 Thr Val Val Asn Ser Ala Ala Pro Gly Ala Ile Glu Leu Ala His Gly
 305 310 315 320
 Tyr Thr Tyr Ser Gly His Pro Leu Ala Ala Ala Ala Ile Ala Thr
 325 330 335
 Leu Asp Leu Tyr Gln Arg Glu Asn Leu Phe Gly Arg Ala Ala Glu Leu
 340 345 350
 Ser Pro Val Phe Glu Ala Ala Val His Ser Val Arg Ser Ala Pro His
 355 360 365
 Val Lys Asp Ile Arg Asn Leu Gly Met Val Ala Gly Ile Glu Leu Glu
 370 375 380
 Pro Arg Pro Gly Gln Pro Gly Ala Arg Ala Tyr Glu Ala Phe Leu Lys
 385 390 395 400
 Cys Leu Glu Arg Gly Val Leu Val Arg Tyr Thr Gly Asp Ile Leu Ala
 405 410 415
 Phe Ser Pro Pro Leu Ile Ile Ser Glu Ala Gln Ile Ala Glu Leu Phe
 420 425 430
 Asp Thr Val Lys Gln Ala Leu Gln Glu Val Gln
 435 440

<210> 251
 <211> 1341
 <212> ДНК
 <213> *Shewanella oneidensis*
 <400> 251
 atggccgact caccacaacaa cctcgctcac gaacatcctt cacttgaaca ctattggatg 60
 cctttttaccg ccaatcgcca attcaaagcg agccctcggt tactcgccca agctgaaggt 120
 atgtattaca cagatatcaa tggcaacaag gtattagact ctacagcggg cttatgggtgt 180
 tgtaatgctg gccatggtcg ccgtgagatc agtgaagccg tcagcaaaca aattcggcag 240

```

atggattacg ctccctcctt ccaaattgggc catcccatcg cttttgaact ggccgaacgt 300
ttaaccgaac tcagcccaga aggactcaac aaagtattct ttaccaactc aggctctgag 360
tcggttgata ccgcgctaaa aatggctctt tgctaccata gagccaatgg ccaagcgtca 420
cgcacccgct ttattggccg tgaaatgggt taccatggcg taggatttgg tgggatctcg 480
gtgggtggtt taagcaataa ccgtaaagcc ttcagcggcc agctattgca aggcgtggat 540
cacctgcccc acaccttaga cattcaacat gccgccttta gtcgtggctt accgagcctc 600
ggtgctgaaa aagctgaggt attagaacaa ttagtcacac tccatggcgc cgaaaatatt 660
gccgccgtta ttgttgaacc catgtcaggt tctgcagggg taattttacc acctcaaggc 720
tacttaaaac gcttacgtga aatcactaaa aaacacggca tcttattgat ttctgatgaa 780
gtcattaccg catttggccg tgtaggtgca gcattcgcca gccaacgttg gggcggttatt 840
ccagacataa tcaccacggc taaagccatt aataatggcg ccatccccat gggcgcagtg 900
tttgtagagg attatatcca cgatacttgc atgcaagggc caaccgaact gattgaattt 960
ttccacgggtt atacctattc gggccaccca gtcgccgcag cagcagcact cgccacgctc 1020
tccatctacc aaaacgagca actgtttgag cgcagttttg agcttgagcg gtatttcgaa 1080
gaagccgttc atagcctcaa agggttaccg aatgtgattg atattcgcaa caccggatta 1140
gtcgcgggtt tccagctagc accgaatagc caagggtgtg gtaaacgcgg atacagcgtg 1200
ttcgagcatt gtttccatca aggcacactc gtgcggggcaa cgggcgatat tatcgccatg 1260
tccccaccac tcattgttga gaaacatcag attgaccaa tggtaaatag ccttagcgat 1320
gcaattcacg ccgttggatg a 1341

```

<210> 252

<211> 446

<212> PRT

<213> Бета-аланин-пируваттрансаминаза

<400> 252

```

Met Ala Asp Ser Pro Asn Asn Leu Ala His Glu His Pro Ser Leu Glu
1          5          10          15

```

```

His Tyr Trp Met Pro Phe Thr Ala Asn Arg Gln Phe Lys Ala Ser Pro
          20          25          30

```

```

Arg Leu Leu Ala Gln Ala Glu Gly Met Tyr Tyr Thr Asp Ile Asn Gly
          35          40          45

```

```

Asn Lys Val Leu Asp Ser Thr Ala Gly Leu Trp Cys Cys Asn Ala Gly
          50          55          60

```

```

His Gly Arg Arg Glu Ile Ser Glu Ala Val Ser Lys Gln Ile Arg Gln
65          70          75          80

```

```

Met Asp Tyr Ala Pro Ser Phe Gln Met Gly His Pro Ile Ala Phe Glu

```

85										90					95						
Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	Glu	Gly	Leu	Asn	Lys	Val						
			100					105					110								
Phe	Phe	Thr	Asn	Ser	Gly	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Leu	Lys	Met						
		115					120					125									
Ala	Leu	Cys	Tyr	His	Arg	Ala	Asn	Gly	Gln	Ala	Ser	Arg	Thr	Arg	Phe						
	130					135					140										
Ile	Gly	Arg	Glu	Met	Gly	Tyr	His	Gly	Val	Gly	Phe	Gly	Gly	Ile	Ser						
145					150					155					160						
Val	Gly	Gly	Leu	Ser	Asn	Asn	Arg	Lys	Ala	Phe	Ser	Gly	Gln	Leu	Leu						
				165					170					175							
Gln	Gly	Val	Asp	His	Leu	Pro	His	Thr	Leu	Asp	Ile	Gln	His	Ala	Ala						
			180					185					190								
Phe	Ser	Arg	Gly	Leu	Pro	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Lys	Ala	Glu	Val	Leu						
		195					200					205									
Glu	Gln	Leu	Val	Thr	Leu	His	Gly	Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Ala	Val	Ile						
	210					215					220										
Val	Glu	Pro	Met	Ser	Gly	Ser	Ala	Gly	Val	Ile	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly						
225					230					235					240						
Tyr	Leu	Lys	Arg	Leu	Arg	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	His	Gly	Ile	Leu	Leu						
				245					250					255							
Ile	Phe	Asp	Glu	Val	Ile	Thr	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Phe						
			260					265					270								
Ala	Ser	Gln	Arg	Trp	Gly	Val	Ile	Pro	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Ala	Lys						
		275					280					285									
Ala	Ile	Asn	Asn	Gly	Ala	Ile	Pro	Met	Gly	Ala	Val	Phe	Val	Gln	Asp						
	290					295					300										
Tyr	Ile	His	Asp	Thr	Cys	Met	Gln	Gly	Pro	Thr	Glu	Leu	Ile	Glu	Phe						
305					310					315					320						
Phe	His	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ser	Gly	His	Pro	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala						
				325					330					335							
Leu	Ala	Thr	Leu	Ser	Ile	Tyr	Gln	Asn	Glu	Gln	Leu	Phe	Glu	Arg	Ser						
			340					345					350								

Phe Glu Leu Glu Arg Tyr Phe Glu Glu Ala Val His Ser Leu Lys Gly
355 360 365

Leu Pro Asn Val Ile Asp Ile Arg Asn Thr Gly Leu Val Ala Gly Phe
370 375 380

Gln Leu Ala Pro Asn Ser Gln Gly Val Gly Lys Arg Gly Tyr Ser Val
385 390 395 400

Phe Glu His Cys Phe His Gln Gly Thr Leu Val Arg Ala Thr Gly Asp
405 410 415

Ile Ile Ala Met Ser Pro Pro Leu Ile Val Glu Lys His Gln Ile Asp
420 425 430

Gln Met Val Asn Ser Leu Ser Asp Ala Ile His Ala Val Gly
435 440 445

<210> 253
<211> 1347
<212> ДНК
<213> Pseudomonas putida

<400> 253
atgaacatgc ccgaaactgg tcctgccggt atcgccagcc agctcaagct ggacgcccac 60
tggatgccct acaccgccaa ccgcaacttc cagcgcgacc cagcctgat cgtggcgccc 120
gaaggcaact acctggtcga tgaccacggg cgcaagatct tcgacgccct gtccggcctg 180
tggacctgcg gcgcaggcca cactcgcaag gaaatcgctg acgcgggtgac ccgtcaactg 240
agtacgctgg actactcccc agcgttccag ttccggccacc cgctgtcgtt ccagctggcg 300
gaaaagatcg ccgagctggt tccgggcaat ctgaatcacg tcttctatac caactccggt 360
tccgagtgcg ccgataccgc actgaagatg gtgcgtgcct actggcgccct gaaaggccag 420
gcaaccaaga ccaagatcat cggccgtgcc cgtggttacc atggcgtgaa catcgccggt 480
accagcctgg gtggcgtaaa cggtaaccgc aagatgtttg gccagctgct ggacgtcgac 540
cacctgcctc acactgtatt gccggtgaac gccttctcga aaggcttgcc ggaagagggc 600
ggatatcgcg tggtgacga aatgctcaag ctgatcgagc tgcacgatgc ctccaacatc 660
gcagcagtca tcgtcgagcc gctggccggt tcggccggtg tgctgccgcc gccaaagggc 720
tacctgaagc gcctgcgtga aatctgcacc cagcacaaca ttctgctgat cttcgacgaa 780
gtgatcacag gcttcggccg catgggcgcg atgaccggct cggaagcctt cggcggtacc 840
ccggacctga tgtgcatcgc caagcaggtg accaacggcg ccatcccgat gggcgagtg 900
attgccagca gcgagatcta ccagaccttc atgaaccagc cgaccccgga atacgccgtg 960
gaattccac acggctacac ctattcgcg caccggtag cctgtgccgc cggctctgcc 1020
gcgctggacc tgctgcagaa ggaaaacctg gtgcagtcgg cggctgaact ggcgccgcat 1080
ttcgagaagc tgctgcacgg cgtgaaggcg accaagaata tcgtcgatat ccgcaactac 1140

ggcctggccg ggcctatcca gatcgccgcc cgtgacgggtg atgccatcgt tcgcccttac 1200
 gaagcggcca tgaagctgtg gaaagcgggc ttctatgtac gctttgggtg cgacaccctg 1260
 cagttcggcc caaccttcaa taccaagccg caggaactgg accgcttggt cgatgctggt 1320
 ggcgaaaccc tgaacctgat cgactga 1347

<210> 254
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida

<400> 254

Met Asn Met Pro Glu Thr Gly Pro Ala Gly Ile Ala Ser Gln Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Asp Ala His Trp Met Pro Tyr Thr Ala Asn Arg Asn Phe Gln Arg
 20 25 30

Asp Pro Arg Leu Ile Val Ala Ala Glu Gly Asn Tyr Leu Val Asp Asp
 35 40 45

His Gly Arg Lys Ile Phe Asp Ala Leu Ser Gly Leu Trp Thr Cys Gly
 50 55 60

Ala Gly His Thr Arg Lys Glu Ile Ala Asp Ala Val Thr Arg Gln Leu
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Asp Tyr Ser Pro Ala Phe Gln Phe Gly His Pro Leu Ser
 85 90 95

Phe Gln Leu Ala Glu Lys Ile Ala Glu Leu Val Pro Gly Asn Leu Asn
 100 105 110

His Val Phe Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Cys Ala Asp Thr Ala Leu
 115 120 125

Lys Met Val Arg Ala Tyr Trp Arg Leu Lys Gly Gln Ala Thr Lys Thr
 130 135 140

Lys Ile Ile Gly Arg Ala Arg Gly Tyr His Gly Val Asn Ile Ala Gly
 145 150 155 160

Thr Ser Leu Gly Gly Val Asn Gly Asn Arg Lys Met Phe Gly Gln Leu
 165 170 175

Leu Asp Val Asp His Leu Pro His Thr Val Leu Pro Val Asn Ala Phe
 180 185 190

Ser Lys Gly Leu Pro Glu Glu Gly Gly Ile Ala Leu Ala Asp Glu Met
 195 200 205

Leu Lys Leu Ile Glu Leu His Asp Ala Ser Asn Ile Ala Ala Val Ile
 210 215 220
 Val Glu Pro Leu Ala Gly Ser Ala Gly Val Leu Pro Pro Pro Lys Gly
 225 230 235
 Tyr Leu Lys Arg Leu Arg Glu Ile Cys Thr Gln His Asn Ile Leu Leu
 245 250 255
 Ile Phe Asp Glu Val Ile Thr Gly Phe Gly Arg Met Gly Ala Met Thr
 260 265 270
 Gly Ser Glu Ala Phe Gly Val Thr Pro Asp Leu Met Cys Ile Ala Lys
 275 280 285
 Gln Val Thr Asn Gly Ala Ile Pro Met Gly Ala Val Ile Ala Ser Ser
 290 295 300
 Glu Ile Tyr Gln Thr Phe Met Asn Gln Pro Thr Pro Glu Tyr Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Phe Pro His Gly Tyr Thr Tyr Ser Ala His Pro Val Ala Cys Ala
 325 330 335
 Ala Gly Leu Ala Ala Leu Asp Leu Leu Gln Lys Glu Asn Leu Val Gln
 340 345 350
 Ser Ala Ala Glu Leu Ala Pro His Phe Glu Lys Leu Leu His Gly Val
 355 360 365
 Lys Gly Thr Lys Asn Ile Val Asp Ile Arg Asn Tyr Gly Leu Ala Gly
 370 375 380
 Ala Ile Gln Ile Ala Ala Arg Asp Gly Asp Ala Ile Val Arg Pro Tyr
 385 390 395 400
 Glu Ala Ala Met Lys Leu Trp Lys Ala Gly Phe Tyr Val Arg Phe Gly
 405 410 415
 Gly Asp Thr Leu Gln Phe Gly Pro Thr Phe Asn Thr Lys Pro Gln Glu
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Phe Asp Ala Val Gly Glu Thr Leu Asn Leu Ile Asp
 435 440 445
 <210> 255
 <211> 1701
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces cinnamonensis

<400> 255
 atggacgctg acgcgatcga ggaaggccgc cgacgctggc aggcccgtta cgacaaggcc 60
 cgcaagcgcg acgcggactt caccacgctc tccggggacc ccgtcgaccc cgtctacggc 120
 ccccgggccg gggacacgta cgacgggttc gagcggatcg gctggccggg ggagtacccc 180
 ttaccccgcg ggctctacgc caccgggtac cgcgcccgca cctggaccat ccgccagttc 240
 gccggcttcg gcaacgccga gcagacgaac gagcgctaca agatgatcct ggccaacggc 300
 ggcgggcgcc tctccgtcgc cttcgacatg ccgaccctca tgggccgcga ctccgacgac 360
 ccgcgctcgc tcggcgaggt cggccactgc ggtgtcgcca tcgactccgc cgccgacatg 420
 gaggtcctct tcaaggacat cccgctcggc gacgtcacga cgtccatgac catcagcggg 480
 cccgccgtgc ccgtcttctg catgtacctc gtcgcgccg agcgccaggg cgtcgacccc 540
 gccgtcctca acggcacgct gcagaccgac atcttcaagg agtacatcgc ccagaaggag 600
 tggctcttcc agcccgagcc gcacctgcgc ctcatcggcg acctgatgga gactgcgcg 660
 cgcgacatcc ccgcgtacaa gccgctctcg gtctccggct accacatccg cgaggccggg 720
 gcgacggccg cgaggagct cgcgtaacc ctcgcgacg gcttcgggta cgtggaactg 780
 ggcctctcgc gcggcctgga cgtggacgtc ttcgcgccc gcctctcctt cttcttcgac 840
 gcgcacgtcg acttcttcga ggagatcgcg aagttccgcg ccgcacgccg catctgggcg 900
 cgctggctcc gggacgagta cggagcgaag accgagaagg cacagtggct gcgcttcac 960
 acgcagaccg cgggggtctc gtcacggcc cagcagccgt acaacaacgt ggtgcggacg 1020
 gcggtggagg ccctcgccgc ggtgctcggc ggcacgaact ccctgcacac caacgctctc 1080
 gacgagaccc ttgccctccc cagcgagcag gcccgggaga tcgcgctgcg caccagcag 1140
 gtgctgatgg aggagaccgg cgtcgccaac gtcgcgacc cgctgggcgg ctccctgtac 1200
 atcgagcagc tcaccgaccg catcgaggcc gacgccgaga agatcttcga gcagatcagg 1260
 gagcgggggc ggcgggcctg ccccgacggg cagcaccga tcgggcccgt cacctccggc 1320
 atcctgcgcg gcatcgagga cggctgggtc accggcgaga tcgccgagtc cgccttcag 1380
 taccagcggc ccctggagaa gggcgacaag cgggtcgtcg gcgtcaactg cctcgaaggc 1440
 tccgtcaccg gcgacctgga gatcctgcgc gtcagccacg aggtcgagcg cgagcaggtg 1500
 cgggagcttg cggggcgcaa ggggcggcgt gacgatgcgc ggggtgcggc ctcgctcgac 1560
 gcgatgctcg ccgctgcgcg ggacgggtcg aacatgattg ccccatgct ggaggcgggtg 1620
 cgggccgagg cgaccctcgg ggagatctgc ggggtgcttc gcgatgagt ggggggtctac 1680
 gtggagccgc ccgggttctg a 1701

<210> 256
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces cinnamonensis*
 <400> 256

Met Asp Ala Asp Ala Ile Glu Glu Gly Arg Arg Arg Trp Gln Ala Arg
 1 5 10 15
 Tyr Asp Lys Ala Arg Lys Arg Asp Ala Asp Phe Thr Thr Leu Ser Gly
 20 25 30
 Asp Pro Val Asp Pro Val Tyr Gly Pro Arg Pro Gly Asp Thr Tyr Asp
 35 40 45
 Gly Phe Glu Arg Ile Gly Trp Pro Gly Glu Tyr Pro Phe Thr Arg Gly
 50 55 60
 Leu Tyr Ala Thr Gly Tyr Arg Gly Arg Thr Trp Thr Ile Arg Gln Phe
 65 70 75 80
 Ala Gly Phe Gly Asn Ala Glu Gln Thr Asn Glu Arg Tyr Lys Met Ile
 85 90 95
 Leu Ala Asn Gly Gly Gly Gly Leu Ser Val Ala Phe Asp Met Pro Thr
 100 105 110
 Leu Met Gly Arg Asp Ser Asp Asp Pro Arg Ser Leu Gly Glu Val Gly
 115 120 125
 His Cys Gly Val Ala Ile Asp Ser Ala Ala Asp Met Glu Val Leu Phe
 130 135 140
 Lys Asp Ile Pro Leu Gly Asp Val Thr Thr Ser Met Thr Ile Ser Gly
 145 150 155 160
 Pro Ala Val Pro Val Phe Cys Met Tyr Leu Val Ala Ala Glu Arg Gln
 165 170 175
 Gly Val Asp Pro Ala Val Leu Asn Gly Thr Leu Gln Thr Asp Ile Phe
 180 185 190
 Lys Glu Tyr Ile Ala Gln Lys Glu Trp Leu Phe Gln Pro Glu Pro His
 195 200 205
 Leu Arg Leu Ile Gly Asp Leu Met Glu His Cys Ala Arg Asp Ile Pro
 210 215 220
 Ala Tyr Lys Pro Leu Ser Val Ser Gly Tyr His Ile Arg Glu Ala Gly
 225 230 235 240
 Ala Thr Ala Ala Gln Glu Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Asp Gly Phe Gly
 245 250 255
 Tyr Val Glu Leu Gly Leu Ser Arg Gly Leu Asp Val Asp Val Phe Ala
 260 265 270

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

Thr Leu Gly Glu Ile Cys Gly Val Leu Arg Asp Glu Trp Gly Val Tyr
 545 550 555 560

Val Glu Pro Pro Gly Phe
 565

<210> 257
 <211> 411
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces cinnamonensis

<400> 257
 atgggtgtgg cagccgggccc gatccgcgtg gtggtcgcca agccggggct cgacgggcac 60
 gatcgcgggg ccaaggtgat cgcgcgggcg ttgcgtgacg cgggtatgga ggtcatctac 120
 accgggctgc accagacgcc cgagcaggtg gtggacaccg cgatccagga ggacgccgac 180
 gcgatcgccc tctccatcct ctccggagcg cacaacacgc tggtcgcgcg cgtgttgagg 240
 ctcttgaagg agcgggacgc ggaggacatc aaggtgtttg gtggcggcat catcccgagg 300
 gcggacatcg cgccgctgaa ggagaagggc gtcgcggaga tcttcacgcc cggggccacc 360
 accacgtcga tcgtggagtg gggttcggggg aacgtgacgc aggccgtctg a 411

<210> 258
 <211> 136
 <212> PPT
 <213> Streptomyces cinnamonensis

<400> 258

Met Gly Val Ala Ala Gly Pro Ile Arg Val Val Val Ala Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Leu Asp Gly His Asp Arg Gly Ala Lys Val Ile Ala Arg Ala Leu Arg
 20 25 30

Asp Ala Gly Met Glu Val Ile Tyr Thr Gly Leu His Gln Thr Pro Glu
 35 40 45

Gln Val Val Asp Thr Ala Ile Gln Glu Asp Ala Asp Ala Ile Gly Leu
 50 55 60

Ser Ile Leu Ser Gly Ala His Asn Thr Leu Phe Ala Arg Val Leu Glu
 65 70 75 80

Leu Leu Lys Glu Arg Asp Ala Glu Asp Ile Lys Val Phe Gly Gly Gly
 85 90 95

Ile Ile Pro Glu Ala Asp Ile Ala Pro Leu Lys Glu Lys Gly Val Ala
 100 105 110

Glu Ile Phe Thr Pro Gly Ala Thr Thr Thr Ser Ile Val Glu Trp Val

115	120	125	
Arg Gly Asn Val Arg Gln Ala Val			
130	135		
<210>	259		
<211>	1701		
<212>	ДНК		
<213>	Streptomyces coelicolor		
<400>	259		
atggacgctc atgccataga ggagggccgc cttcgctggc aggcccggtg cgacgcggcg			60
cgcaagcgcg acgcggactt caccacgctc tccggagacc ccgtggagcc ggtgtacggg			120
ccccgccccg gggacgagta cgagggcttc gagcggatcg gctggccggg cgagtacccc			180
ttcacccgcg gcctgtatcc gaccgggtac cgggggctga cgtggaccat ccggcagttc			240
gccgggttcg gcaacgccga gcagaccaac gagcgctaca agatgaccc cgcgaacggc			300
ggcggcgggc tctcggtcgc cttcgacatg ccgaccctga tgggccgcga ctccgacgac			360
ccgcgctcgc tgggcgaggt cgggcactgc ggggtggcca tcgactcggc cgcgcacatg			420
gaagtgcgtg tcaaggacat cccgctcggg gacgtgacga cctccatgac gatcagcggg			480
cccgccgtgc ccgtgttctg catgtacctc gtcgccgccg agcgccaggg cgtcgacgca			540
tccgtgctca acggcacgct gcagaccgac atcttcaagg agtacatcgc ccagaaggag			600
tggctcttcc agcccagacc ccacctccgg ctcatcggcg acctcatgga gtactgcgcg			660
gccggcatcc ccgcctacaa gccgctctcc gtctccggct accacatccg cgaggcgggc			720
gcgacggccg cgcaggagct ggcgtacacg ctcgccgacg gcttcggata cgtggagctg			780
ggcctcagcc gcgggctcga cgtggacgtc ttcgcgcccg gcctctcctt cttcttcgac			840
gcgcacctcg acttcttcga ggagatcgcc aagttccgcg cggcccgcag gatctggggc			900
cgctggatgc gcgacgtgta cggcgcgccg accgacaagg ccagtggtgt gcggttcac			960
accagaccg ccggagtctc gtcaccgcg cagcagccgt acaacaacgt cgtacgcacc			1020
gcggtggagg cgctggcggc cgtgctcggc ggcaccaact ccctgcacac caacgcgctc			1080
gacgagaccc tcgccctgcc cagcgagcag gccgccgaga tcgccctgcg caccagcag			1140
gtgctgatgg aggagaccg cgtcgccaac gtcgccgacc cgctgggcgg ttcctggttc			1200
atcgagcagc tgaccgaccg catcgaggcc gacgccgaga agatcttcga gcagatcaag			1260
gagcgggggc tgcgcgcccc ccccgacggg cagcaccgcc tcggaccgat cacctccggc			1320
ctgctgcgcg gcatcgagga cggctggttc accggcgaga tcgccgagtc cgccttcgc			1380
taccagcagt ccttgagaa ggacgacaag aagggtgtcg gcgtcaacgt ccacaccggc			1440
tccgtcaccg gcgacctgga gatcctgcgg gtcagccacg aggtcgagcg cgagcaggtg			1500
cgggtcctgg gcgagcgcaa ggacggccgg gacgacgccg ccgtgcgcgg cgccctggac			1560
gccatgctgg ccgcggcccc ctccggcggc aacatgatcg ggccgatgct ggacgcgggtg			1620

cgcgcgagg cgacgctggg cgagatctgc ggtgtgctgc gcgacgagtg ggggggtgtac 1680
 acggaaccgg cggggttctg a 1701

<210> 260
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 260

Met Asp Ala His Ala Ile Glu Glu Gly Arg Leu Arg Trp Gln Ala Arg
 1 5 10 15

Tyr Asp Ala Ala Arg Lys Arg Asp Ala Asp Phe Thr Thr Leu Ser Gly
 20 25 30

Asp Pro Val Glu Pro Val Tyr Gly Pro Arg Pro Gly Asp Glu Tyr Glu
 35 40 45

Gly Phe Glu Arg Ile Gly Trp Pro Gly Glu Tyr Pro Phe Thr Arg Gly
 50 55 60

Leu Tyr Pro Thr Gly Tyr Arg Gly Arg Thr Trp Thr Ile Arg Gln Phe
 65 70 75 80

Ala Gly Phe Gly Asn Ala Glu Gln Thr Asn Glu Arg Tyr Lys Met Ile
 85 90 95

Leu Arg Asn Gly Gly Gly Gly Leu Ser Val Ala Phe Asp Met Pro Thr
 100 105 110

Leu Met Gly Arg Asp Ser Asp Asp Pro Arg Ser Leu Gly Glu Val Gly
 115 120 125

His Cys Gly Val Ala Ile Asp Ser Ala Ala Asp Met Glu Val Leu Phe
 130 135 140

Lys Asp Ile Pro Leu Gly Asp Val Thr Thr Ser Met Thr Ile Ser Gly
 145 150 155 160

Pro Ala Val Pro Val Phe Cys Met Tyr Leu Val Ala Ala Glu Arg Gln
 165 170 175

Gly Val Asp Ala Ser Val Leu Asn Gly Thr Leu Gln Thr Asp Ile Phe
 180 185 190

Lys Glu Tyr Ile Ala Gln Lys Glu Trp Leu Phe Gln Pro Glu Pro His
 195 200 205

Leu Arg Leu Ile Gly Asp Leu Met Glu Tyr Cys Ala Ala Gly Ile Pro
 210 215 220

Ala Tyr Lys Pro Leu Ser Val Ser Gly Tyr His Ile Arg Glu Ala Gly
 225 230 235 240
 Ala Thr Ala Ala Gln Glu Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Asp Gly Phe Gly
 245 250 255
 Tyr Val Glu Leu Gly Leu Ser Arg Gly Leu Asp Val Asp Val Phe Ala
 260 265 270
 Pro Gly Leu Ser Phe Phe Phe Asp Ala His Leu Asp Phe Phe Glu Glu
 275 280 285
 Ile Ala Lys Phe Arg Ala Ala Arg Arg Ile Trp Ala Arg Trp Met Arg
 290 295 300
 Asp Val Tyr Gly Ala Arg Thr Asp Lys Ala Gln Trp Leu Arg Phe His
 305 310 315 320
 Thr Gln Thr Ala Gly Val Ser Leu Thr Ala Gln Gln Pro Tyr Asn Asn
 325 330 335
 Val Val Arg Thr Ala Val Glu Ala Leu Ala Ala Val Leu Gly Gly Thr
 340 345 350
 Asn Ser Leu His Thr Asn Ala Leu Asp Glu Thr Leu Ala Leu Pro Ser
 355 360 365
 Glu Gln Ala Ala Glu Ile Ala Leu Arg Thr Gln Gln Val Leu Met Glu
 370 375 380
 Glu Thr Gly Val Ala Asn Val Ala Asp Pro Leu Gly Gly Ser Trp Phe
 385 390 395 400
 Ile Glu Gln Leu Thr Asp Arg Ile Glu Ala Asp Ala Glu Lys Ile Phe
 405 410 415
 Glu Gln Ile Lys Glu Arg Gly Leu Arg Ala His Pro Asp Gly Gln His
 420 425 430
 Pro Val Gly Pro Ile Thr Ser Gly Leu Leu Arg Gly Ile Glu Asp Gly
 435 440 445
 Trp Phe Thr Gly Glu Ile Ala Glu Ser Ala Phe Arg Tyr Gln Gln Ser
 450 455 460
 Leu Glu Lys Asp Asp Lys Lys Val Val Gly Val Asn Val His Thr Gly
 465 470 475 480
 Ser Val Thr Gly Asp Leu Glu Ile Leu Arg Val Ser His Glu Val Glu
 485 490 495

Arg Glu Gln Val Arg Val Leu Gly Glu Arg Lys Asp Ala Arg Asp Asp
500 505 510

Ala Ala Val Arg Gly Ala Leu Asp Ala Met Leu Ala Ala Ala Arg Ser
515 520 525

Gly Gly Asn Met Ile Gly Pro Met Leu Asp Ala Val Arg Ala Glu Ala
530 535 540

Thr Leu Gly Glu Ile Cys Gly Val Leu Arg Asp Glu Trp Gly Val Tyr
545 550 555 560

Thr Glu Pro Ala Gly Phe
565

<210> 261
<211> 417
<212> DHK
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 261
atgggtgtgg cagccggtcc gatccgctg gtggtggcca agccggggct cgacggccac 60
gatcgcgggg ccaaggtgat cgcgagggcc ctgcgtgacg ccggtatgga ggtgatctac 120
accgggctcc accagacgcc cgagcagatc gtcgacaccg cgatccagga ggacgccgac 180
gcgatcgggc tgtccatcct ctccggtgcg cacaacacgc tcttcgccgc cgtgatcgag 240
ctgctccggg agcgggacgc cgcggacatc ctggtcttcg gcggcgggat catccccgag 300
gcggacatcg ccccgctgaa ggagaagggc gtcgcggaga tcttcacgcc cggcgccacc 360
acggcgtcca tcgtggactg ggtccgggcg aacgtgcggg agcccgcggg agcatag 417

<210> 262
<211> 138
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 262
Met Gly Val Ala Ala Gly Pro Ile Arg Val Val Val Ala Lys Pro Gly
1 5 10 15

Leu Asp Gly His Asp Arg Gly Ala Lys Val Ile Ala Arg Ala Leu Arg
20 25 30

Asp Ala Gly Met Glu Val Ile Tyr Thr Gly Leu His Gln Thr Pro Glu
35 40 45

Gln Ile Val Asp Thr Ala Ile Gln Glu Asp Ala Asp Ala Ile Gly Leu
50 55 60

Ser Ile Leu Ser Gly Ala His Asn Thr Leu Phe Ala Ala Val Ile Glu

65		70		75		80									
Leu	Leu	Arg	Glu	Arg	Asp	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly
			85						90					95	
Ile	Ile	Pro	Glu	Ala	Asp	Ile	Ala	Pro	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Val	Ala
			100					105					110		
Glu	Ile	Phe	Thr	Pro	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Ser	Ile	Val	Asp	Trp	Val
		115					120					125			
Arg	Ala	Asn	Val	Arg	Glu	Pro	Ala	Gly	Ala						
	130					135									

<210> 263
 <211> 1701
 <212> ДНК
 <213> Streptomyces avermitilis

<400> 263
 tcagaaaccg gcgggctccg tgtagacccc ccactcctcc cggaggacat cgcagatctc 60
 gccacgcgtg gcctccgcgc ggaccgcgtc cagcatcggg gcgatcatgt tcgaccgcgtc 120
 gcgcgcggcg gcgagcatcg cgtccagggc cgcgggttac gccgtgtcgt cgcgccccga 180
 cttccgctcg cccagcaccc gcacctgctc gcgctccacc tcgtggctga cgcgcaggat 240
 ctccaggtcg cccgtcacgg acccgtggtg gacgttgacg ccgacgaccc gcttgtcggc 300
 cttctccagc gcctgctggt actggaaggc cgactcggcg atctccccgg tgaaccagcc 360
 gtccctcatg ccgcgcagga tgccggaggt gatgggcccc atcgggtgcc gcccgctccgg 420
 gtgggccccg agcccgcgt ccctgatctg ttcgaagatc ttctcggcgt cggcctcatg 480
 ccggtcggtc agctgctcca cgtaccagga accgcccagc ggatcggcca cgttggcgac 540
 gcccgctctc tccatcagca cctgctgggt gcgcaggcg atctcggccg cctgctcgga 600
 cggcagggcg agggctctgt cgagggcggt ggtgtgcagc gagttcgtcc cgcgcagcac 660
 cgcggcgagg gcctccacgg ccgtccgtac gacgttggtg tacggctgct gcgcggtgag 720
 cgagacgccc gcggtctggg tgtggaagcg cagccactgc gccttctccg acttcgcccc 780
 gtacacgtcc cgcagccagc gcgcccagat gcgccgcgcc gcacggaact tggcgatctc 840
 ctcgaagaag tcgacgtgcg cgtcgaagaa gaaggagagc ccgggcgcga acacgtccac 900
 gtccaggccg cggctcagcc ccagctccac gtatccgaaa ccgtcggcga ggggtgtacgc 960
 cagctcctgg gcggccgtgg caccggcctc ccggatgtgg taccgggaga cggacagcgg 1020
 cttgtacgcg gggatcttcg aggcgcagtg ctccatcagg tcgccgatga gccgcagatg 1080
 gggctcgggc tggaagagcc actccttctg cgcgatgtac tccttgaaga tgtcgggtctg 1140
 gaggggtgccg ttgaggacgg aggggtcgac gccctgccgc tcggccgcga ccaggtaacat 1200
 gcagaagacg ggcacggcgg gcccgctgat cgtcatcgac gtcgtcacgt caccacgcgg 1260

gatgtccttg aacaggacct ccatgtcggc cgccgagtcg atcgcgaccc cgcagtgtccc 1320
 gacctgcgcg agcgcgcggc ggtcgtcggg gtcgcgcccc atgagcgtcg gcatgtcgaa 1380
 ggccacggac agcccaccgc cgccgttggc gaggatcttc ttgtagcgct cgttggctctg 1440
 ctcggcgctt ccgaaccccg cgaactgccg gatggtccag gtccggcccc ggtagccggt 1500
 cggatacaga ccgcgcgtga aggggtactc acccggccag ccgatccgct cgaaaccctc 1560
 gtacgcgtcc ccgggccggg gcccgtacgc cggctccacg ggatcgccgg agagcgtggt 1620
 gaaatcggcc tcgcgcttgc gtgaggcgtc gtagcgggcc tgccagcgtc ggcggccttc 1680
 ctcgatggcg tcagcgtcca t 1701

<210> 264
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Streptomyces avermitilis

<400> 264

Met Asp Ala Asp Ala Ile Glu Glu Gly Arg Arg Arg Trp Gln Ala Arg
1 5 10 15

Tyr Asp Ala Ser Arg Lys Arg Glu Ala Asp Phe Thr Thr Leu Ser Gly
20 25 30

Asp Pro Val Glu Pro Ala Tyr Gly Pro Arg Pro Gly Asp Ala Tyr Glu
35 40 45

Gly Phe Glu Arg Ile Gly Trp Pro Gly Glu Tyr Pro Phe Thr Arg Gly
50 55 60

Leu Tyr Pro Thr Gly Tyr Arg Gly Arg Thr Trp Thr Ile Arg Gln Phe
65 70 75 80

Ala Gly Phe Gly Asn Ala Glu Gln Thr Asn Glu Arg Tyr Lys Lys Ile
85 90 95

Leu Ala Asn Gly Gly Gly Gly Leu Ser Val Ala Phe Asp Met Pro Thr
100 105 110

Leu Met Gly Arg Asp Ser Asp Asp Arg Arg Ala Leu Gly Glu Val Gly
115 120 125

His Cys Gly Val Ala Ile Asp Ser Ala Ala Asp Met Glu Val Leu Phe
130 135 140

Lys Asp Ile Pro Leu Gly Asp Val Thr Thr Ser Met Thr Ile Ser Gly
145 150 155 160

Pro Ala Val Pro Val Phe Cys Met Tyr Leu Val Ala Ala Glu Arg Gln
165 170 175

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

Trp Phe Thr Gly Glu Ile Ala Glu Ser Ala Phe Gln Tyr Gln Gln Ala
450 455 460

Leu Glu Lys Gly Asp Lys Arg Val Val Gly Val Asn Val His His Gly
465 470 475 480

Ser Val Thr Gly Asp Leu Glu Ile Leu Arg Val Ser His Glu Val Glu
485 490 495

Arg Glu Gln Val Arg Val Leu Gly Glu Arg Lys Ser Gly Arg Asp Asp
500 505 510

Thr Ala Val Thr Ala Ala Leu Asp Ala Met Leu Ala Ala Ala Arg Asp
515 520 525

Gly Ser Asn Met Ile Ala Pro Met Leu Asp Ala Val Arg Ala Glu Ala
530 535 540

Thr Leu Gly Glu Ile Cys Asp Val Leu Arg Glu Glu Trp Gly Val Tyr
545 550 555 560

Thr Glu Pro Ala Gly Phe
565

<210> 265
<211> 417
<212> ДНК
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 265
ctacgccccg gcaggctgcc gcacgttcgc ccgcacccac tccacgatcg acgccgtggt 60
cgcccccgga gtgaagatct ccgcgacacc cttctccttc agcggcgcgga tgtccgcctc 120
ggggatgatg ccgccaccga acaccttgat gtcctcggca tcgcgctcct tgagcagatc 180
gatgaccgcc gcgaacaacg tgttgtgcgc cccggacagg atcgacagcc cgatcgcgtc 240
ggcgtcctcc tggatggccg tgcccacgat ctgctccggc gtctggtgca gccccgtgta 300
aatgacctcc ataccggcat cgcgcagcgc ccgcgcgata accttggccc cgcgatcgtg 360
gccatcgagc cccggcttgg ccaccaccac gcggatcgga ccggtgcca caccat 417

<210> 266
<211> 138
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 266
Met Gly Val Ala Ala Gly Pro Ile Arg Val Val Val Ala Lys Pro Gly
1 5 10 15

Leu Asp Gly His Asp Arg Gly Ala Lys Val Ile Ala Arg Ala Leu Arg

20 25 30
 Asp Ala Gly Met Glu Val Ile Tyr Thr Gly Leu His Gln Thr Pro Glu
 35 40 45
 Gln Ile Val Gly Thr Ala Ile Gln Glu Asp Ala Asp Ala Ile Gly Leu
 50 55 60
 Ser Ile Leu Ser Gly Ala His Asn Thr Leu Phe Ala Ala Val Ile Asp
 65 70 75 80
 Leu Leu Lys Glu Arg Asp Ala Glu Asp Ile Lys Val Phe Gly Gly Gly
 85 90 95
 Ile Ile Pro Glu Ala Asp Ile Ala Pro Leu Lys Glu Lys Gly Val Ala
 100 105 110
 Glu Ile Phe Thr Pro Gly Ala Thr Thr Ala Ser Ile Val Glu Trp Val
 115 120 125
 Arg Ala Asn Val Arg Gln Pro Ala Gly Ala
 130 135

<210> 267
 <211> 2910
 <212> ДНК
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 267
 gatcaatttc ttttaagtaa tctaaatccc catttttttaa tttcttttta gcctcttttaa 60
 ataatcctga ataaactaat acctgtttac ctttaagtga ttataaaat gcatcaaaga 120
 ctttttgatt tattttattaa ataatcacta tctttaccag aatacttagc catttcatat 180
 aattctttat tattatatttg tcttattttt tgaacttgaa cttgtgttat ttctgaaatg 240
 cccgttacat cagccataa atctaaccat tcttgttggc taatataata tcttttatct 300
 gtgaaatacg atttattttac tgcaattaac acatgaaaat gaggattata atcatctctt 360
 tttttattat atgtaatctc taacttacga acatatccct ttataacact acctactttt 420
 tttctcttta taagttttct aaaagaatta ttataacggt ttatttcatt ttctaattca 480
 tcactcatta cattaggtgt agtcaaagtt aaaaagataa actccttttt ctcttgctgc 540
 ttaatatatt gcatcatcaa agataaaccc aatgcatctt ttctagcttt tctccaagca 600
 cagacaggac aaaatcgatt ttacaagaa ttagctttat ataatttctg tttttctaaa 660
 gttttatcag ctacaaaaga cagaaatgta ttgcaatctt caactaaatc catttgattc 720
 tctccaatat gacgttttaaat aaattttctga aatacttgat ttctttgttt tttctcagta 780
 tactttttcca tgttataaca cataaaaaca acttagtttt cacaaactat gacaataaaa 840
 aaagttgctt tttccctttt ctatgtatgt tttttactag tcatttataaa cgatacatta 900

ataggtacga aaaagcaact ttttttgcgc ttaaaaccag tcataccaat aacttaaggg	960
taactagcct cgccggcaat agttaccctt attatcaaga taagaaagaa aaggattttt	1020
cgctacgctc aaatccttta aaaaaacaca aaagaccaca ttttttaatg tggcttttat	1080
tcttcaacta aagcacccat tagttcaaca aacgaaaatt ggataaagtg ggatattttt	1140
aaaatatata tttatgttac agtaatatgt acttttaaaa aaggattgat tctaataag	1200
aaagcagaca agtaagcctc ctaaattcac tttagataaa aatttaggag gcatatcaaa	1260
tgaactttta taaaattgat ttagacaatt ggaagagaaa agagatatatt aatcattatt	1320
tgaaccaaca aacgactttt agtataacca cagaaattga tattagtgtt ttataccgaa	1380
acataaaaaca agaaggatat aaattttacc ctgcatttat tttcttagtg acaaggggtga	1440
taaactcaaa tacagctttt agaactgggtt acaatagcga cggagagtta ggttattggg	1500
ataagttaga gccactttat acaatttttg atggtgtatc taaaacattc tctggtattt	1560
ggactcctgt aaagaatgac ttcaaagagt tttatgattt atacctttct gatgtagaga	1620
aatataatgg ttccgggaaa ttgtttccca aaacacctat acctgaaaat gctttttctc	1680
tttctattat tccatggact tcatttactg ggtttaactt aaatatcaat aataatagta	1740
attaccttct acccattatt acagcaggaa aattcattaa taaaggtaat tcaatatatt	1800
taccgctatc ttacaggtta catcattctg ttgtgtatgg ttatcatgca ggattgttta	1860
tgaactctat tcaggaattg tcagataggc ctaatgactg gcttttataa tatgagataa	1920
tgccgactgt actttttaca gtcggttttc taatgtcact aacctgcccc gttagttgaa	1980
gaagggtttt atattacagc tccagatcca tatccttctt tttctgaacc gacttctcct	2040
ttttcgcttc ttatttcaa ttgctttatt gacgttgagc ctcggaacct ttaacaatcc	2100
caaaacttgt cgaatggtcg gcttaatagc tcacgctatg ccgacattcg tctgcaagtt	2160
tagttaaggg ttcttctcaa cgcacaataa attttctcgg cataaatgcg tgggtctaatt	2220
tttattttta ataacctga tagcaaaaaa tgccattcca atacaaaacc acatacctat	2280
aatcgataac cacataacag tcataaaacc actccttttt aacaaacttt atcacaagaa	2340
atatttaaat tttaaatgcc tttattttga attttaaggg gcatttttaa gatttagggg	2400
taaatcatat agttttatgc ctaaaaacct acagaagctt ttaaaaagca aatatgagcc	2460
aaataaatat attctaattc tacaacaaca aatttgagca aattcagtgt cgatttttta	2520
agacactgcc cagttacatg caaattaaaa ttttcatgat tttttatagt tcctaacagg	2580
gttaaaatgt gtataacgaa agtataatgt ttatataacg ttagtataat aaagcatttt	2640
aacattatac ttttgataat cgtttatcgt cgtcatcaca ataactttta aaatactcgt	2700
gcataattca cgctgacctc ccaataacta catgggtgta tcgggaggtc agctgttagc	2760
acttatattt tgttattggt cttcctcgat ttctgtctatc attttgtgat taatttctct	2820
ttttcttgt tctgttaagt cataaagttc actagctaaa tactcttttt gtttccaaat	2880
ataaaaaatt tgatagatat attacggttg	2910

