



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103764814 B

(45)授权公告日 2016.11.16

(21)申请号 201280031905.4

(22)申请日 2012.04.27

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103764814 A

(43)申请公布日 2014.04.30

(30)优先权数据

61/481,098 2011.04.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.12.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/035655 2012.04.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/149469 EN 2012.11.01

(73)专利权人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 固特异轮胎和橡胶公司

(72)发明人 Z·Q·贝克 M·C·米勒

C·M·派瑞斯 Y·A·普里马克

J·P·普奇 D·H·韦尔斯

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12N 9/00(2006.01)

C12N 9/10(2006.01)

C12P 5/00(2006.01)

C12P 7/02(2006.01)

C12P 7/04(2006.01)

C12P 7/42(2006.01)

(56)对比文件

EP 1510583 A1,2005.03.02,

EP 1510583 A1,2005.03.02,

CN 101484584 A,2009.07.15,

CN 102027124 A,2011.04.20,

WO 2009076676 A2,2009.06.18,

WO 2007140339 A2,2007.12.06,

WO 0078935 A1,2000.12.28,

US 2010086978 A1,2010.04.08,

WO 2010078457 A2,2010.07.08,

Douglas J. Pitera et al..Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*.《Metabolic Engineering》.2006,193-207.

Vincent JJ Martin et al..Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids.《NATURE BIOTECHNOLOGY》.2003,第21卷(第7期),796-802.

审查员 梁婧文

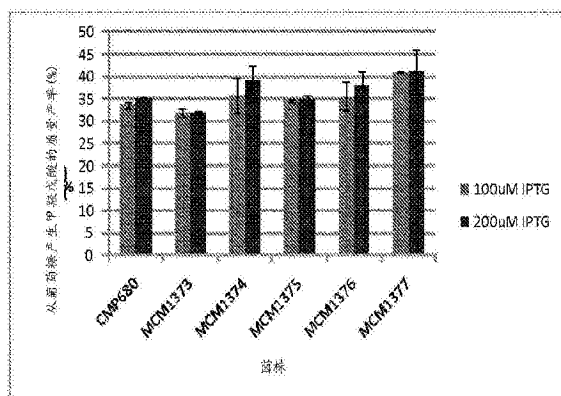
权利要求书8页 说明书99页 附图7页

(54)发明名称

利用编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶活性的多肽的基因产生甲羟戊酸、异戊二烯和类异戊二烯

(57)摘要

本发明描述了通过异源表达来自生物体格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鸢鸡肠球菌EG2和铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因增加微生物中甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯的产量的组合物和方法。



1. 一种能够增加异戊二烯的产量的重组细胞,所述细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:

a. 核苷酸序列,所述核苷酸序列是鹌鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*)的*mvaE*基因和*mvaS*基因;

b. 核苷酸序列,所述核苷酸序列是铅黄肠球菌(*Enterococcus casseliflavus*)的*mvaE*基因和*mvaS*基因;

c. 核苷酸序列,所述核苷酸序列是屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)的*mvaE*基因和*mvaS*基因;和

d. 核苷酸序列,所述核苷酸序列是格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)的*mvaE*基因和*mvaS*基因

其中所述*mvaE*基因和*mvaS*基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中所述细胞还包含:

i. 编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸;和

ii. 一种或多种编码MVA下游途径的多肽的核酸,

其中与不包含所述*mvaE*基因和*mvaS*基因的产异戊二烯细胞相比所述细胞产生增加量的异戊二烯。

2. 根据权利要求1所述的细胞,其中所述编码MVA下游途径的多肽的核酸包含编码选自如下酶的核酸:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊烯焦磷酸的酶。

3. 根据权利要求2所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)甲羟戊酸激酶、布氏拟甲烷球菌(*Methanococcoides burtonii*)甲羟戊酸激酶多肽、乳杆菌(*Lactobacillus*)甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌(*Streptococcus*)甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌(*Streptomyces*)甲羟戊酸激酶多肽。

4. 根据权利要求3所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)甲羟戊酸激酶多肽、和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。

5. 根据权利要求3所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。

6. 根据权利要求1所述的细胞,其中所述异戊二烯合酶多肽为植物异戊二烯合酶多肽。

7. 根据权利要求6所述的细胞,其中所述异戊二烯合酶多肽为来自葛属(*Pueraria*)或杨属(*Populus*)的多肽。

8. 根据权利要求7所述的细胞,其中所述异戊二烯合酶多肽选自山葛(*Pueraria montana*)、野葛(*Pueraria lobata*)、美洲山杨(*Populus tremuloides*)、银白杨(*Populus alba*)、黑杨(*Populus nigra*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)和杂种银白杨x欧洲山杨。

9. 根据权利要求6所述的细胞,其中所述植物异戊二烯合酶多肽为银白杨异戊二烯合酶多肽。

10. 根据权利要求1所述的细胞,还包含一种或多种编码异戊烯二磷酸 $\delta$ -异构酶(IDI)多肽的核酸。

11. 根据权利要求10所述的细胞, 其中所述编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的异源核酸。

12. 根据权利要求11所述的细胞, 其中所述IDI多肽为酵母IDI多肽。

13. 根据权利要求10所述的细胞, 其中所述编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的内源核酸拷贝。

14. 根据权利要求1所述的细胞, 其中将所述一种或多种核酸置于诱导型启动子或组成型启动子之下。

15. 根据权利要求1所述的细胞, 其中将所述一种或多种核酸克隆进多拷贝质粒中。

16. 根据权利要求1所述的细胞, 其中将所述一种或多种核酸整合进所述细胞的染色体中。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的细胞, 其中所述细胞为革兰氏阳性细菌细胞或革兰氏阴性细菌细胞、真菌细胞。

18. 根据权利要求17所述的细胞, 其中所述细菌细胞为埃希杆菌(*Escherichia*)细胞、泛菌(*Pantoea*)细胞, 所述真菌细胞为丝状真菌细胞或酵母细胞。

19. 根据权利要求18所述的细胞, 其中所述丝状真菌细胞为木霉(*Trichoderma*)细胞或曲霉(*Aspergillus*)细胞。

20. 根据权利要求17所述的细胞, 其中所述细胞选自大肠杆菌细胞、柠檬泛菌(*Pantoea citrea*)细胞、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)细胞、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)细胞、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)细胞、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)细胞、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)细胞、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)细胞、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)细胞、克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)细胞、耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)细胞、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)细胞、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)细胞、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)细胞、灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*)细胞、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)细胞、白色链霉菌(*Streptomyces albus*)细胞、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)细胞、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)细胞、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)细胞、假单胞菌属物种(*Pseudomonas sp.*)细胞和产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)细胞。

21. 根据权利要求20所述的细胞, 其中所述细胞为大肠杆菌。

22. 一种产生异戊二烯的方法, 包括: (a) 在适于产生异戊二烯的培养条件下培养根据权利要求1所述的重组细胞; 以及(b) 产生异戊二烯。

23. 根据权利要求22所述的方法, 还包括(c) 回收异戊二烯。

24. 能够增加类异戊二烯前体的产量的重组细胞, 所述细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:

(a) 核苷酸序列, 所述核苷酸序列是鹌鸡肠球菌的*mvaE*基因和*mvaS*基因;

(b) 核苷酸序列, 所述核苷酸序列是铅黄肠球菌的*mvaE*基因和*mvaS*基因; 和

(c) 核苷酸序列, 所述核苷酸序列是格氏李斯特菌的*mvaE*基因和*mvaS*基因,

其中所述*mvaE*基因和*mvaS*基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽, 并且其中与不包含所述*mvaE*基因和*mvaS*基因的产类异戊二烯前体细胞相比所述

细胞产生增加量的类异戊二烯前体,其中所述类异戊二烯前体是甲羟戊酸。

25.根据权利要求24所述的细胞,其中将所述一种或多种核酸置于诱导型启动子或组成型启动子之下。

26.根据权利要求24所述的细胞,其中将所述一种或多种核酸克隆进多拷贝质粒中。

27.根据权利要求24所述的细胞,其中将所述一种或多种核酸整合进所述细胞的染色体中。

28.根据权利要求24所述的细胞,其中所述细胞为革兰氏阳性细菌细胞、革兰氏阴性细菌细胞、真菌细胞。

29.根据权利要求28所述的细胞,其中所述细菌细胞为埃希杆菌细胞、泛菌细胞,所述真菌细胞为丝状真菌细胞或酵母细胞。

30.根据权利要求29所述的细胞,其中所述丝状真菌细胞为木霉细胞或曲霉细胞。

31.根据权利要求28所述的细胞,其中所述细胞选自大肠杆菌细胞、柠檬泛菌细胞、枯草芽孢杆菌细胞、地衣芽孢杆菌细胞、迟缓芽孢杆菌细胞、短芽孢杆菌细胞、嗜热脂肪芽孢杆菌细胞、嗜碱芽孢杆菌细胞、解淀粉芽孢杆菌细胞、克劳氏芽孢杆菌细胞、耐盐芽孢杆菌细胞、巨大芽孢杆菌细胞、凝结芽孢杆菌细胞、环状芽孢杆菌细胞、灿烂芽孢杆菌细胞、苏云金芽孢杆菌细胞、白色链霉菌细胞、变铅青链霉菌细胞、天蓝色链霉菌细胞、灰色链霉菌细胞、假单胞菌属物种细胞和产碱假单胞菌细胞。

32.根据权利要求31所述的细胞,其中所述细胞为大肠杆菌。

33.根据权利要求24-32中任一项所述的细胞,其中所述类异戊二烯前体为甲羟戊酸(MVA)。

34.一种产生类异戊二烯前体的方法,包括:(a)在适于产生类异戊二烯前体的培养条件下培养根据权利要求24所述的重组细胞;以及(b)产生所述类异戊二烯前体。

35.根据权利要求34所述的方法,还包括(c)回收所述类异戊二烯前体。

36.能够增加类异戊二烯的产量的重组细胞,所述细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:

(a)核苷酸序列,所述核苷酸序列是鹌鸡肠球菌的*mvaE*基因和*mvaS*基因;

(b)核苷酸序列,所述核苷酸序列是铅黄肠球菌的*mvaE*基因和*mvaS*基因;

(c)核苷酸序列,所述核苷酸序列是屎肠球菌的*mvaE*基因和*mvaS*基因;和

(d)核苷酸序列,所述核苷酸序列是格氏李斯特菌的*mvaE*基因和*mvaS*基因,

其中所述*mvaE*基因和*mvaS*基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中所述细胞还包含:

i.一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶的核酸;和

ii.一种或多种编码MVA下游途径的多肽的核酸,

其中与不包含所述*mvaE*基因和*mvaS*基因的产类异戊二烯细胞相比所述细胞产生增加量的类异戊二烯。

37.根据权利要求36所述的细胞,其中所述编码MVA下游途径的多肽的核酸包含编码选自如下酶的核酸:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊烯焦磷酸的酶。

38.根据权利要求37所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶

选自马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、布氏拟甲烷球菌甲羟戊酸激酶多肽、乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽。

39. 根据权利要求38所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、和链霉菌*CL190*甲羟戊酸激酶多肽。

40. 根据权利要求38所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。

41. 根据权利要求36所述的细胞,其中将所述一种或多种核酸置于诱导型启动子或组成型启动子之下。

42. 根据权利要求36所述的细胞,其中将所述一种或多种核酸克隆进多拷贝质粒中。

43. 根据权利要求36所述的细胞,其中将所述一种或多种核酸整合进所述细胞的染色体中。

44. 根据权利要求36所述的细胞,其中所述细胞为革兰氏阳性细菌细胞、革兰氏阴性细菌细胞、真菌细胞。

45. 根据权利要求44所述的细胞,其中所述细菌细胞为埃希杆菌细胞、泛菌细胞,所述真菌细胞为丝状真菌细胞或酵母细胞。

46. 根据权利要求45所述的细胞,其中所述丝状真菌细胞为木霉细胞或曲霉细胞。

47. 根据权利要求44所述的细胞,其中所述细胞选自大肠杆菌细胞、柠檬泛菌细胞、枯草芽孢杆菌细胞、地衣芽孢杆菌细胞、迟缓芽孢杆菌细胞、短芽孢杆菌细胞、嗜热脂肪芽孢杆菌细胞、嗜碱芽孢杆菌细胞、解淀粉芽孢杆菌细胞、克劳氏芽孢杆菌细胞、耐盐芽孢杆菌细胞、巨大芽孢杆菌细胞、凝结芽孢杆菌细胞、环状芽孢杆菌细胞、灿烂芽孢杆菌细胞、苏云金芽孢杆菌细胞、白色链霉菌细胞、变铅青链霉菌细胞、天蓝色链霉菌细胞、灰色链霉菌细胞、假单胞菌属物种细胞和产碱假单胞菌细胞。

48. 根据权利要求47所述的细胞,其中所述细胞为大肠杆菌。

49. 根据权利要求36所述的细胞,其中所述类异戊二烯选自单萜、二萜、三萜、四萜、倍半萜和多萜。

50. 根据权利要求49所述的细胞,其中所述类异戊二烯为倍半萜。

51. 根据权利要求36-46中任一项所述的细胞,其中所述类异戊二烯选自松香二烯、紫穗槐二烯、萜烯、 $\alpha$ -金合欢烯、 $\beta$ -金合欢烯、金合欢醇、香叶醇、香叶基香叶醇、芳樟醇、柠檬烯、月桂烯、橙花叔醇、罗勒烯、广藿香醇、 $\beta$ -蒎烯、桉烯、 $\gamma$ -萜品烯、异松香烯和瓦伦西亚桔烯。

52. 一种产生类异戊二烯的方法,包括:(a)在适于产生类异戊二烯的培养条件下培养根据权利要求36所述的重组细胞;以及(b)产生类异戊二烯。

53. 根据权利要求52所述的方法,还包括(c)回收所述类异戊二烯。

54. 具有增加的异戊二烯的产量的重组细胞,所述细胞包含一种或多种异源核酸,所述一种或多种异源核酸包含选自格氏李斯特菌(*L. grayi*)、屎肠球菌(*E. faecium*)、鹌鸡肠球菌(*E. gallinarum*)和铅黄肠球菌(*E. casseliflavus*)的生物体的甲羟戊酸E(*mvaE*)基因和甲羟戊酸S(*mvaS*)基因,其中所述*mvaE*基因和*mvaS*基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和

HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中所述细胞还包含:

- i. 编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸;和
- ii. 一种或多种编码MVA下游途径的多肽的核酸,

其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞相比所述细胞产生增加量的异戊二烯。

55. 根据权利要求54所述的细胞,其中mvaE基因和mvaS基因来自不同的生物体。

56. 根据权利要求54所述的细胞,其中:

- a) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自屎肠球菌;
- b) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌;
- c) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- d) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- e) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌;
- f) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- g) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- h) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自屎肠球菌;
- i) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- j) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- k) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自屎肠球菌;或
- l) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌。

57. 根据权利要求54所述的细胞,其中与(A)含有来自粪肠球菌的mvaE基因和(B)不含有(i)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因、来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因、来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因、或来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞相比所述细胞产生增加量的异戊二烯。

58. 根据权利要求54所述的细胞,其中所述编码MVA下游途径的多肽的核酸包含编码选自如下酶的核酸:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊烯焦磷酸的酶。

59. 根据权利要求58所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)甲羟戊酸激酶、布氏拟甲烷球菌(*Methanococcoides burtonii*)甲羟戊酸激酶多肽、乳杆菌(*Lactobacillus*)甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌(*Streptococcus*)甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌(*Streptomyces*)甲羟戊酸激酶多肽。

60. 根据权利要求59所述的细胞,其中所述将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。

61. 根据权利要求54所述的细胞,其中所述异戊二烯合酶多肽为植物异戊二烯合酶多肽。

62. 根据权利要求61所述的细胞,其中所述异戊二烯合酶多肽为来自葛属(*Pueraria*)或杨属(*Populus*)的多肽。

63. 根据权利要求62所述的细胞,其中所述异戊二烯合酶多肽为来自杂种银白杨x欧洲

山杨的多肽。

64. 根据权利要求61所述的细胞,其中所述植物异戊二烯合酶多肽为银白杨异戊二烯合酶多肽。

65. 根据权利要求54所述的细胞,还包含一种或多种编码异戊烯二磷酸 $\delta$ -异构酶(IDI)多肽的核酸。

66. 根据权利要求54所述的细胞,其中将所述任意一种或多种核酸置于诱导型启动子或组成型启动子之下。

67. 根据权利要求54所述的细胞,其中将所述任意一种或多种核酸克隆进多拷贝质粒中。

68. 根据权利要求54所述的细胞,其中将所述任意一种或多种核酸整合进所述细胞的染色体中。

69. 根据权利要求54所述的细胞,其中细胞是细菌细胞或真菌细胞。

70. 根据权利要求69所述的细胞,其中所述细菌细胞为埃希杆菌细胞、泛菌细胞,所述真菌细胞为丝状真菌细胞。

71. 根据权利要求70所述的细胞,其中所述丝状真菌细胞为木霉细胞或曲霉细胞。

72. 根据权利要求69所述的细胞,其中所述细胞选自大肠杆菌细胞、柠檬泛菌细胞、枯草芽孢杆菌细胞、地衣芽孢杆菌细胞、迟缓芽孢杆菌细胞、短芽孢杆菌细胞、嗜热脂肪芽孢杆菌细胞、嗜碱芽孢杆菌细胞、解淀粉芽孢杆菌细胞、克劳氏芽孢杆菌细胞、耐盐芽孢杆菌细胞、巨大芽孢杆菌细胞、凝结芽孢杆菌细胞、环状芽孢杆菌细胞、灿烂芽孢杆菌细胞、苏云金芽孢杆菌细胞、白色链霉菌细胞、变铅青链霉菌细胞、天蓝色链霉菌细胞、灰色链霉菌细胞、假单胞菌属物种细胞和产碱假单胞菌细胞。

73. 根据权利要求72所述的细胞,其中所述细胞为大肠杆菌细胞。

74. 根据权利要求69所述的细胞,其中所述真菌细胞为酵母细胞。

75. 根据权利要求74所述的细胞,其中所述酵母细胞选自酵母属(*Saccharomyces*)物种、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)物种、毕赤酵母属(*Pichia*)物种或假丝酵母属(*Candida*)物种的细胞。

76. 根据权利要求75所述的细胞,其中所述酵母细胞是酿酒酵母细胞。

77. 一种产生异戊二烯的方法,包括:(a)在适于产生异戊二烯的培养条件下培养根据权利要求68所述的重组细胞;以及(b)产生异戊二烯。

78. 根据权利要求77所述的方法,还包括(c)回收异戊二烯。

79. 具有增加的类异戊二烯前体的产量的重组细胞,所述细胞包含一种或多种异源核酸,所述一种或多种异源核酸包含选自格氏李斯特菌(*L. grayi*)、屎肠球菌(*E. faecium*)、鹌鸡肠球菌(*E. gallinarum*)和铅黄肠球菌(*E. casseliflavus*)的生物体的甲羟戊酸E(*mvaE*)基因和甲羟戊酸S(*mvaS*)基因,其中所述*mvaE*基因和*mvaS*基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中所述细胞还包含:一种或多种编码MVA下游途径的所有多肽的核酸,

其中与不包含所述*mvaE*基因和*mvaS*基因的产异戊二烯细胞相比所述细胞产生增加量的异戊二烯。

80. 根据权利要求79所述的细胞,其中*mvaE*基因和*mvaS*基因来自不同的生物体。

81. 根据权利要求79所述的细胞, 其中:

- a) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自屎肠球菌;
- b) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌;
- c) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- d) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- e) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌;
- f) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- g) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- h) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自屎肠球菌;
- i) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- j) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- k) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自屎肠球菌; 或
- l) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌。

82. 根据权利要求79所述的细胞, 其中与(A)含有来自粪肠球菌的mvaE基因和(B)不含有(i)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因、来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因、来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因、或来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的产类异戊二烯前体的细胞相比所述细胞产生增加量的类异戊二烯前体。

83. 具有增加的类异戊二烯的产量的重组细胞, 所述细胞包含一种或多种异源核酸, 所述一种或多种异源核酸包含选自格氏李斯特菌(*L. grayi*)、屎肠球菌(*E. faecium*)、鹌鸡肠球菌(*E. gallinarum*)和铅黄肠球菌(*E. casseliflavus*)的生物体的甲羟戊酸E(mvaE)基因和甲羟戊酸S(mvaS)基因, 其中所述mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽, 并且其中所述细胞还包含:

- i. 一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶的核酸; 和
- ii. 一种或多种编码MVA下游途径的多肽的核酸,

其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产类异戊二烯细胞相比所述细胞产生增加量的类异戊二烯。

84. 根据权利要求83所述的细胞, 其中mvaE基因和mvaS基因来自不同的生物体。

85. 根据权利要求83所述的细胞, 其中:

- a) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自屎肠球菌;
- b) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌;
- c) mvaE基因是来自格氏李斯特菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- d) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- e) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌;
- f) mvaE基因是来自屎肠球菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- g) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- h) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自屎肠球菌;
- i) mvaE基因是来自鹌鸡肠球菌和mvaS基因是来自铅黄肠球菌;
- j) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自格氏李斯特菌;
- k) mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自屎肠球菌; 或

1)mvaE基因是来自铅黄肠球菌和mvaS基因是来自鹌鸡肠球菌。

86.根据权利要求83所述的细胞,其中与(A)含有来自粪肠球菌的mvaE基因和(B)不含(i)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因、来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因、来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因、或来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的产类异戊二烯的细胞相比所述细胞产生增加量的类异戊二烯。

## 利用编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶酶活性的多肽的基因产生甲羟戊酸、异戊二烯和类异戊二烯

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2011年4月29日提交的美国临时专利申请No.61/481,098的优先权，特此将该专利的公开内容以引用的方式全文并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及用于在微生物中增加甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯和类异戊二烯前体分子的产量的组合物和方法以及制备甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯和类异戊二烯前体分子的方法。

[0004] 发明背景

[0005] R-甲羟戊酸是甲羟戊酸依赖性生物合成途径的中间体，该途径将乙酰辅酶A转化成异戊烯二磷酸和二甲基烯丙基二磷酸。乙酰辅酶A向甲羟戊酸的转化可由上游甲羟戊酸依赖性生物合成途径(MVA途径)的硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶活性催化。根据葡萄糖经由糖酵解向乙酰辅酶A的摩尔转化率，利用MVA上游途径酶硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶产生甲羟戊酸的理论质量产率为54.8%。

[0006] 商业上，甲羟戊酸已被用作化妆品中的添加剂、用于生产可生物降解的聚合物，并且可具有用于合成其他化学品的手性构造块。

[0007] 甲羟戊酸依赖性途径的产物是异戊烯焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)。IPP和DMAPP是异戊二烯以及类异戊二烯的前体。异戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)是天然橡胶的单体并且还是各式各样的其他天然存在的化合物(统称为类异戊二烯)的共同结构基序(structural motif)异戊二烯此外还是多种合成聚合物(最值得注意的是合成橡胶)的关键原料。

[0008] 类异戊二烯是衍生自类异戊二烯前体分子IPP和DMAPP的化合物。已鉴定了超过29,000种类异戊二烯化合物并且每年都发现新的类异戊二烯。类异戊二烯可分离自天然产物，例如将类异戊二烯前体分子用作基础构造块以形成类异戊二烯的相对复杂结构的微生物和植物物种。类异戊二烯对大多数活生物体和细胞是至关重要的，为维持细胞膜流动性和电子传递提供了手段。在自然界，类异戊二烯发挥的作用多种多样，从作为植物中的天然杀虫剂到促成与肉桂、丁香和生姜相关的香味。此外，制药和化学界将类异戊二烯用作药品、保健营养品、调味剂和农业害虫防治剂。鉴于它们在生物系统中的重要性以及在广泛应用中的有用性，类异戊二烯已成为倍受科学家重视的焦点。

[0009] 获得甲羟戊酸和类异戊二烯的常规手段包括从生物材料(如植物、微生物和动物)提取以及在实验室中部分有机合成或全有机合成。然而，这类手段通常已证明差强人意。尤其对于类异戊二烯，鉴于通常其分子结构的复杂性，考虑到通常需要若干步骤来获得所需产物，因而有机合成是不切实际的。另外，这些化学合成步骤可涉及使用毒性溶剂，同样从生物材料提取类异戊二烯也可涉及使用毒性溶剂。此外，这些提取和纯化方法通常导致所需类异戊二烯产率相对较低，因为生物材料通常仅含有微量的这些分子。不幸的是，获得相

对大量的类异戊二烯所涉及的困难已限制了它们的实际应用。

[0010] 已公开了以一定速率、滴度和纯度产生异戊二烯和类异戊二烯的方法(参见例如国际专利申请公开No. W02009/076676A2和美国专利No. 7,915,026)。然而,仍需要增加异戊二烯和类异戊二烯的产量以及增加异戊二烯和类异戊二烯的产率的改进。

[0011] 本发明通过公开组合物和方法以增加作为甲羟戊酸依赖性生物合成途径的中间体的甲羟戊酸的产量以及增加衍生自甲羟戊酸的分子如异戊二烯、类异戊二烯前体和/或类异戊二烯的产量而提供了这类改进。

[0012] 在整篇本说明书中,参考了多个专利、专利申请以及其他类型的出版物(如杂志文章)。特此将本文引用的所有专利、专利申请和出版物以引用的方式全文并入本文用于所有目的。

## 发明内容

[0013] 本文提供的发明尤其公开了增加重组细胞的异戊二烯产量的组合物和方法。本发明还提供通过表达(如异源表达)来自生物体格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)DSM20601、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、鹌鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*)EG2和铅黄肠球菌(*Enterococcus casseliflavus*)的mvaE和mvaS基因增加微生物中甲羟戊酸、类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯的产量的组合物和方法。

[0014] 因此,本发明提供的是能够增加异戊二烯的产量的重组细胞,该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因,其中所述mvaE基因和mvaS基因编码具有疏解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含:一种或多种编码MVA下游途径的多肽的核酸;和编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞相比,该细胞产生增加量的异戊二烯。在一些方面,编码MVA下游途径的多肽的核酸包含选自如下的酶:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊二烯焦磷酸的酶。在任何本文所公开方面的一些方面中,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)甲羟戊酸激酶、布氏拟甲烷球菌(*Methanococcoides burtonii*)甲羟戊酸激酶多肽、乳杆菌(*Lactobacillus*)甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)甲羟戊酸激酶多肽、链球菌(*Streptococcus*)甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌(*Streptomyces*)甲羟戊酸激酶多肽和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。在一些方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。在任何本文所公开方面的一些方面中,该异戊二烯合酶多肽为植物异戊二烯合酶多肽或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为来自葛属(*Pueraria*)或杨属(*Populus*)或杂种银白杨(*Populus alba*)x欧洲山杨(*Populus tremula*)的多肽或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽选自山葛(*Pueraria montana*)、野葛(*Pueraria lobata*)、美洲山杨(*Populus tremuloides*)、银白杨、黑杨(*Populus nigra*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)。在一些方面,植物异戊二

烯合酶多肽为银白杨异戊二烯合酶多肽。在任何本文所公开方面的一些方面中,该细胞还包含一种或多种编码异戊二烯二磷酸 $\delta$ -异构酶(IDI)多肽的核酸。在一些方面,其中编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的异源核酸。在一些方面,IDI多肽为酵母IDI多肽。在一些方面,编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的内源核酸拷贝。在任何本文所公开方面的一些方面中,将该一种或多种核酸置于诱导型启动子或组成型启动子之下。在任何本文所公开方面的一些方面中,将该一种或多种核酸克隆进多拷贝质粒中。在任何本文所公开方面的一些方面中,将该一种或多种核酸整合进细胞的染色体中。在任何本文所公开方面的一些方面中,该细胞为革兰氏阳性细菌细胞或革兰氏阴性细菌细胞、埃希杆菌(*Escherichia*)细胞、泛菌(*Pantoea*)细胞、真菌细胞、丝状真菌细胞、木霉(*Trichoderma*)细胞、曲霉(*Aspergillus*)细胞或酵母细胞。在一些方面,该细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在一些方面,该细胞为大肠杆菌。

[0015] 在另一方面,本发明提供的是产生异戊二烯的方法,包括:在适于产生异戊二烯的培养条件下培养任何本文所提供方面中所公开的宿主细胞;以及产生异戊二烯。在一个方面,该方法还包括回收异戊二烯。

[0016] 在另外的方面,本发明提供的是能够增加类异戊二烯前体的产量的重组细胞,该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:来自鹌鹑肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有疏解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产类异戊二烯前体细胞相比该细胞产生增加量的类异戊二烯前体。在一些方面,将一种或多种核酸置于诱导型启动子或组成型启动子之下。在任何本文所公开方面的一些方面中,将一种或多种核酸克隆进多拷贝质粒中。在任何本文所公开方面的一些方面中,将一种或多种核酸整合进细胞的染色体中。在任何本文所公开方面的一些方面中,该细胞为革兰氏阳性细菌细胞、革兰氏阴性细菌细胞、埃希杆菌细胞、泛菌细胞、真菌细胞、丝状真菌细胞、木霉细胞、曲霉细胞或酵母细胞。在一些方面,该细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在一些方面,该细胞为大肠杆菌。在任何本文所公开方面的一些方面中,类异戊二烯前体是甲羟戊酸(MVA)。

[0017] 在另一方面,本发明提供的是产生类异戊二烯前体的方法,包括:在适于产生类异戊二烯前体的培养条件下培养任何本文所公开方面中所描述的宿主细胞;以及产生类异戊二烯前体。在一个方面,该方法还包括回收类异戊二烯前体。

[0018] 在另外的方面,本发明提供的是能够增加类异戊二烯的产量的重组细胞,该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:来自鹌鹑肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;

和来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因,其中所述mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含:一种或多种编码MVA下游途径的多肽的核酸;和一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶的核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产类异戊二烯细胞相比,该细胞产生增加量的类异戊二烯。在一些方面,编码MVA下游途径的多肽的核酸包含选自如下的酶:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊烯焦磷酸的酶。在任何本文所公开方面的一些方面中,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、布氏拟甲烷球菌甲羟戊酸激酶多肽、乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。在一些方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。在任何本文所公开方面的一些方面中,将一种或多种核酸置于诱导型启动子或组成型启动子之下。在任何本文所公开方面的一些方面中,将一种或多种核酸克隆进多拷贝质粒中。在任何本文所公开方面的一些方面中,将一种或多种核酸整合进细胞的染色体中。在任何本文所公开方面的一些方面中,该细胞为革兰氏阳性细菌细胞、革兰氏阴性细菌细胞、埃希杆菌细胞、泛菌细胞、真菌细胞、丝状真菌细胞、木霉细胞、曲霉细胞或酵母细胞。在一些方面,该细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在一些方面,该细胞为大肠杆菌。在任何本文所公开方面的一些方面中,类异戊二烯选自单萜、二萜、三萜、四萜、倍半萜和多萜。在一些方面,类异戊二烯为倍半萜。在任何本文所公开方面的一些方面中,类异戊二烯选自松香二烯、紫穗槐二烯、萜烯、 $\alpha$ -金合欢烯、 $\beta$ -金合欢烯、金合欢醇、香叶醇、香叶基香叶醇、芳樟醇、柠檬烯、月桂烯、橙花叔醇、罗勒烯、广藿香醇、 $\beta$ -蒎烯、桉烯、 $\gamma$ -萜品烯、异松香烯和瓦伦西亚桔烯。

[0019] 在另一方面,提供用于产生类异戊二烯的方法,包括:在适于产生类异戊二烯前体的培养条件下培养任何本文所公开方面中所描述的宿主细胞;以及产生类异戊二烯。在一个方面,该方法还包括回收类异戊二烯。

[0020] 在一个方面,本发明提供能够增加甲羟戊酸的产量的重组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中与不包含来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较高质量产率的甲羟戊酸。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方

面,来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8的核酸。在一个方面,可将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子的控制下或置于组成型启动子的控制下。在一个方面,将该一种或多种异源核酸进行密码子优化。在一些方面,将该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,将该一种或多种异源核酸整合进细胞(例如细菌细胞)的染色体中。在一个方面,该细胞是为革兰氏阳性细胞或革兰氏阴性细胞的细菌细胞。在另一方面,该细胞是细菌细胞,该细菌细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌(*Pantoea citrea*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)、耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、白色链霉菌(*Streptomyces albus*)、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)、假单胞菌属物种(*Pseudomonas* sp.)和产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)细胞。在另一方面,该细菌细胞为大肠杆菌细胞。

[0021] 在另一方面,本发明提供能够增加甲羟戊酸的产量的重组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中与不包含来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较高峰值滴度(peak titer)的甲羟戊酸。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8的核酸。在一个方面,可将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子的控制下或置于组成型启动子的控制下。在一个方面,该一种或多种异源核酸是经密码子优化的。在一些方面,该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞(例如细菌细胞)的染色体中。在一个方面,该细胞是为革兰氏阳性细胞或革兰氏阴性细胞的细菌细胞。在另一方面,该细胞是细菌细胞,该细菌细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆

菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在另一方面,该细菌细胞为大肠杆菌细胞。

[0022] 在另一方面,本发明提供能够增加甲羟戊酸的产量的重组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中与不包含来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞具有较高细胞生产力指数(cell productivity index)(CPI)。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8的核酸。在一个方面,可将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子的控制下或置于组成型启动子的控制下。在一个方面,该一种或多种异源核酸经密码子优化。在一些方面,该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞(例如细菌细胞)的染色体中。在一个方面,该细胞是为革兰氏阳性细胞或革兰氏阴性细胞的细菌细胞。在另一方面,该细胞是细菌细胞,该细菌细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在另一方面,该细菌细胞为大肠杆菌细胞。

[0023] 在另一方面,本发明提供能够增加甲羟戊酸的产量的重组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中与不包含来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较高质量产率的甲羟戊酸。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8

的核酸。在一个方面,可将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子的控制下或置于组成型启动子的控制下。在一个方面,该一种或多种异源核酸经密码子优化。在一些方面,该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞(例如细菌细胞)的染色体中。在一个方面,该细胞是为革兰氏阳性细胞或革兰氏阴性细胞的细菌细胞。在另一方面,该细胞是细菌细胞,该细菌细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在另一方面,该细菌细胞为大肠杆菌细胞。

[0024] 在另一方面,本发明提供增加甲羟戊酸的产量的方法,该方法包括:(a)培养包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸的细胞:(i)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(ii)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(iii)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(iv)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽;以及(b)产生甲羟戊酸。在一些方面,该方法还包括回收甲羟戊酸的步骤。在一些方面,在34℃下培养该细胞。在一些方面,在低至中等拷贝质粒上表达一种或多种异源核酸。在一些方面,该一种或多种异源核酸处于强启动子的控制下。

[0025] 在另一方面,本发明提供能够增加异戊二烯的产量的重组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含(i)一种或多种编码MVA下游途径的多肽的异源核酸;和(ii)编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较大量的异戊二烯。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8的核酸。在一个方面,该一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸经密码子优化:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因。在一个方面,该MVA下游途径的多肽包含选自如下的酶:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊烯焦磷酸的酶。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶

多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。在另一方面,该异戊二烯合酶多肽为植物异戊二烯合酶多肽。在一个方面,该异戊二烯合酶多肽为来自葛属(*Pueraria*)或杨属(*Populus*)或杂种银白杨(*Populus alba*)x欧洲山杨(*Populus tremula*)的多肽。在另一方面,该异戊二烯合酶多肽选自山葛(*Pueraria montana*)或野葛(*Pueraria lobata*)、美洲山杨(*Populus tremuloides*)、银白杨、黑杨(*Populus nigra*)和毛果杨(*Populus trichocarpa*)。在另一方面,植物异戊二烯合酶多肽为葛(kudzu)异戊二烯合酶多肽。在一个方面该细胞(例如细菌细胞)还包含一种或多种编码异戊二烯二磷酸 $\delta$ -异构酶(IDI)多肽的核酸。在另一方面,编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的异源核酸。在另一方面,IDI多肽为酵母IDI多肽。在一个方面,编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的内源核酸拷贝。在另一方面,将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子或组成型启动子的控制下。在一些方面,该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞的染色体中。在又一个方面,该细胞为革兰氏阳性细菌细胞或革兰氏阴性细菌细胞。在其他方面,该细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在另一方面,该细胞为大肠杆菌。

[0026] 在另一方面,本发明提供能够增加异戊二烯的产量的重组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含(i)一种或多种编码MVA下游途径的多肽的异源核酸;(ii)编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸;和(iii)一种或多种编码DXP途径的多肽的异源核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较大量的异戊二烯。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8的核酸。在一个方面,该一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸经密码子优化:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因。在一个方面该MVA下游途径的多肽包含选自如下的酶:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊二烯焦磷酸的酶。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、乳杆菌甲羟戊酸激酶

多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。在另一方面,该异戊二烯合酶多肽为植物异戊二烯合酶多肽。在一个方面,该异戊二烯合酶多肽为来自葛属或杨属或杂种银白杨x欧洲山杨的多肽。在另一方面,该异戊二烯合酶多肽选自山葛或野葛、美洲山杨、银白杨、黑杨和毛果杨。在另一方面,植物异戊二烯合酶多肽为葛异戊二烯合酶多肽。在一个方面该细胞(例如细菌细胞)还包含一种或多种编码异戊烯二磷酸 $\delta$ -异构酶(IDI)多肽的核酸。在另一方面,编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的异源核酸。在另一方面,IDI多肽为酵母IDI多肽。在一个方面,编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的内源核酸拷贝。在一个方面该DXP途径的多肽包含选自如下的酶:(a)将丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸转化为1-脱氧-d-木酮糖-5-磷酸(DXP)的酶;(b)将1-脱氧-d-木酮糖-5-磷酸(DXP)转化为2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)的酶;(c)将2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)转化为4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-甲基-D-赤藓醇(CDP-ME)的酶;(d)将4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-ME)转化为2-二磷酸-4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-MEP)的酶;(e)将2-磷酸-4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-MEP)转化为2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸(ME-CPP或cMEPP)的酶。(f)将2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸转化为(E)-4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸(HMBPP或HDMAPP)的酶。和(g)将(E)-4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸转化为异戊烯二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)的酶。在另一方面,将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子或组成型启动子的控制下。在一些方面,该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞的染色体中。在又一个方面,该细胞为革兰氏阳性细菌细胞或革兰氏阴性细菌细胞。在其他方面,该细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在另一方面,该细胞为大肠杆菌。

[0027] 在另一方面,本发明提供增加异戊二烯的产量的方法,该方法包括:(a)培养包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸的细胞(例如细菌细胞):(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鹑肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含(i)一种或多种编码MVA下游途径的多肽的异源核酸;和(ii)编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较大量的异戊二烯。在一些方面,该细胞还包含一种或多种编码DXP途径的多肽的异源核酸。在一些方面,该方法还包括回收异戊二烯的步骤。在一些方面,在34℃下培养该细胞。在一些方面,在染色体外质粒上表达该一种或多种异源核酸。在一些方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞的染色体(例如细菌细胞染色体)中。

[0028] 在另一方面,本发明提供能够增加类异戊二烯前体和/或类异戊二烯的产量的重

组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含(i)一种或多种编码MVA下游途径的多肽的异源核酸;和(ii)编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生至少较大量的类异戊二烯和/或类异戊二烯前体。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鹌鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8的核酸。在一个方面,该一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸经密码子优化:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因。在另一方面,将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子或组成型启动子的控制下。在一些方面,该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞的染色体中。在又一个方面,该细胞为革兰氏阳性细菌细胞或革兰氏阴性细菌细胞。在其他方面,该细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在另一方面,该细胞为大肠杆菌。在一个方面,该MVA下游途径的多肽包含选自如下的酶:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊烯焦磷酸的酶。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。在另一方面,该聚丙烯焦磷酸合酶多肽包含法尼基焦磷酸(FPP)合酶。在另一方面,类异戊二烯选自单萜、二萜、三萜、四萜、倍半萜和多萜。在其他方面,类异戊二烯为倍半萜。在一些方面,类异戊二烯选自松香二烯、紫穗槐二烯(amorphadiene)、薷烯、 $\alpha$ -金合欢烯、 $\beta$ -金合欢烯、金合欢醇、香叶醇、香叶基香叶醇、芳樟醇、柠檬烯、月桂烯、橙花叔醇、罗勒烯、广藿香醇、 $\beta$ -蒎烯、桉烯、 $\gamma$ -萜品烯、异松香烯(terpindene)和瓦伦西亚桔烯(valencene)。

[0029] 在另一方面,本发明提供能够增加类异戊二烯前体和/或类异戊二烯的产量的重组细胞(例如细菌细胞),该细胞包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;

(c)来自鸚鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含(i)一种或多种编码MVA下游途径的多肽的异源核酸;(ii)编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸;和(iii)一种或多种编码DXP途径的多肽的异源核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较大的异戊二烯。在一个方面,来自格氏李斯特菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:1的核酸。在另一方面,来自格氏李斯特菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:2的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:3的核酸。在另一方面,来自屎肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:4的核酸。在另一方面,来自鸚鸡肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:5的核酸。在另一方面,来自鸚鸡肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:6的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaE基因包含对应SEQ ID NO:7的核酸。在另一方面,来自铅黄肠球菌的mvaS基因包含对应SEQ ID NO:8的核酸。在一个方面,该一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸经密码子优化:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鸚鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因。在一个方面该MVA下游途径的多肽包含选自如下的酶:(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸的酶;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊烯焦磷酸的酶。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶选自马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。在另一方面,该聚丙烯焦磷酸合酶多肽包含法尼基焦磷酸(FPP)合酶。在一个方面该细胞(例如细菌细胞)还包含一种或多种编码异戊烯二磷酸 $\delta$ -异构酶(IDI)多肽的核酸。在另一方面,编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的异源核酸。在另一方面,IDI多肽为酵母IDI多肽。在一个方面,编码IDI多肽的核酸为编码IDI多肽的内源核酸拷贝。在一个方面该DXP途径的多肽包含选自如下的酶:(a)将丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸转化为1-脱氧-d-木酮糖-5-磷酸(DXP)的酶;(b)将1-脱氧-d-木酮糖-5-磷酸(DXP)转化为2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)的酶;(c)将2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)转化为4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-甲基-D-赤藓醇(CDP-ME)的酶;(d)将4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-甲基-D-赤藓醇(CDP-ME)转化为2-二磷酸-4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-MEP)的酶;(e)将2-磷酸-4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-MEP)转化为2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸(ME-CPP或cMEPP)的酶。(f)将2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸转化为(E)-4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸(HMBPP或HDMAPP)的酶。和(g)将(E)-4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸转化为异戊烯二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)的酶。在另一方面,将一种或多种异源核酸置于诱导型启动子或组成型启动子的控制下。在一些方面,该一种或多种异源核酸克隆进多拷贝质粒中。在另一方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞的染色体中。在又一个方面,该细胞为革兰氏阳性细菌细胞或革兰氏阴性细菌细胞。在其他方面,该细胞选自大肠杆菌、柠檬泛菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、

解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、白色链霉菌、变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌、假单胞菌属物种和产碱假单胞菌细胞。在另一方面,该细胞为大肠杆菌。

[0030] 在另一方面,本发明提供增加类异戊二烯和/或类异戊二烯前体分子的产量的方法,该方法包括:(a)培养包含一种或多种包含选自如下的核苷酸序列的异源核酸的细胞:(a)来自格氏李斯特菌的mvaE基因和mvaS基因;(b)来自屎肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;(c)来自鹌鸡肠球菌的mvaE基因和mvaS基因;和(d)来自铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因,其中该mvaE基因和mvaS基因编码具有硫解酶、HMG-CoA合酶和HMG-CoA还原酶催化活性的多肽,并且其中该细胞还包含(i)一种或多种编码MVA下游途径的多肽的异源核酸;和(ii)编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸,其中与不包含所述mvaE基因和mvaS基因的产类异戊二烯和/或类异戊二烯前体分子的细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞产生较大量的类异戊二烯和/或类异戊二烯前体分子。在一些方面,该细胞还包含一种或多种编码DXP途径的多肽的异源核酸。在一些方面,该方法还包括回收类异戊二烯和/或类异戊二烯前体分子的步骤。在一些方面,在34℃下培养该细胞。在一些方面,在染色体外质粒上表达该一种或多种异源核酸。在一些方面,该一种或多种异源核酸整合进细胞染色体(例如细菌细胞染色体)中。

[0031] 在另一方面,本发明提供能够增加甲羟戊酸的产量的重组宿主(如细菌)细胞,其中该细胞包含来自如下生物体中的一者的降解抗性mvaE基因产物:鹌鸡肠球菌、屎肠球菌、铅黄肠球菌或格氏李斯特菌。

[0032] 在另一方面,本发明提供能够增加异戊二烯的产量的重组宿主(如细菌)细胞,其中该细胞包含来自如下生物体中的一者的降解抗性mvaE基因产物:产生异戊二烯的鹌鸡肠球菌、屎肠球菌、铅黄肠球菌或格氏李斯特菌。

[0033] 在另一方面,本发明提供能够增加类异戊二烯的产量的重组宿主(如细菌)细胞,其中该细胞包含来自如下生物体中的一者的降解抗性mvaE基因产物:产生类异戊二烯的鹌鸡肠球菌、屎肠球菌、铅黄肠球菌或格氏李斯特菌。

## 附图说明

[0034] 图1绘出了自葡萄糖产生甲羟戊酸的质量产率。误差条代表两次重复的标准偏差。

[0035] 图2绘出了pDW34的质粒图谱。

[0036] 图3绘出了在40小时时粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、鹌鸡肠球菌和铅黄肠球菌中的MVP浓度。

[0037] 图4绘出了随时间推移每个15L发酵中所实现的自葡萄糖产生异戊二烯的产率。使用鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌进行的所有运行(分别是三角形和正方形)均比使用粪肠球菌上游途径酶的两个运行(空心菱形和实心菱形)实现更高的自葡萄糖产生异戊二烯的%产率。从葡萄糖产生的%重量产率计算为异戊二烯总量(t)/[(料Wt(0)-料Wt(t)+83.5)\*0.59],其中0.59为葡萄糖料液中葡萄糖的重量百分比,83.5为在t=0时分批供料进发酵罐中的该进料的克数。独立地对每次进料测量其重量%。

[0038] 图5绘出了随时间推移每个15L发酵中所实现的体积生产率(volumetric productivity)。使用鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌进行的所有运行(分别是三角形和正方形)

均比使用粪肠球菌上游途径酶的两个运行(空心菱形和实心菱形)实现更高的总体积生产率。使用下式计算体积生产率:体积生产率(g/L/hr)=[ $\Sigma$ (HGER(t)/1000\*68.117)]/[t-t<sub>0</sub>],其中求和是从t<sub>0</sub>到t。未纳入罐的周转时间。

[0039] 图6绘出了随时间推移每个15L发酵中所实现的比生产率(specific productivity)。使用鸢鸡肠球菌或铅黄肠球菌进行的所有运行(分别是三角形和正方形)均比使用粪肠球菌上游途径酶的两个运行(空心菱形和实心菱形)实现更高的峰值比生产率。使用下式计算比生产率:比生产率(mg/L/hr/OD)=HGER\*68.117g/mol/OD。HGER为异戊二烯放出速率,单位为(mmol/L/hr)。OD=光密度=550nm下的吸光度\*在水中的稀释因子。

[0040] 图7绘出了以小规模进行的工程化大肠杆菌菌株的生长和异戊二烯生产率,该菌株表达大肠杆菌染色体上的布氏拟甲烷球菌甲羟戊酸激酶或马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。

[0041] 图8绘出了大肠杆菌15L发酵物中马氏甲烷八叠球菌和布氏拟甲烷球菌甲羟戊酸激酶的表达。

[0042] 图9绘出了蛋白质印迹,其中显现了来自菌株DW326的MvaE。泳道1-基准标记;泳道2-0.4ug的纯化MvaE;泳道3-7,来自用0、25、50、100、200μM IPTG诱导的菌株DW326的溶胞产物样品。

[0043] 图10绘出了用Safestain染色的SDS-PAGE凝胶,其含有:泳道1-基准标记;泳道2-15-从镍柱洗脱的MvaE蛋白级分的His标签介导的纯化。

## 具体实施方式

[0044] 微生物细胞例如细菌细胞是广泛使用的用于产生重组蛋白的宿主。它们还可用于产生其他产物,例如甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体分子和类异戊二烯。本发明尤其提供利用异源表达由来自微生物格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鸢鸡肠球菌EG2和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因编码的多肽的细胞(例如细菌细胞),产生增加产率和滴度的甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体分子和类异戊二烯的组合物和方法。

[0045] 甲羟戊酸依赖性生物合成途径对于类异戊二烯前体分子甲羟戊酸(MVA)、二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)和异戊烯焦磷酸(IPP)的产生特别重要。甲羟戊酸上游途径的酶经由三个酶促反应将从葡萄糖产生的乙酰辅酶A转化成甲羟戊酸。来自上述细菌物种的mvaE基因和mvaS基因一起编码具有甲羟戊酸上游途径的酶活性的多肽。不受理论的束缚,据信增加上游甲羟戊酸依赖性生物合成途径中的这三种酶活性的效率和生产率将大幅度增加甲羟戊酸的细胞内浓度,并因此增加下游类异戊二烯前体分子例如DMAPP和IPP的细胞内浓度。这些菌株产生的甲羟戊酸的产率增加因此对于商业应用是有利的。

[0046] 此前已将一不同细菌物种即粪肠球菌的mvaE和mvaS基因整合进大肠杆菌菌株中以产生甲羟戊酸(参见美国专利申请公开No.2005/0287655A1;Tabata,K.和Hashimoto,S.-I.Biotechnology Letters(《生物技术快讯》)26:1487-1491,2004)。然而,本发明人已观察到在表达来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鸢鸡肠球菌和铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞)中所产生的甲羟戊酸的质量产率大于含有来自粪肠球菌的mvaE和mvaS基因的大肠杆菌菌株所产生的甲羟戊酸的质量产率。本申请的组合物和方法因而较于此前已在本领域中实践的组合物和方法体现了在可用于增加甲羟戊酸的产量的微生物菌株的

数目以及在由这些细胞(例如细菌细胞)产生的甲羟戊酸的量这两个方面的改善。

[0047] 通用技术

[0048] 除非另外指明,否则对本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学领域的常规技术,这些技术均为本领域的现有技术。这些技术在以下文献中有完整解释:“Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)”,第二版(Sambrook等人,1989);“Oligonucleotide Synthesis(《寡核苷酸合成》)”(M.J.Gait编辑,1984);“Animal Cell Culture(《动物细胞培养》)”(R.I.Freshney编辑,1987);“Methods in Enzymology(《酶学方法》)”(美国学术出版社(Academic Press,Inc.));“Current Protocols in Molecular Biology(《现代分子生物学实验技术》)”(F.M.Ausubel等人编辑,1987,以及定期更新版本);“PCR:The Polymerase Chain Reaction(《PCR:聚合酶链反应》)”,(Mullis等人编辑,1994)。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.(《微生物学和分子生物学词典第二版》),约翰威立父子出版公司(J.Wiley&Sons)(纽约1994)以及March,Advanced Organic Chemistry Reactions,Mechanisms and Structure 4th ed.(《高级有机化学反应、机理和结构,第四版》),约翰威立父子出版公司(纽约1992),为本领域技术人员提供了关于本申请中所用的许多术语的一般性指导。

[0049] 定义

[0050] 术语“异戊二烯”是指2-甲基-1,3-丁二烯(CAS#78-79-5)。其可以是由3,3-二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)消除焦磷酸所得的直接和最终的挥发性C5烃产物。其可能不涉及IPP分子与DMAPP分子的连接或聚合。除非本文中另外指明,否则术语“异戊二烯”通常不旨在受其产生方法的限制。

[0051] 如本文所用,术语“多肽”包括多肽、蛋白质、肽、多肽片段和融合多肽。

[0052] 如本文所用,“分离的多肽”不是多肽文库(如2种、5种、10种、20种、50种或更多种不同多肽的文库)的一部分,并且与和其一起存在于自然界中的至少一种组分分离。分离的多肽可例如通过编码该多肽的重组核酸的表达来获得。

[0053] 所谓“异源多肽”意指由衍生自其他生物体、物种或菌株而非宿主细胞的核酸序列编码的多肽。在一些实施例中,异源多肽不同于存在于自然界中相同宿主细胞内的野生型多肽。

[0054] 如本文所使用,“核酸”是指单股或双股形式的共价连接在一起的两个或更多个脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸。

[0055] 所谓“重组核酸”意指这样的所关注核酸,其缺少在该所关注核酸旁的、所关注核酸所源自的有机体的天然存在的基因组中的一种或多种核酸(例如基因)。因此,该术语包括(例如)掺入载体中、掺入自主复制型质粒或病毒中或掺入原核生物或真核生物的基因组DNA中,或者独立于其他序列作为单独的分子(例如,cDNA、基因组DNA片段或通过PCR或限制性核酸内切酶消化产生的cDNA片段)存在的重组DNA。

[0056] 所谓“异源核酸”意指衍生自其他生物体、物种或菌株而非宿主细胞的核酸序列。在一些实施例中,异源核酸不同于存在于自然界中的相同宿主细胞内存在的野生型核酸。例如,转化或整合进大肠杆菌的染色体中的由来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因编码的核酸是异源核酸。

[0057] 如本文所用,“表达控制序列”意指引导所关注核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以为启动子(例如组成型或诱导型启动子)或增强子。表达控制序列可以是“天然的”或异源的。天然的表达控制序列衍生自与所表达基因相同的生物体、物种或株系。异源表达控制序列衍生自与所表达基因不同的生物体、物种或株系。“诱导型启动子”是在环境或发育调节下具有活性的启动子。

[0058] 所谓“有效连接的”意指核酸表达控制序列(例如启动子)与第二核酸序列之间的功能性连接,其中该表达控制序列引导对应于该第二序列的核酸的转录。

[0059] 如本文所用,术语“基础培养基”是指含有细胞生长所需的可能的最少营养物、通常不存在氨基酸的培养基。基本培养基通常含有:(1)用于细胞(例如细菌细胞)生长的碳源;(2)各种盐,其可因细胞物种(例如细菌细胞物种)和生长条件而变动;和(3)水。从简单的糖如葡萄糖到其他生物质的较复杂水解产物如酵母提取物,碳源可以有很大变化,如下文更详细论述的。盐通常提供必需元素如镁、氮、磷和硫以允许细胞合成蛋白质和核酸。基本培养基还可补充有选择剂,例如抗生素,以针对某些质粒的维持等进行选择。例如,如果微生物对某一抗生素例如氨苄青霉素或四环素具有抗性,则可将该抗生素添加至培养基以便防止缺乏该抗性的细胞生长。培养基可在必要时补充有其他化合物以选择所需的生理或生化特性,例如特定的氨基酸等。

[0060] 如本文所用,术语“类异戊二烯”是指数量大且多样的一类天然存在的一类有机化合物,其由两个或更多个烃单元构成,每个单元由以特定模式排列的五个碳原子组成。如本文所用,明确地将“异戊二烯”从“类异戊二烯”的定义中排除。

[0061] 如本文所用,术语“萜类化合物”是指数量大且多样的一类有机分子,该分子衍生自以多种方式组装和修饰并且根据组成员中所用的类异戊二烯单元的数目分组的五碳类异戊二烯单元。单萜类化合物具有一个类异戊二烯单元。单萜类化合物具有两个类异戊二烯单元。倍半萜类化合物具有三个类异戊二烯单元。二萜类化合物具有四个异戊二烯单元。二倍半萜类具有五个异戊二烯单元。三萜类化合物具有六个类异戊二烯单元。四萜类化合物具有八个类异戊二烯单元。多萜类化合物具有超过八个类异戊二烯单元。

[0062] 如本文所用,“类异戊二烯前体”是指生物体用于萜类化合物或类异戊二烯的生物合成的任何分子。类异戊二烯前体分子的非限制性例子包括例如甲羟戊酸(MVA)、异戊烯焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)。

[0063] 如本文所用,术语“质量产率”是指细胞(例如细菌细胞)所产生的产物的质量除以细胞(例如细菌细胞)所耗费的葡萄糖的质量乘以100。

[0064] 所谓“比生产率”,其意指细胞(例如细菌细胞)所产生的产物的质量除以产生产物的时间、细胞密度和培养物体积。

[0065] 所谓“滴度”,其意指细胞(例如细菌细胞)所产生的产物的质量除以培养物的体积。

[0066] 如本文所用,术语“细胞生产力指数(CPI)”是指细胞(例如细菌细胞)所产生的产物的质量除以培养物中产生的细胞(例如细菌细胞)的质量。

[0067] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域普通技术人员所一般理解的含义相同的含义。

[0068] 如本文所用,除非上下文另有明确说明,否则单数“一个”、“一种”和“该”包括复数

指代。

[0069] 在本说明书通篇中给出的每一最大数值限度旨在包括每一更低数值限度,就如同此类更低数值限度在本文中明确地写出一样。在本说明书通篇中给出的每一最小数值限度将包括每一更高数值限度,就如同此类上限值在本文中明确地写出一样。在本说明书通篇中给出的每一个数值范围将包括落入此类较宽数值范围内的每一个较窄数值范围,就如同此类较窄数值范围在本文中全部明确地写出一样。

[0070] 能够增加类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的产量的重组细胞(例如细菌细胞)

[0071] 甲羟戊酸依赖性生物合成途径(MVA途径)是所有高等真核生物和某些细菌中存在的代谢途径。除了对蛋白质异戊二烯化、细胞膜维持、蛋白质锚定和N-糖基化等各种各样的过程中所用的分子的产生是重要的外,甲羟戊酸途径还提供类异戊二烯前体分子MVA、DMAPP和IPP的主要来源,这些分子充当萜烯、萜类化合物、类异戊二烯和异戊二烯的生物合成的基础。

[0072] 在MVA途径的上游部分中,分子代谢期间所产生的乙酰辅酶A经由具有硫解酶、HMG-CoA还原酶和HMG-CoA合酶酶活性的多肽的作用转化为甲羟戊酸。首先,乙酰辅酶A经由硫解酶的作用转化为乙酰乙酰辅酶A。接着,乙酰乙酰辅酶A通过HMG-CoA合酶的酶促作用转化为3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)。该辅酶A衍生物通过HMG-CoA还原酶还原成甲羟戊酸,这是产生类异戊二烯的甲羟戊酸途径的限速步骤。甲羟戊酸然后经由甲羟戊酸激酶的作用转化为甲羟戊酸-5-磷酸,其随后通过磷酸甲羟戊酸激酶的酶活性转化为甲羟戊酸-5-焦磷酸。最后,通过酶甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶的活性由甲羟戊酸-5-焦磷酸形成IPP。

[0073] 编码mvaE和mvaS多肽的基因

[0074] 在格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和铅黄肠球菌中,mvaE基因编码同时具有硫解酶活性和HMG-CoA还原酶活性的多肽。事实上,mvaE基因产物代表存在于真细菌中的IPP生物合成的第一双功能酶和融合到另一种天然蛋白质上的HMG-CoA还原酶的第一例子(Hedl等人,J Bacteriol.(《细菌学杂志》)2002年4月;184(8):2116-2122)。另一方面,mvaS基因编码具有HMG-CoA合酶活性的多肽。

[0075] 因此,可对细胞(例如细菌(如大肠杆菌)细胞)进行工程改造以表达一种或多种来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因,以增加类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的产量、峰值滴度和细胞生产率。可以在多拷贝质粒上表达该一种或多种mvaE和mvaS基因。质粒可以是高拷贝质粒、低拷贝质粒或中等拷贝质粒。或者,该一种或多种mvaE和mvaS基因可整合进宿主细胞的染色体中。对于一种或多种mvaE和mvaS基因在质粒上或作为宿主细胞染色体的整合部分的两种异源表达而言,可以用诱导型启动子或组成型表达启动子驱动基因的表达。启动子可以是该一种或多种mvaE和mvaS基因的表达的强驱动子,可以是表达的弱驱动子,或可以是表达的中等驱动子。

[0076] 设想单独来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因或所述基因与编码来自MVA上游途径的蛋白质的一种或多种其他mvaE和mvaS基因相结合的多个选项在本发明范围内。因而,可以任何上文所述方式在细胞(例如细菌细胞)中表达表1中所设想的任何基因组合。

[0077] 表1:设想用于本发明的在宿主细胞中表达mvaE和mvaS基因的选项。

[0078]

|                       | 格氏李斯特菌<br><i>mvaE</i>                          | 屎肠球菌 <i>mvaE</i>                          | 鸢鸡肠球菌<br><i>mvaE</i>                          | 铅黄肠球菌<br><i>mvaE</i>                          |
|-----------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 格氏李斯特菌<br><i>mvaS</i> | 格氏李斯特菌<br><i>mvaE</i><br>格氏李斯特菌<br><i>mvaS</i> | 屎肠球菌 <i>mvaE</i><br>格氏李斯特菌<br><i>mvaS</i> | 鸢鸡肠球菌<br><i>mvaE</i><br>格氏李斯特菌<br><i>mvaS</i> | 铅黄肠球菌<br><i>mvaE</i><br>格氏李斯特菌<br><i>mvaS</i> |
| 屎肠球菌<br><i>mvaS</i>   | 格氏李斯特菌<br><i>mvaE</i><br>屎肠球菌 <i>mvaS</i>      | 屎肠球菌 <i>mvaE</i><br>屎肠球菌 <i>mvaS</i>      | 鸢鸡肠球菌<br><i>mvaE</i><br>屎肠球菌 <i>mvaS</i>      | 铅黄肠球菌<br><i>mvaE</i><br>屎肠球菌 <i>mvaS</i>      |
| 鸢鸡肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 格氏李斯特菌<br><i>mvaE</i><br>鸢鸡肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 屎肠球菌 <i>mvaE</i><br>鸢鸡肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 鸢鸡肠球菌<br><i>mvaE</i><br>鸢鸡肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 铅黄肠球菌<br><i>mvaE</i><br>鸢鸡肠球菌<br><i>mvaS</i>  |
| 铅黄肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 格氏李斯特菌<br><i>mvaE</i><br>铅黄肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 屎肠球菌 <i>mvaE</i><br>铅黄肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 鸢鸡肠球菌<br><i>mvaE</i><br>铅黄肠球菌<br><i>mvaS</i>  | 铅黄肠球菌<br><i>mvaE</i><br>铅黄肠球菌<br><i>mvaS</i>  |

[0079] 示例性的*mvaE*多肽和核酸

[0080] *mvaE*基因编码同时具有硫解酶活性和HMG-CoA还原酶活性的多肽。由*mvaE*基因编码的多肽的硫解酶活性将乙酰辅酶A转化为乙酰乙酰辅酶A,而该多肽的HMG-CoA还原酶活性将3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A转化为甲羟戊酸。示例性的*mvaE*多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然存在的多肽和核酸以及衍生自任何本文所述来源生物体的具有*mvaE*多肽的至少一种活性的突变多肽和核酸。

[0081] 突变*mvaE*多肽包括其中一个或多个氨基酸残基已经历氨基酸置换而仍保持*mvaE*多肽活性(即将乙酰辅酶A转化为乙酰乙酰辅酶A的能力以及将3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A转化为甲羟戊酸的能力)的那些。氨基酸置换可以是保守的或非保守的,并且此类置换的氨基酸残基可以为或不为由遗传密码编码的残基。标准的二十种氨基酸的“字母表”已经根据其侧链的相似性而划分成为化学家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯基丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯基丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有化学上相似的侧链的氨基酸残基替换(即,将具有碱性侧链的氨基酸替换为具有碱性侧链的另一种氨基酸)的置换。“非保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有化学上不同的侧链的氨基酸残基替换(即,将具有碱性侧链的氨基酸替换为具有芳族侧链的另一种氨基酸)的置换。

[0082] 可在*mvaE*多肽中引入氨基酸置换以改善该分子的功能性。例如,可将增加*mvaE*多肽对其底物的结合亲和力或改善其将乙酰辅酶A转化为乙酰乙酰辅酶A的能力和/或将3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A转化为甲羟戊酸的能力的氨基酸置换引入*mvaE*多肽中。在一些方面,突变*mvaE*多肽含有一个或多个保守氨基酸置换。

[0083] 在一个方面,不被降解或较不易降解的mvaE蛋白可用于产生甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体和/或类异戊二烯。可使用的不被降解或较不易降解的mvaE的基因产物的例子包括但不限于来自生物体屎肠球菌、鹌鸡肠球菌、铅黄肠球菌和格氏李斯特菌的那些。本领域技术人员可通过任何标准分子生物学技术在大肠杆菌BL21(DE3)中表达mvaE蛋白并且寻找片段的缺失。例如,可使用本文所述的检测方法在Hig标签介导的纯化后或当在产甲羟戊酸、异戊二烯或类异戊二烯的大肠杆菌BL21中表达时在Safestain染色的SDS-PAGE凝胶上鉴定片段的缺失。

[0084] 可将标准方法例如在Hedl等人(J Bacteriol.(《细菌学杂志》)2002年4月;184(8):2116-2122)中描述的那些方法通过测量乙酰乙酰辅酶A硫解酶以及HMG-CoA还原酶活性,用于确定多肽是否具有mvaE活性。在示例性的测定法中,通过分光光度计监测302nm下的吸光度变化来测量乙酰乙酰辅酶A硫解酶活性,该吸光度变化伴随着乙酰乙酰辅酶A的形成或硫解。测定乙酰乙酰辅酶A的合成的每个反应的标准测定法条件是1mM乙酰辅酶A、10mM MgCl<sub>2</sub>、50mM Tris, pH10.5,并且通过添加酶引发反应。测定法可采用200μl的终体积。对于该测定法,1个酶单位(eu)代表1分钟内合成或硫解1μmol的乙酰乙酰辅酶A。在另一示例性测定法中,HMG-CoA还原酶活性可在340nm下通过分光光度计根据NADP(H)的出现和消失来监测。对于测量以显示HMG-CoA还原脱酰基为甲羟戊酸的每个反应的标准测定条件为0.4mM NADPH、1.0mM(R,S)-HMG-CoA、100mM KCl和100mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH6.5。测定法采用200μl的终体积。通过添加酶引发反应。对于该测定法,1eu代表1分钟内周转1μmol的NADP(H)。这对应于0.5μmol的HMG-CoA或甲羟戊酸的周转。

[0085] 或者,甲羟戊酸在细胞(例如细菌细胞)中的产量可通过(不限于)气相色谱法(参见美国专利申请公开No.:US2005/0287655A1)或HPLC(参见美国专利申请No.:12/978,324)来测量。作为示例性测定法,可将培养物接种于容纳有补充有一种或多种抗生素的LB肉汤的摇管中并在34℃下以250rpm温育14小时。接着,可将培养物稀释进容纳有TM3培养基的孔板中至最终OD为0.2,该培养基补充有1%葡萄糖、0.1%酵母提取物和200μM IPTG。然后用Breath Easier膜(Diversified Biotech公司)密封该板并在摇动器/温育箱中以600rpm在34℃下温育24小时。然后将1mL的每份培养物以3,000×g离心5分钟。然后将上清液添加至20%硫酸并在冰上温育5分钟。然后将混合物以3000×g离心5分钟,收集上清液用于HPLC分析。通过与甲羟戊酸(西格玛公司(Sigma))的标准曲线进行比较来测定样品中甲羟戊酸的浓度。另外可通过根据本领域已知的任何方法进行葡萄糖氧化酶测定法测量葡萄糖浓度。利用HPLC,可通过将每份样品的折射率响应与通过运行已知浓度的多种含甲羟戊酸溶液所产生的校准曲线相比较来定量甲羟戊酸的水平。

[0086] 示例性的mvaE核酸包括编码具有mvaE多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性的mvaE多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然多肽和核酸以及衍生自任何本文所述来源生物体的突变多肽和核酸。示例性的mvaE核酸包括例如分离自格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2和/或铅黄肠球菌的mvaE核酸。由格氏李斯特菌DSM20601mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:1具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%序列同一性。在另一方面,由格氏李斯特菌DSM20601mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:1具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由屎肠球菌mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:3具有至

少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。在另一方面,由屎肠球菌mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:3具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由鹌鸡肠球菌EG2mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:5具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。在另一方面,由鹌鸡肠球菌EG2mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:5具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由铅黄肠球菌mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:7具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。在另一方面,由铅黄肠球菌mvaE基因编码的mvaE核酸可与SEQ ID NO:7具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。在任何本文方面中,MVA上游途径多肽可由与SEQ ID NO:1-8中的任一者具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%或80%序列同一性的核酸编码。在任何本文方面中,MVA上游途径多肽可由具有SEQ ID NO:1-8中的任一者的核酸编码。

[0087] 示例性的mvaE多肽包括具有mvaE多肽的至少一种活性的多肽片段、肽或融合多肽。示例性的mvaE多肽包括来自任何本文所述来源生物体的天然多肽以及衍生自任何本文所述来源生物体的突变多肽。示例性的mvaE多肽包括例如分离自格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2和/或铅黄肠球菌的mvaE多肽。由格氏李斯特菌DSM20601mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:11具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%序列同一性。在另一方面,由格氏李斯特菌DSM20601mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:11具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由屎肠球菌mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:13具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。在另一方面,由屎肠球菌mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:13具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由鹌鸡肠球菌EG2mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:9具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。在另一方面,由鹌鸡肠球菌EG2mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:9具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由铅黄肠球菌mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:15具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。在另一方面,由铅黄肠球菌mvaE基因编码的mvaE多肽可与SEQ ID NO:15具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。在任何本文方面中,MVA上游途径多肽可由与SEQ ID NO:9-16中的任一者具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%或80%序列同一性的多肽编码。在任何本文方面中,MVA上游途径多肽可由具有SEQ ID NO:9-16中的任一者的多肽编码。

[0088] mvaE核酸可在细胞(例如细菌细胞)中在多拷贝质粒上表达。质粒可以是高拷贝质粒、低拷贝质粒或中等拷贝质粒。或者,mvaE核酸可整合进宿主细胞的染色体中。对于mvaE核酸在质粒上或作为宿主细胞染色体的整合部分的两种异源表达而言,可以用诱导型启动子或组成型表达启动子驱动核酸的表达。启动子可以是mvaE核酸的表达的强驱动子,可以是表达的弱驱动子,或可以是表达的中等驱动子。

[0089] 示例性的mvaS多肽和核酸

[0090] mvaS基因编码具有HMG-CoA合酶活性的多肽。该多肽可将乙酰乙酰辅酶A转化为3-

羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)。示例性的mvaS多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然存在的多肽和核酸以及衍生自任何本文所述来源生物体的具有mvaS多肽的至少一种活性的突变多肽和核酸。

[0091] 突变mvaS多肽包括其中一个或多个氨基酸残基已经历氨基酸置换而仍保持mvaS多肽活性(即将乙酰乙酰辅酶A转化为3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A的能力)的那些。可在mvaS多肽中引入氨基酸置换以改善该分子的功能性。例如,可将增加mvaS多肽对其底物的结合亲和力或改善其将乙酰乙酰辅酶A转化为3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A的能力的氨基酸置换引入mvaS多肽中。在一些方面,突变mvaS多肽含有一个或多个保守氨基酸置换。

[0092] 可使用标准方法例如Quant等人(Biochem J. (《生物化学杂志》), 1989, 262:159-164)中所述的那些,通过测量HMG-CoA合酶活性,来确定多肽是否具有mvaS活性。在示例性的测定法中,HMG-CoA合酶活性可通过监测在303nm下的吸光度改变以分光光度法测量乙酰乙酰辅酶A的烯醇形式的消失来测定。可添加标准的1ml测定体系,该测定体系含有50mm-Tris/HCl, pH8.0、10mM-MgCl<sub>2</sub>和0.2mM-二巯基丁二醇, 30℃; 5mM-乙酰磷酸、10, M-乙酰乙酰辅酶A和5ul提取物样品,然后同时添加乙酰辅酶A(100uM)和10单位PTA。然后将HMG-CoA合酶活性测量为在添加乙酰辅酶之前和之后的速率差值。乙酰乙酰辅酶A在所用的条件(pH8.0, 10mM-MgCl<sub>2</sub>)下的吸收系数为 $12.2 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 。通过定义,1单位酶活性引起每分钟转化1umol乙酰乙酰辅酶A。

[0093] 或者,甲羟戊酸在细胞(例如细菌细胞)中的产量可通过(不限于)气相色谱法(参见美国专利申请公开No.: US2005/0287655A1, 将其内容以引用的方式全文并入本文)或HPLC(参见美国专利申请公开No.: 2011/0159557A1, 将其内容以引用的方式全文并入本文)来测量。作为示例性测定法,可将培养物接种于容纳有补充有一种或多种抗生素的LB肉汤的摇管中并在34℃下以250rpm温育14小时。接着,可将培养物稀释进容纳有TM3培养基的孔板中至最终OD为0.2,该培养基补充有1%葡萄糖、0.1%酵母提取物和200μM IPTG。然后用Breath Easier膜(Diversified Biotech公司)密封该板并在摇动器/温育箱中以600rpm在34℃下温育24小时。然后将1mL的每份培养物以 $3,000 \times g$ 离心5分钟。然后将上清液添加至20%硫酸并在冰上温育5分钟。然后将混合物以 $3000 \times g$ 离心5分钟,收集上清液用于HPLC分析。通过与甲羟戊酸(西格玛公司)的标准曲线进行比较来测定样品中甲羟戊酸的浓度。另外可通过根据本领域已知的任何方法进行葡萄糖氧化酶测定法测量葡萄糖浓度。利用HPLC,可通过将每份样品的折射率响应与通过运行已知浓度的多种含甲羟戊酸溶液所产生的校准曲线来定量甲羟戊酸的水平。

[0094] 示例性的mvaS核酸包括编码具有mvaS多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性的mvaS多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然多肽和核酸以及衍生自任何本文所述来源生物体的突变多肽和核酸。示例性的mvaS核酸包括例如分离自格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2和/或铅黄肠球菌的mvaS核酸。由格氏李斯特菌DSM20601mvaS基因编码的mvaS核酸可与SEQ ID NO:2具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由格氏李斯特菌DSM20601mvaS基因编码的mvaS核酸还可与SEQ ID NO:2具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由屎肠球菌mvaS基因编码的mvaS核酸可与SEQ ID NO:4具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由屎肠球菌

mvaS基因编码的mvaS核酸可与SEQ ID NO:4具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由鹌鸡肠球菌EG2mvaS基因编码的mvaS核酸可与SEQ ID NO:6具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由鹌鸡肠球菌EG2mvaS基因编码的mvaS核酸可与SEQ ID NO:6具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由铅黄肠球菌mvaS基因编码的mvaS核酸可与SEQ ID NO:8具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由铅黄肠球菌mvaS基因编码的mvaS核酸可与SEQ ID NO:8具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。

[0095] 示例性的mvaS多肽包括具有mvaS多肽的至少一种活性的多肽片段、肽或融合多肽。示例性的mvaS多肽包括来自任何本文所述来源生物体的天然多肽以及衍生自任何本文所述来源生物体的突变多肽。示例性的mvaS多肽包括例如分离自格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2和/或铅黄肠球菌的mvaS多肽。由格氏李斯特菌DSM20601mvaS基因编码的mvaS多肽可与SEQ ID NO:12具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由格氏李斯特菌DSM20601mvaS基因编码的mvaS多肽还可与SEQ ID NO:12具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由屎肠球菌mvaS基因编码的mvaS多肽可与SEQ ID NO:14具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由屎肠球菌mvaS基因编码的mvaS多肽可与SEQ ID NO:14具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由鹌鸡肠球菌EG2mvaS基因编码的mvaS多肽可与SEQ ID NO:10具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由鹌鸡肠球菌EG2mvaS基因编码的mvaS多肽可与SEQ ID NO:10具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。由铅黄肠球菌mvaS基因编码的mvaS多肽可与SEQ ID NO:16具有至少约99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%或85%序列同一性。由铅黄肠球菌mvaS基因编码的mvaS多肽可与SEQ ID NO:16具有至少约84%、83%、82%、81%或80%序列同一性。

[0096] mvaS核酸可在细胞(例如细菌细胞)中在多拷贝质粒上表达。质粒可以是高拷贝质粒、低拷贝质粒或中等拷贝质粒。或者,mvaS核酸可整合进宿主细胞的染色体中。对于mvaS核酸在质粒上或作为宿主细胞染色体的整合部分的两种异源表达而言,可以用诱导型启动子或组成型表达启动子驱动核酸的表达。启动子可以是mvaS核酸的表达的强驱动子,可以是表达的弱驱动子,或可以是表达的中等驱动子。

[0097] 示例性的宿主细胞

[0098] 本领域的技术人员将认识到,可对表达载体进行设计,以包含优化某些宿主菌株的基因表达的某些元件。此类优化元件包括但不限于复制起点、启动子和增强子。本文提及的载体和元件仅出于示例性目的进行描述,且不旨在缩小本发明的范围。

[0099] 可将可用于异源表达基因的任何微生物或其子代用于表达一种或多种来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因。可将可被制成异源表达基因的重组细胞用于表达一种或多种来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因。包括革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌在内的细菌细胞可用于表达上文所述的任何mvaE和mvaS基因。具体而言,mvaE和mvaS基因可在如下细胞中的任一者中表达:柠檬泛菌细胞、枯草芽孢杆菌细胞、地衣芽孢杆菌细胞、迟缓芽孢杆菌细胞、短芽孢杆菌细胞、嗜热脂肪芽孢杆菌细胞、嗜碱芽孢杆菌细胞、解淀粉芽孢杆菌细胞、克劳氏芽

孢杆菌细胞、耐盐芽孢杆菌细胞、巨大芽孢杆菌细胞、凝结芽孢杆菌细胞、环状芽孢杆菌细胞、灿烂芽孢杆菌细胞、苏云金芽孢杆菌细胞、白色链霉菌细胞、变铅青链霉菌细胞、天蓝色链霉菌细胞、灰色链霉菌细胞、假单胞菌属物种细胞和产碱假单胞菌细胞。另外，*mvaE*和*mvaS*基因可在任何乳杆菌属物种，例如乳酸乳杆菌或植物乳杆菌中表达。

[0100] 存在许多类型的可在本发明的组合物和方法中用作宿主细胞的厌氧细胞。在本发明的一个方面，在本文所述的任何组合物或方法中所述的细胞为专性厌氧细胞及其子代。专性厌氧菌在存在氧的条件下通常生长不良，或根本不生长。应当理解，可以存在少量的氧，也就是说，存在专性厌氧菌对低水平氧的一定耐受度。在一个方面，经工程改造以产生甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体和类异戊二烯的专性厌氧菌可作为本文所述的任何方法和/或组合物的宿主细胞，并在基本上无氧的条件下生长，其中氧的存在量对厌氧菌的生长、维持和/或发酵无害。

[0101] 在本发明的另一方面，在本文所述的任何组合物或方法中所述和/或所用的宿主细胞为兼性厌氧细胞及其子代。兼性厌氧菌可在存在氧时通过有氧呼吸（例如利用TCA循环）生成细胞ATP。然而，兼性厌氧菌也可在不存在氧的情况下生长。这与在存在较高氧含量下死亡或生长不良的专性厌氧菌形成对照。在一个方面，因此，兼性厌氧菌可作为本文提供的任何组合物和/或方法的宿主细胞，并可经工程改造以产生甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体和类异戊二烯。兼性厌氧宿主细胞可在基本上无氧的条件下生长，其中氧的存在量对厌氧菌的生长、维持和/或发酵无害，或者作为另外一种选择可在存在较高氧含量的情况下生长。

[0102] 宿主细胞另外可以为丝状真菌细胞及其子代。（参见例如Berka和Barnett, *Biotechnology Advances*（《《生物技术进展》》），(1989), 7(2):127-154）。在一些方面，丝状真菌细胞可以为如下任一者：长梗木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)、康宁木霉(*Trichoderma koningii*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、青霉属(*Penicillium*)物种、特异腐质霉(*Humicola insolens*)、柔毛腐质霉(*Humicola lanuginosa*)、灰腐质霉(*Humicola grisea*)、金孢子菌属(*Chrysosporium*)物种、*Chrysosporium lucknowense*、粘帚霉属(*Gliocladium*)物种、曲霉属(*Aspergillus*)物种（例如米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)、日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)或泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)）、镰刀霉属(*Fusarium*)物种（例如粉红镰刀菌(*Fusarium roseum*)、禾赤镰刀菌(*Fusarium gramineum*)、谷类镰刀菌(*Fusarium cerealis*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)或镶片镰刀菌(*Fusarium venenatum*)）、脉孢菌属(*Neurospora*)物种（例如粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)）、肉座菌属(*Hypocrea*)物种、毛霉属(*Mucor*)物种（例如米黑毛霉(*Mucor miehei*)）、根霉属(*Rhizopus*)物种或翘孢霉属(*Emmericella*)物种。在某些方面，真菌是构巢曲菌、泡盛曲霉、米曲霉、棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)、黑曲霉、日本曲霉、里氏木霉、绿色木霉、尖孢镰刀菌或茄腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)。在某些实施例，供本发明使用的质粒或质粒元件包括美国专利申请公开No. US2011/0045563中描述的那些，将其内容以引用的方式全文并入本文。

[0103] 宿主细胞也可以为酵母，例如酵母属(*Saccharomyces*)物种、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)物种、毕赤酵母属(*Pichia*)物种或假丝酵母属(*Candida*)物种。在

一些方面,酵母菌属物种为酿酒酵母(参见例如Romanos等人,Yeast(《酵母》),(1992),8(6):423-488,将其内容以引用的方式全文并入本文)。在某些实施例中,供本发明使用的质粒或质粒元件包括美国专利申请No.7,659,097和美国专利申请公开No.2011/0045563中描述的那些,将它们的内容以引用的方式全文并入本文。

[0104] 宿主细胞还可以为藻类物种,例如绿藻、红藻、灰藻(glaucophyte)、绿蜘蛛藻(chlorarachniophyte)、眼虫、色藻(chromista)或腰鞭毛虫类(dinoflagellates)。(参见例如Saunders和Warmbrodt,“Gene Expression in Algae and Fungi,Including Yeast(《藻类和真菌(包括酵母)中的基因表达》)”(1993),马里兰州贝尔茨维尔的美国国家农业图书馆(National Agricultural Library,Beltsville,MD),将它们的内容以引用的方式全文并入本文)。在某些实施例中,供本发明使用的质粒或质粒元件包括美国专利申请公开No.US2011/0045563中描述的那些,将其内容以引用的方式全文并入本文。在一些方面,宿主细胞为蓝细菌,例如基于形态学分类成以下任何组的蓝细菌:绿球藻目(Chlorococcales)、宽球藻目(Pleurocapsales)、颤藻目(Oscillatoriales)、念珠藻目(Nostocales)或真枝藻目(Stigonematales)(参见例如Lindberg等人,Metab.Eng.(《代谢工程》)),(2010)12(1):70-79)。在某些实施例中,供本发明使用的质粒或质粒元件包括如下专利文献中描述的那些:美国专利公开No.US2010/0297749;US2009/0282545和国际专利申请No.WO2011/034863,将它们的内容以引用的方式全文并入本文。

[0105] 在本文所述的组合物和方法中,大肠杆菌宿主细胞可用于表达一种或多种来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽。在一个方面,宿主细胞为能够产生甲羟戊酸的大肠埃希杆菌(大肠杆菌)菌株的重组细胞或其子代,其表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的核酸。该大肠杆菌宿主细胞可产生甲羟戊酸,所产生的甲羟戊酸的量、峰值滴度和细胞生产率高于缺少一种或多种异源表达的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的核酸的相同细胞的该量、峰值滴度和细胞生产率。此外,大肠杆菌中一种或多种异源表达的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的核酸可以是染色体拷贝(如整合进大肠杆菌染色体中)。在其他方面,该大肠杆菌细胞是在培养物中。

#### [0106] 示例性的细胞培养基

[0107] 如本文所用,术语“基本培养基”是指含有细胞生长可能所需的最少营养物的培养基,通常但并非总如此,不存在一种或多种氨基酸(如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种氨基酸)。基本培养基通常含有:(1)细胞(例如细菌)生长的碳源;(2)各种盐,其可因细胞(例如细菌)物种和生长条件而变动;和(3)水。从简单的糖如葡萄糖到其他生物质的较复杂水解产物如酵母提取物,碳源可以有很大变化,如下文更详细论述的。盐通常提供必需元素如镁、氮、磷和硫以允许细胞合成蛋白质和核酸。基本培养基还可补充有选择剂,例如抗生素,以针对某些质粒的维持等进行选择。例如,如果微生物对某一抗生素例如氨苄青霉素或四环素具有抗性,则可将该抗生素添加至培养基以便防止缺乏该抗性的细胞生长。培养基可在必要时补充有其他化合物以选择所需的生理或生化特性,例如特定的氨基酸等。

[0108] 任何基本培养基制剂均可用于培养宿主细胞。示例性的基本培养基制剂包括例如M9基本培养基和TM3基本培养基。每升M9基本培养基含有(1)200ml无菌M9盐(每升64g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.5g  $\text{NaCl}$ 和5.0g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ );(2)2ml1M  $\text{MgSO}_4$ (无菌);(3)20ml20% (重量/体积)葡萄糖(或其他碳源);和(4)100 $\mu$ l1M  $\text{CaCl}_2$ (无菌)。每升TM3基本培养基含有(1)13.6g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;(2)13.6g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;(3)2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;(4)2g柠檬酸一水合物;(5)0.3g柠檬酸铁铵;(6)3.2g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;(7)0.2g酵母提取物;和(8)1ml1000X痕量元素(Trace Elements)溶液;将pH调节至约6.8并将该溶液过滤灭菌。每升1000X痕量元素含有:(1)40g柠檬酸一水合物;(2)30g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;(3)10g  $\text{NaCl}$ ;(4)1g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;(4)1g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;(5)1g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;(6)100mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;(7)100mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;和(8)100mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;将pH调节至约3.0。

[0109] 另外的示例性基本培养基包含(1)磷酸钾 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、(2)硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、(3)柠檬酸一水合物 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、(4)柠檬酸铁铵 $\text{NH}_4\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、(5)酵母提取物(来自思宾格公司(biospringer))、(6)1000X改良痕量金属溶液(Modified Trace Metal Solution)、(7)硫酸50%重量/体积、(8)foamblast882(艾默罗德性能材料公司(Emerald Performance Materials)) and (9)宏量盐溶液(Macro Salts Solution)3.36ml。将所有组分一起添加并溶解于去离子 $\text{H}_2\text{O}$ 中,然后加热灭菌。冷却至室温后,用氢氧化铵(28%)将pH调节至7.0,然后定容。灭菌和pH调节后添加维生素溶液和壮观霉素。

[0110] 任何碳源均可用于培养宿主细胞。术语“碳源”是指一种或多种能够被宿主细胞或生物体代谢的含碳化合物。例如,用于培养宿主细胞的细胞培养基可包含任何适于维持活力或培养宿主细胞的碳源。在一些方面,碳源为碳水化合物(例如单糖、二糖、寡糖或多糖)或转化糖(如酶处理过的蔗糖糖浆)。

[0111] 在一些方面,碳源包含酵母提取物或酵母提取物的一种或多种组分。在一些方面,酵母提取物的浓度为0.1%(重量/体积)、0.09%(重量/体积)、0.08%(重量/体积)、0.07%(重量/体积)、0.06%(重量/体积)、0.05%(重量/体积)、0.04%(重量/体积)、0.03%(重量/体积)、0.02%(重量/体积)或0.01%(重量/体积)酵母提取物。在一些方面,碳源既包含酵母提取物(或其一种或多种组分)又包含另一碳源,例如葡萄糖。

[0112] 示例性的单糖包括葡萄糖和果糖;示例性的低聚糖包括乳糖和蔗糖,示例性的多糖包括淀粉和纤维素。示例性的碳水化合物包括C6糖(如果糖、甘露糖、半乳糖或葡萄糖)和C5糖(如木糖或阿拉伯糖)。

#### [0113] 示例性的细胞培养条件

[0114] 下文,例如在实例部分中描述了适于本发明重组细胞维持和生长的材料和方法。适于细胞(如细菌)培养物的维持和生长的其他材料和方法是本领域所熟知的。示例性的技术可见于国际公开No. W02009/076676、美国专利申请No. 12/335,071(美国公开No. 2009/0203102)、W02010/003007、美国专利公开No. 2010/0048964、W02009/132220、美国专利公开No. 2010/0003716;Manual of Methods for General Bacteriology(《普通细菌学方法手册》)Gerhardt等人编辑,华盛顿特区美国微生物协会(American Society for Microbiology, Washington, D.C.)(1994);或Brock,载于Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology(《生物技术:工业微生物学教材》),第二版(1989),马萨诸塞州桑德兰的Sinauer Associates公司(Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.)。在一些方面,将细胞在培养基中在允许由插入进宿主细胞中的核酸编码的一种或多种mvaE多肽、mvaS多肽、异戊二烯合酶DXP途径多肽(如DXS)、IDI多肽、MVA途径多肽或PGL多肽表达的条

件下培养。

[0115] 可将标准的细胞培养条件用于培养细胞(参见例如,W02004/033646及其中所引用的参考文献)。在一些方面,将细胞在适当的温度、气体混合物和pH下(例如在约20℃至约37℃、在约6%至约84%CO<sub>2</sub>和在约5至约9的pH下)培养和维持。在一些方面,在适当的细胞培养基中于35℃下培养细胞。在一些方面,发酵的pH范围为约pH5.0至约pH9.0(例如,约pH6.0至约pH8.0或约pH6.5至约7.0)。可根据宿主细胞的需求在有氧、缺氧或无氧条件下培养细胞。此外,可将更多具体的细胞培养条件用于培养细胞。例如,在一些实施例中,细胞(例如,细菌细胞(如大肠杆菌细胞))表达一种或多种在低至中等拷贝质粒中在强启动子的控制下的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸,并在34℃下培养。

[0116] 可使用的标准培养条件和发酵模式(如分批发酵、分批补料发酵或连续发酵)在如下专利文献中进行了描述:国际公开No. W02009/076676、美国专利申请No. 12/335,071(美国专利公开No. 2009/0203102)、W02010/003007、美国专利公开No. 2010/0048964、W02009/132220、美国专利公开No. 2010/0003716,将上面每一篇的内容以引用的方式全文并入本文。分批发酵和分批补料发酵是通用的并为本领域所熟知,其例子可在如下文献中找到: Brock, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*(《《生物技术:工业微生物学教材》》),第二版(1989)Sinauer Associates公司。

[0117] 在一些方面,将细胞在限制葡萄糖条件下培养。所谓“限制葡萄糖条件”意指添加的葡萄糖的量低于细胞消耗的葡萄糖的量或约细胞消耗的葡萄糖的量的105%(例如约100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%)。具体地讲,在具体的一段时间,添加至培养基的葡萄糖的量与细胞所消耗的葡萄糖的量大致相同。在一些方面,通过限制所添加的葡萄糖的量使得细胞以细胞培养基中的葡萄糖的量可支持的速率生长来控制细胞生长的速率。在一些方面,在培养细胞期间葡萄糖不积聚。在多个方面,将细胞在限制葡萄糖条件下培养超过或约1、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60或70小时。在多个方面,将细胞在限制葡萄糖条件下培养超过或约培养该细胞的总时长的5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、95或100%。虽然无意于受任何特定理论束缚,但据信限制葡萄糖条件可允许对细胞进行更有利的调节。

[0118] 在一些方面,将细胞(例如细菌细胞)进行分批培养。还可将细胞(例如细菌细胞)进行分批补料培养或连续培养。另外,可将细胞(例如细菌细胞)在基本培养基(包括但不限于任何上述基本培养基)中培养。基本培养基可还补充有1.0%(重量/体积)葡萄糖或任何其他六碳糖或更少。具体地讲,基本培养基可补充有1%(重量/体积)、0.9%(重量/体积)、0.8%(重量/体积)、0.7%(重量/体积)、0.6%(重量/体积)、0.5%(重量/体积)、0.4%(重量/体积)、0.3%(重量/体积)、0.2%(重量/体积)或0.1%(重量/体积)葡萄糖。另外,基本培养基可补充0.1%(重量/体积)或更少的酵母提取物。具体地讲,基本培养基可补充有0.1%(重量/体积)、0.09%(重量/体积)、0.08%(重量/体积)、0.07%(重量/体积)、0.06%(重量/体积)、0.05%(重量/体积)、0.04%(重量/体积)、0.03%(重量/体积)、0.02%(重量/体积)或0.01%(重量/体积)酵母提取物。或者,基本培养基可补充有1%(重量/体积)、0.9%(重量/体积)、0.8%(重量/体积)、0.7%(重量/体积)、0.6%(重量/体积)、0.5%(重量/体积)、0.4%(重量/体积)、0.3%(重量/体积)、0.2%(重量/体积)或0.1%(重量/体积)葡萄糖以及补充有0.1%(重量/体积)、

0.09%(重量/体积)、0.08%(重量/体积)、0.07%(重量/体积)、0.06%(重量/体积)、0.05%(重量/体积)、0.04%(重量/体积)、0.03%(重量/体积)、0.02%(重量/体积)或0.01%(重量/体积)酵母提取物。

[0119] 能够增加类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的产量的重组细胞(例如细菌细胞)

[0120] 本文所述的重组细胞(例如细菌细胞)具有产生类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的能力,所产生的类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的浓度高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的该浓度。在一个实施例中,本文所述的重组细胞(例如细菌细胞)具有产生甲羟戊酸的能力,所产生的甲羟戊酸浓度高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的该浓度,任选在基本培养基中培养时。在一些情况下,该一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸为整合进宿主细胞的染色体中的异源核酸。该细胞(例如细菌细胞)可产生大于约85mg/L/hr/OD的甲羟戊酸或另一类异戊二烯前体。或者,该细胞(例如细菌细胞)可产生大于约30mg/L/hr/OD、40mg/L/hr/OD、50mg/L/hr/OD、60mg/L/hr/OD、70mg/L/hr/OD、80mg/L/hr/OD、90mg/L/hr/OD、100mg/L/hr/OD、110mg/L/hr/OD、120mg/L/hr/OD、130mg/L/hr/OD、140mg/L/hr/OD、150mg/L/hr/OD、160mg/L/hr/OD、170mg/L/hr/OD、180mg/L/hr/OD、190mg/L/hr/OD或200mg/L/hr/OD的甲羟戊酸或另一类异戊二烯前体,包括这些数以及这些数之间的任何数值。

[0121] 本文所述的细胞(例如细菌细胞)产生类异戊二烯前体(如甲羟戊酸),所产生的类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的峰值滴度高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的该峰值滴度。在一个实施例中,本文所述的细胞(例如细菌细胞)产生甲羟戊酸,所产生的甲羟戊酸的峰值滴度高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的该峰值滴度,任选在基本培养基中培养时。在48小时发酵后,该细胞(例如细菌细胞)可产生高于约105g/L峰值滴度的甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体)。或者,在48小时发酵后,该细胞(例如细菌细胞)可产生高于约50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、210g/L、220g/L、230g/L、240g/L、250g/L、260g/L、270g/L、280g/L、290g/L、300g/L的峰值滴度的甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体),包括这些数以及这些数之间的任何数值。

[0122] 本文所述的细胞(例如细菌细胞)具有的细胞生产力指数(CPI)高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的CPI。本文所述的细胞(例如细菌细胞)具有的细胞生产力指数(CPI)高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的CPI,任选在基本培养基中培养时。对于甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体)该细胞(例如细菌细胞)可具有至少约4.5(g/g)的CPI。或者,对于甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体)该细胞(例如细菌细胞)可具有至少约1(g/g)、2(g/g)、3(g/g)、4(g/g)、5(g/g)、6(g/g)、7(g/g)、8(g/g)、9(g/g)、10(g/g)、11(g/g)、12(g/g)、13(g/g)、14(g/g)、15(g/g)、20(g/g)、25(g/g)或30(g/g)的CPI,包括这些数以

及这些数之间的任何数值。

[0123] 本文所述的细胞(例如细菌细胞)具有的从葡萄糖产生类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的质量产率高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的该质量产率。在一个实施例中,本文所述的细胞(例如细菌细胞)具有的从葡萄糖产生甲羟戊酸的质量产率高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的相同细胞的该质量产率。该细胞(例如细菌细胞)可产生的从葡萄糖产生甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体)的质量产率为至少约38%。或者,该细胞(例如细菌细胞)可产生的从葡萄糖产生甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体)的质量产量为至少约25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或55%,包括这些数以及这些数之间的任何数值。

[0124] 在一些方面,本文所述的细胞为产甲羟戊酸细胞。在一个方面,产甲羟戊酸细胞能够产生甲羟戊酸的野生型细胞。在另一方面,产甲羟戊酸细胞为经工程改造而含有一种或多种非天然的MVA上游途径多肽的非天然存在的细胞。

[0125] 用重组细胞(例如细菌细胞)来产生高含量的类异戊二烯前体(如甲羟戊酸)的方法

[0126] 本发明还提供的是产生类异戊二烯前体例如甲羟戊酸的方法。在一些方面,产生类异戊二烯前体的方法包括:(a)培养包含能产生类异戊二烯前体的重组细胞(包括任何本文所述的细菌细胞)或其子代的组合物;以及(b)产生类异戊二烯前体。在一些方面,产生类异戊二烯前体的方法包括在适于产生类异戊二烯前体的条件下培养任何本文所述的重组细胞、并让所述重组细胞产生类异戊二烯前体的步骤。在一些方面,产生类异戊二烯前体的方法还包括回收类异戊二烯前体的步骤。

[0127] 在一些方面,产生甲羟戊酸的方法包括:(a)培养包含能够产生甲羟戊酸的重组细菌细胞(包括任何上述的细菌细胞)或其子代的组合物;以及(b)产生甲羟戊酸。在一些方面,产生甲羟戊酸的方法包括在适于产生甲羟戊酸的条件下培养任何本文所述的重组细胞并让所述重组细胞产生甲羟戊酸的步骤。在一些方面,产生甲羟戊酸的方法还包括回收甲羟戊酸的步骤。

[0128] 产生甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体)的方法还可包括如下步骤:(a)培养不内源具有来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),任选在基本培养基中培养,其中该细胞异源表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体)。该细胞(例如细菌细胞)可产生甲羟戊酸(或另一类异戊二烯前体),所产生的浓度高于缺少一个或多个异源拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因的相同细胞的该浓度,任选当在基本培养基中培养所述细胞时。在一些情况下,该一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸为整合进宿主细胞的染色体中的异源核酸。

[0129] 用于产生类异戊二烯前体的本发明方法可产生大于约85mg/L/hr/OD的类异戊二烯前体。或者,类异戊二烯前体可以大于约30mg/L/hr/OD、40mg/L/hr/OD、50mg/L/hr/OD、

60mg/L/hr/OD、70mg/L/hr/OD、80mg/L/hr/OD、90mg/L/hr/OD、100mg/L/hr/OD、110mg/L/hr/OD、120mg/L/hr/OD、130mg/L/hr/OD、140mg/L/hr/OD、150mg/L/hr/OD、160mg/L/hr/OD、170mg/L/hr/OD、180mg/L/hr/OD、190mg/L/hr/OD或200mg/L/hr/OD的类异戊二烯前体的量产生,包括这些数以及这些数之间的任何数值。在一些方面,产生类异戊二烯前体的方法还包括回收类异戊二烯前体的步骤。

[0130] 产生甲羟戊酸的本发明方法可产生大于约85mg/L/hr/OD的甲羟戊酸。或者,甲羟戊酸可以大于约30mg/L/hr/OD、40mg/L/hr/OD、50mg/L/hr/OD、60mg/L/hr/OD、70mg/L/hr/OD、80mg/L/hr/OD、90mg/L/hr/OD、100mg/L/hr/OD、110mg/L/hr/OD、120mg/L/hr/OD、130mg/L/hr/OD、140mg/L/hr/OD、150mg/L/hr/OD、160mg/L/hr/OD、170mg/L/hr/OD、180mg/L/hr/OD、190mg/L/hr/OD或200mg/L/hr/OD的甲羟戊酸的量产生,包括这些数以及这些数之间的任何数值。在一些方面,产生甲羟戊酸的方法还包括回收甲羟戊酸的步骤。

[0131] 产生类异戊二烯前体的方法可包括如下步骤:(a)培养不内源具有来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生类异戊二烯前体,其中该细胞(例如细菌细胞)产生类异戊二烯前体,在48小时发酵后峰值滴度高于缺少一个或多个异源拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因的相同细胞的该峰值滴度。任选地,在基本培养基中培养上述细胞。

[0132] 在48小时发酵后用于产生类异戊二烯前体的本发明方法可产生大于约105g/L峰值滴度的类异戊二烯前体。或者,在48小时发酵后该细胞(例如细菌细胞)可产生大于约50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L或200g/L峰值滴度的类异戊二烯前体,包括这些数以及这些数之间的任何数值。在一些方面,产生类异戊二烯的方法前体还包括回收类异戊二烯前体的步骤。

[0133] 产生甲羟戊酸的方法可类似地包括如下步骤:(a)培养不内源具有来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),任选在基本培养基中培养,其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生甲羟戊酸,其中当在基本培养基中培养该细胞时,该细胞(例如细菌细胞)产生甲羟戊酸,在48小时发酵后峰值滴度高于缺少一个或多个异源拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因的相同细胞的该峰值滴度。

[0134] 在48小时发酵后用于产生甲羟戊酸的本发明方法可产生大于约105g/L峰值滴度的甲羟戊酸。或者,在48小时发酵后该细胞(例如细菌细胞)可产生大于约50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L或200g/L峰值滴度的甲羟戊酸,包括这些数以及这些数之间的任何数值。在一些方面,产生甲羟戊酸的方法还包括回收甲羟戊酸的步骤。

[0135] 产生类异戊二烯前体的方法可包括如下步骤:(a)培养不内源具有来自格氏李斯

特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生类异戊二烯前体,其中该细胞(例如细菌细胞)具有的针对类异戊二烯前体的CPI高于缺少一个或多个异源拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因的相同细胞的该CPI。任选地,在基本培养基中培养上述细胞。

[0136] 用于产生类异戊二烯前体的本发明方法可利用针对类异戊二烯前体的CPI为至少4.5(g/g)的细胞产生类异戊二烯前体。或者,该细胞(例如细菌细胞)可具有至少1(g/g)、2(g/g)、3(g/g)、4(g/g)、5(g/g)、6(g/g)、7(g/g)、8(g/g)、9(g/g)、10(g/g)、11(g/g)、12(g/g)、13(g/g)、14(g/g)、15(g/g)、20(g/g)、25(g/g)或30(g/g)的CPI,包括这些数以及这些数之间的任何数值。在一些方面,产生类异戊二烯前体的方法还包括回收类异戊二烯前体的步骤。

[0137] 产生甲羟戊酸的方法可类似地包括如下步骤:(a)培养不内源具有来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),任选在基本培养基中培养,其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生甲羟戊酸,其中当在基本培养基中培养细胞时,该细胞(例如细菌细胞)具有的针对甲羟戊酸的CPI高于缺少一个或多个异源拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因的相同细胞的该CPI。

[0138] 用于产生甲羟戊酸的本发明方法可利用针对甲羟戊酸的CPI为至少4.5(g/g)的细胞产生甲羟戊酸。或者,该细胞(例如细菌细胞)可具有至少1(g/g)、2(g/g)、3(g/g)、4(g/g)、5(g/g)、6(g/g)、7(g/g)、8(g/g)、9(g/g)、10(g/g)、11(g/g)、12(g/g)、13(g/g)、14(g/g)、15(g/g)、20(g/g)、25(g/g)或30(g/g)的CPI,包括这些数以及这些数之间的任何数值。在一些方面,产生甲羟戊酸的方法还包括回收甲羟戊酸的步骤。

[0139] 本发明提供的是使用任何上述细胞来增加甲羟戊酸产量和/或其他类异戊二烯前体的产量的方法。细胞的甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)的产量可通过一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的表达来增大。与不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)产量相比,甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)的产量可增大约1,000,000倍(如约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。

[0140] 根据任何本文所述方法的细胞的甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)产量可得到增大(如通过一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的表达来增大)。与天然存在的细胞(如不表达一种或多种编

码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞)的甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)的产量相比,甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)的产量可增大约1,000,000倍(如约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。

[0141] 与天然存在的细胞或不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)产量相比,该甲羟戊酸(或其他类异戊二烯前体)产量可增大至少约如下中的任一者:5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍或1,000,000倍。

[0142] 此外,可将更具体的细胞培养条件用于培养本文所述方法中的细胞。例如,在一些方面,用于产生甲羟戊酸的方法包括如下步骤:(a)在34℃下在基本培养基中培养不内源具有来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达在低至中等拷贝质粒上且处于强启动子控制下的一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生甲羟戊酸。在一些方面,产生甲羟戊酸的方法还包括回收甲羟戊酸的步骤。在其他方面,用于产生类异戊二烯前体的方法包括如下步骤:(a)在34℃下在基本培养基中培养不内源具有来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达在低至中等拷贝质粒上且处于强启动子控制下的一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生类异戊二烯前体。在一些方面,产生类异戊二烯前体的方法还包括回收类异戊二烯前体的步骤。

[0143] 能够增加异戊二烯的产量的重组细胞(例如细菌细胞)

[0144] 异戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)是在大量应用中使用的有机化合物。例如,异戊二烯在多种化学组合物和聚合物的合成中,包括在合成橡胶的制备中用作中间体或原料。异戊二烯还是由许多植物和动物天然合成的重要生物材料。

[0145] 异戊二烯通过异戊二烯合酶的酶促作用从DMAPP产生。因此,不受理论束缚,据认为通过任何上述组合物和方法增加细胞(例如细菌细胞)中类异戊二烯前体的细胞产量将类似地导致产生较高量的异戊二烯。当与甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、异戊烯二磷酸异构酶和用于异戊二烯和类异戊二烯产生的其他适当酶的适当酶活性水平组合时,增加从葡萄糖产生类异戊二烯前体的摩尔产率可转化成较高的从葡萄糖产生异戊二烯的摩尔产率。不受理论的束缚,据认为通过任何上述组合物和方法增加细胞(例如细菌细胞)中甲羟戊酸的细胞产量将类似地导致产生较高量的异戊二烯。当与甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、异戊烯二磷酸异构酶和用于异戊二烯和类异戊二烯产生的其他适当酶的适当酶活性水平组合时,增加从葡萄糖产生甲羟戊酸的

摩尔产率可转化成较高的从葡萄糖产生类异戊二烯前体和类异戊二烯(包括异戊二烯)的摩尔产率。

[0146] 任何上述能够增加甲羟戊酸或其他类异戊二烯前体的产量的、表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的重组宿主细胞也可能增加异戊二烯的产量。在一些方面,这些细胞还包含一种或多种编码MVA下游途径的多肽的异源核酸和编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸。在一些方面,这些细胞还包含一种或多种编码MVA下游途径的多肽的核酸和编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸。

[0147] 在一些方面,本文所述的细胞为产异戊二烯细胞。在一个方面,产异戊二烯细胞为能够产生异戊二烯的野生型细胞。在另一方面,产异戊二烯细胞为工程改造为含有一种或多种异源MVA上游途径多肽、MVA下游途径多肽、异戊二烯合酶多肽、DXP途径多肽和/或IDI多肽的非天然存在的细胞。在另外的方面,产异戊二烯细胞可既含有内源的又含有异源的MVA上游途径多肽、MVA下游途径多肽、异戊二烯合酶多肽、DXP途径多肽和/或IDI多肽。

[0148] 编码MVA下游途径的多肽的核酸

[0149] 在本发明的一些方面,任何本文所述组合物或方法中描述的细胞还一种或多种编码甲羟戊酸(MVA)下游途径多肽的核酸。在一些方面,MVA下游途径多肽为内源多肽。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的内源核酸有效连接至组成型启动子。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的内源核酸有效连接至诱导型启动子。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的内源核酸有效连接至强启动子。在一特定方面,对细胞进行工程改造以相对于野生型细胞过表达内源MVA下游途径多肽。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的内源核酸有效连接至弱启动子。

[0150] 甲羟戊酸下游生物合成途径包含甲羟戊酸激酶(MVK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)和二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD)。在一些方面,MVA下游途径可还包含异戊二烯二磷酸异构酶(IDI)。本文提供的细胞可包含至少一种编码异戊二烯合酶、一种或多种MVA上游途径多肽和/或一种或多种MVA下游途径多肽的核酸。MVA下游途径的多肽可以是(a)将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸;(b)将甲羟戊酸5-磷酸转化为甲羟戊酸5-焦磷酸;和(c)将甲羟戊酸5-焦磷酸转化为异戊二烯焦磷酸的任何酶。更具体而言,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶可来自:马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶、乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、拟甲烷球菌(Methanococcoides)甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽和链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽。在另一方面,将甲羟戊酸磷酸化为甲羟戊酸5-磷酸的酶为马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。

[0151] 在一些方面,MVA下游途径多肽为异源多肽。在一些方面,该细胞包含不止一个拷贝的编码MVA下游途径多肽的异源核酸。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的异源核酸有效连接至组成型启动子。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的异源核酸有效连接至诱导型启动子。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的异源核酸有效连接至强启动子。在一些方面,编码MVA下游途径多肽的异源核酸有效连接至弱启动子。在一些方面,异源MVA下游途径多肽为来自酿酒酵母、粪肠球菌、布氏拟甲烷球菌或马氏甲烷八叠球菌的多肽。在一些方面,异源MVA下游途径多肽为来自布氏拟甲烷球菌的甲羟戊酸激酶。

[0152] 编码MVA下游途径多肽的核酸可整合进细胞的基因组中或可在细胞中稳定表达。编码MVA下游途径多肽的核酸另外可位于载体上。

[0153] 还在下面提供了示例性的MVA下游途径多肽:(i)甲羟戊酸激酶(MVK);(ii)磷酸甲羟戊酸激酶(PMK);(iii)二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD);和(iv)异戊烯二磷酸异构酶(IDI)。具体地讲,下游MVK多肽可以来自甲烷八叠球菌属,并且更具体地讲,下游MVK多肽可以来自马氏甲烷八叠球菌。MVA下游途径多肽的另外的例子可见于美国专利申请公开2010/0086978,将上述专利公开关于MVK下游途径多肽和MVK下游途径多肽变体内容明确地以引用的方式全文并入本文。

[0154] 本文所述的细胞中的任一者可包含IDI核酸(如编码IDI的内源或异源核酸)。异戊烯二磷酸异构酶多肽(异戊烯基-二磷酸 $\delta$ -异构酶或IDI)催化异戊烯二磷酸(IPP)与二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)的相互转化(如将IPP转化为DMAPP和/或将DMAPP转化为IPP)。示例性的IDI多肽包括具有IDI多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。可使用标准方法(例如本文所述的那些)通过测定多肽在体外、在细胞提取物内或体内使IPP和DMAPP相互转化的能力来确定多肽是否具有IDI多肽活性。示例性的IDI核酸包括编码具有IDI多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性的IDI多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然多肽和核酸以及衍生自任何本文所述来源生物体的突变多肽和核酸。

[0155] MVA下游途径多肽包括具有MVA下游途径多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。示例性的MVA下游途径核酸包括编码具有MVA下游途径多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性的MVA下游途径多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然存在的多肽和核酸。此外,也还可使用能获得更好异戊二烯产量的MVA下游途径多肽的变体。

[0156] 在一些方面,MVA下游途径多肽是来自酿酒酵母、粪肠球菌或马氏甲烷八叠球菌的多肽。在一些方面,该MVK多肽选自乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、清酒乳杆菌甲羟戊酸激酶多肽、酵母甲羟戊酸激酶多肽、酿酒酵母甲羟戊酸激酶多肽、链球菌甲羟戊酸激酶多肽、肺炎链球菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌甲羟戊酸激酶多肽、链霉菌CL190甲羟戊酸激酶多肽和马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶多肽。本文所述启动子中的任一者(如本文所述的以及在本公开的实例中所鉴定的启动子,包括诱导型启动子和组成型启动子)均可用于驱动任何本文所述MVA多肽的表达。

[0157] 编码异戊二烯合酶多肽的核酸

[0158] 在本发明的一些方面,在任何本文所述组合物或方法中描述的细胞还包含一种或多种编码异戊二烯合酶多肽或具有异戊二烯合酶活性的多肽的核酸。在一些方面,异戊二烯合酶多肽为内源多肽。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的内源核酸有效连接至组成型启动子。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的内源核酸有效连接至诱导型启动子。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的内源核酸有效连接至强启动子。在一特定方面,对细胞进行工程改造以相对于野生型细胞过表达内源异戊二烯合酶途径多肽。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的内源核酸有效连接至弱启动子。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为来自葛属或杨属或杂种例如银白杨x欧洲山杨的多肽。

[0159] 在一些方面,异戊二烯合酶多肽为异源多肽。在一些方面,细胞包含不止一个拷贝

的编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸有效连接至组成型启动子。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸有效连接至诱导型启动子。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸有效连接至强启动子。在一些方面,编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸有效连接至弱启动子。

[0160] 编码异戊二烯合酶多肽的核酸可整合进宿主细胞的基因组,或者可在细胞中稳定表达。编码异戊二烯合酶多肽的核酸另外可位于载体上。

[0161] 示例性异戊二烯合酶核酸包括编码具有异戊二烯合酶多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。异戊二烯合酶多肽将二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)转化成异戊二烯。示例性的异戊二烯合酶多肽包括具有异戊二烯合酶多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。示例性的异戊二烯合酶多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然多肽和核酸。此外,异戊二烯合酶的变体可具有改善的活性例如改善的酶活性。在一些方面,异戊二烯合酶变体具有其他改善的特性,例如改善的稳定性(如热稳定性)和/或改善的溶解性。

[0162] 可使用标准的方法,通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将DMAPP转化为异戊二烯的能力,来测定该多肽是否具有异戊二烯合酶多肽活性。细胞提取物中的异戊二烯合酶多肽活性可例如按如下文献中所描述进行测量:Silver等人,J.Biol.Chem.(《生物化学杂志》)270:13010-13016,1995。在一个示例性的测定法中,可在氮气流下将DMAPP(西格玛公司)蒸发至干燥并在100mM磷酸钾缓冲液(pH8.2)中将其再水化至100mM的浓度,并保存于-20℃下。为了进行该测定法,可将5μL的1M MgCl<sub>2</sub>、1mM(250μg/ml)DMAPP、65μL的植物提取缓冲液(PEB)(50mM Tris-HCl,pH8.0,20mM MgCl<sub>2</sub>,5%甘油和2mM DTT)的溶液添加至20mL顶空小瓶中的25μL的细胞提取物中并在振动下于37℃培养15分钟,其中该小瓶具有金属旋盖和涂有特氟龙的硅隔膜(安捷伦科技公司(Agilent Technologies))。反应可通过加入200μL的250mM EDTA进行淬灭并通过GC/MS进行定量。

[0163] 在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为植物异戊二烯合酶多肽或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为来自葛属的异戊二烯合酶或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为来自杨属的异戊二烯合酶或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为白杨异戊二烯合酶多肽或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为葛异戊二烯合酶多肽或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为来自葛属或杨属或杂种银白杨x欧洲山杨的多肽或其变体。

[0164] 在一些方面,异戊二烯合酶多肽或核酸来自豆科(Fabaceae),例如蝶形花亚科(Faboideae)。在一些方面,异戊二烯合酶多肽或核酸为来自如下的多肽或核酸或其变体:山葛(葛)(Sharkey等人,Plant Physiology(《植物生理学》)137:700-712,2005)、野葛、白杨(例如银白杨、黑杨、毛果杨或银白杨x欧洲山杨(CAC35696)(Miller等人,Planta(《植物学》)213:483-487,2001)、山杨(例如美洲山杨)(Silver等人,JBC270(22):13010-1316,1995)、英国橡树(夏栎(*Quercus robur*))(Zimmer等人,W098/02550)。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为来自山葛、野葛、美洲山杨、银白杨、黑杨或毛果杨的异戊二烯合酶或其变体。在一些方面,该异戊二烯合酶多肽为来自银白杨的异戊二烯合酶或其变体。在一些方面,编码异戊二烯合酶(如来自银白杨的异戊二烯合酶或其变体)的核酸经密码子优化。

[0165] 在一些方面,异戊二烯合酶核酸或多肽为天然存在的多肽或核酸(如来自杨属的

天然存在的多肽或核酸)。在一些方面,异戊二烯合酶核酸或多肽不是野生型的或天然存在的多肽或核酸。在一些方面,异戊二烯合酶核酸或多肽是野生型或天然存在的多肽或核酸的变体(例如,来自杨属的野生型或天然存在的多肽或核酸的变体)。

[0166] 在一些方面,异戊二烯合酶多肽为变体。在一些方面,异戊二烯合酶多肽是野生型或天然存在的异戊二烯合酶的变体。在一些方面,变体与野生型或天然存在的异戊二烯合酶相比具有改善的活性,例如改善的催化活性。活性(如催化活性)的增加可为至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一者。在一些方面,诸如催化活性之类的活性的增加为至少约1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍或100倍中的任一者。在一些方面,诸如催化活性之类的活性的增加为约10%至约100倍(如,约20%至约100倍、约50%至约50倍、约1倍至约25倍、约2倍至约20倍或约5倍至约20倍)。在一些方面,变体与野生型或天然存在的异戊二烯合酶相比具有改善的溶解性。溶解性的增加可为至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一者。溶解性的增加可为至少约1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍或100倍中的任一者。在一些方面,溶解性的增加为约10%至约100倍(如,约20%至约100倍、约50%至约50倍、约1倍至约25倍、约2倍至约20倍或约5倍至约20倍)。在一些方面,异戊二烯合酶多肽为天然存在的异戊二烯合酶的变体,并与天然存在的异戊二烯合酶相比具有改善的稳定性(如热稳定性)。

[0167] 在一些方面,变体具有野生型或天然存在的异戊二烯合酶的活性的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约110%、至少约120%、至少约130%、至少约140%、至少约150%、至少约160%、至少约170%、至少约180%、至少约190%、至少约200%。变体可与野生型或天然存在的异戊二烯合酶具有序列相似性。在一些方面,野生型或天然存在的异戊二烯合酶的变体可与野生型或天然存在的异戊二烯合酶具有至少约40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%中的任一者的氨基酸序列同一性。在一些方面,野生型或天然存在的异戊二烯合酶的变体与野生型或天然存在的异戊二烯合酶具有约70%至约99.9%、约75%至约99%、约80%至约98%、约85%至约97%或约90%至约95%中的任一者的氨基酸序列同一性。

[0168] 在一些方面,变体在野生型或天然存在的异戊二烯合酶中包含突变。在一些方面,变体具有至少一个氨基酸置换、至少一个氨基酸插入和/或至少一个氨基酸缺失。在一些方面,变体具有至少一个氨基酸置换。在一些方面,变体与野生型或天然存在的异戊二烯合酶之间的不同氨基酸残基的数量可为一个或多个,例如1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50或更多个氨基酸残基。天然存在的异戊二烯合酶可包括来自植物的任何异戊二烯合酶,例如葛异戊二烯合酶、白杨异戊二烯合酶、英国栎异戊二烯合酶和柳树异戊二烯合酶。在一些方面,变体为来自银白杨的异戊二烯合酶的变体。在一些方面,来自银白杨的异戊二烯合酶的变体具有至少一个氨基酸置换、至少一个氨基酸插入和/或至少一个氨基酸缺失。在一些方面,变体为截短的银白杨异戊二烯合酶。在一些方面,编码变体(如来自银白杨的异戊二烯合酶的变体)的核酸经密码子优化(例如,基于在其中表达异源异戊二烯合酶的宿主细胞而进行密码子优化)。

[0169] 在一些方面,变体包含一个或多个(即2、3、4、5、6个等)来自下表(表2)的对应于银白杨的氨基酸序列的突变:

表 2: 银白杨(MEA)的异戊二烯合酶变体

|       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| A118E | E472R | S510V | K161K | A118P |
| S22K  | K463F | I342I | W392A | A118Q |
| S21R  | K463T | K348F | W392C | A118A |
| S22K  | R71K  | K348Y | W392F | E41M  |
| S22R  | R71L  | K348K | S288Y | G111S |
| E58L  | R71M  | C437L | M228Y | S74Q  |
| T481V | R71V  | T240C | A3T   | S74S  |
| T481Y | R71R  | M460M | W392Y | K36D  |
| T502F | K393L | R461A | W392W | S282H |
| T381L | F542L | H424P | F89D  | S282I |
| T381M | P538K | H424H | F89E  | S282W |
| T381Y | P538R | A448L | F89F  | S282Y |
| T383H | P538P | A448Q | E41Y  | S282S |
| T383L | A503A | A448V | E41E  | K36S  |
| E480I | L436I | G389D | R43E  | K36T  |
| E480R | L436Y | S444E | R43L  | K36W  |
| K393V | L436F | S444S | K36E  | K36Y  |
| K393I | E488L | H511Y | K36H  | K36K  |
| E415H | E488M | H511H | K36N  |       |
| E415V | E488T | R071I | K36P  |       |
| E415Y | E488W | R071K | K36Q  |       |
| R71H  | E488E | R071L | A453I |       |
| R71I  | I342Y | K374Y | A453V |       |
| E58Y  | C437M | K374K | A453A |       |

[0170]

|       |       |       |       |  |
|-------|-------|-------|-------|--|
| E135G | C437W | L526E | V409I |  |
| A363L | C437Y | L526Q | V409T |  |
| K374Y | C437C | L526L | K161C |  |
| T381I | M460A | R242G | K161E |  |
| L436L | I447T | R242R | K161N |  |
| H254R | I447V | A443G | K161Q |  |
| H254C | I447Y | A443Q | G99E  |  |
| E488C | S444D | A443R | G99G  |  |
| E488F | G389E | A443S | S288A |  |
| T383Y | L376I | S13S  | S288C |  |
| K414I | L376M | V268I | S288T |  |
| K414R | L376L | V268V | W392I |  |
| K414S | I504F | K161A | W392M |  |
| K414W | I504I | V409V | W392S |  |
| E472C | E467W | D323F | W392T |  |
| E472L | S510C | G99D  | W392V |  |

[0171]

[0172] 本文提供的异戊二烯合酶多肽可以是W02009/132220、W02010/124146和美国专利申请公开No.:2010/0086978中所述的任何异戊二烯合酶或异戊二烯合酶变体,将这些专利关于异戊二烯合酶和异戊二烯合酶变体的内容全文明确地以引用的方式明确地并入本文。

[0173] 本文所述启动子中的任一者(如本文所述的以及在本公开的实例中所鉴定的启动子,包括诱导型启动子和组成型启动子)均可用于驱动任何本文所述异戊二烯合酶的表达。

[0174] 合适的异戊二烯合酶包括但不限于Genbank登录号AY341431、AY316691、AY279379、AJ457070和AY182241所标示的那些。可用于本文所述的组合物或方法(包括制备编码异戊二烯合酶的微生物的方法)的任一者中的异戊二烯合酶的类型还在国际专利申请公布No.WO2009/076676、No.WO2010/003007、No.WO2009/132220、No.WO2010/031062、No.WO2010/031068、No.WO2010/031076、No.WO2010/013077、No.WO2010/031079、No.WO2010/148150、No.WO2010/124146、No.WO2010/078457和No.WO2010/148256描述。

#### [0175] 编码DXP途径多肽的核酸

[0176] 在本发明的一些方面,在任何本文所述组合物或方法中描述的细胞还包含一种或多种编码DXS多肽或其他DXP途径多肽的异源核酸。在一些方面,细胞还包含编码DXS多肽或其他DXP途径多肽的内源核酸的染色体拷贝。在一些方面,大肠杆菌细胞还包含一种或多种编码IDI多肽和DXS多肽或其他DXP途径多肽的核酸。在一些方面,一种核酸编码异戊二烯合酶多肽、IDI多肽和DXS多肽或其他DXP途径多肽。在一些方面,一个质粒编码异戊二烯合酶多肽、IDI多肽和DXS多肽或其他DXP途径多肽。在一些方面,多个质粒编码异戊二烯合酶多肽、IDI多肽和DXS多肽或其他DXP途径多肽。

[0177] 示例性的DXS多肽包括具有DXS多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。可使用标准方法(如本文所述的那些)通过测定多肽在体外、在细胞提取物内或体内将丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸转化为1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸的能力来确定多肽是否具有DXS多肽活性。示例性的DXS多肽和核酸以及测量DXS活性的方法在国际专利公开No.WO2009/076676、美国专利申请No.12/335,071(美国专利公开No.2009/0203102)、WO2010/003007、美国专利公开No.2010/0048964、WO2009/132220以及美国专利公开No.2010/0003716中进行了更详细的描述。

[0178] 示例性的DXP途径多肽包括但不限于如下多肽中的任一者:DXS多肽、DXR多肽、MCT多肽、CMK多肽、MCS多肽、HDS多肽、HDR多肽和具有DXP途径多肽中的一种、两种或更多种的活性的多肽(如融合多肽)。具体地讲,DXP途径多肽包括具有DXP途径多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。示例性的DXP途径核酸包括编码具有DXP途径多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性DXP途径多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然存在的多肽和核酸以及衍生自任何本文所述来源生物体的突变多肽和核酸。示例性的DXP途径多肽和核酸以及测量DXP途径多肽活性的方法在国际公开No.:WO2010/148150中进行了更详细的描述。

[0179] 示例性的DXS多肽包括具有DXS多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。可使用标准方法(如本文所述的那些)通过测定多肽在体外、在细胞提取物内或体内将丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸转化为1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸的能力来确定多肽是否具有DXS多肽活性。示例性的DXS多肽和核酸以及测量DXS活性的方法在国际专利公开No.WO2009/076676、美国专利申请No.12/335,071(美国专利公开No.2009/0203102)、WO2010/003007、美国专利公开No.2010/0048964、WO2009/132220以及美国专利公开No.2010/0003716中进行更详细的描述。

[0180] 具体地讲,DXS多肽将丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸转化为1-脱氧-d-木酮糖-5-磷酸

(DXP)。可使用标准方法通过测定多肽在体外、在细胞提取物内或体内转化丙酮酸和D-甘油醛-3-磷酸的能力来确定多肽是否具有DXS多肽活性。

[0181] DXR多肽将1-脱氧-d-木酮糖-5-磷酸(DXP)转化为2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)。可使用标准方法通过测量多肽在体外、在细胞提取物内或体内转化DXP的能力来确定多肽是否具有DXR多肽活性。

[0182] MCT多肽将2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)转化为4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-甲基-D-赤藓醇(CDP-ME)。可使用标准方法通过测量多肽在体外、在细胞提取物内或体内转化MEP的能力来确定多肽是否具有MCT多肽活性。

[0183] CMK多肽将4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-ME)转化为2-二磷酸4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-MEP)。可使用标准方法通过测量多肽在体外、在细胞提取物内或体内转化CDP-ME的能力来确定多肽是否具有CMK多肽活性。

[0184] MCS多肽将2-磷酸-4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-MEP)转化为2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸(ME-CPP或cMEPP)。可使用标准方法通过测量多肽在体外、在细胞提取物内或体内转化CDP-MEP的能力来确定多肽是否具有MCS多肽活性。

[0185] HDS多肽将2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸转化为(E)-4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸(HMBPP或HDMAPP)。可使用标准方法通过测量多肽在体外、在细胞提取物内或体内转化ME-CPP的能力来确定多肽是否具有HDS多肽活性。

[0186] HDR多肽将(E)-4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸转化为异戊烯二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)。可使用标准方法通过测量多肽在体外、在细胞提取物内或体内转化HMBPP的能力来确定多肽是否具有HDR多肽活性。

[0187] MVA下游途径、异戊二烯合酶、IDI和DXP途径多肽的来源生物体

[0188] 异戊二烯合酶、IDI、DXP途径和/或MVA下游途径核酸(以及它们所编码的多肽)可从天然含有异戊二烯合酶、IDI、DXP途径和/或MVA下游途径核酸的任何生物体获得。异戊二烯由多种生物体(例如细菌、酵母、植物和动物)天然地形成。一些生物含有产生异戊二烯的MVA途径。异戊二烯合酶核酸可例如从任何含有异戊二烯合酶的生物体获得。MVA途径核酸可例如从任何含有MVA途径的生物体获得。IDI和DXP途径核酸可例如从含有IDI和DXP途径的任何生物体获得。

[0189] 异戊二烯合酶、DXP途径、IDI和/或MVA途径核酸的核酸序列可分离自细菌、真菌、植物、藻类或蓝细菌。示例性的来源生物体包括例如:酵母如酵母菌属的物种(如酿酒酵母)、细菌如埃希氏杆菌属的物种(如大肠杆菌)或甲烷八叠球菌属的物种(如马氏甲烷八叠球菌)、植物如葛或白杨(如银白杨或银白杨x欧洲山杨CAC35696)或山杨(如美洲山杨)。可使用的异戊二烯合酶、IDI和/或MVA途径多肽的示例性来源也在国际专利公开No. W02009/076676、No. W02010/003007、No. W02009/132220、No. W02010/031062、No. W02010/031068、No. W02010/031076、No. W02010/013077、No. W02010/031079、No. W02010/148150、No. W02010/078457和No. W02010/148256中描述。

[0190] 在某些方面,来源生物体是酵母,如酵母菌属物种、裂殖酵母属物种、毕赤酵母属物种或假丝酵母属物种。

[0191] 在一些方面,来源生物体为细菌,例如芽孢杆菌属的菌株如地衣芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌、泛菌属的菌株如柠檬泛菌、假单胞菌属的菌株如产碱假单胞菌、链霉菌属的菌株

如变铅青链霉菌或锈赤链霉菌(*Streptomyces rubiginosus*)、埃希氏杆菌属的菌株如大肠杆菌、肠杆菌属的菌株、链球菌属的菌株或古细菌(*Archaea*)的菌株如马氏甲烷八叠球菌。

[0192] 如本文所用,“芽孢杆菌属”包括本领域技术人员已知的“芽孢杆菌属”内的所有物种,包括但不限于例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。应该认识到,还在继续对芽孢杆菌属进行分类学整理。因此,意在使该属包括已经重新分类的种,包括但不限于诸如现在命名为“嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)”的嗜热脂肪芽孢杆菌之类的生物体。在存在氧气的情况下抗性内生孢子的产生被视为芽孢杆菌属的定义性特征,但该特性还适用于最近命名的脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus*)、双芽孢杆菌属(*Amphibacillus*)、解硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、线芽孢杆菌属(*Filobacillus*)、薄壁芽孢杆菌属(*Gracilibacillus*)、嗜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、盐芽孢杆菌属(*Salibacillus*)、热芽孢杆菌属(*Thermobacillus*)、脲芽孢杆菌属(*Ureibacillus*)和枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)。

[0193] 在某些方面,来源生物体是革兰氏阳性菌。非限制性例子包括链霉菌属的菌株(例如变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌或灰色链霉菌)和芽孢杆菌。在一些方面,来源生物体为革兰氏阴性细菌如大肠杆菌或假单胞菌属物种。

[0194] 在一些方面,来源生物体为植物,例如来自豆科如蝶形花亚科的植物。在一些方面,来源生物体为葛、白杨(例如银白杨x欧洲山杨CAC35696)、山杨(例如美洲山杨)或夏栎。

[0195] 在某些方面,源生物体是藻类,例如绿藻、红藻、灰藻、绿蜘蛛藻、眼虫、色藻或腰鞭毛虫类。

[0196] 在一些方面,来源生物体为蓝细菌,例如基于形态分类成如下任何组的蓝细菌:色球藻目、宽球藻目、颤藻目、念珠藻目或真枝藻目。

#### [0197] 编码磷酸酮醇酶多肽的核酸

[0198] 在本发明的一些方面,在任何本文所述组合物或方法中描述的重组细胞可还包含一种或多种编码磷酸酮醇酶多肽或具有磷酸酮醇酶活性的多肽的核酸。在一些方面,磷酸酮醇酶多肽为内源多肽。在一些方面,编码磷酸酮醇酶多肽的内源核酸有效连接至组成型启动子。在一些方面,编码磷酸酮醇酶多肽的内源核酸有效连接至诱导型启动子。在一些方面,编码磷酸酮醇酶多肽的内源核酸有效连接至强启动子。在一些方面,使用不止一种编码磷酸酮醇酶多肽的内源核酸(如2、3、4或更多个拷贝的编码磷酸酮醇酶多肽的异源核酸)。在一特定方面,对细胞进行工程改造以相对于野生型细胞过表达内源磷酸酮醇酶多肽。在一些方面,编码磷酸酮醇酶多肽的内源核酸有效连接至弱启动子。

[0199] 磷酸酮醇酶酶催化5-磷酸木酮糖转化为甘油醛3-磷酸和乙酰磷酸和/或催化6-磷酸果糖转化为赤藓糖4-磷酸和乙酰磷酸。在某些实施例中,磷酸酮醇酶酶能够催化5-磷酸木酮糖转化为甘油醛3-磷酸和乙酰磷酸。在其他实施例中,磷酸酮醇酶酶能催化6-磷酸果糖转化为赤藓糖4-磷酸和乙酰磷酸。因而,不受理论的约束,本文所示的磷酸酮醇酶的表达可导致从碳水化合物源产生的乙酰磷酸的量增加。该乙酰磷酸可转化成乙酰辅酶A,乙酰辅酶A然后可被MVA途径的酶活性利用来产生甲羟戊酸、类异戊二烯前体分子、异戊二烯和/或

类异戊二烯。因而可以增加从碳水化合物底物产生的这些化合物的量。或者,乙酰磷酸和乙酰辅酶A的产量可以增加而该增加不反映在较高的细胞内浓度方面。在某些实施例中,细胞内乙酰磷酸或乙酰辅酶A浓度将保持不变或甚至降低,尽管磷酸酮醇酶反应正在进行。

[0200] 示例性的磷酸酮醇酶核酸包括编码具有磷酸酮醇酶多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。示例性的磷酸酮醇酶多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然存在的多肽和核酸以及衍生自任何本文所述来源生物体的突变多肽和核酸。在一些方面,磷酸酮醇酶核酸为编码磷酸酮醇酶多肽的异源核酸。

[0201] 可以用标准方法通过测量肽将D-6-磷酸果糖或D-5-磷酸木酮糖转化成乙酰磷酸的能力来确定多肽是否具有磷酸酮醇酶肽活性。可然后将乙酰磷酸转化成二茂铁乙酰基异羟肟酸(ferryl acetyl hydroxamate),可以用分光光度法对二茂铁乙酰基异羟肟酸进行检测(Meile等人,J.Bact.((《细菌学杂志》))183:2929-2936,2001)。如本文所述的鉴定为具有磷酸酮醇酶肽活性的任何多肽均适合用于本发明。

[0202] 在其他方面,示例性的磷酸酮醇酶核酸包括例如分离自罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、巴利阿里铁单胞菌(*Ferrimonas balearica*)、*Pedobactor saltans*、灰色链霉菌和/或达松维尔拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)的磷酸酮醇酶。可用于本发明的磷酸酮醇酶的另外例子在U.S.7,785,858中描述,将该专利以引用的方式并入本文。

[0203] 涉及恩特纳-杜德洛夫(Entner-Doudoroff)途径的途径

[0204] 恩特纳-杜德洛夫(ED)途径为埃姆登-迈耶霍夫-帕那斯途径(Emden-Meyerhoff-Parnass)(EMP-糖酵解)途径的替代选择。某些生物体(像大肠杆菌)带有ED途径和EMP途径二者,而其他生物体仅具其中一者。枯草芽孢杆菌仅具有EMP途径,而运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)仅具有ED途径(Peekhaus和Conway.1998.J.Bact.((《细菌学杂志》))180:3495-3502;Stulke和Hillen.2000.Annu.Rev.Microbiol.((《微生物学年鉴》))54,849-880;Dawes等人,1966.Biochem.J.((《生物化学杂志》))98:795-803)。

[0205] 磷酸葡萄糖酸脱水酶(edd)从6-磷酸-D葡萄糖酸移除一分子H<sub>2</sub>O而形成2-脱氢-3-脱氧-D-葡萄糖酸6-磷酸,而2-酮-3-脱氧葡萄糖酸6-磷酸醛缩酶(eda)可催化醛醇裂解(Egan等人,1992.J.Bact.((《细菌学杂志》))174:4638-4646)。这两个基因均在一个操纵子内。

[0206] 可导进磷酸酮醇酶途径的代谢物也可转入ED途径。为了避免代谢物损失于ED途径,将磷酸葡萄糖酸脱水酶基因(如内源磷酸葡萄糖酸脱水酶基因)和/或2-酮-3-脱氧葡萄糖酸6-磷酸醛缩酶基因(如内源性2-酮-3-脱氧葡萄糖酸6-磷酸醛缩酶基因)活性减弱。实现减弱的一种方式是通过缺失磷酸葡萄糖酸脱水酶(edd)和/或2-酮-3-脱氧葡萄糖酸6-磷酸醛缩酶(eda)。这可通过如下实现:用氯霉素或卡那霉素盒代替一个基因或者两个基因,然后将该盒环出(looping out)。没有这些酶活性,更多的碳可流过磷酸酮醇酶,因而增加甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯的产率。

[0207] 磷酸葡萄糖酸脱水酶(edd)和/或2-酮-3-脱氧葡萄糖酸6-磷酸醛缩酶(eda)也可通过对该酶的其他分子操纵来降低。酶活性降低可以是与未进行操纵时相比,比活性或总活性降低任何量。在一些情况下,酶活性的降低为降低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0208] 在一些情况下,减弱内源磷酸葡萄糖酸脱水酶基因和/或内源2-酮-3-脱氧葡萄糖酸6-磷酸醛缩酶基因的活性导致与内源磷酸葡萄糖酸脱水酶基因和/或内源乙酸激酶2-酮-3-脱氧葡萄糖酸6-磷酸醛缩酶基因的表达不减弱的细胞相比,更多的碳流进甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

[0209] 涉及磷酸戊糖途径的氧化分支的途径

[0210] 大肠杆菌利用磷酸戊糖途径来分解己糖和戊糖以及给细胞提供用于多个合成代谢途径的中间体。其也是NADPH的主要产生者。磷酸戊糖途径由氧化分支(具有像葡萄糖6-磷酸1-脱氢酶(zwf)、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(pgl)或6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(gnd)的酶)和非氧化分支(具有诸如转酮醇酶(tktA)、转醛醇酶(talA或talB)之类的酶)、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶)构成(Sprenger,1995,Arch.Microbiol.(《微生物学档案》)164:324-330)。

[0211] 为了将碳导向磷酸酮醇酶、磷酸戊糖途径的非氧化分支(转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶),可调节表达(如增加酶活性)以允许更多的碳流向6-磷酸果糖和5-磷酸木酮糖,从而增加甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯的最终产量。转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶活性的增加可以是与在尚未实现任何操纵时相比,比活性或总活性的任何增加量。在某些情况下,该酶活性增加至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些方面,通过增加内源转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶的活性来调节转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶。这可通过用合成的组成型高表达启动子代替内源转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶基因启动子来实现。可将编码转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶的基因克隆于质粒上处于适当启动子后面。转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶的活性增加可导致与转酮醇酶、转醛醇酶、核酮糖-5-磷酸-表异构酶和(或)核糖-5-磷酸表异构酶的表达不增加的细胞相比,更多的碳流进甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

[0212] 涉及磷酸果糖激酶的途径

[0213] 磷酸果糖激酶是糖酵解的关键酶,其催化6-磷酸果糖的磷酸化。大肠杆菌具有由pfkA和pfkB编码的两种同功酶。细胞中的大部分磷酸果糖激酶活性是由于pfkA(Kotlarz等人,1975,Biochim.Biophys.Acta(《生物化学与生物物理学报》),381:257-268)。

[0214] 为了将碳导向磷酸酮醇酶,可调节磷酸果糖激酶表达(如降低酶活性)以允许更多的碳流向6-磷酸果糖和5-磷酸木酮糖,从而增加甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯的最终产量。磷酸果糖激酶活性的降低可以是与未进行操纵时相比,比活性或总活性降低任何量。在某些情况下,酶活性的降低为降低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些方面,通过降低内源磷酸果糖激酶的活性来调节磷酸果糖激酶的活性。这可通过用合成的组成型低表达启动子代替内源磷酸果糖激酶基因启动子来实现。还可缺失编码磷酸果糖激酶的基因。磷酸果糖激酶活性的降低可导致与磷

酸果糖激酶的表达不降低的细胞相比,更多的碳流进甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

#### [0215] 宿主细胞突变

[0216] 本发明还设想可增加通过MVA途径的碳通量的另外的宿主细胞突变。通过增加碳流量,可产生更多的异戊二烯、甲羟戊酸、类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯。还可为了增加流向甲羟戊酸、异戊二烯、类异戊二烯和/或类异戊二烯前体产生的碳通量对本文所述的重组细胞进行工程改造,其中对一种或多种来自如下的酶的活性进行调节:(a)柠檬酸合酶;(b)磷酸转乙酰酶;(c)乙酸激酶;(d)乳酸脱氢酶;(e)NADP依赖性苹果酸酶;和(f)丙酮酸脱氢酶。在一些方面,调节任何本文提及的酶可影响该酶的表达(如转录或翻译)、产量、翻译后修饰或任何其他功能。在一些实施例中,与尚未为这种调节而进行工程改造的细胞相比,重组细胞中的酶的功能(如催化能力)增加或降低。在一个实施例中,与尚未经工程改造的细胞相比,酶的功能(如活性)增加。在另一个实施例中,与尚未经工程改造的细胞相比,酶的功能(如活性)降低。

#### [0217] 柠檬酸合酶途径

[0218] 柠檬酸合酶催化草酰乙酸与乙酰辅酶A缩合而形成柠檬酸,柠檬酸为三羧酸(TCA)循环的代谢物(Ner, S. 等人,1983, *Biochemistry* (《生物化学》), 22:5243-5249; Bhayana, V. & Duckworth, H. 1984, *Biochemistry* (《生物化学》) 23:2900-2905; 图5)。在大肠杆菌中,这种由glbA编码的酶在表现上与二聚亚基的三聚体相似。该六聚体形式允许该酶由NADH别构调节。该酶已得到了广泛研究(Wiegand, G. 和 Remington, S. 1986. *Annual Rev. Biophysics Biophys. Chem.* (《生物物理和生物物理化学年鉴》) 15:97-117; Duckworth 等人, 1987. *Biochem Soc Symp.* (《生物化学协会文集》) 54:83-92; Stockell, D. 等人, 2003. *J. Biol. Chem.* (《生物化学杂志》) 278:35435-43; Maurus, R. 等人, 2003. *Biochemistry* (《生物化学》). 42:5555-5565)。为了避免NADH的别构抑制,已考虑用枯草芽孢杆菌NADH非敏感性柠檬酸合酶进行替换或补充(Underwood 等人, 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* (《应用和环境微生物学》) 68:1071-1081; Sanchez 等人, 2005. *Met. Eng.* (《代谢工程》) 7:229-239)。

[0219] 由柠檬酸合酶催化的反应直接与催化甲羟戊酸途径的第一个步骤的硫解酶竞争,因为它们都以乙酰辅酶A作为底物(Hedl 等人, 2002. *J. Bact.* (《细菌学杂志》) 184:2116-2122)。因此,本领域的技术人员可以调节柠檬酸合酶的表达(如,降低酶活性)以允许更多的碳流入甲羟戊酸途径,从而增加甲羟戊酸和异戊二烯的最终产量。柠檬酸合酶活性降低可以是与未进行操纵时相比,比活性或总活性降低任何量。在一些情况下,酶活性的降低为降低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些方面,柠檬酸合酶的活性通过降低内源柠檬酸合酶基因的活性而进行调节。这可通过用编码NADH非敏感性柠檬酸合酶的转基因对内源柠檬酸合酶基因进行染色体置换或通过使用衍生自枯草芽孢杆菌的编码NADH非敏感性柠檬酸合酶的转基因来实现。还可通过用合成的组成型低表达启动子代替内源柠檬酸合酶基因启动子来调节(如降低)柠檬酸合酶的活性。柠檬酸合酶活性的降低可导致与柠檬酸合酶的表达不降低的微生物相比,更多的碳流入甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

#### [0220] 涉及磷酸转乙酰酶和/或乙酸激酶的途径

[0221] 磷酸转乙酰酶(pta)(Shimizu等人,1969.Biochim.Biophys.Acta(《生物化学与生物物理学学报》)191:550-558)催化乙酰辅酶A与乙酰磷酸(乙酰基-P)之间的可逆转化,而乙酸激酶(ackA)(Kakuda,H.等人,1994.J.Biochem.(《生物化学杂志》),11:916-922)使用乙酰基-P形成乙酸。这些基因可在大肠杆菌中作为一个操纵子转录。它们一起催化乙酸的异化,同时释放ATP。因此,本领域的技术人员可通过降低磷酸转乙酰酶基因(如内源磷酸转乙酰酶基因)和/或乙酸激酶基因(如内源乙酸激酶基因)的活性而增加可用乙酰辅酶A的量。一种实现降低的方式是通过缺失磷酸转乙酰酶(pta)和/或乙酸激酶(ackA)。这可通过如下方式实现:将一个或两个基因替换为氯霉素表达盒,然后将该表达盒环出。乙酸由大肠杆菌因多种原因而产生(Wolfe,A.2005.Microb.Mol.Biol.Rev.(《微生物学与分子生物学评论》)69:12-50)。不受理论的约束,由于ackA-pta利用乙酰辅酶A,因此缺失那些基因可能使碳不转向乙酸并从而增加甲羟戊酸、类异戊二烯、类异戊二烯前体分子和/或异戊二烯的产量。在一些方面,将eutD基因减弱或缺失,该基因表现具有磷酸转乙酰酶样的酶活性(如,在生物体例如但不限于大肠杆菌和酿酒酵母中的eutD基因)。

[0222] 在一些方面,重组微生物与内源磷酸转乙酰酶基因和/或内源乙酸激酶基因的表达不减弱的微生物相比产生降低量的乙酸。所产生乙酸的量的降低可通过本领域技术人员已知的常规测定法进行测量。乙酸减少的量与未进行分子操纵时相比为至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0223] 磷酸转乙酰酶(pta)和/或乙酸激酶(ackA)的活性还可通过对酶进行其他分子操纵来降低。酶活性的降低可以是与尚未进行操纵时出现的比活性或总活性相比,比活性或总活性降低任何量。在某些情况下,酶活性的降低为降低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,包括这些百分数以及包括这些百分数之间的任何值。

[0224] 在一些情况下,降低内源磷酸转乙酰酶基因和/或内源乙酸激酶基因的活性导致与内源磷酸转乙酰酶基因和/或内源乙酸激酶基因的表达不减弱的微生物相比更多的碳流入甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

#### [0225] 涉及乳酸脱氢酶的途径

[0226] 在大肠杆菌中,D-乳酸通过乳酸脱氢酶(ldhA-图5)由丙酮酸产生(Bunch,P.等人,1997.Microbiol.(《微生物学》)143:187-195)。乳酸的产生伴随NADH的氧化,因此,当氧被限制并且无法适应所有还原当量时,将产生乳酸。因此,乳酸的产生可能是碳消耗源。这样,为了改善通向甲羟戊酸产生(以及异戊二烯、类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯产生,如果需要的话)的碳流量,本领域技术人员可调节乳酸脱氢酶的活性,例如通过降低该酶的活性来调节。

[0227] 因此,在一个方面,乳酸脱氢酶的活性可通过降低内源乳酸脱氢酶基因的活性而进行调节。这种降低可以通过使内源乳酸脱氢酶基因缺失来实现。也可以使用本领域技术人员已知的减弱乳酸脱氢酶基因活性的其他方式。通过操纵涉及乳酸脱氢酶的途径,重组微生物与不具有减弱的内源乳酸脱氢酶基因表达的微生物相比产生降低量的乳酸。所产生乳酸的量的降低可通过本领域技术人员已知的常规测定法测量。乳酸减少的量与未进行分

子操纵时相比为至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0228] 乳酸脱氢酶的活性还可以通过对酶进行其他分子操纵来降低。酶活性降低可以是与未进行操纵时相比,比活性或总活性降低任何量。在某些情况下,酶活性的降低为降低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,包括这些百分数以及这些值之间的任何百分数。

[0229] 因此,在一些情况下,减弱内源乳酸脱氢酶基因的活性导致与内源乳酸脱氢酶基因表达不减弱的微生物相比,更多的碳流入甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

[0230] 涉及苹果酸酶的途径

[0231] 苹果酸酶(在大肠杆菌中,为sfca和maeB)是通过以下方程式催化苹果酸转化成丙酮酸(利用NAD<sup>+</sup>或NADP<sup>+</sup>)的回补酶:

[0232] (S)-苹果酸 + NAD(P)<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  丙酮酸 + CO<sub>2</sub> + NAD(P)H

[0233] 因此,该酶的两种底物为(S)-苹果酸和NAD(P)<sup>+</sup>,而其三种产物为丙酮酸、CO<sub>2</sub>和NADPH。

[0234] NADP依赖性苹果酸酶(maeB-图5)(Iwamura, M. 等人, 1979, J. Biochem. (《生物化学杂志》) 85:1355-1365)的表达可通过如下方式有助于增加甲羟戊酸和/或异戊二烯产量: 1) 将碳从TCA循环带回至甲羟戊酸途径的丙酮酸即乙酰辅酶A的直接前体(乙酰辅酶A为甲羟戊酸自身的直接前体), 以及2) 产生可用于HMG-CoA还原酶反应的额外NADPH(Oh, MK等人(2002) J. Biol. Chem. (《生物化学杂志》) 277:13175-13183; Bologna, F. 等人(2007) J. Bact. (《细菌学杂志》) 189:5937-5946)。

[0235] 这样,可通过调节(例如增加)苹果酸酶的活性和/或表达来实现更多的用于下游产生甲羟戊酸、类异戊二烯前体分子、类异戊二烯和/或异戊二烯的起始底物(丙酮酸或乙酰辅酶A)。NADP依赖性苹果酸酶基因可以是内源基因。实现此目的的一种非限制性方式是将内源NADP依赖性苹果酸酶基因启动子替换为合成的组成型表达启动子。另一种增加酶活性的非限制性方式是通过使用一种或多种编码NADP依赖性苹果酸酶多肽的异源核酸。本领域的技术人员可使用易得的分子生物学技术在发酵或培养过程中监测maeB RNA的表达。

[0236] 因此,在一些实施例中,重组微生物与NADP依赖性苹果酸酶基因的表达不增加的微生物相比产生增加量的丙酮酸。在一些方面,增加NADP依赖性苹果酸酶基因的活性导致与NADP依赖性苹果酸酶基因表达不增加的微生物相比更多的碳流入甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

[0237] 所产生丙酮酸的量的增加可通过本领域技术人员已知的常规测定法测量。丙酮酸增加的量与未进行分子操纵时相比可为至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0238] 苹果酸酶的活性还可以通过对酶进行其他分子操纵来增加。酶活性增加可以是与尚未进行操纵时相比,比活性或总活性增加任何量。在一些情况下,酶活性的增加为至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0239] 涉及丙酮酸脱氢酶复合物的途径

[0240] 催化丙酮酸脱羧成乙酰辅酶A的丙酮酸脱氢酶复合物由基因aceE、aceF和lpdA编码的蛋白质构成。那些基因的转录由数种调节因子调节。因此,本领域的技术人员可通过调节丙酮酸脱氢酶复合物的活性来增加乙酰辅酶A。调节可以是增加丙酮酸脱氢酶复合物的活性和/或表达(例如,恒定表达)。这可通过不同的方式实现,例如通过在操纵子前设置强组成型启动子如PL.6(aattcatataaaaaacatacagataaccatctgcggtgataaattatctctggcggtgttgacataaataccactggc ggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgaccacatgaaggtg-λ启动子, GenBank NC\_001416),或使用一个或多个合成的组成型表达启动子。

[0241] 因此,在一个方面,丙酮酸脱氢酶的活性通过增加丙酮酸脱氢酶复合物的一个或多个基因的活性来调节,所述丙酮酸脱氢酶复合物由如下组成:(a)丙酮酸脱氢酶(E1),(b)二氢硫辛酸转乙酰酶和(c)二氢硫辛酸脱氢酶。应当理解,可操纵这些基因中的任何一种、两种或三种以增加丙酮酸脱氢酶的活性。在另一方面,丙酮酸脱氢酶复合物的活性可通过减弱内源丙酮酸脱氢酶复合物抑制因子基因的活性来调节,下文进一步进行了详细描述。内源丙酮酸脱氢酶复合物抑制因子的活性可通过缺失内源丙酮酸脱氢酶复合物抑制因子基因来减弱。

[0242] 在一些情况下,丙酮酸脱氢酶复合物的一种或多种基因为内源基因。增加丙酮酸脱氢酶复合物活性的另一种方式是通过向微生物引入编码选自如下的一种或多种多肽的一种或多种异源核酸:(a)丙酮酸脱氢酶(E1),(b)二氢硫辛酸转乙酰酶和(c)二氢硫辛酸脱氢酶。

[0243] 通过使用任何这些方法,重组微生物与其中丙酮酸脱氢酶活性未受调节的微生物相比可产生增加量的乙酰辅酶。调节丙酮酸脱氢酶活性可导致与丙酮酸脱氢酶表达未受调节的微生物相比,更多的碳流入甲羟戊酸依赖性生物合成途径。

[0244] 突变的组合

[0245] 应当理解,对于本文所述的任何酶和/或酶途径,明确地设想了调节本文所述的酶和/或酶途径(如其中两者、三者、四者、五者或六者)的任何组合的分子操纵。为了便于对组合进行表述,将柠檬酸合酶(gltA)定为A,将磷酸转乙酰酶(ptaB)定为B,将乙酸激酶(ackA)定为C,将乳酸脱氢酶(ldhA)定为D,将苹果酸酶(sfcA或maeB)定为E,并且将丙酮酸脱羧酶(aceE、aceF和/或lpdA)定为F。如上所述,丙酮酸脱羧酶复合物的aceE、aceF和/或lpdA酶可单个地使用、或三种酶中的两种或三种酶中的三种一起使用,以增加丙酮酸脱羧酶活性。

[0246] 因此,对于酶A-F的任何两种的组合,可以使用的非限制性组合为:AB、AC、AD、AE、AF、BC、BD、BE、BF、CD、CE、CF、DE、DF和EF。对于酶A-F的任何三种的组合,可以使用的非限制性组合为:ABC、ABD、ABE、ABF、BCD、BCE、BCF、CDE、CDF、DEF、ACD、ACE、ACF、ADE、ADF、AEF、BDE、BDF、BEF和CEF。对于酶A-F的任何四种的组合,可以使用的非限制性组合为:ABCD、ABCE、ABCF、ABDE、ABDF、ABEF、BCDE、BCDF、CDEF、ACDE、ACDF、ACEF、BCEF、BDEF和ADEF。对于酶A-F的任何五种的组合,可以使用的非限制性组合为:ABCDE、ABCDF、ABDEF、BCDEF、ACDEF和ABCEF。在另一方面,使用所有六种酶的组合:ABCDEF。

[0247] 因此,与不在三羧酸(TCA)循环活性条件下生长的微生物相比,本文所述的重组微生物可实现增加的甲羟戊酸产量,其中重组微生物中的代谢碳通量通过调节一种或多种选自如下的酶的活性而被导向甲羟戊酸产生:(a)柠檬酸合酶,(b)磷酸转乙酰酶和/或乙酸激

酶,(c)乳酸脱氢酶,(d)苹果酸酶和(e)丙酮酸脱羧酶复合物。

[0248] 增加异戊二烯产量的其他调节因子和因子

[0249] 可将其他分子操纵用于增加碳流向异戊二烯产生。一种方法是减少、降低或消除负调节因子对进入甲羟戊酸途径的途径的影响。例如,在一些情况下,基因aceEF-1pdA与第四个上游基因pdhR处于操纵子中。pdhR是其操纵子的转录负调节因子。在不存在丙酮酸的情况下,它结合其靶启动子并抑制转录。其还以相同的方式调节ndh和cyoABCD(Ogasawara, H. 等人, 2007. J. Bact. (《细菌学杂志》) 189: 5534-5541)。在一个方面, pdhR调节因子的缺失可改善丙酮酸的供应, 并因此提高甲羟戊酸和/或异戊二烯的产量。

[0250] 在其他方面, 将6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(PGL)引入缺少PGL的微生物(如多种大肠杆菌菌株)中可用于提高甲羟戊酸和/或异戊二烯的产量。PGL可使用染色体整合或染色体外载体(如质粒)而引入。在其他方面, 可从表达内源PGL的细胞(例如, 微生物, 如多种大肠杆菌菌株)的基因组缺失PGL, 以提高甲羟戊酸和/或异戊二烯的产量。在一些方面, 缺失PGL导致与表达PGL的微生物相比异戊二烯百分比产率高出约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者, 包括这些百分数以及这些百分数之间的任何值。在其他方面, 缺失PGL导致与表达PGL的微生物相比异戊二烯瞬时百分比产率高出约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者, 包括这些百分数以及这些百分数之间的任何值。在其他方面, 缺失PGL导致与表达PGL的微生物相比针对异戊二烯的细胞生产力指数高出约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者, 包括这些百分数以及这些百分数之间的任何值。在其他方面, 缺失PGL导致与表达PGL的微生物相比异戊二烯的体积生产率高出约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者, 包括这些百分数以及这些百分数之间的任何值。在其他方面, 缺失PGL导致与表达PGL的微生物相比异戊二烯的峰值比生产率高出约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者, 包括这些百分数以及这些百分数之间的任何值。在一些方面, 缺失PGL导致与表达PGL的微生物相比峰值比生产率维持较长的一段时间。

[0251] 能够增加异戊二烯的产量的重组细胞(如细菌细胞)

[0252] 本文所述的重组细胞(例如细菌细胞)具有产生异戊二烯的能力, 所产生的异戊二烯的浓度高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一个或多个拷贝的编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或多种编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸的相同细胞的该浓度, 任选在基本培养基中培养时。在一些情况下, 一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一个或多个拷贝的编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或多种编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸为整合进宿主细胞的染色体中的异源核酸。与不包含来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的产异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比, 该细胞(例如细菌细胞)可产生高至少5%的量的异戊二烯。或者, 该细胞(例如细菌细胞)可产生高出约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%的异戊二烯, 包括这些数以及这些数之间的任何数值。

[0253] 在本发明的一个方面, 提供了包含一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一种或多种编码甲羟戊酸

(MVA)下游途径多肽的异源核酸、一种或多种编码DXP途径多肽的异源核酸和一种或多种编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸的细胞(例如细菌细胞)。该细胞可还包含一种或多种编码IDI多肽的异源核酸。该一种或多种异源核酸可有效连接至组成型启动子、可有效连接至诱导型启动子或可有效连接至诱导型启动子和组成型启动子的组合。该一种或多种异源核酸可另外有效连接至强启动子、弱启动子和/或中等启动子。编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽、甲羟戊酸(MVA)下游途径多肽、DXP途径多肽和异戊二烯合酶多肽的异源核酸中的一者或多者可整合进宿主细胞的基因组中或可在细胞中稳定表达。该一种或多种异源核酸另外可位于载体上。

[0254] 可增大(如通过一种或多种编码异戊二烯合酶多肽、MVA下游途径多肽、DXP途径多肽和/或来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的表达来增大)根据任何本文所述组合物或方法的细胞的异戊二烯产量。如本文所用,“增大的”异戊二烯产量是指与不具有一种或多种编码异戊二烯合酶多肽、MVA下游途径多肽、DXP途径多肽和/或来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞相比,任何本文所述组合物和方法所描述的细胞增加的针对异戊二烯的细胞生产力指数(CPI)、增加的异戊二烯滴度、增加的异戊二烯质量产率和/或增加的异戊二烯比生产率。异戊二烯的产量可增大约5%至约1,000,000倍。与不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的异戊二烯产量相比,异戊二烯的产量可增大约10%至约1,000,000倍(如约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。

[0255] 异戊二烯的产量可还增大至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍或1,000,000倍中的任一者。

#### [0256] 使用重组细胞来产生异戊二烯的方法

[0257] 本发明还提供的是产生异戊二烯的方法,包括培养包含一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽、MVA下游途径多肽和异戊二烯合酶多肽的异源核酸的细胞(例如细菌细胞)。异戊二烯可从任何本文所述的和根据任何本文所述方法的细胞产生。可将任何所述细胞用于从碳水化合物(包括六碳糖如葡萄糖)产生异戊二烯的目的。

[0258] 因而,本发明还提供的是产生异戊二烯的方法,包括在适于产生异戊二烯的条件下培养包含一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞(例如细菌细胞)和(b)产生异戊二烯。该细胞可还包含一种或多种编码上述MVA下游途径多肽(如MVK、PMK、MVD和/或IDI)和任何上述异戊二烯合酶多肽(如葛异戊二烯合酶)的核酸分子。在一些方面,该细胞(例如细菌细胞)可以是任何本文所述细胞。任何本文所述异戊二烯合酶或其变体、任何本文所述微生物(例如细菌)菌株或植物细胞、任何本文所述启动子和/或任何本文所述载体也可用于利用任何本文所述能量来源(如葡萄糖或任何其他六碳糖)来产生异戊二烯。在一些方面,产生异戊二烯的方

法还包括回收异戊二烯的步骤。

[0259] 在一些方面,在峰值绝对生产率时间点测量所产生的异戊二烯的量。在一些方面,细胞的峰值绝对生产率为大约任何本文公开的异戊二烯量。在一些方面,在峰值比生产率时间点测量所产生的异戊二烯的量。在一些方面,细胞的峰值比生产率为大约任何本文公开的每细胞异戊二烯量。在一些方面,测量所产生的异戊二烯的累积总量。在一些方面,细胞的累积总生产率为大约任何本文所公开的异戊二烯量。在一些方面,在峰值体积生产率时间点测量所产生的异戊二烯的量。在一些方面,细胞的峰值体积生产率为大约任何本文公开的异戊二烯量。在一些方面,在从葡萄糖产生的累积百分比产率时间点测量所产生的异戊二烯的量。在一些方面,从葡萄糖产生的累积百分比产率为大约任何本文所公开的异戊二烯量。

[0260] 在一些方面,任何本文所述的细胞(例如培养物中的细胞)以大于约如下中的任一者或以约如下中的任一者产生异戊二烯:1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000或更多纳摩尔的异戊二烯/克细胞湿重/小时(nmol/g<sub>wcm</sub>/hr)。在一些方面,异戊二烯的量为约2至约5,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr,例如约2至约100nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约100至约500nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约150至约500nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约500至约1,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约1,000至约2,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr或约2,000至约5,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr。在一些方面,异戊二烯的量为约20至约5,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约100至约5,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约200至约2,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约200至约1,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr、约300至约1,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr或约400至约1,000nmol/g<sub>wcm</sub>/hr。

[0261] 在一些方面,培养物中的细胞以大于如下的量或以约如下的量产生异戊二烯:1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、100,000或更多纳克的异戊二烯/克细胞湿重/hr(ng/g<sub>wcm</sub>/h)。在一些方面,异戊二烯的量为约2至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h,例如约2至约100ng/g<sub>wcm</sub>/h、约100至约500ng/g<sub>wcm</sub>/h、约500至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约1,000至约2,000ng/g<sub>wcm</sub>/h或约2,000至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h。在一些方面,异戊二烯的量为约20至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约100至约5,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约200至约2,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约200至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h、约300至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h或约400至约1,000ng/g<sub>wcm</sub>/h。

[0262] 在一些方面,培养物中的细胞以大于约如下量中的任一者或以约如下量中的任一者产生累积滴度(总量)的异戊二烯:1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000或更多毫克的异戊二烯/L发酵液(mg/L<sub>发酵液</sub>,其中发酵液的体积包括细胞和细胞培养基的体积)。在一些方面,异戊二烯的量为约2至约5,000mg/L<sub>发酵液</sub>,例如在约2至约100mg/L<sub>发酵液</sub>、约100至约500mg/L<sub>发酵液</sub>、约500至约1,000mg/L<sub>发酵液</sub>、约1,000至约2,000mg/L<sub>发酵液</sub>或约2,000至约5,000mg/L<sub>发酵液</sub>。在一些方面,异戊二烯的量为约20至约5,000mg/L<sub>发酵液</sub>、约100至约5,000mg/L<sub>发酵液</sub>、约200至约2,000mg/L<sub>发酵液</sub>、约200至约1,000mg/L<sub>发酵液</sub>、约300至约1,000mg/L<sub>发酵液</sub>或约400至约1,000mg/L<sub>发酵液</sub>。

[0263] 在一些方面,培养物中的细胞所产生的异戊二烯包含至少约1、2、5、10、15、20或25体积%的发酵废气。在一些方面,异戊二烯包含约1至约25体积%的废气,例如约5至约15%、约15至约25%、约10至约20%或约1至约10%。

[0264] 本发明提供的是具有增大的异戊二烯产量的细胞。细胞的异戊二烯产量可通过一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一个或多个拷贝的编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或多种编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸的表达来增大。如本文所用,“增大的”异戊二烯产量是指与不具有一种或多种编码异戊二烯合酶多肽、MVA下游途径多肽、DXP途径多肽和/或来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞相比,任何本文所述组合和方法所描述的细胞增加的针对异戊二烯的细胞生产力指数(CPI)、增加的异戊二烯滴度、增加的异戊二烯质量产率、增加的体积生产率和/或增加的异戊二烯比生产率。异戊二烯的产量可增大约5%至约1,000,000倍。与不内源具有来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的细胞的异戊二烯产量相比,异戊二烯的产量可增大约10%至约1,000,000倍(如约50%至约1,000,000倍、约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。

[0265] 可增大(如通过一种或多种编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸的表达来增大)根据任何本文所述方法的细胞的异戊二烯产量。异戊二烯的产量可增大约5%至约1,000,000倍。与天然存在的细胞(如不表达一种或多种编码异戊二烯合酶多肽的异源核酸的细胞)的异戊二烯产量相比,异戊二烯的产量可增大约10%至约1,000,000倍(如约50%至约1,000,000倍、约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。与天然存在的细胞或不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的异戊二烯产量相比,异戊二烯的产量可还增大至少约如下中的任一者:10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍或1,000,000倍。

[0266] 能够增加类异戊二烯的产量的重组细胞(例如细菌细胞)

[0267] 类异戊二烯可在任何生物体中从由MVA途径产生的类异戊二烯前体分子的合成产生。如上所述,类异戊二烯代表重要的一类化合物并且包括例如食品和饲料补充剂、风味和气味化合物以及抗癌化合物、抗疟疾化合物、抗真菌化合物和抗细菌化合物。

[0268] 类异戊二烯作为一类分子,根据化合物中所包含的异戊二烯单位数对其进行分类。单萜包含十个碳或两个异戊二烯单位,倍半萜包含15个碳或三个异戊二烯单位,二萜包含20个碳或四个异戊二烯单位,二倍半萜包含25个碳或五个异戊二烯单位等等。类固醇(通常包含约27个碳)为裂解或重排的一类异戊二烯产物。

[0269] 类异戊二烯可由类异戊二烯前体分子IPP和DMAPP产生。这些各式各样的化合物衍生自这些相当简单的通用前体并且由成组的保守聚丙烯焦磷酸合酶合成(Hsieh等人, Plant Physiol.(《植物生理学》)2011年3月;155(3):1079-90)。这些直链异戊二烯焦磷酸

的各种链长(反映它们独特的生理学功能)通常由聚丙烯焦磷酸合酶高度发达的活性位点经由烯丙基底物(二甲基烯丙基焦磷酸(C<sub>5</sub>-DMAPP)、香叶基焦磷酸(C<sub>10</sub>-GPP)、法尼基焦磷酸(C<sub>15</sub>-FPP)、香叶基香叶基焦磷酸(C<sub>20</sub>-GGPP))与对应数目的异戊烯焦磷酸(C<sub>5</sub>-IPP)的缩合反应决定(Hsieh等人, *Plant Physiol.* (《植物生理学》)2011年3月;155(3):1079-90)。

[0270] 任何上述能够增加甲羟戊酸或类异戊二烯前体或异戊二烯的产量的、表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的重组宿主细胞也能够增加类异戊二烯前体和/或类异戊二烯的产量。在一些方面,这些细胞还包含一种或多种编码如上所述的MVA下游途径的多肽、IDI和/或DXP途径的异源核酸和编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸。不受理论的束缚,通过任何上述组合物和方法增加细胞(例如细菌细胞)中类异戊二烯前体的细胞产量可导致产生较高量的类异戊二烯。当与甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、异戊烯二磷酸异构酶和用于类异戊二烯产生的其他适当酶的适当酶活性水平组合时,增加从葡萄糖产生类异戊二烯前体的摩尔产率转化成较高的从葡萄糖产生类异戊二烯的摩尔产率。也不受理论的束缚,据认为通过任何上述组合物和方法增加细胞(例如细菌细胞)中甲羟戊酸的细胞产量将类似地导致产生较高量的类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯。当与甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、异戊烯二磷酸异构酶和用于异戊二烯和类异戊二烯产生的其他适当酶的适当酶活性水平组合时,增加从葡萄糖产生甲羟戊酸的摩尔产率转化成较高的从葡萄糖产生类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯(包括异戊二烯)的摩尔产率。

[0271] 在一些方面,本文所述的细胞为产类异戊二烯细胞。在一个方面,产类异戊二烯细胞为能够产生类异戊二烯的野生型细胞。在另一方面,产类异戊二烯细胞为非天然存在的细胞,该细胞经工程改造而含有一种或多种异源MVA上游途径多肽、MVA下游途径多肽、聚丙烯焦磷酸合酶多肽、DXP途径多肽和/或IDI多肽。在另外的方面,产异戊二烯细胞可既含有内源的又含有异源的MVA上游途径多肽、MVA下游途径多肽、聚丙烯焦磷酸合酶多肽、DXP途径多肽和/或IDI多肽。

#### [0272] 类异戊二烯的类型

[0273] 本发明的细胞(例如细菌细胞)能够增加类异戊二烯的产量。类异戊二烯的例子包括(不限于)单萜类化合物、单萜类化合物、倍半萜类化合物、二萜类化合物、二倍半萜类化合物、三萜类化合物、四萜类化合物和更高级的多萜类化合物。在一些方面,单萜类化合物为戊二烯醇(即3-甲基-2-丁烯-1-醇)、异戊二烯醇(即3-甲基-3-丁烯-1-醇)、2-甲基-3-丁烯-2-醇或异戊酸。在一些方面,单萜类化合物可以为(不限于)香叶基焦磷酸、桉叶素、柠檬烯或蒎烯。在一些方面,倍半萜类化合物为法尼基焦磷酸、青蒿素或没药醇。在一些方面,二萜类化合物可以为(不限于)香叶基香叶基焦磷酸、视黄醇、视黄醛、植醇、紫杉醇、毛喉素(forskolin)或阿非迪霉素(aphidicolin)。在一些方面,三萜类化合物可以为(不限于)角鲨烯或羊毛甾醇。类异戊二烯还可以选自松香二烯、紫穗槐二烯、薏烯、 $\alpha$ -金合欢烯、 $\beta$ -金合欢烯、金合欢醇、香叶醇、香叶基香叶醇、芳樟醇、柠檬烯、月桂烯、橙花叔醇、罗勒烯、广藿香醇、 $\beta$ -蒎烯、桉烯、 $\gamma$ -萜品烯、异松香烯和瓦伦西亚桔烯。

[0274] 在一些方面,四萜类化合物为番茄红素或胡萝卜素(类胡萝卜素)。如本文所用,术语“类胡萝卜素”是指一组天然存在的有机色素,其在植物、一些其他光合生物体如藻类的叶绿

体和色质体中、在某些类型的真菌以及在某些细菌中产生。类胡萝卜素类包括含氧叶黄素类和非含氧胡萝卜素类。在一些方面,类胡萝卜素类选自叶黄素类和胡萝卜素类。在一些方面,叶黄素类为叶黄素或玉米黄质。在一些方面,类胡萝卜素为 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\gamma$ -胡萝卜素、 $\beta$ -隐黄质或番茄红素。

[0275] 编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸

[0276] 在本发明的一些方面,任何本文组合物或方法中所述的细胞还包含一种或多种编码如上所述的甲羟戊酸(MVA)下游途径多肽的核酸以及一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的核酸。该聚丙烯焦磷酸合酶多肽可以为内源多肽。编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的内源核酸可有效连接至组成型启动子或可类似地有效连接至诱导型启动子。编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的内源核酸可另外有效连接至强启动子。或者,编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的内源核酸可有效连接至弱启动子。具体地讲,对细胞进行工程改造以相对于野生型细胞过表达内源聚丙烯焦磷酸合酶多肽。

[0277] 在一些方面,聚丙烯焦磷酸合酶多肽为异源多肽。本发明的细胞可包含不止一个拷贝的编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸。在一些方面,编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸有效连接至组成型启动子。在一些方面,编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸有效连接至诱导型启动子。在一些方面,编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸有效连接至强启动子。在一些方面,编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸有效连接至弱启动子。

[0278] 编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的核酸可整合进宿主细胞的基因组中或可在细胞中稳定表达。编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的核酸另外可位于载体上。

[0279] 示例性的聚丙烯焦磷酸合酶核酸包括编码具有聚丙烯焦磷酸合酶的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽或融合多肽的核酸。聚丙烯焦磷酸合酶多肽将类异戊二烯前体分子转化成更复杂的类异戊二烯化合物。示例性的聚丙烯焦磷酸合酶多肽包括具有异戊二烯合酶多肽的至少一种活性的多肽、多肽片段、肽和融合多肽。示例性的聚丙烯焦磷酸合酶多肽和核酸包括来自任何本文所述来源生物体的天然存在的多肽和核酸。此外,聚丙烯焦磷酸合酶的变体可具有改善的活性如改善的酶活性。在一些方面,聚丙烯焦磷酸合酶变体具有其他改善的特性,例如改善的稳定性(如热稳定性)和/或改善的溶解性。示例性的聚丙烯焦磷酸合酶核酸可包括编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽例如(不限于)香叶基二磷酸(GPP)合酶、法尼基焦磷酸(FPP)合酶和香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)合酶或任何其他已知聚丙烯焦磷酸合酶多肽的核酸。

[0280] 在本发明的一些方面,任何本文组合物或方法中所述的细胞还包含一种或多种编码法尼基焦磷酸(FPP)合酶的核酸。FPP合酶多肽可以为内源基因编码的内源多肽。在一些方面,FPP合酶多肽由大肠杆菌中的内源ispA基因编码。编码FPP合酶多肽的内源核酸可有效连接至组成型启动子或可类似地有效连接至诱导型启动子。编码FPP合酶多肽的内源核酸可另外有效连接至强启动子。具体地讲,对细胞进行工程改造以相对于野生型细胞过表达内源FPP合酶多肽。

[0281] 在一些方面,FPP合酶多肽为异源多肽。本发明的细胞可包含不止一个拷贝的编码FPP合酶多肽的异源核酸。在一些方面,编码FPP合酶多肽的异源核酸有效连接至组成型启动子。在一些方面,编码FPP合酶多肽的异源核酸有效连接至诱导型启动子。在一些方面,编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸有效连接至强启动子。

[0282] 编码FPP合酶多肽的核酸可整合进宿主细胞的基因组中或者可在细胞中稳定表达。编码FPP合酶的核酸另外可位于载体上。

[0283] 可使用标准的方法,通过测量多肽在体外、在细胞提取物中或在体内将IPP转化为更高级的类异戊二烯的能力,来确定该多肽是否具有聚丙烯焦磷酸合酶多肽活性。这些方法是本领域所熟知的并且例如在如下参考文献中进行描述:美国专利No.:7,915,026;Hsieh等人,Plant Physiol.(《植物生理学》)2011年3月;155(3):1079-90;Danner等人,Phytochemistry.(《植物化学》)2011年4月12日[印刷版之前的电子出版物];Jones等人,J Biol Chem.(《生物化学杂志》)2011年3月24日[印刷版之前的电子出版物];Keeling等人,BMC Plant Biol.(《BMC植物生物学》)2011年3月7日;11:43;Martin等人,BMC Plant Biol.(《BMC植物生物学》)2010年10月21日;10:226;Kumeta和Ito,Plant Physiol.(《植物生理学》)2010年12月;154(4):1998-2007;以及Köllner和Boland,J Org Chem.(《有机化学杂志》)2010年8月20日;75(16):5590-600。

[0284] 能够增加类异戊二烯的产量的重组细胞(例如细菌细胞)

[0285] 本文所述的重组细胞(例如细菌细胞)具有产生类异戊二烯的能力,所产类异戊二烯的浓度高于缺少一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一个或多个拷贝的编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸的相同细胞的该浓度,任选在基本培养基中培养时。在一些情况下,该一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一个或多个拷贝的编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸为整合进宿主细胞的染色体中的异源核酸。与不包含来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的产类异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比,该细胞(例如细菌细胞)可产生高至少5%的量的类异戊二烯。或者,该细胞(例如细菌细胞)可产生高约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%的类异戊二烯,包括这些数以及这些数之间的任何数值。

[0286] 在本发明的一个方面、提供了包含一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一种或多种编码甲羟戊酸(MVA)下游途径多肽的异源核酸、一种或多种编码DXP途径多肽的异源核酸和一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶的异源核酸的细胞(例如细菌细胞)。该细胞可还包含一种或多种编码IDI多肽的异源核酸。另外,该聚丙烯焦磷酸合酶多肽可以为FPP合酶多肽。该一种或多种异源核酸可有效连接至组成型启动子、可有效连接至诱导型启动子或可有效连接至诱导型启动子和组成型启动子的组合。该一种或多种异源核酸可另外有效连接至强启动子、弱启动子和/或中等启动子。编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽、甲羟戊酸(MVA)下游途径多肽和DXP途径多肽以及聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸中的一者或多者可以整合进宿主细胞的基因组中或可在细胞中稳定表达。该一种或多种异源核酸另外可位于载体上。

[0287] 本发明提供的是使用任何上述细胞来增大类异戊二烯产量的方法。细胞的类异戊二烯产量可通过一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一种或多种编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或

多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸的表达来增大。如本文所用,“增大的”类异戊二烯产量是指与不具有一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽、MVA下游途径多肽、DXP途径多肽和/或来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞相比,任何本文所述组合物和方法所描述的细胞增加的针对类异戊二烯产生的细胞生产力指数(CPI)、增加的类异戊二烯滴度、增加的类异戊二烯质量产率和/或增加的类异戊二烯比生产率。类异戊二烯的产量可增大约5%至约1,000,000倍。与不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的类异戊二烯产量相比,类异戊二烯的产量可增大约10%至约1,000,000倍(如约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。

[0288] 可增大(如通过一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一种或多种编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸的表达来增大)根据任何本文所述方法的细胞的类异戊二烯产量。类异戊二烯的产量可增大约5%至约1,000,000倍。与天然存在的细胞(如不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞)的类异戊二烯产量相比,类异戊二烯产量可增大约10%至约1,000,000倍(如约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。

[0289] 与天然存在的细胞或不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的类异戊二烯产量相比,类异戊二烯产量可还增大至少约如下中的任一者:5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍或1,000,000倍。

[0290] 使用重组细胞来产生类异戊二烯分子的方法

[0291] 本发明还提供的是产生类异戊二烯的方法,包括培养包含一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽、MVA下游途径多肽和聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸的细胞(例如细菌细胞)。类异戊二烯可从任何本文所述和根据任何本文所述方法的细胞产生。可将任何所述细胞用于从碳水化合物(包括六碳糖如葡萄糖)产生类异戊二烯的目的。

[0292] 因而,本发明提供的是产生类异戊二烯的方法,包括在适于产生异戊二烯的条件下培养包含一种或多种编码来自格氏李斯特菌、尿肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞(例如细菌细胞)以及(b)产生类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯。该细胞可还包含一种或多种编码上述MVA下游途径多肽(如MVK、PMK、MVD和/或IDI)和任何上述聚丙烯焦磷酸合酶多肽的核酸分子。在一些方面,该细胞(例如细菌细胞)可以是任何本文所述细胞。任何本文所述聚丙烯焦磷酸合酶或其变体、任何本文所述微

生物(例如细菌)菌株或植物细胞、任何本文所述启动子和/或任何本文所述载体也可用于利用任何本文所述能量来源(如葡萄糖或任何其他六碳糖)来产生类异戊二烯。在一些方面,产生类异戊二烯的方法还包括回收类异戊二烯的步骤。

[0293] 产生类异戊二烯的方法可类似地包括如下步骤:(a)培养不内源具有来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生类异戊二烯,其中当与不包含来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的产类异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比时,该细胞(例如细菌细胞)产生较大量的类异戊二烯。

[0294] 当与不包含来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的产类异戊二烯细胞(例如细菌细胞)相比时,产生类异戊二烯的本发明方法可产生高至少5%的量的类异戊二烯。或者,该细胞(例如细菌细胞)可产生高约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%的类异戊二烯,包括这些百分数。在一些方面,产生类异戊二烯的方法还包括回收类异戊二烯的步骤。

[0295] 本发明提供的是使用任何上述细胞来增大类异戊二烯产量的方法。细胞的类异戊二烯产量可通过一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸、一种或多种编码MVA下游途径多肽的异源核酸和一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽的异源核酸的表达来增大。如本文所用,“增大的”类异戊二烯产量是指与不具有一种或多种编码聚丙烯焦磷酸合酶多肽、MVA下游途径多肽、DXP途径多肽和/或来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞相比,任何本文所述组合物和方法所描述的细胞增加的针对类异戊二烯产生的细胞生产力指数(CPI)、增加的类异戊二烯滴度、增加的类异戊二烯质量产率和/或增加的类异戊二烯比生产率。类异戊二烯的产量可增大约5%至约1,000,000倍。与不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的类异戊二烯产量相比,类异戊二烯的产量可增大约10%至约1,000,000倍(如约1至约500,000倍、约1至约50,000倍、约1至约5,000倍、约1至约1,000倍、约1至约500倍、约1至约100倍、约1至约50倍、约5至约100,000倍、约5至约10,000倍、约5至约1,000倍、约5至约500倍、约5至约100倍、约10至约50,000倍、约50至约10,000倍、约100至约5,000倍、约200至约1,000倍、约50至约500倍或约50至约200倍)。

[0296] 与不表达一种或多种编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS多肽的异源核酸的细胞的类异戊二烯产量相比,类异戊二烯产量可还增大至少约如下中的任一者:10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍或1,000,000倍。

[0297] 此外,可将更具体的细胞培养条件用于培养本文所述方法中的细胞。例如,在一些方面,产生类异戊二烯的方法包括(a)在34℃下培养不内源具有来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌和/或铅黄肠球菌的mvaE基因和mvaS基因的细胞(例如细菌细胞;包括但不限于大肠杆菌细胞),其中该细胞(例如细菌细胞)异源表达在低至中等拷贝质粒上且处于

强启动子控制下的一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽的基因;以及(b)产生类异戊二烯,例如甲羟戊酸。在一些方面,产生甲羟戊酸的方法还包括回收类异戊二烯前体分子和/或类异戊二烯的步骤。

#### [0298] 载体

[0299] 可将合适的载体用于任何本文所述组合物和方法。例如,可将合适的载体用于优化一个或多个拷贝的编码来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE多肽和mvaS多肽、异戊二烯合酶、聚丙烯焦磷酸合酶和/或一种或多种MVA途径多肽的基因在厌氧菌中的表达。在某些方面,载体包含选择标记。选择标记的例子包括但不限于抗生素抗性核酸(例如,卡那霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素、庆大霉素、潮霉素、腐草霉素、博来霉素、新霉素或氯霉素)和/或赋予宿主细胞代谢优势(如营养优势)的核酸。在一些方面,一个或多个拷贝的来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS核酸、异戊二烯合酶核酸、聚丙烯焦磷酸合酶核酸和/或一种或多种MVA途径多肽核酸整合进不具有选择标记的宿主细胞的基因组中。

[0300] 可使用本公开的实例中表征或使用的载体中的任一者。

#### [0301] 转化方法

[0302] 可使用合适的技术将编码一个或多个拷贝的来自格氏李斯特菌、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的mvaE和mvaS核酸、异戊二烯合酶和/或MVA下游途径多肽的核酸插入微生物中。另外,可使用将DNA构建体或载体引入宿主细胞中的标准技术,例如转化、电穿孔、核显微注射、转导、转染(如脂质转染介导的或DEAE-糊精介导的转染或使用重组噬菌体病毒的转染)、使用磷酸钙-DNA沉淀进行温育、用DNA包被的微粒进行高速轰击以及原生质体融合,将异戊二烯合酶、IDI、DXP途径和/或聚丙烯焦磷酸合酶核酸或含有它们的载体插入宿主细胞(如本文所述的植物细胞、真菌细胞、酵母细胞或细菌细胞)中。通用的转化技术是本领域已知的(参见例如Current Protocols in Molecular Biology(《现代分子生物学实验手册》)(F.M.Ausubel等人(编辑)第9章,1987;Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验手册》),第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor),1989;以及Campbell等人,Curr.Genet.(《当代遗传学》)16:53-56,1989)。所引入的核酸可整合进染色体DNA中或作为染色体外复制型序列维持。可以通过本领域中已知的任何方法选择转化体。适于选择转化体的方法在国际公开No.WO2009/076676、美国专利申请No.12/335,071(美国公开No.2009/0203102)、WO2010/003007、美国专利公开No.2010/0048964、WO2009/132220以及美国专利公开No.2010/0003716中进行了描述。

#### [0303] 示例性的纯化方法

[0304] 在一些方面,任何本文所述方法还包括回收所产生的化合物的步骤。在一些方面,本文所述的任何方法还包括回收异戊二烯的步骤。在一些方面,通过吸收汽提(absorption stripping)(参见例如美国公开No.2011/0178261,将其内容以引用的方式并入,尤其是关于其中所公开的吸收汽提和纯化技术的内容)回收异戊二烯。在一些方面,任何本文所述方法还包括回收异源多肽的步骤。在一些方面,任何本文所述方法还包括回收萜类化合物或类胡萝卜素的步骤。

[0305] 合适的纯化步骤在美国专利申请公开US2010/0196977A1中有更详细描述。

[0306] 通过参照以下实例能进一步理解本发明,这些实例以举例说明的方式提供而非旨

在进行限制。

[0307] 实例

[0308] 实例1:大肠杆菌菌株CMP451(含有BL21pgl+PL.2mKKDyI GI1.2gltA)、CMP452和CMP453的构建

[0309] BL21(Novagen公司)中柠檬酸合酶基因(gltA)前面的启动子已被组成型低表达启动子即GI1.2替换(美国专利7,371,558)。gltA的两种野生型启动子已有所描述(Wilde,R和J.Guest.1986.J.Gen.Microbiol.(《普通微生物学杂志》)132:3239-3251),并且合成的启动子刚好插在远端启动子的-35区之后。使用引物Up g l t A C m - F ( 5 ' - TATTTAATTTTAAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTA CAATTAACCCTCACTAAAGGGCGG-3')和DngltA1.xgiCm-R(5'-TCAACAGCTGTATCCCCGTTGAGGGTGAGTTTGTCTTTGTATCAGCCATATATTTCCACCCAGCTATTTGTTAGTGAATAAAGTGGTTGAATTATTTGCTCAGGATGTGGCATHGTCAAGGGCTAATACGACTCACTATAGGGCTC G-3'),并将来自德国海德堡的基因桥公司(Gene Bridges,Heidelberg,Germany)的质粒FRT-gb2-Cm-FRT作为模板,来获得PCR产物。如制造商(德国海德堡的基因桥公司)所述将PCR产物纯化并将其用于λ-Red介导的重组。选择若干菌落用于进一步的表征。使用引物g l t A P r o m S e q F : 5 ' - GGCAGTATAGGCTGTTCAAAAATC-3'和gltApromSeqR:5'-CTTGACCCAGCGTGCCTTTCAGC-3'以及作为模板的DNA来对启动子区进行PCR扩增,该DNA通过将菌落重悬浮于30uL H2O中、在95C下加热4分钟、离心来提取,并且在50uL反应物中使用2uL该材料作为模板。观察获得的PCR产物的测序结果之后,保存携带三个不同启动子GI1.2、GI1.5和GI1.6(美国专利7,371,558)中的每一种的菌落供进一步使用(CMP141、CMP142和CMP143;表3)。

[0310] 表3:大肠杆菌菌株

[0311]

| 菌株       | 描述                                                                      | 亲本                         |
|----------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| CMP141   | BL21 Cm-GI1.2 gltA                                                      | BL21                       |
| CMP142   | BL21 Cm-GI1.5 gltA                                                      | BL21                       |
| CMP143   | BL21 Cm-GI1.6 gltA                                                      | BL21                       |
| CMP258   | BL21 pgl+                                                               | BL21                       |
| CMP374   | BL21 pgl+ PL.2-mKKDyI ldhA::Kan                                         | MD09-314                   |
| CMP440   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI Cm-GI1.2 gltA                                     | MD09-314                   |
| CMP441   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI Cm-GI1.5 gltA                                     | MD09-314                   |
| CMP442   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI Cm-GI1.6 gltA                                     | MD09-314                   |
| CMP451   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA                                        | CMP440                     |
| CMP452   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI1.5 gltA                                        | CMP441                     |
| CMP453   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI1.6 gltA                                        | CMP442                     |
| CMP604   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI 1.2 gltA<br>ackA-pta::Cm                       | CMP451                     |
| CMP620   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI 1.2 gltA ML<br>ackA-pta::Cm ldhA::Kan          | CMP604                     |
| CMP635   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI 1.2 gltA ML<br>ackA-pta ldhA                   | CMP620                     |
| CMP646   | BL21 attB:Cm (以恢复 LowerP) col1                                          | BL21 (Novagen 公司)          |
| CMP676   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI 1.2 gltA ML<br>ackA-pta ldhA attB::Cm          | CMP635                     |
| CMP680   | BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI 1.2 gltA ML<br>ackA-pta ldhA attB::Cm, pCHL276 | CMP676                     |
| MCM521   | BL21 neo-PL.2-mKKDyI                                                    | (美国专利申请<br>No. 12/978,324) |
| MD09-313 | BL21 pgl+ neo-PL.2-mKKDyI                                               | CMP258                     |
| MD09-314 | BL21 pgl+ PL.2-mKKDyI                                                   | MD09-313                   |
| MD491    | BL21 pgl+ ackA-pta::Cm                                                  | CMP258                     |

[0312] 通过用来自菌株MCM521(参见美国专利申请公开No.2011/0159557)的P1溶胞产物转导CMP258(参见美国专利申请No.12/978,324)并在含有20ug/ml卡那霉素的Luria-Bertani板上选择菌落而构建菌株MD09-313。P1溶胞产物根据Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(《现代分子生物学实验方法》),约翰威立父子出版公司(John Wiley and Sons,Inc.)中描述的方法制备。利用制造商(德国海德堡基因桥公司)的推荐方案移除卡那霉素标记以形成菌株MD09-314。

[0313] 由菌株CMP141、CMP142和CMP143制备P1溶胞产物并将其用于转导菌株MD09-314,以分别形成CMP440、CMP441和CMP442(表3)。用制造商(德国海德堡基因桥公司)推荐的方案移除氯霉素标记,以分别形成菌株CMP451、CMP452和CMP453(表3)。

[0314] 实例2:大肠杆菌菌株CMP604(含有BL21pgl+PL.2mKKDyI GI1.2gltA ML ackA-pta::Cm)的构建

[0315] 使用其中氯霉素标记仍在其中的菌株Triple Triple(US7,745,184B2)作为模板以及使用引物ackACF(5'-GTGCAAATTCACAACTCAGCGG)和ptaCR(CACCAACGTATCGGGCAT TGCC-3'),通过PCR扩增含有被氯霉素标记破坏的ackA-pta基因的DNA片段。按照制造商(德国海

德堡的基因桥公司)的建议将所获得的PCR产物用于重组反应以在菌株CMP258(美国专利申请No.12/978,324)的ackA-pta基因座位处整合该PCR产物。在LB+5ug/ml的氯霉素上选择菌落。挑选一个菌落并命名为MD491。制备MD491的P1溶胞产物并将其用于转导菌株CMP451。在LB+5ug/ml的氯霉素上选择菌落。挑选一个菌落并命名为CMP604。

[0316] 实例3:大肠杆菌菌株CMP620(含有BL21pgl+PL.2mKKDyI GI1.2gltA ML ackA-pta::Cm ldhA::Kan)和CMP635(含有BL21pgl+PL.2mKKDyI GI1.2gltA ML ackA-pta ldhA)的构建

[0317] 使用来自Keio集(Keio collection)(Baba等人,2006.Mol.Syst.Biol.(《分子系统生物学》)2:2006.0008)的菌株JW1375作为模板,以及使用引物ldhAseqR(5'-GGCTTACCGTTTACGCTTTCCAGC-3')和ldhAseqF2(5'-CTAATGCAATACGTGTCCCGAGC-3'),通过PCR扩增含有被卡那霉素标记破坏的ldhA基因的DNA片段。按照制造商(德国海德堡的基因桥公司)的建议将所获得的PCR产物用于重组反应以在菌株MD09-313的ldhA基因座位处整合该PCR产物。在LB+20ug/ml的氯霉素上选择菌落。挑选一个菌落并命名为CMP374。制备CMP374的P1溶胞产物并将其用于转导CMP604。在LB+20ug/ml的氯霉素上选择菌落。挑选一个菌落并命名为CMP620。在通过将pCP20(Datsenko和Wanner,2000.PNAS97:6640-5)电穿孔进该菌株中、于30℃在LB+50ug/ml羧苄青霉素上选择两个菌落、然后于42℃将这些菌落重新划线接种于LB板上,来同时环出氯霉素和卡那霉素标记。从那些板选择Cm<sup>S</sup>和Kan<sup>S</sup>菌落并命名为CMP635。

[0318] 实例4:大肠杆菌菌株CMP676(含有BL21pgl+PL.2mKKDyI GI1.2gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm)的构建

[0319] 使用质粒pKD3(Datsenko和Wanner,2000,PNAS97:6640-5)作为模板以及使用引物tCMP171(5'-AAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTACATGGGAATTAGCCATGG TCC-3')和CMP172(5'-GACCAAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGGCATTTTCTTGGTGTAGGCTGGAGCTG CTTCG-3'),通过PCR扩增含有氯霉素标记的DNA片段,该氯霉素标记旁侧为与λ附着点attB的上游区和下游区同源的DNA。按制造商(德国海德堡的基因桥公司)的建议将所获得的PCR产物用于BL21(Novagen公司)中的重组反应以在λ附着点attB处整合该PCR产物。从而产生菌株CMP646,并在LB+5ug/ml氯霉素上进行选择。制备CMP646的P1溶胞产物并将其用于菌株CMP635上的转导反应,从而从该菌株的染色体移除甲羟戊酸下游途径(甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶和异戊烯二磷酸异构酶)。将该转导反应物涂布接种于LB+氯霉素5ug/ml上,挑选一个菌落并命名为CMP676。

[0320] 实例5:大肠杆菌菌株CMP680(BL21pgl+PL.2mKKDyI GI1.2gltAML ackA-pta ldhA attB::Cm,pCHL276)的构建及甲羟戊酸的检测

[0321] 通过电穿孔将质粒pCHL276(参见实例6(iii))引入CMP676中。在LB+50ug/mL壮观霉素上选择菌落。挑选一个菌落并命名为CMP680。

[0322] (i)甲羟戊酸产率测定法

[0323] 在装有2mL LB肉汤的摇管中温育上面鉴定的菌株的过夜培养物,该LB肉汤补充有50μg/mL壮观霉素(Novagen)。然后在34℃下以250rpm温育培养物14小时。接着,将培养物稀

释进5mL48孔板(爱思进科学公司(Axygen Scientific))中至最终OD为0.2,该板含有2mL TM3培养基,该培养基补充有1%葡萄糖、酵母提取物至终浓度为0.1%以及200 $\mu$ M IPTG。用 Breath Easier膜(Diversified Biotech公司)密封该板并在34℃下在Shel Lab摇动器/温育箱中以600rpm温育24小时。将1mL每份培养物以3,000 $\times$ g离心5分钟。将250 $\mu$ l上清液添加至19 $\mu$ L的20%硫酸并在冰上温育5分钟。然后将该混合物以3000 $\times$ g离心5分钟,收集上清液用于HPLC分析。将200 $\mu$ l上清液转移至HPLC兼容的96孔锥底聚丙烯板(Nunc公司)。通过与甲羟戊酸(西格玛公司)的标准曲线进行比较来测定样品中甲羟戊酸的浓度。通过根据制造商的说明书(波音特科技有限公司(Pointe Scientific, Inc.))进行葡萄糖氧化酶测定法来测量葡萄糖浓度。

[0324] (ii)甲羟戊酸的HPLC检测:

[0325] HPLC分析在Agilent1100系列HPLC系统上进行,该HPLC系统包括折射率检测器,使用在50℃下温育的300mm $\times$ 7.8mm BioRad-Aminex HPX-87H离子排斥柱(目录号为125-0140)并且装配有BioRad-Microguard Cation H refill130mm $\times$ 4.6mm(目录号为125-0129)。将样品在0.01N硫酸运行缓冲液中以0.6ml/min的流速运行。用折射率检测器检测甲羟戊酸。

[0326] 实例6:表达来自格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鸢鸡肠球菌EG2和铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因的大肠杆菌菌株MCM1373-1377的构建

[0327] (i)基因鉴定和选择

[0328] 使用设在NCBI网站的BLASTp程序(Stephen F.Altschul,Thomas L.Madden, Alejandro A.Sch?ffer,Jinghui Zhang,Zheng Zhang,Webb Miller和David J.Lipman (1997),“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”,Nucleic Acids Res.(《核酸研究》)25:3389-3402)进行一级序列同源性搜索,将粪肠球菌mvaE基因产物用作查询序列。从搜索结果选择所关注的序列。

[0329] 通常,分别地,与野生型粪肠球菌mvaE和mvaS核酸和蛋白质序列相比,所关注的mvaE和mvaS基因序列显示出59-66%核苷酸序列同一性(经密码子优化;参见表4)和59-71%氨基酸序列同一性(表5)。

[0330] 表4:mvaE和mvaS核苷酸(经密码子优化)与粪肠球菌WT相比的同一性百分比

[0331]

| 物种        | <i>mvaE</i> 基因<br>(同一性百分比) | <i>mvaS</i> 基因<br>(同一性百分比) |
|-----------|----------------------------|----------------------------|
| 格氏李斯特菌    | 62                         | 64                         |
| 屎肠球菌      | 60                         | 59                         |
| 鸢鸡肠球菌 EG2 | 60                         | 65                         |
| 铅黄肠球菌     | 60                         | 66                         |

[0332] 表5:mvaE和mvaS氨基酸序列与粪肠球菌WT相比的同一性百分比

[0333]

| 物种        | <i>mvaE</i> 基因<br>(同一性百分比) | <i>mvaS</i> 基因<br>(同一性百分比) |
|-----------|----------------------------|----------------------------|
| 格氏李斯特菌    | 59                         | 70                         |
| 屎肠球菌      | 61                         | 60                         |
| 鸸鸡肠球菌 EG2 | 60                         | 69                         |
| 铅黄肠球菌     | 59                         | 71                         |

[0334] (ii) 质粒 pDW83、pMCM1223-pMCM1225

[0335] 针对在大肠杆菌中的表达对来自铅黄肠球菌 EC10 的 *mvaE* 和 *mvaS* 的编码序列进行优化 (GeneOracle 公司), 并亚克隆进表达载体 MCM82 (美国专利申请公开 No. US2010/0196977, 段落 [1023]) 中以产生 pDW83。具体地讲, 利用标准的分子生物学技术用限制酶 BglII 和 PmeI (罗氏公司 (Roche)) 从克隆载体 GcD126 (GeneOracle 公司) 切出带有 *mvaES* 操纵子的盒。然后将该片段连接 (Roche Rapid Ligation) 进 MCM82 中, 此前已将 MCM82 用酶 BamHI 和 PmeI (罗氏公司) 进行了限制性消化, 然后进行琼脂糖凝胶分离 (Invitrogen E-Gel) 以使用标准的分子生物学技术移除编码来自粪肠球菌的 *mvaES* 的表达盒。根据生产商的推荐方案将该连接混合物转化进化学感受态 Top10 细胞 (英杰公司 (Invitrogen)) 中。将壮观霉素抗性阳性转化株在液体 LB 培养基中培养, 并纯化 (Qiagen Miniprep) 质粒, 使用引物 Ec Seq1F 至 4R (表 6) 通过测序 (Quintara Biosciences 公司) 进行验证。

[0336] 表 6: 测序引物

[0337]

|          |                             |
|----------|-----------------------------|
| Ec Seq1F | 5'-GGGTATGAAAGCGATTCTGA-3'  |
| Ec Seq2F | 5'-AGCCCAAGGCGCTATTACCG-3'  |
| Ec Seq3F | 5'-GGATTAGTTCAAAATTTGGC-3'  |
| Ec Seq4F | 5'-CGGTTAATGGCACGTTATGA-3'  |
| Ec Seq1R | 5'-TCGTTTCGCCTGTAACTGCT-3'  |
| Ec Seq2R | 5'-TGCTCTATTTTCAGTACCTTT-3' |
| Ec Seq3R | 5'-TGTAAGTTCAGGCCACGCC-3'   |
| Ec Seq4R | 5'-CCTCAGCCTTGTGTGAATAA-3'  |

[0338] 由 GeneOracle 公司 (加州山景城 (Mountain View, CA)) 使用表 7 中的设计构建编码来自屎肠球菌、格氏李斯特菌和鸸鸡肠球菌的 *mvaE* 和 *mvaS* 的质粒。产生编码 *mvaE*-RBS-*mvaS* 的合成 DNA, 然后克隆进 pMCM82 的 NcoI 和 PstI 位点之间, 从而代替现有的操纵子。该载体为 *mvaE* 提供了 RBS。

[0339] 表 7: 编码来自屎肠球菌、格氏李斯特菌和鸸鸡肠球菌的 *mvaE* 和 *mvaS* 的质粒 pMCM1223-pMCM1225 的设计

[0340]

| 质粒标识符    | 质粒名称                                               | 来源生物体                   | <i>MvaE</i>                                                                                | <i>MvaS</i>                                                             | 起源和选择                  |
|----------|----------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| pMCM1223 | pCL-Ptrc-Upper_GcMM_161 (格氏李斯特菌 <i>DSM 20601</i> ) | 格氏李斯特菌 <i>DSM 20601</i> | gi 229554876 ref ZP_04442665.1 乙酰辅酶 A 乙酰转移酶/羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶, 降解型 [格氏李斯特菌 <i>DSM 20601</i> ] | gi 229554877 ref ZP_04442666.1 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 [格氏李斯特菌 <i>DSM 20601</i> ] | pSC101, 壮观霉素 (50ug/mL) |
| pMCM1224 | pCL-Ptrc-Upper_GcMM_162 (屎肠球菌)                     | 屎肠球菌                    | gi 9937391 gb AAG02444.1 AF290094_2 乙酰辅酶 A 乙酰转移酶                                           | gi 9937390 gb AAG02443.1 AF290094_1 HMG-CoA 合酶                          | pSC101, 壮观霉素 (50ug/mL) |

[0341]

|          |                                     |           |                                                                        |                                                          |                        |
|----------|-------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------|
|          |                                     |           | /HMG-CoA 还原酶 [屎肠球菌]                                                    | [屎肠球菌]                                                   |                        |
| pMCM1225 | pCL-Ptrc-Upper_GcMM_163 (鸪鸡肠球菌 EG2) | 鸪鸡肠球菌 EG2 | gi 257869528 ref ZP_05649181.1 乙酰辅酶 A 乙酰转移酶/羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 [鸪鸡肠球菌 EG2] | gi 257869527 ref ZP_05649180.1 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 [鸪鸡肠球菌 EG2] | pSC101, 壮观霉素 (50ug/mL) |

[0342] (iii)pCL\_pTrc-Upper(粪肠球菌)-无先导序列构建体(pCHL276)

[0343] 设计引物(CL483F:5'-AGGAGGAATAAACCATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGCATTAC-3'; CL484R:5'-ACTACTGTTTTTCATGGTTTATTCCTCCTTATTTAATCGATAC-3')以移除pCL\_pTrc-Upper(粪肠球菌)即MCM82质粒上的额外RBS。PCR反应物由模板DNA即MCM82(100ng)、50uM每种正向引物和反向引物、1uL的10mM dNTP(罗氏公司)、5uL的10X PfuII反应缓冲液(安捷伦公司(Agilent))、1uL的Pfu II融合酶(安捷伦公司)和40uL的水组成。在Bio-Rad热循环仪中进行八个循环,温度分布为:95℃下50秒,60℃下50秒且在68℃下9分钟并且在68℃下进行另外10分钟延伸。完成该PCR反应后添加DpnI(1uL)并在37℃下温育2个小时以移除模板DNA。添加另外1uL的DpnI并在37℃下温育过夜。将2微升的该反应物转化进TOP10细胞(英杰公司)中并涂布接种于LB+50μg/mL壮观霉素上。通过测序确认正确的克隆。

[0344] (iv)pCL\_pTrc-Upper(铅黄肠球菌)-无先导序列构建体(pCHL277)

[0345] 设计引物(CL485F:5'-AGGAGGAATAAACCATGGAAGAAGTTGTCATCATTGACGCAC-3'; CL486R:5'-ACTTCTTCCATGGTTTATTCCTCCTTATTTAATCG-3')来移除pCL\_pTrc-Upper(铅黄肠球菌)即pDW83质粒上的额外RBS。该PCR反应物由模板DNA即pDW83(100ng)、50uM的每种正向引物(CL483F)和反向引物(CL484R)、1uL的10mM dNTP(罗氏公司)、5uL的10X PfuII反应缓冲液(安捷伦公司)、1uL的Pfu II融合酶(安捷伦公司)和40uL的水组成。在Bio-Rad热循环仪中进行八个循环,温度分布为:95℃下50秒,60℃下50秒且在68℃下9分钟并且在68℃下进行另外10分钟延伸。完成PCR反应后添加DpnI(1uL)并在37℃下温育两小时以移除模板DNA。添加另外1uL的DpnI并在37℃下温育过夜。将2微升的该反应物转化进TOP10细胞(英杰公

司)中并涂布接种于LA/spec50上。通过测序确认正确的克隆。

[0346] (v)高产率产MVA菌株MCM1373-1377的构建

[0347] 将宿主CMP676在LB中于37C下培养至对数中期并通过在一半培养体积的冰冷重蒸水中洗涤3次并重新悬浮于十分之一培养体积的冰冷重蒸水中准备进行电穿孔。将100uL的细胞悬浮液与1uL质粒DNA组合,移至2mm电穿孔皿,在25uFD、200ohms、2.5kV下电穿孔,并立即用500uL LB淬灭。在37C下摇动1小时后回收细胞,然后在37C下在含有50ug/mL壮观霉素的LB板上过夜来选择转化株。将多个单一克隆在LB+50ug/mL壮观霉素中于37C下培养至OD600~1。将500uL发酵液与1mL50%甘油混合并在干冰上冷冻。将冷冻的原种于-80C下保存。

[0348] 实例7:以15L规模分批补料培养的、表达来自甲羟戊酸途径的基因的工程化大肠杆菌菌株的甲羟戊酸生产率度量的检验

[0349] (i)材料

[0350] 培养基配方(每升发酵培养基):

[0351] 磷酸钾 $K_2HPO_4$ 7.5g、硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g、柠檬酸一水合物 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 2g、柠檬酸铁铵 $NH_4FeC_6H_5O_7$ 0.34g、酵母提取物(来自思宾格公司)0.5g、1000X改良痕量金属溶液1.5ml、硫酸50%重量/体积2.26ml、foamblast882(艾默罗德性能材料公司)0.83ml、宏量盐溶液(Macro Salts Solution)3.36ml。将所有组分一起加入并溶解于去离子水中。将该溶液加热灭菌(123°C 20分钟)。冷却至室温后,用氢氧化铵(28%)将pH调节至7.0,然后定容。灭菌和pH调节后添加料液#116.7g、维生素溶液11.9mL和壮观霉素溶液5ml。

[0352] 1000X改良痕量金属溶液(每升):

[0353] 柠檬酸 $\cdot H_2O$ 40g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 30g、NaCl 10g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100mg、 $H_3BO_3$ 100mg、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 100mg。以每次溶解一种物质的方式将每种组分溶于去离子水中,用HCl/NaOH将pH调至3.0,然后将溶液定容并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0354] 宏量盐溶液(每升):

[0355]  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 296g、一水合柠檬酸296g、柠檬酸铁铵49.6g。用水溶解所有组分,定容并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0356] 维生素溶液(每升):

[0357] 盐酸硫胺素1.0g、D-(+)-生物素1.0g、烟酸1.0g、盐酸吡哆醇4.0g。以每次溶解一种物质的方式用去离子水溶解每种组分,用HCl/NaOH将pH调节至3.0,然后对溶液定容,并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0358] 壮观霉素溶液(每升):

[0359] 将50g壮观霉素用去离子水定容并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0360] 料液#1(每千克):

[0361] 葡萄糖0.590kg、去离子水0.394kg、 $K_2HPO_4$ 7.4g,以及Foamblast8828.94g。将所有组分混合并高压灭菌。

[0362] (ii)实验方法

[0363] 在15L生物反应器中用表8中描述的大肠杆菌BL21菌株进行发酵。每种菌株在相同的条件下运行两次,所以生产率结果可报告为两个结果的平均值。

[0364] 表8:在15L规模的分批补料培养物中检验的产甲羟戊酸菌株的列表

[0365]

|             |                                                                         |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------|
| CMP680      | HMB GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm, pCLPtrcUpper(rbs) (pCHL276)) |
| MCM137<br>3 | HMB GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Ef           |
| MCM137<br>4 | HMB GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Ec           |
| MCM137<br>5 | HMB GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Listeria     |
| MCM137<br>6 | HMB GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Efaecium     |
| MCM137<br>7 | HMB GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Eg           |

[0366] 将大肠杆菌菌株的冷冻小瓶解冻并接种进2.8L Erlynmeyer烧瓶中的胰蛋白胍-酵母提取物培养基(LB Miller培养基)中以用作生物反应器的接种物。在接种物生长至在550nm下测量的光密度(OD550)为1.0时,将500mL用于接种15-L生物反应器并使初始罐体积为5L。

[0367] 进行该实验以监测所需的发酵pH7.0和温度34℃下从葡萄糖形成甲羟戊酸。通过以每分钟8标准升的速率鼓泡空气在运行的持续时间内维持有氧条件,保持回压为70kPa(0.7巴)表压,并且保持搅拌速率为每分钟850转,使用叶轮和折流板将能量传送至液体培养基。

[0368] 利用脉冲进料程序提供葡萄糖料液。葡萄糖批料一耗竭(由pH升高指示( $\text{pH} \geq 7.05$ )),就添加3g/min的脉冲持续20分钟。然后,通过pH触发器( $\text{pH} \geq 7.05$ )诱发葡萄糖进料脉冲。脉冲持续30分钟,大小(g/min)等于总二氧化碳放出速率( $\text{mmol/hr}$ )除以足以保持发酵液中的残余葡萄糖过量的预定系数。在52小时发酵期间递送至生物反应器的葡萄糖进料总量因菌株而不同。通过添加异丙基- $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)来实现诱导。当细胞处于OD550为4时将一注IPTG添加至罐中以使浓度为400 $\mu\text{M}$ 。使用Hiden质谱仪测定来自生物反应器的废气中的氧气、氮气和二氧化碳水平。以4小时间隔从每个反应器取出一系列发酵液样品。通过HPLC测定葡萄糖、柠檬酸和甲羟戊酸的发酵液浓度。通过测量550nm下稀释的发酵液悬浮液的吸光度并乘以稀释因子来测定光密度,以报告结果(OD550)。通过使用先前产生的系数将OD550读数转化为干细胞质量,该系数将发酵的时间进程中OD550与干细胞重量相比较。使用上文给出的定义(参见“定义”),质量产率、比生产率和细胞生产力指数的生产率度量报告为来自每次运行的相当时间点处的两个结果的平均值。

[0369] (iii)小规模甲羟戊酸产率测定法

[0370] 将过夜培养物接种于装有2mL LB肉汤的摇管中,该肉汤补充有来自冷冻种菌的50 $\mu\text{g/mL}$ 壮观霉素(Novagen)和50 $\mu\text{g/mL}$ 羧苄青霉素(Novagen)。然后在34℃下以250rpm温育培养物14小时。接着,将培养物稀释进5mL48孔板(爱思进科学公司)中至最终OD为0.2,该板含有2mL TM3培养基,该培养基补充有1%葡萄糖、酵母提取物至总浓度为1%以及200 $\mu\text{M}$  IPTG。用Breath Easier膜(Diversified Biotech公司)密封该板并在34℃下在Shel Lab摇动器/温育箱中以600rpm温育24小时。将1mL每份培养物以3,000 $\times g$ 离心5分钟。将250 $\mu\text{L}$ 上清液添

加至19μL的20%硫酸并在冰上温育5分钟。然后将该混合物以3000×g离心5分钟,收集上清液用于HPLC分析。将200μL上清液转移至HPLC兼容的96孔锥底聚丙烯板(Nunc公司)。通过与甲羟戊酸(西格玛公司)的标准曲线进行比较来测定样品中甲羟戊酸的浓度。通过根据制造商的说明书(波音特科技有限公司)进行葡萄糖氧化酶测定法来测量葡萄糖浓度。

[0371] (iv)甲羟戊酸的HPLC检测:

[0372] HPLC分析在Waters2695Alliance HPLC系统上进行,该系统包含Knauer K2301折射率检测器,使用在50℃下温育的300mm×7.8mmBioRad-Aminex HPX-87H离子排斥柱(目录号为125-0140)并且装配有BioRad-Microguard Cation H refill30mm×4.6mm(目录号为125-0129)。将样品在0.01N硫酸运行缓冲液中以0.6ml/min的流速运行。能通过将每份样品的折射率响应与通过运行已知浓度的多种含甲羟戊酸溶液所产生的校准曲线相比较来定量甲羟戊酸的发酵液水平。

[0373] 分批培养物中含有来自生物体格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2、铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因的大肠杆菌从葡萄糖产生甲羟戊酸的质量产率范围为34.8%至41.1%(图1,表9)。

[0374] 表9:自葡萄糖产生甲羟戊酸的质量产率.S.D.代表两次重复的标准偏差。

| 菌株             | IPTG<br>(μM) | 质量产率(%) | S.D. |
|----------------|--------------|---------|------|
| CMP680         | 100          | 33.6    | 0.8  |
| MCM1373        | 100          | 31.8    | 0.8  |
| MCM1374        | 100          | 35.8    | 3.9  |
| MCM1375        | 100          | 34.6    | 0.2  |
| [0375] MCM1376 | 100          | 35.6    | 3.2  |
| MCM1377        | 100          | 41.0    | 0.1  |
| CMP680         | 200          | 35.3    | 0.1  |
| MCM1373        | 200          | 31.9    | 0.2  |
| MCM1374        | 200          | 39.2    | 3.0  |
| MCM1375        | 200          | 34.8    | 1.0  |
| MCM1376        | 200          | 37.9    | 3.3  |
| MCM1377        | 200          | 41.1    | 4.9  |

[0376] 在15L发酵罐中的分批补料培养中含有来自生物体格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2、铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因的大肠杆菌累积从葡萄糖产生甲羟戊酸的质量产率范围为39.1%至43.4%。(表10)。

[0377] 表10:累积质量产率结果(每种菌株2次运行的3个最终点的平均值)

| 菌株             | 上游酶                 | 质量产率(从葡萄糖产生甲羟戊酸)(w/w%) | 标准偏差(w/w%) | C.V.% |
|----------------|---------------------|------------------------|------------|-------|
| CMP680         | 粪肠球菌                | 37.3                   | 0.5        | 1.34% |
| [0378] MCM1374 | 铅黄肠球菌               | 41.3                   | 1.7        | 4.12% |
| MCM1375        | 格氏李斯特菌<br>DSM 20601 | 39.1                   | 2.0        | 5.12% |
| MCM1376        | 屎肠球菌                | 39.7                   | 0.7        | 1.76% |
| MCM1377        | 鹌鸡肠球菌 EG2           | 43.4                   | 1.1        | 2.53% |

[0379] 在15L发酵罐中的分批补料培养中含有来自生物体格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2、铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因的大肠杆菌的甲羟戊酸峰值比生产率范围为87.5至100.1g/L/h/OD(表11)。

[0380] 表11:所观测到的每种菌株的峰值比生产率(每个菌株2个轮次中所观察到的峰观测值的平均值)

| [0381] | 菌株      | 上游酶                        | 峰值比生产率<br>(mg/L/hr/OD) | 标准偏差<br>(mg/L/hr/OD) | C.V.% |
|--------|---------|----------------------------|------------------------|----------------------|-------|
|        | CMP680  | 粪肠球菌                       | 87.4                   | 7.2                  | 8.2%  |
|        | MCM1374 | 铅黄肠球菌                      | 100.1                  | 11.6                 | 11.6% |
|        | MCM1375 | 格氏李斯特菌<br><i>DSM 20601</i> | 87.5                   | 26.7                 | 30.5% |
|        | MCM1376 | 屎肠球菌                       | 93.9                   | 14.2                 | 15.1% |
|        | MCM1377 | 鹌鸡肠球菌<br><i>EG2</i>        | 88.6                   | 13.9                 | 15.7% |
|        |         |                            |                        |                      |       |

[0382] 最后,含有来自生物体格氏李斯特菌DSM20601、屎肠球菌、鹌鸡肠球菌EG2、铅黄肠球菌的mvaE和mvaS基因的大肠杆菌中甲羟戊酸滴度范围为108.2至115.4g/L(表12),并且CPI范围为4.86至5.80g甲羟戊酸/g葡萄糖(表13)。

[0383] 表12:所观测到的每个菌株的峰值甲羟戊酸滴度(每组运行的在48小时时观测到的发酵液滴度的平均值)

| [0384] | 菌株      | 上游酶                 | 峰值甲羟戊酸滴度在 48 小时 EFT<br>(g/L) | 标准偏差<br>(g/L) | C.V.% |
|--------|---------|---------------------|------------------------------|---------------|-------|
|        | CMP680  | 粪肠球菌                | 122.8                        | 5.8           | 4.7%  |
|        | MCM1374 | 铅黄肠球菌               | 115.4                        | 4.1           | 3.6%  |
|        | MCM1375 | 格氏李斯特菌<br>DSM 20601 | 108.2                        | 4.8           | 4.4%  |
|        | MCM1376 | 屎肠球菌                | 110.1                        | 12.0          | 10.9% |
|        | MCM1377 | 鹌鸡肠球菌<br>EG2        | 111.2                        | 6.1           | 5.5%  |

[0385] 表13:每个菌株的CPI值(每组运行的在44小时和48小时时观测到的CPI值的平均值)

[0386]

| 菌株      | 上游酶                 | CPI (g/g) | 标准偏差(g/g) | C.V.% |
|---------|---------------------|-----------|-----------|-------|
| CMP680  | 粪肠球菌                | 4.25      | 0.25      | 5.9%  |
| MCM1374 | 铅黄肠球菌               | 5.70      | 0.37      | 6.5%  |
| MCM1375 | 格氏李斯特菌<br>DSM 20601 | 4.86      | 0.73      | 15.0% |
| MCM1376 | 屎肠球菌                | 5.29      | 0.12      | 2.3%  |
| MCM1377 | 鹌鸡肠球菌<br>EG2        | 5.80      | 0.52      | 8.9%  |

[0387] 实例8:产异戊二烯菌株的构建

[0388] 通过用来自MCM521的溶胞产物转导进CMP676中可引入甲羟戊酸下游途径(参见表3)。根据制造商(德国海德堡的基因桥公司)环出卡那霉素标记。可通过利用替代基因修饰每个基因前面的rbs来改变操纵子上游的启动子而修饰来自MCM521的下游途径。将质粒pMCM1223(格氏李斯特菌)、pMCM1224(屎肠球菌)、pMCM1225(鹌鸡肠球菌)、pCHL276(粪肠球菌)或pCHL277(铅黄肠球菌)与质粒pDW34的变型(参见美国专利申请公开No:2010/0196977;图2)一起共同电穿孔。所述质粒(它们为pDW34的变体)含有活性改善的异戊二烯合酶变体。在LB+壮观霉素50ug/mL+羧苄青霉素50ug/mL上选择菌落。

[0389] 实例9:利用来自铅黄肠球菌或鹌鸡肠球菌的MVA上游途径增加MVP水平

[0390] 这些实验突出了与利用来自粪肠球菌的MVA上游途径相比,在利用来自铅黄肠球菌或鹌鸡肠球菌的MVA上游途径时甲羟戊酸-5-磷酸(MVP)水平的增加。甲羟戊酸5-磷酸为磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)的底物。因此,不受理论的束缚,细胞中MVP浓度增加指示流过MVA上游途径的碳通量增加。

[0391] (i)材料和方法

[0392] 来自大肠杆菌的代谢物提取:通过取出大约3mL培养物放进填充有9mL干冰冷却的甲醇的管中来使在发酵罐中培养的细菌细胞的代谢快速失活。对所得的样品进行称重以计算采样发酵液的量,然后在-80℃下保存直至进一步分析。对于代谢物提取和浓度,将细胞悬浮液的0.25mL等分试样(如果以OD<sub>600</sub>测得的培养物细胞密度低于50,则使用0.4mL等分试样)用1.5mL甲醇/乙酸铵缓冲液(5mM,pH=8.0)混合物(6:1,体积/体积)稀释并通过进行4分钟离心使细胞碎片形成沉淀。收集上清液并上样至来自菲罗门公司(Phenomenex)的Strata-X-AW柱(33μm30mg/3mL Polymeric Weak Anion Exchange(聚合物弱阴离子交换柱))。将该细胞沉淀再提取两次,先用1.5mL的甲醇/乙酸铵缓冲液(5mM,pH=8.0)混合物(6:1体积/体积)提取,然后用1.5mL的甲醇/乙酸铵缓冲液(5mM,pH=8.0)混合物(1:1体积/体积)提取。这两次均通过离心使细胞形成沉淀,将所得的上清液相继上样至相同Strata-X-AW柱上。在提取-离心期间,将样品与细胞保持低于4℃。在用1mL水和1mL甲醇洗涤柱后,先用0.3mL的浓NH<sub>4</sub>OH/甲醇(1:14,体积/体积)混合物并然后用0.3mL的浓NH<sub>4</sub>OH/甲醇/水(1:12:2,体积/体积/v)混合物从柱子洗脱所关注的代谢物。通过添加20μL的冰醋酸中和所得洗脱物,然后通过离心澄清。

[0393] 代谢物定量。使用TSQ Quantum Access TSQ系统(赛默科技公司(Thermo Scientific))通过质谱法进行对代谢物的分析。所有体系对照、数据采集和质谱数据评价均用XCalibur和LCQuan软件(赛默科技公司)进行。对于LC-ESI-MS/MS方法,将手性Nucleodexβ-OH5μM HPLC柱(100×2mm,德国Macherey-Nagel公司)与CC8/4Nucleodex beta-OH保护柱(guard cartridge)一起使用。如表14中所述应用流动相梯度,其中流动相A为MilliQ级水中的100mM乙酸铵(SigmaUltra等级,西格玛公司)缓冲液(pH=8),流动相B为MilliQ级水,流动相C为LC-MS级乙腈(Chromasolv,Riedel-de Haën)。将柱和样品托盘温度分别降低至5℃和4℃。注入体积为10μL。

[0394] 表14:用于洗脱MVA途径的代谢物的HPLC梯度。

[0395]

| 时间      | 溶剂 A | 溶剂 B  | 溶剂 C | 流速        |
|---------|------|-------|------|-----------|
| 0.0 分钟  | 20%  | 0%    | 80%  | 0.4mL/min |
| 0.5 分钟  | 20%  | 0%    | 80%  | 0.4mL/min |
| 4.0 分钟  | 60%  | 0%    | 40%  | 0.4mL/min |
| 6.5 分钟  | 60%  | 0%    | 40%  | 0.4mL/min |
| 7.0 分钟  | 0.5% | 59.5% | 40%  | 0.5mL/min |
| 13.0 分钟 | 0.1% | 34.9% | 65%  | 0.5mL/min |
| 13.5 分钟 | 20%  | 0%    | 80%  | 0.5mL/min |
| 14.0 分钟 | 20%  | 0%    | 80%  | 0.5mL/min |

[0396] 质量检测使用电喷射离子化以负离子模式进行(ESI喷射电压为3.0kV,离子传输管温度为390℃)。选择母离子的如下m/z值来以SRM模式检测所关注的代谢物:对于IPP和DMAPP的245.0、对于GPP的313.1,对于FPP的381.1、对于MVP的227.0以及对于MVPP的307.1。为了在运行质谱仪时考虑灵敏度的小变化,还将均匀标记的<sup>13</sup>C<sub>10</sub>-ADP作为内标以等量(最终浓度为19.6uM)添加至样品和校准物二者(从获自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)的Isotec的<sup>13</sup>C<sub>10</sub>-ATP通过酶制备<sup>13</sup>C<sub>10</sub>-ADP;m/z=436.1)。根据由PO<sub>3</sub><sup>-</sup>产物离子(m/z=79.0)产生的峰的积分强度的样品/内标响应比测定代谢物的浓度。将通过注入标准品所获得的校正曲线用于计算细胞提取物中代谢物的浓度。IPP、DMAPP、GPP和FPP标准品购自Echelon Biosciences公司,MVP和MVPP(R-形式)购自西格玛奥德里奇公司。

#### [0397] 结果

[0398] 在40小时时,使用来自鹌鸡肠球菌和铅黄肠球菌的MVA上游途径时的MVP浓度高于使用粪肠球菌时的浓度(图3)。

[0399] 实例10:与具有粪肠球菌上游途径的途径相比,含有替代的甲羟戊酸上游途径的质粒的菌株的异戊二烯产量增加。

#### [0400] (i)材料

[0401] TM3培养基配方(每升发酵培养基):

[0402] K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>13.6g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>13.6g、MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O2g、柠檬酸一水合物2g、柠檬酸铁铵0.3g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>3.2g、酵母提取物0.2g、1000X痕量金属溶液1ml。将所有组分一起加入并溶解于去离子H<sub>2</sub>O中。用氢氧化铵(30%)将pH调节至6.8,然后定容。用0.22微米过滤器对培养基进行过滤灭菌。在灭菌和调节pH后加入葡萄糖10.0g和抗生素。

[0403] 1000×痕量金属溶液(每升发酵培养基)

[0404] 柠檬酸\*H<sub>2</sub>O40g、MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O30g、NaCl10g、FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O1g、CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O1g、ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O1g、CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O100mg、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>100mg、NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O100mg。将每种组分一样一次溶解于去离子H<sub>2</sub>O中。用HCl/NaOH将pH调节至3.0,然后将溶液定容并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

#### [0405] (ii)实验程序

[0406] 将细胞在Luria-Bertani肉汤+抗生素中培养过夜。次日,将它们在含有50ug/ml的壮观霉素和50ug/mL羧苄青霉素的20mL TM3培养基(250-mL带挡板的Erlenmeyer烧瓶)中稀释至OD<sub>600</sub>为0.05,并在34℃和200rpm下温育。培养2小时后,测量OD<sub>600</sub>并添加200uM IPTG。在发酵过程中定期取样。在每个时间点,测量OD<sub>600</sub>。另外,对异戊二烯的废气分析用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)(安捷伦公司)顶空测定法来进行。将100微升全发酵液置于密封的

GC小瓶中并在34℃和200rpm下温育30分钟的固定时间。在由在70℃下温育5分钟组成的加热杀灭步骤后,将样品上样至GC上。所报道的比生产率为由GC读出的单位为ug/L的异戊二烯量除以温育时间(30分钟)和所测得的OD600。

[0407] (iii)结果:

[0408] 当将含有pMCM1223(格氏李斯特菌)、pMCM1224(屎肠球菌)、pMCM1225(鹌鸡肠球菌)或pCHL277(铅黄肠球菌)的菌株与含有pCHL276(粪肠球菌)的相同背景比较时,观测到增加的异戊二烯比生产率、产率、CPI和/或滴度。

[0409] 实例11:表达MVA上游途径基因的大肠杆菌的异戊二烯产量

[0410] 该实例评价了表达所引入的来自甲羟戊酸途径的基因并以15L规模分批补料培养的大肠杆菌(BL21)中的异戊二烯产量。MVA上游途径酶的基因来自粪肠球菌(菌株DW709和DW717)、铅黄肠球菌(DW718)或鹌鸡肠球菌(DW719、MCM2158)。

[0411] (i)材料和方法

[0412] 菌株构建:通过将含有异戊二烯合酶(IspS)变体的质粒和四种含有不同MVA上游途径的质粒中的一者共同转化进大肠杆菌生产宿主菌株中来产生菌株DW709、DW717、DW718和DW719。按照标准的分子生物学技术,用携带IspS变体的pDW240(pTrc P.alba IspS MEA-mMVK(Carb50))和pMCM82(美国专利申请公开No.:2009/0203102)、pCHL276(pCL\_pTrc-Upper(粪肠球菌)-无先导序列)、pCHL277(pCL\_pTrc-Upper(铅黄肠球菌)-无先导序列)或pMCM1225(参见表7)电穿孔进宿主菌株CMP1133(BL21 Δ pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPyddVIspA yhfS thiFRTtruncIspA)中。回收细胞并将其涂布接种于选择培养基上,对壮观霉素和羧苄青霉素有抗性的单独转化体得到菌株DW709、DW717、DW718和DW719。这些异戊二烯生产菌株分别表达IspS变体和来自粪肠球菌的MVA上游途径、来自粪肠球菌的无先导序列MVA上游途径、来自铅黄肠球菌的MVA上游途径或来自鹌鸡肠球菌的MVA上游途径(参见表15)。

[0413] 表15:产异戊二烯菌株

[0414]

| 菌株名称  | 基因型                                    | 宿主亲本    | 质粒      |
|-------|----------------------------------------|---------|---------|
| DW709 | BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDyI t pgl pgl-, | CMP1133 | pDW240, |

[0415]

|         |                                                                                                                                              |         |                     |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------|
|         | yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRTtruncIspA,<br>pTrc(IspS 变体)_mMVK,<br>pCLPtrcUpper_E.faecalis                                                      |         | pMCM82              |
| DW717   | BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDYI t pgl pgl-,<br>yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRTtruncIspA,<br>pTrc(IspS 变体)_mMVK,<br>pCLPtrcUpper_E.faecalis leaderless | CMP1133 | pDW240,<br>pCHL276  |
| DW718   | BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDYI t pgl pgl-,<br>yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRTtruncIspA,<br>pTrc(IspS 变体)_mMVK,<br>pCLPtrcUpper_E.casseliflavus       | CMP1133 | pDW240,<br>pCHL277  |
| DW719   | BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDYI t pgl pgl-,<br>yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRTtruncIspA,<br>pTrc(IspS 变体)_mMVK,<br>pCLPtrcUpper_E.gallinarum          | CMP1133 | pDW240,<br>pMCM1225 |
| MCM2158 | pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) +<br>pTrcAlba-MVKdel2 + pCL-Ptrc-<br>Upper_Egallinarum                                             | CMP1133 | pDW240              |

[0416] 培养基配方(每升发酵培养基):K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 47.5g、MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 2g、柠檬酸一水合物2g、柠檬酸铁铵0.3g、酵母提取物0.5g、50%硫酸1.6mL、1000X改良痕量金属溶液1mL。将所有组分一起加入并溶解于去离子水中。将该溶液加热灭菌(123℃, 20分钟)。用氢氧化铵(28%)将pH调节至7.0, 然后定容。灭菌和pH调节后加入葡萄糖10g、维生素溶液8mL和抗生素。

[0417] 1000X改良痕量金属溶液(每升):一水柠檬酸40g、MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 30g、NaCl 10g、FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g、CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1g、ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1g、CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 100mg、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100mg、NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 100mg。以每次溶解一种物质的方式用去离子水溶解每种组分, 使用HCl/NaOH将pH调节至3.0, 然后对溶液定容, 并使用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0418] 维生素溶液(每升):盐酸硫胺素1.0g、D-(+)-生物素1.0g、烟酸1.0g、盐酸吡哆醇4.0g。以每次溶解一种物质的方式用去离子水溶解每种组分, 使用HCl/NaOH将pH调节至3.0, 然后对溶液定容, 并使用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0419] 宏量盐溶液(每升):MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 296g、一水柠檬酸296g、柠檬酸铁铵49.6g。用水溶解所有组分, 定容并使用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0420] 料液(每千克):葡萄糖0.590kg、Di H<sub>2</sub>O 0.393kg、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 47.4g和100% Foamblast 8828.9g。将所有组分混合并高压灭菌。在对料液进行高压灭菌后, 将营养补充物添加至无菌罩中的料瓶中。灭菌后向进料中添加的是(每千克料液)宏量盐溶液5.54mL、维生素溶液6.55mL、1000X改良痕量金属溶液0.82mL。

[0421] 进行该实验以监测所需发酵pH(7.0)和温度(34℃)下从葡萄糖形成异戊二烯。将一冷冻小瓶的大肠杆菌菌株解冻并接种进装有胰蛋白胨-酵母提取物培养基和适当抗生素的烧瓶中。当接种物生长至在550nm下测量的光密度(OD<sub>550</sub>)为1.0时, 将500mL用于接种15-L生物反应器并使初始罐体积为5L。将产异戊二烯菌株在分批补料发酵工艺运行。

[0422] 该分批补料培养基具有以9.7g/L分批补充的葡萄糖。通过添加异丙基-β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)来实现诱导。当细胞处于OD<sub>550</sub>为6时, 将一注IPTG添加至罐中以使浓

度为200 $\mu$ M。一旦培养物消耗了葡萄糖(由pH升高指示),就以低于或等于10g/min的速率供应葡萄糖料液以满足代谢要求。发酵运行足以测定从葡萄糖产生的最大异戊二烯质量产率的时长,用去的总发酵时间为64至68小时。

[0423] 分析:异戊二烯是挥发性的并且可以通过惰性气体有效地从罐中扫除。用两种质谱仪即iSCAN质谱仪(汉胜公司(Hamilton Sundstrand))和Hiden HPR20质谱仪(海德公司(Hiden Analytical))来测定生物反应器废气中的异戊二烯水平。通过相同的质谱单元测定废气中的氧气、氮气和CO<sub>2</sub>水平。通过带有汉密尔顿公司(Hamilton Company)提供的光学传感器的清洁可灭菌探针来测量发酵液中的溶氧。

[0424] 通过HPLC测定以4小时的间隔提取的发酵液样品中柠檬酸、葡萄糖、乙酸和甲羟戊酸在发酵液中的浓度。通过折射率响应与此前用已知浓度的标准品产生的校正曲线的比较来测定发酵液样品中的浓度。

[0425] (ii)结果

[0426] 表16:异戊二烯生产率度量

| [0427] | 菌株描述/运行数              | 总体异戊二烯体积<br>生产率(g/L/hr)<br>(在峰值产率下) | 从葡萄糖产生异戊<br>二烯的峰值总产率<br>百分比(g/g) | 峰值比生产率<br>(mg 异戊二烯<br>/L/hr/OD) |
|--------|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
|        |                       |                                     |                                  |                                 |
| [0428] | DW709 /<br>20120108   | 1.89                                | 16.35                            | 26.0                            |
|        | DW717 /<br>20120131   | 1.97                                | 16.46                            | 27.7                            |
|        | DW718 /<br>20120132   | 2.44                                | 17.54                            | 37.6                            |
|        | DW719 /<br>20120133   | 2.38                                | 18.16                            | 34.3                            |
|        | MCM2158 /<br>20120409 | 2.11                                | 17.35                            | 38.6                            |

[0429] 如表16中所汇总的,与使用粪肠球菌的MVA上游途径的发酵相比,使用鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌MVA上游途径酶的发酵展现出总体较高的质量产率(图4)、较高的峰值体积生产率(图5)、较高的峰值比生产率(图6)。另外,当菌株含有铅黄肠球菌或鹌鸡肠球菌途径时,细胞中的乙酰辅酶A水平较低(表17)。乙酰辅酶A水平的这种降低可指示增加的碳通量进入细胞中的MVA途径。

[0430] 表17:在相同背景但具有不同甲羟戊酸上游途径即具有来自鹌鸡肠球菌或铅黄肠球菌的MVA上游途径的菌株中,在大约24小时的已发酵时间(EFT)时的乙酰辅酶A水平(mM)。

[0431]

| 上游             | 粪肠球菌(DW717) -<br>20 小时 | 铅黄肠球菌(DW718) -<br>24 小时 | 鹌鸡肠球菌(DW719) -<br>24 小时 |
|----------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 乙酰辅酶 A<br>(mM) | 6.34                   | 3.57                    | 3.56                    |

[0432] 实例12:在大肠杆菌染色体上表达布氏拟甲烷球菌或马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶的大肠杆菌菌株的生长和异戊二烯生产率

[0433] 该实例详细描述了以小规模进行的工程化大肠杆菌菌株的生长和异戊二烯生产率的检验,该菌株表达大肠杆菌染色体上的布氏拟甲烷球菌甲羟戊酸激酶或马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶。

#### [0434] 材料和方法

[0435] 生长测定法:将过夜培养物接种于装有2mL的LB肉汤的摇管中,该肉汤补充有来自冷冻种菌的50 $\mu$ g/mL羧苄青霉素(Novagen)和50 $\mu$ g/mL壮观霉素(Novagen)。然后在34 $^{\circ}$ C下以240rpm温育培养物14小时。接着,将培养物稀释进5mL48孔板(爱思进科学公司)中至最终OD为0.2,该板含有2mL TM3培养基,该培养基补充有1%葡萄糖、0.02%酵母提取物、50 $\mu$ g/mL羧苄青霉素和50 $\mu$ g/mL壮观霉素。用Breath Easier膜(Diversified Biotech公司)密封该板并在34 $^{\circ}$ C下在Shel Lab摇动器/温育箱中以600rpm温育。在OD为0.4时用200 $\mu$ M IPTG诱导培养物。诱导后一小时,将甲羟戊酸添加至该培养物至最终浓度为0、2、4、8、16、32mM。在用IPTG诱导后0、1、2、3、4和5小时取OD测量值。

#### [0436] 表18:小规模检验的工程化大肠杆菌菌株的列表

[0437]

| 菌株名称    | 缩写的基因型                                                                                     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| CMP1136 | pgl- + pTrcAlba-mMVK + pCL-Ptrc-Upper_Ef                                                   |
| DW708   | pgl- + pTrcAlba-mMVK + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum                                           |
| MCM2131 | pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) + pTrcAlba-bMVK + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum      |
| MCM2125 | pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) + pTrcAlba-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum |
| MCM2126 | pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS1000-mMVK + pTrcAlba-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum           |
| MCM2127 | pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS100000-mMVK + pTrcAlba-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum         |
| MCM2129 | pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS1000000-mMVK + pTrcAlba-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum        |
| MCM2130 | pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-mMVK + pTrcAlba-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum          |

[0438] 异戊二烯生产率:诱导后1、2、3、4和5小时取出来自工程化大肠杆菌菌株的用于通过GC/MS分析异戊二烯生产率的样品。将100 $\mu$ L的培养发酵液吸移进深98孔玻璃板中并用铝密封层(Beckman Coulter)密封。将该玻璃块在34 $^{\circ}$ C水浴中温育30分钟,然后将其转移至80 $^{\circ}$ C水浴中以进行2分钟的热杀灭温育。使玻璃块冷却并转移至GC/MS进行异戊二烯测量。

[0439] 通过GC/MS进行异戊二烯检测:使用Agilent6890GC/MS系统进行GC/MS,该系统连接着以顶空模式操作的CTC Analytics(瑞士)CombiPAL自动进样器。使用Agilent HP-5MS GC/MS柱(30m $\times$ 0.25mm;0.25 $\mu$ m膜厚度)进行被分析物的分离。GC/MS方法利用氦气作为载气,流量为1mL/分钟。注入口保持在250 $^{\circ}$ C,分流比为50:1。对于2分钟的分析持续时间,烘箱温度保持在37 $^{\circ}$ C。以对m/z67的单离子监测(SIM)模式运行Agilent5793N质量选择检测器。从1.4分钟至1.7分钟关闭检测器以允许洗脱永久气体。在这些条件下,观察到异戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)在1.78分钟洗脱出来。将校准表用于定量异戊二烯的绝对量并且发现从1 $\mu$ g/L至2000 $\mu$ g/L为线性。使用该方法,检测极限估计为50至100ng/L。

#### [0440] (ii)结果

[0441] 范围在0至16mM之间的甲羟戊酸浓度未抑制MCM2131的生长。添加32mM甲羟戊酸时MCM2131具有范围为30–42mg/L/h/OD的最高比生产率,因而其能够支持来自上游途径的高碳通量。

[0442] 提供16mM甲羟戊酸进料时,具有一个拷贝的染色体甲羟戊酸激酶的工程化菌株MCM2125、MCM2127和MCM2130能够实现40mg/L/h/OD的比生产率。它们的生长也未受0–16mM的甲羟戊酸浓度抑制(图7)。

[0443] 实例13:质粒和马氏甲烷八叠球菌和布氏拟甲烷球菌甲羟戊酸激酶在大肠杆菌中的染色体表达。

[0444] 运行菌株MCM2126和MCM2127以检测仅表达染色体上的马氏甲烷八叠球菌MVK的效果。

[0445] 材料和方法

[0446] (i)溶液

[0447] 培养基配方(每升发酵培养基): $K_2HPO_4$ 7.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g、柠檬酸一水合物2g、柠檬酸铁铵0.3g、酵母提取物0.5g、50%硫酸1.6mL、1000X改良痕量金属溶液1mL。将所有组分一起加入并溶解于去离子水中。将该溶液加热灭菌(123℃,20分钟)。用氢氧化铵(28%)将pH调节至7.0,然后定容。灭菌和pH调节后加入葡萄糖10g、维生素溶液8mL和抗生素。

[0448] 1000X改良痕量金属溶液(每升):柠檬酸 $\cdot H_2O$ 40g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 30g、NaCl10g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100mg、 $H_3BO_3$ 100mg、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 100mg。以每次溶解一种物质的方式用去离子水溶解每种组分,使用HCl/NaOH将pH调节至3.0,然后对溶液定容,并使用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0449] 宏量盐溶液(每升): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 296g、柠檬酸一水合物296g、柠檬酸铁铵49.6g。用水溶解所有组分,定容并使用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0450] 维生素溶液(每升):盐酸硫胺素1.0g、D-(+)-生物素1.0g、烟酸1.0g、盐酸吡哆醇4.0g。以每次溶解一种物质的方式将每种组分溶于去离子水中,用HCl/NaOH将pH调至3.0,然后将溶液定容并通过0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0451] 料液#1(每千克):葡萄糖0.590kg、 $Di\ H_2O$ 0.393kg、 $K_2HPO_4$ 7.4g和100%Foamblast8828.9g。将所有组分混合并高压灭菌。在对料液进行高压灭菌后,将营养补充物添加至无菌罩中的料瓶中。灭菌后向进料中添加的是(每千克料液)宏量盐溶液5.54mL、维生素溶液6.55mL、1000X改良痕量金属溶液0.82mL。

[0452] (ii)方法

[0453] 将样品解冻并归一化至在100mM Tris、100mM NaCl,pH7.6、0.1mg/ml DNA酶I、1mg/ml溶菌酶和0.5mM AEBSF(4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐)中OD=20。通过重复通过4826.3kPa(700psi)下的弗氏压碎器(French pressure cell)将OD归一化的细胞悬浮液裂解。通过在14,000rpm下离心10分钟使溶胞产物澄清。使用Bradford测定法(伯乐公司(BioRad),500-0006)评价澄清溶胞产物的总蛋白质含量。然后将样品进行蛋白质归一化并在4–12%SDS-PAGE凝胶(生命科技公司(Life Technologies))上跑胶。使用iBlot转移装置(生命科技公司)将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。使用BenchPro™4100Western Card Processing Station(生命科技公司),用ProSci公司(ProSci incorporated)在兔中产生的对抗纯化酶的多克隆一抗和荧光二抗Alexa Fluor488山羊抗兔IgG(生命科技公司,A-

11008)探测马氏甲烷八叠球菌和布氏拟甲烷球菌MVK,来使硝酸纤维素显影。使用来自通用电气医疗公司(GE Healthcare)的Storm成像仪和ImageQuant TL软件实现特定蛋白质定量。

[0454] (iii)结果

[0455] 根据通过蛋白质印记分析进行的蛋白质定量,MCM2125中布氏拟甲烷球菌甲羟戊酸激酶的表达比DW708菌株中马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶的表达低至少15倍(图8)。

[0456] 实例14:表达构建体和产甲羟戊酸乳杆菌菌株

[0457] I. 编码MVA上游途径的质粒的构造

[0458] 载体pDM20为大肠杆菌-乳杆菌穿梭载体(美国专利申请公开No.2010/0081182),将该专利以引用的方式并入本文。该载体含有来自植物乳杆菌ATCC14917质粒pLF1的最小pLF1复制子(~0.7Kbp)和pemK-pemI毒素-抗毒素(TA)、来自pACYC184的P15A复制子、用于在大肠杆菌和植物乳杆菌二者中选择的氯霉素抗性标记和P30合成启动子(Rud等人, Microbiology(《微生物学》)(2006)152:1011-1019)。

[0459] 通过将来自pTrc99a的rrnBT1T2终止子添加进P30启动子下游的多克隆位点中来修饰pDM20质粒。使用引物T1T2\_F\_Hind3\_Sal(SEQ)和T1T2R\_Pst(SEQ)用Phusion高保真DNA聚合酶(麻萨诸塞州贝弗利的纽英伦生物技术公司(New England Biolabs,Beverly,MA))从pTrc99a扩增该终止子区。

[0460] 扩增是根据生产商的方案用HF缓冲液在50μl反应物中进行。循环参数为98℃30秒,然后30个循环的:98℃10秒,55℃30秒,72℃10秒,以及72℃下的最后延伸10分钟。用DNA Clean and Concentrator-5试剂盒(加利福尼亚州尔湾的Zymo研究公司(Zymo Research Corp.,Irvine,CA))按照制造商的方案纯化该终止子的PCR产物。

[0461] 将PCR产物和pDM20各自用HindIII然后用PstI(纽英伦生物技术公司)依次消化。用DNA Clean and Concentrator-5试剂盒(Zymo研究公司)纯化消化的插入物和载体。

[0462] 使用Quick连接试剂盒(纽英伦生物技术公司)根据制造商的说明在20μl体积中连接插入物和载体。根据制造商的方案将连接物转化进TOP10化学感受态细胞(加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司)中。将细胞和连接物混合并在冰上温育30分钟,然后将细胞在42℃下热休克45分钟,然后在冰上温育2分钟。将SOC培养基添加至细胞,然后将细胞伴随摇动(220rpm)在37℃下放置1小时。将细胞涂布接种于含有25μg/mL氯霉素(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)的LB板上。对转化体菌落进行测序。在确认序列后,用Qiaprep Mini试剂盒(加利福尼亚州瓦伦西亚的凯杰公司(Qiagen Inc,Valencia,CA))制备质粒pDM20\_T。

[0463] 使用引物UP\_EF\_BamHI(SEQ)和UP\_EF\_R\_Xho(SEQ)从模板pCL-PtrcUpper(pCHL276)PCR扩增包含两个基因即来自粪肠球菌的mvaE和mvaS的甲羟戊酸上游途径。用BamHI和XhoI消化所得的PCR产物并用Zymoclean Gel DNA Recovery试剂盒(Zymo研究公司)进行凝胶纯化。

[0464] 使用引物UP\_EF\_BamHI(SEQ)和UP\_EG\_R\_Xho(SEQ)PCR扩增来自模板pCL-Ptrc-upper Gc-MM163的编码来自鹌鸡肠球菌的mvaE和mvaS的基因。用BamHI和XhoI消化所得的PCR产物并用Zymoclean Gel DNA Recovery试剂盒(Zymo研究公司)进行凝胶纯化。

[0465] 将载体pDM20\_T用BamHI和SalI双酶消化并用DNA Clean and Concentrator-5试

剂盒(Zymo研究公司)纯化。

[0466] 使用Quick连接试剂盒(纽英伦生物技术公司)根据试剂盒说明书连接消化的载体pDM20\_T和UP\_EF片段。将连接物转化进TOP10化学感受态细胞(英杰公司)中并涂布接种至含有25 $\mu$ g/mL氯霉素的LB板上。对转化体进行测序。将所得的质粒定为pDM20\_T\_EF。

[0467] 使用Quick连接试剂盒(纽英伦生物技术公司)根据试剂盒说明书连接消化的载体pDM20\_T和UP\_EG片段。将连接物转化进TOP10化学感受态细胞(英杰公司)中并涂布接种至含有25 $\mu$ g/mL氯霉素的LB板上。对转化体进行测序。将所得的质粒定为pDM20\_T\_EG。

#### [0468] II. 表达甲羟戊酸上游途径的乳杆菌菌株的生成

[0469] 通过如美国专利申请公开No.:2011/0244536A1中描述的如下程序将质粒pDM20\_T、pDM20\_T\_UP\_EF和pDM20\_T\_UP\_EG转化进植物乳杆菌PN0512(ATCC菌株#PTA-7727;(美国专利申请公开No.:2008/0124774A1))中。用PN0512细胞接种5ml含有1%甘氨酸(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)的乳杆菌MRS培养基(马里兰州斯帕克斯的BD公司(Becton Dickenson, Sparks, MD))并在30 $^{\circ}$ C下培养过夜。用过夜培养物接种100ml含有1%甘氨酸的MRS培养基至OD<sub>600</sub>为0.1并在30 $^{\circ}$ C下培养至OD<sub>600</sub>为0.7。在4 $^{\circ}$ C下以3700 $\times$ g收获细胞8分钟,并用100ml冷1mM MgCl<sub>2</sub>(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)洗涤,在4 $^{\circ}$ C下以3700 $\times$ g离心8分钟,用100ml冷30%PEG-1000(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)洗涤,然后在4 $^{\circ}$ C下以3700 $\times$ g离心20分钟,然后重新悬浮于1ml冷30%PEG-1000中。将60 $\mu$ l细胞与约100ng质粒DNA在冷的1mm带间隙电穿孔皿中混合,并在BioRad Gene Pulser(加利福尼亚州赫拉克勒斯(Hercules, CA))中以1.7kV、25 $\mu$ F和400 $\Omega$ 进行电穿孔。将细胞重新悬浮于1ml含有500mM蔗糖(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)和100mM MgCl<sub>2</sub>的MRS培养基中,在30 $^{\circ}$ C下温育2小时,涂布接种于含有10 $\mu$ g/ml氯霉素(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)的MRS培养基板上,然后在30 $^{\circ}$ C下温育。

#### [0470] III. 针对甲羟戊酸的测试

[0471] 该实例的目的是证明与携带来自粪肠球菌的甲羟戊酸上游途径的菌株相比,具有鸢鸡肠球菌甲羟戊酸上游途径的乳杆菌菌株中甲羟戊酸的产量增加。

##### [0472] (i)材料和方法

[0473] 细胞培养:将携带pDM20\_T\_UP\_EF和pDM20\_T\_UP\_EG以及空对照质粒pDM20\_T的植物乳杆菌PN0512在20ml补充有10 $\mu$ g/ml氯霉素的乳杆菌MRS培养基中培养过夜。将培养物在30 $^{\circ}$ C下温育14小时过夜。将该过夜培养物稀释进含有2mL补充有10 $\mu$ g/ml氯霉素的MRS的5mL48孔板(爱思进科学公司)中至最终OD为0.2。用Breath Easier膜(Diversified Biotech公司)密封该板并在30 $^{\circ}$ C下在Shel Lab摇动器/温育箱中以600rpm温育24小时。将1mL每份培养物以3,000 $\times$ g离心5分钟。将250 $\mu$ l上清液添加至19 $\mu$ L的20%硫酸并在冰上温育5分钟。然后将混合物以3000 $\times$ g离心5分钟,收集上清液用于HPLC分析。将200 $\mu$ l上清液转移至HPLC兼容的96孔锥底聚丙烯板(Nunc公司)。通过与甲羟戊酸(西格玛公司)的标准曲线进行比较来测定样品中甲羟戊酸的浓度。通过根据制造商的说明书(波音特科技有限公司)进行葡萄糖氧化酶测定法来测量葡萄糖浓度。

[0474] 甲羟戊酸的HPLC检测:HPLC分析在Waters2695Alliance HPLC系统上进行,该系统包括Knauer K2301折射率检测器,使用在50 $^{\circ}$ C下温育的300mm $\times$ 7.8mm BioRad-Aminex HPX-87H离子排斥柱(目录号为125-0140)并且装配有BioRad-Microguard Cation H

refill 30mm×4.6mm(目录号为125-0129)。将样品在0.01N硫酸运行缓冲液中以0.6ml/min的流速运行。通过将每份样品的折射率响应与通过运行已知浓度的多种含甲羟戊酸溶液所产生的校准曲线相比较来定量甲羟戊酸的发酵液水平。

[0475] (ii)结果

[0476] 将表达由来自鸢鸡肠球菌的基因编码的甲羟戊酸上游途径的乳杆菌菌株的甲羟戊酸比生产率与表达由来自粪肠球菌的基因编码的甲羟戊酸上游途径的菌株相比较。在相同条件下培养细菌。HPLC分析将显示,与具有来自粪肠球菌的上游途径的菌株相比,具有鸢鸡肠球菌上游途径的菌株具有较高的异戊二烯比生产率。表达来自鸢鸡肠球菌或粪肠球菌的上游途径的两种菌株均将产生比具有空对照质粒的菌株更多的甲羟戊酸。

[0477] 实例15:用于在乳杆菌中产生异戊二烯的菌株的构建

[0478] 在乳杆菌中产生异戊二烯需要将由MVK、yPMK、MVD基因组成的甲羟戊酸下游途径整合进乳杆菌的染色体中。将编码异戊二烯合酶和IDI的基因作为处于P1dhL启动子的控制下的操纵子克隆至质粒上。将上游途径基因(mvaE和mvaS)作为操纵子克隆至相同质粒上处于P30启动子的控制下。将携带IspS-IDI操纵子和上游途径操纵子的质粒转化进具有整合的甲羟戊酸下游途径的乳杆菌中。

[0479] I.克隆IspS\_IDI操纵子进大肠杆菌-乳杆菌穿梭载体中

[0480] 在50μl具有HF缓冲液的反应物中使用Phusion高保真DNA聚合酶根据试剂盒说明用引物P1dhL F(SEQ)和P1dhL R(SEQ)从模板pDM5-P1dhL1-ilvC(美国专利申请公开No.: 2011/0136192)扩增P1dhL引物。退火温度为55℃并且在72℃下延伸10分钟。用DNA Clean and Concentrator-5试剂盒(Zymo研究公司)按照试剂盒方案纯化PCR反应物。将纯化的PCR产物和载体pDM20\_T1用PstI在37℃下消化2小时。将载体和插入物在80℃下温育20分钟以使PstI失活。将PstI消化的载体用虾碱性磷酸酶(加利福尼亚州圣克拉拉的昂飞公司(Affymetrix Inc, Santa Clara, CA))在37℃下处理30分钟。通过在65℃下加热15分钟终止该磷酸酶反应。将处理过的载体和消化的PCR产物二者用DNA Clean and Concentrator-5试剂盒(Zymo研究公司)按照试剂盒方案纯化。

[0481] 使用Quick连接试剂盒(纽英伦生物技术公司)连接消化的PCR产物和载体。将连接混合物转化进化学感受态的大肠杆菌Top10细胞(加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司)中。在37℃下在含有25μg/mL氯霉素的LB板上选择转化体。通过DNA测序筛选转化体。将所得的质粒称为pDM20\_T\_P1dhL。

[0482] 由Gene Oracle公司(加利福尼亚州山景城)合成针对乳杆菌进行密码子优化的银白杨ispS基因和yIDI基因。将基因合成为其中乳杆菌核糖体结合位点处于所述基因的ATG起始密码子的每一者之前的操纵子。将IspS-yIDI操纵子克隆进pCR Blunt II TOP0(英杰公司)中,从而生成pCR Blunt II TOP0-II。

[0483] 采用55℃的退火和1分钟的延伸,使用Phusion高保真DNA聚合物用引物II F Avr2(SEQ)和II R Nde (SEQ)从pCR Blunt II TOP0-II扩增ispS-yIDI操纵子。

[0484] 用AvrII和NdeI消化载体pDM20\_T\_P1dhL和ispS-yIDI PCR产物。连接载体和插入物并转化进TOP10细胞中。在37℃下于含有25μg/mL氯霉素的LB板上选择转化体。通过DNA测序确认转化体。将所得的质粒称为pDM20\_T\_P1dh-II。

[0485] II.添加上游途径至具有IspS-yIDI的质粒

[0486] 用BamHI和SalI消化载体pDM20\_T\_Pldh-II。将消化的载体与BamHI和XhoI消化的EF\_UP PCR产物(参见实例14)连接。还将消化的载体与BamHI和XhoI消化的EG\_UP PCR产物(参见实例14)连接。将连接物转化进Top10细胞中并涂布接种于含有25μg/mL氯霉素的LB板上用于在37℃下的选择。将所得的质粒称为pDM20T-EF-Pldh-II和pDM20T-EG-Pldh-II。

### [0487] III. 下游途径整合载体和PN0512 ΔldhL1:: MVK-yPMK-MVD整合菌株的构建

[0488] 这描述了将MVA下游途径基因整合进植物乳杆菌菌株PN0512的染色体中以用于表达MVK、yPMK、MVD。基因可整合进染色体中的不同位置,包括对细胞代谢没有影响的中性位置,或者可将整合设计为改变细胞的生理。

[0489] 将两个DNA片段(同源臂)设计用于为两个遗传交换提供同源区使得整合将会将MVK、yPMK、MVD编码区置于菌株PN0512的ldhL1启动子的下游。克隆进质粒中的左同源臂和右同源臂各自大约1200个碱基对。从植物乳杆菌PN0512基因组DNA扩增左同源臂和右同源臂。整合载体pFP996-ldhL1-arms的构建在美国专利申请公开No.:2011/0244536A1中进行了描述,将该专利公开以引用的方式并入本文。

[0490] 将来自大肠杆菌MVKCMP451的基因组DNA(其含有MVK、yPMK、MVD和yIDI的编码序列)用作模板来扩增MPM操纵子以对下游途径基因进行PCR扩增。使用Gentra Pure Gene试剂盒(加利福尼亚州瓦伦西亚的凯杰公司)从在37℃下在LB中培养至稳定期的培养物的1ml细胞沉淀纯化基因组DNA。使用Phusion高保真PCR试剂盒(纽英伦生物技术),通过含有Xho I位点、Spe I位点和核糖体结合序列的引物MPMI Xho Spe For(表23)和含有Pme I和Xho I位点的引物MPM Pme Xho RevI(表23)产生MPM操纵子。典型的PCR反应物(50μl)含有1X HF缓冲液、1μl10mM dNTP、2.5μl10μM每种引物、0.5μl Phusion聚合酶和250ng基因组DNA。循环条件为:一个循环的98℃30秒,然后30个循环的:98℃10秒,56℃30秒,72℃2分20秒。循环后,将反应混合物保持在72℃下10分钟。用Zymo Clean and Concentrate-5试剂盒(Zymo研究公司)纯化反应物。将所得的PCR片段用XhoI(纽英伦生物技术)在37℃下进行限制性内切酶消化。用Zymo Clean and Concentrate-5试剂盒(Zymo研究公司)纯化反应物。

### [0491] 表18:引物

[0492]

| 名称               | 序列                                     |
|------------------|----------------------------------------|
| T1T2_F_Hind3_Sal | CATAAGCTTGTCGACCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCC |
| T1T2_R_Pst       | CATCTGCAGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA     |
| UP_EF_BamHI      | CATGGATCCCGATTAAATAAGGAGGAATAAACC      |
| UP_EF_R_Xho      | GTCACCTCGAGGGTACCAGCTGCAGATCTCTTAG     |
| UP_EG_R_Xho      | GTCACCTCGAGCATATGGTACCAGCTGCAGTCA      |
| PldhL_F          | CATCTGCAGTAAGTCGTATTGGCACCACACTACTCAC  |
| PldhL_R          | CATCTGCAGCATATGATCCTAGGGCTTGACAAAATAAG |

[0493]

|                         |                                                 |
|-------------------------|-------------------------------------------------|
|                         | TCATCCTCIC                                      |
| II F Avr2               | CATCCTAGGAGGAGGAGAGAAAAAAACCATG                 |
| II R Nde                | CATCATATGTTACAACATTCTGTGAATTTGTCTG              |
| MPMI Xho Spe For        | CAATCTCGAGACTAGTCAAAGGAGGTAAAAAACATG<br>GTATC   |
| MPM Pme Xho Rev1        | GTTACTCGAGGTTTAACTTATTCCTTTGGTAGACCAGT<br>CTTTG |
| MPMIseqF5               | GTGGCCTGGGAAATGGGAAAAGCTG                       |
| ldhseqR3                | CCCCCAATCATAAGTCCACGTTA                         |
| MPMIseqF3               | CAGATATTGGAAGTGCTACTTACGGC                      |
| MPMIseqR4               | TGCGGTAACGGATGCTGTGTAAACGG                      |
| ldhL left arm check UP  | CAACCGAGGTCACGACCACTGCCG                        |
| MPMIseqR8               | GAACACGGGTACGCAGTTCCACCG                        |
| MPMIseqF6               | GATGTTGCCAGAGTGATTTTAACTC                       |
| ldhL right arm check DN | GAAACTGGTTGGGAATAACTTGAGCC                      |

[0494] 将pFP996-ldhL1arms载体用XhoI(纽英伦生物技术)进行限制性内切酶消化。消化后,将XhoI在65℃下加热失活20分钟。然后用虾碱性磷酸酶(昂飞公司)将载体末端去磷酸化。将反应物在37℃下温育45分钟,然后将磷酸酶在65℃下加热失活15分钟。使用Zymoclean Gel DNA Recovery试剂盒(Zymo研究公司)从琼脂糖凝胶纯化载体。

[0495] 在25℃下用Quick连接试剂盒(纽英伦生物技术公司)将所得的Xho-I消化的去磷酸化的载体pFP996ldhL1arms和XhoI消化的MPM片段连接5分钟。用连接混合物转化化学感受态大肠杆菌Stb13(英杰公司)细胞。典型的转化包括将细胞和连接混合物在冰上温育30分钟,在42℃下热休克45秒,在冰上温育2分钟,并在30℃下于SOC培养基中恢复1小时。将转化物铺展于含有氨苄青霉素(100μg/ml)的LB琼脂上用于选择。将板在30℃下温育过夜。

[0496] 用JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™反应混合物(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司),使用引物MPMIseqF5(表18)和引物ldhseqR3(表18)对转化体进行PCR菌落筛选。通过DNA测序验证若干阳性转化体。将所得的整合质粒定为pFP996-ldhL1arms::MPM。

[0497] 使用Qiaprep Mini试剂盒(加利福尼亚州瓦伦西亚的凯杰公司),从在含有氨苄青霉素(100μg/ml)的LB中过夜生长的大肠杆菌Stb13/pFP996-ldhL1arms::MPM菌株的细胞沉淀分离质粒DNA。

[0498] 将MPM操纵子整合进植物乳杆菌PN0512菌株的染色体中使得其将从ldhL1启动子表达并且ldhL1将缺失。单拷贝的从ldhL1启动子表达的MVK、yPMK、MVD编码区的染色体整合通过与所描述的(Ferain等人,1994,J.Bact.《细菌学杂志》)176:596)相同的用于无标记缺失(unmarked deletion)的两步式同源重组程序构建,不同的是第二个交换事件或者产生野生型序列或者产生预期的整合而不是缺失。

[0499] 通过用pFP996-ldhL1arms::MPM转化植物乳杆菌PN0512来获得MVK、yPMK、MVD编码区的整合。用PN0512接种具有5ml含有0.5%甘氨酸的乳杆菌MRS培养基的培养物并在30℃下培养过夜。用过夜培养物接种100ml含有0.5%甘氨酸的MRS培养基至OD<sub>600</sub>为0.1并在30℃下培养至OD<sub>600</sub>为0.7。在4℃下以3700×g收获细胞8分钟,用100ml冷1mM MgCl<sub>2</sub>洗涤,在4℃下以3700×g离心8分钟,用100ml冷30%PEG-1000洗涤,在4℃下以3700×g再次离心20分钟,并然后重新悬浮于1ml冷30%PEG-1000中。将60μl细胞与约100ng质粒DNA在冷的1mm带间隙电

穿孔皿中混合,并在BioRad Gene Pulser中以1.7kV、25 $\mu$ F和400  $\Omega$  进行电穿孔。将细胞重新悬浮于1ml含有500mM蔗糖和100mM MgCl<sub>2</sub>的MRS培养基中,在30℃下温育2小时,并然后铺展于含有2 $\mu$ g/ml红霉素(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)的MRS培养基板上。

[0500] 使用操纵子特异性引物MPMIseqF3(表18)和引物MPMIseqR4(表18)通过PCR筛选转化体。通过在乳杆菌MRS培养基中系列接种将转化体在30℃下于含有红霉素(1 $\mu$ g/ml)的乳杆菌MRS培养基中培养大约10代并然后在37℃下培养大约40代。将培养物铺展在含有红霉素(0.5 $\mu$ g/ml)的乳杆菌MRS培养基上。用染色体特异性引物ldhL left arm check DN(表18)和质粒特异性引物MPMIseqR8(表18),通过菌落PCR针对单个交换对分离株进行筛选。

[0501] 然后通过乳杆菌MRS培养基中系列接种将单交换整合体在37℃下培养大约40代。将培养物铺展在MRS培养基上。将菌落转接(patch)至MRS板上并在37℃下培养。然后将分离株转接至含有红霉素(0.5 $\mu$ g/ml)的MRS培养基上。使用染色体特异性引物和基因特异性引物对通过菌落PCR针对野生型或整合第二个交换的存在对红霉素敏感性分离株进行筛选,ldhL left arm check UP和MPMIseqR8将产生一大约1400-bp的产物;MPMIseqF6和ldhL right arm check DN.将产生一大约1600-bp的产物;通过对PCR产物进行测序来确认整合并将鉴定的整合菌株定为PN0512  $\Delta$  ldhL1::MPM。

#### [0502] IV. 产异戊二烯的LAB菌株的生成

[0503] 如上所述使植物乳杆菌PN0512  $\Delta$  ldhL1::MPM变成电转感受态并用pDM20T-EF-P1dh-II或pDM20T EG-P1dh-II转化。将细胞涂布接种于具有10 $\mu$ g/ml氯霉素的MRS上。

#### [0504] 实例16:测试乳杆菌中的异戊二烯产量

[0505] 该实例的目的是证明与携带来自粪肠球菌的甲羟戊酸上游途径的菌株相比,具有鸢鸡肠球菌甲羟戊酸上游途径的乳杆菌菌株中异戊二烯的产量增加。

#### [0506] (i) 材料和方法

[0507] 将含有pDM20T-EF-P1dh-II或pDM20T EG-P1dh-II的植物乳杆菌PN0512  $\Delta$  ldhL1::MPM接种于补充有10 $\mu$ g/mL氯霉素的MRS培养基中并在30℃下培养14小时。通过在来自微反应器技术公司(MicroReactor Technologies, Inc.)的Cellerator<sup>TM</sup>中培养菌株来分析异戊二烯产量。24孔的每一者中的工作体积为4.5ml。将过夜培养物稀释进4.5ml含有10 $\mu$ g/mL氯霉素的MRS中以达到在550nm下测得的光密度为0.05。将温度维持在30℃, pH设定点为7.0, 氧气流量设定点为20sccm, 搅拌速率为800rpm。

[0508] 对异戊二烯的废气分析用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)(安捷伦公司)顶空测定法来进行。样品的制备如下:将100 $\mu$ L的全发酵液置于密封的GC小瓶中,并在30℃下温育30分钟的固定时间。在由在70℃下温育5分钟组成的加热杀灭步骤后,将样品上样至GC上。

[0509] 在运行过程中用读板仪(Spectramax)获得550nm波长处的光密度(OD)。通过将异戊二烯浓度( $\mu$ g/L)除以OD读数来获得比生产率。在微发酵(mini-fermentation)中对24孔每一者在三个时间点进行取样。

#### [0510] (ii) 结果

[0511] 将具有由来自鸢鸡肠球菌的基因编码的上游途径、表达完整的甲羟戊酸途径的菌株的异戊二烯比生产率与携带来自粪肠球菌的甲羟戊酸上游途径、表达完整的甲羟戊酸途径的菌株相比较。将细菌在微发酵中于相同条件下培养细菌。随时间推移的顶空测量(参见美国专利申请公开No.:2010/0086978)显示,与具有来自粪肠球菌的上游途径的菌株相比,

具有鹌鸡肠球菌上游途径的菌株具有较高的异戊二烯比生产率。

[0512] 实例17:产紫穗槐二烯或产金合欢烯菌株的构建

[0513] 通过用来自MCM521的溶胞产物转导进CMP676中引入甲羟戊酸下游途径(参见表3)。根据制造商(德国海德堡的基因桥公司)环出卡那霉素标记。可通过利用替代基因修饰每个基因前面的rbs来改变操纵子上游的启动子而修饰来自MCM521的下游途径。法尼基二磷酸合酶(ispA)通过改变染色体上的启动子和/或rbs、或通过从质粒表达该酶来过表达。将质粒pMCM1223(格氏李斯特菌)、pMCM1224(屎肠球菌)、pMCM1225(鹌鸡肠球菌)、pCHL276(粪肠球菌)或pCHL277(铅黄肠球菌)与质粒pDW34的变型(参见美国专利申请公开No:2010/0196977;图2)一起共同电穿孔。作为pDW34变体的质粒含有针对大肠杆菌进行密码子优化的金合欢烯合酶或针对大肠杆菌进行密码子优化的紫穗槐二烯合酶而不是异戊二烯合酶。在LB+壮观霉素50ug/mL+羧苄青霉素50ug/mL上选择菌落。

[0514] 实例18:与具有粪肠球菌上游途径的途径相比,含有具有替代的甲羟戊酸上游途径的质粒的菌株的紫穗槐二烯或金合欢烯产量增加。

[0515] (i)材料

[0516] TM3培养基配方(每升发酵培养基): $K_2HPO_4$ 13.6g、 $KH_2PO_4$ 13.6g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g、柠檬酸一水合物2g、柠檬酸铁铵0.3g、 $(NH_4)_2SO_4$ 3.2g、酵母提取物0.2g、1000X痕量金属溶液1mL。将所有组分一起加入并溶解于去离子 $H_2O$ 中。用氢氧化铵(30%)将pH调节至6.8,然后定容。将培养基用0.22微米过滤器对培养基进行过滤灭菌。在灭菌和调节pH后加入葡萄糖10.0g和抗生素。

[0517] 1000×痕量金属溶液(每升发酵培养基):柠檬酸 $\cdot H_2O$ 40g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 30g、NaCl10g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100mg、 $H_3BO_3$ 100mg、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 100mg。将每种组分一样一次溶解于去离子 $H_2O$ 中。用HCl/NaOH将pH调节至3.0,然后将溶液定容并用0.22微米过滤器过滤灭菌。

[0518] (ii)实验程序

[0519] 将细胞在Luria-Bertani肉汤+抗生素中培养过夜。次日,将它们在含有50ug/mL的壮观霉素和50ug/mL羧苄青霉素的20mL TM3培养基(250-mL带挡板的Erlenmeyer烧瓶)中稀释至OD600为0.05,并在34℃和200rpm下温育。在接种前,如此前所述(Newman等人,2006)将20%(体积/体积)十二烷(西格玛奥德里奇公司)的覆盖层添加至每个培养瓶以捕集挥发性的倍半萜产物。

[0520] 培养2小时后,测量OD600并添加0.05-0.40mM异丙基 $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)。在发酵过程中定期取样。在每个时间点,测量OD600。另外,通过将十二烷覆盖层稀释进乙酸乙酯中来测定有机层中的紫穗槐二烯或金合欢烯浓度。如此前所述(Martin等人,Nat.Biotechnol.(《自然生物技术》)2003,21:96-802)通过GC-MS方法通过监测紫穗槐二烯的分子离子(204m/z)和189m/z片段离子或金合欢烯的分子离子(204m/z)来分析十二烷/乙酸乙酯提取物。注入已知浓度的紫穗槐二烯或金合欢烯样品以产生分别用于紫穗槐二烯或金合欢烯的标准曲线。分别使用紫穗槐二烯或金合欢烯标准曲线,计算样品中紫穗槐二烯或金合欢烯的量。

[0521] (iii)结果

[0522] 当将含有pMCM1223(格氏李斯特菌)、pMCM1224(屎肠球菌)、pMCM1225(鹌鸡肠球

菌)或pCHL277(铅黄肠球菌)的菌株与含有pCHL276(粪肠球菌)的相同背景相比时,观测到紫穗槐二烯或金合欢烯的增加的比生产率、产率、CPI和/或滴度。

[0523] (iv)参考文献

[0524] Newman, J.D., Marshal, J.L., Chang, M.C.Y., Nowroozi, F., Paradise, E.M., Pitera, D.J., Newman, K.L., Keasling, J.D., 2006. High-level production of amorphadiene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* (《生物技术与生物工程》) 95:684-691.

[0525] Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., Keasling, J.D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in *E. coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* (《自然生物技术》) 21:796-802.

[0526] 实例19:当在大肠杆菌BL21或大肠杆菌BL21(DE3)中表达时不降解的MvaE蛋白的鉴定

[0527] 细胞中异源表达的蛋白质的降解可导致由于蛋白质合成和蛋白质降解的无效循环引起的ATP损失、被降解的蛋白质的催化活性降低、所关注蛋白质的稳态细胞内浓度降低、诱导可改变细胞生理的应激应答和对商业生产生物衍生产品潜在有害的其他影响(S.-O. Enfors, 2004)。因而,表达较不易于降解的全长蛋白质对代谢工程改造是有利的。来自粪肠球菌的mvaE基因产物当在大肠杆菌BL21中表达时部分降解,这可通过蛋白质印迹鉴定的片段指示(图9)。粪肠球菌MvaE的裂解片段还可通过对在SDS-PAGE凝胶上跑胶的带His标签的纯化物质进行Safestain染色来鉴定(图10)。降解抗性的mvaE基因产物的鉴定和利用对增加甲羟戊酸、异戊二烯和类异戊二烯的产量是有利的。

[0528] 我们证明,来自生物体屎肠球菌、鸢鸡肠球菌、铅黄肠球菌和格氏李斯特菌的mvaE的基因产物在大肠杆菌BL21(DE3)中表达时不降解,这可通过不存在下述片段来指示,该片段可在His标签介导的纯化后进行的Safestain染色的SDS-PAGE凝胶上鉴定,或当在产甲羟戊酸、异戊二烯或类异戊二烯大肠杆菌BL21中表达时使用所述的检测方法鉴定。

[0529] (i)方法:

[0530] 构建含有编码带His标签的来自鸢鸡肠球菌、屎肠球菌、铅黄肠球菌和格氏李斯特菌的MvaE的DNA的质粒。在大肠杆菌BL21(DE3)中表达MvaE并通过Ni-树脂色谱法纯化。通过SDS-PAGE分析纯化的样品。通过阴离子交换色谱以及在一些情形中通过凝胶过滤进一步纯化样品。将纯化至>95%同质性的样品用于产生多克隆抗体。通过蛋白质印迹分析生产菌株并用针对所关注的MvaE的多克隆抗体探测。

[0531] (ii)参考文献

[0532] Enfors, S.O., Scheper, T. *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*. 柏林海德堡施普林格出版社(Springer-Verlag Berlin Heidelberg) 2004.

[0533] 序列

[0534] 格氏李斯特菌mvaE:

[0535]

```
atggttaaagacattgtaataattgatgccctccgtactcccatcggttaagtaccgcggtcagctctcaaagatgac
ggcggtggaattgggaaccgcagttacaaaggctctgttcgagaagaacgaccaggtcaaagaccatgtagaacaag
tcatttttggcaacgttttacaggcaggaacggccagaatcccgcccgtcagatcgcccttaattctggcctgtcc
```

gcagagataccggcttcgactattaaccaggtgtgtggttctggcctgaaagcaataagcatggcgcgccaacagat  
cctactcggagaagcggaagtaatagtagcaggaggtatcgaaatccatgacgaatgcccgcgagtattacatatata  
ataaagaagaagacacctctcaaagcctgttcctacgatgaccttcgatggtctgaccgacgcgtttagcggaaag  
attatgggtttaacagccgaaaatgttgccgaacagctacggcgtatcacgtgaggcccaggacgcctttgcgtatgg  
atcgcagatgaaagcagcaaaggcccaagaacagggcattttcgcagctgaaatactgcctcttgaaataggggacg  
aagttattactcaggacgagggggttcgtcaagagaccacctcgaaaaattaagtctgcttcggaccatttttaaa  
gaagatgggtactgttacagcgggcaacgcctcaacgatcaatgatggcgccctcagccgtgatcattgcatcaaagga  
gtttgctgagacaaaccagattccctaccttgcatcgctacatgatattacagagataggcattgatccatcaataa  
tgggcatttgctcccgtagtgatgcatcaataaactgatcgatcgtaaccaaattagcatggaagaaatcgatctcttt  
gaaattaatgaggcattttgcagcatcctcggtggtagttcaaaaagagttaagcattcccgatgaaaagatcaatat  
tggcggttccggtattgcactaggccatcctcttgccgcccacaggagcgcgcatgttaaccaccctagcgcaccagt  
tgaaacgtacacacggacgctatggtattgcctccctgtgcattggcggtggccttgccctagcaatatataagaa  
gtgcctcaggaagatcagccggttaaaaaattttatcaattggcccgtaggaccgtctggctagacttcaggagca  
agccgtgatcagcccagctacaaaacatgtactggcagaaatgacacttctgaagatattgccgacaatctgatcg  
aaaatcaaatatctgaaatggaaatccctcttggtgtggctttgaatctgagggtcaatgataagagttataccatc  
ccactagcaactgaggaaccgagtgtaatcgctgcctgtaataatggtgcaaaaatggcaaacacctggcgcggttt  
tcagtcagaattaaaagatggtttcctgcgtgggcaaatgtacttatgaacgtcaaagaaccgcaactatcgagc  
atacgatcacggcagagaaagcggcaatttttcgtgccgcagcgcagtcacatccatcgattgtgaaacgaggtggg  
ggtctaaaagagatagtagtgctacgttcgatgatgatccgacgttcctgtctattgatctgatagttgatactaa  
agacgcaatggcgctaacatcattaacaccattctcgagggtgtagccggctttctgagggaatccttacgaag  
aaattctgttctctattttatctaatcagcaaccgaatcaattgtgaccgccagctgtcgcataccttacgaagca  
ctgagtaaaaaaggtgatggtaaacgaatcgctgaaaaagtggctgctgcatactaaatttgcccagttagatcctta  
tcgagctgcaaccacacaaaggtattatgaatgggtattgaggccgtcgttttggcctcaggaaatgacacacggg  
cggtcgcggcagccgcacatgcgtatgcttcacgcgatcagcactatcggggcttaagccagtggcaggttcagaa  
ggcgcttacacggggagatcagtcctaccacttgccactcggcagcgttgccggtgcaattgaggtcttgccctaaagc  
gaaggcggcattcgaaatcatggggatcacagaggcgaaggagctggcagaagtcacagctgcggtagggttgccgc  
aaaacctggcgcggttaagagcgcttgtagtgaaagaaacagcaaggtcacatgtcgctccaggctcgctctctt  
gcattatcggttaggtgtacaggcaaggaagttgaaatcctggccgaaaaattacagggtctcgatgaatcaggc  
gaacgctcagaccatactcgagagatcagatcgcaaaaagttgaattgtga SEQ ID NO:1

[0536] 格氏李斯特菌mvaS:

[0537]

atgacatgaacgttggaatcgataaaatgtcattctttgttccaccttactttgtggacatgactgatctggcagt  
agcacgggatgtcgatcccaataagtttctgattgggtattggccaggaccagatggcagttaatccgaaaacgcagg  
atatgtgacatttgccacaaatgctgccaaaaacatactgtcagctgaggaccttgataaaattgatattggtcata  
gtcggcaccgagagtggaaatcgatgaatccaaagcgagtgccgtagtgttcacaggttgctcggtatccagaagtt  
tgctcgctcctttgaaatcaaagaagcctgttatgggggtaccgcggctttacagttcgctgtaaacacattagga  
atcatcctgaatcaaaggttctttagttgcatcagatatcgcgaaatcggccttggtcttgaggtgaaccaacg  
caaggtgcaggcgctgtggctatgctcgctcactgacctaaagatcattgctttcaacgacgatagcctcgcgct  
tacacaagatatctatgacttctggcgaccagttggacatgactatcctatggtcgacgggcctcttagtacagaga

cctacatccagtcatttcagaccgtatggcaggaaatacacaaaacggctcgcagcatgcactggcagactttgtgtcc  
cttagctttcatatcccgtataactaaaatgggcaaaaaggcgctgcttgcaatccttgaaggcgaatcagaggagge  
tcagaaccgtatactagcaaaatatgaaaagagtagcctactccagaaaggcgggtaacctgtataccggtagcc  
tgtatctaggacttatttcacttctggaaaatgcagaagaccttaaagctgggtgatttaataggcctcttttcttac  
ggttccgggtgtgttgcggagtttttctcaggaaggctgggtgaggactatcaggaacagctacttaaaacaaaaca  
tgccgaacagctggcccatagaaagcaactgacaatcgaggagtacgaaacgatgttctccgatcgcttgacgtgg  
acaaagacgcgcaatacgaagacacattagcttatagcatttcgtcagtcgaaacaccgtacgtgagtagcaggagt  
tga SEQ ID NO:2

[0538] 屎肠球菌mvaE:

[0539]

atgaaagaagtgggttatgattgatgcggctcgcacacccattgggaaatacagaggtagtcttagtcccttttacage  
ggtggagctggggacactgggtcacgaaagggtgctggataaaacaaagcttaagaaagacaagatagaccaagtga  
tattcggcaatgtgttcaggcaggaaacggacaaaacggttgaagacaaaatagccctgaacagtggcttaccagtt  
gacgtgccggcgatgactattaacgaagtttgcgggtccggaatgaaagcggtgattttagccccccagtttaataca  
gttaggggaggcagagttgggtcattgcaggggtacggagtcaatgtcacaagcacccatgctgaaaccttaccagt  
cagagaccaacgaatacggagagccgatatcatcaatgggttaatgacgggctgacggatgcgttttccaatgctcac  
atgggtcttactgccgaaaagggtggcgaccagttttcagtgctcgcgcgaggaacaagaccggtacgcattgtccag  
ccaattgaaagcagcgcacgcggttgaagccgggggttcttcagaagagattattccggttaagattagcgacgagg  
atgtcttgagtgaagacgaggcagtaagaggcaacagcactttggaaaaactgggcaccttgcgacgggtgttttct  
gaagagggcacggttaccgctggcaatgcttcaccgctgaatgacggcgctagtgtcgtgattcttgcataaaaaga  
atacgcggaaaacaataatctgccttacctggcgacgataaaggaggttgcggaagtgggtatcgatccttctatca  
tgggtattgccccataaaggccattcaaaagttaacagatcggtcgggcatgaacctgtccacgattgatctgttc  
gaaattaatgaagcattcgcggcatctagcattgtgttttctcaagagctgcaattggacgaagaaaaagtgaatat  
ctatggcggggcgatagcttttaggcatccaatcggcgcaagcggagccccgatactgacaaccttagcatacggcc  
tcctgcgtgagcaaaagcgttatgggtattgcgtcattatgtatcggcggtggtcttgggtctggccgtgctgttagaa  
gctaatatggagcagaccacaaagacgttcagaagaaaaaagttttaccagcttacccttccgagcggagatcgca  
gcttatcgagaagaacgttctgactcaagaaacggcacttattttccaggagcagacgttgtccgaagaactgtccg  
atcacatgattgagaatcaggtctccgaagtggaaattccaatgggaattgcacaaaattttcagattaatggcaag  
aaaaaatggattcctatggcgactgaagaaccttcagtaatagcggcagcatcgaacggcgccaaaaatctgcgggaa  
catttgcgcggaaacgcctcagcggcttatgcgcgggcagattgtcctgtctggcaaatcagaatatcaagccgtga  
taaattgccgtgaatcatcgcaagaagaactgattctttgcgcaaacgagtcgtacccgagtattgttaaaccgggg  
ggaggtgttcaggatatttctacgcgggagtttatgggttcttttcacgcgtatttatcaatcgactttctgggtgga  
cgtcaaggacgcaatgggggcaaacatgatcaactctattctcgaaagcgttgcaataaactgcgtgaatggttcc  
cggaagaggaaatactgttctccatcctgtcaaaccttcgctacggagtccttgccatctgcatgttgcgagattcct  
tttgaaagacttggctcgtaacaaagaaattgggtgaacagatcgccaagaaaattcaacaggcaggggaatatgctaa  
gcttgaccttaccgcgcggcaaccataacaaggggattatgaacggtatcgaagccgtcgttgcgcgaacgggaa  
acgacacacgggctgtttccgcttctattcacgcatacgcgcccgtaatggcttgtaccaaggtttaacggattgg  
cagatcaagggcgataaactgggttggttaaattaacagtcacactggctgtggcgactgtcgggtggcgcgctcgaacat  
attacaaaagccaaagcttccctcgccatgctggatattgattccgcaaaagaactggcccaagtgatcgcgcgg

taggttttagcacagaatctggcggcggttacgtgcattagtgacagaaggcattcagaaaggacacatgggcttgcaa  
gcacgttcttttagcgatttcgataggtgccatcggtgaggagatagagcaagtcgcgaaaaaactgcgtgaagctga  
aaaaatgaatcagcaaacggcaatacagattttagaaaaaattcgcgagaaatga SEQ ID NO:3

[0540] 屎肠球菌mvaS:

[0541]

atgaaaatcggtattgaccgtctgtccttcttcatcccgaatttgtatttggacatgactgagctggcagaatcacg  
cggggatgatccagctaaatatcatattggaatcggacaagatcagatggcagtgaaatcgcgcaaacgaggacatca  
taacactgggtgcaaacgctgcgagtaagatcgtgacagagaaaagaccgcgagttgattgatatggtaatcgttggc  
acggaatcaggaattgaccactccaaagcaagcgcggtgattattcaccatctccttaaaattcagtcgttgcgccg  
ttcttttcgaggtaaaagaagcttgcctatggcggaaactgctgccctgcacatggcgaaggagtatgtcaaaaatcattc  
cggagcgttaaggtcttggtaattgcgtcagacatcgcgcgttatggtttggccagcggaggagaagttactcaagge  
gtggggggcgttagccatgatgattacacaaaacccccggattctttcgattgaagacgatagtgtttttctcacaga  
ggatatctatgatttctggcggcctgattactccgagttccctgtagtggacgggcccccttcaaacacacgtata  
tagagagttttcagaaagtttggaaaccggcacaaggaaattgtccggaagagggttggaagattatcaagctattgct  
tttcacataccctatacgaagatgggtaagaaagcgtccagagtgttttagaccaaaccgatgaagataaccagga  
gcgcttaatggctagatatgaggagtcatttcgctatagccggagaatttgtaacctgtacacaggcagcttgtacc  
ttgggtcttacaagcttgttggaaaactctaaaagtttacaaccgggagatcggaatcggcctcttttcttatggcagt  
gggtgcggtgtccgagttctttaccgggtatttagaagaaaattaccaagagtacctgttcgctcaaagccatcaaga  
aatgctggatagccggactcggattacggtcgatgaatacagagaccatcttttcagagactctgccagaacatgggtg  
aatgcgcgaatatcagagcgacgtcccccttttctataaccaagattgagaacgacattcgttattataaaatctga  
SEQ ID NO:4

[0542] 鸸鸡肠球菌mvaE:

[0543]

atggaagaagtggtaattatagatgcacgtcggactccgattggtaaaatcacgggtcgttgaagaagttttcagc  
gggtggcgttggggacggcctggctaaagacatgttcgaacgaaccagaaaaatcaaagaggagatcgcgcaggtca  
taattggtaattgtcttgcaggcaggaaatggccagaacccccgcgcggcaagttgctcttcaatcagggttgtccgtt  
gacattcccgttctacaattaacgaggtttgtgggtctggtttgaaagctatcttgatgggcatggaacaaatcca  
actcggcaaaagcgaagtagtgcgtggcaggcggcattgaaatcaatgacaaatgcgccaagcctgtcccactataaca  
aggcggaggatacgtatagtgtcccagtgctcgagcatgacactggatggctctgacagacgcattttctagtaaacct  
atgggattaacagcggaaaacgtcgcacagcgtacggatatctcccgtgaggcgaagatcaattcgcataatcaatc  
tcagatgaaagcagcaaaagcgcaggcagaaaacaaattcgctaaggaaattgtgccactggcgggtgaaactaaaa  
ccatcacagctgacgaagggatcagatcccaaacacgatggagaaactggcaagttctaaacctgttttttaaacc  
gatggcactgtaaccgcagggaatgctagcaccattaatgacggggccgcccttgtgctgcttgctagcaaaactta  
ctgcgaaactaatgacataccgtaccttgcgacaatcaaagaaattgttgaagttggaatcgatccggagattatgg  
gcatctctccgataaaagcgatacaaacattgttacaaaatcaaaaagttagcctcgaagatattggagtttttgaa  
ataaatgaagcctttgcccgaagtagcatagtgggtgaaatctgagttgggattagatccggctaaagtttaaccgtta  
tgggggtgggtatataccttaggtcatgcaattggggcaaccggcgtcgcctggccacttcactgggtgtatcaaatgc  
aggagatacaagcacgttatggatttgcgagcctgtgcgttgggtggacttggaatgctttttagaacgt  
ccaactattgagaaggctaaaccgacagacaaaaagttctatgaattgtcaccagctgaacggttgcaagagctgga

aaatcaacagaaaatcagttctgaaactaaacagcagttatctcagatgatgcttgccgaggacactgcaaaccatt  
tgatagaaaaatcaaatatcagagattgaactcccaatgggctcgggatgaacctgaaggttgatgggaaagccat  
gttgtgccaatggcgacggaagagccgtccgtcatcgcgcccatgtctaatgggtgccaatggccggcgaaattca  
cactcagtcgaaagaacggctgctcagaggtcagattgttttcagcgcgagaatccgaatgaaatcgaacagagaa  
tagctgagaaccaagctttgatcttcgaacgtgccgaacagtcctatccttcattgtgaaaagagaggagggtctc  
cgccgcatctgcacttcgtcattttcctgcccattctcagcaggagtctgcccaccagtcacacatttttatcagtga  
cctttttgttagatgtgaaagacgcgatgggggcaaataatcataaatgcaatacttgaggcgctcgagccctgtttc  
gcgaatgggttcccaatgaggaaattctttttctattctctcgaacttggttacggagagcttagtcacggctgtt  
tgtgaagtcccatttagtgcaacttagcaagagaggtgggtgcaacgggtggcccagaaaattgtgcaggcgctcgctctt  
cgcaaagacagaccataaccgcgcagtgacccacaacaaagggattatgaacgggtgtagaggctgttatgcttgcca  
caggcaacgacacgcgcgcagtcctcagccgcttgctatggatacgagcgcgaccggtagctatcagggtctgact  
aactggacgattgagtcggatcgctggtaggcgagataaacactgccgtggccatcgctacagttggaggcgctac  
caaagtgttgcccaaagctcaagcggcactggagatttagtgatgttcactcttctcaagagcttgacgcttagcgg  
cgctcagtaggttttagtacaaaatctcgcgccctgcgcgcactggtttccgaaggtatacaaaaagggcacatgtcc  
atgcaagcccggtctctcgcaatcgcggtcggtgtgaaaaagccgagatcgagcaggtcgccgaaaagttgcggca  
gaaccgcgaatgaatcagcagcagcgctccgttttcttggcgagatccgcgaacaatga SEQ ID NO:5

[0544] 鹌鸡肠球菌mvaS:

[0545]

atgaacgtcggcattgacaaaattaatttttctgtccaccgtattatctggatatggctgacctggcccacgcacg  
cgaagtggaccgcgaacaaatttacaattggaattggacaggatcagatggctgtgagcaaaaagacgcacgatatcg  
taacattcgcggttagtgccgcgaaggaaattttagaacctgaggacttgcaagctatagacatggttatagttggt  
accgaatcgggcattgacgagagcaaaagcatccgcggctgttttacatcgtttgttggcggtacaacctttcgctcg  
cagttttgaaattaaagaagcctgttacggggcaaccgcaggcattcagtttgccaagactcatatacaagcgaacc  
cggagagcaaggctcctggtaattgcaagcgatatagctcggtatggtcttcggtcaggtggagagcccacacaaggc  
gcaggggcagttgctatgcttctcagcgcaaatcccagaatcctgaccttcgaaaacgacaatctgatgttaacgca  
ggatattttatgacttctggagaccacttggtcacgcttaccctatggtagatggccacctttccaatcaagctctata  
ttgacagttttaagaaggctctggcaagcacattgcgaacgcaatcaagcttctataatccgactatgccgcgattagt  
tttcatattccgtatacaaaaatgggtaagaaagccctgctcgctgtttttgcagatgaagtggaaactgaacagga  
acgcgttatggcacgggtatgaagagtctatcgatatcaccgcggatcggaacttgatacgggatcattgtacc  
tggggctgatataccttattggaaaacagttctcaccgtcgcgggcgaccggataggattgttttagttatgggagt  
ggcgctgtcagcgaatttttctccggctgcttagtggcaggctatgaaaatcaattgaacaaagaggcgcatacca  
gctcctggatcagcgtcagaagctttccatcgaagagtatgaggcgatttttacagattccttagaaattgacagga  
atgcagcgcttctcggtatgacctgccatattccatccgcgagataaaaaacacgattcggtactataaggagagctga  
SEQ ID NO:6

[0546] 铅黄肠球菌mvaE:

[0547]

atggaagaagttgtcatcattgacgcactgcgtactccaataggaaagtaccacggttcgctgaaagattacacagc  
tgttgaactggggacagtagcagcaaaaggcgttgctggcacgaaatcagcaagcaaaagaacacatagcgcaagtta  
ttattggcaacgtcctgcaagccggaagtgggcagaatccaggccgacaagtcagtttacagtcaggattgtcttct

gatatccccgctagcacgatcaatgaagtgtgtggctcgggtatgaaagcgattctgatgggtatggagcaaattca  
gctgaacaaagcctctgtgggtcttaacaggcggaattgaaagcatgaccaacgcgcgctgttttagttattacaaca  
aggctgaggatcaatatctggcgccggttagcacaatgatgcacgatggcttaacagatgctttcagttccaaacca  
atgggcttaaccgcagagaccgtcgctgagagatatggaattacgcgtaaggaacaagatgaatttgcttatcactc  
tcaaatgaaggcgccaaagcccaggcgcgaaaaagtttgatcaggaaattgtaccctgacggaaaaatccggaa  
cggttctccaggacgaaggcatcagagccgcgacaacagtcgagaagctagctgagcttaaaacggtgttcaaaaa  
gacggaacagttacagcgggtaacgcctctacgataaatgatggcgctgctatggatttaatagcatcaaaatctta  
ttgcgaagaacaccagattccttatctggccgttataaaggagatcggtgaggtgggttttgcggcgaaataatgg  
gtatttccccattaaggctatagacacctgctgaaaaatcaagcactgaccatagaggatataggaatatttgag  
attaatgaagcctttgctgcgagttcgattgtggtagaacgcgagttgggctggacccccaaaaagttaatcgcta  
tggcgggtggtatatactcggccacgcaattggggcgacgggagctcgcatcgacgaccgttgcttatcagctga  
aagatacccaggagcgctacgggtatagcttccttatgcgttgggtgggggtcttggattggcgatgcttctggaaaac  
ccatcgggcactgcctcacaaactaattttgatgaggaatctgcttccgaaaaactgagaagaagaagttttatgc  
gctagctcctaacgaacgcttagcgtttttggaaagccaaggcgctattaccgctgctgaaacctggcttccagg  
agatgaccttaacaaagagacagccaatcacttaatcgaaaacaaatcagcgaagttgaaattccttttagcggtg  
ggcctgaacttacaggtgaatgggaaagcgataatgttccctcggccacggaggaaccgtccgttatcgctcgcat  
gtcgaatggcgccaaaatggctgggtcctattacaacaacaagtcaggagaggctgttacggggtcagattgtcttca  
tggacgtacaggaccagaagcaatattagcgaaagttgaatccgagcaagctaccattttcgcggtggcaaatgaa  
acatacccgctctatcggtgaaaagaggaggaggtctgcgtagagtcattggcaggaatttcagtcggccgaaagtga  
cttagccacggcgatgtatcaattgacctgatggtagatgttaaggatgcaatgggtgctaataatcatcaatagta  
tcctagaaggtgttgcggaattgtttagaaaaatgggtccagaagaagaaatcctgtttctcaattctctccaatctc  
gcgacagaaagtctggtaacggcgacgtgctcagttccgtttgataaaattgtccaaaactgggaatggtcgacaagt  
agctggtaaaatagtgacgcggcgactttgctaagatagatccatacagagctgccacacacaataaaggtatta  
tgaatggcggtgaagcgtaatcttagccaccggtaatgacaccctgcgggtgctcggtgcatgccacggttacgcg  
gcacgcaatggggaatgcaagggttacctcttgacgattatcgaaagatcggtgtaggtcttatcacattacc  
tttggctattgcgacagtgggggggtgccacaaaaatcttgccaaaagcacaggccgcccctggcgctaactggcggtg  
agacggcgctcggaactggccagcctggcgcgagtggtgggattagttcaaaatttggccgctttacgagcactagtg  
agcgagggcattcagcaagggcacatgagtatgcaagctagatccctggccattagcgtaggtgcgaaaggtactga  
aatagagcaactagctgcgaagctgagggcgacgcgcaaatgaatcaggagcaggctcgtaatttctgaccgaaa  
taagaaattaa SEQID NO:7

[0548] 铅黄肠球菌mvaS:

[0549]

atgaacgttggaaattgataaaatcaattttttcgttccgccctatttcattgatatggtggatctcgctcatgcaag  
agaagttgacccaacaagttcactataggaataggccaagatcagatggcagtaaacagaacgaagatatcg  
taacgttcgcgatgcacgccggaaggatattctgactaaggaagatttacaggccatagatatggtaatagtgggg  
actgagctctgggatcgacgagagcaaggcaagtgctgtcgtattgcatcggttttaggtattcagccttttgcgcg  
ctcctttgaaattaaggaggcatgctatggggccactgccggccttcagtttgcaaaagctcatgtgcaggctaate  
cccagagcaaggctcctgggtgtagcttccgatatagcacgctacggactggcatccggaggagaaccgactcaaggt  
gtaggtgctgtggcaatgttgatttccgctgatccagctatcttgagttagaaaatgataatctcatgttgacca

agatatatacgatTTTTTggcgcccggtcgggcatcaatatcctatggttagacggccatctgtctaatgccgtctata  
tagacagctTTTaaacaagctctggcaagcacattgcgagaaaaaccaacggactgctaaagattatgctgcattgtcg  
ttccatattccgtacacgaaaatgggtaagaaagctctgttagcggTTTTTgcgaggagaatgagacagaacaaaa  
gcggttaatggcacgttatgaagaatcaattgtatacagtcgtcggactggaaatctgtatactggctcactctatc  
tgggcctgatttccttactggagaatagtagcagtttacaggcgaacgatcgcataggtctgttttagctatggttca  
ggggccgttgcggaatttttcagtggcctcttgggtaccgggttacgagaaacaattagcgcaagctgcccatcaagc  
tcttctggacgaccggcaaaaactgactatcgcagagtagcaagccatgtttaatgaaaccattgatattgatcagg  
accagtcatttgaggatgacttactgtactccatcagagagatcaaaaacactattcgctactataacgaggagaat  
gaataa SEQ ID NO:8

[0550] 鹌鸡肠球菌EG2(mvaE):

[0551] MEEVVIIDARRTPIGKYHGSLKKFSAVALGTAVAKDMFERNQKIKEEIAQVIIGNVLQAGNGQNPQRQV  
A

[0552] LQSGLSVDIPASTINEVCGSGLKAILMGMEIQLGKAQVVLGGIESMTNAPSLSHYNKAEDTYSVPVS  
S

[0553] MTLDGLTDAFSSKPMGLTAENVAQRYGISREAQDQFAYQSQMKAQAENKFAKEIVPLAGETKTITA  
D

[0554] EGIRSQTTMEKLASLKPVFKTDGTVTAGNASTINDGAALVLLASKTYCETNDIPYLATIKEIVEVGIDP  
E

[0555] IMGISPIKAIQTLLQNQKVSLEDIGVFEINEAFAASSIVVESELGLDPAKVNRYGGGISLGHAIATGA  
R

[0556] LATSLVYQMQEIQARYGIASLCVGGGLGLAMLLERPTIEKAKPTDKKFYELSPAERLQELNQQKISSE  
T

[0557] KQQLSQMMLAEDTANHLIENQISEIELPMGVGMNLKVDGKAYVVPMAATEEPSVIAAMSNGAKMAGEIHT  
Q

[0558] SKERLLRGQIVFSAKNPNEIEQRIAENQALIFERAESQSPSIVKREGGLRRIALRHFPAQSQQESADQS  
T

[0559] FLSVDLFVDVKDAMGANIINAILEGVAALFREWFNNEILFSILSNLATESLVTAVCEVPFSALSKRGG  
A

[0560] TVAQKIVQASLFAKTDPYRAVTHNKGIMNGVEAVMLATGNDTRAVSAACHGYAARTGSYQGLTNWTIES  
D

[0561] RLVGEITLPLAIATVGGATKVLPAQAALIEISDVHSSQELAALAASVGLVQNLAALRALVSEGIQKGHM  
S

[0562] MQARSLAIVGAEKAEIEQVAEKLQNPPMNQQALRFLGEIREQ SEQID NO:9

[0563] 鹌鸡肠球菌EG2(mvaS)

[0564] MNVGIDKINFFVPPYYLDMVDLAHAREVDPNKFTIGIGQDQMAVSKKTHDIVTFAASAKEILEPEDLQ  
A

[0565] IDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLLGVPFARSFEIKEACYGATAGIQFAKTHIQANPESKVLVIASD  
I

[0566] ARYGLRSGGEPTQGAGAVAMLLTANPRILTFENDNLMLTQDIYDFWRPLGHAYPMVDGHLNQQVYIDSF

K

[0567] KVVQAHCERNQASISDYAAISFHIPYTKMGKKALLAVFADEVETEQERVMARYEESIVYSRRIGNLYTG

S

[0568] LYLGLISLLENSSHLSAGDRIGLFSYSGSAGVSEFFSGRLVAGYENQLNKEAHTQLLDQRQKLSIEEYEA

I

[0569] FTDSLEIDQDAAFSDDLPSYSIREIKNTIRYYKES SEQ ID NO:10

[0570] 格氏李斯特菌(mvaE):

[0571] MVKDIVIIDALRTPIGKYRGQLSKMTAVELGTAVTKALFEKNDQVKDHVEQVIFGNVLQAGNGQNPARQ

I

[0572] ALNSGLSAEIPASTINQVCGSGLKAISMARQQILLGEAEVIVAGGIESMTNAPSITYYNKEEDTLSKPV

P

[0573] TMTFDGLTDAFSGKIMGLTAENVAEQYGVSRQAQDAFAYGSQMKAQAQEQGIFAAEILPLEIGDEVIT

Q

[0574] DEGVRQETTLEKLSLLRTIFKEDGTVTAGNASTINDGASAVIIASKEFAETNQIPYLAIVHDITEIGID

P

[0575] SIMGIAPVSAINKLIDRNQISMEEIDLFEINEAFAASSVVVQKELSIPDEKINIGGSGIALGHPLGATG

A

[0576] RIVTTLAHQKLRTHGRYGIASLCIGGGLGLAILIEVPQEDQPVKKFYQLAREDRLARLQEQAVISPA TK

H

[0577] VLAEMTLPEDIADNLIENQISEMEIPLGVALNLRVNDKSYTIPLATEEPSVIAACNNGAKMANHLGGFQ

S

[0578] ELKDGFLRGQIVLMNVKEPATIEHTITA EKAAIFRAAAQSHPSIVKRGGGLKEIVVRTFDDDP TFLSID

L

[0579] IVDTKDAMGANIINTILEGVAGFLREILTEEILFSILSNYATESIVTASCRIPYEALSKKGDGKRIA EK

V

[0580] AAASKFAQLDPYRAATHNKGIMNGIEAVVLASGNDTRAVAAAAAHAYASRDQHYRGLSQWQVAEGALHGE

I

[0581] SLPLALGSVGGAEVLPKAKAAFEIMGITEAKELAEVTA AVGLAQNLALRALVSEGIQQGHMSLQARS

L

[0582] ALSVGATGKEVEILA EKLQGSRMNQANAQTILAEIRSQKVEL SEQ IDNO:11

[0583] 格氏李斯特菌(mvaS):

[0584] MTMNVGIDKMSFFVPPYFVDMTDLAVARDVDPNKFLIGIGQDQMAVNPKTQDIVTFATNAAKNILSAED

L

[0585] DKIDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLG IQKFARSFEIKEACYGGTAALQFAVNHIRNHPESKVLVVA

S

[0586] DIAKYGLASGGIPTQGAGAVAMLVSTDPKIIAFNDDSLALTQDIYDFWRPVGHDYPMVDGPLSTETYIQ

S

[0587] FQTVWQEYTKRSQHALADFAALS FHIPYTKMGKKALLAILEGESEEAQNRILAKYEKSIAYS RKAGNLY

T

- [0588] GSLYLGLISLLENAEDLKAGDLIGLFSYSGGAVAEFFSGRLVEDYQEQLLTKHAEQLAHRKQLTIEEY  
E
- [0589] TMFSDRLDVKDAEYEDTLAYSISVRNTVREYRS SEQ ID NO:12
- [0590] 尿肠球菌(mvaE):
- [0591] MKEVVMIDAARTPIGKYRGSLSPTAVELGTLVTKGLLDKTKLKKDKIDQVIFGNVLQAGNGQNVARQI  
A
- [0592] LNSGLPVDVPAMTINEVCGSGMKAVILARQLIQLGEAELVIAGGTESMSQAPMLKPYQSETNEYGEPIS  
S
- [0593] MVNDGLTDAFSNAHMGLTAEKVATQFSVSREEQDRYALSSQLKAAHAVEAGVFSEEIIPVKISDEDVLS  
E
- [0594] DEAVRGNSTLEKLGTLRTVFSEEGTVTAGNASPLNDGASVVILASKEYAENNNLPYLATIKEVAEVGID  
P
- [0595] SIMGIAPIKAIQKLTDRSGMNLSTIDLFEINEAFAASSIVVSQELQLDEEKVNIYGGAIALGHPIGASG  
A
- [0596] RILTTLAYGLLREQKRYGIASLCIGGGLGLAVLLEANMEQTHKDVQKKKFYQLTPSERRSQLIEKNVLT  
Q
- [0597] ETALIFQEQLSEELSDHMIENQVSEVEIPMGIAQNFQINGKKKWIPMATEEPSVIAAASNGAKICGNI  
C
- [0598] AETPQRLMRGQIVLSGKSEYQAVINAVNHRKEELILCANESYPISVKRGGGVQDISTREFMGSFHAYLS  
I
- [0599] DFLVDVKDAMGANMINSILESVANKLREWFPEEEILFSILSNFATESLASACCEIPFERLGRNKEIGEQ  
I
- [0600] AKKIQQAGEYAKLDPYRAATHNKGIMNGIEAVVAATGNDTRAVSASIHAYAARNGLYQGLTDWQIKGDK  
L
- [0601] VGKLTVP LAVATVGGASNILPKAKASLAML DIDS AKELAQVIAAVGLAQNL AALRALVTEGIQKGHML  
Q
- [0602] ARSLAISIGAIGEEIEQVAKKLREAEMNQQTAIQILEKIREK SEQ IDNO:13
- [0603] 尿肠球菌(mvaS)
- [0604] MKIGIDRLSFFIPNL YLDMTELAESRGDDPAKYHIGIGQDQMAVN RANEDIITLGANAASKIVTEKDRE  
L
- [0605] IDMVIVGTESGIDHSKASAVIIHLLKIQSFARSFEVKEACYGGTAALHMAKEYVKNHPERKVLVIASD  
I
- [0606] ARYGLASGGEVTQGVGAVAMMITQNPRILSIEDDSVFLTEDIYDFWRPDYSEFPVVDGPLSNSTYIESF  
Q
- [0607] KVWNRHKELSGRGLEDYQAI AFHIPYTKMGKKALQSVLDQTD EDNQR L MARYEESIRYSRRIGNLYTG  
S
- [0608] LYLGLTSLENSKSLQPGDRIGLFSYSGGAVSEFFTGYLEENYQEYLFAQSHQEMLDSRTRITVDEYET  
I
- [0609] FSETLPEHGEC AEYTS DVPFSITKIENDIRYYKI SEQ ID NO:14

[0610] 铅黄肠球菌(mvaE):

[0611] MEEVVIIDALRTPIGKYHGLKDYTAVELGTVAAKALLARNQQAKEHIAQVIIGNVLQAGSGQNPGRQV  
S

[0612] LQSGLSDDIPASTINEVCGSGMKAILMGMEQIQLNKASVVLTTGGIESMTNAPLFSYYNKAEDQYSAPVS  
T

[0613] MMHDGLTDAFSSKPMGLTAETVAERYGITRKEQDEFAYHSQMKAQAQAQAKKFDQEIVPLTEKSGTVLQ  
D

[0614] EGIRAATTVEKLAELKTVFKDGTVTAGNASTINDGAAMVLIASKSYCEEHQIPYLAVIKEIVEVGFAP  
E

[0615] IMGISPIKAIDTLLKNQALTIEDIGIFEINEAFAASSIVVERELGLDPKKVNRVGGGISLGHAIATGA  
R

[0616] IATTVAYQLKDTQERYGIASLCVGGGLGLAMLENPSATASQTNFDEESASEKTEKKKFYALAPNERLA  
F

[0617] LEAQGAITAAETLVFQEMTLNKETANHLIENQISEVEIPLGVGLNLQVNGKAYNVPLATEEPSVIAAMS  
N

[0618] GAKMAGPITTTTSQERLLRGQIVFMDVQDPEAILAKVESEQATIFAVANETYPISIVKRGGGLRRVIGRNF  
S

[0619] PAESDLATAYVSIIDLMVDVKDAMGANIINSILEGVAELFRKWFPEEEILFSILSNLATESLVTATCSVP  
F

[0620] DKLSKTGNRQVAGKIVHAADFADIDPYRAATHNKGIMNGVEALILATGNDTRAVSAACHGYAARNRGM  
Q

[0621] GLTSWTIIEDRLIGSITLPLAIATVGGATKILPKAQAALALTGVETASELASLAASVGLVQNLAALRAL  
V

[0622] SEGIQQGHMSMQARSLAISVGAKGTEIEQLAAKLRAATQMNQEQARKFLTEIRN SEQ ID NO:15

[0623] 铅黄肠球菌(mvaS)

[0624] MNVGIDKINFVPPYFIDMVDLAHAREVDPNKFTIGIGQDQMAVNKKTQDIVTFAMHAAKDILTKEDLQ  
A

[0625] IDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLLGIQPFARSFEIKEACYGATAGLQFAKAHVQANPQSKVLVVASD  
I

[0626] ARYGLASGGIPTQGVGAVAMLI SADPAILQLENDNLMLTQDIYDFWRPVGHQYPMVDGHLNAVYIDSF  
K

[0627] QVWQAHCEKNQRTAKDYAALSFHIPYTKMGKKALLAVFAEEDETEQKRLMARYEESIVYSRRTGNLYTG  
S

[0628] LYLGLISLLENSSSLQANDRIGLFSYSGGAVAEFFSGLLVPGYEKQLAQAAHQALLDDRQKLTIAEYEA  
M

[0629] FNETIDIDQDQSFEDDLLYSIREIKNTIRYYNEENE SEQ ID NO:16

[0630] 异戊二烯合酶:

[0631]

Atggaagctcgctggttctggaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacga

gtccatcgaagtatacaaaagacaaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcag  
aatttctgacctgctggaactgattgacaacgtccagcgcttggcctgggttaccgtttcagagtctgatatccgt  
gggtgcgtggatcgcttcgtttcctccggcggttcgatgcggtaaccaagacttcctgcacgggtacggcactgtc  
ttccgtctgctgcgtcaacacgggttttgaggtttctcaggaagcgttcagcgggttcaaagacaaaacggcaact  
tcctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaa  
aacatcctggacgagcggaaggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagct  
ggcagaacaggtgaacctatgcactggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcg  
aggcctaccgtaaaaaaggaggacgcgaatcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagctct  
gtataccagcgtgatctgctgaaacgtcccgttgggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcactttgctcg  
tgaccgcctgattgagagcttctactgggcccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccg  
tcgcaaaaatgttttctttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcacccctggacgaactggagctg  
tttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggttacatgaaactgtgctttctggc  
tctgtataacactattaacgaaatcgccctacgacaacctgaaagataaaggtgagaacatcctgccgtatctgacca  
aagcctgggctgacctgtgcaacgctttcctgcaagaagccaagtggctgtacaacaaatctactccgacctttgac  
gactacttcggcaacgcattgaaatcctcttctggcccgtgcaactgggtgttcgcttacttcgctgtcgtgcagaa  
cattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaataccatgacaccatctctcgtccttcccatacttccgtctgt  
gcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtgggtgaaaccgcaaatagcgtttcttgtttacatgcgcact  
aaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaacaagga  
aaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcactt  
atcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgacccgcaaaccggttctgtctgtaatcactgaaccgatt  
ctgccgtttgaacgctaaaispA:

[0632]

tggactttccgcagcaactcgaagcctgcgttaagcaggccaaccaggcgtgagccgttttatcgccccactgccc  
tttcagaacactcccgtggctgaaacctatgcagtatggcgcattattaggtggtaagcgccctgcgacctttcctggt  
ttatgccaccggctcatatgtttggcgttagcacaaacacgctggacgcaccgctgctgccgtagagtgtatccacg  
cttactcattaattcatgatgatttaccggcgatggatgatgacgactcgcgccgggtttgccgacctgccatgtg  
aagtttggcgaagcaaacgcgattctcgttggcgacgctttacaaacgctggcgttctcgattctaaagcgatgccga  
tatgccggaagtgtcggatcgcgacagaatttcgatgatttctgaaactggcgagcgccagcgggtattgccggaatgt  
ggggtggtcaggcactagatttagacgcggaaggcaaacacgtacctctggacgcgcttgagcgtattcatcgtcat  
aaaaccggcgcatgtattcgcgcgccgttcgccttgggtgcattaaagcgccggagataaaggggcgtcgtgctctgcc  
agtactcgacaagtacgcagagagcatcgcccttgccctccaggttcaagatgacatcctggatgtggttaggagata  
ctgcaacgttgggaaaacgccagggtgccgaccagcaacttggtaaaagtacctacctgcacttctgggtcttgag  
caagcccgaagaaagcccgggatctgatcgacgatgcccgtcagtcgctgaaacaactggctgaacagtcactcga  
tacctcggcactggaagcgttagcggactacatcatccagcgtataataataa

[0633] 针对大肠杆菌进行密码子优化的紫穗槐二烯合酶:

[0634] ATGAGCCTGACCGAAGAAAAACCGATTTCGTCCGATTGCAAATTTCCGCCTAGCATTGTTGGGTGATCAG  
TTTCTGATTTATGAGAAACAGGTTGAACAGGGCGTTGAGCAGATTGTTAATGATCTGAAAAAGAAGTTCGCCAGCT  
GCTGAAAGAAGCACTGGATATTCCGATGAAACATGCCAATCTGCTGAAACTGATTGATGAAATTCAGCGTCTGGGTA  
TCCCGTATCATTTTGAACGTGAAATTGATCATGCCCTGCAGTGCATTTATGAAACCTATGGTGATAATTGGAATGGT

GATCGTAGCAGCCTGTGGTTTCGTCTGATGCGTAAACAGGGTTATTATGTTACCTGCGACGTGTTTAACTATAA  
AGATAAAACGGTGCCTTTAAACAGAGCCTGGCAAATGATGTTGAAGGTCTGCTGGAACGTATGAAGCAACCAGCA  
TGCGTGTTCCGGGTGAAATTATTCTGGAAGATGCACTGGGTTTTACCCGTAGCCGTCTGAGCATGATGACCAAAGAT  
GCATTTAGCACCAATCCGGCACTGTTTACCGAAATCCAGCGTGCACTGAAACAGCCGCTGTGGAAACGTCTGCCTCG  
TATTGAAGCAGCACAGTATATTCCGTTTTATCAGCAGCAGGATAGCCATAACAAAACCCTGCTGAAACTGGCAAAAC  
TGGAATTTAATCTGCTGCAGAGCCTGCATAAAGAAGAACTGAGCCACGTTTGTAATGGTGGAAAGCCTTCGACATC  
AAAAAAAACGCACCGTGTCTGCGTGATCGTATTGTTGAATGTTATTTTTGGGGTCTGGGTAGCGTTTTGAACCGCA  
GTATAGCCGTGCACGTGTGTTTTTACCAAAGCAGTTGCAGTTATTACCCTGATCGATGATACCTATGACGCATATG  
GCACCTATGAGGAACTGAAAATCTTTACCGAAGCCGTTGAACGTTGGAGCATTACCTGTCTGGATACCCTGCCGGAA  
TATATGAAACCGATCTATAAACTGTTTCATGGACACCTATACCGAGATGGAAGAATTTCTGGCAAAAGAAGGTCTGAC  
CGACCTGTTTAATTGCGGTAAAGAATTTGTGAAAGAATTCGTGCGTAACCTGATGGTTGAAGCAAAATGGGCCAATG  
AAGGTCATATTCCGACCACCGAAGAACATGATCCGGTTGTGATTATTACCGGTGGTGCAAACCTGCTGACCACCACC  
TGTTATCTGGGTATGAGCGATATTTTACCAAAGAAAGCGTTGAATGGGCAGTTAGCGCACCGCCTCTGTTTCGTTA  
TAGCGGTATTCTGGGTGCTGCTCTGAACGATCTGATGACCCATAAAGCAGAACAAGAACGTAAACATAGCAGCAGCA  
GCCTGGAAAGCTATATGAAAGAATATAACGTGAACGAAGAGTATGCACAGACCCTGATTTACAAAGAAGTTGAGGAC  
GTTTGGAAAGATATCAACCGTGAATATCTGACCACGAAAAACATTCCGCGTCCGCTGCTGATGGCAGTTATTTATCT  
GTGTCAGTTCCTGGAAGTTCAGTATGCAGGTAAAGATAACTTTACGCGTATGGGCGACGAATATAAACATCTGATTA  
AAAGCCTGCTGGTGTATCCGATGAGCATTTAA

[0635] 针对大肠杆菌进行密码子优化的金合欢烯合酶：

[0636] ATGAGCACCTGCCGATTAGCAGCGTTAGCTTTAGCAGCAGCACCAGTCCGCTGGTTGTTGATGATAAA  
GTTAGCACCAAACCGGATGTTATTTCGTACACCATGAACTTTAATGCAAGCATTGGGGTGATCAGTTTCTGACCTA  
TGATGAACCGGAAGATCTGGTGATGAAAAACAGCTGGTTGAAGAACTGAAAGAAGAAGTTAAAAAGAGCTGATCA  
CCATCAAAGGTAGCAATGAACCGATGCAGCATGTTAACTGATTGAACTGATCGATGCCGTTACGCGTCTGGGTATT  
GCATATCATTTTGAAGAAGAAATCGAAGAAGCCCTGCAGCATATTATGTTACCTATGGTGAACAGTGGGTGGATAA  
AGAAAATCTGCAGAGCATTAGCCTGTGGTTTCGTCTGCTGCGTCAGCAGGGTTTTAATGTTAGCAGCGGTGTGTTTA  
AAGATTTTATGGACGAGAAAGGCAAATTCAAAGAAAGCCTGTGTAATGATGCACAGGGTATTCTGGCACTGTATGAA  
GCAGCATTTATGCGTGTTGAAGATGAAACCATTTCTGGATAATGCACTGGAATTTACCAAAGTGCACCTGGATATCAT  
TGCAAAAGATCCGAGCTGTGATAGCAGCCTGCGTACCCAGATTCATCAGGCACCTGAAACAGCCGCTGCGTCGTCGTC  
TGGCACGCATTGAAGCACTGCATTATATGCCGATTTATCAGCAAGAAACCAGCCATAATGAAGATCTGCTGAAACTG  
GCAAAACTGGATTTTAGCGTTCTGCAGTCCATGCACAAAAAAGAACTGAGCCATATTTGTAAATGGTGGAAAGATCT  
GGATCTGCAGAATAAACTGCCGTATGTTCTGTGATCGTGTTGTGGAAGGTTATTTTTGGATTCTGAGCATCTATTATG  
AACCGCAGCATGCACGTACCCGTATGTTTCTGTATGAAAACCTGTATGTGGCTGGTTGTGCTGGATGATACGTTTGAT  
AATTATGGCACCTACGAGGAACTGGAAATCTTTACCCAGGCAGTTGAACGTTGGAGCATTAGTTGTCTGGATATGCT  
GCCGGAATACATGAACTGATTTATCAAGAACTGGTGAACCTGCACGTTGAAATGGAAGAAAGTCTGGGCAAAGGTG  
GTAAAAACATTAGCAATAGTCTGTGTCAGGGTCGTTGGCAGAAAGAACTGGGTAGTCAGATTACCCTGGTTGAAACC  
AAAATGGCAAAACGTGGTGTTTCATGCCAGCCGCTGGAAGAGTATATGAGCGTTAGCATGGTTACCGGCACCTATGG  
TCTGATGATTGCAGTAGCTATGTTGGTCGTGGTGATATTGTTACCGAAGATACCTTTAAATGGGTGAGCAGCTATC  
CGCCTATTATCAAAGCAAGCTGTGTTATTGTTTCGCTGATGGATGATATTGTGAGCCACAAAGAAGAACAAGAACGC  
GGTCATGTTGCCAGCAGCATTGAATGTTATAGCAAAGAAAGTGGTGCAAGCGAAGAAGAAGCCTGCGAATATATCAG

CCGTAAAGTGAAGATGCCTGGAAAGTTATTAATCGTGAAAGCCTGCGTCCGACCGCAGTTCCGTTTCCGCTGCTGA  
TGCCTGCAATTAACCTGGCACGTATGTGTGAAGTTCTGTATAGCGTTAATGATGGTTTTACCCATGCCGAAGGTGAT  
ATGAAATCCTATATGAAAAGCTTCTTCGTGCATCCGATGGTTGTTTAA

[0637] pMCM1223-pCL-Ptrc-Upper\_GcMM\_161(格氏李斯特菌DSM20601);

[0638]

cccgctcttactgtcggaattcgcggtggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcat  
ccggctcggtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaag  
cggcactgctctttacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaaactttattattaaa  
aattaaagaggtatataattaatgtatcgattaaataaggaggaaataaacatgggttaaagacattgtaataattgat  
gccctccgtactcccatcggttaagtaccgcggtcagctctcaaagatgacggcggtggaattgggaaccgcagttac  
aaaggctctgttcgagaagaacgaccagggtcaaagaccatgtagaacaagtcatttttggcaacgttttacaggcag  
ggaacggccagaatcccgcgcgctcagatcgcccttaattctggcctgtccgcagagataccggcttcgactattaac  
cagggtgtgtggttctggcctgaaagcaataagcatggcgcgccaacagatcctactcggagaagcggagtaatagt  
agcaggaggtatcgaaatccatgacgaatgcgcccaggtattacataattataaagaagaagacacccctctcaaagc  
ctgttctctacgatgaccttcgatggctgtgaccgacgcgttttagcggaagattatgggtttaacagccgaaaaatgtt  
gccgaacagtagcggcgtatcacgtgaggcccaggacgcctttgcgtatggatcgagatgaaagcagcaaaggccca  
agaacagggcatttttcgcagctgaaatactgcctcttgaaaataggggacgaagtattactcaggacgagggggttc  
gtcaagagaccacccctcgaaaaattaagtctgcttcggaccatttttaagaagatgggtactgttacagcgggcaac  
gcctcaacgatcaatgatggcgccctcagccgtgatcattgcatcaaaggagtttgctgagacaaaccagattcccta  
ccttgcgategtatcatgatattacagagataggcattgatccatcaataatgggcattgctcccgtgagtgcgatca  
ataaactgatcgatcgtaaccaaattagcatggaagaaatcgatctctttgaaattaatgaggcatttgcagcatcc  
tcgggtggtagttcaaaaagagtttaagcattcccgatgaaaagatcaatattggcggttccggtattgcactaggcca  
tcctcttggcgccacaggagcgcgcatgttaaccaccctagcgcaccagttgaaacgtacacacggacgctatggta  
ttgcctccctgtgcattggcggtggccttggcctagcaatatataagaagtgcctcaggaagatcagccggttaaa  
aaattttatcaattggcccgtgaggaccgtctggcctagacttcaggagcaagccgtgatcagcccagctacaaaaca  
tgtactggcagaaatgacacttccctgaagatattgccgacaatctgatcgaaaatcaaatatctgaaatggaaatcc  
ctcttgggtgtggcctttgaatctgagggtcaatgataagagttataccatcccactagcaactgaggaaccgagtgta  
atcgctgcctgtaataatgggtgcaaaaatggcaaacccgcaactatcgagcatagcatcacggcagagaaagcggcaa  
tttttcgtgcgcgacgcagtcacatccatcgattgtgaaacgaggtgggggtctaaaagagatagtagtgcgtaag  
ttcgatgatgatccgacgttccctgtctattgatctgatagttgatactaaagacgcaatgggcgctaacaatcattaa  
caccattctcgagggtgtagccggctttctgagggaaatccttacgaagaaatctgttctctattttatctaat  
acgcaaccgaatcaattgtgaccgccagctgtcgcataccttacgaagcactgagtaaaaaaggtgatggtaaacga  
atcgctgaaaaagtggctgctgcacataaatttggccagtttagatccttatcgagctgcaaccacacaacaaggtat  
tatgaatgggtattgaggccgtcgttttggcctcaggaaatgacacacgggcggtcgcggcagccgcacatgcgtatg  
cttcacgcgatcagcactatcggggcttaagccagtggcaggttgacagaaggcggttacacggggagatcagctcta  
ccacttgcactcggcagcggttggcggtgcaattgaggcttgcctaaagcgaaggcggcattcgaaatcatggggat  
cacagaggcgaaggagctggcagaagtcacagctgcggtagggctggcgcaaaacctggcgggcggttaagagcgcttg  
ttagtgaaggaatacagcaagggtcacatgtcgctccaggctcgctctcttgcatattcggttaggtgctacaggcaag

gaagttgaaatcctggccgaaaaattacagggctctcgtatgaatcaggcgaacgctcagaccatactcgcagagat  
cagatcgcaaaaagttgaattgtgatctagacgcactaggaggataataccaatgacatgaacgttggaaatcgataa  
aatgtcattctttgttccaccttactttgtggacatgactgatctggcagtagcacgggatgtcgatcccaataagt  
ttctgattggatattggccaggaccagatggcagttaatccgaaaacgcaggatattgtgacatttgccacaaatgct  
gccaaaaacatactgtcagctgaggaccttgataaaattgatatggtcatagtcggcaccgagagtggaaatcgatga  
atccaaagcgagtgcgtagtgccttcacaggttgctcggtatccagaagtttgctcgctcctttgaaatcaaagaag  
cctgttatgggggtaccgcggctttacagttcgctgtaaaccacattaggaatcatcctgaatcaaaggttcttgta  
gttgcatcagatatcgcgaaatacggcctggcttctggagggtgaaccaacgcaaggtgcaggcgctgtggctaagct  
cgtctcaactgacctaaagatcattgctttcaacgacgatagcctcgcgcttacacaagatatctatgacttctggc  
gaccagttggacatgactatcctatggctcgacgggctcttagtacagagacctacatccagtcatttcagaccgta  
tggcaggaatacacaaaaacggctcgacgatgcactggcagactttgctgccccttagctttcataatcccgtatactaa  
aatgggcaaaaaggcgctgcttgcaatccttgaaaggcgaaatcagaggaggctcagaaccgtatactagcaaaaatg  
aaaagagtatagcctactccagaaaggcggttaacctgtataaccggtagcctgtatctaggacttatttcacttctg  
gaaaatgcagaagaccttaaagctgggtgatttaataggcctcttttcttacggttccggtgctgttgccggagttttt  
ctcaggaaggctgggttgaggactatcaggaacagctacttaaaacaaaacatgccgaacagctggccccatagaaagc  
aactgacaatcgaggagtacgaaacgatgttctccgatcgcttgacgtggacaaagacgccgaatacgaagacaca  
ttagcttatagcatttctgcagtcggaaacaccgtacgtgagtacaggagttgactgcagctggtaccatatgggaa  
ttcgaagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatc  
attgagtttaaacggtctccagcttggctgttttgccggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcg  
aacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcttgccggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaac  
tcagaagtgaacgcgctagcgccgatggtagtgtggggctctcccctatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaa  
taaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgtttgttgctgggtgaacgctctcctgagtagg  
acaaatccgcccgggagcggatttgaacgttgcaagcaacggcccgagggtggcgggcaggacgcccgcataaac  
tgccaggcatcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatt  
tttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatctggcgtaatag  
cgaagaggccccgcaccgatcgcccttcccacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggtattttc  
tccttacgcactctgtgcggtatttcacaccgcataatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagtta  
agccagccccgacaccgcgaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagatttttaatgcggatgttgca  
ttacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatacttcccatttgtgtagggcttatt  
atgcacgcttaaaaaataataaaagcagacttgacctgatatgtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaa  
cgcttgagtttaagccgcgcgcggaagcggtcggttgaaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtg  
atctcgccctttcagtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgagggccaagcgatcttcttcttgccaag  
ataagcctgtctagcttcaagtatgacgggtgatactgggcccggcaggcgtccattgcccagtcggcagcgacat  
ccttcggcgcgattttgcccgttactgcgctgtaccaaatgcccggacaacgtaagcactacatttcgctcategcca  
gcccagtcgggcccggcagttccatagcgttaaggtttcatttagcgctcaaatagatcctgttcaggaaccggatc  
aaagagttcctccgcgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcgtttgtcagcaagatagccagatcaa  
tgtcgatcgtggctggctcgaagataacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgctta  
gctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatgggtgacttctacagcgcgagagaatctcgtctctctcc  
aggggaagccgaagtttccaaaaggctggtgatcaaagctcgccgctgttttcatcaagccttacggtcacccgtaa

ccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcgagccgtacaaatgtacggccagcaacgtc  
ggttcgagatggcgctcgatgacccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcacgcgttccctcat  
gatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcggttgctgctccataacatcaaacatcgacca  
cggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccaggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaa  
accgccactgcgcgcttaccaccgctgcgttcgggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgtacttgca  
ttacagcttacgaaccgaacaggettattgtccactgggttcgtgccttcacgtttccacgggtgtgcgtcaccggg  
caaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcgaaggtttcgggtctccacgcat  
cgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcgg  
aagacctcgccgctgcggcgcttgccggtgggtgctgaccccggtgaagtgggtcgcatcctcggttttctggaag  
gcgagcatcggttgctgcggcagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggttgcaactgcgggtcaag  
gatctggatttcgatcacggcacgatcatcgctgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttaccga  
gagcttggcaccagcctgcgcgagcaggggaattaatccacgggttttgcgtgccgcaaacgggctgttctgggt  
gttgcctagtttggttatcagaatcgagatccggcttcagccggtttgcggctgaaagcgtatttcttcagaatt  
gccatgatttttccccacgggaggcgctactggctcccgtgttgctgcgcagctttgattcgataagcagcatcgcc  
tgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagggtgtcaatttcattgttctagttgctt  
tgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcacatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaa  
cagctttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccgttttcacatctgtgcatacg  
gacagttttccctttgatatgtaacgggtgaacagttgttctacttttgtttgtagtcttgatgcttcactgataga  
tacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtagttctctagtggttcgttggttttgcgtg  
agccatgagaacgaaccattgagatcacttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctg  
aatttttgcagttaaagcatcgctgtagtgttttcttagtccggtatgtaggtaggaatctgatgtaattggttggtg  
gtattttgtcaccattcatttttatctggttggttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctagttcaact  
tggaanaatcaacgtatcagtcggggcgccctcgcttatcaaccaccaatttcataattgctgtaagtgtttaaatcttt  
acttattggtttcaaaacccattgggttaagccttttaaacatggttagttattttcaagcattaacatgaacttaa  
attcatcaaggctaatectctatatttgccttgtagttttcttttggttagttcttttaataaccactcataaactc  
ctcatagagtatttgttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaattttttaactggaaaagata  
aggcaatatctcttactaaaaactaattcatttttcgcttgagaacttggcatagtttgccacttggaanaatct  
caaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgatcagctctctggttgcttttagctaatacacca  
taagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattgggtataagtgaacgataccgctccgttctttccttg  
agggttttcaatcgctggggttagtagtgccacacagcataaaattagcttggttcatgctccgttaagtcatagc  
gactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattgggtctaggtgattttaatca  
ctataccaattgagatgggctagtcattgataattactagtccttttcttttgagttgtgggtatctgtaaatcttg  
ctagacctttgctggaaaacttgtaaatctgctagacctctgtaaatccgctagacctttgtgtgttttttttg  
tttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaagataaaaaaagataaaaaagaatagatcccagccctgtg  
tataactcactacttttagtcagttccgcagtatcaaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgtctctctacaaaacag  
accttaaaaccctaaaggettaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatatctctttgtctccgacc  
atcaggcacctgagtcgctgtcttttctgtgacattcagttcgtgcgctcacggctctggcagtgaaatgggggtaa  
atggcactacaggcgcccttttatggattcatgcaaggaaactaccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttct  
cagggcgttttatggcggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgcctctgatttt

ccagtctgaccacttcggattatcccgtagacaggtcattcagactggctaatagcaccagtaaggcagcggtatcat  
caacaggctta

[0639] pMCM1224-pCL-Ptrc-Upper\_GcMM\_162(屎肠球菌)

[0640]

cccgctcttactgtcggaattcgcggtggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcat  
ccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaag  
cggcactgctctttacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaaactttattattaaa  
aattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaacatgaaagaagtggttatgattgatgcg  
gctcgacacccattgggaaatacagaggtagtcttagtccctttacagcgggtggagctggggacactgggtcacgaa  
agggtcgtggataaaacaaagcttaagaaagacaagatagaccaagtgatattcggaatgtgcttcaggcaggaa  
acggacaaaacggttgcaagacaaatagccctgaacagtggcttaccagttgacgtgccggcgatgactattaacgaa  
gtttgcgggtccggaatgaaagcgggtgattttagcccgcagtttaatacagttaggggaggcagagttggtcattgc  
agggggtacggagtcaatgtcacaagcaccatgctgaaaccttaccagtcagagaccaacgaatacggagagccga  
tatcatcaatggttaatgacgggctgacggatgcgttttccaatgctcacatgggtcttactgccgaaaaggtggcg  
accagttttcagtgtcgcgcgaggaacaagaccggtacgcattgtccagccaattgaaagcagcgcacgcggttga  
agccggggtgttctcagaagagattattccggttaagattagcgacgaggatgtcttgagtgaagacgaggcagtaa  
gaggcaacagcactttggaaaaactgggcaccttgccgacgggtgttttctgaagagggcacggttaccgctggcaat  
gcttcaccgctgaatgacggcgctagtgtcgtgattcttgcataaaaagaatacgcggaaaacaataatctgcctta  
cctggcgacgataaaggaggttgccgaagtgggtatcgatccttctatcatgggtattgccccataaaggccattc  
aaaagttaacagatcggtcgggcatgaacctgtccacgattgatctgttcgaaattaatgaagcattcgcggcatct  
agcattgttgtttctcaagagctgcaattggacgaagaaaaagtgaatatctatggcggggcgatagctttaggcca  
tccaatcggcgcaagcggagccccgatactgacaaccttagcatacggcctcctgctgtagcaaaaagcgttatggta  
ttgcgtcattatgtatcggcgggtgggtcttgggtcgtggttagaagctaataatggagcagaccacaaaagac  
gttcagaagaaaaagttttaccagcttaccctccgagcggagatcgagcttatcgagaagaacgttctgactca  
agaaacggcacttattttccaggagcagacgttgtccgaagaactgtccgatcacatgattgagaatcaggtctccg  
aagtggaaattccaatgggaattgcacaaaattttcagattaatggcaagaaaaaatggattcctatggcgactgaa  
gaaccttcagtaatagcggcagcatcgaacggcgccaaaaatctgcgggaacatttgccgggaaacgcctcagcggct  
tatgcgcgggcagattgtcctgtctggcaaatcagaatatcaagccgtgataaatgccgtgaatcatcgcaagaag  
aactgattctttgcgcaaacgagtcgtaccgcagtatgttaaacgcgggggaggtgttcaggatatcttacgcgg  
gagtttatgggttcttttcacgcgtatttatcaatcgactttctggtggacgtcaaggacgcaatgggggcaaacat  
gatcaactctattctcgaaagcgttgcaataaaactgcgtgaatgggtcccggaagaggaaatactgttctccatcc  
tgtcaaaacttcgtacggagtccttgccatctgcattgtgcgagattccttttgaaagacttggtcgtaacaaagaa  
attggtgaacagatcgccaagaaaattcaacaggcaggggaatatgctaagcttgacccttaccgcgcggcaaccca  
taacaaggggattatgaacggtatcgaagccgtcgttgccgcaacgggaaacgacacagggctgtttccgcttcta  
ttcacgcatacgcgcgccgtaattggcttgtaaccaaggtttaacggattggcagatcaaggcgataaaactggttggt  
aaattaacagtcacctggctgtggcgactgtcggtaggcgctcgaacataattaccaaagccaaagcttccctcgc  
catgctggatatattgattccgcaaaaagaactggcccaagtgatcgccgcggtaggttttagcacagaatctggcgcgct  
tacgtgcatttagtgacagaaggcattcagaaaggacacatgggcttgcaagcacgttcttttagcgatttcgataggt  
gccatcgggtgaggagatagagcaagtcgcgaaaaaacgcgtgaagctgaaaaaatgaatcagcaaacggcaataca

gatttttagaaaaatttcgcgagaaatgatctagacgcactaggaggatataccaatgaaaatcggtattgaccgtct  
gtccttcttcatcccgaatttgtatttggacatgactgagctggcagaatcacgcggggatgatccagctaaatatac  
atattggaatcggacaagatcagatggcagtgaatcgcgcaaacaggacatcataacactgggtgcaaacgctgcg  
agtaagatcgtgacagagaaagaccgcgagttgattgatatggtaatcgttggcacggaatcaggaattgaccactc  
caaagcaagegcgctgattattcaccatctccttaaaattcagtcgttcgcccgttctttcgaggtaaaagaagctt  
gctatggcggaaactgctgcctgcacatggcgaaggagtatgtcaaaaatcatccggagcgtgaaggtcttggtaatt  
gcgtcagacatcgcgcgttatggtttggccagcggaggagaagttactcaaggcgtggggggccgtagccatgatgat  
tacacaaaacccccggattctttcgattgaagacgatatgtttttctcacagaggatatctatgatttctggcggc  
ctgattactccgagttccctgtagtggacgggcccccttcaaaactcaacgtatataagagagttttcagaaagtttgg  
aaccggcacaaggaattgtccggaagagggttggaagattatcaagctattgttttcacataccctatacgaagat  
gggtaagaaagcgctccagagtgttttagaccaaacccgatgaagataaccaggagcgttaatggctagatatgagg  
agtcattatcgctatagccggagaattggtaacctgtacacaggcagcttgtaccttggctcttacaagcttgttggaa  
aactctaaaagtttacaaccgggagatcggatcgccctcttttcttatggcagtggtgcggtgtccgagttctttac  
cgggtattttagaagaaaattaccaagagtacctgttcgctcaaagccatcaagaaatgctggatagccggactcgga  
ttacggtegatgaatacagagaccatcttttcagagactctgccagaacatggtgaatgcgccgaataatacagcgcac  
gtccccctttctataaccaagattgagaacgacattcgttattataaaaatctgactgcagctggtaccatatgggaa  
ttcgaagcttggggccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcgctgcaccatcatcatcatc  
attgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcag  
aacgcagaagcggcttgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaac  
tcagaagtgaacgcgctagcgcgatggtagtgtgggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaa  
taaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctctctagtagg  
acaaatccgcgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggccccggagggtggcgggcaggacgccccgcataaac  
tgccaggcatcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatt  
tttctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatctggcgtaatag  
cgaagaggccccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcggaatggcgctgatgcggtattttc  
tccttacgcactctgtgcggtattttcacaccgcataatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagtta  
agccagccccgcaccccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggatgtttgcga  
ttacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatataatctcccaatttgtgtagggttatt  
atgcacgcttaaaaaataataaaagcagacttgacctgatatgtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaa  
cgcttgagtttaagcgcgcgcggaagcggcgtcggttgaaacgaattgttagacattatttgcgactaccttgggtg  
atctcgccctttacgtagtggaacaaattcttccaactgactctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgcgaag  
ataagcctgtctagcttcaagtatgacgggtgatactgggcccggcaggcgtccattgccagtcggcagcgacat  
ccttcggcgcgattttgcgggttactgcgctgtaccaaatacggggacaacgtaagcactacatttcgctcactcgcca  
gcccagtcggggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatcttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaacccgcatc  
aaagagttcctccgcgcgtggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcgtttgtcagcaagatagccagatcaa  
tgtcgatcgtggctggctcgaagataacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagtttcgctta  
gctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgtctctctcc  
aggggaagccgaagtttccaaaaggctgttgatcaaagctcgccgcttgtttcatcaagccttacggtcacccgtaa  
ccagcaaatcaatatcactgtgtggttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgctc

ggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcacgcgttccctcat  
gatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcggttgctgctccataacatcaaacatcgacca  
cggcgtaacgcgcttgctgcttgatgcccaggcatagactgtacccccaaaaaacagtcataacaagccatgaaa  
accgccactgcgcgcttaccaccgctgcgttcgggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgtacttgca  
ttacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcacgtttccacgggtgtgcgtcaccgg  
caaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgaaggtttcggctcaccgcat  
cgtcaggcattggcgcccttgctgttctctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcgg  
aagacctcggcgctgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggtgaagtgggttcgcatcctcggttttctggaag  
gcgagcatcggttggttcgccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaag  
gatctggatttcgatcacggcacgatcatcgctgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttaccga  
gagcttggcaccagcctgcgcgagcagggaattaatcccacgggttttgcctgccgcaaacgggctgttctggt  
gttgcctagtttggttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgcccggctgaaagcgtatttcttcagaatt  
gccatgattttttcccccaggaggcgctcactggctcccgtgttgctcggcagctttgatcagataagcagcatcgcc  
tgcttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagggtgttcaatttcattgttctagttgctt  
tgctttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcacatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaa  
cagctttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccgttttcacatctgtgcatacg  
gacagttttccctttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttggttgtagtcttgatgcttcactgataga  
tacaagagccataagaacctcagatccttcgctatttagccagtatgttctctagtgtggttcgcttggttttgcgtg  
agccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctg  
aatttttgcagttaaagcatcgctgtagtgttttcttagtccggttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttggtg  
gtattttgtcaccattcatttttatctggttggttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctagttcaact  
tggaatatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcataattgctgtaagtgtttaaatcttt  
acttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaactcatggttagttattttcaagcattaacatgaacttaa  
attcatcaaggctaattctctatatttgccctgtgagttttcttttggttagttcttttaataaccactcataaatc  
ctcatagagtatttggtttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaattttttaactggaaaagata  
aggcaatatctcttcactaaaaactaattctaatttttcgcttgagaacttgcatagtttgccactggaaaatct  
caaagcctttaacaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgcttttagctaatacacca  
taagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttg  
agggttttcaatcgctggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagc  
gactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggcttaggtgattttaatca  
ctataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttcccttgagttgtgggtatctgtaaatctg  
ctagacctttgctggaaaacttgtaaatctgctagacctctgtaaatccgctagacctttgtgtgttttttttg  
tttatattcaagtgggttataatttatagaataaagaaagataaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtg  
tataactcactacttttagtcagttccgcagattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacag  
accttaaaaccctaaaggcttaagtagcacccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattccttttgtctccgacc  
atcaggcacctgagtcgctgtcttttctgtgacattcagttcgtgcgtcacggctctggcagtgaaatgggggttaa  
atggcactacaggcgcccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttct  
cagggcgttttatggcggttctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgcccctctgatttt  
ccagctctgaccacttcggattatcccgtagacaggctcattcagactggctaatgcaccagtaaggcagcggtatcat

caacaggctta

[0641] pMCM1225-pCL-Ptrc-Upper\_GcMM\_163(鹌鸡肠球菌EG2):

[0642]

cccgctcttactgtcggaattcgcggtggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcat  
ccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaag  
cggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaa  
aaattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaa taaggaggaataaaccatggaagaagtggtaattatagatgc  
acgtcggactccgattggtaaataatcacgggtcggtgaagaagttttcagcgggtggcgctggggacggccgtggcta  
aagacatgttcgaacgaaccagaaaaatcaaagaggagatcgcgcgaggtcataattggtaatgtcttgcaggcagga  
aatggccagaacccccgcggcaagtgtcttcaatcagggtgtccgttgacattcccgttctacaattaacga  
ggtttgtgggtctggtttgaaagctatcttgatgggcatggaacaaatccaactcggcaaagcgaagtagtctgg  
caggcggcattgaatcaatgacaaatgcgccaagcctgtcccactataacaaggcggaggatacgtatagtgtccca  
gtgtcgagcatgacactggatggtctgacagacgcattttctagtaaacctatgggattaacagcggaaaacgtcgc  
acagcgtacgggtatctcccgtgaggcgcaagatcaattcgcatatcaatctcagatgaaagcagcaaaagcgcagg  
cagaaaacaaattcgctaaggaaattgtgccactggcgggtgaaactaaaaccatcacagctgacgaagggatcaga  
tcccaaacacgatggagaaactggcaagtctcaaacctgtttttaaaaccgatggcactgtaaccgcagggaatgc  
tagcaccattaatgacggggccgcccctgtgtctgcttgctagcaaaacttactgcgaaactaatgacataccgtacc  
ttgcgacaatcaaagaaattgttgaagttggaatcgatccggagattatgggcatctctccgataaaagcgatacaa  
acattgtttacaaaatcaaaaagttagcctcgaagatatggagtttttgaaataaatgaagcctttgccgcaagtag  
catagtggttgaatctgagttgggattagatccggctaaagttaaccgttatgggggtggtatatccttaggtcatg  
caattggggcaaccggcgctcgccctggccacttcaactggtgtatcaaatgcaggagatacaagcacgttatggtatt  
gcgagcctgtgcgttggtgggtggacttggactggcaatgcttttagaacgtccaactattgagaaggctaaaccgac  
agacaaaaagttctatgaattgtcaccagctgaacggttgcaagagctggaaaatcaacagaaaaatcagttctgaaa  
ctaaacagcagttatctcagatgatgcttgccgaggacactgcaaaccatttgatagaaaatcaaatatcagagatt  
gaactcccaatgggcgtcgggatgaacctgaaggtgatgggaaagcctatgttgtgccaatggcgacggaagagcc  
gtccgtcatecgggccatgtctaatggtgccaaaaatggccggcgaaattcacactcagtcgaaagaacggctgtctca  
gaggtcagattgttttcagcgcgaagaatccgaatgaaatcgaaacagagaatagctgagaaccaagccttgattttc  
gaacgtgccgaacagtcctatccttccattgtgaaaagagagggaggtctccgccgattgcacttcgtcattttcc  
tgccgattctcagcaggagctctgcggaccagtccacatttttatcagtggacctttttgtagatgtgaaagacgga  
tgggggcaaatatcataaatgcaatacttgaggcgctcgagccctgtttcgcaatggttccccaatgaggaaatt  
cttttttctattctctcgaacttggctacggagagcttagtcacggctgtttgtgaagtcceatttagtgcacttag  
caagagaggtggtgcaacggtggccagaaaaattgtgcaggcgctcgctcttcgcaaagacagaccataaccgcgcag  
tgaccacaacaaagggtatgaacggtgtagaggctgttatgcttgccacaggcaacgacacgcgcgcagctctca  
gccgttgtcatggatacgcagcgcgcaccggtagctatcagggtctgactaactggacgattgagtcggatcgccct  
ggtaggcgagataacactgccgtggccatcgctacagttggaggcgctaccaaaagtgttgcccaaagctcaagcgg  
cactggagattagtgtatgttcaactcttctcaagagcttgacgcttagcggcgctcagtaggttttagtacaatactc  
gcggccctgcgcgcactggtttccgaaggatatacaaaaagggcacatgtccatgcaagcccggctctctcgcaatcgc  
ggtcgggtgctgaaaaagccgagatcgagcaggtcgccgaaaagttgcggcagaacccgccaatgaatcagcagcagg  
cgctccgttttcttggcgagatccgcgaacaatgatctagacgcactaggaggatataccaatgaacgtcggcattg

acaaaattaatttttttcgttccaccgtattatctggatatggtcgacctggccccacgcacgcgaagtggacccgaac  
aaattttacaatttgaattggacaggatcagatggctgtgagcaaaaagacgcacgatatcgtaacattcgcggttag  
tgccgcgaaggaaatttttagaacctgaggacttgcaagctatagacatggttatagttggtaccgaatcgggcattg  
acgagagcaaaagcateccgcggtcgttttacatcgtttgttggcggtacaacctttcgctcgcagttttgaaattaa  
gaagcctgttacggggcaaccgcaggcattcagtttgccaagactcatatacaagcgaacccggagagcaaggctct  
ggtaattgcaagcagatatagctcggtatggctcttcggtcaggtggagagccccacacaaggcgcaggggcagttgcta  
tgcttctcacggcaaatcccagaatcctgaccttcgaaaacgacaatctgatgttaacgcaggatatattatgacttc  
tgagagaccacttggtcacgcttaccctatggtagatggccacctttccaatcaagctctatattgacagttttaagaa  
ggtctggcaagcacattgcaacgcaatcaagcttctatatccgactatgccgcgattagttttcatattccgtata  
caaaaatgggtaagaaagccctgctcgctgtttttgcagatgaagtggaaactgaacaggaacgcgttatggcacgg  
tatgaagagctctatcgatatattcacgccggatcggaaccttgatacgggatcattgtacctggggctgatatcctt  
attggaaaacagttctcacctgtcggcgggcgaccggataggattgttttagttatgggagtgggcgtgtcagcgaat  
ttttctcgggtcgttttagtggcaggctatgaaaatcaattgaacaaagaggcgcataccagctcctggatcagcgt  
cagaagctttccatcgaagagtatgaggcgatttttacagattccttagaaattgatcaggatgcagcgttctcgga  
tgacctgccatattccatccgcgagataaaaaacacgattcggtactataaggagagctgactgcagctgggtaccat  
atgggaattcgaagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcgctcgaccatcatcat  
catcatcattgagtttaacgggtctccagcttggctgtttttggcggtatgagagaagattttcagcctgatacagatt  
aaatcagaacgcagaagcggctctgataaaacagaatttgcttggcggcagtagcgcggtgggtccacctgaccccat  
gccgaactcagaagtgaacgcgcgtagcgcgcatggtagtgggggtctccccatgcgagagtagggaactgccagg  
catcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgtttgtttgtcgggtgaacgctctcct  
gagtaggacaaatccgcgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggccccggagggtggcgggcaggacgccccgc  
cataaactgccaggcatcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttt  
gtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatctggc  
gtaatagcgaagaggccccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcgg  
tattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcataatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgc  
atagtttaagccagccccgcacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggat  
gttgcgattacttcgccaaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatacttcccaatttgtgtagg  
gcttattatgcagccttaaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtg  
catctaacgcttgagttaagccgcgcccgcgaagcggcgctcggttgaacgaattgttagacattatttgccgactac  
cttgggtgatctcgcttttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttctt  
gtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggcccgcaggcgtccattgcccagtcggca  
ggacatccttcggcgcgattttgcccgttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctc  
atcgccagcccagtcgggcccgcaggttccatagcgttaaggtttcatttagcgctcaaatagatcctgttccaggaa  
ccggatcaaagagttctccgcgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcgttttgcagcaagatagcc  
agatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagataacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttc  
gcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgc  
tctctccaggggaagccgaagtttccaaaaggctcgttgatcaaagctcgccgcgttggttcatcaagccttacggtc  
accgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccag  
caacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcacccgtt

ccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccataacatcaaacat  
cgaccacggcgtaacgcgcttgctgcttgatgcccaggcatagactgtacccccaaaaaacagtcataacaagc  
catgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcgggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgt  
acttgcaattacagettacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcacggttccacggtgtgcgt  
cacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgaagggttcggcttc  
cacgcatcgtcaggcattggcgcccttgctgttctctacggcaagggtgctgtgcacggatctgccctggcttcagg  
agatcggaagacctcggcgctcgccgcttgccgggtggtgctgaccccgatgaagtggctcgatcctcggtttt  
ctggaaggcgagcatcgtttgctcgccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcg  
ggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgctgcgggagggaagggtccaaggatcgggccttgatgt  
taccgagagcttggcaccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacgggttttgctgcccgaacgggctg  
ttctgggtgttgctagtttggtatcagaatcgagatccggcttcagccggtttgcccggctgaaagcgctatttcttc  
cagaattgccatgattttttcccacgggaggcgctactggctcccgtgttgctcggcagctttgattcgataagcag  
categcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttcta  
gttgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgtgttcacatgttacattgtcgatctgttca  
tggtgaacagctttgaaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccgttttcacatgt  
gcataatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaacagttgttctacttttggtttgtagtcttgatgcttca  
tgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggttcggtgttt  
ttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactgg  
tgagctgaatttttgcaagttaaagcatcggtgtagtgttttcttagtccgttatgtaggttagaatctgatgtaatg  
gttggttggtattttgtcaccattcatttttatctggttggttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctag  
ttcaacttggaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcataattgctgtaagtgttta  
aatctttacttatttggtttcaaaaccattgggttaagccttttaaacatggttagttattttcaagcattaacatg  
aacttaaattcatcaaggctaattctctatatttgcccttgtagttttcttttggttagttcttttaataaccactc  
ataaatcctcatagagtatttggtttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactgga  
aaagataaggcaatatctcttcaactaaaaactaattctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactgg  
aaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgcttttagctaa  
tacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattgggtataagtgaacgataccgtccgttctt  
tccttgtaggggttttcaatcgtaggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaag  
tcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattgggtctaggtgatt  
ttaatcactataccaattgagatgggctagtcattgataattactagtccttttcccttgagttgtgggtatctgta  
aattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaattctgctagacctctgtaaattccgctagacctttgtgtgtt  
ttttttgttttatattcaagtgggtataatttatagaataaaagaaagataaaaaagataaaaagaaatagatccag  
ccctgtgtataactcactacttttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctac  
aaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcacccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatatctctttgtc  
tccgaccatcaggcacctgagtcgctgtcttttctgtgacattcagttcgctgcgtcagggctctggcagtgaaatg  
ggggtaaatggcactacaggegccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtaacg  
ggcttctcagggcggttttatggcggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgcctc  
tgattttccagctctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatagcacccagtaaggcagc  
gtatcatcaacaggtta

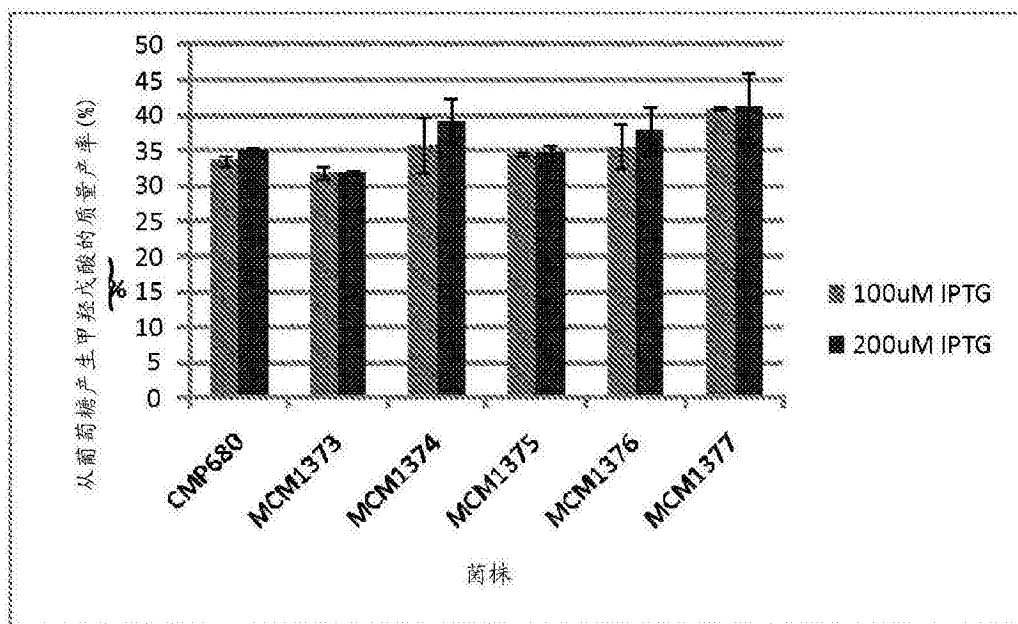


图1

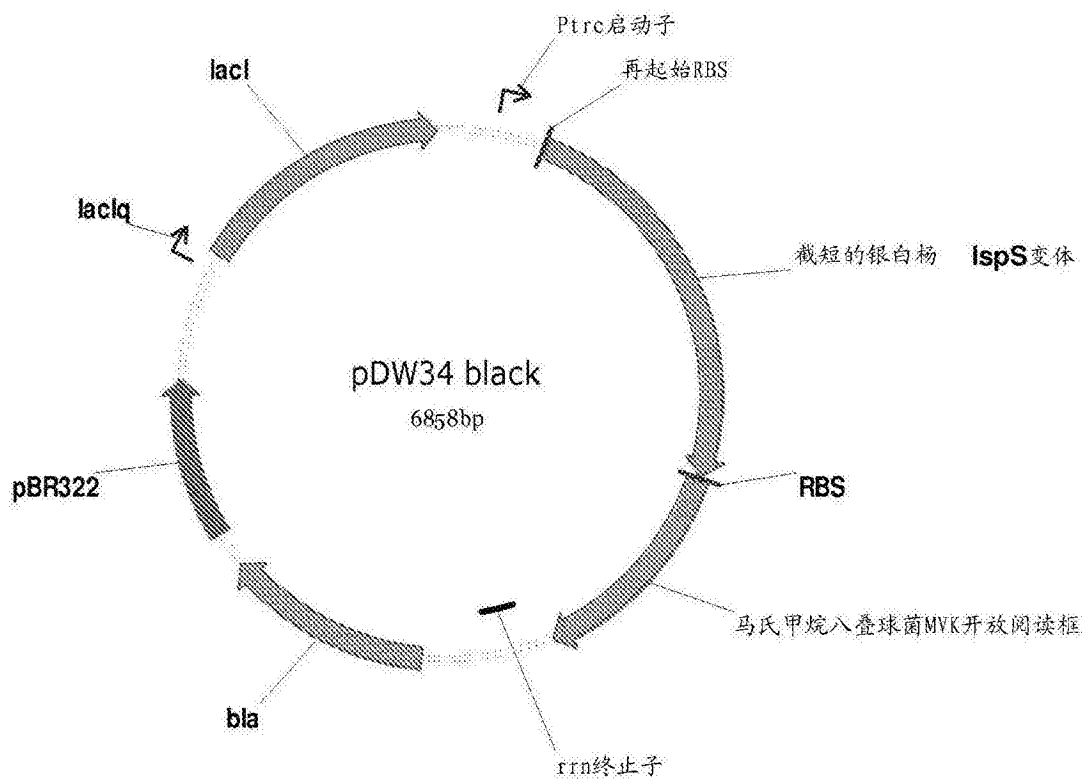


图2

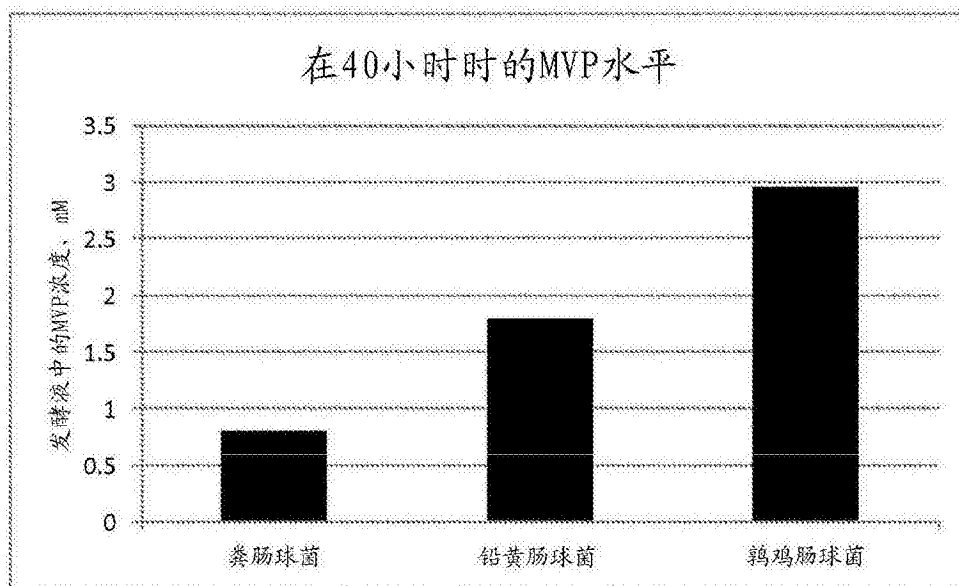


图3

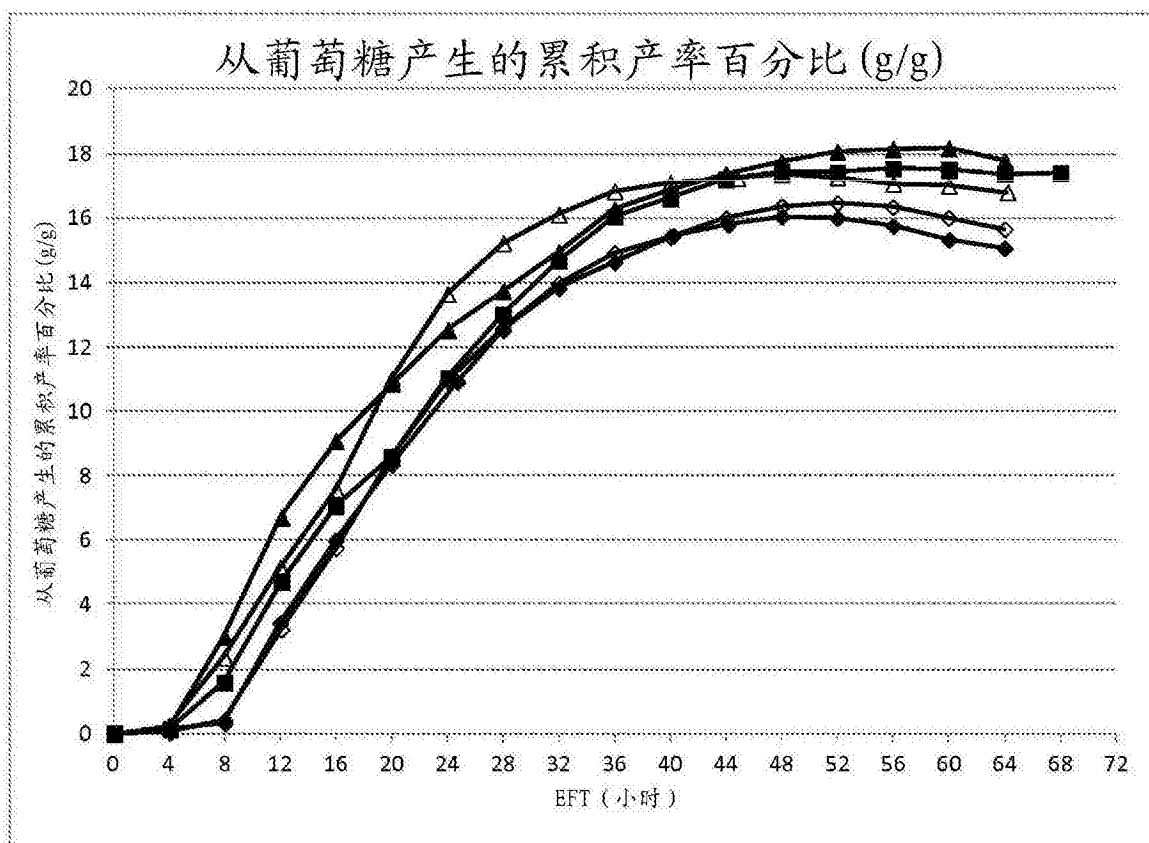


图4

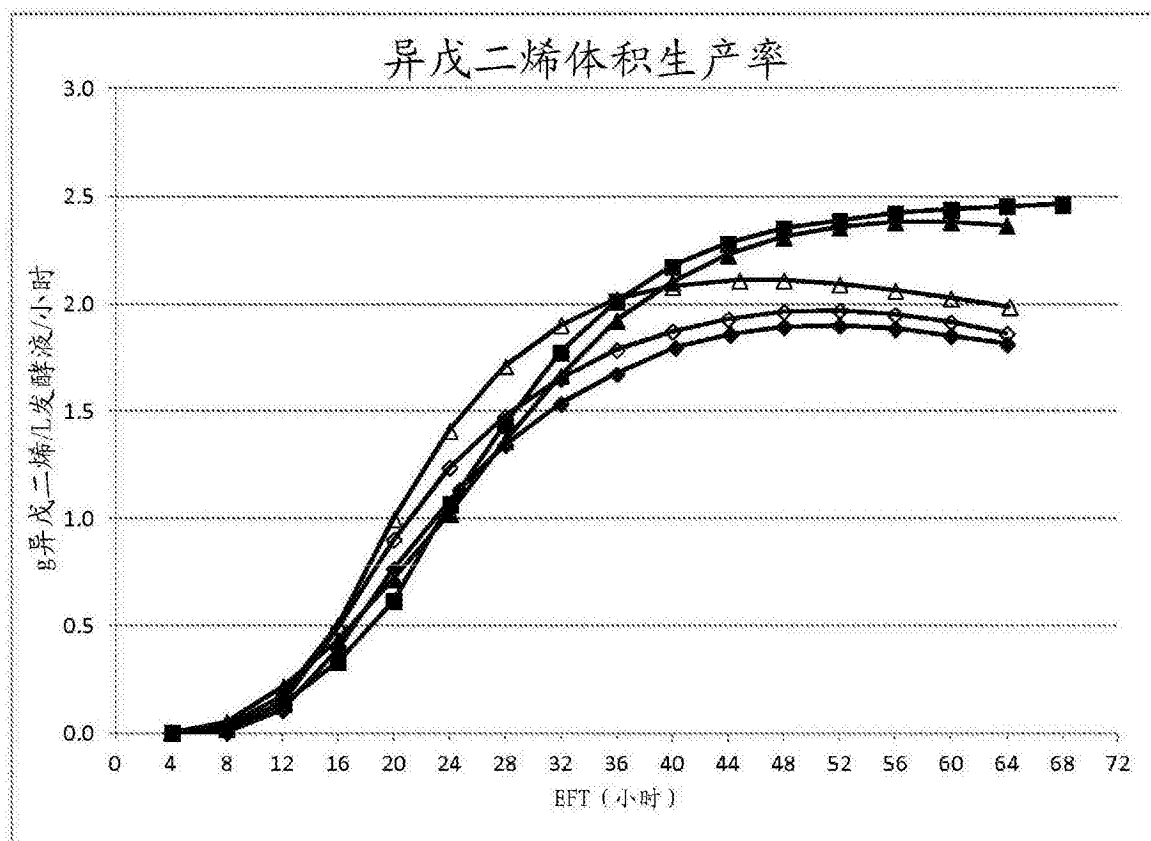


图5

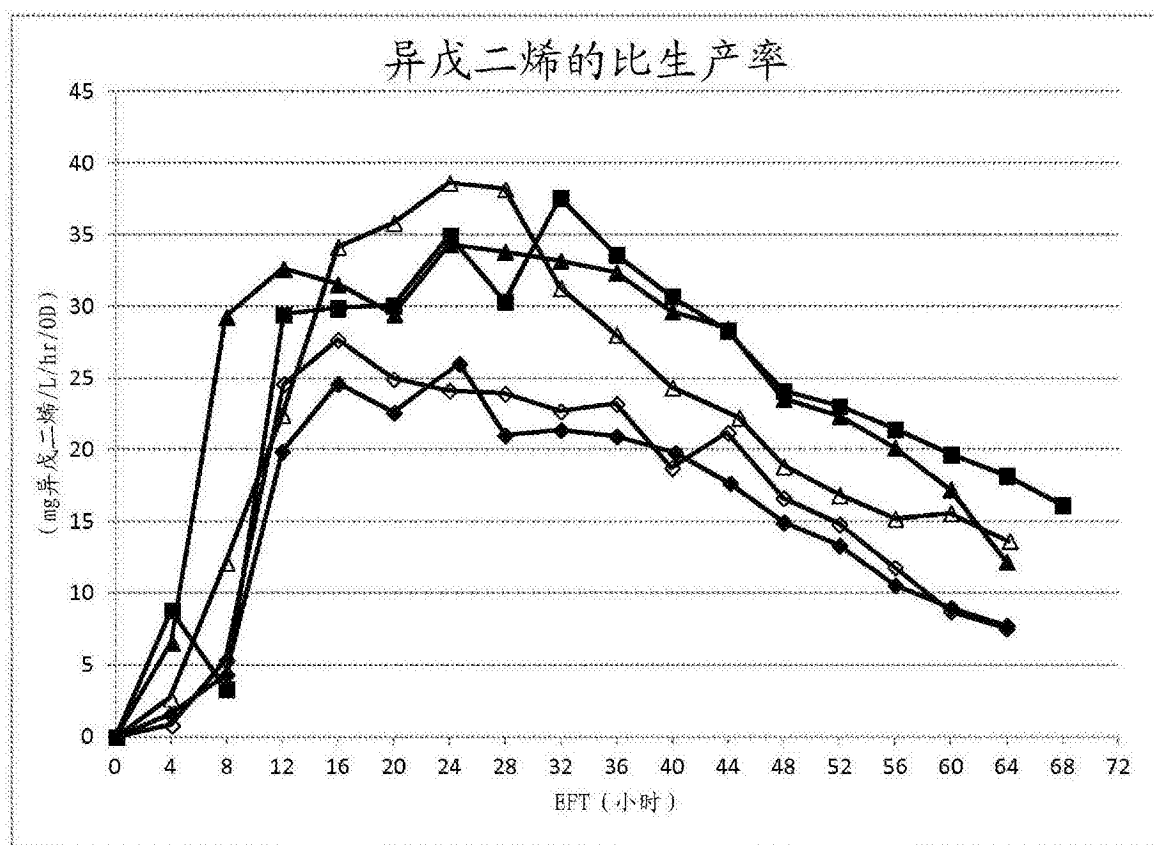


图6

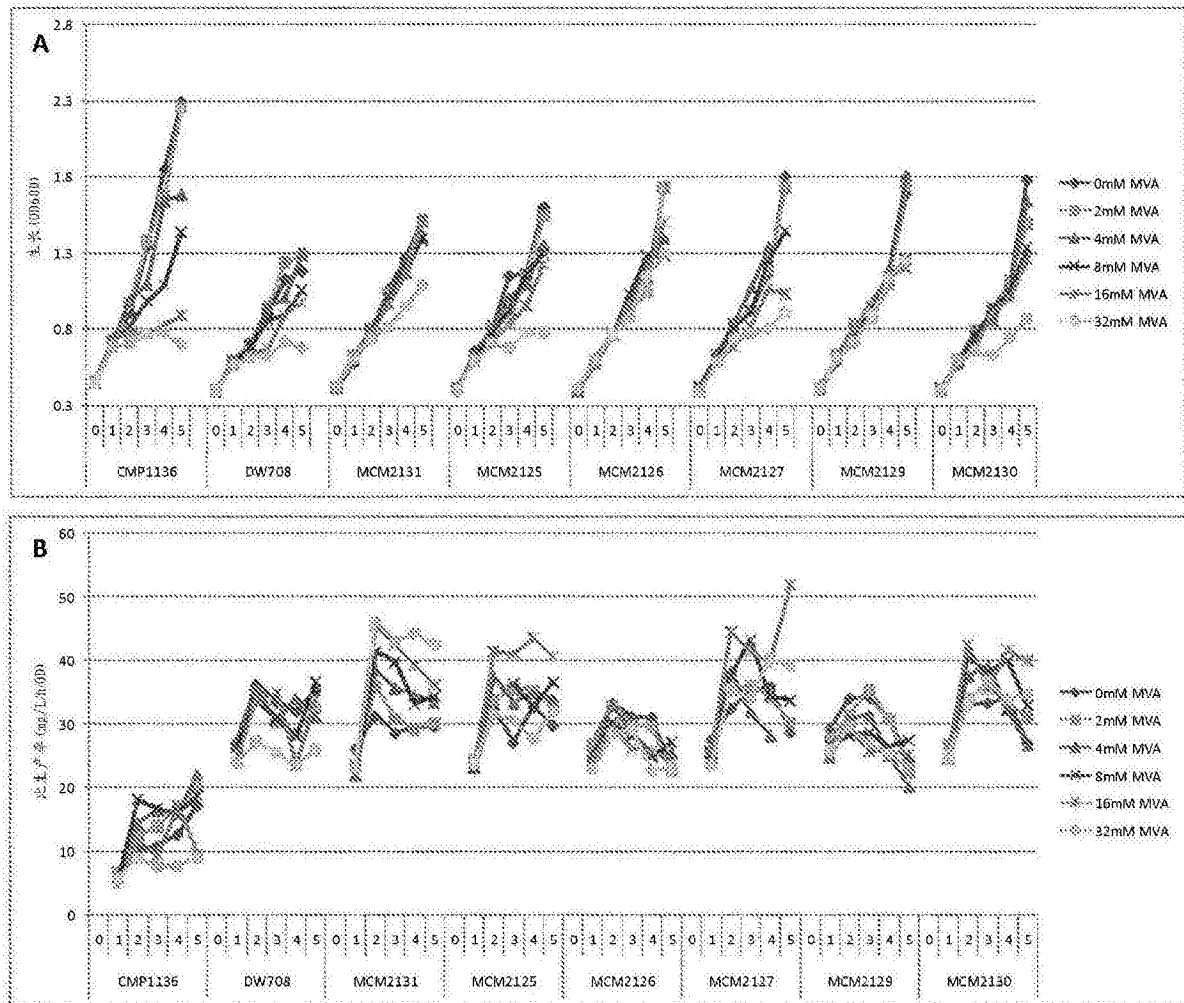


图7

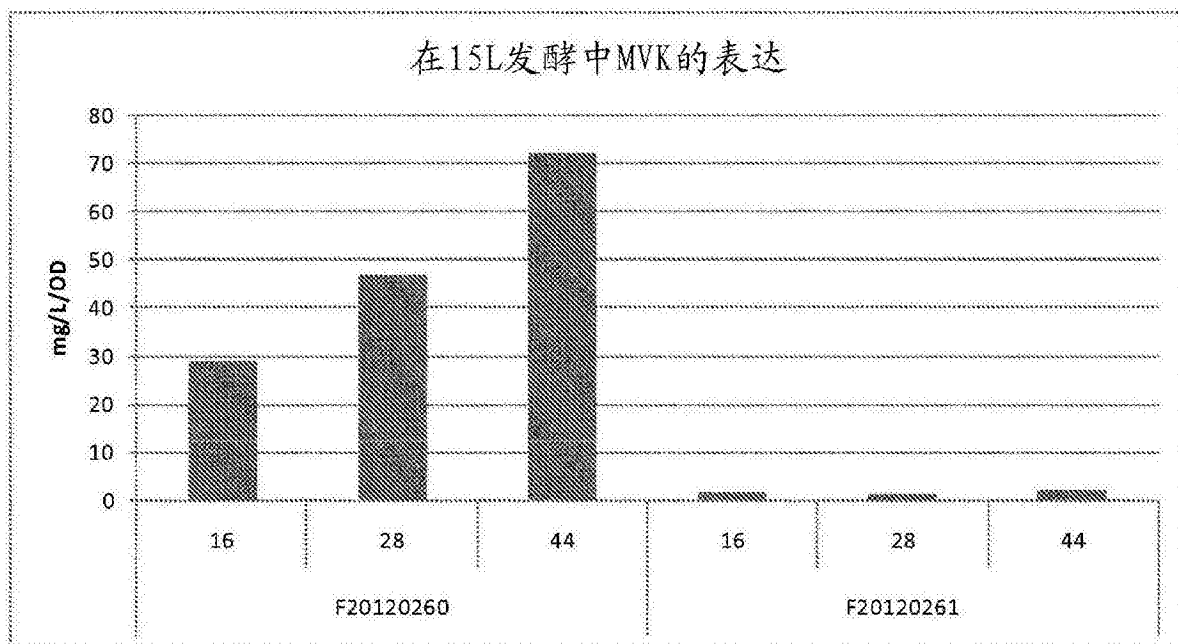


图8

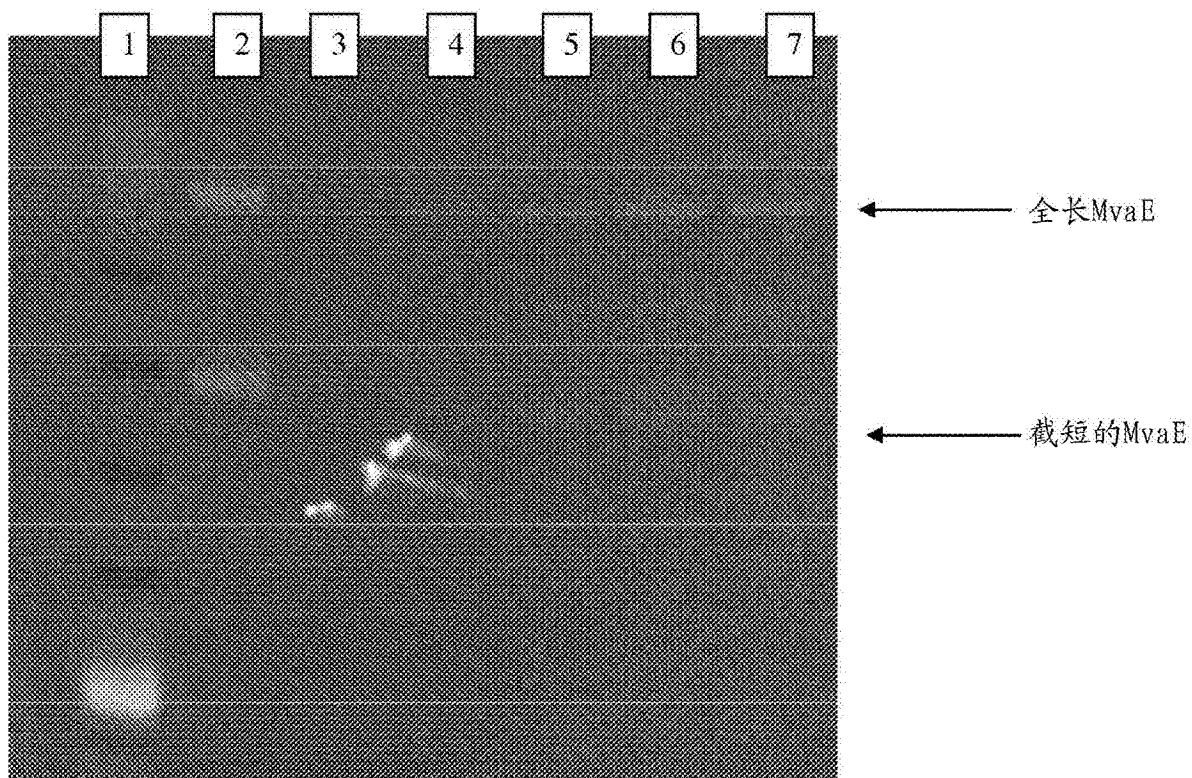


图9

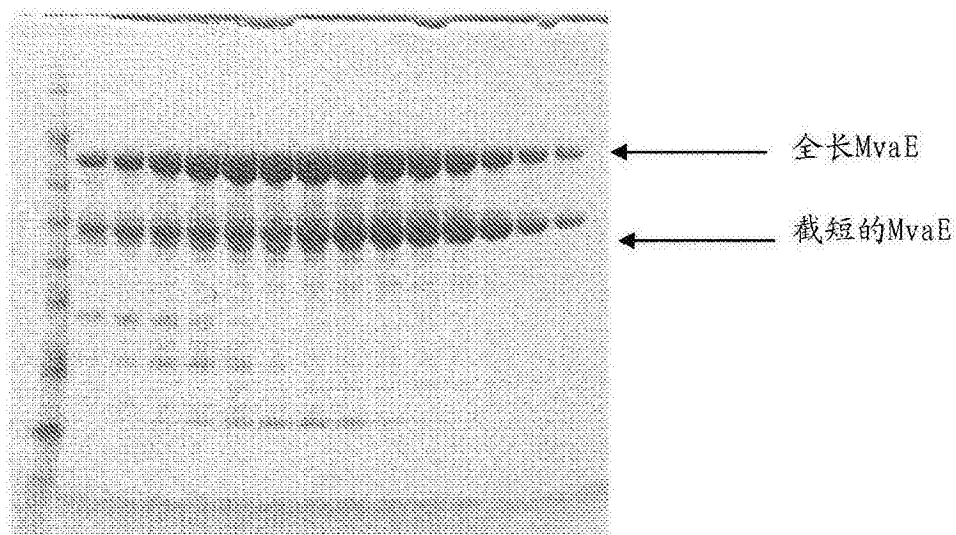


图10