



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101932694 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 29

(21) 申请号 200880125972. 6

特拉维斯·S·拜尔

(22) 申请日 2008. 11. 26

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(30) 优先权数据

60/991, 678 2007. 11. 30 US

61/038, 368 2008. 03. 20 US

61/041, 467 2008. 04. 01 US

61/098, 221 2008. 09. 18 US

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

C12N 1/00 (2006. 01)

C12Q 1/48 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/085019 2008. 11. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02009/073560 EN 2009. 06. 11

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚

申请人 丹尼尔·V·桑蒂

(72) 发明人 克里斯托弗·A·沃伊特

丹尼尔·V·桑蒂

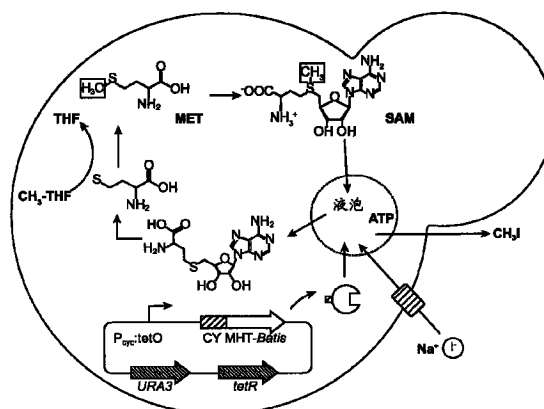
权利要求书 5 页 说明书 61 页 附图 12 页

(54) 发明名称

使用表达卤代甲烷转移酶的重组生物进行有机化合物的工业生产

(57) 摘要

本发明涉及使用表达 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶的基因工程生物用于生产有机化合物的方法,并且所述基因工程生物可选地在影响通过 SAM 代谢途径的通量或影响胞内卤化物水平的位点进行修饰。在一种方法中,将所述生物、卤化物(氯化物、溴化物和/或碘化物)和碳源在产生卤代甲烷的条件下,在培养基中培养。可以收集所述卤代甲烷并将其转化为非卤化有机分子。



1. 一种方法,包括在产生卤代甲烷的条件下,在培养基中混合以下物质:
 - i) 重组酵母,包含编码 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的异源基因,
 - ii) 卤化物,选自氯化物、溴化物和碘化物构成的组;和
 - iii) 碳源。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,还包括将所述卤代甲烷转化为非卤化有机分子或非卤化有机分子混合物的步骤。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述酵母来自选自自由酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、耶氏酵母 (*Yarrowia*)、木霉属 (*Trichoderma*) 和裂殖酵母属 (*Scizosacchomyces*) 构成的组中的属。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述酵母选自自由酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichiapastoris*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowialipolytica*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 和粟酒裂殖酵母 (*Scizosacchomyces pombe*) 构成的组。
5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述酵母是酿酒酵母。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中 MHT 来自盐草 (*Batis maritima*)。
7. 一种方法,包括
 - a) 在产生卤代甲烷的条件下,在培养基中混合以下物质:
 - i) 包含 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的生物,
 - ii) 卤化物,选自氯化物、溴化物和碘化物构成的组;和
 - iii) 碳源;
 - b) 将所述卤代甲烷转化为非卤化有机分子或非卤化有机分子混合物。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,还包括在步骤 (a) 之后并且在步骤 (b) 之前收集所述卤代甲烷。
9. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述生物是高等植物、藻类、酵母、细菌或古细菌。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述生物是包含编码异源 MHT 的基因的重组生物。
11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述 MHT 是天然存在的 MHT。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述 MHT 来自盐草、肿块伯克氏菌 (*Burkholderia phymatum*)、细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)、芜菁 (*Brassica rapa*)、甘蓝 (*Brassica oleracea*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、拟南芥、钩端螺菌属 (*Leptospirillum*)、新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、稻 (*Oryza sativa*)、金牛蛎球菌 (*Ostreococcus tauri*)、芳族脱氯单胞菌 (*Dechloromonas aromatica*)、灰盖鬼伞 (*Coprinopsis cinerea*)、Robiginitalea bofirmata、马氏海洋杆状菌 (*Maricaulis maris*)、黄杆菌 (*Flavobacterium bacterium*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 或嗜盐嗜盐红螺菌 (*halorhodospira halophila*)。
13. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述异源 MHT 的表达受诱导型启动子的控制。
14. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述重组生物是革兰氏阴性细菌或古细菌。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述革兰氏阴性细菌是大肠杆菌 (*E. Coli*)、

沙门氏菌属 (*Salmonella*)、红杆菌属 (*Rhodobacter*)、集胞藻 (*Synechocystis*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、来自甲基球菌科 (*Methylococcaceae*) 和甲基孢囊菌科 (*methylocystaceae*) 的一个或多个成员;或极端嗜热菌 (*Thermotoga hypogea*)、嗜萘栖热袍菌 (*Thermotoganaphthophila*)、地下栖热袍菌 (*Thermotoga subterranean*)、嗜盐石油神袍菌 (*Petrotoga halophila*)、墨西哥石油神袍菌 (*Petrotoga mexicana*)、温和石油神袍菌 (*Petrotoga miortherma*) 或运动石油神袍菌 (*Petrotoga mobilis*)。

16. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述重组生物是革兰氏阳性细菌。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述革兰氏阳性细菌是枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 或梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)。

18. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述重组生物是真菌。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述真菌是酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、或里氏木霉。

20. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述生物是藻类。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述藻类是衣藻型。

22. 根据权利要求 7-10 所述的方法,其中对所述生物进行基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 生物合成途径的通量。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中通过表达或过表达 SAM 合成酶以提高通过所述 SAM 生物合成途径的所述通量。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述 SAM 合成酶是大肠杆菌 metK、立克次氏体 metK、酿酒酵母 sam1p 或酿酒酵母 sam2p 或与大肠杆菌 metK 具有至少 80% 氨基酸同一性的蛋白质。

25. 根据权利要求 22 所述的方法,其中通过消除或降低至少一种基因的表达和 / 或活性以提高通过所述 SAM 生物合成途径的所述通量。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中通过消除至少一种基因的表达以提高通过所述 SAM 生物合成途径的所述通量。

27. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述基因参与 SAM 利用途径。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述基因编码粪卟啉原 III 氧化酶、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶、胱硫醚 β -合成酶、核酮糖 5-磷酸酯 3-表异构酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、L-丙氨酸转氨酶、3',5'-二磷酸核苷酸酶、甘氨酸羟甲基转移酶、或甘氨酸羟甲基转移酶。

29. 根据权利要求 22 所述的方法,其中通过提高通过甲硫氨酸生物合成途径的通量以提高通过所述 SAM 生物合成途径的所述通量。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中通过表达或过表达大肠杆菌 metL、metA、metB、metC、metE 和 / 或 metH 基因以提高通过所述甲硫氨酸生物合成途径的通量。

31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中编码甲硫氨酸生物合成阻遏物的基因失活。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述基因是大肠杆菌 metJ 基因。

33. 根据权利要求 22 所述的方法,其中通过表达 SAM 转运子蛋白以提高通量。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述 SAM 转运子是 Sam5p 酵母线粒体基因。

35. 根据权利要求 7-10 所述的方法,其中通过表达提高 ATP 的胞内浓度和 / 或可用性的基因提高卤代甲烷的产量。

36. 根据权利要求 7-10 所述的方法,其中通过提高胞内卤化物的浓度提高卤代甲烷的产量。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中通过过表达卤化物转运子蛋白基因提高胞内卤化物的浓度。

38. 根据权利要求 7-10 所述的方法,其中所述卤化物以卤盐提供,所述卤盐选自氯化钠、溴化钠和碘化钠构成的组。

39. 根据权利要求 38 所述的方法,其中所述卤化物以 0.05 至 0.3M 的浓度存在于所述培养基中。

40. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述培养基包含甲硫氨酸。

41. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述卤代甲烷是氯甲烷。

42. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述卤代甲烷是溴甲烷。

43. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述卤代甲烷是碘甲烷。

44. 根据权利要求 7-10 所述的方法,其中 (c) 中所述转化是催化缩合的结果。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述催化剂是沸石催化剂。

46. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述催化剂是溴化铝。

47. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述催化缩合步骤导致卤化物的产生,所述卤化物再循环回到所述培养基中。

48. 根据权利要求 7-10 所述的方法,其中产生包含烷烃、烯烃、醚、醛或其混合物的组合物。

49. 根据权利要求 10 所述的方法,其中在 2、3、4、5 或 6 个位点对所述生物进行基因修饰,其中每种所述修饰的影响分别为相对于未经修饰的生物提高卤代甲烷的产量。

50. 一种基因修饰的生物,包含异源 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶基因,其中所述生物是藻类、真菌或细菌,并且其中所述生物:

i) 经过基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 生物合成途径的通量;和 / 或

ii) 经过基因修饰以提高胞内卤化物的浓度。

51. 根据权利要求 50 所述的生物,其中所述 MHT 是天然存在的 MHT。

52. 根据权利要求 51 所述的生物,其中所述 MHT 来自盐草、肿块伯克氏菌、细长聚球藻、芜菁、甘蓝、拟南芥、拟南芥、钩端螺菌属、新型隐球酵母、稻、金牛蛭球菌、芳族脱氯单胞菌、灰盖鬼伞、*Robiginitalea bofirmata*、马氏海洋杆状菌、黄杆菌、葡萄或嗜盐嗜盐红螺菌。

53. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物是革兰氏阴性细菌。

54. 根据权利要求 53 所述的生物,所述生物是大肠杆菌 (*E. Coli*)。

55. 根据权利要求 53 所述的生物,所述生物是沙门氏菌属、红杆菌属、集胞藻、欧文氏菌属。

56. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物是革兰氏阳性细菌。

57. 根据权利要求 56 所述的生物,所述生物是枯草芽孢杆菌或梭状芽孢杆菌。

58. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物是真菌。

59. 根据权利要求 58 所述的生物,所述生物是酵母属、毕赤酵母属、汉逊酵母属、克鲁维酵母属、耶氏酵母属、木霉属和裂殖酵母属。

60. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物是藻类。

61. 根据权利要求 60 所述的生物,其中所述藻类是衣藻型(*Chlamydomonas*)。
62. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物经过基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)生物合成途径的通量,其中所述基因修饰是 SAM 合成酶的过表达。
63. 根据权利要求 62 所述的生物,其中所述 SAM 合成酶是大肠杆菌 *metK*、立克次氏体 *metK*、酿酒酵母 *sam1p*、或酿酒酵母 *sam2p*。
64. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物经过基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)生物合成途径的通量,其中所述基因修饰是编码 SAM 利用途径中的蛋白质的基因的缺失或失活。
65. 根据权利要求 64 所述的生物,其中所述基因编码粪卟啉原 III 氧化酶、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶、胱硫醚 β -合成酶、核酮糖 5-磷酸酯 3-表异构酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、L-丙氨酸转氨酶、3',5'-二磷酸核苷酸酶、甘氨酸羟甲基转移酶、或甘氨酸羟甲基转移酶。
66. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物经过基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)生物合成途径的通量,其中所述基因修饰提高通过甲硫氨酸生物合成途径的通量。
67. 根据权利要求 66 所述的生物,其中通过表达或过表达大肠杆菌 *metL*、*metA*、*metB*、*metC*、*metE* 和 / 或 *metH* 基因以提高通过所述甲硫氨酸生物合成途径的通量。
68. 根据权利要求 67 所述的生物,其中编码甲硫氨酸生物合成阻遏物的基因被失活。
69. 根据权利要求 68 所述的生物,其中所述基因是大肠杆菌 *metJ* 基因。
70. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物经过基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)生物合成途径的通量,其中通过表达 SAM 转运子蛋白提高通量。
71. 根据权利要求 70 所述的生物,其中所述 SAM 转运子是 Sam5p 酵母线粒体基因。
72. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物经过基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)生物合成途径的通量,其中通过表达提高 ATP 胞内浓度和 / 或可用性的基因提高通量。
73. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物经过基因修饰以提高所述胞内卤化物的浓度。
74. 根据权利要求 50 所述的生物,其中通过过表达卤化物转运子蛋白基因提高卤代甲烷的产量。
75. 根据权利要求 50 所述的生物,所述生物在 2、3、4、5 或 6 个位点进行基因修饰,其中每种所述修饰的影响分别为相对于未经修饰的生物提高卤代甲烷的产量。
76. 一种重组酵母细胞,包含编码 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶(MHT)的异源基因。
77. 根据权利要求 76 所述的重组酵母细胞,其中所述 MHT 来自盐草、肿块伯克氏菌、细长聚球藻、芜菁、甘蓝、拟南芥、拟南芥、钩端螺菌属、新型隐球酵母、稻、金牛蛭球菌、芳族脱氯单胞菌、灰盖鬼伞、*Robiginitalea bofirmata*、马氏海洋杆状菌、黄杆菌、葡萄或嗜盐嗜盐红螺菌。
78. 根据权利要求 77 所述的重组酵母细胞,所述重组酵母细胞选自酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母、乳酸克鲁维酵母、解脂耶氏酵母、里氏木霉和粟酒裂殖酵母构成的组。
79. 根据权利要求 78 所述的重组酵母细胞,所述重组酵母细胞是表达盐草卤代甲烷转

移酶蛋白的酿酒酵母细胞。

80. 根据权利要求 76-79 中任一项所述的重组酵母细胞,其中所述 MHT 表达为融合蛋白,所述融合蛋白包含将蛋白质靶向所述酵母的液泡的靶肽序列。

81. 根据权利要求 80 所述的重组酵母细胞,其中所述靶肽序列是来自羧肽酶 Y 的 N 末端肽结构域。

使用表达卤代甲烷转移酶的重组生物进行有机化合物的工业生产

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求美国临时专利申请 No. 60/991,678(2007 年 11 月 30 日提交);61/038,368(2008 年 3 月 20 日提交);61/041,467(2008 年 4 月 1 日提交)和 61/098,221(2008 年 9 月 18 日提交)的优先权。这些申请中的每一个出于各种目的均以全文并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及通过培养表达卤代甲烷转移酶的基因修饰生物而进行的生物燃料及其它卤代甲烷衍生物的生产。

背景技术

[0004] 卤代甲烷是反应性的一碳化合物,从其可以生产出多种具有重要商业价值的有机产物。已经使用高能耗并且包含高温和高压条件的化学方法进行卤代甲烷的工业生产。例如,卤代甲烷工业生产的常见方法包括在高温并且压力至少为 1 巴的条件下,在存在氧化铝催化剂时将甲醇与气态氯化氢反应。参见,例如,McKetta, J., CHEMICAL PROCESSING HANDBOOK, 1993。

[0005] 多种植物和真菌产生卤代甲烷并将它们释放到环境中。这些生物含有将氯、溴或碘离子与代谢产物 S-腺苷甲硫氨酸 (“AdoMet”或“SAM”) 的甲基结合以形成卤代甲烷和 S-腺苷高半胱氨酸的卤代甲烷转移酶。

发明内容

[0006] 本发明包括一种方法,其包括将 (i) 包含 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的生物、(ii) 选自包含氯化物、溴化物和碘化物的组的卤化物;和 (iii) 培养基中的碳源,在产生卤代甲烷的条件下混合。可选地,可以收集该卤代甲烷。该卤代甲烷可以转化为非卤化有机分子或非卤化有机分子的混合物,并且可以可选地对它们进行收集。可以以工业规模实施该方法,例如,在反应器中实施。本发明还提供了基因修饰的藻类、真菌或细菌,其包含异源 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶基因,其经过基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 生物合成途径的通量;和/或其经过基因修饰以提高胞内卤化物浓度。

[0007] 有用的生物包括藻类、酵母和细菌。所述重组生物可以是革兰氏阴性细菌,例如,大肠杆菌 (*E. coli*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、红杆菌属 (*Rhodobacter*)、集胞藻 (*Synechocystis*) 或欧文氏菌属 (*Erwinia*)。其它革兰氏阴性细菌包括来自甲基球菌科 (*Methylococcaceae*) 和甲基孢囊菌科 (*methylocystaceae*) 的成员;极端嗜热菌 (*Thermotoga hypogaea*)、嗜萘栖热袍菌 (*Thermotoganaphthophila*)、地下栖热袍菌 (*Thermotoga subterranean*)、嗜盐石油神袍菌 (*Petrotoga halophila*)、墨西哥石油神袍

菌 (*Petrotogamexicana*)、温和石油神袍菌 (*Petrotoga miotherma*) 和运动石油神袍菌 (*Petrotoga mobilis*)。作为另外一种选择,该重组生物可以是革兰氏阳性细菌,例如,枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 或梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)。如果需要,该重组生物可以是真菌,如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、粟酒裂殖酵母 (*Scizosacchomyces pombe*) 或里氏木霉 (*Trichoderma reesei*),或酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、耶氏酵母 (*Yarrowia*)、木霉属 (*Trichoderma*) 和裂殖酵母属 (*Scizosacchomyces*) 的其它酵母种。该重组生物还可以是真核生物,如藻类。藻类的实例包括衣藻型 (*Chlamydomonas*)。

[0008] 该生物可选地包含编码异源 MHT 的基因。该 MHT 可以是天然存在的 MHT 或是合成的 MHT。如果需要,该异源 MHT 的表达可以受诱导型启动子的控制。有用的 MHT 包括,例如但不限于,来自盐草 (*Batis maritima*)、肿块伯克氏菌 (*Burkholderia phymatum*)、细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)、芜菁 (*Brassica rapa*)、甘蓝 (*Brassica oleracea*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、钩端螺菌属 (*Leptospirillum*)、新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、稻 (*Oryza sativa*)、金牛蛎球菌 (*Ostreococcus tauri*)、芳族脱氯单胞菌 (*Dechloromonas aromatica*)、灰盖鬼伞 (*Coprinopsis cinerea*)、*Robiginitalea bofirmata*、马氏海洋杆状菌 (*Maricaulis maris*)、黄杆菌 (*Flavobacterium bacterium*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 或嗜盐嗜盐红螺菌 (*halorhodospira halophila*) 的 MHT。其它有用的 MHT 包括 (但不限于) 来自伯克氏菌 (*B. xenovorans*)、小白菜 (*B. rapa chinensis*)、类鼻疽伯克氏菌 (*B. pseudomallei*)、泰国伯克氏菌 (*B. thailandensis*)、海洋细菌 HTCC2080 和皮氏罗尔斯顿菌 (*R. pickett*) 的 MHT。还参见以下的讨论和图 10A。

[0009] 可以对生物进行基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 生物合成途径的通量。例如,可以通过 SAM 合成酶的表达或过表达提高通过 SAM 生物合成途径的通量。SAM 合成酶可以是大肠杆菌 (*E. coli*)metK、立克次氏体 (*Rickettsia*)metK、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)sam1p 或酿酒酵母 sam2p。SAM 合成酶可选地具有与大肠杆菌 (*E. coli*)metK 至少 80% 的氨基酸同一性。

[0010] 如果需要,可以通过使至少一种基因的表达和 / 或活性消除、失活或降低以提高通过 SAM 生物合成途径的通量。在适当的情况下,该基因可以参与 SAM 利用途径,例如,粪卟啉原 III 氧化酶、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶、胱硫醚 β -合成酶、核酮糖 5-磷酸酯 3-表异构酶、葡萄糖 -6-磷酸脱氢酶、L-丙氨酸转氨酶、3',5'-二磷酸核苷酸酶、甘氨酸羟甲基转移酶或甘氨酸羟甲基转移酶。

[0011] 也可以通过提高通过甲硫氨酸生物合成途径的通量来提高通过 SAM 生物合成途径的通量。例如,可以通过大肠杆菌 (*E. coli*)metL、metA、metB、metC、metE 和 / 或 metH 基因的表达或过表达以提高通过甲硫氨酸生物合成途径的通量。如果需要,可以使编码甲硫氨酸生物合成阻遏物的基因,例如,大肠杆菌 (*E. coli*)metJ 失活。

[0012] 如果需要,可以通过表达诸如 Sam5p 酵母线粒体基因的 SAM 转运子蛋白以提高该通量。另一方面,可以通过表达提高 ATP 胞内浓度和 / 或可用性的基因和 / 或通过提高胞内

卤化物浓度（例如，通过卤化物转运子蛋白基因的过表达）来提高卤代甲烷的产量。所述卤化物转运子可以是大肠杆菌 (*E. coli*) *clc* 转运子或与大肠杆菌 *clc* 转运子具有至少 80% 氨基酸序列同一性的基因。

[0013] 可以将本发明中使用的卤化物以卤盐例如，氯化钠、溴化钠和碘化钠来提供。该卤化物可以以 0.05 至 0.3M 的浓度存在于培养基中。培养基可选地包含甲硫氨酸。所产生的卤代甲烷可以是氯甲烷、溴甲烷和 / 或碘甲烷。卤代甲烷向其它产物的转化可以是催化缩合 (catalytic condensation) 的结果。有用的催化剂包括沸石催化剂，例如，ZSM-5 或溴化铝 (AlBr_3)。催化缩合步骤导致卤化物的产生，其可以再循环回到培养基中。本发明的方法可以用于生产包含烷烃（例如，乙烷、丙烷、丁烷、戊烷、己烷、庚烷、辛烷或它们的混合物）的组合物。可以产生的其它有机分子包括但不限于烯烃、醇、醚和 / 或醛。

[0014] 可以在多个（例如，2、3、4、5 或 6 个）位点对所述生物进行基因修饰。每种修饰的影响单独可以提高卤代甲烷的产量。

[0015] 本发明一方面，提供了一种方法，其包括在产生卤代甲烷的条件下将 i) 包含编码 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的异源基因的重组酵母、ii) 选自包含氯化物、溴化物和碘化物的组的卤化物；和 iii) 碳源在培养基中混合的步骤。该方法还可以包括将所述卤代甲烷转化为非卤化有机分子或非卤化有机分子混合物的步骤。在一些实施方式中，所述酵母来自于选自酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、耶氏酵母 (*Yarrowia*)、木霉属 (*Trichoderma*) 和裂殖酵母属 (*Scizosacchomyces*) 的属。例如，所述酵母可以是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 或粟酒裂殖酵母 (*Scizosacchomyces pombe*)。一些实施方式中，所述 MHT 来自于盐草 (*Batis maritima*)。在一些实施方式中，所述碳源为通过纤维素代谢产生的乙酸盐和 / 或乙醇，其中纤维素是通过可分解纤维素的微生物代谢的。该分解纤维素的微生物可以是细菌，如发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*)。在一些实施方式中，纤维素为微晶纤维素。在一些实施方式中，纤维素为切碎或粉碎的原料（例如，粉碎的柳枝稷、甘蔗渣、象草、玉米秸秆和白杨）。

[0016] 本发明一方面，提供了包含酵母和纤维素细菌的共培养物系统，其中所述酵母表达至少一种异源蛋白。所述共培养物系统可以含有纤维素。在一些实施方式中，所述共培养物系统含有一种酵母和一种细菌。

[0017] 在所述共培养物系统的一些实施方式中，所述酵母可以来自选自由酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、耶氏酵母 (*Yarrowia*)、木霉属 (*Trichoderma*) 和裂殖酵母属 (*Scizosacchomyces*) 构成的组的属，例如，酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)。

[0018] 在一些实施方式中，所述共培养物的酵母和细菌在培养中具有共生关系。在一些实施方式中，所述细菌为发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*)。

[0019] 本发明一方面，提供了两种微生物稳定的体外共培养物（共培养，co-culture），所述两种微生物适应于需氧共同生长并且保持相对恒定的物种种群比，从而使任一种微生物种群都不压倒另一种。所述共培养物包括 (i) 代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物

的第一微生物组分;(ii) 经过重组修饰以表达异源蛋白并且不能够经过代谢降解纤维素的第二微生物组分,其中第二微生物使用第一微生物的代谢产物作为碳源。在一种实施方式中,第一微生物为纤维素细菌 (cellulosic bacteria) 而第二微生物为酵母。在一种实施方式中,所述酵母表达异源卤代甲烷转移酶。在一些实施方式中,所述酵母为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 而所述细菌为发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*)。

[0020] 在某些实施方式中,所述异源基因编码包含 MHT 序列和将该 MHT 序列靶向酵母液泡的靶肽序列的融合蛋白。该靶肽序列可以是羧肽酶 Y 的 N 末端肽结构域。

[0021] 本发明一方面,提供生产卤代甲烷的方法,其包括在产生卤代甲烷的条件下,在含有纤维素和卤化物的培养基中,将代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物的第一微生物与不代谢纤维素并经过重组修饰以表达异源卤代甲烷转移酶蛋白的第二微生物共同培养。在一些实施方式中,该卤化物为氯化物、溴化物和碘化物。

[0022] 本发明一方面,提供了重组酵母细胞,其包含编码 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的异源基因。在某些实施方式中,该 MHT 来自盐草 (*Batis maritima*)、肿块伯克氏菌 (*Burkholderia phyumatum*)、细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)、芜菁 (*Brassica rapa*)、甘蓝 (*Brassica oleracea*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、钩端螺菌属 (*Leptospirillum*)、新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、稻 (*Oryza sativa*)、金牛蛎球菌 (*Ostreococcus tauri*)、芳族脱氯单胞菌 (*Dechloromonas aromatica*)、灰盖鬼伞 (*Coprinopsis cinerea*)、Robiginitalea bofirmata、马氏海洋杆状菌 (*Maricaulis maris*)、黄杆菌 (*Flavobacterium bacterium*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 或嗜盐嗜盐红螺菌 (*halorhodospira halophila*)。在某些实施方式中,该 MHT 来自伯克氏菌 (*B. xenovorans*)、小白菜 (*B. rapa chinensis*)、类鼻疽伯克氏菌 (*B. pseudomallei*)、泰国伯克氏菌 (*B. thailandensis*)、海洋细菌 HTCC2080 或皮氏罗尔斯顿菌 (*R. pickett*)。在某些实施方式中,所述重组酵母细胞选自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、多形汉逊酵母 (*Hansenulapolyomorpha*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 和粟酒裂殖酵母 (*Scizosacchomyces pombe*)。例如,所述重组酵母细胞可以是表达盐草 (*Batis maritima*) 卤代甲烷转移酶蛋白的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞。

[0023] 在一些实施方式中,该 MHT 作为融合蛋白在酵母细胞中表达,所述融合蛋白包含将蛋白质靶向酵母液泡的靶肽序列 (targeting peptide sequence)。在一种实施方式中,该靶肽序列是羧肽酶 Y 的 N 末端肽结构域。

[0024] 另一方面,本文说明了共培养物系统,其包含培养基,其中含细菌代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物的纤维素细菌组分和使用所述细菌的至少一种代谢产物作为碳源的酵母组分。在一种实施方式中,细菌-酵母共培养物包含代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物的发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 细菌和使用所述细菌产生的至少一种代谢产物作为碳源的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)。所述培养基可以含有纤维素。在一些实施方式中,所述酵母不能通过代谢降解纤维素。在一些实施方式中,所述(一种或多种)代谢产物是所述酵母唯一的或主要的碳源和能量来源。

[0025] 在一些实施方式中,所述酵母经过重组修饰以表达异源蛋白或过表达内源蛋白。在一些实施方式中,所述酵母经过重组修饰以敲除内源蛋白的表达。在一些实施方式中,所述细菌和酵母共同生长而保持相对恒定的物种种群比从而使得任一种微生物种群都不压倒另一种。所述共培养物系统可以保持在基本有氧的(aerobic)条件或基本无氧的(anaerobic)条件下。

[0026] 在各种实施方式中,所述酵母来自于选自酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、耶氏酵母(*Yarrowia*)、木霉属(*Trichoderma*)和裂殖酵母属(*Scizosacchomyces*)的属。在一种实施方式中,所述酵母为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)。在多种实施方式中,所述细菌为氨基酸球菌(*Actinotalea*)或纤维单胞菌(*cellulomonas*)种。在一种实施方式中,所述细菌为发酵氨基酸球菌(*Actinotalea fermentans*)。在一种实施方式中,所述酵母为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)而所述细菌为发酵氨基酸球菌(*Actinotalea fermentans*)。在一些实施方式中,所述共培养物(co-culture,共培养)包含仅一种酵母和仅一种细菌。在一些实施方式中,所述酵母和细菌在培养中具有共生关系。

[0027] 在一些实施方式中,由所述细菌产生的碳源为包含1-6个碳原子的分子,如,例如,乙醇、乙酸盐、乳酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐或苹果酸盐。

[0028] 在一些实施方式中,所述酵母表达异源蛋白。例如,所述异源蛋白可以是哺乳动物蛋白,如,例如用于治疗患者的人蛋白。在一些实施方式中,所述异源蛋白是酶,如在酵母中催化合成途径中步骤的酶。在一种实施方式中,所述异源蛋白是卤代甲烷转移酶。在一些实施方式中,所述酵母经过基因工程设计以产生具有商业价值的小分子化合物。在其它实施方式中,所述酵母是未经重组修饰的天然存在的或培养的菌株。

[0029] 另一方面,本文说明了一种酵母培养方法,其包括在培养基中,在存在纤维素或纤维素源的情况下,在以下条件下共同培养纤维素细菌和酵母,在所述条件下(i)所述细菌代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物,且(ii)所述酵母组分使用所述细菌的至少一种代谢产物作为碳源。通常所述培养基是液体。在一种实施方式中,所述纤维素为微晶纤维素。

[0030] 在一些实施方式中,所述纤维素源是生物质(biomass),例如但不限于,柳枝稷、甘蔗渣、象草、玉米秸秆、白杨(每种均可以粉碎)以及这些和其它生物质材料的混合物。

[0031] 在一些实施方式中,所述培养维持在有氧条件下。在一些实施方式中,所述培养维持在无氧条件下。在一些实施方式中,所述酵母和细菌在培养中具有共生关系。在一些实施方式中,所述酵母不能通过代谢降解纤维素。在一些实施方式中,所述细菌产生的碳源为包含1-6个碳原子的分子,如,例如,乙醇、乙酸盐、乳酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐或苹果酸盐。

[0032] 在多种实施方式中,所述共培养物中的酵母来自于选自酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、耶氏酵母(*Yarrowia*)、木霉属(*Trichoderma*)和裂殖酵母属(*Scizosacchomyces*)的属。在一种实施方式中,所述酵母为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)。在多种实施方式中,所述细菌为氨基酸球菌(*Actinotalea*)或纤维单胞菌(*Cellulomonas*)种。在一种实施方式中,所述细菌为发酵氨基酸球菌(*Actinotalea fermentans*)。在一种实施方式中,所述酵母为酿酒酵母

(*S. cerevisiae*) 而所述细菌为发酵氨基酸球菌。在一些实施方式中,所述共培养物包含仅一种酵母和仅一种细菌。在一些实施方式中,所述酵母和细菌在培养中具有共生关系。

[0033] 一些实施方式中,所述酵母经过重组修饰以表达异源蛋白。例如,所述异源蛋白可以是哺乳动物蛋白,如,例如用于治疗患者的人蛋白。在一些实施方式中,所述异源蛋白是酶。在一种实施方式中,所述异源蛋白是卤代甲烷转移酶。在一些实施方式中,所述酵母经过基因工程设计以产生具有商业价值的小分子化合物。在其它实施方式中,所述酵母是未经过重组修饰的天然存在的或培养的菌株。

[0034] 在一些实施方式中,所述酵母经过重组修饰以敲除内源蛋白的表达。在其它实施方式中,所述酵母是未经过重组修饰的天然存在的或培养的菌株。

[0035] 在一些实施方式中,所述方法包括从由酵母产生物的培养基中回收产物的步骤。可以回收的产物的实例包括,但不限于,由所述酵母表达的重组蛋白、由所述酵母细胞合成的小分子、药物、食品产品、氨基酸、辅因子、激素、蛋白质、维生素、脂肪、烷烃、芳族化合物、烯烃、醇或生物燃料中间体。在一种实施方式中,所述产物是卤代甲烷。在一些实施方式中,所述产物的合成需要在酵母中表达异源蛋白。在一些实施方式中,所述合成需要表达在酵母中过表达的内源蛋白或缺失酵母的一种或多种内源基因。

[0036] 一方面,本发明提供了生产卤代甲烷的方法,其包括在包含纤维素源和卤化物的培养基中,在产生卤代甲烷的条件下将代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物的纤维素细菌与不代谢纤维素并经过重组修饰以表达异源卤代甲烷转移酶蛋白的酵母共同培养。所述卤化物可以是氯化物 (chlorine)、溴化物 (bromine) 和碘化物 (iodine)。

[0037] 一方面,本发明提供了一种方法,其包括在培养基中在产生卤代甲烷的条件下混合 i) 包含编码 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的异源基因的重组酵母, ii) 选自氯化物、溴化物和碘化物构成的组的卤化物;和 iii) 通过纤维素代谢产生碳源的纤维素分解细菌。在一些实施方式中,所述碳源是包含 1-6 个碳原子的分子,如乙醇、乙酸盐、乳酸盐、琥珀酸盐、甲酸盐、柠檬酸盐或苹果酸盐。在一些实施方式中,所述方法包括从培养基中回收卤代甲烷并将该卤代甲烷转化为非卤化有机分子或非卤化有机分子的混合物。在一些实施方式中,所述酵母为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 或下文所述的另一种酵母。

[0038] 在一些实施方式中,所述细菌是发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 或下文所述的另一种纤维素细菌。在一些实施方式中,所述 MHT 来自盐草 (*Batis maritima*) 或为下文所述的另一种 MHT。在一种实施方式中,所述酵母为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*), 所述细菌为发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 而所述 MHT 来自盐草 (*Batis maritima*)。

附图说明

[0039] 图 1:通过含有从 IPTG-诱导型启动子表达的重组卤代甲烷转移酶 (MHT) 基因的细菌进行的卤代甲烷生产。

[0040] 图 2:向培养基添加 IPTG 后,通过含有从 IPTG-诱导型启动子表达的重组 MHT 基因的细菌进行的卤代甲烷生产的时间过程。

[0041] 图 3:细菌生长期对卤代甲烷生产的影响。

[0042] 图 4 :培养基中卤盐浓度对卤代甲烷生产的影响。

[0043] 图 5 :不同卤化物对卤代甲烷生产的影响。

[0044] 图 6 :通过过表达除 MHT 之外的基因 (例如, metK) 的细菌生产卤代甲烷。

[0045] 图 7 :通过表达来自多种生物的多源 MHT 的细菌实现卤代甲烷的生产。

[0046] 图 8 :生产有机化合物的生物反应器系统的示意图。

[0047] 图 9A-C :使用微生物共培养从纤维素原料中生产 CH_3I 。图 9A :共培养图。发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 将纤维素原料发酵为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 可以呼吸的作为碳源 (和能量来源) 的乙酸盐和乙醇。图 9B, 左侧部分 :酵母在共培养中的生长。将酵母接种到作为唯一碳源的羧甲基纤维素 (CMC) 上, 其中含有和不含发酵氨基酸球菌。以菌落形成单位测量生长。图 9B, 右侧部分 :细菌在共培养中的生长。图 9C :从纤维素原料生产 CH_3I 。以低密度接种共培养物并用指定的原料 (20g/L) 作为唯一碳源生长 36 小时。加入碘化钠并通过如前所述的 GC-MS 测量 CH_3I 的产量。以克 / 升 / 天为单位报告 CH_3I 的产率, 并用 CFU/ 毫升培养物进行归一化。显示了发酵氨基酸球菌 - 酿酒酵母共培养在乙酸盐、CMC、柳枝稷、玉米秸秆和白杨上的产率。不与发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 共同生长的培养物表现为无碘甲烷活性。

[0048] 图 10A-B :对 MHT 文库筛选卤代甲烷活性。图 10A :大肠杆菌 (*E. coli*) 中 MHT 文库的卤代甲烷活性。左侧显示了 MHT 基因的来源生物。以红色字体表示细菌, 绿色表示植物, 蓝色表示真菌, 紫色表示古细菌。显示了 CH_3I 、 CH_3Br 和 CH_3Cl 的生产。根据 CH_3I 活性排列基因。图 10B, 对 MHT 文库的子集测定卤代甲烷活性。测量进行三次并显示标准偏差。

[0049] 图 11A-D :在重组酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中生产碘甲烷。图 11A, CH_3I 生产途径。表达具有 N 末端液泡靶向标记的盐草 (*B. maritima*) MHT。使用 SAM 作为甲基供体, ATP- 依赖性 MHT 使碘离子甲基化。图 11B, 随时间测量的培养基顶部空间 (顶空, headspace) 中的 CH_3I 。示出了在葡萄糖上生长的细胞的活性。图 11C, CH_3I 的产率, 单位为克 / 升培养物 / 天。可培养的红藻格药铃 (*E. muricata*) 的数值取自文献。通过与标准曲线比较, 计算出表达盐草 (*B. maritima*) MHT 的大肠杆菌 (*E. coli*) 和酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的产率。图 11D, 酵母中 CH_3I 的毒性。将指数生长期的培养物稀释至 OD_{600} 为 0.05 并加入可商购的 CH_3I 。在生长 24 小时后测量 OD_{600} 。在填充框中示出了 W303a 实验室菌株, 而在空白框中示出了 DNA 甲基化敏感性 RAD50 Δ 突变体。

[0050] 图 12 :通过使用 N- 末端融合的 CPY 信号将盐草 (*B. maritima*) MHT 靶向酵母液泡以改善碘甲烷的生产。对每种培养, 显示了每小时的碘甲烷的量。在 W303 菌株和锚定 VPS33 缺失的 W303 菌株 (其消除了液泡形成) 中表达了液泡靶向的 (CPY-MHT) 细胞质 MHT。

具体实施方式

[0051] 1、介绍

[0052] 使用石油化学工业中常用的沸石催化剂可以将卤代甲烷转化为商品化学品和包括汽油在内的液体燃料。卤代甲烷转移酶 (MHT) 以 ATP- 依赖性方式将普遍存在的代谢产物 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM) 中的甲基转移到卤离子上。使用生物信息学和邮购 (mail-order) 的 DNA 合成, 我们从植物、真菌、细菌和未鉴定生物中鉴别并克隆了 89 种推定 MHT 基因的文库。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中筛选文库以鉴别 CH_3Cl 、 CH_3Br 和 CH_3I 的产率,

其中文库中 56% 对氯化物 (chloride) 有活性、85% 对溴化物 (bromide) 有活性而 69% 对碘化物 (iodide) 有活性。最高活性的 MHT 的表达以及随后在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的工程设计导致从葡萄糖和蔗糖的产率为 4.5 克 / 升 - 天, 是可培养的天然存在来源的四个数量级 (four orders of magnitude)。使用工程酵母和纤维素分解细菌 - 发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 的共生共培养, 我们能够实现从未处理的柳枝稷 (*Panicum virgatum*)、玉米秸秆和白杨中生产卤代甲烷。从各种生物可再生资源生产的卤代甲烷可以用作化学工业中生产烷烃、芳烃、烯烃和醇类的 1- 碳前体。

[0053] 一方面, 本发明提供了生产商品化学品和燃料的方法。本发明提供了生产生物燃料以及其它有商业价值的有机产物的方法。一方面, 在存在碳源的情况下 (例如, 农业或废弃生物质、培养基、石油、天然气应用甲烷) 并且在产生卤代甲烷气体的条件下培养表达卤代甲烷转移酶 (MHT) 的重组细菌、真菌或植物细胞。在一种实施方式中, 所述 MHT 是异源的。将卤代甲烷转化为非卤化有机化合物, 如长链烷烃、烯烃、醇、醚和醛。在一种实施方式中, 该有机化合物适于用作生物燃料。可以通过任何方式将卤代甲烷转化为其它有机分子, 这并不局限于特定机制。在一种实施方式中, 表达 MHT 的生物也表达将卤代甲烷转化为另一种有机分子 (如甲醇) 的酶 (内源或异源的)。在一种实施方式中, 表达 MHT 的生物释放卤代甲烷, 然后通过不同的生物 (天然或重组的) 将其转化为另一种有机分子。在一种实施方式中, 收集卤代甲烷并通过熟知的化学合成方法 (例如, 催化缩合) 进行转化。将卤代甲烷转化为非卤化有机分子或非卤化有机分子的混合物后, 可以收集该非卤化有机分子和 / 或进行包装以备随后使用。

[0054] 本发明还包括表达异源卤代甲烷转移酶并具有至少一个其它基因修饰的生物, 所述至少一个其它基因修饰导致该生物比缺少所述至少一个其它基因修饰的生物产生更多的卤代甲烷。可以通过多种方式辅助 MHT 表达细胞中卤代甲烷产率的提高, 例如, 通过工程设计的 SAM 的过量生产、提高 ATP 的浓度和 / 或可用性、卤离子输入子 (importer) 的表达。各种代谢途径中的基因操控使得产生能够有效地将来自纤维素、糖、废料或 CO₂ 的碳转化为卤代甲烷气体的生物。

[0055] 本发明还提供了共培养系统, 其中将纤维素分解细菌和表达异源蛋白的酵母细胞共同培养。在该系统中, 细菌代谢纤维素以产生用作酵母碳源的产物。在一些实施例中, 培养基中产物的累积对该细菌是有毒的。酵母细胞对该产物的消耗起到除去该产物的作用, 从而使得所述细菌和酵母具有共生关系。

[0056] 2. 表达卤代甲烷转移酶的细胞

[0057] 在本发明实践中可以使用多种类型的细胞或生物, 包括表达内源卤代甲烷转移酶 (MHT) 的细胞和经过修饰以表达异源的 MHT 的细胞。优选地, 该生物每天能够产生约 1-1000mg/L 的卤代甲烷, 通常为每天约 10-100mg/L, 如约 20-60mg/L, 例如, 约 30-50mg/L 或约 40mg/L。如本文所使用的, 术语“异源”指正常情况下不存在于该细胞基因组中的基因, 如来自不同物种的基因或天然未发现的基因, 或由异源基因编码的蛋白质。可以将野生型细胞基因组中发现的基因或正常情况下在该细胞中表达的蛋白质称为“内源的”。可以将内源基因的另外的拷贝 (在组成型或诱导型启动子的控制下) 引入宿主生物以提高内源酶的水平。

[0058] 原则上, 可以修饰几乎任何细胞类型以用于本发明方法, 然而在实践中, 这些细胞

或生物应适合于工业规模生物生产,例如,通常为单细胞的和 / 或快速生长的。为简单起见,在本文使用术语“细胞”以涵盖表达 MHT 的单细胞生物和表达 MHT 的多细胞生物的细胞。适合的细胞可以是真核的或原核的。实例包括细菌、真菌、藻类和高等植物细胞。

[0059] 可以使用表达内源 MHT 的细胞。在此情况下,通常选择或修饰该细胞以表达高水平的内源 MHT 和 / 或在影响卤代甲烷生产的其它位点选择或修饰细胞,如下所讨论的。尽管在进行或未进行预先诱变的情况下可以使用选择,但是由于重组技术对最终细胞表型的控制更强,因此它们通常是优选的。

[0060] 当使用重组细胞时,它们可以表达异源 MHT,表达修饰的内源 MHT,表达比野生型细胞更高水平的内源 MHT,可以在除 MHT 基因(以下将进行讨论)之外的一个或多个位点进行修饰,或这些修饰的组合。最优选地,细胞表达异源 MHT 并在影响卤代甲烷生产的至少一个其它位点进行修饰。

[0061] 一方面,该重组生物不是大肠杆菌 (*E. coli*)。另一方面,该异源酶不是盐草 (*Batis*)MHT。另一方面,该重组生物不是含有盐草 (*Batis*)MHT 的大肠杆菌 (*E. coli*)。

[0062] 2.1 表达内源 MHT 的细胞

[0063] 多种植物、真菌和细菌表达内源 MHT 并可以根据本发明方法使用。另外,MHT 表达细胞是可以转移到诸如大肠杆菌 (*E. coli*) 的异源宿主的 MHT 基因源。表达 MHT 的生物包括原核生物,例如细菌或古细菌 (*archaea*)。根据本发明,可用于产生 MHT 的细菌的实例包括土壤细菌和蛋白细菌 (*Proteobacteria*)、氯甲烷甲基杆菌 (*Methylobacterium chloromethanicum*) 和氯甲烷生丝微菌 (*Hyphomicrobium chloromethanicum*)。蛋白细菌 (*Proteobacteria*) 门包括如假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和伯克氏菌属 (*Burkholderia*)。伯克氏菌属 (*Burkholderia*) 的实例包括伯克氏菌 (*Burkholderia xenovorans*) (先前名为洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*),然后改为洋葱伯克氏菌 (*B. cepacia*) 和真菌伯克氏菌 (*B. fungorum*)),它们已知能够降解有机氯杀虫剂和多氯联苯 (PCB)。其它的伯克氏菌种包括鼻疽伯克氏菌 (*B. mallei*)、类鼻疽伯克氏菌 (*B. pseudomallei*) 和洋葱伯克氏菌 (*B. cepacia*)。除细菌之外,其它原核生物(如古细菌)可以在修饰或未修饰的情况下用于产生 MHT。古细菌的实例包括硫化叶菌属 (*Sulfolobus*),如嗜酸热硫化叶菌 (*S. acidocaldarius*)、冰岛硫化叶菌 (*S. islandicus*)、金属硫化叶菌 (*S. metallicus*)、新西兰硫化叶菌 (*S. neozealandicus*)、希氏硫化叶菌 (*S. shibatae*)、硫矿硫化叶菌 (*S. solfataricus*) 或硫化叶菌属 AMP12/99。

[0064] 其它特别有用的生物类型包括海洋藻类(例如,浮游植物、巨藻和海草)、高等植物(例如,喜盐植物、十字花科植物 (*Brassicaceae*),如甘蓝 (*Brassica oleracea*) (TM1 或 TM2) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (TM1 或 TM2)) 和真菌(例如,酵母)。特定的种包括盐草 (*Batis maritima*)、肿块伯克氏菌 (*Burkholderia phytofirmans*) STM815、细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PCC6301、小白菜亚种 (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) ; 钩端螺菌属 (*Leptospirillum* sp.) II 组 (Group) UBA ; 新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 变种新型 JEC21 ; 稻 (*Oryza sativa*) (日本产植物变种) ; 金牛蛎球菌 (*Ostreococcus tauri*) ; 芳族脱氯单胞菌 (*Dechloromonas aromatica*) RCB ; 灰盖鬼伞冈山株 (*Coprinopsis cinerea* okayama) ; *Robiginitalea bofirmata* HTCC2501 ; 马氏海洋杆状菌 (*Maricaulis maris*) MCS10 ; 黄杆菌 (*Flavobacterium bacterium*) BBFL7 ;

葡萄 (*Vitis vinifera*) ;嗜盐红螺菌 (*halorhodospira halophila*) SL1 ;苹果木层孔菌 (*Phellinus pomaceus*, 白腐真菌)、内枝藻 (*Endocladia muricata*, 海洋红藻)、冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum*), 如脂肪巴夫藻 (*P. pinguis*) 和旋转巴夫藻 (*P. gyrans*) 的巴夫藻 (*Pavlova*) 种、*Papenfusiella kuromo*、铜藻 (*Sargassum horneri*) 和昆布 (*Laminaria digitata*)。参见, 例如, Wuosmaa 等, 1990, *Science* 249 :160-2 ;Nagatoshi 等, 2007, *Plant Biotechnology* 24, 503-506。本文还公开了其它的种。

[0065] 2.2 表达异源 MHT 的细胞

[0066] 在一些实施方式中, 本发明中使用的细胞不表达内源 MHT, 但经过修饰可以表达异源 MHT。作为另外一种选择, 可以使用经过修饰以表达异源 MHT 以及还表达内源 MHT 的细胞。使用表达异源 MHT 的细胞具有几个优势。第一, 使用本文所述方法, 有可能将该生物的所需特性 (易于培养、代谢特定原料的能力、其它位点重组操控的适合性) 与 MHT 基因的所需特性 (例如, 高酶活性) 相结合。

[0067] 可以经过基因修饰以表达异源 MHT 的细胞包括原核生物和真核生物, 如植物、真菌等。示例性的原核生物包括革兰氏阴性细菌, 如大肠杆菌 (*E. coli*) (例如, MC1061、BL21 和 DH10B)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) (例如, SL1344)、红杆菌属 (*Rhodobacter*)、集胞藻 (*Synechocystis*)、立克次氏体属 (*Rickettsia*) 和欧文氏菌属 (*Erwinia*), 和革兰氏阳性细菌, 如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)。示例性的植物包括藻类 (例如, 衣藻型 (*Chlamydomonas*)、小球藻属 (*Chlorella*) 和原壁菌属 (*Prototheca*))。示例性的真菌包括里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和酵母 (例如, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母属 (*Pichia*))。本文公开了其它细胞类型并且它们在本领域中是已知的。其它示例性细菌包括芝田硫化叶菌 (*Sulfobolus sulfataricus*) 和茎菌 (*Caulobacter*), 如马氏海洋杆状菌 (*Maricaulis maris*)。

[0068] 可以选择有效代谢特定碳源的生物以与可用原料相匹配。例如, 当使用纤维素材料作为碳源时, 可以使用如欧文氏菌属 (*Erwinia*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*) 和黑曲霉 (*Aspergillus Niger*) 的生物。大肠杆菌 (*E. coli*) 和酵母 (*Saccharomyces*) 是可用于代谢淀粉和甘蔗的生物的实例。类似地, 如藻类 (例如, 小球藻属 (*Chlorella*) 和原壁菌属 (*Prototheca*)) 的光合生物可以代谢如 CO₂ 的碳源。

[0069] 2.3 卤代甲烷转移酶

[0070] 在本发明的上下文中, “卤代甲烷转移酶 (MHT)” 是将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移到卤素上的蛋白。如上所述, 卤代甲烷转移酶是自然界中普遍存在的。示例性的天然存在的卤代甲烷转移酶包括, 但不限于, 本文中公开的那些。可以参考蛋白质数据库 (例如, NCBI 蛋白质序列数据库, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>) 和科学文献识别其它天然存在的卤代甲烷转移酶。

[0071] 下表 1 列出了已知具有 MHT 的一些生物。另外, 请参见附图、表 4 和 6 以及实施例 8 和 9。

[0072] 表 1

[0073]

生物
盐草 (<i>Batis maritima</i>)
肿块伯克氏菌 (<i>Burkholderia phymatum</i>)STM815
细长聚球藻 (<i>Synechococcus elongatus</i>)PCC 6301
小白菜亚种 (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>Chinensis</i>)
甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>)TM1
甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>)TM2
拟南芥 (<i>Arabidopsis Thaliana</i>)TM1
拟南芥 (<i>Arabidopsis Thaliana</i>)TM2
钩端螺菌种 (<i>Leptospirillum</i> sp.)II 组 UBA
新型隐球酵母变种 (<i>Cryptococcus neoformans</i> var.) 新型 JEC21
稻 (<i>Oryza sativa</i>) (日本产植物培养变种型) ;
金牛蛎球菌 (<i>Ostreococcus tauri</i>)
芳族脱氯单胞菌 (<i>Dechloromonas aromatica</i>)RCB
灰盖鬼伞冈山株 (<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>)
<i>Robiginitalea bofirmata</i> HTCC2501
马氏海洋杆状菌 (<i>Maricaulis maris</i>)MCS10
黄杆菌 (<i>Flavobacterium bacterium</i>)BBFL7
葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>)
嗜盐嗜盐红螺菌 (<i>Halorhodospira halophila</i>)SL1

[0074] 可以在适合于在宿主中使用的启动子的控制下将 MHT 基因克隆并引入到宿主生物。作为另外一种选择,可以合成编码所需 MHT 序列的基因,这使得在该基因中的密码子使用对该宿主优化。所述启动子可以是诱导型或组成型的。可以将所述异源 MHT 基因整合到该宿主染色体中(例如,稳定转染)或可以维持为游离基因。

[0075] 适合的 MHT 不限于由天然存在的基因所编码的蛋白质。例如,定向进化技术可以用于产生具有甲基转移酶活性的新型或杂交基因产物。另外,可以使用天然存在

的 MHT 的催化活性片段和变体。部分或全合成的 MHT, 如通过电脑模拟设计的酶或使用本领域已知的定向进化技术产生的酶, 所述技术包括基因改组、家族改组、交错延伸过程 (StEP)、过渡模板随机嵌合生长 (RACHITT)、用于产生杂交酶的重叠截短 (ITCHY)、截短模板重组延伸 (RETT) 等 (参见 Cramer et al, 1998, "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution", *Nature* 391:288-91; Rubin-Pitel et al, 2006, "Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution", *Comb Chem High Throughput Screen* 9:247-57; Johannes 和 Zhao, 2006, "Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways", *Curr Opin Microbiol.* 9:261-7; Bornscheuer 和 Pohl, 2001, "Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design", *Curr Opin Chem Biol.* 5:137-43)。

[0076] 显然, 在本发明方法中可以使用多种天然和非天然存在的卤代甲烷转移酶, 假设 MHT 可以影响宿主生物中 S-腺苷甲硫氨酸的甲基向卤化物 (即氯化物、碘化物和 / 或溴化物) 的转移。可以使用本领域中已知的多种测定方法测量 MHT 酶的活性。这些测定方法可以测量纯化的或部分纯化的蛋白质的活性。参见, 例如, Niand Hager, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 96:3611-15 and Nagatoshi and Nakamura, 2007, *Plant Biotechnology*, 24:503-506。作为另外一种选择, 可以在确实表达 MHT 的细胞中表达蛋白质, 并且在随后的实施例和其它本领域已知的测定中说明测量的卤代甲烷产量。在一个测定中, 将具有编码 MHT 蛋白的序列的表达载体引入细菌 (例如, 大肠杆菌 (*E. coli*)) 宿主细胞和所选的转化体中。在试管或烧瓶中的生长培养基上培养克隆 (例如, 在含有 NaCl、NaI 或 NaBr 的 LB 培养基上并且在 37°C 振荡培养 4-22 小时)。如果 MHT 编码序列受诱导型启动子的控制, 则其中包含诱导试剂。密封所述试管或烧瓶 (例如, 用橡皮筋捆紧的封口膜和铝箔密封)。培养期结束时, 通过例如气相色谱法确定顶部空间气体中 MeX 的水平。

[0077] 如下文实施例 8 中所表明的, 可以在本发明实践中使用的 MHT 序列具有相当的变化性。当在细菌或真菌细胞中异源表达时, 已将彼此之间具有少至 29% 的序列同一性的序列用于生产卤代甲烷。此外, 如实施例 8 所示, 不同的卤代甲烷转移酶均可以在大肠杆菌 (*E. coli*) 中起作用。

[0078] 在某些实施方式中, 本发明包括使用与本发明中已知的 SAM-依赖性卤代甲烷转移酶 (如本文所述的 MHT) 具有至少约 25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或至少 99% 的同一性的酶活性多肽。如本文所使用的, "序列同一性百分比" 表示通过对两种最优比对序列的比较窗进行比较所确定的值, 其中与两序列最优比对的参考序列 (不包括添加或缺失) 相比, 比较窗中的多核苷酸序列部分可以包括添加或缺失 (即, 缺口)。百分比的计算如下, 确定两序列中氨基酸残基相同的位置数目以得到匹配位置的数目, 将匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数并将该结果乘以 100 即得到了序列同一性百分比。

[0079] 3. 影响卤代甲烷生产的其它基因修饰

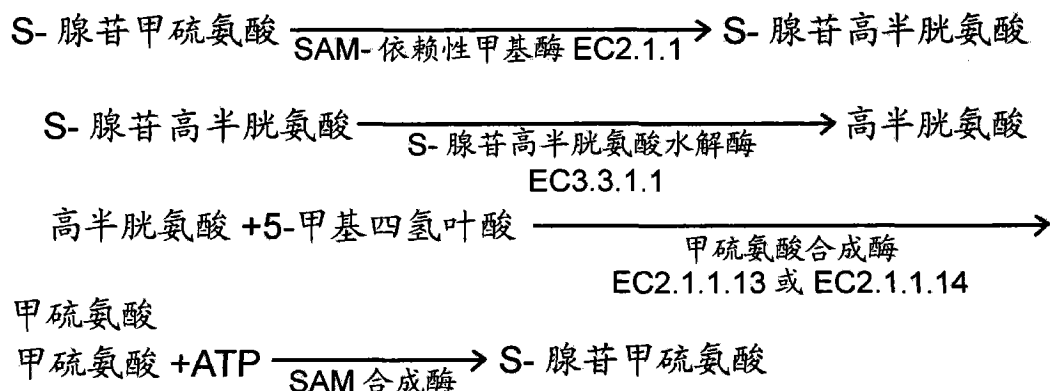
[0080] 除引入和操纵 MHT 基因外, 可以进行其它基因修饰以提高卤代甲烷生产效率, 或提高卤代甲烷产量。这些改变包括提高如氯化物和 S-腺苷甲硫氨酸 (也称为 "SAM" 或 "AdoMet") 的反应底物的胞内浓度。可以通过改变 SAM 生物合成速率 (例如, 通过提高 SAM 前体物的水平)、降低 SAM 消耗等来提高 SAM 的胞内水平。可以通过刺激氯化物向细胞的传输、向胞外环境添加氯化物等来提高胞内氯化物水平。一般说来, 代谢工程技术可用于使卤

代甲烷的产量最大化。

[0081] 3.1SAM 代谢途径

[0082] 可以通过操纵通过影响 SAM 水平的代谢途径的通量来提高卤代甲烷的产量,所述代谢途径如 SAM 生物合成途径、甲硫氨酸生物合成途径、SAM 利用或降解途径和 SAM 循环途径。S-腺苷甲硫氨酸是普遍存在的代谢产物,其参与需要甲基转移的多条代谢途径。以下说明了一条该类途径:

[0083]



[0084] 3.1.1SAM 合成酶的过表达

[0085] 从 ATP 和甲硫氨酸合成了 SAM,即由 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (SAM 合成酶, EC 2.5.1.6; Cantano, 1953, J Biol. Chem. 1953, 204:403-16) 催化的反应。本发明一方面,对 MHT 表达细胞进行修饰以通过内源 SAM 合成酶的过表达或引入异源 SAM 合成酶来提高 SAM 合成酶的活性。SAM 合成酶 (SAMS) 基因包括如大肠杆菌 (E. Coli) 的原核生物中的 metK (登录号:NP_289514.1), 酿酒酵母 (S. Cerevisiae) 中的 samlp (登录号:NP_010790.1) 或 sam2p 或拟南芥 (Arabidopsis) 中的 MT03 (登录号:NP_188365.1)。可以在组成型或诱导型启动子的控制下,通过引入异源 SAMS 基因或引入宿主生物 SAMS 基因的另外的拷贝使 SAMS 在细胞中过表达。例如, Yu et al, 2003, Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 35:127-32 中说明了通过酿酒酵母 (S. cerevisiae) SAM 合成酶 2 基因在巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris) 中的过表达提高了 SAM 的产量。如以下所讨论的 (3.8 节), 对特定基因的参考是用于说明而不是限制。应理解,生物与生物之间基因的名称不同并且以上对基因名称的引用不旨在限制,而旨在涵盖具有相同酶活性的同源基因、直系同源基因 (orthologs) 和变体。

[0086] 3.1.2 提高 SAM 的循环

[0087] 如上所示,卤代甲烷转移酶催化 SAM 向 S-腺苷高半胱氨酸的转化。S-腺苷高半胱氨酸通过 SAM 生物合成途径“循环”回到 SAM。因此,可以通过提高该途径中酶的水平 and / 或活性来提高 SAM 的产量或水平。该类酶的实例包括 SAM-依赖性甲基酶 (EC 2.1.1)、甲硫氨酸合成酶 (EC 2.1.1.13 或 EC 2.1.1.14) 和 N⁵-甲基-四氢蝶酰三谷氨酸盐-高半胱氨酸甲基转移酶 (例如,酵母 MET6)。作为甲基化代谢的关键酶, S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶 (SAH1) 使起到所有 AdoMet 依赖性甲基转移酶的强竞争性抑制剂作用的 S-腺苷-L-高半胱氨酸分解代谢。

[0088] 应理解生物与生物之间基因名称不同,并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0089] 3. 1. 3SAM 利用途径的削弱

[0090] 卤代甲烷产生生物中的各种代谢途径导致游离 SAM 的胞内水平下降 (SAM 利用途径)。为了有利于或提高卤代甲烷的生产,可以降低参与 SAM 利用途径的一种或多种酶的含量和 / 或生物活性。

[0091] 可以通过抑制以降低 SAM 利用的基因的实例包括 S- 腺苷甲硫氨酸脱羧酶 (对应于大肠杆菌 (*E. coli*) 基因 *speD*)。其它实例包括胱硫醚 β - 合成酶、核酮糖 5- 磷酸酯 3- 表异构酶、葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶、L- 丙氨酸转氨酶、3', 5' - 二磷酸核苷酸酶、甘氨酸羟甲基转移酶 (可逆的, 线粒体酶)、甘氨酸羟甲基转移酶 (可逆的), 对应于酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 基因 *CYS4*、*Rpe1*、*Zwf1*、*Alt*、*Met22*、*Shm1-m* 和 *Shm2*。

[0092] 应理解,生物与生物之间基因名称不同,并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0093] 3. 1. 4SAM 转运基因的过表达

[0094] 在一种方法中,在细胞中表达或过表达了参与 SAM 从胞外环境向细胞转运的 SAM 转运蛋白。实例包括酵母 *Sam5p* 蛋白和同源物,如 GenBank ID No. BC037142 (小家鼠 (*Mus musculus*))、AL355930 (粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*))、AE003753 (果蝇 (*Drosophila melanogaster*))、Z68160 (秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditiselegans*)) 和 SLC25A26 (人)。参见 Marrobio et al, 2003, EMBO J. 22 :5975-82; and Agrimi et al, 2004, Biochem. J. 379 : 183-90。

[0095] 应理解生物与生物之间基因名称不同,并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0096] 3. 2. 甲硫氨酸生物合成途径

[0097] 可以通过使用具有高甲硫氨酸合成效率的微生物来提高 SAM 的生物合成以及相应的卤代甲烷的生产。一般说来,导致甲硫氨酸合成的基本代谢途径是熟知的 (参见,例如,Voet and Voet, 1995, "Biotechnology", 2nd edition, Jon Wiley & Sons, Inc.; Rückert et al, 2003, J. of Biotechnology 104, 213-228; and Lee et al, 2003, Appl. Microbiol. Biotechnol., 62 :459-67)。这些途径通常受到各种机制 (如反馈控制) 的严格调控。(参见,例如,Neidhardt, 1996, *E. coli* and *S. lyphimurium*, ASM Press Washington)。因此,相关基因的表达或抑制,或相应基因产物水平和 / 或活性的提高可以导致甲硫氨酸产量的提高。

[0098] 3. 2. 1 甲硫氨酸生物合成酶

[0099] 可以表达或上调的基因包括参与甲硫氨酸生物合成的那些基因。PCT 公开 WO 02/10209 说明了为提高甲硫氨酸产量而对某些基因过表达或抑制,该专利以其整体作为参考并入。甲硫氨酸生物合成酶的实例包括 O- 乙酰 - 高丝氨酸硫化氢解酶 (*metY*) 和 O- 丁二酰 - 高丝氨酸硫化氢解酶 (*metZ*)。其它基因包括亚甲基四氢叶酸还原酶 (*MetF*) ; 天冬氨酸激酶 (*lysC*) ; 高丝氨酸脱氢酶 (*horn*) ; 高丝氨酸乙酰基转移酶 (*metX*) ; 高丝氨酸琥珀酰转移酶 (*metA*) ; 胱硫醚 γ - 合成酶 (*metB*) ; 胱硫醚 β - 裂解酶 (*metC*) ; 维生素 B₁₂- 依赖性甲硫氨酸合成酶 (*metH*) ; 非维生素 B₁₂- 依赖性甲硫氨酸合成酶 (*metE*) ; N^{5,10}- 亚甲基 - 四氢叶酸还原酶 (*metF*) 和 S- 腺苷甲硫氨酸合成酶 (*metK*)。

[0100] 对甲硫氨酸反馈抑制有耐受性的这些酶的变体可以进一步提高卤代甲烷的产量。

在 WO 07/011939 and Park et al, 2007, MetabEng. 9 :327-36 中说明了一些该类变体, 以上参考文献以其全部作为参考并入。举例来说, 可以在诸如大肠杆菌 (*E. coli*) 和棒状杆菌 (*Corynebacterium*) 的原核生物中通过使如 *metY*、*metA*、*metB*、*metC*、*metE* 和 / 或 *metH* 的基因过表达或另外地提高它们的基因产物的水平或活性来提高卤代甲烷的产量。类似地, 降低阻遏蛋白基因的水平或削弱其活性可以提高卤代甲烷的产量 (例如, *metJ* 或 *metD* (*McbR*) 基因编码的阻遏物, 其阻遏了甲硫氨酸合成的相关基因, 如 *metB*、*metL* 和 *metF*)。参见, Rey et al, 2003, J. Biotechnol., 103 :1-65 ; Nakamori et al, 1999, Applied Microbiology and Biotechnology 52 :179-85 ; WO 02/097096 ; 每篇文献以其整体作为参考并入)。

[0101] 应理解生物与生物之间基因名称不同, 并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0102] 3.2.2 甲硫氨酸生物合成前体

[0103] 也可以通过改变提供其它前体的那些途径的通量来提高甲硫氨酸合成, 所述其它前体的实例包括不同氧化态的硫原子、诸如氨的还原态氮、包括 C1- 碳源 (如丝氨酸、甘氨酸和甲酸盐) 的碳前体、甲硫氨酸的前体和在 N5 和 / 或 N10 用碳取代的四氢叶酸的代谢物。另外, 例如, 还原等价形式的能量 (如 NADH、NADPH 或 FADH₂) 可以参与产生甲硫氨酸的途径。

[0104] 例如, 可以通过提高参与硫酸盐同化、半胱氨酸生物合成和丁酮二酸盐向天冬氨酸半醛转化的基因产物的水平和 / 或活性来提高卤代甲烷的产量。基因的实例包括 L- 半胱氨酸合成酶 (*cysK*)、NADPH 依赖性亚硫酸还原酶 (*cysI*) 和烷基磺酸盐单加氧酶 (*ssuD*)。

[0105] 提高丝氨酸的水平也可以导致甲硫氨酸产量的提高。因此, 可以针对参与丝氨酸代谢或转运的蛋白对生物进行修饰。参与丝氨酸合成的酶包括 D-3- 磷酸甘油酸脱氢酶 (*SerA*)、磷酸丝氨酸磷酸化酶 (*SerB*) 和磷酸丝氨酸转氨酶 (*SerC*)。参见 WO 07/135188, 该专利以其整体作为参考并入。可以修饰参与丝氨酸合成的酶以降低或防止丝氨酸反馈抑制。

[0106] 类似地, 可以提高参与丝氨酸向甲基四氢叶酸转化的一种或多种酶的水平 and / 或生物活性。这些基因包括丝氨酸羟甲基转移酶 (*SHMT*) 和亚甲基四氢叶酸还原酶 (*metF*)。

[0107] 类似地, 可以降低参与丝氨酸降解为丙酮酸盐 (例如, 丝氨酸脱水酶, *sdaA*) 或参与丝氨酸从细胞输出 (例如, *ThrE*) 的一种或多种酶的含量和 / 或生物活性。

[0108] 应理解生物与生物之间基因名称不同, 并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0109] 3.2.3 甲硫氨酸吸收

[0110] 可以修饰细胞中控制甲硫氨酸吸收的基因以提高卤代甲烷的产量。例如, 大肠杆菌 (*E. coli*) 中的 *MetD* 位点编码了腺苷三磷酸酶 (*metN*)、甲硫氨酸透性酶 (*metI*) 和底物结合蛋白 (*metQ*)。这些基因的表达受 L- 甲硫氨酸和 *MetJ* (甲硫氨酸调节子的常见阻遏物) 的调控。已知多种其它物种中的直系同源物 (orthologs), 如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)、弧菌属 (*Vibrio*)、嗜血菌属 (*Haemophilus*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*) 和布氏菌属 (*Brucella*)。参见, 例如, Merlin et al, 2002, J. Bacteriology 184 :5513-17. et al, 2003, EMBO J. 22 :5975-82 ; and Agrimi et al, 2004, Biochem. J. 379 :183-90。

[0111] 应理解生物与生物之间基因名称不同,并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0112] 3.3 提高胞内卤化物浓度

[0113] 还可以通过提高 MHT 表达细胞中胞内卤化物浓度来提高卤代甲烷的产量。这可以通过多种方式实现,例如,通过引入或提高一种或多种卤化物转运子的水平和 / 或活性,和 / 或提高培养基中卤化物浓度。实例包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Gef1、大肠杆菌 (*E. coli*) (P37019) 和集胞藻 (*Synechocystis*) (P74477) 的 EriC。

[0114] 应理解生物与生物之间基因名称不同,并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0115] 3.4 提高 ATP 水平

[0116] 还可以通过提高卤代甲烷合成活性来提高卤代甲烷的产量,而卤代甲烷合成活性可以通过提高 ATP 的胞内浓度和 / 或可用性得以提高。

[0117] 应理解生物与生物之间基因名称不同,并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0118] 3.5 削弱卤代甲烷利用

[0119] 可以降低卤代甲烷利用酶的活性和 / 或水平。这些酶包括 *cmu* 基因簇中的酶,如 *cmuC*、*cmuA*、*orf146*、*paaE* 和 *hut1*。其它的酶包括细菌的 10- 甲酰 -H₄ 叶酸水解酶、5,10- 亚甲基 -H₄ 叶酸还原酶和 *purU* 和类咕啉酶,如卤代甲烷 :二硫化物 / 卤离子甲基转移酶。

[0120] 应理解生物与生物之间基因名称不同,并且以上对基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。

[0121] 3.6 表达 MHT 的重组酵母

[0122] 我们已观察到使用酵母作为 MHT 表达细胞会导致特别高的卤代甲烷产率。参见实施例 10。一方面,本发明提供了重组酵母细胞,其包含编码 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM) 依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的异源基因。如在本文其它处所讨论的,可以在酵母中表达的 MHT 蛋白的实例包括来自盐草 (*Batis maritima*)、肿块伯克氏菌 (*Burkholderia phymatum*)、细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)、芜菁 (*Brassica rapa*)、甘蓝 (*Brassica oleracea*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、钩端螺菌属 (*Leptospirillum*)、新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、稻 (*Oryza sativa*)、金牛蛎球菌 (*Ostreococcus tauri*)、芳族脱氯单胞菌 (*Dechloromonas aromatica*)、灰盖鬼伞 (*Coprinopsis cinerea*)、(Robiginitalea bofirmata)、马氏海洋杆状菌 (*Maricaulis maris*)、黄杆菌 (*Flavobacterium bacterium*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 或嗜盐嗜盐红螺菌 (*halorhodospira halophila*) 的那些。如在本文其它处所讨论的,适合的重组酵母细胞的实例包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 和粟酒裂殖酵母 (*Scizosacchomyces pombe*) 等。在本领域中,酵母的培养和基因操纵方法是熟知的。

[0123] 3.7 使用靶结构域提高酵母中的产量

[0124] 异源卤代甲烷转移酶 (例如,盐草 (*Batis maritima*) MCT) 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的表达会导致卤代甲烷的生产 (例如,碘甲烷)。通过

使用肽信号将酶靶向液泡显著地提高了产率。参见以下的讨论。不旨在限制于特定的机制,据信产量的提高是由于 (i) 大多数细胞 SAM 在液泡中聚集 (隔离, sequestration) (Farooqui et al, 1983, Studies on compartmentation of S-adenosyl-L-methionine in *Saccharomyces cerevisiae* and isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 757 : 342-51), 和 (ii) 卤离子在液泡中聚集 (Wada et al, 1994, Chemiosmotic coupling of ion transport in the yeast vacuole: its role in acidification inside organelles. *J Bioenerg Biomembr* 26 : 631-7) 所引起的。

[0125] 一个肽信号是已知将悬挂蛋白 (pendant protein) 靶向酵母液泡的羧肽酶 Y 的 N 末端肽结构域,但是也可以使用其它靶肽。参见,例如, Valls et al, 1990, Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *J Cell Biol* 111 : 361-8; and Tague et al, 1987, "The Plant Vacuolar Protein, Phytohemagglutinin, Is Transported to the Vacuole of Transgenic Yeast", *J. Cell Biology*, 105 : 1971-1979; Tague et al, 1990, "A Short Domain of the Plant Vacuolar Protein Phytohemagglutinin Targets Invertase to the Yeast Vacuole", *The Plant Cell*, 2 : 533-546 和美国专利 No. 6054637, 以上所有文献作为参考并入本文。

[0126] 在一种方法中,为了说明而非限制,合成了盐草 (*B. maritima*) 氯甲烷转移酶 (MCT) 的编码序列并在 tet⁻ 阻遏性 CYC 启动子 (plasmid pCM190, Gari et al, 1997, yeast 13 : 837-48) 的控制下克隆到高拷贝载体中。将 MCT 编码序列融合到来自已知将悬挂蛋白靶向酵母液泡的羧肽酶 Y 的 N 末端肽结构域 (氨基酸序列 : KAISLQRPLGLDKDVL, Valls et al, 1990, *J Cell Biol*. 111 : 361-8)。将该表达系统转化到酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 菌株 W303a 中。将携带 MCT 表达载体的酵母在冷冻保存 (15% 的甘油) 的尿嘧啶缺陷型板上划线并生长 48 小时。将各个菌落接种到 2mL 合成的完全尿嘧啶缺陷型培养基上并在 30°C 生长过夜。接着,将培养物接种到 100mL 新鲜合成的完全尿嘧啶缺陷型培养基上并生长 24 小时。将细胞旋转离心并在加入 2% 葡萄糖和 100mM 碘化钠盐的新鲜 YP 培养基中浓缩至高细胞密度 (OD 50)。将 10mL 该浓缩的培养物等分到 14mL 培养管中并用橡皮塞密封。在 30°C, 以 250rpm 的转速振荡使培养物生长,并在指定的间隔通过气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) 测定碘甲烷的产量。气相色谱-质谱联用系统由 6850 系列 II 型网络化气相色谱系统 (Agilent) 和 5973 型网络化质量选择系统 (Agilent) 组成。温箱温度程序化地从 50°C (1 分钟) 升高到 60°C (10°C / 分钟)。用注射器穿过橡皮塞吸取 100 微升培养物顶部空间并手动进样到气相色谱-质谱联用系统,从而测量了碘甲烷的产量。

[0127] 如以下所讨论的 (实施例 10), 使用如上所述的方法,我们使用羧肽酶 Y 肽将盐草 (*B. maritima*) MHT 靶向酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 菌株 W303a 的液泡,并测定了从葡萄糖生产的碘甲烷 (图 9A)。酵母对葡萄糖表现出高活性 (图 9B) 并且与天然来源几天的倍增时间相比,表现出正常的生长速率 (约 90min 的倍增时间)。通过与标准品比较,将来自葡萄糖的碘甲烷的产率测量为 4.5g/升-天,这是最好的天然来源的约 10000 倍 (图 9C)。

[0128] 更一般地,应理解可以使用将参与代谢过程的其它酶靶向液泡以提高产量。具体地,可以通过这种靶向作用提高底物为 SAM 和 / 或卤化物的反应的产率。例如,可以通过使用 SAM 的代谢途径生产乙烯 (参见,例如,美国专利 No. 5416250, 其以参考形式并入本文)。在表达 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 合成酶 (参见, Wilson et al, 1993, Apple

ripening-related cDNA clone pAP4 confers ethylene-forming ability in transformed *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant physiol.* 103:783-8, 以参考形式并入本文) 和乙烯形成酶 (EFE, 参见 McGarvey et al, 1992, Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J Biol Chem.* 267(9):5964-7) 的酵母 (例如, 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 中, 可以通过将这些酶靶向液泡来提高乙烯的产量。

[0129] 3.7 组合

[0130] 通常, 本发明的方法利用了多个不同位点 (例如, 至少 2 个, 有时至少 3 个, 有时至少 4 个和有时为 5 个或 5 个以上) 选择或修饰的细胞以提高卤代甲烷的产量。细胞可以具有另外的基因修饰以有利于它们在特定原料上生长和提供抗生素抗性等。在一些实施方式中, 可以进一步对以不同目的开发的菌株进行修饰以满足本发明的需要。参见, 例如, He et al, 2006, "A synergistic effect on the production of S-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of S-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine-beta synthase", *J Biotechnol.* 126:519-27. Park et al, 2007, "Characteristics of methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain" *Metab Eng.* 9:327-36 中说明了对谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) 进行基因操纵以提高甲硫氨酸的产量。该菌株携带了下调的 (deregulated) *hom* 基因以消除苏氨酸对高丝氨酸脱氢酶的反馈抑制而 *thrB* 基因的缺失消除了苏氨酸的合成。又如所讨论的, 可以通过用选择方法代替重组技术获得修饰的菌株, 其中可以针对甲硫氨酸的过量生产对生物进行诱变和筛选。已经从包括大肠杆菌 (*E. coli*) 和酵母在内的多种生物中分离出了高产菌株。参见, 例如, Alvarez-Jacobs et al, 2005, *Biotechnology Letters*, 12:425-30; Dunyak et al, 1985, 21:182-85; Nakamori et al, 1999, *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:179-85。

[0131] 出于说明而非限制的目的, 可以使用下列示例性组合。指定特定的修饰并不排除其他修饰的存在:

[0132] a) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高通过 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 生物合成途径的通量。在一种实施方式中, 通过提高 SAM 合成酶 (它可以是异源的或内源的) 的表达来提高通过 SAM 生物合成途径的通量。在一种实施方式中, 使 *metK* 基因或同源基因过表达。在一种实施方式中, 使 *sam1p* 和 / 或 *sam2p* 基因或同源基因过表达。参见上述 3.1.1 节。

[0133] b) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高通过 SAM "循环" 途径的通量。在一个实施方式中, 提高了 SAM-依赖性甲基酶、甲硫氨酸合成酶、S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶 (例如, SAH1) 和 N⁵-甲基四氢蝶酰-三谷氨酸-高半胱氨酸甲基转移酶 (例如, MET6) 的活性。参见上述 3.1.2 节。

[0134] c) 异源 MHT 的表达和基因修饰以抑制通过 SAM 利用途径的通量。在一个实施方式中, 抑制了粪卟啉原 III 氧化酶、粪卟啉原 III 氧化酶、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶、胱硫醚 β -合成酶、核酮糖 5-磷酸酯 3-表异构酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、L-丙氨酸转氨酶、3', 5'-二磷酸核苷酸酶、甘氨酸羟甲基转移酶或甘氨酸羟甲基转移酶。在一个实施方式中, 抑制了 *CYS4*、*Rpe1*、*Zwf1*、*Alt*、*Met22*、*Shm1-m*、*Shm2*、*HEM 13* 或 *hemF* 基因。参见上述 3.1.3 节。

[0135] d) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高甲硫氨酸生物合成。参见上述 3.2.1 节。

[0136] e) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高参与硫酸盐同化、半胱氨酸生物合成和 / 或丁酮二酸盐向天冬氨酸半醛转化的基因产物的活性。在一些实施方式中, L- 半胱氨酸合成酶 (例如, cysK)、NADPH- 依赖性亚硫酸还原酶 (例如, cysI) 或烷基磺酸盐单加氧酶 (例如, ssuD) 过表达。参见上述 3.2.2 节。

[0137] f) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高胞内 ATP 水平。参见上述 3.4 节。

[0138] g) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高胞内丝氨酸水平。参见上述 3.2.2 节。

[0139] h) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高甲硫氨酸的吸收。参见上述 3.2.3 节。

[0140] i) 异源 MHT 的表达和基因修饰以提高胞内卤化物浓度。参见上述 3.3 节。

[0141] j) 异源 MHT 的表达和基因修饰, 其降低了除用于卤代甲烷合成外的卤化物的利用。参见上述 3.5 节。

[0142] k) (a)-(j) 的组合, 如 a+b、a+c、a+d、a+e、a+f、a+g、a+h、a+i、a+j、b+c、b+d、b+e、b+f、b+g、b+h、b+i、b+j、c+d、c+e、c+f、c+g、c+h、c+i、c+j、d+e、d+f、d+g、d+h、d+i、d+j、e+f、e+g、e+h、e+i、e+j、f+g、f+h、f+i、f+j、g+h、g+i、g+j、h+i 或 h+j。

[0143] 1) 除细胞表达或过表达内源 MHT 而非异源 MHT 外, 以上 (a)-(k) 中存在的修饰。

[0144] 3.8 同源物、直系同源物和变体

[0145] 应理解生物与生物之间基因名称不同, 并且以上对上述基因名称的引用不旨在限制而旨在涵盖具有等价活性的同源基因。此外, 在所述方法需要活性过表达的情况下, 只要过表达的蛋白具有适当的活性并可以在宿主中表达, 则编码的蛋白不需要与天然存在的形式一致。在某些实施方式中, 本发明包括酶活性多肽的使用, 其具有与以上所述的已知蛋白至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 的同一性。

[0146] 4. 重组技术

[0147] 可以通过基因工程技术或使用经典微生物学技术 (如化学或紫外线诱变以及随后筛选) 来实现基因修饰。重组修饰和经典筛选技术的组合可以用于产生所关心的生物。使用重组技术, 可以导致在该生物或在培养物中卤代甲烷产率提高的方式使核酸分子引入、缺失、抑制或修饰。在本领域中, 原核生物和真核生物的基因操纵方法是熟知的。因此, 仅简要地说明了这些方法。一般地, 公开了一些培养和基因工程技术, 例如, 在 Sambrook et al, 1989, MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL, ColdSpring Harbor Laboratory Press; Sambrook 和 Russell, 2001, MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, ColdSpring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al, 2002, SHORTPROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons; Tuan, R. S., 1997, RECOMBINANT GENE EXPRESSIONPROTOCOLS, Humana Press; Ball, A. S., 1997, BACTERIAL CELL CULTURE :ESSENTIAL DATA, John Wiley&Sons; Richmond, A., 2003, HANDBOOK OF MICROALGAL CULTURE, Wiley-Blackwell; Becker, E. W., 1994, "MICROALGAE BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY, Cambridge University Press; Guthrie and Fink, 2004, GUIDE TO YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, Academic Press; and Walker, G. M., 1998, YEAST PHYSIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, John Wiley&Sons 中, 以上每篇文献出于各种目的作为参考并入本文。

[0148] 在实验室和工业规模, 由重组细胞产生的重组蛋白或产物的表达和富集是熟知的并在文献中广泛讨论。对于工业级的生产, 可以使用大型生物反应器 (参见, 例如, McKetta,

J., "CHEMICAL PROCESSING HANDBOOK, 1993, Marcel Dekker; Lee, S., ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL PROCESSING, 2006, Taylor and Francis Group; Asenjo, J., BIOREACTOR SYSTEM DESIGN, 1995, Marcel Dekker; Nielsen, J., BIOREACTION ENGINEERING PRINCIPLES, 2003, Kluwer Academics; Crow et al, Process for manufacturing methyl chloride, 美国专利 No. 6111153; Van't Riet and Tramper, 1991, BASIC BIOREACTOR DESIGN, CRC Press; Asenjo and Merchuk, 1995, BIOREACTOR SYSTEM DESIGN, CRC Press)。

[0149] 4.1 重组基因的表达

[0150] 可以实现或提高有助于卤代甲烷生产的基因表达, 和/或相应基因产物(mRNA 和/或蛋白质)的存在、水平和/或活性。可以通过引入指导基因产物在宿主细胞中表达的重组构建体, 或通过改变内源基因产物表达的基础水平(例如, 通过诱导其转录或使其去阻遏, 或提高诸如 mRNA 和/或蛋白质的基因产物的转运、稳定性和/或活性)来实现过表达。非内源核酸序列的密码子优化也可以提高翻译效率。

[0151] 可以通过, 例如, 将克隆基因保持在复制型载体中或通过将克隆基因整合到生产生物的基因组中实现克隆基因的稳定引入。实例包括多拷贝质粒、转座子、病毒载体或 YAC。所述载体可以包含复制原点, 如 PSC101、BAC、p15a 或 ColE1(原核生物)或 ARS(酵母)或 SV40 原点(真核生物)。

[0152] 可以用于产生所需蛋白质的表达载体可以包括以下的可操作连接:(1) 编码用于将表达载体保持在宿主细胞中的原点的 DNA 元件;(2) 控制转录起始的 DNA 元件, 如启动子;(3) 控制转录本加工的 DNA 元件, 如转录终止子和(4) 可选地, 编码可选择标志物(如抗生素抗性)的基因。

[0153] 在所需的原核或真核生物中起作用的启动子的控制下, 放置待表达的序列。根据具体应用, 多种启动子是熟知的并且可以使用。本发明涵盖了诱导型和组成型启动子。诱导型启动子包括受阿拉伯糖(PBAD); IPTG(PTRC)、卤盐(例如, 氯化钠)、渗透压、糖、淀粉、纤维素或光诱导的那些启动子。

[0154] 如实施例 4 所示, 细菌中使用 IPTG 诱导型启动子的卤代甲烷的产量在表达诱导后 1-2.5 个小时内提高到峰值水平。

[0155] 通过将基因可操作地连接至天然或异源转录控制元件上可以提高基因的表达。可以通过使用合成操纵子、核糖体结合位点、转录终止位点等进行该操作。在本领域中, 多种原核和真核表达控制序列是已知的。参见, 例如, WO 06/069220, 以其整体作为参考并入。编码重组核糖体结合位点的序列的实例为 ATTAAGAGGAGAAATTAAGC。

[0156] 可以通过在不改变合成蛋白质的氨基酸序列的情况下将该生物翻译系统非优选的克隆基因内的任何密码子改变为优选密码子从而对特定宿主物种中的蛋白质表达优化重组序列。密码子优化可以提高重组基因的翻译。可选地, 可以改变基因的 DNA 序列从而使得与野生型 DNA 序列之间的差异最大化, 例如, 以避免宿主细胞调控蛋白调控该基因的可能性。

[0157] 4.2 基因的阻遏、抑制或缺失

[0158] 可以消除或减少倾向于限制、调节或降低卤代甲烷产量或相应基因产物(mRNA 和/或蛋白质)的存在、水平和/或活性的基因表达。可以通过使基因完全或部分失活、抑制、缺失、中断、封闭或下调导致基因和/或基因产物的表达和/或功能降低的基因修饰。例如,

可以通过基因“敲除”、失活、突变、缺失或反义技术实现这一过程。可以使用本领域已知的方法实现基因敲除,包括可商购的试剂盒,如“TargeTron 基因敲除系统”(Sigma-Aldrich)。可以从大肠杆菌 (*E. coli*) 基因组计划 (www.genome.wisc.edu) 中获得具有各个基因敲除的大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株。本发明包括多个敲除,例如,在相同生物中的 2-6 个基因。本发明还包括基因引入、缺失或修饰的任意组合。

[0159] 5. 培养 / 发酵培养基和条件

[0160] 在本文中术语“培养”和“发酵”可替换使用以表示 MHT 表达细胞在液体培养基中,在生产卤代甲烷的条件下(有氧或无氧)的培养。用于生产卤代甲烷的生长培养基很大程度上取决于宿主生物。多种原核生物和真核生物通常在实验室或工业环境中使用的适合的生长条件是已知的并在科学文献中有所说明。参见,例如, Ball, A. S., 1997, BACTERIAL CELL CULTURE :ESSENTIAL DATA, JohnWiley&Sons ;Richmond, A., 2003, HANDBOOK OF MICROALGALCULTURE, Wiley-Blackwell ;Becker, E. W., 1994, MICROALGAE : BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY, Cambridge University Press ;and Walker, G. M., 1998, YEAST PHYSIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, John Wiley&Sons, 以上每篇文献出于所有目的作为参考并入本文。可以使用本领域已知技术确定优化培养条件的方法。

[0161] 营养或培养基将包含碳源、卤化物源和营养物。培养基还应含有适量的氮和硫源,例如,以一种或多种硫酸盐(如硫酸铵)和 / 或硫代硫酸盐的形式。培养基还可以含有维生素,如维生素 B12。用于细菌(如大肠杆菌 (*E. coli*))的一种适合的培养基为 Luria-Bertani (LB) 肉汤培养基。

[0162] 代谢含碳底物以提供卤代甲烷的甲基部分。还可以代谢碳化合物以提供驱动卤代甲烷生产的能量。底物包括诸如石油和 / 或天然气的含碳化合物、碳水化合物,其中的碳可以被所选生物代谢的形成存在。碳水化合物的实例包括单糖、诸如葡萄糖、果糖或蔗糖的糖类、寡糖、诸如淀粉或纤维素的多糖和一碳底物或它们的混合物,例如,以原料形式存在。二氧化碳也可以用作碳源,特别是使用诸如藻类的光合生物时。可以使用的常见含碳原材料包括,但不限于,木屑、蔬菜、生物质、排泄物、动物粪便、燕麦、小麦、玉米(例如,玉米秸秆)、大麦、蜀黍、小米、大米、黑麦、高粱、马铃薯、甜菜、芋头、木薯、水果、果汁和甘蔗。柳枝稷 (*Panicum virgatum*)、象草 (*Miscanthus giganteus*)、甘蔗渣、白杨、玉米秸秆和其它专用能量来源作物。根据所选生物的不同,最适底物的选择将有所不同。如上所述,当使用纤维素材料作为碳源时,可以使用诸如欧文氏菌属 (*Erwinia*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*) 和黑曲霉 (*Aspergillus Niger*) 的生物。大肠杆菌 (*E. coli*) 和酵母 (*Saccharomyces*) 是可以用于代谢淀粉和甘蔗的生物的实例。类似地,诸如藻类(例如,小球藻属 (*Chlorella*) 和原壁菌属 (*Prototheca*)) 的光合生物可以代谢如 CO₂ 的碳源。参见, Schmid, R. D., 2003, POCKET GUIDE TO BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING, John Wiley&Sons。可选地,可以在加入到培养基之前混合或粉碎纤维素原料。

[0163] 除了各种基因修饰之外,可以通过优化生长培养基的组成来提供卤代甲烷的产量。如所提到的,还可以通过提高 SAM 生物合成中的一种或多种反应物或前体(如卤化物、甲硫氨酸、SAM) 和中间体的胞内浓度来提高卤代甲烷的产率。使用富含甲硫氨酸、丝氨酸和 / 或卤化物的培养基可以提高卤代甲烷的产量。在某些实施方式中,培养基中甲硫氨酸

的浓度为约 0.5gm/L 至约 10gm/L。在其它实施方式中,培养基中丝氨酸的浓度为约 0.5gm/L 至约 10gm/L。

[0164] 向培养基中添加卤盐可以提高胞内卤化物浓度。卤盐包括钠、钾、镁等的氯化物、碘化物或溴化物。如以下在实施例 5 中所示,卤代甲烷的产量随卤化物的原子量而升高。因此,在某些情况下,碘化物的产率可以比溴化物的好,而相应地,溴化物的产率趋于比氯化物的好。如实施例 5 所示,可以通过调节培养基中卤化物的浓度来提高卤代甲烷的产量。培养基的最佳摩尔渗透压浓度通常为约 0.01 至 1M,通常为约 0.05 至 0.3,如约 0.1M。根据本发明的指导,技术人员可以凭经验确定所选卤盐的最佳浓度。以 NaCl 的使用为例,本发明计划使用约 0.01 至 0.1M 的 NaCl,通常使用约 0.05 至 0.5M,例如约 0.1M,如 0.085M 的 NaCl。诸如 Luria-Bertani (LB) 肉汤培养基 (0.171M 的 NaCl) 的培养基是适合的。也可以使用各种反离子 (接近约 0.16M) 制备 LB 肉汤培养基。例如,在由 5g/L 酵母提取物、10g/L 胰蛋白胍和 0.5g/L 的 NaCl 制备的 LB 肉汤培养基中可以补充 16.7g/L 的 NaBr 或 24.4g/L 的 NaI。

[0165] 也可以通过,例如,提供富含丝氨酸的营养源以提高丝氨酸的水平从而导致甲硫氨酸产量的提高。参见,例如,WO 07/135188,以其整体作为参考并入。

[0166] 可以在有助于卤代甲烷生产的条件下维持或培养所述生物。多个参数可以影响卤代甲烷的生产,如顶部空间比、生长期和氧含量。

[0167] 本发明设计了所述生物处于静止期或指数 (log) 期的培养条件。静止期通常适合于卤代甲烷的生产。类似地,本发明还涵盖了培养物的有氧和无氧生长。有时,有氧生长是适合的。有时,可以提高细胞密度 (并且相应也提高了营养物质浓度) 而不损害卤代甲烷的生产。一些宿主细胞维持在高温 (例如,37°C) 并具有搅拌的条件下。在一种方法中,使用了固态发酵 (参见, Mitchell 等, SOLID-STATE FERMENTATION BIOREACTORS), 2006, Springer。部分根据生物和菌株,可以选择有氧或无氧条件。

[0168] 根据本发明,使用亨利定律 (Henry's law) 可以优化单位液体培养基体积的顶部空间气体 (空气) 比。已确定最佳比一般为约 0.5 : 1 至 4 : 1,例如约 2 : 1。

[0169] 通常以工业规模生产使用本发明方法生产的卤代甲烷和非卤化有机分子,例如,生产适合作为石油代用品的生物燃料。因此,在一些实施方式中,可以在具有至少 10 升、至少 50 升、至少 100 升或至少 500 升液体容积的生物反应器中培养包含 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性卤代甲烷转移酶 (MHT) 的生物。例如,生物反应器的液体容积通常为至少 1000 升、至少 5000 升或至少 10000 升。在本发明的培养物中,培养基的体积通常为至少 10 升、至少 25 升、至少 50 升、至少 100 升、至少 500 升、至少 1000 升或至少 5000 升。可以作为分批发酵、在连续培养生物反应器中或使用本领域已知的其它方法进行培养。

[0170] 5.1 酵母和纤维素分解细菌的共培养

[0171] 另一方面,本发明提供了使用纤维素原料作为唯一或主要碳源生产任意多种生物或有机产物的方法。根据该方法,制备了包含叶肉纤维素分解细菌 (例如,发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*)) 和重组酵母 (例如,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 的共培养。将纤维素 (例如,纤维素、微晶纤维素、Avicel、纤维素原料) 作为能量来源提供给该共培养物。在本文涉及纤维素的地方,据考虑在某些实施方式中半纤维素和 / 或木质素 (其它生物物质组分) 可以与纤维素一同使用或代替纤维素使用。通常,如本文所述,使用粗纤维素原

料或部分处理的纤维素原料。然后,纤维素被细菌代谢以产生作为酵母碳源的产物。因此,重组酵母能够在提供纤维素的共培养中进行代谢过程。在一些实施方式中,细菌-酵母共培养维持在有氧条件下。在一些实施方式中,细菌-酵母共培养维持在无氧条件下。

[0172] 在一些实施方式中,该共培养为共生共培养。共生共培养是其中酵母的碳源依赖于细菌(即,以作为细菌代谢废物的化合物形式),而细菌依赖于酵母对有毒废物的代谢的培养。即,在不存在酵母共生体的情况下细菌废物的累积会抑制该细菌的生长或生存力。因此,例如,(a) 代谢纤维素以产生乙醇并且(b) 生长受乙醇抑制的纤维素分解细菌与代谢乙醇的酵母可以用于共生共培养。如另一实施例,(a) 代谢纤维素以产生乙酸盐并且(b) 生长受乙酸盐抑制的纤维素分解细菌与代谢乙酸盐的酵母可以用于共生共培养。如另一实施例,(a) 代谢纤维素以产生乳酸盐并且(b) 生长受乳酸盐抑制的纤维素分解细菌与代谢乳酸盐的酵母可以用于共生共培养。这些实施例用于对本发明进行说明而非用于限制本发明。此外,就这一点来说,“依赖”不必须表示绝对的依赖性,而可以表示生物的生长或生存力在共培养中更高或更稳定。可以将共生细菌-酵母共培养描述为彼此制约的协作系统,其中每种生物的生存力均依赖于另一种生物。

[0173] 多种纤维素分解细菌适合在共培养中使用。有关对纤维素分解细菌的讨论,参见,例如, Lynd et al, 2002, “Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology”, Microbiol Mol Biol Rev. 66:506-77。在一些实施方式中,所述纤维素分解细菌为纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)或氨基酸球菌(*actinotalea*)种。作为说明而非限制,示例性纤维素分解细菌包括哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、潮湿纤维单胞菌(*Cellulomonas uda*)、产黄纤维单胞菌(*Cellulomonas flavigena*)、解纤维纤维单胞菌(*Cellulomonas cellulolyticum*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)和嗜热单孢菌(*Thermomonospora*)。能够将纤维素有氧发酵为乙醇、乙酸盐或乳酸盐的细菌很适合于共培养。能够将纤维素有氧发酵为琥珀酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐或苹果酸盐的细菌也很适合于共培养。在一些实施方式中,使用了能够将纤维素无氧发酵为乙醇、乙酸盐、乳酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐或苹果酸盐的细菌。可以重组修饰纤维素细菌(例如,掺入药物抗性标志物、修饰细胞中的合成途径等)。在一些实施方式中,根据纤维素的细菌代谢产物对生长的抑制(例如,乙醇、乙酸盐、乳酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐或苹果酸盐对生长的抑制)选择纤维素分解细菌。应理解表现出这种生长抑制的细菌对共生共培养特别有用。可以通过参考科学文献鉴别表现出这种生长抑制的纤维素分解细菌,或者可以在实验室中进行鉴别或筛选。在一些实施方式中,使用重组技术使特定的细菌类型或菌株对该抑制敏感。其它所需的特性包括快速生长、在有氧或无氧条件下生长的能力和分泌来源于纤维素的大量的碳的能力(例如,在有氧和无氧条件其中之一或两种状态下,至少约20%、优选地至少约40%、最优选至少约50%)。在一些实施方式中,该细菌不是乳酸杆菌种(*Lactobacillus*)。在一些实施方式中,该细菌不是马乳酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefirianofaciens*)。

[0174] 在一种实施方式中,该细菌为发酵氨基酸球菌。发酵氨基酸球菌(*A. fermentans*)可得自美国模式培养物保藏所(ATCC 43279)并且之前称为发酵纤维单胞菌(*Cellulomonas fermentans*)(参见, Yi et al, 2007, “*Demequina aestuarii* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the suborder Micrococccineae, and

reclassification of *Cellulomonas fermentans* Bagnara et al. 1985 as *Actinotalea fermentans* gen. nov., comb. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 1):151-6; 另外参见 Bagnara et al, 1987, "Physiological properties of *Cellulomonas fermentans*, a mesophilic cellulolytic bacterium." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:170-176, 1987)。发酵氨基酸球菌代谢纤维素以产生乙酸盐和乙醇。

[0175] 类似地, 可以使用多种酵母菌株和菌种。在一个实施方式中, 该酵母为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) (例如, 酿酒酵母 W303a)。在其它实施方式中, 使用了另一酵母种 (例如, 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、酵母 (*Sacharomyces*) 和粟酒裂殖酵母 (*Scizosacchomyces pombe*))。

[0176] 只要纤维素的细菌代谢产物可以用作酵母的能量来源和碳源, 那么该共培养可以包含纤维素分解细菌和酵母的任意组合。在一种实施方式中, 细菌对纤维素的代谢产生了分泌的乙酸盐和 / 或乙醇。纤维素细菌的其它终产物包括分泌的乳酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐、甲酸酯和其它有机分子 (通常具有 1-6 个碳原子)。

[0177] 在一种实施方式中, 所述纤维素细菌为发酵氨基酸球菌 (*A. fermentans*) 而所述酵母为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)。

[0178] 通常对所述酵母进行重组设计以产生所关心的产物。例如, 可以修饰酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 以表达盐草 (*Batis Maritima*) MHT。如实施例所述, 与通过工程设计以表达 MHT 的酵母共培养可以用于生产卤代甲烷。然而, 可以在多种其它应用中应用共培养。即, 给定经过重组修饰以产生所关心产物的任意酵母, 则可以在存在纤维素源和该酵母产生该产物所需的任何底物的情况下使用该酵母和纤维素细菌的共培养生产产物。酵母产物可以是药物、食品、氨基酸、辅因子、激素、蛋白质、维生素、脂肪、工业酶等。通过重组酵母生产的产物实例包括小分子药物 (参见, 例如, Ro et al, 2006 "Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast" *Nature* 440(7086):940-3); 石化预制品 (参见, 例如, Pirkov et al, 2008, "Ethylene production by metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Metab Eng.* 10(5):276-80); 商用或医用蛋白质 (参见, 例如, Gerngross et al, 2004, "Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi" *Nat Biotechnol*; 22(11):1409-14)。示例性医用蛋白质包括胰岛素、乙型肝炎抗原、地西卢定、来匹卢定 (*lepidurin*) 和高血糖素。有关其它实例, 请参见, Porro et al, 2005, "Recombinant protein production in yeasts" *Mol Biotechnol.* 31(3):245-59。可以通过本发明共培养中酵母产生的有商业价值的化合物的其它实例包括, 但不限于, 1,4 二酸 (琥珀酸、富马酸和苹果酸); 2,5 呋喃二羧酸; 3 羟基丙酸; 门冬氨酸; 葡萄糖二酸; 谷氨酸; 衣康酸; 乙酰丙酸; 3- 羟基丁内酯; 甘油; 山梨糖醇; 木糖醇 / 阿拉伯糖醇; 葡糖酸; 乳酸; 丙二酸; 丙酸; 三元酸 (柠檬酸和乌头酸); 木糖酸; 醋偶姻; 糠醛; 左旋葡聚糖; 赖氨酸; 丝氨酸; 苏氨酸、缬氨酸和 S- 腺苷甲硫氨酸。其它实例包括 3 甘油、3 羟基丙酸、乳酸、丙二酸、丙酸、丝氨酸; 4 醋偶姻、门冬氨酸、富马酸、3- 羟基丁内酯、苹果酸、琥珀酸、苏氨酸; 5 阿拉伯糖醇、糠醛、谷氨酸、衣康酸、乙酰丙酸、脯氨酸、木糖醇、木糖酸; 乌头酸、柠檬酸和 2,5 呋喃二羧酸。参见, Werpy et al, 2004 "TOP VALUE ADDED CHEMICALS

FROM BIOMASS VOLUME I-RESULTS OF SCREENING FOR POTENTIAL CANDIDATES FROM SUGARS AND SYNTHESIS GAS" published by Department of Energy Washington D.C.。另外,参见 Biomass Document Database at <http://www1.eere.energy.gov/biomass/publications.html>, 它们以其整体作为参考并入。对酵母进行基因修饰从而使其产生所需产品的方法在本领域中是已知的或者可以开发。

[0179] 一方面,本发明包括收集或富集由酵母细胞产生的所关心产物的其它步骤。在一个实施方式中,所关心的产物是分子量小于 1000 的小分子化合物。

[0180] 通常并且最方便地,使共培养的细菌和酵母组分在液体培养基中共同(混合)生长。然而,在一些实施方式中,可以(例如)将共培养的生物维持在通过渗透膜隔开的生物反应器的单独隔室中,所述渗透膜允许代谢产物和其它分子在隔室之间扩散。多种适合的生物反应器在本领域中是已知的。

[0181] 除可以添加的纤维素、半纤维素、木质素、生物质、原料等之外,共培养中使用的培养物或生长培养基将包含适量的氮和硫源,例如,以一种或多种硫酸盐(如硫酸铵)和/或硫代硫酸盐的形式。该培养基还可以含有维生素,如维生素 B12。可以使用 YP 培养基(10 克 Bacto- 酵母提取物(Difco)、20 克 Bacto- 蛋白胨(Difco),加入双蒸水(ddH₂O)至 900mL)。可以使用本领域已知的技术确定优化培养条件的方法。参见,例如, Ball, A. S., 1997, BACTERIAL CELL CULTURE: ESSENTIAL DATA, John Wiley & Sons; Richmond, A., 2003, (HANDBOOK OF MICROALGAL CULTURE, Wiley-Blackwell; Becker, E. W., 1994, MICROALGAE: BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY", Cambridge University Press; and Walker, G. M., 1998, YEAST PHYSIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, John Wiley & Sons.

[0182] 本发明提供了细菌-酵母共培养,其中所述细菌代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物,而所述酵母使用所述细菌的代谢产物作为碳源。在一些实施方式中,所述微生物适应共同生长并且维持相对恒定的物种种群比,从而使任一种微生物种群均不压倒另一种。在以下 5.1 节中所述的细菌-酵母共培养类型中,我们通常观察到细菌比酵母过量 100 倍(每毫升中有约 100 万个活酵母细胞和 1 亿个活细菌细胞)。

[0183] 5.1.1 表达 MHT 的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 的共培养

[0184] 与现有预制品 (building block) 分子相比,在酵母中生产碘甲烷具有几个优势,包括与工业过程的兼容性。然而,从来源于粮食作物的糖(如玉米和甘蔗)生产生物燃料和生物基预制品可以直接造成全球食品短缺。为了缓和这些问题,碘甲烷(及其它生物基分子)必须来源于纤维素原料,其包括“能量来源作物”,如柳枝稷 (*Panicum virgatum*) 和象草 (*Miscanthus giganteus*) 以及诸如玉米秸秆的农业废物。由于木质纤维材料能够耐受微生物的消化,因此这些真实世界的生物质来源向可发酵的糖和产物的转化存在问题。

[0185] 我们构建了 MHT- 表达酵母(如上所述)与叶肉纤维素分解细菌,发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 的共培养。发酵氨基酸球菌有氧地将纤维素发酵为乙酸盐和乙醇,而酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 能够将其作为碳源进行利用。重要的是,发酵氨基酸球菌的生长受乙酸盐和乙醇累积的抑制,从而在群落内产生代谢相互依赖性,即酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的碳源依赖于发酵氨基酸球菌,而发酵氨基酸球菌依赖酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 对有毒废物进行代谢(图 9A)。我们将酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 与发酵

氨基酸球菌接种到含有羧甲基纤维素作为唯一碳源的培养基上并测量酵母和细菌的菌落形成单位 (CFU) 随时间的变化。酵母在共培养中生长 36 小时后增加到 10^6 cfu/ml, 而无纤维素分解同伴的酵母表现出较少的生长 (图 9B, 左侧部分)。通过消耗有毒成分, 酵母的存在也提高了细菌的生长率 (图 9B, 右侧部分)。这种相互作用表明了共生的关系。

[0186] 我们接着测试了纤维素原料向碘甲烷的共培养转化。我们在含有粉碎的干燥柳枝稷作为唯一碳源的培养基上以低密度接种共培养物。在接种后的 36 小时, 向培养基中添加碘化钠以诱导碘甲烷的生产。图 9C 显示了各种纤维素源上碘甲烷的产率, 包括柳枝稷、玉米秸秆和白杨。添加乙酸盐作为非可发酵碳源的参照, 而添加羧甲基纤维素 (CMC) 作为纤维素标准品。与传统作物相比, 诸如柳枝稷的能量来源作物提供了几种优势, 如需要较少的农业输入和在边际耕地上生长, 或表现出优良的生长或遗传易处理性 (例如, 白杨)。诸如玉米 (*Zea mays*) 秸秆的农业残余物是纤维素碳的另一来源, 其中美国每年产生约 200mg 的秸秆。该结果表明可以从多种纤维素碳源生产碘甲烷。

[0187] 因此, 本发明提供了生产卤代甲烷的方法, 其包括将代谢纤维素并产生一种或多种代谢产物的第一微生物与不代谢纤维素并经过重组修饰以表达异源卤代甲烷转移酶蛋白的第二微生物在产生卤代甲烷的条件下在含有纤维素和卤化物 (例如, 氯化物、溴化物和碘化物) 的培养基中共同培养。

[0188] 6. 卤代甲烷的收集和纯化

[0189] 卤代甲烷是挥发性的并逸入液体培养基上方的蒸汽中。在生产规模中, 由于纯化卤代甲烷 (如果需要) 需要相对很少的额外能量, 因此与 (例如) 其它生物燃料中间体相比, 这是有利的。在一个实施方式中, 可以在转化为一种或多种非卤化有机分子前收集卤代甲烷。在另一个实施方式中, 省略了收集步骤, 例如, 当产生卤代甲烷的同一生物还将该卤代甲烷转化为有机分子时。

[0190] 可以在反应器系统中进行培养、卤代甲烷的收集和 / 或卤代甲烷向诸如高分子量化合物 (以下) 的有机化合物的转化。化学加工方法和生物反应器系统在本领域中是已知的并且可以容易地适应于本发明。出于说明而非限制, 在科学和工程文献中提供了指导, 例如, McKetta, J., CHEMICAL PROCESSING HANDBOOK, 1993, Marcel Dekker; Lee, S., ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL PROCESSING, 2006, Taylor and Francis Group; Asenjo, J., BIOREACTOR SYSTEM DESIGN, 1995, Marcel Dekker; Nielsen, J., BIOREACTION ENGINEERING PRINCIPLES, 2003, KluwerAcademics; Crow et al, Process for manufacturing methyl chloride, 美国专利 No. 6111153; Van 't Riet and Tramper, 1991, BASIC BIOREACTOR DESIGN, CRC Press; Asenjo and Merchuk, 1995, BIOREACTOR SYSTEM DESIGN, CRC Press; and Narita et al, Preparation of methyl chloride, 美国专利 No. 5917099, 以上每篇文献作为参考并入本文。出于说明而非限制, 图 9 中示出了一种反应器系统。可以使用任何已知方法通过将以气态形式产生的卤代甲烷从发酵罐转移到冷凝器以收集挥发性卤代甲烷。在该冷凝器中, 可以降低包含卤代甲烷的气体的温度, 例如, 使卤代甲烷液化而不使其它气态组分液化, 这使其易于纯化。在反应器中可以发生催化缩合或其它反应。作为缩合反应副产物产生的卤盐可以通过例如引回发酵罐而进行循环。

[0191] 可以容易地通过例如气相色谱 - 质谱法测量气相的产量, 其确定了所产生的卤代甲烷的分子数。可以使用亨利定律 (Henry's Law) 计算所产生的卤代甲烷的总量。

[0192] 7. 将卤代甲烷加工成有机分子

[0193] 可以将卤代甲烷转化为有机产物,如醇、烷烃(乙烷-辛烷或更长链的烷烃)、醚、醛、链烯、烯炔和硅氧烷聚合物。相应地,这些产物可以用于制备非常广泛的石油化学品,有时称为“生物燃料”。在传统石化工业中,在生产更复杂的有机化合物中使用包括卤代甲烷在内的卤代烃类是已知的。参见,例如, Osterwalder and Stark, 2007, “Direct coupling of bromine-mediated methane activation and carbon-deposit gasification”, Chemphyschem 8 :297-303 ; Osterwalder 和 Stark, 2007, Production of saturated C₂ to C₅ hydrocarbons”, 欧洲专利申请 EP 1837320。

[0194] 可以通过多种已知方法实现转化,包括生物转化(例如,通过使用可以将卤代甲烷转化为非卤化有机分子的生物,例如,该通过一种或多种酶的作用)。如果需要,可以在维持产生卤代甲烷的生物的相同反应器或容器中进行转化。可以用产生卤代甲烷的相同生物或不同的生物进行转化,所述相同生物或不同的生物存在于相同反应器中或隔离在不同隔室或反应器中。可以修饰生物从而与未修饰生物相比以更高的速率或更大的程度产生或转化(或既产生又转化)卤代甲烷。当通过产生卤代甲烷的相同生物实现转化时,可以可选地省略卤代甲烷的收集。可以可选地在相同容器或反应器中进行生产和转化。

[0195] 通过使用化学催化剂,可以将卤代甲烷转化为多种有机分子。根据底物的选择(所用的化学催化剂和/或卤代甲烷)和不同变量的调整(如温度、(分)压力和催化剂预处理),可以获得多种有机产物。例如,使用金属氧化物催化剂可以导致较长链烷烃的生产。使用 AlBr₃ 催化剂可以导致丙烷的生产。如果所需产品为醇、醚或醛,则可以将卤代甲烷通过根据其选择性而选择的特定金属氧化物以产生所需的功能性(例如,醇、醚或醛)。如果所需产物的选择性受一卤代烷基与金属氧化物之间反应中所存在的水含量的影响,则可以向一溴代烷基原料中加水至适当水平。

[0196] 使用沸石催化剂可以导致烯烃的生产。沸石的实例包括天然存在的沸石,如斜碱沸石、方沸石、钠红沸石、贝尔伯格石、比基塔石、伯格斯石、锆沸石、菱沸石、斜发沸石、刃沸石、环晶石、钡沸石、柱沸石、毛沸石、八面沸石、镁碱沸石、十字沸石、水钙沸石、钠菱沸石、戈硅钠铝石、纤沸石、古柱沸石、交沸石、碱菱沸石、片沸石、浊沸石、插晶菱沸石、马里铅沸石、针沸石、麦钾沸石、中沸石、蒙特索马石、丝光沸石、钠沸石、钾沸石、副钠沸石、方碱沸石、五元环沸石、培水硅铝钾石、钙十字沸石、铯榴石、钙沸石、钠环晶沸石、淡红沸石、辉沸石、四钠沸石、杆沸石、缺泥沸石(Tschernichite)、斜钙沸石、钡钙十字石、钾菱沸石和汤河原沸石。也可以使用合成沸石。在本领域中,使用沸石从卤代甲烷进行生产是熟知的。参见,例如, Svelle et al, 2006, Journal of Catalysis, 241 :243-54 and Millar et al, 1995, 美国专利 No. 5, 397, 560, 以上两篇文献以其整体作为参考并入,其讨论了使用沸石产生烃类产物,包括链烯,如乙烯、丙烯和丁烯以及乙苯和高级芳烃。

[0197] 除作为有机分子工业生产中有用的中间体外,卤代甲烷具有各种其它用途,例如在丁基橡胶生产和石油炼制中用作溶剂,在有机化学中用作甲基化和/或卤化试剂,用作油脂、油剂和树脂的提取剂,用作聚苯乙烯泡沫塑料生产的抛射剂和起泡剂,用作局部麻醉剂,用作药物生产的中间体,用作低温聚合反应中的催化剂载体,用作测温和恒温设备的液体以及用作除草剂。

[0198] 8. 实施例

[0199] 下列实施例仅出于说明的目的而并不是要进行限制。

[0200] 实施例 1. 在大肠杆菌 (E. coli) 中表达盐草 (Batis Maritima)MHTcDNA

[0201] 盐草 (Batis Maritima)MHT cDNA (Genbank 登录号 :AF109128 或 AF084829) 是人工合成的并克隆到表达载体 pTRC99a 中。

[0202] 所得的大肠杆菌 (E. coli) (DH10B 菌株) 包含受 IPTG 诱导型启动子控制的编码盐草 (Batis maritima)MHT 的表达构建体, 并将其称作 “E. coli-MHT_{Batis}” 菌株。

[0203] 实施例 2 :测量卤代甲烷的产量

[0204] 可以通过气相色谱法测量卤代甲烷的产量。在如下所述的实验中, 使用了 Agilent 气相色谱 / 质谱 (GC/MS) 系统。通常 “AIR. U” 调谐文件使用 1341 的电离电压。在一些实验中, 使用了约 1250 的电离电压。将溶剂延迟设置为 0 并将扫描参数集设置为 15-100MW。将进样口 (注射口, injection port) 和柱预置为 50°C。振荡数秒以混合待测试样品。用气密注射器提取 100 μ L 顶部空间气体。手动将样品气体进样 (injected) 到 GCMS 进样口。以下列设置启动 GCMS 程序 :50°C, 1:00 ;每分钟升高 10°C 至 70°C (样品通常以约 52°C 离开) ;70°C, 1:00。然后清洗色谱柱 (2 分钟升高到 240°C)。通过提取对应于 50MW 的 GC 峰鉴别出样品峰 (-0.3, +0.7)。对该峰进行积分以产生 “GC 50MW” 数据。

[0205] 实施例 3 :通过表达盐草 (Batis Maritima) 卤代甲烷转移酶的重组大肠杆菌 (E. coli) 生产卤代甲烷

[0206] 用编码来自如实施例 1 所述的盐草 (Batis Maritima) 的密码子优化的氯甲烷转移酶基因 MCT 的质粒转化大肠杆菌 (E. coli) (DH10B、BL21 或 MC1061 菌株) 和沙门氏菌属 (Salmonella) (SL1344)。在 16mL 培养管中, 对加入 1mM IPTG 的 10mL LB 培养基接种铺板细胞的单一菌落。然后, 覆盖封口膜和铝箔并用橡皮筋扎紧以密封该管。在 37°C 振荡培养该培养物 4-22 小时, 并测量卤代甲烷的产量。每株菌株均产生氯甲烷。

[0207] 另外, 发现该结果高度可重复。使用大肠杆菌 (E. coli) (DH10B 菌株) 中一种盐草 (Batis maritima)MHT 酶的 5 个不同克隆重复试验得到了每个克隆中氯甲烷的产量, 其标准偏差为平均卤代甲烷产量的约 12%。

[0208] 实施例 4 :卤代甲烷的生产遵循用其它 IPTG 诱导型构建体观察到的诱导曲线

[0209] 将用编码密码子优化的氯甲烷转移酶基因 MCT 的质粒转化的大肠杆菌 (DH10B 菌株) 在存在诱导剂 (IPTG) 的情况下培养, 其中所述密码子优化的氯甲烷转移酶基因 MCT 来自如实施例 1 所述的盐草 (Batis maritima)。如图 1 所示, 提高 IPTG 的水平造成氯甲烷的产量提高。

[0210] 如图 2 所示, 诱导后, 卤代甲烷的产量在诱导培养基上随时间线性增加直至约 1 至 2.5 小时。

[0211] 如图 3 所示, 静止期的细胞比生长期的细胞产生更多卤代甲烷。如果营养物浓度不提高, 则人工加倍培养物的密度不能提高卤代甲烷的产量。

[0212] 比较了有氧和无氧培养条件之间的卤代甲烷产量。有氧条件产生了更高水平的卤代甲烷培养物。

[0213] 实施例 5 :培养基中盐浓度的影响

[0214] 使 E. coli-MHT_{Batis} 细胞在改变了 NaCl 浓度的改进 Luria-Bertani (LB) 培养基上生长。正常 LB 培养基含有 5g/L 的酵母提取物、10g/L 的胰蛋白胨、10g/L 的 NaCl (0.171M

NaCl), pH 为 7。测试了在 LB 培养基和含有 0.85 或 0.017M NaCl 的改进 LB 培养基上的氯甲烷的产量。图 4 中总结了结果。0.085M NaCl 的结果最好。然而,正常 LB 培养基的结果接近最佳值。

[0215] 如表 3 所示,配制了具有 0.16M 的溴或碘的反离子 (counter ion) 的改进 Luria-Bertani 培养基。

[0216] 表 3

[0217]

	LB-NaBr	LB-NaI
酵母提取物	5g/L	5g/L
胰蛋白胨	10g/L	10g/L
NaCl	0.5g/L	0.5g/L
NaBr	16.7g/L	0
NaI	0	24.4g/L

[0218] 实施例 6 :不同卤化物的影响

[0219] 为了比较使用不同卤盐的卤代甲烷的产量,设计了标准化测定。在 20mL LB 培养基上接种了铺板细胞的单一菌落并在 37°C 振荡培养约 10-14 小时。使细胞成粒并用 LB 培养基再悬浮。将相等等份加入至具有 IPTG 的 10ml LB、LB-Br 或 LB-I 培养基并培养 1.5 小时。采集 100 μ L 的顶部空间气体并按照实施例 2 测量存在的卤代甲烷的量。

[0220] 如图 5 所示,更高分子量的卤化物具有更高的卤代甲烷产率,其中碘离子的产率最大,然后是溴离子和氯离子。使用亨利定律 (Henry's law) 计算产生的气体总量 (溶于培养基和存在于顶部空间中的量),计算得到碘甲烷的产率为约每天 40 (具体地为 43)mg/L。

[0221] 实施例 7 :表达异源 MHT 和过表达大肠杆菌 (E. coli) metK 的大肠杆菌 (E. coli) 细胞中卤代甲烷的产量

[0222] 测试了某些辅助蛋白的过表达对卤代甲烷生产的影响。用编码大肠杆菌 (E. coli) metK、大肠杆菌 (E. coli) clcA 或大肠杆菌 (E. coli) vgb 基因的质粒转化 E. coli-MHT_{Batis} 菌株。培养细胞并测量氯甲烷的产量。如图 6 所示,metK 的过表达改善了氯甲烷的产率。在所使用的条件下,vgb 和 clcA 的表达造成了一般的毒性。

[0223] 实施例 8 :大肠杆菌 (E. coli) 中异源 MHT 表达的影响

[0224] 对来自各种生物的十九种卤代甲烷转移酶基因进行密码子优化并引入大肠杆菌 (E. coli)。对每种基因确定了溴甲烷和碘甲烷的产量。如表 5 所示,这些基因来自盐草 (Batis maritima)、肿块伯克氏菌 (Burkholderia phyumatum) STM815、细长聚球藻 (Synechococcus elongatus) PCC 6301、小白菜亚种 (Brassica rapa subsp. Chinensis);甘蓝 (Brassica oleracea) TM2;拟南芥 (Arabidopsis thaliana) TM1;拟南

芥 (*Arabidopsis thaliana*) TM2; 钩端螺菌属 (*Leptospirillum* sp) II 组 UBA; 新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 新型变体 JEC21; 水稻 (*Oryza sativa*) (日本产植物培养组 (*iaponica* cultivar-group)); 金牛蛎球菌 (*Ostreococcus tauri*); 芳族脱氯单胞菌 (*Dechloromonas aromatica*) RCB; 灰盖鬼伞冈山株 (*Coprinopsis cinerea okayama*); Robiginitalea bofirmata HTCC2501; 马氏海洋杆状菌 (*Maricaulis maris*) MCS10; 黄杆菌 (*Flavobacterium bacterium*) BBFL7; 葡萄 (*Vitis vinifera*); 嗜盐嗜盐红螺菌 (*Halorhodospira halophila*) SL1。表 4 中示出了 MHT 序列。表 5 显示了与盐草 (*Batis maritima*) 蛋白相比的氨基酸同一性水平。

[0225] 表 4

[0226] 盐草 (BATIS MARITIMA)

[0227] MSTVANIAPVFTGDCKTIPTPEECATFLYKVVNSGGWEKCWVEE

[0228] VIPWDLGVPTPLVLHLVKNNALPNGKGLVPGCGGGYDVVAMA

[0229] NPERFMVGLDISENALKKARETFSTMPNSSCFSVKEDVFTWRP

[0230] EQPFDFIFDYVFF CAIDPKMRPAWGKAMYELLKPDGELITLMYPI

[0231] TNHEGGPPFSVSESEYEKVLVPLGFKQLSLEDYSDLA VEPRKGK

[0232] EKLARWKKMNN

[0233] 肿块伯克氏菌 (BURKHOLDERIA PHYMATUM) STM815 (与盐草 (BATIS MARITIMA) 29% 的同一性)

[0234] MSDKRPSVPPSAPDFENRDPNAPGFWDERFGRGFTPWDQAGVP

[0235] PAFKAFVERHSPVPVLIPGCGSAYEARWLAKEGWTVRAIDFAPN

[0236] AVEAARAQLGSHASLVHEADFFTYRPPFDPGWIYERAFLCALPP

[0237] ARRSDWVARMAQLLSPGGLLAGFFFIGATEKGPPFGIERAELDA

[0238] LMSPDFTLVEDEPVDDSI AVFAGRERWLTWRRRGAARG

[0239] 细长聚球藻 (SYNECHOCOCCUS ELONGATUS) PCC 6301

[0240] MTNAVNQAQFWEQRYQEGSDRWDLGQAAPVWRSLLAGTNAP

[0241] APGRIAVLGCGRGHDARLFAEQGFVVGFDFAPSATAAAQALAQ

[0242] GTTAQFLQRDIFALPQEFAGQFDTVLEHTCFCAIDPDRRAEYVEV

[0243] VRQILKPKGCLLGLFWCHDRPSGPPYGCSLTELDRFAQGWQEE

[0244] QLESVTESVEGRRGEEYLGRWRRLD

[0245] 小白菜亚种 (BRASSICA RAPA SUBSP. CHINENSIS)

[0246] MAEVQQNSAHINGENI IPPEDVAKFLPKTVEEGGWEKCWEDGV

[0247] TPWDQGRATPLVVHLVESSSLPLGRALVPGCGGGHDVVAMASP

[0248] ERYVVGLDISESALEKAAETYGSSPKAKYFTFVKEDFFTWRPNE

[0249] LFDLIFDYVVFCAIEPETRPAWAKAMYELLKPDGELITLMYPITD

[0250] HDGGPPYKVAFSTYEDVLVPVGFKAVSIEENPYSIATRKGKEKLA

[0251] RWKKIN

[0252] 甘蓝 (BRASSICA OLERACEA) (TM1)

[0253] MAEEQQKAGHSNGENI IPPEEVAKFLPETVEEGGWEKCWEDGIT

[0254] PWDQGRATPLVVHLVDSSSLPLGRALVPGCGGGHDVVAMASPE

- [0255] RFVVGLDISESALEKAAETYGS SPKAKYFTFVKEDFFTWRPNEL
- [0256] FDLIFDYVVFFCAIEPEMRPAWAKSMYELLKPDGELITLMYPITDH
- [0257] DGGPPYKVAVSTYEDVLVPVGFKAIVSIEENPYSIATRKGKEKLGR
- [0258] WKKIN
- [0259] 甘蓝 (BRASSICA OLERACEA) (TM2)
- [0260] MAEVQQNS GNSNGENIIPPEDVAKFLPKTVDEGGWEK CWEDGV
- [0261] TPWDQGRATPLVVHLVESSSLPLGRGLVPGCGGGHDVVAMASP
- [0262] ERYVVGLDISESALEKAAETYGSSPKAKYFTFVKEDFFTWRPNE
- [0263] LFDLIFDYVVFFCAIEPETRPAWAKAMYELLKPDGELITLMYPITD
- [0264] HDGGPPYKVAVSTYEDVLVPVGFKAIVSIEENPYSIATRKGKEKLA
- [0265] RWKKIN
- [0266] 拟南芥 (ARABIDOPSIS THALIANA) TM1
- [0267] MAEEQQNS SYSIGGNILPTPEEAATFQPQVVAEGGWDKCWEDG
- [0268] VTPWDQGRATPLILHLLDSSALPLGRTLVPVPGCGGGHDVVAMASP
- [0269] ERFVVGLDISDKALNKANETYGSSPKAEYFSFVKEDVFTWRPNE
- [0270] LFDLIFDYVVFFCAIEPEMRPAWGKSMHELLKPDGELITLMYPMT
- [0271] DHEGGAPYKVALS SYEDVLVPVGFKAIVSVEENPDSIPTRKGKEK
- [0272] LARWKKIN
- [0273] 拟南芥 (ARABIDOPSIS THALIANA) TM2
- [0274] MAEEQQNSDQSNGGNVIPTPEEVATFLHKTVEEGGWEK CWEEE
- [0275] ITPWDQGRATPLIVHLVDTSLPLGRALVPGCGGGHDVVAMASP
- [0276] ERFVVGLDISESALAKANETYGSSPKAEYFSFVKEDVFTWRPTE
- [0277] LFDLIFDYVVFFCAIEPEMRPAWAKSMYELLKPDGELITLMYPITD
- [0278] HVGPPYKVDVSTFEEVLVPIGFKAIVSVEENPHAIPTRQREAGK
- [0279] VEEDQLIPKKEILLFGKSVICVIYKE
- [0280] 钩端螺旋菌属 (LEPTOSPIRILLUM SP.) II 组 UBA
- [0281] MPDKIFWNQRYLDKNTGWDLGQPAPPFVRLVEKGEFGPPGRVLI
- [0282] PGAGRSYEGIFLASRGYDVTCVDFAPQAVREAREAAARQAGVKL
- [0283] TVVEEDFFRLDPRTIGVFDYLVEHTCFCAIDPPMRQAYVDQSHA
- [0284] LLAPGGLLIGLFYAHGREGGPPWTTTEEEVRGLFGKKFDLLSLG
- [0285] LTDWSVDSRKGEELLGRLRRKNDRIE
- [0286] 新型隐球酵母 (CRYPTOCOCCLUS NEOFORMANS) 新型变体 (VAR. NEOFORMANS JEC21)
(假定蛋白质)
- [0287] MAQASGDDNAWEERWAQGRATFDQSAHPVFVKFLKSDIAREL
- [0288] GVPKSGKALVPGCGRGYDVHLLASTGLDAIGLDLAPTGVAAAR
- [0289] RWIGSQPSTSGKADILVQDFFTYDPLEKFDLIYDYTFCLALPPSLR
- [0290] QEWARQTTHLANIAADTNPILITLMYPLPPSAKSGGPPFALSEEIY
- [0291] QELLKEQGWMVWSEDIIEPTRMVGAPGGEKLAVWKRI
- [0292] 稻 (ORYZA SATIVA) 日本产植物培育组 (JAPONICACULTIVAR-GROUP)

- [0293] MASAIVDVAGGGRQQALDGSNPAVARLRQLIGGGQES SDGWSR
- [0294] CWEENVTVPWDLGQRTPAVVELVHSGTLPAGDATTVLVPGCGAG
- [0295] YDVVALSGPGRFVVGLDICDTAIQKAKQLSAAAAAADGGDGS
- [0296] SSFFAFVADDFFTWEPPEPFHLIFDYTFFCALHPSPMPAWAKRMA
- [0297] DLLRPDGELITLMYLAEGQEAGPPFNNTTVLDYKEVLNPLGLVITS
- [0298] IEDNEVAVEPRKGMEKIARWKRMTKSD
- [0299] 金牛蛎球菌 (OSTREOCOCCUS TAURI) (未命名蛋白产物)
- [0300] MTTTS SAPTRHTSMRVALAAPATVTRRLGTYKRVFDRRAMSTRAI
- [0301] DGAVTSNAGDFARQDGDSTDWEGMWSRGITKGAAFDCSRTEPAF
- [0302] QNALDAKEIAIGSGRALVPGCGRGYALASLARAGFGDVVGLEIS
- [0303] ETAKEACEEQLKAESIPETARVEVVVADFFAYDPKEAFDAAYDC
- [0304] TFLCAIDPRRREEWARKHASLIKPGGTLVCLVFPVGDFFEGGPPYA
- [0305] LTPEIVRELLAPAGFEEIELRETPAEMYARGRLEYLFTWRRRS
- [0306] 芳族脱氯单胞菌 (DECHLOROMONAS AROMATICA) RCB
- [0307] MSETIKPPEQRPEHPDFWCKRFEGVTPWDAGKVPMAFVDFVG
- [0308] AQTTPLNSLIPGCGSAWEAAHLAELGWPVTALDFSPLAIEKARE
- [0309] VLGDSPVKLVCADFFTFAPRQPLDLIYERAFLCALPRKLWADWG
- [0310] KQVAELLPSGARLAGFFFLCDQPKGPPFGILPAQLDELLRPNFELI
- [0311] EDQPVGDSVPVFAGRERWQVWRRR
- [0312] 灰盖鬼伞冈山株 (COPRINOPSIS CINEREA OKAYAMA) (假定蛋白质)
- [0313] MADPNLAPEIRAKMQEIFKPDDRHSWDLWKENITPWDAGDA
- [0314] QPSLIELIEESGLDFARKGRALVPGCGTGYDAVYLASALGLQTIG
- [0315] MDISESAVEAANRYRDSSGVQGADRAIFQKADFFTYKVPDEERF
- [0316] DLIMDHTEFFCAIHPSLRPEWGQRMSELIKPGGYLITICFPMIPKVE
- [0317] TGPPYYLRPEHYDEVVKETFEKVYDKVPTKS SENHKDKERMLV
- [0318] WKKK
- [0319] ROBIGINITALEA BIFORMATA HTCC2501
- [0320] MTDLDRDFWEDRYRAGTDRWDLGGPSPPLTAYIDGLTDQELRIL
- [0321] VPGAGRGYEAELYRAGFENLTIVDLARRPLDDLRRRLPELPAA
- [0322] ALQQTDFFSFRGGPFDLILEHTFFCALPPARRPDYVQAMHRLLP
- [0323] GGRLAGLFFDFPLTEDGPPFGGSETEYRNRFSSLFHIRKLERARN
- [0324] SIPPRAGTEFFIFEKK
- [0325] 马氏海洋杆菌 (MARICAULIS MARIS) MCSIO
- [0326] MTHDENRSAFDWEARFIDGNTPWERGALHPAFEAWQHQ SAFA
- [0327] AGDRALIPGCGRSPPELLALAQAGLAVTGADLSGTAMAWQRKLF
- [0328] ADAGQQVELITGDVFDWQPQQALDLVYEQTFLCAIHPRLRTRYE
- [0329] EALARWLKPGGRLYALFMQKPERGGPPFDALDAMRALFPAER
- [0330] WTPAEADIQWPWHPQLNGKAELGAVLIRR
- [0331] 黄杆菌 (FLAVOBACTERIA BACTERIUM) BBFL7

- [0332] MPLNKQYWEDRYKNNSTGWDLGIIISTPIKEYVNQLENKNSKILI
[0333] PGAGNAHEATYLVKNGFKNIFILDIALSPLKFAKQRSKLPEEHLIQ
[0334] QDFFDHKGSYDLII EQTFFCALEPRFRESYVKKIHMLLRDQGCLI
[0335] GVLNFENNLSSPPFGGSINEYLNLFEPYFEIVTMEPCNNSVIERQ
[0336] GKEIFIKLKKKK
[0337] 葡萄 (VITIS VINIFERA)
[0338] MASPDNTKPKARSSESVTGQRRGRRPSDRHWPCVGEESGSFY
[0339] TIADGERQYQHRIELRASKNKPSSWEEKWQQGITPVDLGKATPI
[0340] IEHLHQAGALPNGRTLIPGCGRGYDVVAIACPERFVVGLDISDSA
[0341] IKKAKESSSSWNASHFIFLKADFFTWNPTLFDLIIDYTFFCAIEP
[0342] DMRPAWASRMQQLKPDGELLTLMFPI SDHTGGPPYKVSIADYE
[0343] KVLHPMRFKAVSIVDNEMAIGSRKKKYPLKPDLSLFGFVDRPKR
[0344] AYEARSEEFRI SDWVCGWMGLCVPSGRISGGVCGLLSGRSLTW
[0345] AKNLGVSTTQLRMSNNGS SIESNPKVQKLNQIIGSDSAGGWEKS
[0346] WQQGHTPVDLGKPTPIIQHLHQTGTLPSGKTLVPGCGGYDVV
[0347] TIACPERFVVGLDISDSAIKKAKEISDHAGGPPYKVSADYEEVL
[0348] HPMGFKAIVSIVDNKMAIGPRKGREKLGRWKRTPSKSLL
[0349] 嗜盐嗜盐红螺菌 (HALORHODOSPIRA HALOPHILA) SL1
[0350] MSGDPDPRRAPWEARWREGRTGWDRGGVSPTLEAWLSAGVIP
[0351] GRRVLVPGAGRGYEVEALARRGYKVTAVDIAAEACQQLRDGLD
[0352] AAGVEARVVQADLLAWQPDTPFDVYEQTCLCALDPADWPAY
[0353] EQRLYGWLRPGGVLLALFMQTGASGGPPFHCALPEMATLFDSE
[0354] RWQWPAEPPRQWPHPSGRWEEAVRLLRR
[0355] 表 5
[0356]

缩写	名称	%氨基酸同一性
Batis	盐草 (<i>Batis maritima</i>)	100
BP	肿块伯克氏菌 (<i>Burkholderia phyatum</i>) STM815	29
BR	小白菜亚种 (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>Chinensis</i>)	65
SE	细长聚球藻 (<i>Synechococcus elongatus</i>) PCC 6301	30
BO-1	甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) TM1	65
BO-2	甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) TM2	64
LS	钩端螺菌属 (<i>Leptospirillum</i> sp) II 组 UBA	34
AT-1	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) TM1	69
CN	新型隐球酵母 (<i>Cryptococcus neoformans</i>) var. <i>neoformans</i> JEC21	33
OS	水稻 (<i>Oryza sativa</i>) (<i>japonica</i> cultivar 组)	58
OT	金牛蛎球菌 (<i>Ostreococcus tauri</i>)	33
DA	芳族脱氯单胞菌 (<i>Dechloromonas aromatica</i>) RCB	30
CC	灰盖鬼伞冈山株 (<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>)	36
RB	<i>Robiginitalea bofirmata</i> HTCC2501	32
MM	马氏海洋杆状菌 (<i>Maricaulis maris</i>) MCS10	30
AT-2	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) TM2	67
FB	黄杆菌 (<i>Flavobacterium bacterium</i>) BBFL7	28
VV	葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>)	59
HH	嗜盐嗜盐红螺菌 (<i>halorhodospira halophila</i>) SL1	28

[0357]

[0358] 按照以下方法培养细胞：

[0359] 对于每个菌株，挑取单一菌落并在置于 30mL 玻璃试管中的 20mL 的 LB miller 培养基上，在 37℃ 以 250rpm 的转速振荡通气（松开盖）生长过夜（10-14 小时）。在摇摆离心机中以 3000×g 的离心力对培养物离心沉降 5 分钟。将细胞重新悬浮于含有 100uM IPTG 诱导剂的 20mL 的适当培养基（10g/L 胰蛋白胨、5g/L 酵母提取物、165mM NaX[其中 X = Cl、

Br、I])。用橡皮塞和封口膜密封细胞并在 37℃ 以 250rpm 的转速振荡培养 1.5 小时。对培养物进行 GC/MS, 采集 100 μ L 的顶部空间气体样品并加载到色谱柱上。方法运行 VOIGT.m。报告了适当物质 (MeCl、MeBr、MeI) 的计数值。细胞始终在存在 30 μ g/mL 氯霉素的情况下生长。

[0360] 如上述实施例所述, 测量了卤代甲烷的产量。在图 7 中总结了结果。发现盐草 (*B. maritima*) 转移酶的溴甲烷产量最好, 而肿块伯克氏菌 (*B. phymatum*) 转移酶溴甲烷产量在细菌中最好。新型隐球酵母 (*C. neoformans*) JEC21 得到了最好的溴甲烷和碘甲烷产量。钩端螺菌属 (*Leptospirillum*) 得到了最好的碘甲烷产量。来自稻 (*O. sativa*)、金牛蛭球菌 (*O. tauri*) ; 芳族脱氯单胞菌 (*D. aromatica*) 和灰盖鬼伞 (*C. cinerea*) 的酶对碘甲烷的生产表现出显著的特异性。盐草 (*B. maritima*)、小白菜亚种 (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) 和甘蓝 (*B. oleracea*) 对溴甲烷的生产表现出显著的特异性。表 5 中的酶 RB、MM、AT-2、FB、VV 和 HH 表现出不显著的活性。

[0361] 实施例 9A : 鉴别新的卤代甲烷转移酶

[0362] 通过 BLAST 蛋白 - 蛋白搜索, 对与已知 MHT (如来自盐草 (*Batis maritima*) 的 MHT) 具有序列同一性的蛋白质进行搜索以鉴别具有 MHT 活性的蛋白质 (包括先前不知道具有该活性的蛋白质)。基于盐草 (*Batis maritima*) 和肿块伯克氏菌 (*Burkholderia phymatum*) MHT 序列之间 29% 的同一性, 将同一性的截止点指定为 28%。将每种鉴别出的序列通过 BLAST 返回数据库进行搜索并产生了新列表。重复该操作直至不再发现其它序列为止。表 6 示出了已经鉴别为具有 MHT 活性的序列 (和相应的 GenBank 登录号), 包括至今未识别具有 MHT 活性的蛋白。多种新近鉴别的蛋白质为巯基嘌呤 S- 甲基转移酶。

[0363] 表 6

[0364] > 盐草序列 (BATIS SEQ)

[0365] MSTVANIAPVFTGDCKTIPTPEECATFLYKVVNSGGWEKCVVEE

[0366] VIPWDLGVPTPLVLHLVKNNALPNGKGLVPGCGGGYDVVAMA

[0367] NPERFMVGLDISENALKKARETFSTMPNSSCFSFVKEDVFTWRP

[0368] EQPFDFIFDYVFFCAIDPKMRPAWGKAMYELLKPDGELITLMYPI

[0369] TNHEGGPPFSVSESEYEKVLVPLGFKQLSLEDYSDLAVEPRKGK

[0370] EKLARWKKMNN

[0371] > GI|30689545|REF|NP_850403.1| 硫醇甲基转移酶, 推定的, [拟南芥 (*ARABIDOPSIS THALIANA*)]

[0372] MENAGKATSLQSSRDLFHRLMSENSSGGWEKSWEAGATPDDL

[0373] GKPTPVIAHLVETGSLPNGRALVPGCGTGYDVVAMASPDHVV

[0374] GLDISKTAVERSTKKFSTLPNAKYFSFLSEDFFTWEPAEKFDLIFD

[0375] YTFFCAFEPGVRPLWAQRMEKLLKPGGELITLMFPIDERSGGPPY

[0376] EVSVSEYEKVLPLGFEAISIVDNELAVGPRKGMEKLGRWKKST

[0377] FHSTL

[0378] > GI|157353829|EMB|CA046361.1| 未命名蛋白质产物, [葡萄 (*VITIS VINIFERA*)]

[0379] MANDSTSIESNSELQKISQVIGSGFNWSWEEKWQGLTPWDLGK

- [0380] ATPII EHLHQAGALPNGRTLIPGCGRGYDVVAIACPERFVVGLDIS
- [0381] DSAIKKAKESSSSSWNASHFIFLKADFFTWNPTLFDLIIDYTFFC
- [0382] AIEPDMRPAWASRMQQLKPDGELLTLMFPI SDHTGGPPYKVSIA
- [0383] DYEKVLHPMRFKAVSIVDNEMAIGSRKGREKLGRWKRTDEPLL
- [0384] > GI|157353828|EMBL|CA046360.1| 未命名蛋白质产物, [葡萄 (VITIS VINIFERA)]
- [0385] MGLCVPSGRISGGVCGLLSGRSLTWAKNLGVSTTQLRMSNNGS
- [0386] SIESNPKVQKLNQIIIGSDSAGGWEKSWQQGHTPWDLGKPTPIIQ
- [0387] HLHQTGTLPSGKTLVPGCGGYDVVTIACPERFVVGLDISDSAIAK
- [0388] KAKELSSSLWNANHFTFLKEDFFTWNPTLFDLIFDYTFFCAIEP
- [0389] DMRSVWAKMRHLLKPDGELLTLMFPI SDHAGGPPYKVSVDY
- [0390] EEVLHPMGFKAVSIVDNKMAIGPRKGREKLGRWKRTPSKSL
- [0391] > GI|125554131|GB|EAY99736.1| 假定蛋白质, OSI_020969, [稻 (ORYZA SATIVA) (印度产植物培养组)]
- [0392] MDRALPLALSVSLWLLVGD LGGRWTLEDDGGGGGVSRFGSW
- [0393] YRMCGWWWVADWIIELGASSWGNLFGLVLKRRKNEAVERD
- [0394] SSDGWEKSWEA AVTPWDLGKPTPIIEHLVKSGTLPKGRALGYD
- [0395] VVALASPERFVVGLGISSTAVEKAKQWSSSLPNADCFTFLADDDFF
- [0396] KWKPSEQFDLIFDYTFFCALDPSLRRLAWAETVSGLLKPHGELITL
- [0397] IYLVTEESIYSFVYFSIEDVMVLIISYCAERISYRSVTKKEDHHSI
- [0398] IQSPILLRCPFRNHSYQKVLEPLGFKAILMEDNELAIKPRKAISAF
- [0399] RTSEQPSLAAQDVTE
- [0400] > GI|125546406|GB|EAY92545.1| 假定蛋白质, OSI_013778, [稻 (ORYZA SATIVA) (印度产植物培养组)]
- [0401] MASAIVDVAGGGRQQALDGSNPAVARLRQLIGGGQES SDGWSR
- [0402] CWEEGVTPWDLGQPTPAVVELVHSGTLPAGDATTVLVPGCGAG
- [0403] YDVVALSGPGRFVVGLDICDTAIQKAKQLSAAAAAADGGDGS
- [0404] SSFFAFVADDDFTWEPPEPFHLIFDYTFFCALHPSMRPAWAKRMA
- [0405] DLLRPDGELITL MYLAEGQEAGPPFNTTVLDYKEVLNPLGLVITS
- [0406] IEDNEVAVEPRKGMEKIARWKRM TKSD
- [0407] > GI|108712049|GB|ABF99844.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶家族蛋白, 表达的, [稻 (ORYZA SATIVA) (日本产植物培养组)]
- [0408] MASAIVDVAGGGRQQALDGSNPAVARLRQLIGGGQESSDGWSR
- [0409] CWEEGVTPWDLGQRTPAVVELVHSGTLPAGDATTVLVPGCGAG
- [0410] YDVVALSGPGRFVVGLDICDTAIQKAKQLSAAAAAADGGDGS
- [0411] SSFFAFVADDDFTWEPPEPFHLIFDYTFFCALHPSMRPAWAKRMA
- [0412] DLLRPDGELITL MYLVINRRYQHV
- [0413] > GI|115466488|REF|NP_001056843.1| OS06G0153900, [稻 (ORYZA SATIVA) (日本产植物培养组)]

- [0414] MSSSAARVGGGGGRDPSNNPAVGRLRELVQRGDAADGWEKSW
- [0415] EAAVTPWDLGKPTPIIEHLVKSGTLPKGRALVPGCGTGYDVVAL
- [0416] ASPERFVVGLDISSTAVEKAKQWSSSLPNADCFTFLADDDFFKWK
- [0417] PSEQFDLIFDYTFFCALDPSLRLAWAETVSGLLKPHGELITLIY LIS
- [0418] DQEGGPPFNNTVTDYQKVLEPLGFKA ILMEDNELAIKPRKGQEK
- [0419] LGRWKRFPVPGSSL
- [0420] > 灰盖鬼伞冈山株 (COPRINOPSIS CINEREA OKAYAMA) (假定蛋白质)
- [0421] MADPNLAPEIRAKMQEIFKPDDRHSWDLWKENITPWDAGDA
- [0422] QPSLIELIEESGLDFARKGRALVPGCGTGYDAVYLASALGLQTIG
- [0423] MDISESAVEAANRYRDSSGVQGADRAIFQKADFFTYKVPDEERF
- [0424] DLIMDHTFFCAIHPSLRPEWQRMSELIKPGGYLITICFPMIPKVE
- [0425] TGPPYYLRPEHYDEV LKETFEKVYDKVPTKSSSENHKDKERMLV
- [0426] WKKK
- [0427] > GI|71024813|REF|XP_762636.1|假定蛋白质, UM06489.1, [玉米黑粉菌 (USTILAGO MAYDIS) 521]
- [0428] MTSSLSKDDQIQNLRLRFADSGVPNDPKAWDQAWIDSTTPWDA
- [0429] NRPQPALVELLEGADADAKVPDVGNLIPVSQAIPKGDGTAVV
- [0430] PGCGRGYDARVFAERGLTSYGVDISSNAVAANKWLGDQDLPT
- [0431] ELDDKVNFAEADFFTLGTSKSLVLELSKPGQATLAYDYTF LCAIP
- [0432] PSLRTTWAETYTRLLAKHGVLIALVFPIHGDRPGGPPFSISPQLVR
- [0433] ELLGSQKNADGSAAWTELVELKPKGPETRPDVERMMVWRRS
- [0434] > GI|145230089|REF|XP_001389353.1|假定蛋白质, AN01G09330, [黑曲霉 (ASPERGILLUS NIGER)]
- [0435] MTDQSTLTAAQQSVHNTLAKYPGEKYVDGWAEIWNANPSPPW
- [0436] DKGAPNPALED TLMQRRGTIGNALATDAEGNRYRKALVPGCG
- [0437] RGV DVLLLASF GYDAYGLEYS GAAVQACRQEEKESTTS AKYPV
- [0438] RDEEGDFFKDDWLEELGLGLNCFDLIYDYTFFCALSPSMRPDW
- [0439] ALRHTQLLAPSPHG NLI CLEYPRHKDPSLP GPPFGLSSEAYMEHL
- [0440] SHPGEQVS YDAQGR CRGDPLREPSDRGLERVAYWQPARTHEVG
- [0441] KDANGEVQDRVSIWRRR
- [0442] > GI|111069917|GB|EAT91037.1|假定蛋白质, SNOG_01388, [小麦叶枯病菌 (PHAEOSPHERIA NQDORUM) SN15]
- [0443] MANPNQDRLRSHFAALDPSTHASGWDSLWAE GTFIPWDRGYAN
- [0444] PALIDLLANPSSPPTSSDANPTPGAPKNTIDGQGVQLPAPLEGG
- [0445] VRRKALVPGCGKGYDVALLASWGYDTWGLEVSRHAADAAKE
- [0446] YLKDAGEGALEGEYKIKDAKIGKGREECVVADFFDDAWLKDV
- [0447] GAGEFDVIYDNTFLCALPPLL RPKWAARMAQLLARDGV LICLEF
- [0448] PTHKPASSGGPPWSLPPTVHQELLKRPGEDISYDEGGVVVATDR
- [0449] AESENALVRVAHWTPKRTHNIAVINGVVRDCVSVWRHKKQS

- [0450] > GI|119195301|REF|XP_001248254.1|假定蛋白质, CIMG_02025, [粗球孢子菌 (COCCIDIODES IMMITIS) RS]
- [0451] MANEILRSAPNLSDRFKNLDGRNQGEVWDDLWKESRTPWDRG
- [0452] SHNPALEDALVEKRGFFGAPVFEDEPLRRKKALVPGCGRGVDVF
- [0453] LLASFGYDAYGLEYSKTAVDVCLKEMEKGEGGKVPVRDEKVG
- [0454] SGKVMFLEGDFFKDDWVKEAGVEDGAFDLIYDYTFFCALNPAL
- [0455] RPQWALRHRQLLAPSPRGNLICLEFPTTKDPAALGPPFASTPAMY
- [0456] MEHLSPGEDIPYDDKGHVKSPLQQPSDKGLERVAHWQPKRT
- [0457] HTVGMDDKGNVLDWVSIWRR
- [0458] RD
- [0459] > GI|145234849|REF|XP_001390073.1|假定蛋白质, AN03G01710, [黑曲霉 (ASPERGILLUS NIGER)]
- [0460] MSEAPNPVQGRLISHFADRRRAEDQGSWSALWDSNESVLWDR
- [0461] GSPSIALVDVVEQQQDVFFPYTRDGRRKKALVPGCGRGYDPVM
- [0462] LALHGFVDVYGLDISATGVSEATKYATSEMQSPQDVKFIAGDFFSS
- [0463] EWESQALQDGDKFDLIYDYTFLCALHPDLRRKWAERMSQLLHP
- [0464] GGLLVCFEPMYKDTSLPGPPWGLNGVHWDLLARGGDGITNIT
- [0465] KEEDEDSGIQLSGQFRRAQYFRPIRSYPSGKGTDMLSIYVRR
- [0466] > GI|119499868|REF|XP_001266691.1|硫醇甲基转移酶, 推定的, [费希新萨托菌 (NEOSARTORYA FISCHERI) NRRL181]
- [0467] MSNDPRLSSIPEFIARYKENYVEGWAELWNKSEGKPLPFDRGF
- [0468] PNPALDTLIEKRDIIGGPIGRDAQGNTYRKALVPGCGRGVDV
- [0469] LLLASFGYDAYGLEYSDTAVQVCKEEQAKNGDKYPVRDAEIGQ
- [0470] GKITFVQGDFFKDTWLEKLQLPRNSFDLIYDYTFFCALDPSMRP
- [0471] QWALRHTQLLADSPRGHLICLEFPRHKDTSLQGPPWASTSEAYM
- [0472] AHLNHPGEEIPYDANRQCSIDPSKAPSPQGLERVAYWQPARTHE
- [0473] VGIVEGEVQDRVSIWRRPN
- [0474] > GI|70993254|REF|XP_751474.1|硫醇甲基转移酶, 推定的, [烟曲霉 (ASPERGILLUS FUMIGATUS) AF293]
- [0475] MSNDPRLVSSIPEFIARYKENYVEGWAELWDKSEGKPLPFDRGF
- [0476] PNPALDTLIEKRDIIGDPIGRDAQGNTYRKALVPGCGRGVDV
- [0477] LLLASFGYDAYGLEYSATAVKVCKEEQAKNGDKYPVRDAEIGQ
- [0478] GKITYVQGDFFKDTWWEKLQLPRNSFDLIYDYTFFCALDPSMRP
- [0479] QWALRHTQLLADSPRGHLICLEFPRHKDTSLQGPPWASTSEAYM
- [0480] AHLNHPGEEIPYDANRQCSIDPSKAPSPQGLERVAYWQPARTHE
- [0481] VGIVEGEVQDRVSIWRRPN
- [0482] > GI|46137187|REF|XP_390285.1|假定蛋白质, FG10109.1, [玉蜀黍赤霉 (GIBBERELLA ZEAE) PH-1]
- [0483] MATENPLEDRISSVPFAEQGPKWDSCWKDALTPWDRGTASIALH

- [0484] DLLAQRPDLPVPSQHQDHRGHPLRDATGAIQKKTALVPGCGRG
- [0485] HDVLLLSSWGYDVWGLDYSAAAKEEAIKNQKQAESEGLYMPV
- [0486] DGLDKGKIHWTIGNFFAQDWSKGAGDDGKFDLIYDYTFLCALP
- [0487] PDARPKWAKRMTELLSHDGRILCLEFPSTKPM SANGPPWGV SPE
- [0488] LYEALLAAPGEEIAYNDGTVHEDPCSKPWADALHRLSLLKPTR
- [0489] THKAGMSPEGAVMDFLSVWSR
- [0490] > GI|145228457|REF|XP_001388537.1|假定蛋白质, AN01G00930, [黑曲霉 (ASPERGILLUS NIGER)]
- [0491] MTTPTDNKFKDAQAYLAKHQGD SYLKGDLLWDKGDYLPWD
- [0492] RGFPNPALEDTLVERAGTIGGPIGPDGKRRKVLVPGCGRGVDVL
- [0493] LFASFGYDAYGLECSAAAVEACKKEEEKVNNIQYRVRDEKVGK
- [0494] GKITFVQGDFFDDAWLKEIGVPRNGFDVIYDYTFFCALNPELRP
- [0495] KWALRHTELLAPFPAGNLICLESPRHRDPLAPGPPFASPSEAYME
- [0496] HLSHPGEEISYNDKGLVDADPLREPSKAGLERVAYWQPERTHTV
- [0497] GKDKNGVIQDRVSIWRRRD
- [0498] > GI|121708664|REF|XP_001272206.1|硫醇甲基转移酶, 推定的, [棒曲霉 (ASPERGILLUS CLAVATUS) NRRL1]
- [0499] MSTPSLIPSGVHEVLAKYKDGNYVDGWAE LWDSKSGDRLPWD
- [0500] RGFPNPALEDTLIQKRAIIGGPLGQDAQGKTYRKKALVPGCGRG
- [0501] VDVLLLASFGYDAYGLEYSATAVDVCQEEQAKNGDQYPVRDAE
- [0502] IGQGKITFVQGDFFEDTWLEKLNLTRNCFDVIYDYTFFCALNPS
- [0503] MRPQWALRHTQLLADSPRGHLICLEFPRHKDPSVQGPPWGSASE
- [0504] AYRAHLSHPGEEIPYDASRQCQFDSSKAPSAQGLERVAYWQPER
- [0505] THEVGKNEKGEVQDRVSIWQRPPQSSL
- [0506] > GI|67539848|REF|XP_663698.1|假定蛋白质, AN6094.2, [构巢曲霉 (ASPERGILLUS NIDULANS) FGSC A4]
- [0507] MSSPSQQPIKGRLISHFENRPTSPHPKAWSDLWDSGKSSLWDRG
- [0508] MPSPALIDLLESYQDTLLHPFEIDIEDEEDS SDAGKTRKRKRALV
- [0509] PGCGRGYDVITFALHGFDACGLEVSTTAVSEARAFKKELCSPQ
- [0510] SGNFGRRFDRERARHIGVGKAQFLQGDFFTDTWIENESTGLDQG
- [0511] RTENGKFDLVYDYTFLCALHPAQRTRWAERMADLLRPGLLVC
- [0512] LEFPMYKDPALPGPPWGVNGIHWELLAGGDTGQGFTRKAYV
- [0513] QPERTFEVGRGTD MISVYERK
- [0514] > GI|121529427|REF|ZP_01662039.1|保守的假定蛋白质, [皮氏罗尔斯顿菌 (RALSTONIA PICKETTII) 12J]
- [0515] MAQPPVFQSRDAADPAFWDERFTREHTPWDAAGVPAAFRQFCE
- [0516] AQPAPLSTLIPGCGNAYEAGWLAERGWPVTAIDFAPS AVASARA
- [0517] VLGPHADVVLADFFRFSPRPVHWIYERAFLCAMP RRLWPDY
- [0518] AAQVAKLLPPRGLLAGFFAVVEGREAMPKGPPFETTQPELDALL

- [0519] SPAFERISDMPIAETDSIPVFAGRERWQVWRRRAD
- [0520] > GI|17545181|REF|NP_518583.1|假定蛋白质, RSC0462, [茄科雷尔氏菌 (RALSTONIA SOLANACEARUM) GMI1000]
- [0521] MAQPPVFTTRDAAAPAFWDERFSRDHMPWDAHGVPAPFRQFC
- [0522] EAQPAPLSTLIPGCGSAYEAGWLAERGWPVAAIDFAPS AVASAQA
- [0523] VLGPHAGVVELADFFRFTPRQPQWIYERAFLCAMPRLWADY
- [0524] ATQVARLLPPGGLLAGFFVVVDGRAAAPSGPPFEITAQEQEALLS
- [0525] PAFERIADALVPENESIPVFAGRERWQVWRRRAD
- [0526] > GI|83644186|REF|YP_432621.1|SAM-依赖性甲基转移酶, [HAHELLA CHEJUENSIS KCTC 2396]
- [0527] MDANFWHERWAENSIAFHQCEANPLLVAHFNRLDLAKGSRVFV
- [0528] PLCGKTLDISWLLSQGHRVVGCELEMAIEQFFKELGVTPAISEIV
- [0529] AGKRYSAENLDIIVGDDFDLTVETLGHVDATYDRAALVALPKPM
- [0530] RDSYAKHLMALTNNAPQLMLCYQYDQTMEGPPFSISAEVQH
- [0531] HYADSYALTALATVGVEGGLRELNEVSETVWLLESR
- [0532] >钩端螺菌属 (LEPTOSPIRILLUM SP.) II 组 UBAMPDKIFWNQRYLDKNTGWDLGQPAPPFVR
LVEKGEGFPGRVLIPGAGRSYEGIFLASRGYDVTCDVAFAPQAVREAREAAARQAGVKLTVEEDFFRLDPRTIGVFD
YLVEHTCFCAIDPPMRQAYVDQSHALLAPGGLLIGLFYAHGREGGPPWTTTEEEVRGLFGKKFDLLSLGLTDWSVDS
RKGEELLGRLRRKNDRIE
- [0533] > GI|37520387|REF|NP_923764.1|类似于硫醇甲基转移酶, [GLOEOBACTER VIOLACEUS PCC 7421]
- [0534] MPSEESSGVDQPAFWERYRGGQDRWDLGQPAPTFVHLLSGSE
- [0535] APPLGTVAVPGCGRGHDALLFAARGYKVCGFDAADA IADATR
- [0536] LALRAGAAATFLQQDLFNLPRPFAGLFDLVVEHTCFCAIDPVRR
- [0537] EEYVEIVHWLLKPGGELVAIFFAHPRPGPPYRTDAGEIERLFSR
- [0538] FKITALLPAPMSVPSRRGEELFGRFVRA
- [0539] > GI|86130841|REF|ZP_01049440.1|假定蛋白质, MED134_07976, [噬纤维菌属 (CELLULOPHAGA SP.) MED134]
- [0540] MELTSTYWNRYAEGSTGWDLKEVSPPIKAYLDQLENKELKILI
- [0541] PGGGYSYEAQYCWEQGFKNVYVVDFSQALLENLKQRVPDFPSL
- [0542] QLIQEDFFTYDGGFDVIEEQTFFCALQPDLPAYVAHMH TLLKAK
- [0543] GKLVLGLLFNPLTEKGPPYGGSTTEYESLSEHFDIQKMETAYNS
- [0544] VAARAGKELFIKMKVKK
- [0545] > GI|159875886|GB|EDP69945.1|假定蛋白质, FBALC1_10447, [黄杆菌 (FLAVOBACTERIALES BACTERIUM) ALC-1]
- [0546] MISMKKNKLDSDYWEDRYTKNSTSWDIGYPSTPIRTYIDQLKDK
- [0547] SLKILIPGAGNSFEAEYLWNLGFKNIYILDFAKQPLENFKKRLPDF
- [0548] PENQLLHIDFFKLDIHFDLILEQTFFCALNPSLREKYVEQMHQLL
- [0549] KPKGKLVGLFFNFPLTKSGPPFGGSLTEYQFLFDKKFKIKILETSI

- [0550] NSIKEREGKELFFIFESP
- [0551] > GI|149199821|REF|ZP_01876851.1| 硫醇甲基转移酶 1-样蛋白, [LENTISPHAERA ARANEOA HTCC2155]
- [0552] MRTKGNEKAESWDKIYREGNPGWDIKKPAPPFEDLFKQNP SWL
- [0553] KAGSLISFGCGGGHDANFFAQNDFNVTAVDFASEAVKLARSNYP
- [0554] QLNVIQKNILELSPEYDEQFDYVLEHTCFCAVPLDHRRAYMESA
- [0555] HAILKAGAYLFGLFYRFDPDQDGPYSLSLEDLEDAYSGLFTLE
- [0556] ENAIPKRSHGRRTQRERFIVLKKI
- [0557] > GI|71066354|REF|YP_265081.1| 假定蛋白质, PSYC_1799, [北极嗜冷杆菌 (PSYCHROBACTER ARCTICUS) 273-4]
- [0558] MGNVNQAEFWQQRYEQDSIGWDMGQVSPPLKVYIDQLPEAAK
- [0559] EQAVLVPGAGNAYEVGYLYEQGFTNITLVDFAPAPIKDEAERYPD
- [0560] FPADKLICADFFDLLPKQHFDWVLEQTFFCAINPARRDEYVQQ
- [0561] MARLLKPKGQLVGLLFDKDFGRNEPPFGGTKEEYQQRFSTHFD
- [0562] TEIMEQSYNSHPARQGSELFIKMRVKD
- [0563] > GI|86135149|REF|ZP_01053731.1| 假定蛋白质, MED152_10555, [黏着杆菌属 (TENACIBACULUM SP.) MED152]
- [0564] MIFDEQFWDNKYITNKTGWDLGQVSPPLKAYFDQLTNKDLKILI
- [0565] PGGGNSHEAEYLLENGFTNVYVIDISKLALTNLKNRVPGFPS SNL
- [0566] IHQNFELNQTFDLVIEQTFFCALPNLREEYVSKMHSVLNDNG
- [0567] KLVGLLFD AKLNEDHPPFGGSKKEYTSLFRNLFTIEVLEECYNSI
- [0568] ENRKGMELFCKFVK
- [0569] > GI|93006905|REF|YP_581342.1| 巯基嘌呤 S-甲基转移酶, [PSYCHROBACTER CRYOHALOLENTIS K5]
- [0570] MENVNQAQFWQQRYEQD SIGWDMGQVSPPLKAYIDQLPEAAK
- [0571] NQAVLVPGAGNAYEVGYLHEQGFTNVTLVDFAPAPIAAFAERYP
- [0572] NFP AKHLICADFFELSPEQYQFDWVLEQTFFCAINPSRRDEYVQ
- [0573] QMASLVKPNGKLIGLLFDKDFGRDEPPFGGTKEYYQQRFATHFD
- [0574] IDIMEPSYNSHPARQGSELFIE MHVKD
- [0575] > GI|114778202|REF|ZP_01453074.1| 硫代甲基转移酶 1-样蛋白, [铁氧化深海菌 (MARIPROFUNDUS FERROXYDANS) PV-I]
- [0576] MTVWEERYQRGETGWD RGGVSPALTQLVDHLHLEARVLI
- [0577] PGCGRGHEVIELARLGFRVTAIDIAPSAIAHLSQQLEQEDLDAEL
- [0578] VNGDLFAYAPDHCFDAVYEQTCLCAIEPEQRADYEQRLHGWLK
- [0579] PEGVLYALFMQTGIRGGPPFHCDLLMMRELFDASRWQWPEETG
- [0580] AVLVP HKNGRFELGHMLRRTGR
- [0581] > GI|83855599|REF|ZP_00949128.1| 假定蛋白质, CA2559_00890, [CROCEIBACTER ATLANTICUS HTCC2559]
- [0582] MTSNFWEQRYANNNTGWDLNTVSPPLKHYI DTLSNKT LFI LI

- [0583] PGCGNAYEAEYLHNQGFENVFIVDLAEHPLLEFSKRVPDFPKSHI
- [0584] LHLDFFNLTQKFDLILEQTFFCALHPEQRLHYAHHTSKLLNSNGC
- [0585] LVGLFFNKEFDKTGPPFGGNKKEYKNLFFKNLFFKIKKLENCYNSI
- [0586] KPRQGSSELFIFEKK
- [0587] > GI|83858455|REF|ZP_00951977.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [OCEANICAULIS ALEXANDRII HTCC2633]
- [0588] MTQAS SDTPRSEDRSGFDWESRFQSDDAPWERQGVHPAAQDW
- [0589] VRNGEIKPGQAILTPGCGRSQEPALASRGFDVTATDIAPTAIAW
- [0590] QKTRFQTLGVMAEAIETDALAWRPETGFDALYEQTFLCAIHPKR
- [0591] RQDYEAAMAHASLSGGKLLALFMQAEMGGPPYGCGLDAMR
- [0592] ELFADTRVWVPDGEARPYPHPGLNAKAELAMVLIRR
- [0593] > GI|113866478|REF|YP_724967.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶 (TPMT), [真氧产碱杆菌 (RALSTONIA EUTROPHA) H16]
- [0594] MSDPAKPVPTFATRNaADPAFWDERFEQGFTPWDQGGVPEEFR
- [0595] QFIEGRAPCPTLVPGCGNGWEAAWLFERGWPTAIDFSPQAVAS
- [0596] ARQTLGPAGVVVQGGDFFAFTPQPPCELIYERAFLCALPPAMRA
- [0597] DYAAARVAQLLPGGLLAGYFYLGENRGPPFAMPAEALDALLAP
- [0598] AFERLEDRPTAAPLPVFQGGQERWQVWRRRSG
- [0599] > GI|150025500|REF|YP_001296326.1| 假定蛋白质, FP1441, [嗜冷黄杆菌 (FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM) JIP02/86]
- [0600] MKKIDQKYWQNRYQTNDIAWDTGKITTPIKAYIDQIEDQSIKILI
- [0601] PGCGNGYEYELIKKGFYNSFVADYAQTPIIDNLKKRIPNCNANQ
- [0602] LLISDFFELEGSYDLIEQTFFCALNPELRVKYAQKMLSLLSPKGG
- [0603] IIGLLFQFPLTEAGPPFGGSKEEYKLKFSTNFNIKTETAYNSIKPRE
- [0604] GNELFFIFTKK
- [0605] > GI|124268594|REF|YP_001022598.1| 假定蛋白质, MPE_A3410 [METHYLBIUM PETROLEIPHILUM PM1]
- [0606] MSGPDLNFWQQRFDTGQLPWDRGAPSPQLAAWLGDSLAPGR
- [0607] IAVPGCGSGHEVVALARGGFSVTAIDYAPGAVRLTQGRLAAGL
- [0608] AAEVVQADVLTWQPTAPLDAVYEQTCLCALHPDHWVAYAAARL
- [0609] HAWLRPGGTLALLAMQALREGAGQGLIEGPPYHVDVNALRAL
- [0610] LPGDRWDWPRPPYARVPHPSSTWAEIAIVLTRR
- [0611] > GI|86141349|REF|ZP_01059895.1| 假定蛋白质, MED217_05007, [黄杆菌 (FLAVOBACTERIUM SP.) MED217]
- [0612] MKTDLNKLWEDRYQNQQTGWDIGSVSTPLKEYIDQIDDKNIQI
- [0613] LVPAGYGGHEVRYLAQQGFKNVDVIDLSVSALTQLKKALPDTT
- [0614] AYQLIEGDFFEHHTSYDLILEQTFFCALEPDKRPDYAAHAASLLK
- [0615] DSGKISGVLFNFPLTEKGPPFGGSSEYKKLFSEYFNIKTLEACY
- [0616] NSIKPRLGNELFFIFEKSNQES

- [0617] > GI|124003356|REF|ZP_01688206.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶 (TPMT) 超家族, [海洋微颤菌 (MICROSCILLA MARINA) ATCC23134]
- [0618] MHTTLDKDFWSNRYQAQDTGWDAGSITTPIKAYVDQLEDKHL
- [0619] KILVPGAGNSHEAEYLHQGGFTNVTVIDIVQAPLDNLKSRSPDFP
- [0620] EAHLLQGDFELVGQYDLIIETFFCALNPSLRESYVQVKVSLK
- [0621] PEGKLVGVLFNCVFLDRTEPPFGATEQQHQEYFLPHFIAKHFASC
- [0622] YNSIAPRQGAEWFI CLIND
- [0623] > GI|151577463|GB|EDN41864.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [皮氏罗尔斯顿菌 (RALSTONIA PICKETTII) 12D]
- [0624] MAEPPVFQSRDAADPAFWDERFSREHTPWDAAGVPAAFQQFCE
- [0625] SQPVPLSTLIPGCGSAYEAGWLAERGWPVTAIDFAPS AVASARAV
- [0626] LGPHADVEMADFFGFSPARSVQWIYERAF LCAMPRLWPDYA
- [0627] AQVAKLLPPGGLLAGFFAVVEGREAVPKGPPFETTQPELDALLSP
- [0628] AFERISDIPIAEADSIPVFAGRERWQVWRRRAD
- [0629] > GI|121303859|GB|EAX44825.1| 保守的假定蛋白质, [皮氏罗尔斯顿菌 (RALSTONIA PICKETTII) 12J]
- [0630] MAQPPVFQSRDAADPAFWDERFTREHTPWDAAGVPAAFRQFCE
- [0631] AQPAPLSTLIPGCGNAYEAGWLAERGWPVTAIDFAPS AVASARA
- [0632] VLGPHADVVLADFFRF SPVRPVHWIYERAF LCAMPRLWPDY
- [0633] AAQVAKLLPPRGLLAGFFAVVEGREAMPKGPPFETTQPELDALL
- [0634] SPAFERISDMPIAETDSIPVFAGRERWQVWRRRAD
- [0635] > GI|121583316|REF|YP_973752.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [噬萘极地单胞菌 (POLAROMONAS NAPHTHALENIVORANS) CJ2]
- [0636] MAGPTTDFWQARFDNKETGWD RGAPGPQLLAWLESGALQPCR
- [0637] IAVPGCGSGWEVAELARRGFVVGDYTPAAVERTRALLAAQGL
- [0638] AAEVVQADV LAYQPHKPFEAIYEQTCLCALHPDHWVAYARQLQ
- [0639] QWLKPQSGSIWALFMQMRPEATDEGLIQGPPYHCDINAMRALF
- [0640] PAQHWAWPRPPYAKVPHPNVGHELGLRLMLRQGR
- [0641] > GI|88802008|REF|ZP_01117536.1| 假定蛋白质, PI23P_05077, [伊氏极地杆菌 (POLARIBACTER IRGENSII) 23-P]
- [0642] MNLSADA WDERYTNNDIAWDLGEVSSPLKAYFDQLENKEIKILI
- [0643] PGGGNSHEAAYLFENGFKNIWVVDLSETAIGNIQKRIPEFPQS LI
- [0644] QGDFFNMDVDVFDLIIETFFCAINPNLRADYTTKMHHLLKSKGK
- [0645] LVGVLFNVPLNTNKPPFGGDKSEYLEYFKPFFIIKKMEACYN SFG
- [0646] NRKGREL FVILRSK
- [0647] > GI|126661882|REF|ZP_01732881.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [黄杆菌 (FLAVOBACTERIABACTERIUM) BAL38]
- [0648] MNYWEERYKKGETGWDAGTITTP LKEYIDQLTDKNLTILIPGAG
- [0649] NGHEFDYLIDNGFKNVFVVDIAITPLENIKKRKPKYSSHLINADF

- [0650] FSLTTTDFDLILEQTFFCALPPEMRQRYVEKMTSLLNPNGKLAGLL
- [0651] FDFPLTSEGPPFGGSKSEYITLFSNTFSIKTLERAYNSIKPRENKEL
- [0652] FFIFETK
- [0653] > GI|149924142|REF|ZP_01912520.1|假定蛋白质,PPSIR1_29093,[太平洋近囊菌 (PLESIOCYSTIS PACIFICA) SIR-I]
- [0654] MRVIVPGAGVGHDALAWAQAGHEVVALDFAPAAVARLRERAAE
- [0655] AGLTIEAHVADVTNPGPALNDGLGGRFDLVWEQTCLCAITPELR
- [0656] GAYLAQARSWLTDPGSMALLWNTGNEGPPYDMPPELVERL
- [0657] MTGLFVIDKFAPVTGSNPNRREHLYWLRPEPT
- [0658] > GI|126647682|REF|ZP_01720187.1|假定蛋白质,ALPR1_06920,[噬冷菌 (ALGORIPHAGUS SP) PR1]
- [0659] MAELDEKYWSERYKSGLTGWDIGFPSTPIVQYLDQIVNKDVEILI
- [0660] PGAGNAYEAYYAFQSGFSNVHVLDISQEPLRNFKDKFPNFPSSNL
- [0661] HHGDFFEHHGSYNLILEQTFFCALNPSLRPKYVKKMSELLKGG
- [0662] KLVGLLFNKEFNSPGPPFGGGIKEYQKLFHNSFEIDVMEECYNSI
- [0663] PARAGSEAFIRLINSKG
- [0664] > GI|89900214|REF|YP_522685.1|巯基嘌呤 S- 甲基转移酶,[铁还原红育菌 (RHODOFERAX FERRIREDUCTENS) T118]
- [0665] MAGPTTEFWQERFEKKETGWDGSPSPQLLAWLASGALRPCRI
- [0666] AVPGCGSGWEVAELAQRGFDVVGLDYTAAATTRTRALCDARGL
- [0667] KAEVLQADVLSYQPEKKFAAIYEQTCLCAIHPDHWIDYARQLH
- [0668] QWLEPQGSLWVLFQMIRPAATEGLIQGPPYHCDINAMRALFP
- [0669] QKDWWPKPPYARVSHPNL SHELALQLVRR
- [0670] > GI|17545181|REF|NP_518583.1|假定蛋白质,RSC0462,[茄科雷尔氏菌 (RALSTONIA SOLANACEARUM) GMI 1000]
- [0671] MAQPPVFTTRDAAAPAFWDERFSRDHMPWDAHGVPPAFRQFC
- [0672] EAQPAPLSTLIPGCGSAYEAGWLAERGWPVAAIDFAPS AVASAQA
- [0673] VLGPAGVVELADFFRFTPRQPQWIYERAFLCAMPRLWADY
- [0674] ATQVARLLPPGGLLAGFFVVVDGAAAPSGPPFEITAQEQEALLS
- [0675] PAFERIADALVPENESIPVFAGRERWQVWRRRAD
- [0676] > GI|120436745|REF|YP_862431.1|巯基嘌呤 S- 甲基转移酶,[弗塞特革兰菌 (GRAMELLA FORSETII) KT0803]
- [0677] MNKDFWSLRQKGN TGWDIGNISTPLKEYIDHLHKKELKILIPG
- [0678] AGNSYEA EYLF EKGFKNIWICDIAKEPIENFKKRLPEFPESQILNR
- [0679] DFFELKDQFDLILEQTFFCALPVNFRENYAKKVFELLKVNGKISG
- [0680] VLDFDFPLTPDGPPFGGSKEEYLAYFSPYFKINTFERCYNSINPRQG
- [0681] KELFFNFSKK
- [0682] > GI|86159623|REF|YP_466408.1|12 型甲基转移酶,[脱卤厌氧粘球菌 (ANAEROMYXOBACTER DEHALOGENANS) 2CP-C]

- [0683] MGTSYRLAYLIGFTPWEDQPLPPELSALVEGLRARPPGRALDLG
- [0684] CGRGAAHVYLASHGWKVTGVDLVPAALAKARQRATDAGVDV
- [0685] QFLDGDVTRLDTLGLSPGYDLLLLDAGCFHGLSDPERAAYARGV
- [0686] TALRAPRAAMLLFAFKPGWRGPAPRGASAEDLTSAFGPSWRLV
- [0687] RSERARESRLPLPLRNADPRWHLLEAA
- [0688] > GI|118468119|REF|YP_886428.1|12 型甲基转移酶, [耻垢分枝杆菌菌系 (MYCOBACTERIUM SMEGMATIS STR.)MC2155]
- [0689] MDTTPTRELFD EAYESRTAPWVIGEPQPAVVELERAGLIRSRVLD
- [0690] VGCGAGEHTILLTRLGYDVLGIDFSPQAITEMARENARGRGVDAR
- [0691] FAVGDAMALGDLGDGAYDTILDSALFHIFDDADRQTYVASLHA
- [0692] GCRPGGTVHILALSDAGRGFGPEVSEEQIRKAFGDGWDLEALET
- [0693] TTYRGVVGPVHAEAIGLPVGTQVDEPAWLARARRL
- [0694] > GI|119504877|REF|ZP_01626954.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [海洋 Y 蛋白菌 (MARINE GAMMA PROTEOBACTERIUM)HTCC2080]
- [0695] MEKFGASAMEPVL DWEARYQESSVPWERTGLNPAFVAWQSWL
- [0696] RDHQGGTVVVPGCGRSPELQAFADMGFNVIGVDLSPSAAQFQE
- [0697] TVLAAKGLDGKLVVSNLFDWSPDTPVDFVYEQTCLCALCPDH
- [0698] WRAYENLLTRWLRPGGTLLALFMQTGESGGPPFHCGKAAMEQ
- [0699] LFSEQRWIWD ETSVRSEHPLGVHELGFRLTLR
- [0700] > GI|161325846|GB|EDP97172.1| 假定蛋白质, KAOT1_18457, [KQRDIA ALGICIDA OT-1]
- [0701] MNSDATKEYWSQRYKDNSTGWDIGSPSTPLKTYIDQLKDRNLKI
- [0702] LIPGAGNAYEA EYLLQQGFTNIYILDISEIPLQEFKQRNPEFPSDR
- [0703] LLCDDFFTHKNTYDLIEQTFFCSFPPLPETRAQYAKHMADLLNP
- [0704] NGKLVGLWFDPLTDDLEKRPFGGSKEEYLEYFKPYFDVKTFEK
- [0705] AYNSIAPRAGNELFGIFIKS
- [0706] > GI|150389542|REF|YP_001319591.1|11 型甲基转移酶, [嗜碱菌 (ALKALIPHILUS METALLIREDIGENS)QYMF]
- [0707] MNDKLDQEVILNQEDLLNMLDSLLEKWDEEWWNEFYSDKGKP
- [0708] IPFFVNAPDENLV TYFDKYFDDIGRALDVGCNGRNSRFIASRG
- [0709] YDVEGLDFS KKSIEWAKEESKKTGDIALYVND SFFNINRELSSYD
- [0710] LIYDSGCLHHIKPHRRSQYLEKVHRL LKPGGYFGLVCFNLKGA
- [0711] NLSHDH VYKKS SMAGGLGYSDIKLKKILGTYFEIVEFREMRECA
- [0712] DNALYGKD ICWSILMRRLAK
- [0713] > GI|71024813|REF|XP_762636.1| 假定蛋白质, UM06489.1, [玉米黑粉菌 (USTILAGO MAYDIS)521]
- [0714] MTSSLSKDDQIQNLRR LFADSGVPNDPKAWDQAWIDSTTPWDA
- [0715] NRPQPALVELLEG AHDAKVPDVG NLI PVSAIPKGDGTAVV
- [0716] PGCGRGYDARVFAERGLTSYGVDISSNAVA AANKWLGDQDLPT

- [0717] ELDDKVNFAEADFFTLGTSKSLVLELSKPGQATLAYDYTFLLCAIP
- [0718] PSLRTTWAETYTRLLAKHGVLIALVFP IHGDRPGGPPFSISPQLVR
- [0719] ELLGSQKNADGSAAWTELVELKPKGPETRPDVERMMVWRRS
- [0720] > GI|20090980|REF|NP_617055.1| 假定蛋白质, MA2137, [噬乙酸甲烷八叠球菌 (METHANOSARCINA ACETIVORANS) C2A]
- [0721] MFWDEVYKGTTPWDIDHPQPAFQALIESGEIRPGRALDIGCGRG
- [0722] ENAIMLAKNGCDVTGIDLAKDAI SDAKAKAIERHVKVNFIVGN
- [0723] VLEMDQLFTEDEFDVIDSGLFHVITDEERLLFTRHVHVKVLKEGG
- [0724] KYFMLCFSDKEPGEYELPRRASKAEIESTFSPLFNIIYIKDVIFDSL
- [0725] LNPGRQAYLLSATKS
- [0726] >嗜盐嗜盐红螺菌 (HALORHODOSPIRA HALOPHILA)
- [0727] SL1MSGDPDPRRAPWEARWREGRTGWDRGGVSPTEAWLSAG
- [0728] VIPGRRVLVPGAGRGYEVEALARRGYKVTAVDIAAEACQQLRD
- [0729] GLDAAGVEARVVQADLLAWQPDTPFDVYEQTCLCALDPADW
- [0730] PAYEQRLYGWLRPGGVLLALFMQTGASGGPPFHCALPEMATLF
- [0731] DSERWQWPAEPPRQWPHPSGRWEEAVRLLRR
- [0732] > GI|54295659|REF|YP_128074.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [嗜肺性军团菌菌系 (LEGIONELLAPNEUMOPHILA STR.) LENS]
- [0733] MNKGQYFWNELWCEGRISFHKKEVNPDLIAYVS SLNIPAKGRVL
- [0734] VPLCGKSVDMLWLVRQGYHVVGIELVEKAILQFVQEHQITVRE
- [0735] NTIGQAKQYFTDNLNLWVTDIFALNSALIEPVDAIYDRAALVALP
- [0736] KKL RPAYVDICLKWLKPGGSILLKTLQYNQEKVQGPYSVSPEEI
- [0737] ALSYQQCAKIKLLKSQKRIQEPNDHLFNFNGISEVNSVWCIRKG
- [0738] > GI|116187307|REF|ZP_01477195.1| 假定蛋白质, VEX2W_02000031, [弧菌属 (VIBRIO SP.) EX25]
- [0739] MKQAPTINQQFWDNLFTQGTMPWDAKTPQELKAYLENALHS
- [0740] GQSVFIPGCGAAYELSSFIQYGHDIAMDYSEQAVKMAQSTLGK
- [0741] HKDKVVLGDVFNADSTHSFDVIYERAFLAALPRDQWPEYFAMV
- [0742] DKLLPRGGLLIGYFVIDDDYHSRFPFCLRSGELEGYLEPVFKLV
- [0743] ESSVVANSVEVFKGRERWMVWQKSCRI
- [0744] > GI|120402886|REF|YP_952715.1|11 型 甲 基 转 移 酶, [范氏分枝杆菌 (MYCQBACTERIUM VANBAALENII) PYR-I]
- [0745] MDLTPRLSRFDEFYKNQTPPWVIGEPQQAIVELEQAGLIGGRVL
- [0746] DVGCGTGEHTILLARAGYDVLGIDGAPTAVEQARRNAEAQGVD
- [0747] ARFELADALHLGPDPTYDTIVDSALFHIFDDADRATYVRS LHAA
- [0748] TRPGSVVHLLALSDSGRGFGPEVSEHTIRAAFGAGWEVEALTET
- [0749] TYRGVVIDAHTALNLPAGTVVDEPAWSARIRRL
- [0750] > GI|134101246|REF|YP_001106907.1|6-O- 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 [糖多孢红霉菌 (SACCHAROPOLYSPORA ERYTHRAEA) NRRL 2338]

- [0751] MDDELAESQRAHWQDTYSAHPGMYGEEPSAPAVHAAGVFRAA
- [0752] GARDVLELGAGHGRDALHFAREGFTVQALDFSSSLQQLRDAA
- [0753] RAQQVEQRVTTAVHDVRHPLPSADASVDAVFAHMLLCMALSTE
- [0754] EIHALVGEIHRVLRPGGVLVYTVRHTGDAHHGTGVAHGDDIFEH
- [0755] DGFVHFHFRGLVDLADGWTLDVHAFEEGDLPRRLWRVTQT
- [0756] LPR
- [0757] > 肿块伯克氏菌 (BURKHOLDERIA PHYMATUM) STM815 (与盐草 (BATIC) 具有 29% 的同一性)
- [0758] MSDKRPSVPPSAPDFENRDPNAPGFWDERFGRGFTPWDQAGVP
- [0759] PAFKAFVERHSPVPVLIPGCGSAYEARWLAKEGWTVRAIDFAPN
- [0760] AVEAARAQLGSHASLVHEADFFTYRPPFDPGWIYERAFICALPP
- [0761] ARRSDWVARMAQLLSPGGLLAGFFFIGATEKGPPFGIERAELDA
- [0762] LMSPDFTLVEDEPVDDSIADFAGRERWLTWRRRGAARG
- [0763] > GI|91781799|REF|YP_557005.1| 假定蛋白质, BXE_A4046, [伯克氏菌 (BURKHOLDERIA XENOVORANS) LB400]
- [0764] MSDPTQPAVPDFETRDPNSPAFWDERFERRFTPWDQAGVPAAFQ
- [0765] SFAARHSGAAVLIPGCGSAYEAVWLAGQGNPVRAIDFSPAATAA
- [0766] AHEQLGAQHAQLVEQADFF TYEPPFTPAWIYERAFICALPLARR
- [0767] ADYAHRMADLLPGGALLAGFFFLGATPKGPPFGIERAELDALLT
- [0768] PYFDLIEDEAVHDSIAVFAGRERWLTWRRRA
- [0769] > GI|118038664|REF|ZP_01510068.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [吩嗪伯克氏菌 (BURKHOLDERIA PHYTOFIRMANS) PSJN]
- [0770] MSDPTQPSAPEFESRDPNSPEFWDERFERGFMPWDQAGVPSAFE
- [0771] SFAARHAGAAVLIPGCGSAYEAVWLAGHGYPVRAIDFSPAATAA
- [0772] AHEQLGAQHADLVEQADFFTYELPFTPAWIYERAFICALPLARR
- [0773] ADYARRMADLLPGGALLAGFFFIGATPKGPPFGIERAELDGLLKP
- [0774] YFELIEDEPVHDSIAVFAGRERWLTWRRRV
- [0775] > GI|83719252|REF|YP_441114.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶家族蛋白, [泰国伯克氏菌 (BURKHOLDERIA THAILANDENSIS) E264]
- [0776] MTSEANKGDAAVQAAGDAQPASPPSADVQPARAALAPSSV
- [0777] PPAPSAANFASRDPGDASFWDERFERGVTPWDSARVPDAFAAFA
- [0778] ARHPRCPVLIPGCGSAYEARWLARAGWPVRAIDFSAQAVAAAR
- [0779] RESGADAALVEQADFFAYVPPFVPQWIYERAFICALPTSRRADY
- [0780] ARVAELLAPAGFLAGFFFIGATPKGPPFGIERAELDALLSPNFEL
- [0781] VEDEPVADSLPVFAGRERWLAWRRS
- [0782] > GI|134296925|REF|YP_001120660.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [越南伯克氏菌 (BURKHOLDERIA VIETNAMIENSIS) G4]
- [0783] MSNPTQPPPPSAADFATRDPANASFWDERFARGVTPWEFGGVPD
- [0784] GFRAFAQRRAPCTVLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAEQ

- [0785] AVVAAKATLGAHADVVEQADFFAYQPPFVVQWVYERAFLCALP
- [0786] PSLRAGYAARMAELLPAGGLLAGYFFVMKKPKGPPFGIERAELD
- [0787] ALLAP SFELIEDLPVTDSLAVFDGHERWLTWRRR
- [0788] > GI|118707586|REF|ZP_01560172.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [新洋葱伯克氏菌 (BURKHOLDERIA CENOCEPACIA) MCO-3]
- [0789] MSDPKQPAAPSAAEFATRDPGSASFWDERFARGVTPWEFGGVP
- [0790] DGFRAFAQRHEPCAVLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAA
- [0791] QAVAAAKVQLGAHADVVEQADFFQYRPPFDVQWVYERAFLLCA
- [0792] LPPSLRADYAARMAELLPTGGLLAGYFFVVAKPKGPPFGIERAE
- [0793] LDALLAPHFELLEDLPVTDSLAVFDGHERWLTWRRR
- [0794] > GI|53724994|REF|YP_102027.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶家族蛋白, [鼻疽伯克氏菌 (BURKHOLDERIA MALLEI) ATCC 23344]
- [0795] MKDRLMSQGDGVTNEANQPEAAGQAAGDAQPASPAGPAHIAN
- [0796] PANPANPPALPSFSPAAAASSASSAAPFSSRDPGDASFWDERFEQ
- [0797] GVTPWDSARVPDAFAARHARVPVLIPGCGSAYEARWLARAGWP
- [0798] VRAIDFSAQAVAAARRELGEDAGLVEQADFFTYAPPFVPQWIYE
- [0799] RAFLCAIPRSRRADYARRMAELLPPGGFLAGFFFIGATPKGPPFGI
- [0800] ERAELDALLCPHFALVEDEPVADSLPVFAGRERWLAWRRS
- [0801] > GI|76808612|REF|YP_332262.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶家族蛋白, [类鼻疽伯克氏菌 (BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI) 1710B]
- [0802] MKDRLMSQGDGVTNEANQPEAAGQATGDAQPASPAGPAHIANP
- [0803] ANPANPANPPALPSLSPAAAAPSSASSAAHFSSRDPGDASFWDER
- [0804] FEQGVTPWDSARVPDAFAAFAARHARVPVLIPGCGSAYEARWL
- [0805] ARAGWPVRAIDFSAQAVAAARRELGEDAGLVEQADFFTYAPPF
- [0806] VPQWIYERAFLLCAIPRSRRADYARRMAELLPPGGFLAGFFFIGAT
- [0807] PKGPPFGIERAELDALLCPHFALVEDEPVADSLPVFAGRERWLA
- [0808] WRRS
- [0809] > GI|107023663|REF|YP_621990.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [新洋葱伯克氏菌 (BURKHOLDERIA CENOCEPACIA) AU 1054]
- [0810] MSDPKQPAAPSAADFATRDPGSASFWDERFARGVTPWEFGGVP
- [0811] DGFVRFAQRREPCAVLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAA
- [0812] QAVAAAKAQLGAHADVVEQADFFQYRPPFDVQWVYERAFLLCA
- [0813] LPPGLRAGYAARMAELLPTGGLLAGYFFVVAKPKGPPFGIERAE
- [0814] LDALLAPHFELLEDLPVTDSLAVFDGHERWLTWRRR
- [0815] > GI|84362923|REF|ZP_00987534.1| COG0500 :SAM 依赖性甲基转移酶, [勉强伯克氏菌 (BURKHOLDERIA DOLOSA) AU0158]
- [0816] MTGRSFAMSDPKQPGTPTAADFATRDPGDASFWDERFARGVTP
- [0817] WEFGGVPDGFRAFAQRLERCAVLIPGCGSAQEAGWLADAGWP
- [0818] VRAIDFAAQAVATAKAQLGAHADVVVELADFFTYRPPFDVRWIYE

- [0819] RAFLCALPPARRADYAAQMAALLPAGGLLAGYFFVTAKPKGPP
- [0820] FGIERAELDALLAPQFDLIDDWPVTDSPVFEGHERWLTWRRR
- [0821] > GI|115352830|REF|YP_774669.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [不明确伯克氏菌 (BURKHOLDERIA AMBIFARIA) AMMD]
- [0822] MSEPQKQPSTPGAADFATRDPGDASFWDERFARGVTPWEFGGVP
- [0823] EGFRAFAQRLGPCAVLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAA
- [0824] QAVAAAKAQLGAHADVVEQADFFMYRPPFDVQWVYERAFLCA
- [0825] LPPSLRAGYAARMAELLPAGALLAGYFFVTKKPKGPPFGIERAE
- [0826] LDALLAPHFELIDDLPVTDSLAVFEGHERWLTWRRR
- [0827] > GI|78067524|REF|YP_370293.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [伯克氏菌 (BURKHOLDERIA SP.) 383]
- [0828] MSDPKQPKPNAPAAADFTTRDPGNASFWNERFERGVTPWEFGG
- [0829] VPEGFSVFAHRLELCAVLIPGCGSAQEAGWLAEGWPVRAIDFA
- [0830] AQAVAAAKAQLGAHAGVVEQADFFAYRPPFDVQWVYERAFLC
- [0831] ALPPAMRADYAAARMAELLPADGLLAGYFFLMAKPKGPPFGIER
- [0832] AELDALLTPHFELIEDLPVTDSLAVFEGHERWLTWRRR
- [0833] > GI|161523751|REF|YP_001578763.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶 [多噬伯克氏菌 (BURKHOLDERIA MULTIVORANS) ATCC 17616]
- [0834] MSDPKHAAAPAAASFETRDPGDASFWDERFARGMTPWEFGGVP
- [0835] AGFRAFASARPPCAVLIPGCGSAREAGWLAQAGWPVRAIDFSA
- [0836] QAVAAAKAQLGAHADVVEQADFFAYRPPFDVQWIYERAFLCAL
- [0837] PPARRADYAAATMAALLPAQGLLAGYFFVADKQKGPFGITRGEL
- [0838] DALLGAHFELIDDPVSDSLPVFEGHERWLAWRRR
- [0839] > GI|84355663|REF|ZP_00980538.1| COG0500 :SAM- 依赖性甲基转移酶, [新洋葱伯克氏菌 (BURKHOLDERIA CENOCEPACIA) PC184]
- [0840] MLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAAQAVAAAKAQLGAH
- [0841] ADVVEQADFFAYRPPFDVQWVYERAFLCALPPSLRAGYAARMA
- [0842] ELLPTGGLLAGYFFVVAKPKGPPFGIEPAELDALLAPHFALLEDL
- [0843] PVTDSLAVFDGHERWLTWRRR
- [0844] > GI|116187307|REF|ZP_01477195.1| 假定蛋白质, VEX2W_02000031, [弧菌属 (VIBRIO SP.) EX25]
- [0845] MKQAPTINQQFWDNLFTQGTMPWDAKTPQELKAYLENALHS
- [0846] GQSVFIPGCGAAYELSSFIQYGHDIAMDYSEQAVKMAQSTLGK
- [0847] HKDKVVLGDVFNADSTHSFDVIYERAFLAALPRDQWPEYFAMV
- [0848] DKLLPRGGLLIGYFVIDDDYHSRFPFCLRSGELEGYLEPVFKLV
- [0849] ESSVVANSVEVFKGRERWMVWQKSRI
- [0850] > GI|28901001|REF|NP_800656.1| 假定蛋白质, VPA1146, [副溶血弧菌 (VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS) RIMD 2210633]
- [0851] MKSKDSPIINEQFWDALFFNGTMPWDRSQTPNELKHYLKRIAD

- [0852] KTHSVFIPGCGAAYEVSHFVDCGHDVIAMDYSAEAVNLAKSQL
- [0853] GQHQDKVMLGDVFNADFSREFDVIYERAFLAALPREIWGDYFA
- [0854] MIERLLPSNGLLVGYFVISDDYRSRFPFCLRSGEIEQKLEANFHL
- [0855] IESTPVTDSVDVFKGKEQWMVWQKK
- [0856] > GI|91224783|REF|ZP_01260043.1| 假定蛋白质, V12G01_01280, [溶藻弧菌 (VIBRIO ALGINOLYTICUS) 12G01]
- [0857] MKQAPMINTQFWDRLFIRGTMPWDAQSTPQELKDYLDNSLHV
- [0858] GQSVFIPGCGAAYELSTFIQYGHDIAMDYSQEA VKMAQSALG
- [0859] NYKDKVVLGDVFNADFSHSFDVIYERAFLAALPRDMWSEYFST
- [0860] VDKLLPSGGFLIGFFVIDDDYCSRFPPFCLRS GELASFLEPTFELV
- [0861] KSSVVANSVEVFKGREQWMVWQKR
- [0862] > 细长聚球藻 (SYNECHOCOCCUS ELONGATUS) PCC
- [0863] 6301MTNAVNQAQFWEQRYQEGSDRWDLGQAAPVWRSLLAGT
- [0864] NAPAPGRIAVLGCGRGH DARLFAEQGFVVGFD FAPSAIAAAQA
- [0865] LAQGTTAQFLQRDIFALPQEFAGQFDTVLEHTCFCAIDPDRRAEY
- [0866] VEVVRQILKPKGCLLGLFWCHDRPSGPPYGCSLTELDRDFAQG
- [0867] WQEEQLESVTESVEGRRGEEYLGWRRLD
- [0868] > GI|148239221|REF|YP_001224608.1| 可能的巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [聚球藻 (SYNECHOCOCCUS SP.) WH 7803]
- [0869] MTNVHLPQAWDARYQHGTG WELGKAAPPLQAFLEHHPRAPQ
- [0870] PEGTVLVPGCGRGHEAALLARLGFEVIGLDFSSEAI REARRLHGE
- [0871] HPRLRWLQADLFDADALSGAGLASGSLSGVLEHTCFCAIDPSQR
- [0872] AHYRSTVDRLLRAEGWLLGLFFCHPRPGGPPFGSDPEQLAASW
- [0873] AQIGFYPLIWEPARGSVAGRSEEWLGFWRKPEQRSA
- [0874] > GI|87124194|REF|ZP_01080043.1| 巯基甲基转移酶 1- 样蛋白, [聚球藻 (SYNECHOCOCCUS SP.) RS9917]
- [0875] MQLDGASSAPTLTARDWDARYRQGTDRWELGMAAPPLQAFLE
- [0876] QHPLAPKPTGTVLVPGCGRGHEAALLARLGFDVVGLDFSVEAIR
- [0877] EARRLQGEHENLRWLQADLFNGAALDRAGLGAHSLSGVVEHT
- [0878] CFCAIDPSQRDHYRSTVDRLLLEPGGWLLGVFFCHDRPGGPPYGS
- [0879] DAEQLAASWSQIGFTGVIWEP AQGSVAQRSDEWLGLWRKPSQA
- [0880] DNEAIPAGSR
- [0881] > GI|87124194|REF|ZP_01080043.1| 巯基甲基转移酶 1- 样蛋白, [聚球藻 (SYNECHOCOCCUS SP.) RS9917]
- [0882] MQLDGASSAPTLTARDWDARYRQGTDRWELGMAAPPLQAFLE
- [0883] QHPLAPKPTGTVLVPGCGRGHEAALLARLGFDVVGLDFSVEAIR
- [0884] EARRLQGEHENLRWLQADLFNGAALDRAGLGAHSLSGVVEHT
- [0885] CFCAIDPSQRDHYRSTVDRLLLEPGGWLLGVFFCHDRPGGPPYGS
- [0886] DAEQLAASWSQIGF

- [0887] TGVIWEPAQGSVAQRSDEWLGLWRKPSQADNEAIPAGSR
- [0888] > GI|111027025|REF|YP_709003.1|可能的3-去甲辅酶Q-9 3-甲基转移酶,[红球菌(RHODOCOCUS SP.)RHAL]
- [0889] MVDAPRFYPGSPVHGPDDLYVTPPPWDIGRAQPVFVALAEGG
- [0890] AIRGRVLDCGCGTGEHVLLAAGLGLDATGVDLAATALRIAEQK
- [0891] ARDRGLTARFLHHDARRLAELGERFDTVLDCGLFHIFDPDDRAA
- [0892] YVDSLRLDVLVPGGRYMLGFSDQQPGDWGPHRLTRDEITTAFD
- [0893] DGWTIDSLESATLEVTLDPAGMRAWQLAATRTWPHPIERECSAP
- [0894] C
- [0895] > GI|118038664|REF|ZP_01510068.1|巯基嘌呤S-甲基转移酶[吩嗪伯克氏菌(BURKHOLDERIA PHYTOFIRMANS)PSJN]
- [0896] MSDPTQPSAPEFESRDPNSPEFWDERFERGFMPWDQAGVPSAFE
- [0897] SFAARHAGAAVLIPGCGSAYEAVWLAGHGYPVRAIDFSPAATAAA
- [0898] AHEQLGAQHADLVEQADFFTYELPFTPAWIYERAFLCALPLARR
- [0899] ADYARRMADLLPGGALLAGFFFIGATPKGPPFGIERAELDGLLKP
- [0900] YFELIEDEPVHDSIAVFAGRERWLTWRRRV
- [0901] > GI|91685753|GB|ABE28953.1|保守的假定蛋白质,[伯克氏菌(BURKHOLDERIA XENOVORANS)LB400]
- [0902] MSDPTQPAVPDFETRDPNSPAFWDERFERRFTPWDQAGVPAAAFQ
- [0903] SFAARHSGAAVLIPGCGSAYEAVWLAGQGNPVRAIDFSPAATAAA
- [0904] AHEQLGAQHAQLVEQADFFTYEPPFTPAWIYERAFLCALPLARR
- [0905] ADYAHRMADLLPGGALLAGFFFLGATPKGPPFGIERAELDALLT
- [0906] PYFDLIEDEAVHDSIAVFAGRERWLTWRRRA
- [0907] > GI|118655249|GB|EAV62028.1|巯基嘌呤S-甲基转移酶,[新洋葱伯克氏菌(BURKHOLDERIA CENOCEPACIA)MC0-3]
- [0908] MSDPKQPAAPSAAEFATRDPGSASFWDERFARGVTPWEFGGVP
- [0909] DGFRAFAQRHEPCAFLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAA
- [0910] QAVAAAKVQLGAHADVVEQADFFQYRPPFDVQWVYERAFLCA
- [0911] LPPSLRADYAARMAELLPTGGLLAGYFFVVAKPKGPPFGIERAE
- [0912] LDALLAPHFELLEDLPVTDSLAVFDGHERWLTWRRR
- [0913] > GI|134140082|GB|ABO55825.1|巯基嘌呤S-甲基转移酶,[越南伯克氏菌(BURKHOLDERIA VIETNAMIENSIS)G4]
- [0914] MSNPTQPPPPSAADFATRDPANASFWDERFARGVTPWEFGGVPD
- [0915] GFRAFAQRRAPCTVLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAEQ
- [0916] AVVAAKATLGAHADVVEQADFFAYQPPFVQWVYERAFLCALP
- [0917] PSLRAGYAARMAELLPAGGLLAGYFFVMKKPKGPPFGIERAELD
- [0918] ALLAPSFELIEDLPVTDSLAVFDGHERWLTWRRR
- [0919] > GI|83653077|GB|ABC37140.1|巯基嘌呤S-甲基转移酶家族蛋白,[泰国伯克氏菌(BURKHOLDERIA THAILANDENSIS)E264]

- [0920] MTSEANKGDAAVQAAGDAQPASPPSADVQPARAALAPSSV
- [0921] PPAPSAANFASRDPGDASFWDERFERGVTPWDSARVPDAFAAFA
- [0922] ARHPRCPVLIPGCGSAYEARWLLARAGWPVRAIDFSAQAVAAAR
- [0923] RESGADAALVEQADFFAYVPPFVPQWIYERAFLECAIPTSRADY
- [0924] ARRVAELLPAGGFLAGFFFIGATPKGPPFGIERAELDALLSPNFEL
- [0925] VEDEPVADSLPVFAGRERWLLAWRRS
- [0926] > GI | 148029498 | GB | EDK87403.1 | 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶家族蛋白, [鼻疽伯克氏菌 (BURKHOLDERIA MALLEI) 2002721280]
- [0927] MKDRLMSQGDGVTNEANQPEAAGQAAGDAQPASPAHIAN
- [0928] PANPANPPALPSFSPAAASSASSAAPFSSRDPGDASFWDERFEQ
- [0929] GVTPWDSARVPDAFAARHARVPVLIPGCGSAYEARWLLARAGWP
- [0930] VRAIDFSAQAVAAARRELGEDAGIVEQADFFTYAPPFVPQWIYE
- [0931] RAFLCAIPSRADYARRMAELLPPGGFLAGFFFIGATPKGPPFGI
- [0932] ERAELDALLCPHFALVEDEPVADSLPVFAGRERWLLAWRRS
- [0933] > GI | 116648837 | GB | ABK09478.1 | 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [新洋葱伯克氏菌 (BURKHOLDERIA CENOCEPACIA) HI2424]
- [0934] MSDPKQAAPSAADFATRDPGSASFWDERFARGVTPWEFGGVP
- [0935] DGFRVFAQRREPCAVLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAA
- [0936] QAVAAAKAQLGAHADVVEQADFFQYRPPFDVQWVYERAFLECA
- [0937] LPPGLRAGYAARMAELLPTGGLLAGYFFVAKPKGPPFGIERAE
- [0938] LDALLAPHFELLEDLPTDSLAVFDGHERWLLTWRRR
- [0939] > GI | 124292927 | GB | ABN02196.1 | 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶家族蛋白, [鼻疽伯克氏菌 (BURKHOLDERIA MALLEI) NCTC 10229]
- [0940] MSQGDGVTNEANQPEAAGQAAGDAQPASPAHIANPANPAN
- [0941] PPALPSFSPAAASSASSAAPFSSRDPGDASFWDERFEQGVTPW
- [0942] DSARVPDAFAARHARVPVLIPGCGSAYEARWLLARAGWPVRAID
- [0943] FSAQAVAAARRELGEDAGLVEQADFFTYAPPFVPQWIYERAFLECA
- [0944] AIPSRADYARRMAELLPPGGFLAGFFFIGATPKGPPFGIERAEL
- [0945] DALLCPHFALVEDEPVADSLPVFAGRERWLLAWRRS
- [0946] > GI | 84362923 | REF | ZP_00987534.1 | COG0500 :SAM- 依赖性甲基转移酶, [勉强伯克氏菌 (BURKHOLDERIA DOLOSA) AU0158]
- [0947] MTGRSFAMSDPKQPGTPTAADFATRDPGDASFWDERFARGVTP
- [0948] WEFGGVPDGFRAFAQRLERCAVLIPGCGSAQEAGWLADAGWP
- [0949] VRAIDFAAQAVATAKAQLGAHADVVELADFFTYRPPFDVRWIYE
- [0950] RAFLCALPPARRADYAAQMAALLPAGGLLAGYFFVTAKPKGPP
- [0951] FGIERAELDALLAPQFDLIDDWPVTDSPVFEGHERWLLTWRRR
- [0952] > GI | 147750562 | GB | EDK57631.1 | 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶家族蛋白, [鼻疽伯克氏菌 (BURKHOLDERIA MALLEI) JHU]
- [0953] MTNEANQPEAAGQAAGDAQPASPAHIANPANPANPPALPSF

- [0954] SPPAAASSASSAAPFSSRDPGDASFWDERFEQGVTPWDSARVP
- [0955] DAFAARHARVPVLIPGCGSAYEARWLAGWPVRAIDFSAQAV
- [0956] AAARRELGEDAGLVEQADFFTYAPPFVPQWIYERAFICAIPRSR
- [0957] RADYARRMAELLPPGGFLAGFFFIGATPKGPPFGIERAELDALLC
- [0958] PHFALVEDEPVADSLPVFAGRERWLAWRRS
- [0959] > GI|126220666|GB|ABN84172.1| 推定巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [类鼻疽伯克氏菌 (BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI) 668]
- [0960] MKDRLMSQGDGVTNEANQPEAAGQAAGDAQPASPAGPAHIAN
- [0961] PANPANPANPPALPSLSPAAAAPSSASSAAHFSSRDPGDASFWE
- [0962] RFEQGVTPWDSARVPDAFAAFAARHARVPVLIPGCGSAYEARW
- [0963] LARAGWLVRADIFSAQAVAAAARRELGEDARLVEQADFFTYAPPF
- [0964] VPQWIYERAFICAIPRSRRADYARRMAELLPPGGFLAGFFFIGAT
- [0965] PKGPPFGIERAELDALLCPRFALVEDEPVADSLPVFAGRERWLAW
- [0966] RRS
- [0967] > GI|77968269|GB|ABB09649.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [伯克氏菌 (BURKHOLDERIA SP.) 383]
- [0968] MSDPKQKPNAPAAADFTTRDPGNASFWNERFERGVTPWEFGG
- [0969] VPEGFSVFAHRLCAVLIPGCGSAQEAGWLAEGWPVRAIDFA
- [0970] AQAVAAAKAQLGAHAGVVEQADFFAYRPPFDVQWVYERAFIC
- [0971] ALPPAMRADYAARMAELLPADGLLAGYFFLMAPKGPPFGIER
- [0972] AELDALLTPHFELIEDLPVTDLSLAVFEGHERWLTWRRR
- [0973] > GI|115282818|GB|ABI88335.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [不明确伯克氏菌 (BURKHOLDERIA AMBIFARIA) AMMD]
- [0974] MSEPKQPSTPGAADFATRDPGDASFWDERFARGVTPWEFGGVP
- [0975] EGFRAFAQRLGPCAVLIPGCGSAQEAGWLAQAGWPVRAIDFAA
- [0976] QAVAAAKAQLGAHADVVEQADFFMYRPPFDVQWVYERAFIC
- [0977] LPPSLRAGYAARMAELLPAGALLAGYFFVTKKPKGPPFGIERAE
- [0978] LDALLAPHFELIDDLPVTDLSLAVFEGHERWLTWRRR
- [0979] > GI|118659542|GB|EAV66286.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [多噬伯克氏菌 (BURKHOLDERIA MULTIVORANS) ATCC 17616]
- [0980] MSDPKHAAAPAAASFETRDPGDASFWDERFARGMTPWEFGGVP
- [0981] AGFRAFASARPPCAVLIPGCGSAREAGWLAQAGWPVRAIDFSA
- [0982] QAVAAAKAQLGAHADVVEQADFFAYRPPFDVQWIYERAFICAL
- [0983] PPARRADYAATMAALLPAQGLLAGYFFVADKQKGPPFGITRGEL
- [0984] DALLGAHFELIDDPVSDSLPVFEGHERWLAWRRR
- [0985] > GI|113866478|REF|YP_724967.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶 (TPMT), [真氧产碱杆菌 (RALSTONIA EUTROPHA) H16]
- [0986] MSDPAKPVPTFATRNaADPAFWDERFEQGFTPWDQGGVPEEFR
- [0987] QFIEGRAPCPTLVPGCGNGWEAAWLFERGWPTAIDFSPQAVAS

- [0988] ARQTLGPAGVVVQQGDFEAFTPQPPCELIYERAFLCALPPAMRA
- [0989] DYAAARVAQLLPGGLLAGYFYLGENRGPPFAMPAEALDALLAP
- [0990] AFERLEDRPTAAPLPVFQGGQERWQVWRRRSG
- [0991] > GI|151577463|GB_|EDN41864.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [皮氏罗尔斯顿菌 (RALSTONIA PICKETTII) 12D]
- [0992] MAEPPVFQSRDAADPAFWDERFSREHTPWDAAGVPAAFQQFCE
- [0993] SQPVPLSTLIPGCGSAYEAGWLAERGWPVTAIDFAPSASAVASARAV
- [0994] LGPHADVEMADFFGFSPARSVQWIYERAFLCAMPRLWPDYA
- [0995] AQVAKLLPPGGLLAGFFAVVEGREAVPKGPPFETTQPELDALLSP
- [0996] AFERISDIPIAEADSIPVFAGRERWQVWRRRAD
- [0997] > GI|34102667|GB|AAQ59032.1| 保守的假定蛋白质, [紫色色杆菌 (CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM) ATCC 12472]
- [0998] MADSSRADFWEQRYREGVTPWEGGQLPPRARAFFAAQRPLRVL
- [0999] MPGCGSAADLPLLAMGHDLAVDFSEAAIELAARQWPEAAGR
- [1000] LLLADFFQLQMPAFDCLFERAFLCALPVGMRQYAERVAALIAP
- [1001] GGALAGVFFVADTERGPPFGMQAEALRELLSPWFELEEDLALD
- [1002] ESVAVFRNRERWMVWRRRGFDLGQVSEHESTGNCGAHRKE
- [1003] > GI|157353828|EMB|CA046360.1| 未命名蛋白产物, [葡萄 (VITIS VINIFERA)]
- [1004] MGLCVPSGRISGGVCGLLSGRSLTWAKNLGVSTTQLRMSNNGS
- [1005] SIESNPKVQKLNQIIIGSDSAGGWEKSWQQGHTPWDLGKPTPIIQ
- [1006] HLHQTGTLPKGKTLVPGCGGYDVVTIACPERFVVGLDISDSAIAK
- [1007] KAKELSSSLWNaNHFTFLKEDFFTWNPTLFDLIIFYTFFCAIEP
- [1008] DMRSVWAKRMRHLLKPDGELLTLMFPISDHAGGPPYKVSVDY
- [1009] EEVLHPMGFKAVSIVDNKMAIGPRKGREKLGRWKRTPSKSL
- [1010] > GI|46102042|GB|EAK87275.1| 假定蛋白质, UM06489.1, [玉米黑粉菌 (USTILAGO MAYDIS) 521]
- [1011] MTSSLSKDDQIQNLRLRFADSGVPNDPKAWDQAWIDSTTPWDA
- [1012] NRPQPALVELLEGADADAKVPDVGDLIPVSQAIPKGDGTAVV
- [1013] PGCGRGYDARVFAERGLTSYGVDISSNAVAANKWLGDQDLPT
- [1014] ELDDKVNFAEADFFTLGTSLVLELSKPGQATLAYDYTFLCAIP
- [1015] PSLRTTWAETYTRLAKHGVLIALVFPIHGDRPGGPPFSISPQLVR
- [1016] ELLGSQKNADGSAAWTELVELKPKGPETRPDVERMMVWRRS
- [1017] > GI|134057747|EMB|CAK38144.1| 未命名蛋白产物, [黑曲霉 (ASPERGILLUS NIGER)]
- [1018] MSEAPNPPVQGRLISHFADRRRAEDQSGWSALWDSNESVLWDR
- [1019] GSPSIALVDVVEQQQDVFFPYTRDGRRKKALVPGCGRGYDPVM
- [1020] LALHGFDVYGLDISATGVSEATKYATSEMQSPQDVKFIAGDFFSS
- [1021] EWESQALQDGDKFDLIYDYTFLCALHPDLRRKWAERMSQLLHP
- [1022] GGLLVCLEFPMYKDTSLPGPPWGLNGVHVDLLARGGDGITNIT

- [1023] KEEDEDSGIQLSGQFRRAYFRPIRSYPSGKGTDMLSIYVRR
- [1024] > GI|46137187|REF|XP_390285.1| 假定蛋白质, FG10109.1, [玉蜀黍赤霉 (GIBBERELLA ZEAE) PH-I]
- [1025] MATENPLEDRISSVPFAEQGPKWDSCWKDALTPWDRGTASIALH
- [1026] DLLAQRPDLVPPSQHQDHRGHPLRDATGAIQKKTALVPGCGRG
- [1027] HDVLLLSSWGYDVWGLDYSAAAKEEAIKNQKQAESEGLYMPV
- [1028] DGLDKGKIHWITGNFFAQDWSKGAGDDGKFDLIYDYTFLCALP
- [1029] PDARPKWAKRMTELLSHDGRLICLEFPSTKPM SANGPPWGV SPE
- [1030] LYEALLAAPGEEIAYNDGTVHEDPCSKPWADALHRLSLLKPTR
- [1031] THKAGMSPEGAVMDFLSVWSR
- [1032] > GI|88184126|GB|EAQ91594.1| 假定蛋白质, CHGG_03529, [球毛壳菌 (CHAETOMIUM GLOBOSUM) CBS 148.51]
- [1033] MAHPKSDPPGRLITHFANRDRQSQKAGWSELWSDQTDLWDR
- [1034] GMPSPALIDFITTRRDIIGRLGGRRRPRALVPGCGRGYDVV ML
- [1035] AFHGFDAIGLEVSQTAVNSARAYAEVELSDPSAYNFATEDDEKR
- [1036] RATCQPGTVSFVCGDFFQREWETSCFAPGDDGGFDLIYDYTF LC
- [1037] ALLPEMRKDWAQQMRELIRPTGVLVCLFPLYKDV TADGPPWG
- [1038] LQGIYWNLLAEGGNRMDGPAATDGGRGPF SRVAYIKPSRSYE
- [1039] MGRGTDMLSVWAPQEPSGDRKRPATAATPIPWCAHYLLNDTPA
- [1040] PFPLAYTTSIVVNRCVVRPS SQKQLAEARVAVPVAGARSYMKGR
- [1041] LARVVRLPARRSHFQKGLGGWVKLELYCALEIRPGCVAGLHLSY
- [1042] RAPLDMRCARNLEPAASPELD
- [1043] > GI|119414856|GB|EAW24794.1| 巯基甲基转移酶, 推定的, [费希新萨托菌 (NEOSARTORYA FISCHERI) NRRL 181]
- [1044] MSNDPRLSSPIEFIARYKENYVEGWAELWNKSEGKPLPFDRGF
- [1045] PNPALD TLIEKRDIIGGPIGRDAQGNTYRK KALVPGCGRGVDV
- [1046] LLLASFGYDAYGLEYS DTAVQVCKEEQAKNGDKYPVRDAEIGQ
- [1047] GKITFVQGDFFKDTWLEKLQLPRNSFDLIYDYTFFCALDPSMRP
- [1048] QWALRHTQLLADSPRGHLICLEFPRHKDTSLQGPPWASTSEAYM
- [1049] AHLNHPGEEIPYDANRQC SIDPSKAPSPQGLERVAYWQPARTHE
- [1050] VGIVEGEVQDRVSIWRRPN
- [1051] > GI|90307040|GB|EAS36671.1| 假定蛋白质, CIMG_02025, [粗球孢子菌 (COCCIDIODES IMMITIS) RS]
- [1052] MANEILRSAPNLSDRFKNLDGRNQGEVWDDLWKESRTPWDRG
- [1053] SHNPALEDALVEKRGFFGAPVFEDEPLRRKKALVPGCGRGVDVF
- [1054] LLASFGYDAYGLEYSKTAVDVCLKEMEKGEGGKVPPRDEKVG
- [1055] SGKVMFLEGDFFKDDWVKEAGVEDGAFDLIYDYTFFCALNPAL
- [1056] RPQWALRHRQLLAPSPRGNLICLEFP TTKDPAALGPPFASTPAMY
- [1057] MEHLSHPGEDIPYDDKGHVKS NPLQQPSDKGLERVAHWQPKRT

- [1058] HTVGMDDKGNVLDWVSIWRRRD
- [1059] > GI|145018369|GB|EDK02648.1| 巯基甲基转移酶 1, 推定的, [稻瘟菌 (MAGNAPORTHE GRISEA) 70-15]
- [1060] MGTPEQTNKLSNLFLDQPLSEHGKRWDLWKEDYTPWDRAGP
- [1061] SMALYDVLTPGRPDLPPTGGQKKRALVPGCGRGYDVLLLSRL
- [1062] GYDVWGLDYSEEATKQSIIEKKVEQGDDGTAELEREGVKKG
- [1063] KVTWLTGDDFSDEWVNKAGVQQFDLTIDYTFLCALPISARPAW
- [1064] ARRMDLLAHEGRLVCLQWPTAKPWSGGGPPWGVLP EHYIAQ
- [1065] LARPGKEVEYESDGKIPAKAMPKVVEQGLRRLELVVPSRTHNS
- [1066] GIADGVLHDRIAVFAH
- [1067] > GI|111069917|GB|EAT91037.1| 假定蛋白质, SNOG_01388, [小麦叶枯病菌 (PHAEOSPHERIA NODORUM) SN15]
- [1068] MANPNQDRLRSHFAALDPSTHASGWSLWAEFTFIPWDRGYAN
- [1069] PALIDLLANPSSPPTSSDANPTPGAPKNTIDGQGVQLPAPLEGG
- [1070] VRRKALVPGCGKGYDVALLASWG YDTWGLEVSRHAADAAKE
- [1071] YLKDAGEGALEGEYKIKDAKIGKGREECVVADFFDDAWLKDV
- [1072] GAGEFDVIYDNTFLCALPPLLRPKWAARMAQLLARDGVLICLEF
- [1073] PTHKPASSGGPPWSLPPTVHQELLKRPGEDISYDEGGVVVATDR
- [1074] AESENALVRVAHWTPKRTHNIAVINGVVRDCVSVWRHKKQS
- [1075] > GI|39577142|EMBL|CAE80965.1| 保守的假定蛋白质, [噬菌蛭弧菌 (BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS) HD100]
- [1076] MAIPTNFIQIDEEGFALSREVRIQDPVIGQEILQNLKIHGGTLLST
- [1077] FGDVPVIVEAFDEPYVAAQVNLKEDKTWEILLPYGVHYAFELES
- [1078] LSLDEWDRFHGYAANKIPFVMSRKAQATFFNLLEEF GDDFIEFD
- [1079] GKTYDIPAYWPPHKDVEKETYSQIYQQEENPGWNLGEP AEAL
- [1080] KDMIPRLKISRSLVVLGCGEGHDAALFAAAGHFVTAVDISPLAL
- [1081] ERAKKLYGHLPTLTFVEADLFKLPQDFDQSFDDVFEHTCYCAIN
- [1082] PERRQELVKVWNRVLVQGGHLMGVFFTFEKRQGPYPGGTEWE
- [1083] LRQLKNHYHPIFWGRWQKSIPRRQGKELFIYTKKK
- [1084] > GI|35211380|DBJ|BAC88759.1|GLL0818, [无类囊体蓝藻 (GLOEOBACTER VIOLACEUS) PCC7421]
- [1085] MPSEESSGVDQPAFWERYRGGQDRWDLGQPAPTFVHLLSGSE
- [1086] APPLGTVAVPGCGRGHDALLFAARGYKVC GFDFAADAIADATR
- [1087] LALRAGAAATFLQQDLFNLPRPFAGLFDLVVEHTCFCAIDPVRR
- [1088] EEYVEIVHWLLKPGGELVAIFFAHPRPGPPYRTDAGEIERLF SPR
- [1089] FKITALLPAPMSVPSRRGEELFGRFVRA
- [1090] > GI|85818252|GB|EAQ39412.1| 假定蛋白质, MED134_07976, [东海独岛菌 (DOKDONIA DONGHAENSIS) MED134]
- [1091] MELTSTYWNRYAEGSTGWDLKEVSPPIKAYLDQLENKELKILI

- [1092] PGGGYSYEAQYCWEQGFKNVYVDFSQLALENLKQRVPDFPSL
- [1093] QLIQEDFFTYDQGFDVIEQTFFCALQPDLRPAYVAHMTLLKAK
- [1094] GKLVLGLLFNFPLTEKGPPYGGSTTEYESLFSEHFDIQKMETAYNS
- [1095] VAARAGKELFIKMVKK
- [1096] > GI|151939691|GB|EDN58518.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶 (TPMT) 超家族, [弧菌属 (VIBRIO SP.) EX25]
- [1097] MKQAPTINQQFWDNLFTQGTMPWDAKTTQELKAYLENALHS
- [1098] GQSVFIPGCGAAYELSSFIQYGHDIAMDYSEQAVKMAQSTLGK
- [1099] HKDKVVLGDVFNADSTHSFDVIYERAFLAALPRDQWPEYFAMV
- [1100] DKLLPRGGLLIGYFVIDDDYHSRFPFCLRSGELEGYLEPVFKLV
- [1101] ESSVVANSVEVFKGRERWMVWQKSCRI
- [1102] > GI|124261369|GB|ABM96363.1| 假定蛋白质, MPE_A3410, [METHYLIBIUM PETROLEIPHILUM PM1]
- [1103] MSGPDLNFWQQRFDTGQLPWDRGAPSPQLAAWLGDGSLAPGR
- [1104] IAVPGCGSGHEVVALARGGFSVTAIDYAPGAVRLTQGRLLAAAGL
- [1105] AAEEVQADVLTWQPTAPLDAVYEQTCLCALHPDHWVAYAARL
- [1106] HAWLRPGGTLALLAMQALREGAGQGLIEGPPYHVDVNALRAL
- [1107] LPGDRWDWPRPPYARVPHPS STWAEIAIVLTRR
- [1108] > GI|114551449|GB|EAU54004.1| 巯基甲基转移酶 1- 样蛋白质 [铁氧化深海菌 (MARIPROFUNDUS FERROOXYDANS) PV-I]
- [1109] MTVWEERYQRGETGWDRGGVSPALTQLVDHLHLEARVLI PGCG
- [1110] RGHEVIELARLGFRVTAIDIAPSAIAHLSQQLEQEDLDAELVNGD
- [1111] LFAYAPDHCDAVYEQTCLCAIEPEQRADYEQRLHGWLKPEGVL
- [1112] YALFMQTGIRGGPPFHC DLLMMRELF DASRWQWPEETGAVLVP
- [1113] HKNGRFELGHMLRRTGR
- [1114] > GI|92394583|GB|ABE75858.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [嗜冷杆菌 (PSYCHROBACTER CRYOHALOLENTIS) K5]
- [1115] MENVNQAQFWQQRYEQDSIGWDMGQVSPPLKAYIDQLPEAAK
- [1116] NQAVLVPGAGNAYEVGYLHEQGFTNVTLVDFAPAPIAAFAERYP
- [1117] NFPKHLICADFFELSPEQYQFDWVLEQTFFCAINPSRRDEYVQ
- [1118] QMASLVKPNKGKLI GLLLFDKDFGRDEPPFGG TKDEYQQRFATHFD
- [1119] IDIMEPSYNSHPARQGSELFIE MHVKD
- [1120] > GI|83849399|GB|EAP87267.1| 假定蛋白质, CA2559_00890, [CROCEIBACTER ATLANTICUS HTCC2559]
- [1121] MTSNFWEQRYANNNTGWDLNTVSPPLKHYIDTLSNKTFLFILIPG
- [1122] CGNAYEAEYLHNQGFENVFIVDLAEHPLLEFSKRVPDFPKSHILH
- [1123] LDFFNLTQKFDLILEQTFFCALHPEQRLHYAHHTSKLLNSNGCLV
- [1124] GLFFNKEFDKTGPPFGGNKKEYKNL FKNLFKIKKLENCYNSIKP
- [1125] RQGSELF IFEEK

[1126] > GI|120596574|GB|ABM40010.1| 巯基嘌呤 S- 甲基转移酶, [噬萼极地单胞菌 (POLAROMONAS NAPHTHALENIVORANS) CJ2]

[1127] MAGPTTDFWQARFDNKGWDRGAPGPQLLAWLESGALQPCR

[1128] IAVPGCGSGWEVAELARRGFEVVGIDYTPAAVERTRALLAAQGL

[1129] AAEVVQADVLAAYQPHKPFEATYEQTCLCALHPDHWVAYARQLQ

[1130] QWLKPQGSIWALFMQMRPEATDEGLIQGPPYHCDINAMRALF

[1131] PAQHWAWPRPPYAKVPHPNVGHELGLRLMLRQGR

[1132] 合成了编码上述序列的密码子优化的核酸并插入至在大肠杆菌 (*E. coli*)、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和其它宿主细胞中有活性的表达载体。在碳源和卤化物源存在下,在卤代甲烷转移酶表达以及在产生卤代甲烷的情况下培养细胞。可选地收集卤代甲烷并将其转化为非卤化有机分子。

[1133] 实施例 9B :鉴别新的卤代甲烷转移酶

[1134] 如实施例 9A 中所述,为了筛选在重组宿主中具有高活性的 MHT,我们根据 NCBI 序列数据库合成了所有推定的 MHT 并在大肠杆菌 (*E. coli*) 中测定了卤代甲烷的生产。我们首先鉴别出与已知 MHT 具有类似性的 89 个基因的自相一致集 (self-consistent set) (Rhew et al,2003,“Genetic control of methyl halide production in *Arabidopsis*”, *Curr Biol* 13 :1809-13 ;Attieh et al,1995,“Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*”, *J Biol Chem* 270 :9250-7 ;Ni and Hager,1999,“Expression of *Batis maritima* methyl chloride transferase in *Escherichia coli*”, *Proc Natl Acad Sci USA* 96 :3611-5)。该文库包含高度的序列多样性,其序列间氨基酸平均同一性为 26%。该文库包括推定、假定和错误注释的基因,以及来自未鉴定生物和环境样本的基因。这些基因通过计算对大肠杆菌 (*E. coli*) 和酵母表达进行密码子优化并使用自动全基因 DNA 合成进行构建。这是基于信息的克隆的实例,其中从数据库检索基因数据,化学合成这些基因并测定功能,整个过程不接触来源生物。

[1135] 通过向生长培养基中添加适当的卤盐,对三种离子 (氯、溴和碘) 测定了卤代甲烷活性。通过使用 GC-MS 分析顶部空间气体,对卤代甲烷的生产进行取样 (补充信息)。我们发现对每种离子的活性分布广泛,其中 51% 的基因对氯化物表现出活性,85% 的基因对溴化物表现出活性,而 69% 的基因对碘化物表现出活性 (图 10A)。具体地,在所有基因中来自盐草 (*Batis maritima*) (一种喜盐植物) 的 MHT 对所有离子表现出最高的活性。几种基因对给定离子表现出独特的特异性 (图 10B),并且在生物水平上也观察到了该现象 (Rhew 等,2003, *supra*)。碘甲烷的最高产率比溴甲烷高约 10 倍,而溴甲烷的产率比氯甲烷高 10 倍。这与这些酶所测量的 K_m 一致: I^- (8.5mM)、 Br^- (18.5mM) 和 Cl^- (155mM) (Attieh et al, 1995, *supra*; Ni and Hager,1999, 见前)。

[1136] 实施例 10 :盐草 (*B. maritima*) MHT 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的表达

[1137] 我们将盐草 (*B. maritima*) MHT 基因转移到酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中 (图 11A)。代谢工程中真核宿主的一个优势是能够将基因产物靶向可以提供更有利于酶功能的环境的特定细胞区室。我们假设将盐草 (*B. maritima*) MHT 靶向酵母液泡可

以提高碘甲烷的产率：大多数 SAM 在液泡中聚集 (Farooqui et al, 1983, "Studies on compartmentation of S-adenosyl-L-methionine in *Saccharomyces cerevisiae* and isolated rat hepatocytes," *Biochim Biophys Acta* 757 :342-51) 并且卤离子也在此聚集 (Wada 和 Anraku, 1994 "Chemiosmotic coupling of ion transport in the yeast vacuole: its role in acidification inside organelles", *J Bioenerg Biomembr* 26 : 631-7)。使用来自如上所讨论的羧肽酶 Y 的十六个氨基酸 N 端标记将盐草 (*B. maritima*) MHT 靶向酵母液泡。

[1138] 酵母在葡萄糖或蔗糖上表现出高产率 (图 11B 和 11C) 和正常生长速率。降葡萄糖上碘甲烷的产率测量为 4.5g/L-天, 比从大肠杆菌 (*E. coli*) 中获得的高 10 倍, 并且是最好天然来源的约 12000 倍 (图 11C)。除速率外, 葡萄糖向碘甲烷转化的碳转化效率是确定过程活力的重要参数。对于酵母, 我们根据以下平衡方程确定了碘甲烷的最大理论产率为 0.66 (摩尔分数) :



[1140] 葡萄糖中碳释放的最大效率与葡萄糖中乙醇的最大效率相同。测量的葡萄糖向碘甲烷转化的碳转化效率为 2.5%, 表明通过将碳通量重新定向到 SAM 还有提高产率的空间。

[1141] 宿主生物对过度产生代谢产物的有毒影响的响应对集成工业过程的开发至关重要。卤代甲烷是已知会在 ssDNA 和 RNA 中造成细胞毒素损害的 $\text{S}_\text{N}2$ 甲基化剂。我们发现酵母耐受高水平的碘甲烷的有害甲基化作用 ($> 5\text{g/L}$, 图 11D)。由于该发酵是有氧的并且碘甲烷的亨利常数较大 (参见, Moore et al, 1995, *Chemosphere* 30 :1183-91), 因此可以从发酵罐的释放气体 (off-gas, 废气) 中回收碘甲烷。缺乏 DNA 修复基因的突变株 (*RAD50* Δ Symington et al, 2002, *Microbiol Mol Biol Rev* 66 :630-70) 对碘甲烷表现出提高的敏感性, 从而确认了甲基化压力在细胞毒性中的作用。

[1142] 实施例 11 : 通过靶向液泡的 MHT 生产碘甲烷

[1143] 我们将来自酵母羧肽酶 Y 的 16 个氨基酸的液泡靶向标记 (KAISLQRPLGLDKDVL) 融合到盐草 (*B. maritima*) MCT 的 N-末端并在载体 pCM190 中表达该酶。碘甲烷产量的测定表明将 MCT 靶向液泡造成产率提高 50% (图 12)。我们接着在 VPS33 Δ 背景中表达细胞溶质和液泡靶向酶, 该背景不能形成功能性液泡。在 VPS33D 菌株中消除了产率的差异, 表明将 MCT 靶向完全形成的液泡是提高碘甲烷形成率所必须的。

[1144] 实施例 12 : 材料和方法

[1145] 本实施例说明了在以上讨论的实施例中使用的材料和方法。

[1146] 菌株和质粒

[1147] 使用标准程序在大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10 细胞 (Invitrogen) 中进行克隆。以下列出了引物。通过 DNA 2.0 (Menlo Park, CA) 在携带氯霉素抗性基因的 pTRC99a 诱导型表达载体中合成了 MHT 编码区。将构建体转化到 DH10B 菌株中用于卤代甲烷生产测定。对于酵母表达, 将盐草 (*B. maritima*) MHT 编码区克隆到载体 pCM190 中。

[1148] 使用标准程序在大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10 细胞 (Invitrogen) 中进行克隆。通过 DNA 2.0 (Menlo Park, CA) 合成了盐草 (*B. maritima*) MCT 编码区, 并根据制造商的说明使用指定的引物通过 PfuUltra II (Stratagene) 进行扩增。根据制造商的说明, 使用 Zymo 凝胶提取试剂盒纯化 PCR 产物。用限制酶 NotI 和 PstI 在 37°C 对纯化的表达载体 (pCM190) 和

编码区插入（插入序列，insert）消化过夜，并在1%琼脂糖凝胶上进行凝胶纯化，根据制造商的说明使用 Promega Wizard SV 凝胶试剂盒进行提取。在室温下对载体和插入进行定量并用 T4 连接酶（Invitrogen）连接（10fmol 载体相对于 30fmol 插入）15 分钟，并转化至化学感受态大肠杆菌（*E. coli*）TOP10 细胞（Invitrogen）。对转化体进行筛选并使用指定的引物对质粒测序以确认克隆。

[1149] 使用标准醋酸锂技术将构建体转化到酿酒酵母（*S. cerevisiae*）W303a 背景中并在选择性培养基上铺板（涂板，plate）。简要地，通过用水和 100mM 醋酸锂的 Tris-EDTA 缓冲液连续清洗制备了感受态 W303a 细胞。将 1 μ g 质粒在 30℃ 与 50 μ L 感受态细胞以及作为载体的 300 μ L 的 PEG 4000 和 5 μ g 煮沸的鲑鱼精液一同培养 30 分钟。然后在 42℃ 对细胞进行热休克 20 分钟。细胞离心沉降并在 100 μ L 的水中重新悬浮，在合成完全尿嘧啶缺陷板上铺板。将板在 30℃ 培养 48 小时并通过在尿嘧啶缺陷板上划线确认阳性转化体。

[1150] 培养基和生长条件

[1151] 从新近划线平板中接种携带 MHT 表达载体的细菌并生长过夜。将细胞在含有 1mM IPTG 和 100mM 适当卤化钠盐的培养基中稀释 100 倍。用橡皮塞密封培养管并在 37℃ 生长 3 小时。将携带 MHT 表达载体的酵母在冷冻保存（15% 的甘油）的尿嘧啶缺陷板上划线并生长 48 小时。将单个菌落接种到 2mL 合成完全尿嘧啶缺陷培养基上并在 30℃ 生长过夜。接着，将培养物接种到 100mL 新鲜的合成完全尿嘧啶缺陷培养基上并生长 24 小时。使细胞离心沉降并在加入 2% 葡萄糖和 100mM 碘化钠盐的新鲜 YP 培养基中浓缩至高细胞密度（OD₅₀）。将 10mL 该浓缩的培养物等分到 14mL 培养管中并用橡皮塞密封。使培养物在 30℃ 以 250rpm 的转速振荡生长。

[1152] 气相色谱 - 质谱法

[1153] 气相色谱 - 质谱（GC-MS）系统由 6850 系列 II 型网络气相色谱系统（Agilent）和 5973 网络质量选择系统（Agilent）组成。温箱温度程序化地从 50℃（1 分钟）升高到 70℃（10℃ / 分钟）。用注射器穿过橡皮塞吸取 100 μ L 培养物顶部空间并手动进样到气相色谱 - 质谱系统。通过与可商购的碘甲烷（Sigma）比较，确认样品为碘甲烷，其保留时间为 1.50 分钟而分子量为 142。将碘甲烷的产量与 YPD 中可商购碘甲烷的标准曲线进行比较。将标准品在加入 2% 葡萄糖的 10mL YP 培养基中配制成 0.1g/L、0.5g/L、1.0g/L 和 10g/L，等分到 14mL 培养管中并用橡皮塞密封。将标准品在 30℃ 培养 1 小时，并如上所述测量顶部空间中的碘甲烷。用标准曲线拟合数据以将顶部空间计数与碘甲烷相关联。

[1154] 碘甲烷毒性测定

[1155] 将单个菌落接种到加入 2% 葡萄糖的 YP 培养基中并生长过夜。将培养物稀释至 OD₆₀₀ 为 0.05 并加入碘甲烷至指定的量。使培养物在 30℃ 以 250rpm 的转速下振荡生长 24 小时。以 YP 培养基作为空白，用分光光度法测量 OD₆₀₀ 值。每个数据点重复三次。RAD50 Δ 突变体得自酵母基因组缺失计划（*Saccharomyces* Genome Deletion Project, Invitrogen）。

[1156] 葡萄糖向碘甲烷转化的效率

[1157] 将效率测量为每消耗单位克数的葡萄糖所产生的高能碳的克数。用气相色谱 - 质谱法测量培养基顶部空间中碘甲烷的产量，而使用标准曲线计算液相中的碘甲烷部分。通过减去卤离子的分子量计算出高能碳（-CH₃）的克数从而与其它烃类生产技术进行比较。按照制造商的说明通过使用己糖激酶试剂盒（Sigma）测量了在限定时间量（90 分钟）前后生

长培养基中的葡萄糖从而计算了消耗的葡萄糖的量并使用标准葡萄糖曲线进行定量。

[1158] 累积碘甲烷产量测定

[1159] 通过诱导如上所述的培养,测定 1 小时的碘甲烷以及排出培养物以模拟产物提取,测量了长期 (> 2 小时) 碘甲烷的产量。然后重新密封培养物并再次测量碘甲烷以确定排放的碘甲烷的量。使培养物再生长 1 小时,然后测量并排出。在正文中,通过加和每小时的产量显示了数据。

[1160] 纤维素原料上的生长和碘甲烷产量

[1161] 发酵氨基酸球菌 (*Actinotalea fermentans*) 得自 ATCC(43279)。将发酵氨基酸球菌和酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 细胞接种到 YP 培养基 +2% 葡萄糖 (用于酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 或 BH 培养基 +2% 葡萄糖 (用于发酵氨基酸球菌) 并生长过夜。将培养物在含有 20g/L 纤维素原料作为唯一碳源的 50mL YP 培养基中稀释到 OD600 = 0.05。使用配备了 1HP、1000W 电机的可商购搅拌器粉碎玉米秸秆和白杨。将甘蔗渣分成适当干重,然后用热水清洗 3 次以除去土壤和残余的糖。将培养物在 30°C 以 250rpm 的转速振荡培养 36 小时。将 9ml 的培养物等份置于加入 1ml 1M 氯化钠的 14ml 管中并用橡皮塞密封。如上所述,测定了顶部空间样品的气相色谱-质谱产量。如下所述,对发酵氨基酸球菌 (*A. fermentans*) 和酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 进行定量。

[1162] 酵母和细菌定量

[1163] 通过在选择性培养基上铺板,定量了生长在纤维素原料上的培养物中的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和发酵氨基酸球菌 (*A. fermentans*)。用无菌水稀释培养物,并将 100 μ L 培养物铺板到 YPD 琼脂 + 氨苄西林 (以定量酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 或脑-心脏琼脂 (以定量发酵氨基酸球菌 (*A. fermentans*)) 上。将板在 30°C 培养 48 小时 (对于 YPD) 或 16 小时 (对于 BH)。对菌落手动计数,并且将来自至少 4 块板的计数进行平均。在生长于柳枝稷和玉米秸秆上的培养物中,出现了一些未识别的背景培养物,但是它们表现出与发酵氨基酸球菌可区分的形态。

[1164] 菌株

[1165] 大肠杆菌 (*E. coli*) (Invitrogen TOP10)

[1166] [F⁻mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC)801acZM15lacX74recA1ara139(ara-leu)7697galU galK rpsL(Str^R)endA1 nupG]

[1167] 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) W303a

[1168] (MATa leu2-3,112trp1-1can1-100ura3-1ade2-1 his3-11,15)

[1169] 发酵氨基酸球菌 (*A. fermentans*) (ATCC 43279)

[1170] ***

[1171] 以上给出的实施例仅是说明性的而不旨在表示本发明所有可能的实施方式、应用或改变的详细列表。因此,在不背离本发明范围和精神的前提下,本发明所述方法和系统的各种改变和变化对本领域的技术人员来说是显而易见的。尽管已结合具体实施方式对本发明进行了说明,但是应理解如所要求的,本发明不应过度地限制于这些具体实施方式。

[1172] 以上引用的所有参考文献和出版物的公开明确地以其整体作为参考并入,并且达到正如它们分别作为参考并入的程度一样。

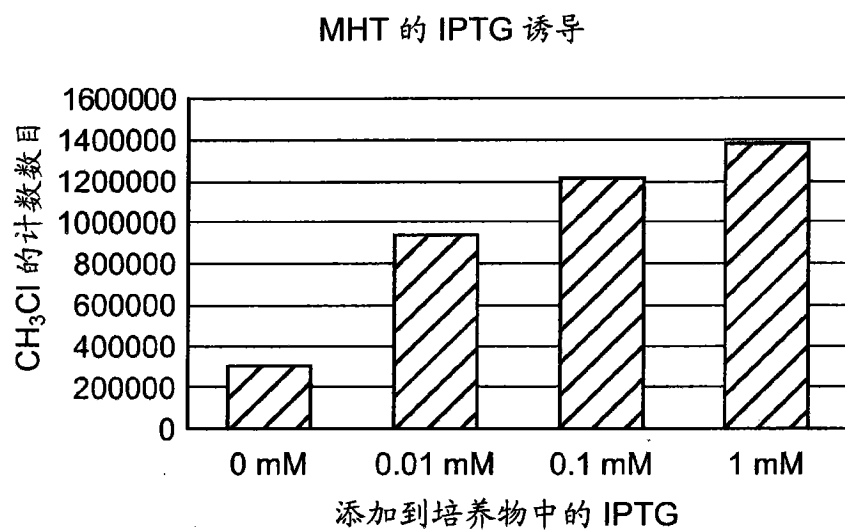


图 1

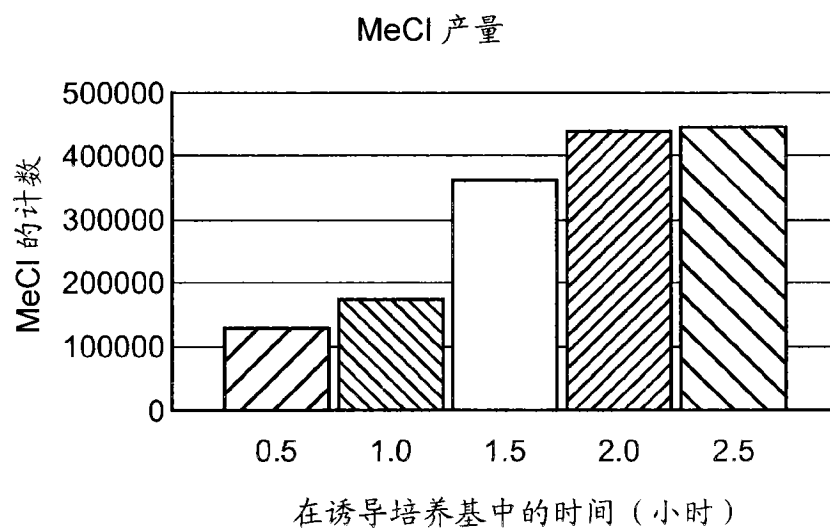


图 2

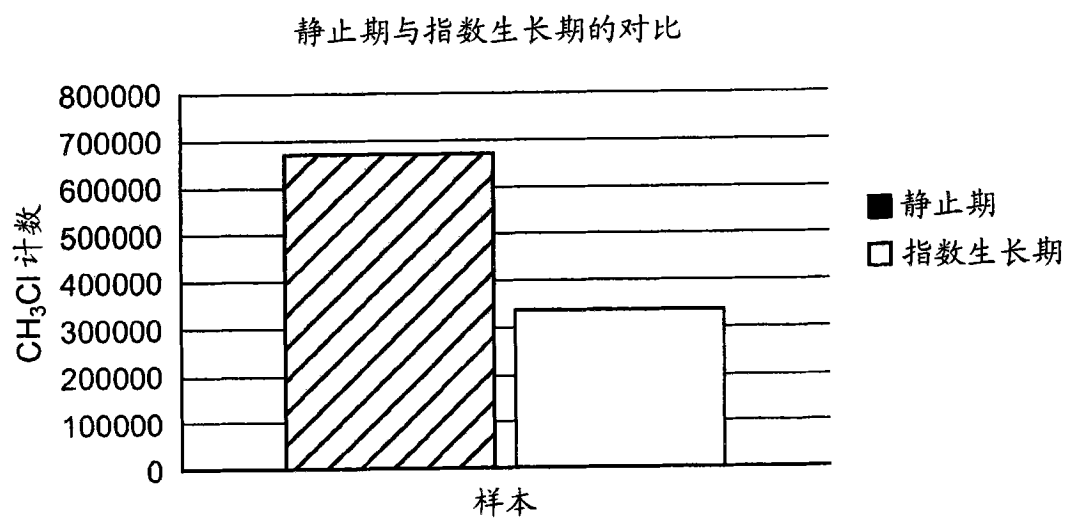


图 3

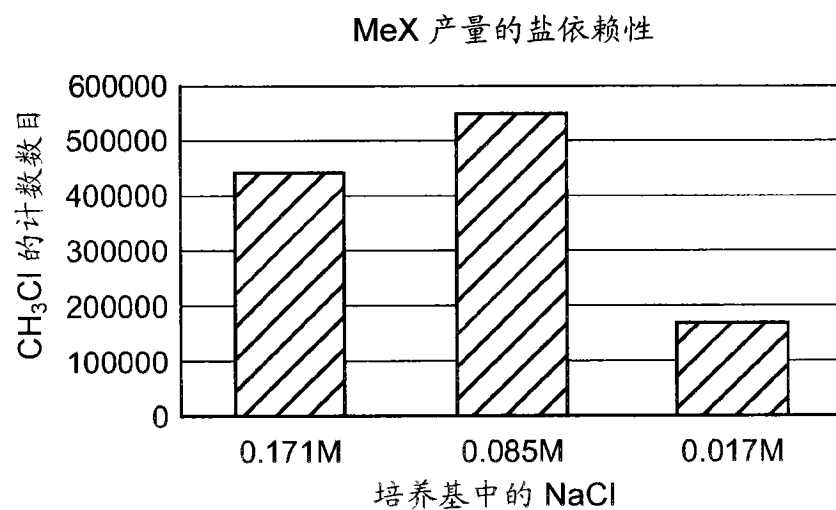


图 4

较大的卤素为较好的反应剂

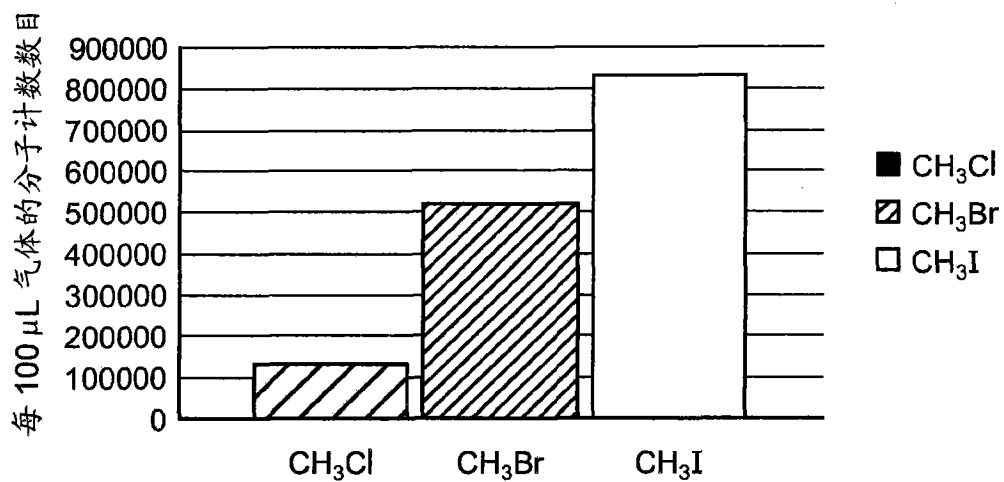


图 5

应用辅助蛋白的 MeX 产量

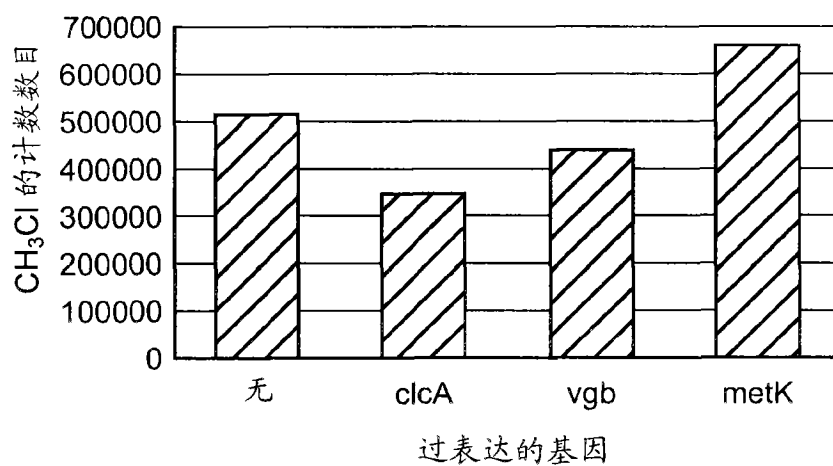


图 6

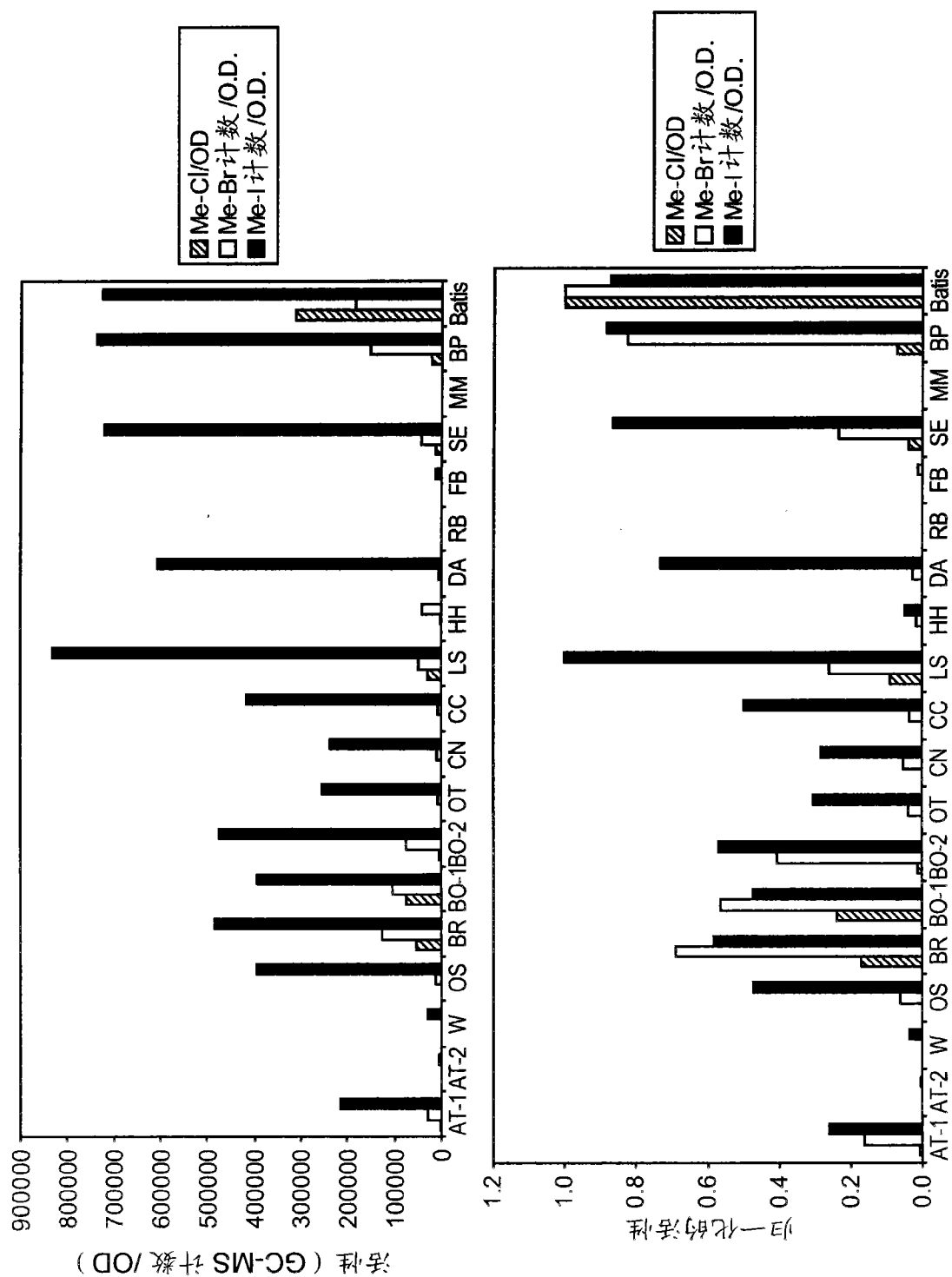


图 7

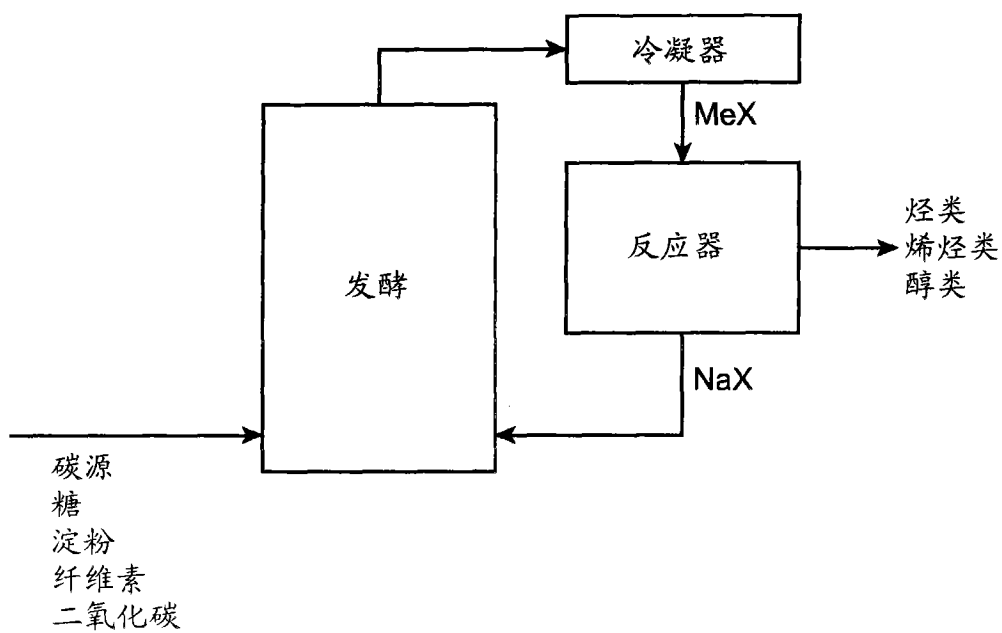


图 8

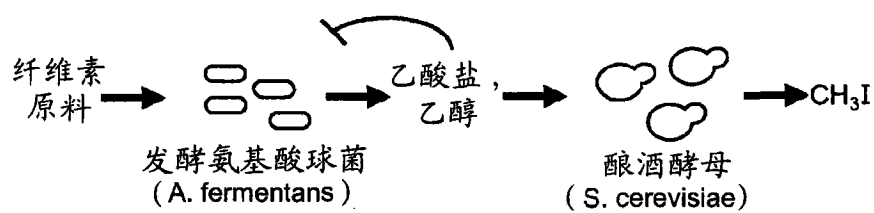


图 9A

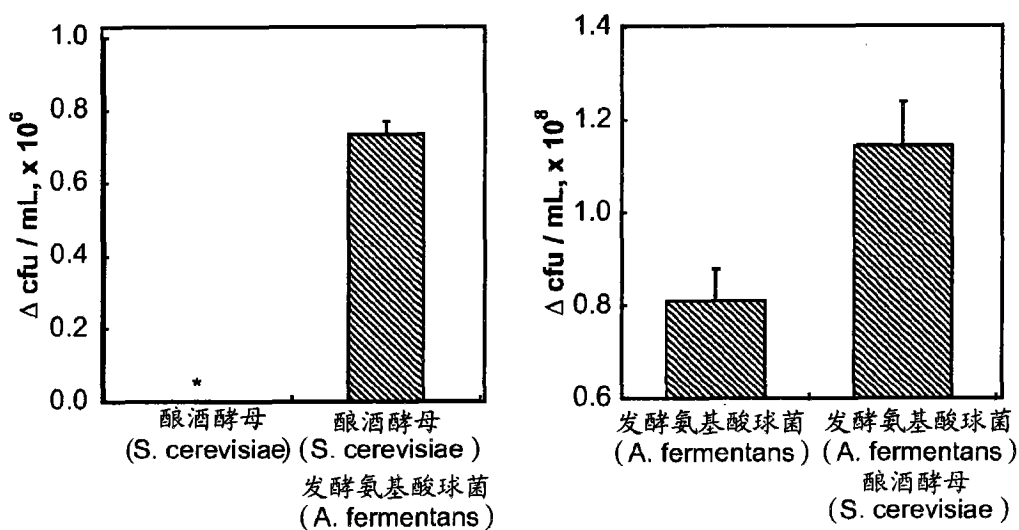


图 9B

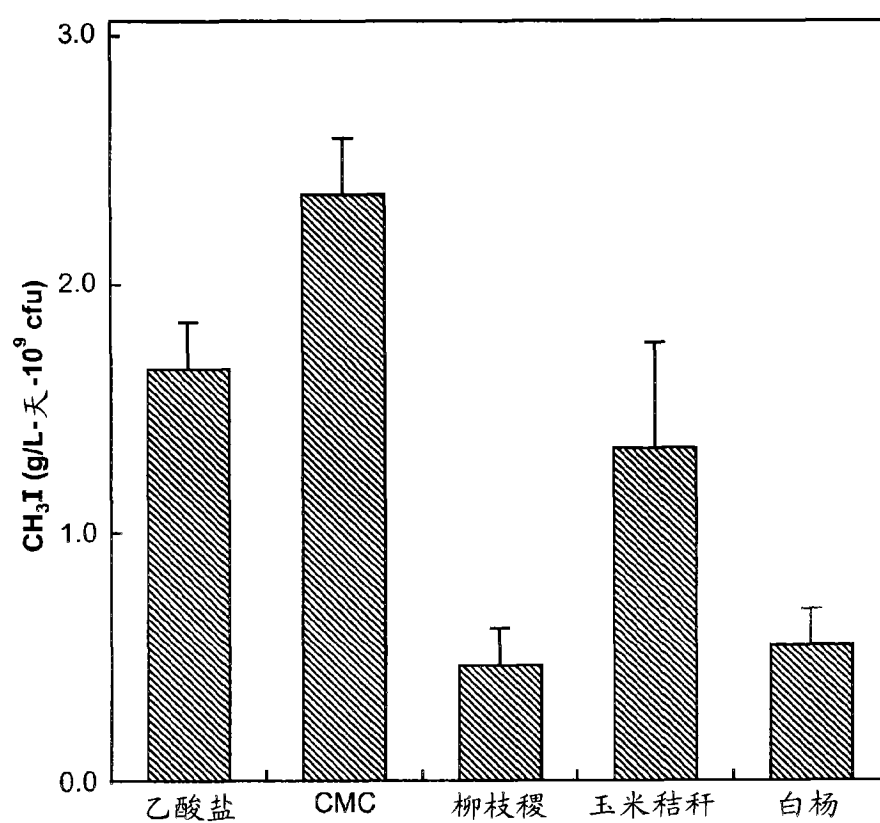


图 9C

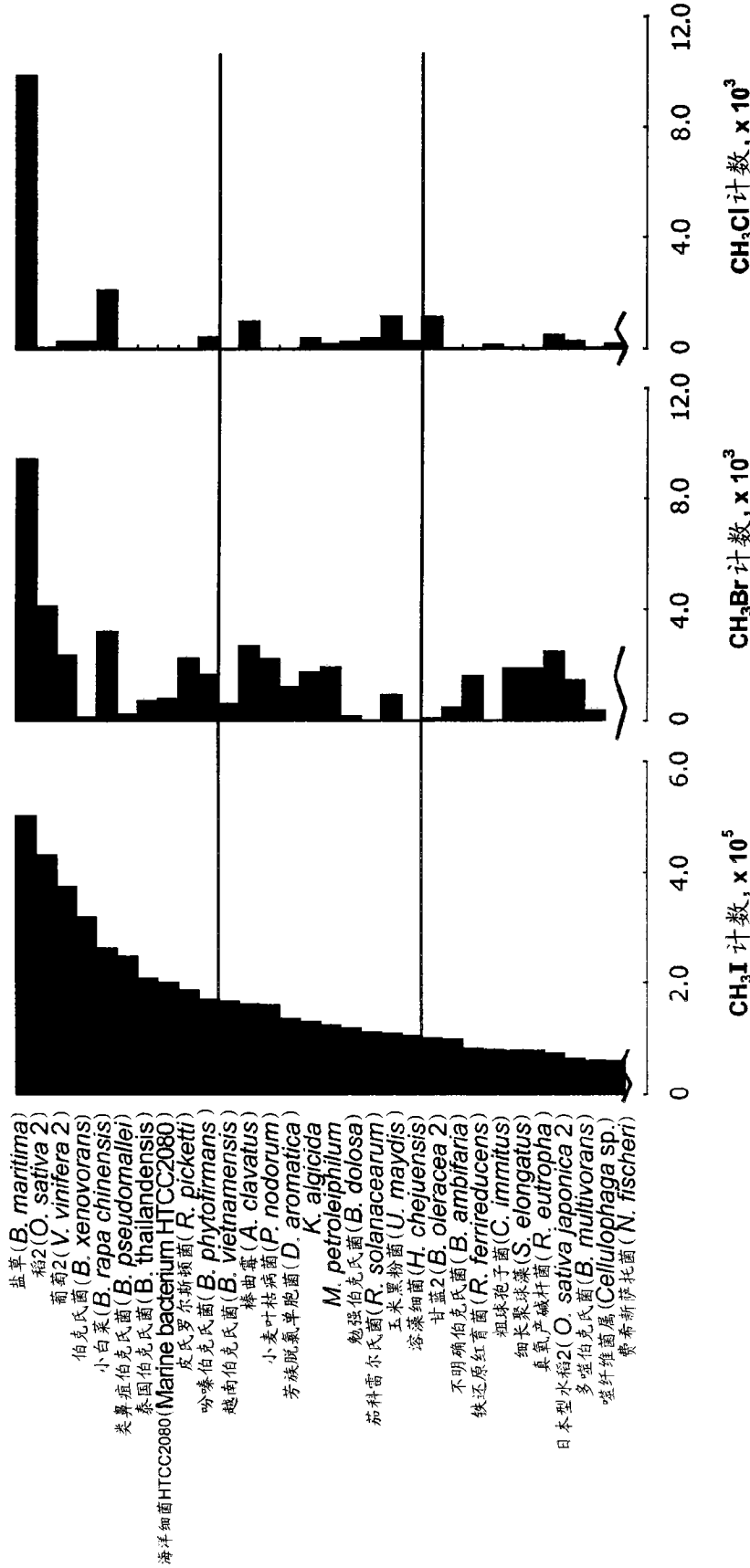


图 10A

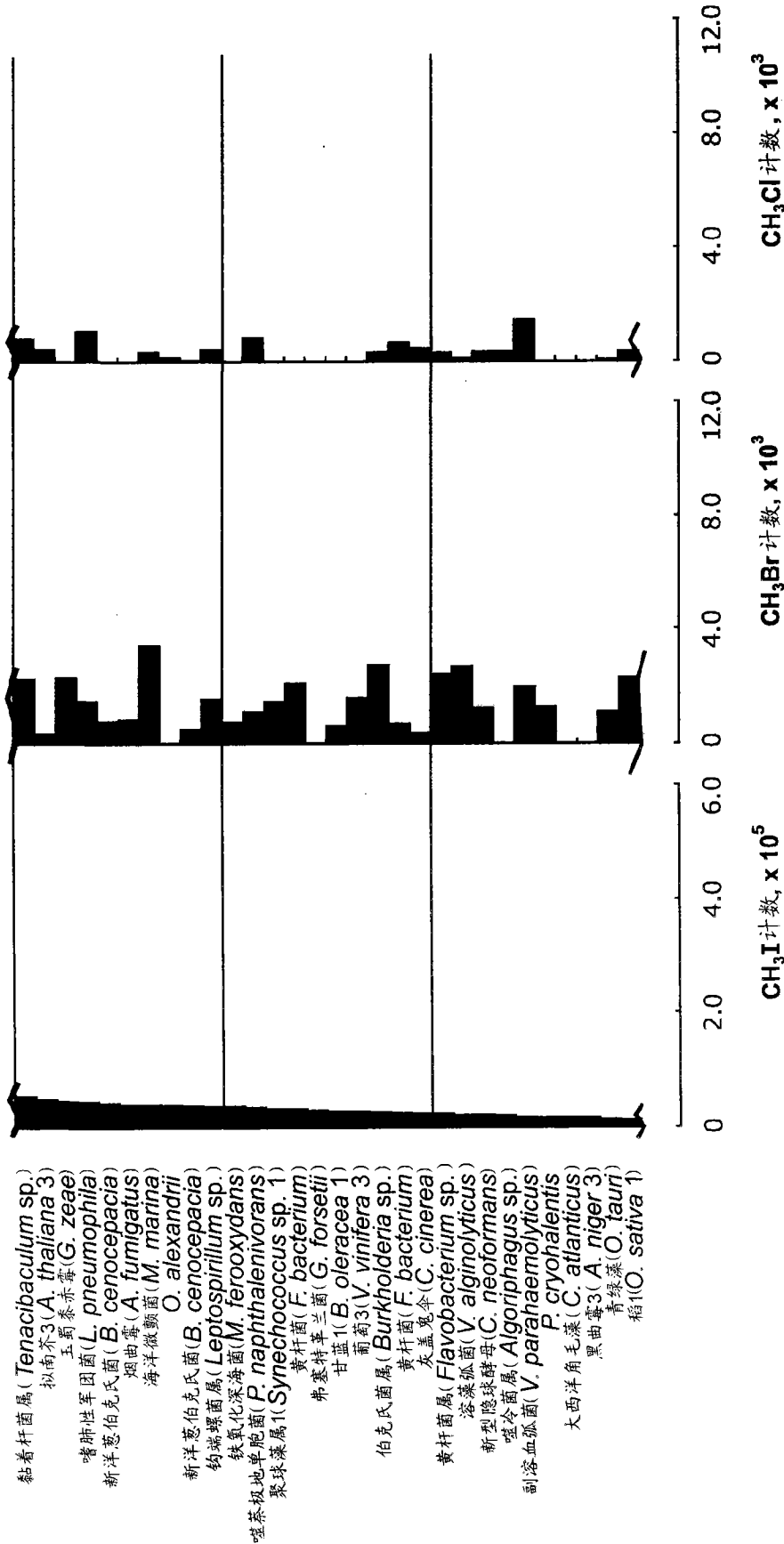


图 10A (续)

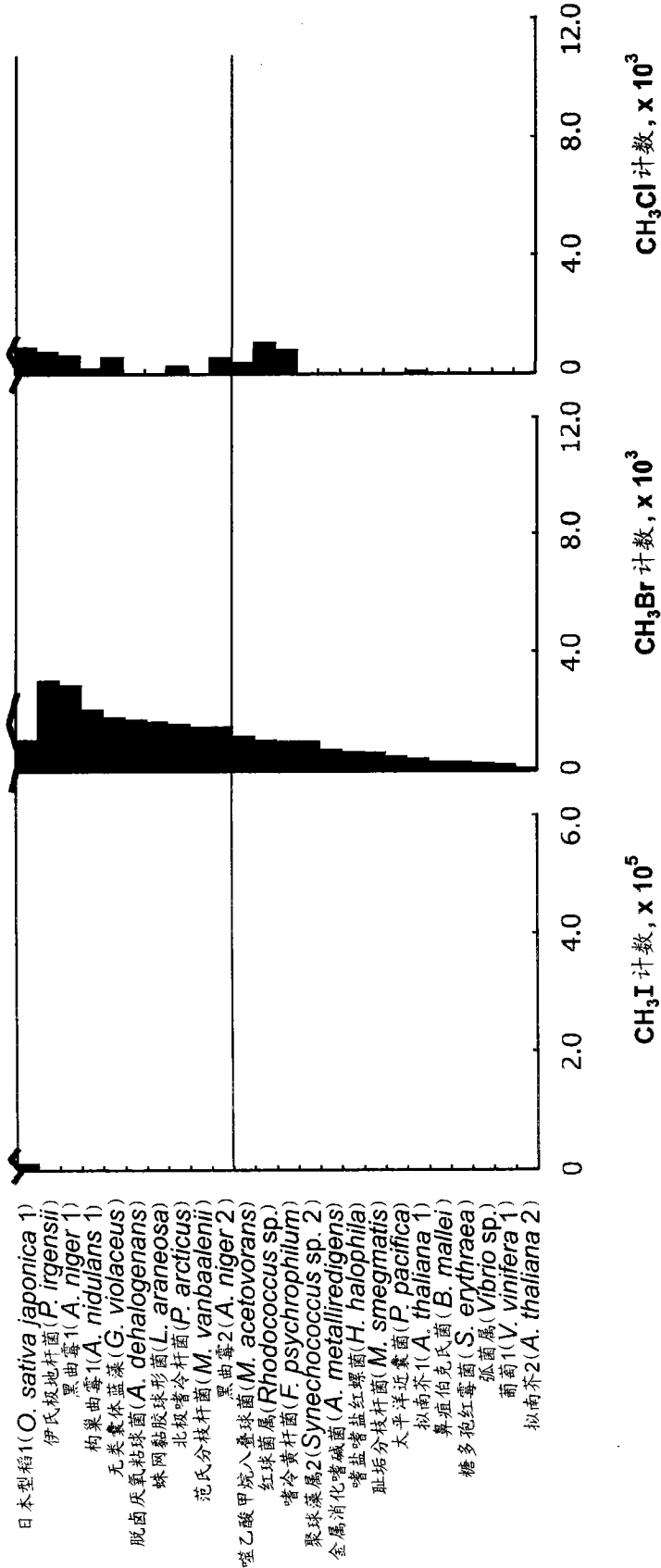


图 10A(续)

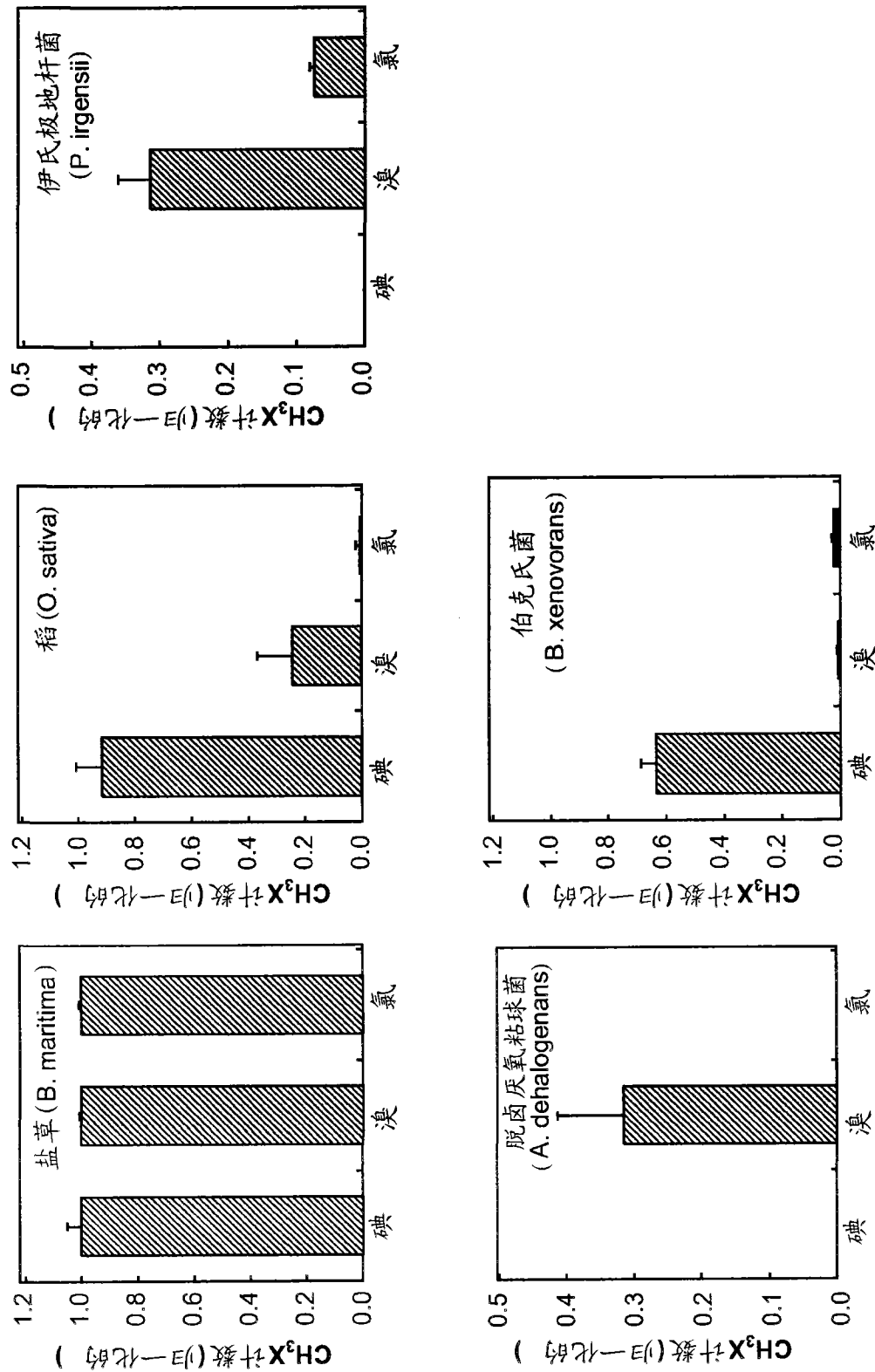


图 10B

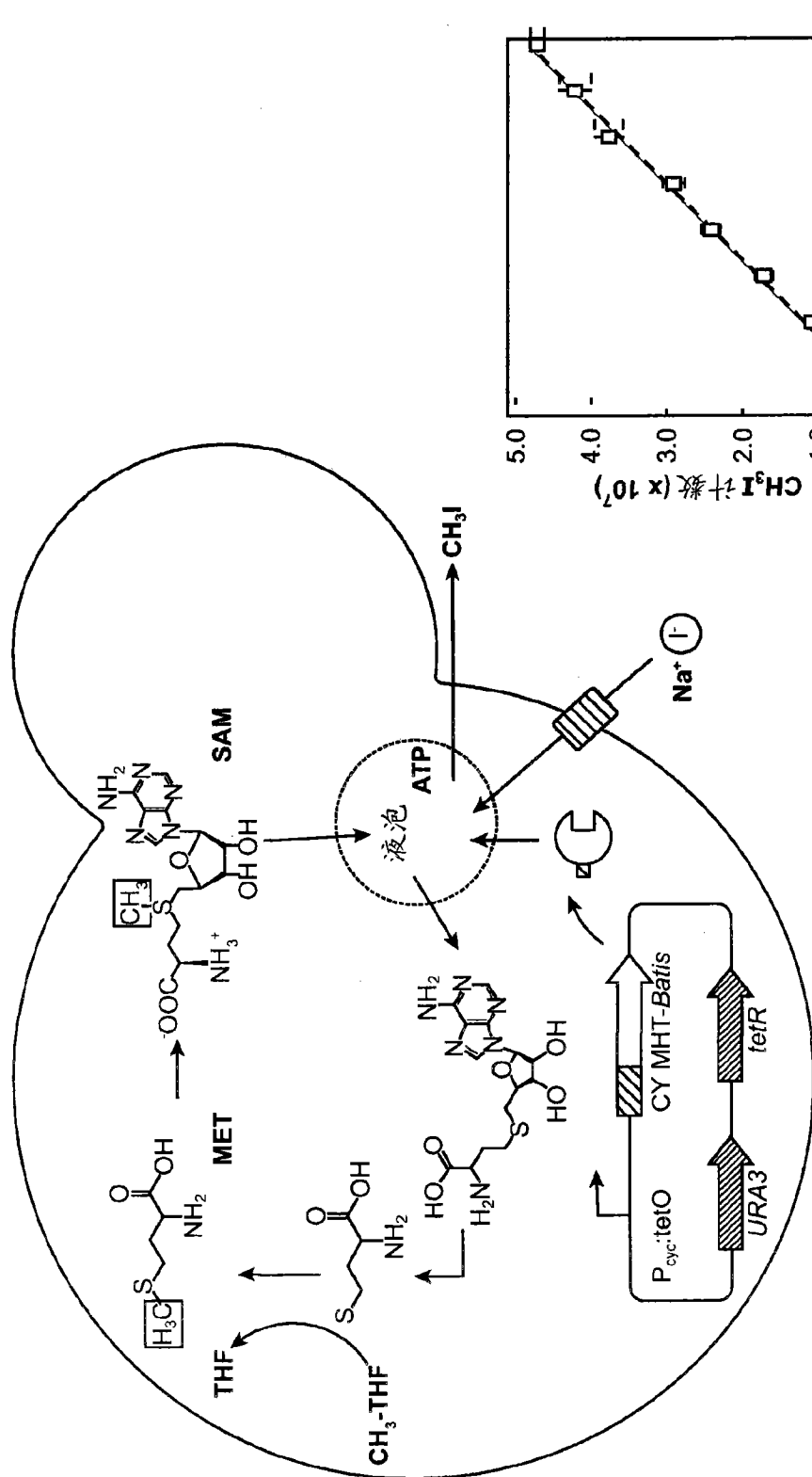


图 11A

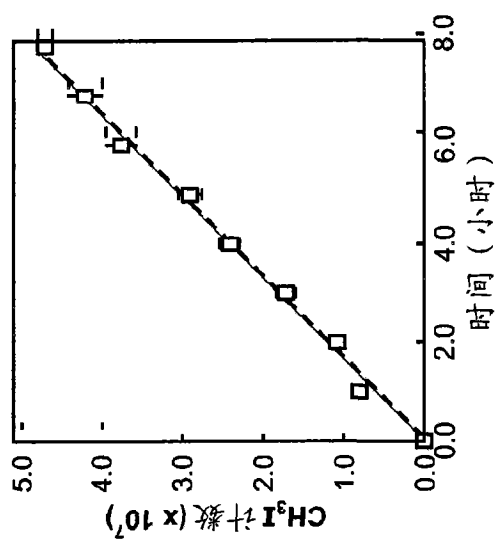


图 11B

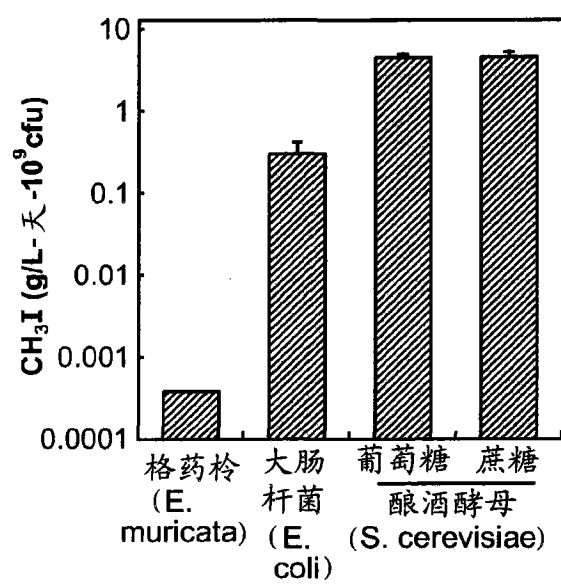


图 11C

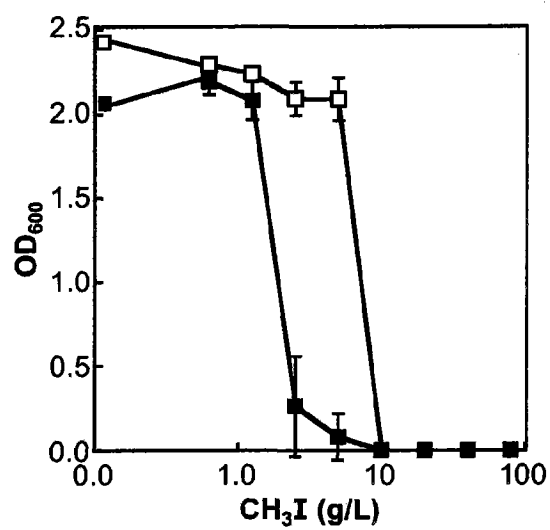


图 11D

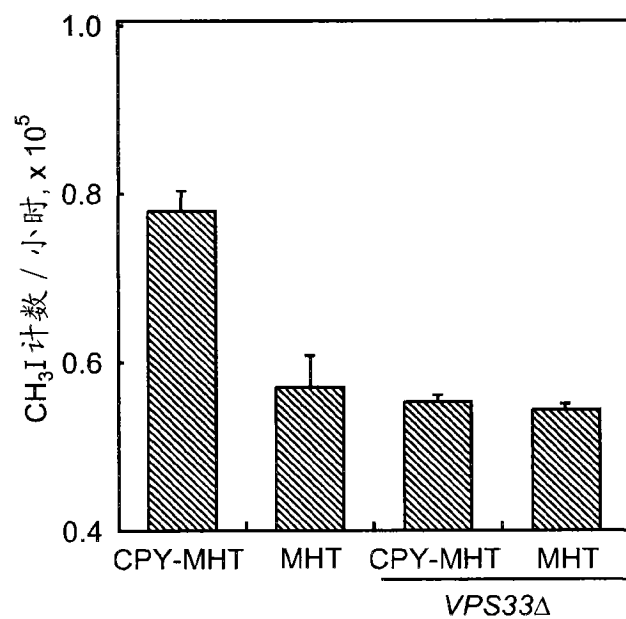


图 12