



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114672425 A

(43) 申请公布日 2022.06.28

(21) 申请号 202210373921.7

C12N 15/81 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.11

C12P 5/00 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

(71) 申请人 湖北工业大学

地址 430068 湖北省武汉市洪山区南李路
28号

(72) 发明人 柳志杰 汪超 徐宁 胡勇

祁勇刚 李玮 周梦舟 吴茜

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

专利代理师 常海涛

(51) Int. Cl.

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/61 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

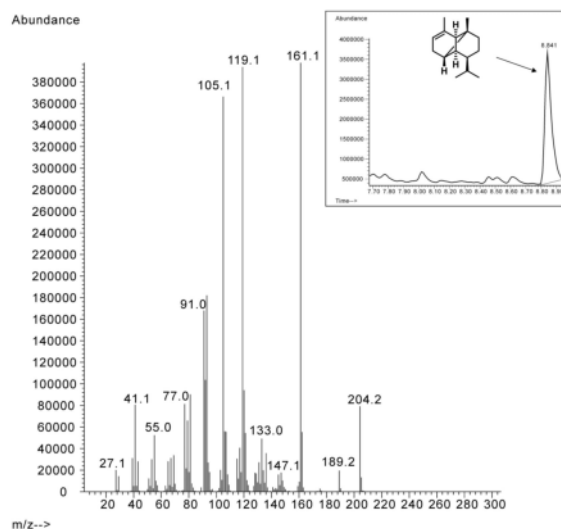
序列表7页 附图6页

(54) 发明名称

产 α -古巴烯的重组酿酒酵母及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株产 α -古巴烯的重组酿酒酵母及其应用,属于代谢工程和生物工程领域。本发明产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其以酿酒酵母为宿主,异源表达了 α -古巴烯合酶,过表达了法尼基焦磷酸合成酶和异戊烯焦磷酸异构酶。通过将能够表达 α -古巴烯合酶基因、法尼基焦磷酸合成酶基因和异戊烯焦磷酸异构酶基因的重组质粒转入到酿酒酵母中得到产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株。本发明在酿酒酵母中引入外源基因来生产 α -古巴烯,不需要利用石油资源来进行化学合成,减少了对石油资源的消耗和对环境的污染,实现了可持续发展。本发明可高效生产 α -古巴烯,促进了 α -古巴烯在食品、医药、农业、烟草等领域中的应用。



1. 产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:其以酿酒酵母为宿主,异源表达了 α -古巴烯合酶,过表达了法尼基焦磷酸合成酶和异戊烯焦磷酸异构酶;所述的 α -古巴烯合酶的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

2. 根据权利要求1所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:所述的法尼基焦磷酸合成酶的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示,所述的异戊烯焦磷酸异构酶的氨基酸序列如SEQ ID No.3所示。

3. 根据权利要求1所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:其以酿酒酵母BY4741为宿主。

4. 根据权利要求1所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:其含有能够表达 α -古巴烯合酶基因、法尼基焦磷酸合成酶基因和异戊烯焦磷酸异构酶基因的重组质粒。

5. 根据权利要求4所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:所述的 α -古巴烯合酶基因、法尼基焦磷酸合成酶基因和异戊烯焦磷酸异构酶基因的核苷酸序列分别如SEQ ID No.4、5、6所示。

6. 根据权利要求4所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:所述的重组质粒以pY26TEF-GPD质粒为出发质粒。

7. 根据权利要求4所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:所述的重组质粒中含有 α -古巴烯合酶基因和法尼基焦磷酸合成酶基因, α -古巴烯合酶和法尼基焦磷酸合成酶为独立表达或融合表达。

8. 根据权利要求7所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其特征在于:所述的重组质粒中含有异戊烯焦磷酸异构酶基因,异戊烯焦磷酸异构酶为独立表达或与 α -古巴烯合酶和法尼基焦磷酸合成酶融合表达。

9. 权利要求1-8任一项所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株在生产 α -古巴烯中的应用。

10. 一种生产 α -古巴烯的方法,其特征在于:包括如下步骤:将权利要求1-8任一项所述的产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株接种至培养基中进行培养,得到含 α -古巴烯的发酵液。

产 α -古巴烯的重组酿酒酵母及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于代谢工程和生物工程领域,具体涉及产 α -古巴烯的重组酿酒酵母及其应用。

背景技术

[0002] α -古巴烯,分子式 $C_{15}H_{24}$,分子量204.35,一种三环倍半萜,是一种重要的生物活性物质,天然存在于许多药用和芳香植物中。 α -古巴烯作为一种重要的植物活性成分,广泛应用于食品、医药、农业等领域,具有多种功能特性。一些研究表明,富含 α -古巴烯的精油具有抗氧化、抗突变、镇痛、抗炎、保肝、抗疟原虫以及对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌等具有抑制作用。此外, α -古巴烯还具有抗肿瘤活性,并且有可能成为一种有效的抗癌药物。在农业领域, α -古巴烯具有重要的经济意义, α -古巴烯可以作为一种新的有害昆虫引诱剂。

[0003] 目前, α -古巴烯主要是通过化学法合成,但是,目前的化学合成法不但成本高,还会造成环境污染,消耗珍贵的石油资源。

[0004] 目前工业上已经有许多利用微生物发酵获得产品的成功实例。通过微生物来生产 α -古巴烯具有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术存在的缺点与不足,提供产 α -古巴烯的重组酿酒酵母及其应用,所述重组酿酒酵母可高效生产 α -古巴烯,促进其在食品、医药、农业、烟草中的应用。

[0006] 本发明提供了产 α -古巴烯的重组酿酒酵母菌株,其以酿酒酵母为宿主,异源表达了 α -古巴烯合酶,过表达了法尼基焦磷酸合成酶和异戊烯焦磷酸异构酶;所述的 α -古巴烯合酶的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示;所述的法尼基焦磷酸合成酶的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示;所述的异戊烯焦磷酸异构酶的氨基酸序列如SEQ ID No.3所示。

[0007] 优选的,所述的重组酿酒酵母菌株以酿酒酵母BY4741为宿主。

[0008] 优选的,所述的重组酿酒酵母菌株含有能够表达 α -古巴烯合酶基因、法尼基焦磷酸合成酶基因和异戊烯焦磷酸异构酶基因的重组质粒。所述的 α -古巴烯合酶基因、法尼基焦磷酸合成酶基因和异戊烯焦磷酸异构酶基因的核苷酸序列分别如SEQ ID No.4、5、6所示。通过将所述的重组质粒转入到酿酒酵母中得到所述的重组酿酒酵母菌株。

[0009] 优选的,所述的重组质粒以pY26TEF-GPD质粒为出发质粒。

[0010] 优选的,所述的重组质粒中含有 α -古巴烯合酶基因和法尼基焦磷酸合成酶基因, α -古巴烯合酶和法尼基焦磷酸合成酶为独立表达或融合表达。融合表达 α -古巴烯合酶和法尼基焦磷酸合成酶,可显著提高 α -古巴烯产量。

[0011] 优选的,所述的重组质粒中还含有异戊烯焦磷酸异构酶基因,异戊烯焦磷酸异构酶为独立表达或与 α -古巴烯合酶和法尼基焦磷酸合成酶融合表达。融合表达异戊烯焦磷酸

异构酶基因,可显著提高 α -古巴烯产量。进一步地, α -古巴烯合酶、法尼基焦磷酸合成酶、异戊烯焦磷酸异构酶融合表达的顺序为 α -古巴烯合酶-法尼基焦磷酸合成酶-异戊烯焦磷酸异构酶。

[0012] 本发明还提供了所述的重组酿酒酵母菌株在生产 α -古巴烯中的应用。

[0013] 本发明还提供了一种生产 α -古巴烯的方法,其包括如下步骤:将所述的重组酿酒酵母菌株接种至培养基中进行培养,得到含 α -古巴烯的发酵液。

[0014] 优选的,所述的生产 α -古巴烯的方法包括如下步骤:将所述的重组酿酒酵母菌株接种至YPD培养基中,于30℃、200rpm培养1-4天。

[0015] 本发明还提供了所述的重组酿酒酵母菌株在生产含 α -古巴烯的食品、医药、农业、烟草方面的应用。

[0016] 本发明的优点是在微生物中引入外源基因来生产 α -古巴烯,不需要利用石油资源来进行化学合成,减少了对石油资源的消耗和对环境的污染,实现了可持续发展。同时,由于酿酒酵母生长、代谢速度快,易于代谢工程改造,不受天气、季节等因素影响,可以实现连续生产。采用本发明获得的 α -古巴烯高产量酿酒酵母菌株及方法可高效生产 α -古巴烯,促进其在食品、医药、农业、烟草等领域中的应用。

附图说明

[0017] 图1是质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3的示意图,合成PnTPS3基因,在BglIII位点克隆于pY26TEF-GPD上,得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3。

[0018] 图2是在酿酒酵母中表达pY26TEF-GPD-PnTPS3质粒,发酵提取产物后用气相色谱质谱联用仪鉴定有 α -古巴烯产生的图。

[0019] 图3是质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-EGR20的示意图,酿酒酵母ERG20基因片段在BamHI位点克隆于pY26TEF-GPD-PnTPS3上,得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-EGR20。

[0020] 图4是质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-EGR20的示意图,PnTPS3和ERG20基因片段在BglIII位点克隆于pY26TEF-GPD上,得到PnTPS3和ERG20融合表达质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-EGR20。

[0021] 图5是质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-EGR20-IDI1示意图,酿酒酵母IDI1基因片段在BamHI位点克隆于pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-EGR20上,得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-EGR20-IDI1。

[0022] 图6是质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-L-IDI1示意图,PnTPS3、ERG20和IDI1基因片段在BglIII位点克隆于pY26TEF-GPD上,得到PnTPS3、ERG20和IDI1融合表达质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-L-IDI1。

具体实施方式

[0023] 本发明的目的通过以下措施来达到:在酿酒酵母体内引入外源基因—— α -古巴烯合酶基因,从而催化自身的法尼基焦磷酸得 α -古巴烯。

[0024] 以下实施例用于进一步说明本发明,但不应理解为对本发明的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0025] 若未特别指明,下述实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0026] 实施例1中选用一种酿酒酵母BY4741作为生产菌株,选用其表达载体pY26TEF-GPD。 α -古巴烯合酶氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,法尼基焦磷酸合成酶的氨基酸序列如SEQ IDNo.2所示,异戊烯焦磷酸异构酶的氨基酸序列如SEQ ID No.3所示。

[0027] 实施例1

[0028] 合成编码 α -古巴烯合酶的基因PnTPS3(核苷酸序列如SEQ ID No.4所示),以PnTPS3基因为模板,通过使用如下引物PCR扩增PnTPS3基因片段:

[0029] PnTPS3上游引物:AACTCCGGACCGCGAGATCTATGGGCTTTCTTTTGTAAC,

[0030] PnTPS3下游引物:AGAATTGTTAATTAAGATCTTTAGAGGGGGATAGGTTGGA。

[0031] 用BglIII酶对pY26TEF-GPD进行酶切,得到线性化的pY26TEF-GPD质粒,然后将扩增得到的PnTPS3基因片段和线性化的pY26TEF-GPD质粒进行同源重组连接(重组酶购买于南京诺唯赞公司,产品货号C115),得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3,其示意图见图1。

[0032] 将质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3转入酿酒酵母BY4741,利用尿嘧啶营养缺陷筛选成功的转化子,得到菌株BY4741/pY26TEF-GPD-PnTPS3,将构建成功的重组菌命名为P1。挑取P1单克隆于10mL YPD培养基中30℃、200rpm培养12h后,转接2mL菌液入200mL YPD培养基中37℃、220rpm培养。

[0033] 定性定量分析实验如下:

[0034] 培养4天后,取20mL发酵液进行萃取分析。

[0035] 萃取方法为:在20mL发酵液中,加入石竹烯作为内标,再加入20mL乙酸乙酯萃取10min,静置分层,将上层有机层转入50mL的旋蒸瓶进行旋转蒸发浓缩。待有机相浓缩至200 μ L左右,过滤后转移入样品瓶中。

[0036] 将处理好的样品用气相色谱质谱联用仪(安捷伦7890-5977)检测,使用的柱子为AgilentHP-5ms柱子,氦气流速1mL/min,进样量为1 μ L,程序温度为:80℃维持1min,再以10℃/min升至260℃,维持3min,溶剂延迟4.5min。

[0037] 定性和定量分析实验结果:气相色谱质谱联用仪结果(图2)表明,表达pY26TEF-GPD-PnTPS3质粒,酿酒酵母产生了 α -古巴烯;由GC-MS定量分析得到,产生的 α -古巴烯量为20.25 $\pm$ 0.89mg/L。

[0038] 该实施例结果证明在酿酒酵母体内表达PnTPS3基因,即编码 α -古巴烯合酶的基因,可生产得到 α -古巴烯。

[0039] 实施例2

[0040] 同实施例1,不同的是进一步过表达法尼基焦磷酸合成酶基因(核苷酸序列如SEQ IDNo.5所示)来提高酿酒酵母体内法尼基焦磷酸的量。

[0041] 选取实施例1中构建好的质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3。将编码法尼基焦磷酸合成酶基因ERG20构建到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3上,得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-ERG20。

[0042] 以酿酒酵母BY4741的基因组为模板,通过使用如下引物PCR扩增ERG20基因片段:

[0043] ERG20上游引物:GATTCTAGAACTAGTGGATCCATGGCTTCAGAAAAAGAAAT,

[0044] ERG20下游引物:TTCCTGCAGCCCGGGGATCCTTATTTGCTTCTCTTGTAAG。

[0045] 用BamHI酶对pY26TEF-GPD-PnTPS3进行酶切,得到线性化的pY26TEF-GPD-PnTPS3

质粒,然后将扩增得到的ERG20基因片段和线性化的pY26TEF-GPD-PnTPS3质粒进行同源重组连接(重组酶购买于南京诺唯赞公司,产品货号C115),得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-ERG20,其示意图见图3。

[0046] 将质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-ERG20转入酿酒酵母BY4741,利用尿嘧啶营养缺陷筛选成功的转化子,得到菌株BY4741/pY26TEF-GPD-PnTPS3-ERG20,将构建成功的重组菌命名为P2。挑取P2单克隆于10mL YPD培养基中30℃、200rpm培养12h后,转接2mL菌液入200mL YPD培养基中37℃、220rpm培养4天。

[0047] 定量分析实验结果:由GC-MS定量分析得到,产生的 α -古巴烯量为 46.86 ± 0.95 mg/L。

[0048] 该实施例结果证明在酿酒酵母体内过表达法尼基焦磷酸合成酶基因来提高法尼基焦磷酸的量,可以提高重组菌 α -古巴烯的产量。

[0049] 实施例3

[0050] 同实施例2,不同的是融合表达 α -古巴烯合酶和法尼基焦磷酸合成酶。

[0051] 选取质粒pY26TEF-GPD。将编码法尼基焦磷酸合成酶的基因ERG20和编码 α -古巴烯合成酶的基因PnTPS3构建到质粒pY26TEF-GPD上,得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20。

[0052] 以PnTPS3基因为模板,通过使用如下引物PCR扩增PnTPS3基因片段:

[0053] PnTPS3上游引物:AACTCCGGACCGCGAGATCTATGGGCTTTTCTTTTGTAAC,

[0054] PnTPS3下游引物:GAGGGGGATAGGTTGGACAA。

[0055] 以酿酒酵母BY4741的基因组为模板,通过使用如下引物PCR扩增ERG20基因片段:

[0056] ERG20上游引物:TCCAACCTATCCCCCTCGGTTCTGGTATGGCTTCAGAAAAAGAAAT,

[0057] ERG20下游引物:AGAATTGTAAATTAAGATCTTTATTTGCTTCTCTTGTAAT。

[0058] 用BglII酶对pY26TEF-GPD进行酶切,得到线性化的pY26TEF-GPD质粒,然后将扩增得到的PnTPS3-ERG20基因片段和线性化的pY26TEF-GPD质粒进行同源重组连接(重组酶购买于南京诺唯赞公司,产品货号C115),得到PnTPS3和ERG20融合表达质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20,其示意图见图4。

[0059] 将质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20转入酿酒酵母BY4741,利用尿嘧啶营养缺陷筛选成功的转化子,得到菌株BY4741/pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20,将构建成功的重组菌命名为P3。挑取P3单克隆于10mL YPD培养基中30℃、200rpm培养12h后,转接2mL菌液入200mL YPD培养基中37℃、220rpm培养4天。

[0060] 定量分析实验结果:由GC-MS定量分析得到,产生的 α -古巴烯量为 77.73 ± 0.85 mg/L。

[0061] 该实施例结果证明在微生物体内融合表达 α -古巴烯合酶和法尼基焦磷酸合成酶,可以进一步提高重组菌 α -古巴烯的产量。

[0062] 实施例4

[0063] 同实施例3,不同的是进一步过表达异戊烯焦磷酸异构酶。

[0064] 选取实施例3中构建好的质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20。将编码异戊烯焦磷酸异构酶的基因IDI1(核苷酸序列如SEQ ID No.6所示)构建到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20上,得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-IDI1。

[0065] 以酿酒酵母BY4741的基因组为模板,通过使用如下引物PCR扩增IDI1基因片段:

[0066] IDI1上游引物:GATTCTAGAACTAGTGGATCCATGACTGCCGACAACAATAG,

[0067] IDI1下游引物:TTCCTGCAGCCCCGGGGATCCTTATAGCATTCTATGAATTT。

[0068] 用BamHI酶对pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20进行酶切,得到线性化的pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20质粒,然后将扩增得到的IDI1基因片段和线性化的pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20质粒进行同源重组连接(重组酶购买于南京诺唯赞公司,产品货号C115),得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-IDI1,其示意图见图5。

[0069] 将质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-IDI1转入酿酒酵母BY4741,利用尿嘧啶营养缺陷筛选成功的转化子,得到菌株BY4741/pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-IDI1,将构建成功的重组菌命名为P4。挑取P4单克隆于10mL YPD培养基中30℃、200rpm培养12h后,转接2mL菌液入200mL YPD培养基中37℃、220rpm培养4天。

[0070] 定量分析实验结果:由GC-MS定量分析得到,产生的 α -古巴烯量为 $110.36 \pm 1.21\text{mg/L}$ 。

[0071] 该实施例结果证明在酿酒酵母体内过表达异戊烯焦磷酸异构酶可以进一步提高 α -古巴烯的产量。

[0072] 实施例5

[0073] 同实施例4,不同的是融合过表达异戊烯焦磷酸异构酶。

[0074] 选取质粒pY26TEF-GPD。将PnTPS3、ERG20和IDI1基因构建到质粒pY26TEF-GPD上,得到融合表达PnTPS3、ERG20和IDI1基因的质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-L-IDI1。

[0075] 以PnTPS3基因为模板,通过使用如下引物PCR扩增PnTPS3基因片段:

[0076] PnTPS3上游引物:AACTCCGACCGCGGAGATCTATGGGCTTTTCTTTTGTAAAC,

[0077] PnTPS3下游引物:ATTTCTTTTCTGAAGCCATACCAGAACCGAGGGGGATAGGTTGGACAA。

[0078] 以酿酒酵母BY4741的基因组为模板,通过使用如下引物PCR扩增ERG20基因片段:

[0079] ERG20上游引物:ATGGCTTCAGAAAAAGAAAT,

[0080] ERG20下游引物:TTTGCTTCTCTTGTAACCTT。

[0081] 以酿酒酵母BY4741的基因组为模板,通过使用如下引物PCR扩增IDI1基因片段:

[0082] IDI1上游引物:AAGTTTACAAGAGAAGCAAAGGTTCTGGTATGACTGCCGACAACAATAG,

[0083] IDI1下游引物:GGCGAAGAATTGTAAATTAAGATCTTTATAGCATTCTATGAATTT。

[0084] 用BglIII酶对pY26TEF-GPD进行酶切,得到线性化的pY26TEF-GPD质粒,然后将扩增得到的PnTPS3、ERG20、IDI1基因片段和线性化的pY26TEF-GPD质粒进行同源重组连接(重组酶购买于南京诺唯赞公司,产品货号C115),得到质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-L-IDI1,其示意图见图6。

[0085] 将质粒pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-L-IDI1转入酿酒酵母BY4741,利用尿嘧啶营养缺陷筛选成功的转化子,得到菌株BY4741/pY26TEF-GPD-PnTPS3-L-ERG20-L-IDI1,将构建成功的重组菌命名为P5。挑取P5单克隆于10mL YPD培养基中30℃、200rpm培养12h后,转接2mL菌液入200mL YPD培养基中37℃、220rpm培养4天。

[0086] 定量分析实验结果:由GC-MS定量分析得到,产生的 α -古巴烯量为 $342.25 \pm 2.13\text{mg/L}$ 。

[0087] 该实施例结果证明在酿酒酵母体内融合过表达异戊烯焦磷酸异构酶可以进一步提高 α -古巴烯的产量。

序列表

<110> 湖北工业大学

<120> 产 α -古巴烯的重组酿酒酵母及其应用

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 561

<212> PRT

<213> Piper nigrum

<400> 1

```

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

```

Ser Ile Ser Cys Tyr Glu Asn Lys Asn Gly Arg Asn Glu Val Val Leu			
225	230	235	240
Glu Leu Ala Lys Leu Asp Phe Asn Leu Leu Gln Ala Val His Gln Arg			
	245	250	255
Glu Leu Ala Leu Leu Thr Ser Trp Trp Asn Glu Leu Gly Ala Ser Thr			
	260	265	270
Asn Leu Pro Phe Thr Arg Asn Arg Val Val Glu Leu Tyr Phe Trp Val			
	275	280	285
Leu Glu Val Leu Ser Lys Pro Glu His Ala Arg Ala Arg Glu Ile Met			
	290	295	300
Val Lys Ser Ile Ile Met Ala Ser Ile Leu Asp Asp Val Tyr Asp Val			
305	310	315	320
Tyr Gly Thr Leu Glu Glu Leu Gln Leu Phe Thr Ser Ala Leu Glu Arg			
	325	330	335
Trp Asp Leu Gln Ala Leu Glu Gln Leu Pro Asn Thr Ile Lys Thr Ala			
	340	345	350
Tyr Ser Ile Val Leu Arg Val Phe Lys Glu Tyr Glu Asp Leu Leu Lys			
	355	360	365
Pro His Glu Val Tyr Arg Val Gly Phe Ala Arg Lys Ala Leu Ile Pro			
	370	375	380
Tyr Met Asn Ala Tyr Phe Leu Glu Ala Lys Trp Phe Tyr Ser His His			
385	390	395	400
His Pro Ser Phe Glu Glu Tyr Met Asp Asn Ala Leu Val Ser Cys Gly			
	405	410	415
Tyr Pro Phe Leu Phe Leu Val Ser Leu Val Gly Leu Asp Glu Ile Ala			
	420	425	430
Thr Lys Asp Val Phe Glu Trp Ala Ile Lys Arg Pro Asn Ile Val Val			
	435	440	445
Ala Ala Ser Met Ile Cys Arg Asn Arg Asp Asp Ile Val Gly His Lys			
	450	455	460
Glu Glu Gln Glu Arg Gly Asp Val Pro Ser Gly Val Glu Cys Tyr Thr			
465	470	475	480
Lys Asp His Gly Cys Thr Glu Glu Glu Ala Cys Met Ala Leu Gln Ala			
	485	490	495
Met Val Asp Asp Ala Trp Lys Asp Ile Asn Cys Glu Leu Leu His Asp			
	500	505	510
Thr Ser Met Pro Lys Ala Ile Leu Met Arg Ala Val Gly Leu Ala Arg			
	515	520	525
Ile Ile Ser Ile Leu Tyr Gln Tyr Arg Asp Gly Tyr Ser Asp Ser Thr			

530	535	540
His Glu Thr Lys Ala	His Val Thr Gln Val	Leu Val Gln Pro Ile Pro
545	550	555
560		
Leu		
<210> 2		
<211> 352		
<212> PRT		
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<400> 2		
Met Ala Ser Glu Lys Glu Ile Arg Arg Glu Arg Phe Leu Asn Val Phe		
1	5	10
Pro Lys Leu Val Glu Glu Leu Asn Ala Ser Leu Leu Ala Tyr Gly Met		
20	25	30
Pro Lys Glu Ala Cys Asp Trp Tyr Ala His Ser Leu Asn Tyr Asn Thr		
35	40	45
Pro Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val Val Asp Thr Tyr Ala		
50	55	60
Ile Leu Ser Asn Lys Thr Val Glu Gln Leu Gly Gln Glu Glu Tyr Glu		
65	70	75
80		
Lys Val Ala Ile Leu Gly Trp Cys Ile Glu Leu Leu Gln Ala Tyr Phe		
85	90	95
Leu Val Ala Asp Asp Met Met Asp Lys Ser Ile Thr Arg Arg Gly Gln		
100	105	110
Pro Cys Trp Tyr Lys Val Pro Glu Val Gly Glu Ile Ala Ile Asn Asp		
115	120	125
Ala Phe Met Leu Glu Ala Ala Ile Tyr Lys Leu Leu Lys Ser His Phe		
130	135	140
Arg Asn Glu Lys Tyr Tyr Ile Asp Ile Thr Glu Leu Phe His Glu Val		
145	150	155
160		
Thr Phe Gln Thr Glu Leu Gly Gln Leu Met Asp Leu Ile Thr Ala Pro		
165	170	175
Glu Asp Lys Val Asp Leu Ser Lys Phe Ser Leu Lys Lys His Ser Phe		
180	185	190
Ile Val Thr Phe Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu Pro Val Ala		
195	200	205
Leu Ala Met Tyr Val Ala Gly Ile Thr Asp Glu Lys Asp Leu Lys Gln		
210	215	220
Ala Arg Asp Val Leu Ile Pro Leu Gly Glu Tyr Phe Gln Ile Gln Asp		
225	230	235
240		

Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Gly Thr Pro Glu Gln Ile Gly Lys Ile Gly			
245	250	255	
Thr Asp Ile Gln Asp Asn Lys Cys Ser Trp Val Ile Asn Lys Ala Leu			
260	265	270	
Glu Leu Ala Ser Ala Glu Gln Arg Lys Thr Leu Asp Glu Asn Tyr Gly			
275	280	285	
Lys Lys Asp Ser Val Ala Glu Ala Lys Cys Lys Lys Ile Phe Asn Asp			
290	295	300	
Leu Lys Ile Glu Gln Leu Tyr His Glu Tyr Glu Glu Ser Ile Ala Lys			
305	310	315	320
Asp Leu Lys Ala Lys Ile Ser Gln Val Asp Glu Ser Arg Gly Phe Lys			
325	330	335	
Ala Asp Val Leu Thr Ala Phe Leu Asn Lys Val Tyr Lys Arg Ser Lys			
340	345	350	
<210> 3			
<211> 288			
<212> PRT			
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
<400> 3			
Met Thr Ala Asp Asn Asn Ser Met Pro His Gly Ala Val Ser Ser Tyr			
1	5	10	15
Ala Lys Leu Val Gln Asn Gln Thr Pro Glu Asp Ile Leu Glu Glu Phe			
20	25	30	
Pro Glu Ile Ile Pro Leu Gln Gln Arg Pro Asn Thr Arg Ser Ser Glu			
35	40	45	
Thr Ser Asn Asp Glu Ser Gly Glu Thr Cys Phe Ser Gly His Asp Glu			
50	55	60	
Glu Gln Ile Lys Leu Met Asn Glu Asn Cys Ile Val Leu Asp Trp Asp			
65	70	75	80
Asp Asn Ala Ile Gly Ala Gly Thr Lys Lys Val Cys His Leu Met Glu			
85	90	95	
Asn Ile Glu Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Ile Phe			
100	105	110	
Asn Glu Gln Gly Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Thr Glu Lys Ile			
115	120	125	
Thr Phe Pro Asp Leu Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Cys			
130	135	140	
Ile Asp Asp Glu Leu Gly Leu Lys Gly Lys Leu Asp Asp Lys Ile Lys			
145	150	155	160

Gly Ala Ile Thr Ala Ala Val Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly Ile		
165	170	175
Pro Glu Asp Glu Thr Lys Thr Arg Gly Lys Phe His Phe Leu Asn Arg		
180	185	190
Ile His Tyr Met Ala Pro Ser Asn Glu Pro Trp Gly Glu His Glu Ile		
195	200	205
Asp Tyr Ile Leu Phe Tyr Lys Ile Asn Ala Lys Glu Asn Leu Thr Val		
210	215	220
Asn Pro Asn Val Asn Glu Val Arg Asp Phe Lys Trp Val Ser Pro Asn		
225	230	235
Asp Leu Lys Thr Met Phe Ala Asp Pro Ser Tyr Lys Phe Thr Pro Trp		
245	250	255
Phe Lys Ile Ile Cys Glu Asn Tyr Leu Phe Asn Trp Trp Glu Gln Leu		
260	265	270
Asp Asp Leu Ser Glu Val Glu Asn Asp Arg Gln Ile His Arg Met Leu		
275	280	285

<210> 4

<211> 1686

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

```

atgggctttt cttttgtaac aaatgctgct attgctgctc atatgccgcc atccaagcag 60
gagatcattc gtcgtgatgc caaatatcat cctaccattt ggggtgatca tttcatccag 120
tatttagata ctccattga tcctcccaa aaagtggtag agaggatgga ggaattgaag 180
aaacaagtga gagcaatgct ccgagataca aacttagata ttagtttgat tgattggatt 240
cagaggacag gaattgcata tcattttgag gaacagattg ctgaaacatt gaagcatgta 300
tatgaagcct cgacctgac cactgattcc tccaaatata ttgaacactt tgatcttcgc 360
catattgcac tgcgttttcg attgtccagg cagcaagggt accatgcata aacagatgtg 420
ttcaagaggt tcatggacga gggagataaa ttcaaacaaa gcatagccaa cgatatagaa 480
ggcatgttga gcttatacga agcatcattt atgagcgtga agggggaagc gattcttgat 540
gaagctctag ctttcaccgg taaaaatctc gaagccacat tgccaaactt aacaggttcc 600
cttgctcaac aagtggaatg tgcacttgag ataccactcc gtagatgcac agacttggtg 660
aaagcaagga ggtcaatctc atgctatgag aacaaaaatg gtaggaatga ggttggtgctt 720
gagcttgcaa agctggattt caatctgtta caagctgtgc accagagaga attggcctta 780
ctaacaagtt ggtggaacga gcttgagct tctacaaatc ttccctttac caggaataga 840
gtagtcgagc tatacttttg ggtacttgaa gttctctcaa aacctgaaca tgcaagagct 900
agagagataa tggatgaagag tatcatcatg gcgtcaattt tggatgatgt atatgatgtc 960
tatggaaccc tagaggagct acaactcttc acttcagcac ttgaaaggtg ggatttgcaa 1020
gctcttgagc aattgcaaaa cactataaaa acagcttatt ctattgtttt gaggtgtttt 1080

```

aaggaatatg aagacttgct taaaccacat gaagtgtatc gtgttggctt cgcaagaaaa 1140
gcattaatcc cctacatgaa tgcatacttt ttggaagcaa aatggtttta ttcgcatcac 1200
catccatcat ttgaagagta catggacaat gcactcgtat catgcggcta tcccttcttg 1260
tttttggat ctttagttgg attggacgaa attgcaacaa aagatgtctt tgaatgggcc 1320
attaaaagac caaatatagt tgtcgcagca agcatgatat gcaggaacag ggatgacatt 1380
gttgggcaca aggaagaaca agagagggga gacgttccat caggggtaga gtgttacacg 1440
aaggaccatg gatgcacaga ggaagaggca tgcattggc tccaagccat ggtggatgat 1500
gcatggaagg acataaactg cgagctacta cagatacat ctatgccaaa ggccattctc 1560
atgagggcgg tcggactagc tcgcatcatt tcaatccttt accaatacag agatggttac 1620
tcggactcca cacatgagac aaaagctcat gttactcagg tgcttgtcca acctatcccc 1680
ctctaa 1686

<210> 5

<211> 1059

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

atggcttcag aaaaagaaat taggagagag agattcttga acgttttccc taaattagta 60
gaggaattga acgcatcgct tttggcttac ggtatgccta aggaagcatg tgactggtat 120
gccactcat tgaactacaa cactccaggc ggtaagctaa atagaggttt gtccgttgtg 180
gacacgtatg ctattctctc caacaagacc gttgaacaat tggggcaaga agaatacga 240
aaggttgcca ttctaggttg gtgcattgag ttgttgcagg cttacttctt ggctcgccat 300
gatatgatgg acaagtccat taccagaaga ggccaacat gttggtacaa ggttcctgaa 360
gttggggaaa ttgccatcaa tgacgattc atgttagagg ctgctatcta caagcttttg 420
aaatctcact tcagaaacga aaaatactac atagatatca ccgaattgtt ccatgaggtc 480
accttccaaa ccgaattggg ccaattgatg gacttaatca ctgcacctga agacaaagtc 540
gacttgagta agttctccct aaagaagcac tccttcatag ttactttcaa gactgcttac 600
tattctttct acttgccgtg cgcatggcc atgtacgttg ccggtatcac ggatgaaaag 660
gatttgaaac aagccagaga tgtcttgatt ccattgggtg aatacttcca aattcaagat 720
gactacttag actgcttcgg taccccagaa cagatcggtg agatcggtac agatatccaa 780
gataacaaat gttcttgggt aatcaacaag gcattggaac ttgcttccgc agaacaaaga 840
aagactttag acgaaaatta cggtgaaga gactcagtcg cagaagccaa atgcaaaaag 900
athttcaatg acttgaaaat tgaacagcta taccacgaat atgaagagtc tattgccaag 960
gatttgaagg ccaaaaattc tcaggtcgat gagtctcgtg gcttcaaagc tgatgtctta 1020
actgcgttct tgaacaaagt ttacaagaga agcaaataa 1059

<210> 6

<211> 867

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6

atgactgccg acaacaatag tatgccccat ggtgcagtat ctagttacgc caaattagtg 60
caaaacaaaa cacctgaaga catTTTggaa gagtttctg aaattattcc attacaaca 120
agacctataa cccgatctag tgagacgtca aatgacgaaa gcggagaaac atgtttttct 180
ggtcatgatg aggagcaaat taagttaatg aatgaaaatt gtattgtttt ggattgggac 240
gataatgcta ttggtgccgg taccaagaaa gtttgtcatt taatggaaaa tattgaaaag 300
ggtttactac atcgtgcatt ctccgtcttt attttcaatg aacaaggtga attactttta 360
caacaaagag ccactgaaaa aataactttc cctgatcttt ggactaacac atgctgctct 420
catccactat gtattgatga cgaattaggt ttgaagggtg agctagacga taagattaag 480
ggcgctatta ctgcggcggt gagaaaacta gatcatgaat taggtattcc agaagatgaa 540
actaagacaa ggggtaagtt tcacttttta aacagaatcc attacatggc accaagcaat 600
gaaccatggg gtgaacatga aattgattac atcctatTTT ataagatcaa cgctaaagaa 660
aacttgactg tcaacccaaa cgtcaatgaa gttagagact tcaaattgggt ttcaccaaT 720
gatttgaaaa ctatgtttgc tgaccaagt tacaagtTTa cgccttggtt taagattatt 780
tgcgagaatt acttattcaa ctggtgggag caattagatg acctttctga agtggaaaat 840
gacaggcaaa ttcatagaat gctataa 867



图1

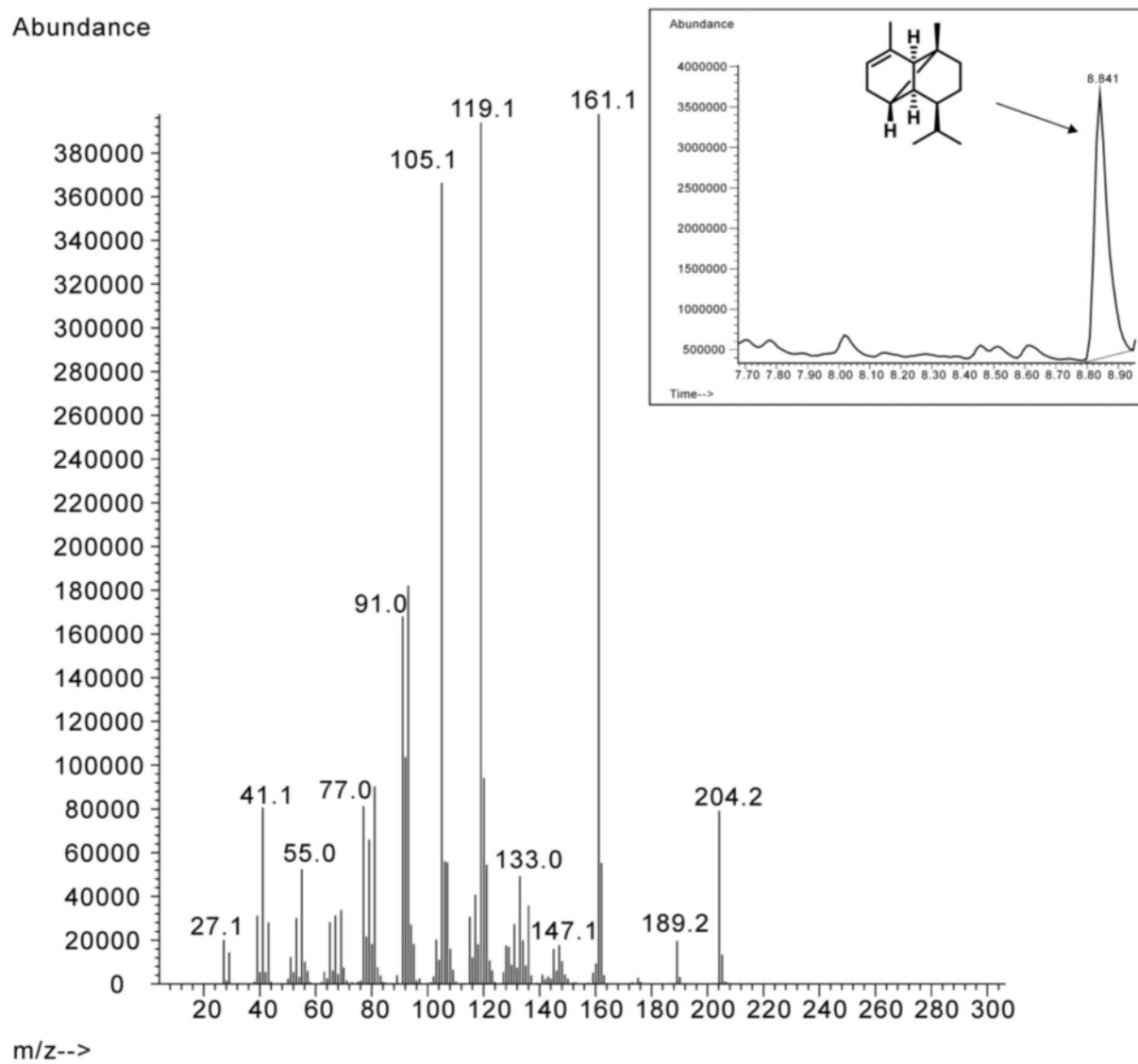


图2

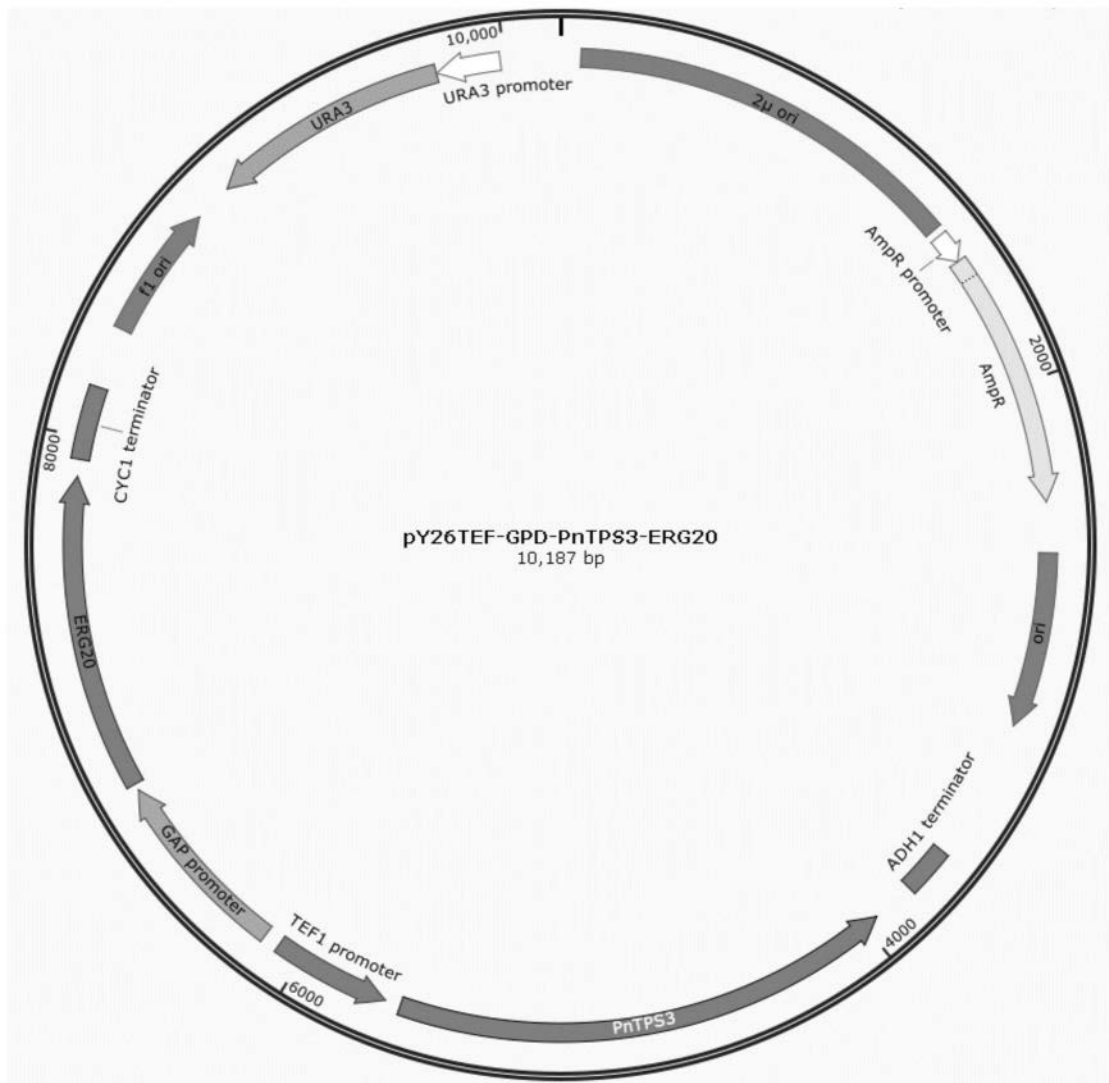


图3



图4

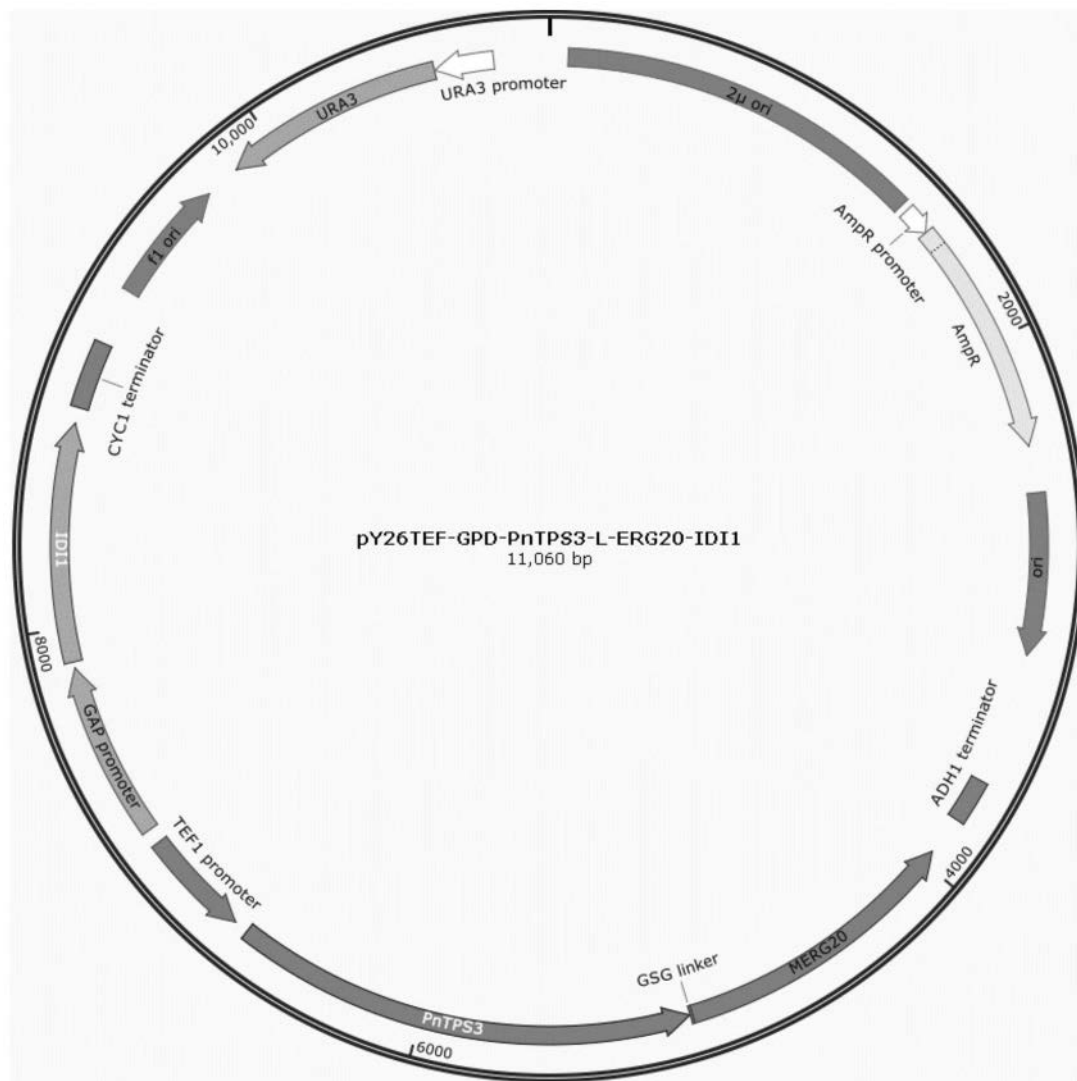


图5

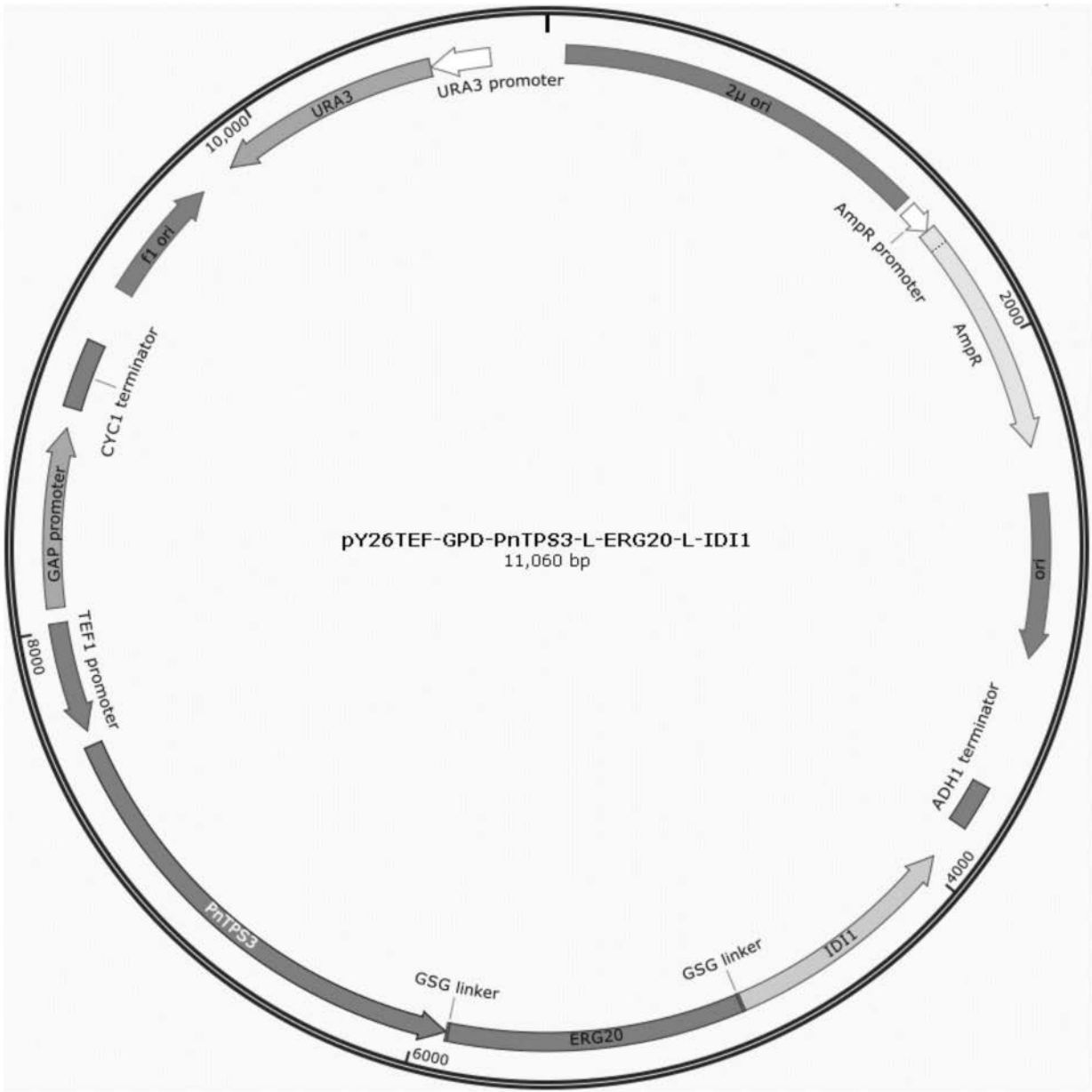


图6