

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580024343.0

[51] Int. Cl.

C12P 23/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 22 日

[11] 公开号 CN 101023181A

[51] Int. Cl. (续)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

[22] 申请日 2005.5.20

[21] 申请号 200580024343.0

[30] 优先权

[32] 2004.5.21 [33] US [31] 60/573,492

[86] 国际申请 PCT/US2005/017874 2005.5.20

[87] 国际公布 WO2006/085899 英 2006.8.17

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.19

[71] 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·D·基斯林 J·D·纽曼

D·J·皮特拉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 4 页 说明书 78 页 序列表 39 页
附图 46 页

[54] 发明名称

提高类异戊二烯化合物的产生的方法

[57] 摘要

本发明提供了在遗传修饰的宿主细胞中产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的方法。该方法通常包括：调节细胞中羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG - CoA) 的水平，以使 HMG - CoA 水平对细胞没有毒性和/或不显著抑制细胞生长，但却维持在可高水平产生甲羟戊酸、IPP 和类异戊二烯或类异戊二烯途径的其它下游产物(如多异戊烯二磷酸酯和类异戊二烯化合物)的水平。本发明还提供了适用于本发明方法的遗传修饰的宿主细胞。本发明还提供了用于产生本发明遗传修饰的宿主细胞的重组核酸构建物，包括含有编码一个或多个甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的重组核酸构建物，以及含有上述重组核酸构建物的重组载体(例如，重组表达载体)。本发明还提供了鉴定编码可缓解 HMG - CoA 累积诱导的毒性的 HMG - CoA 还原酶(HMGR)变体的核酸的

方法。本发明还提供了用于鉴定减少 HMG - CoA 细胞内累积的试剂的方法。

1. 一种在宿主细胞中降低 HMG-CoA 毒性并提高通过甲羟戊酸途径产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体的方法，其中，所述宿主细胞通过甲羟戊酸途径产生类异戊二烯或类异戊二烯前体，所述方法包括：

(a)遗传修饰所述宿主细胞以包含一种或多种编码一种或多种酶的异源核酸，与没有用所述异源核酸遗传修饰的对照亲代宿主细胞相比，当所述酶在细胞中产生时降低 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制；和

(b)在使遗传修饰的宿主细胞中产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体水平高于对照亲代宿主细胞中产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体水平的条件下，培养所述遗传修饰的宿主细胞。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述一种或多种酶包括具有 HMG-CoA 还原酶(HMGR)活性的酶。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述遗传修饰的宿主细胞中产生的 HMGR 水平比对照宿主细胞高至少约 10%。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，编码 HMGR 的核苷酸序列可操作地连接于强启动子。

5. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述包含编码 HMGR 的核苷酸序列的核酸是高拷贝数质粒。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述一种或多种酶包括 HMG-CoA 合酶(HMGS)。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述遗传修饰的宿主细胞中产生的 HMGS 水平比对照宿主细胞低至少约 10%。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述包含编码 HMGS 的核苷酸序列的核酸是低拷贝数质粒。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述亲代宿主细胞是通过甲羟戊酸途径正常产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的细胞。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述亲代宿主细胞是不通过甲羟戊酸途径正常产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的细胞，其中，所述亲代

宿主细胞经遗传修饰以通过甲羟戊酸途径产生类异戊二烯或类异戊二烯前体。

11. 如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述亲代宿主细胞经一种或多种包含编码下述酶的核苷酸序列的核酸遗传修饰: 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 合酶、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶、甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶、甲羟戊酸焦磷酸酯脱羧酶、异戊烯焦磷酸酯异构酶和异戊烯基转移酶。

12. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述类异戊二烯前体是异戊烯二磷酸酯(IPP), 所述遗传修饰的宿主细胞中产生的 IPP 水平比对照亲代宿主细胞中产生的 IPP 水平高至少约 10%。

13. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述类异戊二烯前体是甲羟戊酸, 所述遗传修饰的宿主细胞中产生的甲羟戊酸水平比对照亲代宿主细胞中产生的甲羟戊酸水平高至少约 10%。

14. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述类异戊二烯化合物是多萜。

15. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述类异戊二烯化合物是二萜。

16. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述类异戊二烯化合物是单萜。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述类异戊二烯化合物是三萜。

18. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述类异戊二烯化合物是倍半萜。

19. 一种在宿主细胞中通过甲羟戊酸途径合成异戊烯焦磷酸酯(IPP)的方法, 所述方法包括: 在合适的培养基中培养遗传修饰的宿主细胞, 其中, 所述遗传修饰的宿主细胞通过甲羟戊酸途径产生 IPP, 与未经遗传修饰以包含一个或多个突变且显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的对照亲代宿主细胞相比, 所述遗传修饰的宿主细胞在包含编码一种或多种酶的核苷酸序列的内源性核酸中具有一个或多个突变, 当所述酶在细胞中产生时降低 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制, 并且, 所述遗传修饰的宿主细胞中产生的 IPP 水平高于对照亲代

宿主细胞中产生的 IPP 水平。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述内源性核酸包含编码 HMG-CoA 合酶(HMGS)的核苷酸序列。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述遗传修饰的宿主细胞中产生的 HMGS 水平比对照亲代宿主细胞中低至少约 10%。

22. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述突变位于 HMGS 编码区，所述突变形成酶活性降低的 HMGS。

23. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述突变位于控制 HMGS 编码序列转录的启动子中。

24. 一种在宿主细胞中提高通过甲羟戊酸途径产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的方法，所述方法包括：在合适的培养基中培养遗传修饰的宿主细胞，其中，所述遗传修饰的宿主细胞通过甲羟戊酸途径产生类异戊二烯或类异戊二烯前体，与未经一种或多种异源核酸遗传修饰且显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的对照亲代宿主细胞相比，所述遗传修饰的宿主细胞含有一种或多种包含编码一种或多种酶的核苷酸序列的异源核酸，当所述酶在所述细胞中产生时降低 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制，并且，所述遗传修饰的宿主细胞中产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体水平高于对照亲代宿主细胞中产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体水平。

25. 一种鉴定包含编码变体 HMG-CoA 还原酶(HMGR)的核苷酸序列的核酸的方法，其中所述变体 HMG-CoA 还原酶(HMGR)降低细胞内 HMG-CoA 累积，所述方法包括：

a)通过将包含编码候选基因产物的核苷酸序列的外源性核酸引入宿主细胞产生试验细胞，其中，所述宿主细胞通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸并显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制；和

b)如果有的话，确定候选基因产物的表达对试验细胞生长的影响，其中，生长抑制的减少表明候选基因产物编码降低细胞内 HMG-CoA 累积的变体 HMGR。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述外源性核酸是合成的。

27. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述外源性核酸分离自与宿

主细胞不同种类的细胞。

28. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述外源性核酸分离自真核细胞或原核细胞。

29. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述外源性核酸是 cDNA 文库。

30. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述宿主细胞是原核细胞。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其特征在于，所述宿主细胞经遗传修饰以通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸。

32. 如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述宿主细胞经一种或多种包含编码一种或多种下列酶的核苷酸序列的核酸遗传修饰：乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 合酶、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶、甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶和甲羟戊酸焦磷酸酯脱羧酶。

33. 如权利要求 25 所述的方法，还包括从试验细胞分离外源性核酸。

34. 一种鉴定减少细胞中 HMG-CoA 累积的试剂的方法，所述方法包括：

a) 使试验细胞与受试试剂相接触，其中，所述试验细胞通过甲羟戊酸途径合成甲羟戊酸，并且所述试验细胞显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制；和

b) 如果有的话，确定受试试剂对 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的作用，其中，生长抑制减少表明所述候选试剂降低了细胞中 HMG-CoA 的累积水平。

提高类异戊二烯化合物的产生的方法

交叉引用

本申请要求 2004 年 5 月 21 日提交的美国临时专利申请第 60/573,492 号的优先权，该临时申请的全部内容通过引用包括在此。

关于联邦发起研究的声明

依据国家科学基金授予的资助号 BES-9911463 和海军研究所授予的资助号 FDN00014-99-0182，美国政府可能对本发明享有某些权利。

发明领域

本发明涉及产生类异戊二烯（isoprenoid）化合物的领域，具体涉及遗传修饰以产生类异戊二烯化合物的宿主细胞。

发明背景

类异戊二烯构成了大量各种各样的天然产物，它们具有相同的生物合成来源，即单一代谢前体异戊烯二磷酸酯(isopentenyl diphosphate)(IPP)。已公开了至少 20,000 种类异戊二烯。通过定义，类异戊二烯由称为异戊二烯(C5)的单元构成。类异戊二烯中存在的碳原子数目通常是 5 的倍数(C5、C10、C15、C20、C25、C30 和 C40)，虽然也报道了不规则类异戊二烯和多萜。类异戊二烯化合物也称为“萜”或“萜类化合物”。类异戊二烯的重要成员包括类胡萝卜素、倍半萜、二萜和半萜。类胡萝卜素包括，例如番茄红素、 β -胡萝卜素等，其中许多用作抗氧化剂。倍半萜包括例如青蒿素，它是一种具有抗疟活性的化合物。二萜包括例如紫杉醇，它是一种癌症化学治疗剂。

类异戊二烯是数量最多、结构最多样的天然产物家族。在该家族中，从植物和前体天然来源分离的萜类化合物用作市售矫味和芳香性化合物以及抗疟药和抗癌药物。目前使用的大多数萜类化合物是天然产物或其衍生物。这种天

然产物中的许多来源生物体(例如, 树木、海洋无脊椎动物)既不能进行大规模培养以产生商业上有活力的量, 也不能进行基因操作以提高产量或衍生这些化合物。因此, 这些天然产物必需从类似物半合成或采用常规化学合成方法合成。而且, 许多天然产物具有复杂结构, 使得目前合成不经济或不能合成。这些天然产物必需从其天然来源如树木、海绵动物、珊瑚和海洋微生物提取; 或者从更充足的前体合成或半合成产生。从天然来源提取天然产物受到天然来源可获得性的限制; 并且, 天然产物的合成或半合成制备产率低和/或成本高。这些制备问题和天然来源限制的可获得性限制了这些产物的商业和临床发展。

类异戊二烯天然产物在工程化微生物中的生物合成将能够开发上述天然来源尚未实现的商业和治疗潜力, 并产生花费较少、可更广泛获得的精细化学品和药品。高水平萜类化合物生物合成的主要障碍在于萜前体的制备。现有试验已表明, 当在大肠杆菌中表达时, 甲羟戊酸(mevalonate)途径可产生异戊烯焦磷酸酯(isopentenyl pyrophosphate)(IPP), 异戊烯焦磷酸酯可异构化并聚合形成具有商业价值的类异戊二烯和萜。使微生物代谢最佳地重新定向为朝产生类异戊二烯的方向需要适当工程改造所引入的生物合成途径, 使其既能使碳有效聚集于 IPP 同时又不产生有毒的中间体。事实上, 已发现产生甲羟戊酸的酶的表达可抑制细胞生长和限制微生物培养物的生产。已提示过去报道的在没有 IPP 异构酶、FPP 合成酶和萜合成酶的情况下, 通过表达甲羟戊酸途径抑制生长可导致毒性水平 IPP 的累积。

本领域需要改进的产生类异戊二烯或产生类异戊二烯前体的宿主细胞, 所述宿主细胞同时提供宿主细胞的强壮生长和类异戊二烯化合物的高水平产生, 以及这些化合物的多异戊烯二磷酸酯(polyprenyl diphosphate)前体。本发明解决了这种需要并提供了相关优点。

参考文献

美国专利公开 2004/005678; 美国专利公开 2003/0148479; Martin 等, (2003)Nat. Biotech. 21(7):796-802; Polakowski 等, (1998)Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 67-71; Wilding 等, (2000)J Bacteriol 182(15): 4319-27; 美国专利公开 2004/0194162; Donald 等, (1997)Appl. Env. Microbiol. 63:3341-3344;

Jackson 等, (2003)Organ. Lett. 5:1629-1632; 美国专利公开 2004/0072323; 美国专利公开 2004/0029239; 美国专利公开 2004/0110259; 美国专利公开 2004/0063182; 美国专利 5,460,949; 美国专利公开 2004/0077039; 美国专利 6,531,303; 美国专利 6,689,593; Hamano 等, (2001)Biosci. Biotechnol. Biochem. 65:1627-1635; T. Kuzuyama. (2004)Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(4): 931-934; T. Kazuhiko. (2004)Biotechnology Letters. 26: 1487-1491; Brock 等, (2004)Eur J. Biochem. 271: 3227-3241; Choi 等, (1999)Appl. Environ. Microbio. 65 4363-4368; Parke 等, (2004)Appl. Environ. Microbio. 70: 2974-2983; Subrahmanyam 等, (1998)J. Bad. 180: 4596-4602; Murli 等, (2003)J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 500-509。

发明概述

本发明提供了在遗传修饰的宿主细胞中产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的方法。该方法通常包括：调节细胞中羟甲基戊二酸单酰辅酶A(hydroxymethylglutaryl-CoA)(HMG-CoA)的水平，以使 HMG-CoA 水平对细胞没有毒性和/或不显著抑制细胞生长，但却维持在可高水平产生甲羟戊酸、IPP 和类异戊二烯或类异戊二烯途径的其它下游产物（如多异戊烯二磷酸酯和类异戊二烯化合物）的水平。本发明还提供了适用于本发明方法的遗传修饰的宿主细胞。本发明还提供了用于产生本发明遗传修饰的宿主细胞的重组核酸构建物，包括含有编码一个或多个甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的重组核酸构建物，以及含有上述重组核酸构建物的重组载体(例如，重组表达载体)。本发明还提供了鉴定编码可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的 HMG-CoA 还原酶(HMGR)变体的核酸的方法。本发明还提供了用于鉴定减少 HMG-CoA 细胞内累积的试剂的方法。

附图简要说明

图 1 是类异戊二烯代谢途径的示意图，从异戊烯二磷酸酯(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸酯(DMAPP)产生类异戊二烯生物合成途径中间体多异戊烯二磷酸酯牻牛儿基二磷酸酯(GPP)、法呢基二磷酸酯(FPP)和牻牛儿基牻牛儿基二磷酸

酯(GGPPP)。

图 2 是甲羟戊酸(MEV)途径产生 IPP 的示意图。

图 3 是 DXP 途径产生 IPP 和二甲基烯丙基焦磷酸酯(DMAPP)的示意图。

图 4 显示了在没有甲羟戊酸、补充有 10 mM 甲羟戊酸或 20 mM 甲羟戊酸的培养基中培养的遗传修饰以通过甲羟戊酸途径产生 IPP 的大肠杆菌菌株中，紫穗槐二烯 (amorphadiene) 的产生。

图 5 显示了 MevT 操纵子表达增加对用 MevT 操纵子遗传修饰的大肠杆菌细胞生长的抑制作用。

图 6 显示了 MevT 操纵子中包含的单个基因及其组合的表达增加对细胞生长的影响。

图 7 显示了无催化活性的 HMGS 对大肠杆菌细胞生长的影响。

图 8 显示了在表达毒性甲羟戊酸途径构建物的大肠杆菌菌株中 HMG-CoA 的细胞内累积。

图 9 显示了 HMG-CoA 累积对细胞生长的影响。

图 10 显示了 tHMGR 表达增加对细胞生长的影响。

图 11 显示了 tHMGR 表达增加对 HMG-CoA 累积的影响。

图 12 显示了 tHMGR 表达增加对甲羟戊酸产生的影响。

图 13 A-C 显示了 pBAD24MevT 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。

图 14A-C 显示了 pBAD33MevT 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。

图 15A-C 显示了 pMevT 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)。

图 16A-D 显示了 pMBIS 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。

图 17A-B 显示了 pADS 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:5)。

图 18A-B 显示了 pAtoB 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:6)。

图 19A-B 显示了 pHMGS 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:7)。

图 20 A-C 显示了 pHMGR 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO : 8)。

图 21 A-C 显示了 pBAD18HMGR 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:9)。

图 22A-C 显示了 pHMGSR 质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO: 10)。

图 23A-C 显示了 pBAD33MevT(C159A)质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO: 11)。

图 24A-C 显示了 pHMGS(C159A)质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO: 12)。

定义

术语“类异戊二烯”、“类异戊二烯化合物”、“萜”、“萜化合物”、“萜类”和“萜类化合物”在本文中可互换使用。类异戊二烯化合物由各种数量的所谓异戊二烯(C5)单元构成。类异戊二烯中存在的碳原子数量通常是 5 的倍数(例如, C5、C10、C15、C20、C25、C30 和 C40)。也报道了不规则类异戊二烯和多萜, 它们也包括在“类异戊二烯”的定义中。类异戊二烯化合物包括但不限于: 单萜、倍半萜、三萜、多萜和二萜。

如本文所用, 术语“异戊烯二磷酸酯(prenyl diphosphate)”可与“异戊烯焦磷酸酯(prenyl pyrophosphate)”互换使用, 包括具有一个异戊烯基的单异戊烯二磷酸酯(例如, IPP 和 DMAPP), 以及具有 2 个或多个异戊烯基的多异戊烯二磷酸酯。单异戊烯二磷酸酯包括异戊烯焦磷酸酯 (IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸酯(DMAPP)。

如本文所用, 术语“萜合成酶”指对 IPP、DMAPP 或多异戊烯焦磷酸酯进行酶学修饰从而产生萜类化合物的任何酶。术语“萜合成酶”包括催化异戊烯二磷酸酯转化形成类异戊二烯的酶。

术语“焦磷酸酯”可与“二磷酸酯”互换使用。因此, 例如, 术语“异戊烯二磷酸酯”和“异戊烯焦磷酸酯”可互换; 术语“异戊烯基焦磷酸酯”和“异戊烯基二磷酸酯”可互换; 术语“法呢基二磷酸酯”和“法呢基焦磷酸酯”可互换; 等等。

术语“甲羟戊酸途径”或“MEV 途径”在本文中指乙酰辅酶 A 转化为 IPP 的生物合成途径。甲羟戊酸途径包括催化以下步骤的酶: (a)两分子乙酰辅酶 A 缩合形成乙酰乙酰辅酶 A; (b)乙酰乙酰辅酶 A 与乙酰辅酶 A 缩合形成 HMG-CoA; (c)HMG-CoA 转化形成甲羟戊酸; (d)甲羟戊酸磷酸化形成甲羟戊酸 5-磷酸酯; (e)甲羟戊酸 5-磷酸酯转化形成甲羟戊酸 5-焦磷酸酯; 和(f)甲羟戊酸 5-焦磷酸酯转化形成异戊烯焦磷酸酯。甲羟戊酸途径的示意图如图 2 所示。甲羟戊酸途径的“上半部分”指负责使乙酰辅酶 A 通过 MEV 途径中间体转化形成甲羟戊酸的酶。

术语“1-脱氧-D-木酮糖 5-二磷酸酯途径”或“DXP 途径”在本文中指甘油醛-3-磷酸酯和丙酮酸酯通过 DXP 途径中间体转化为 IPP 和 DMAPP 的途径，其中，DXP 途径包括催化图 3 示意性所示反应的酶。

如本文所用，术语“异戊烯基转移酶”可与术语“异戊烯二磷酸酯合成酶”和“多异戊烯基合成酶”(例如，“GPP 合成酶”、“FPP 合成酶”、“OPP 合成酶”等)互换使用，用于表示催化异戊烯二磷酸酯与烯丙型引物底物连续 1'-4 缩合反应的酶，形成各种链长度的异戊烯二磷酸酯。

术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用，用于表示任意长度的核苷酸聚合形式，无论是核糖核苷酸还是脱氧核苷酸。因此，该术语包括但不限于：单链、双链或多链 DNA 或 RNA、基因组 DNA、cDNA、DNA-RNA 杂交体、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然、化学或生物化学修饰的非天然或衍生的核苷酸碱基的聚合体。

如本文所用，术语“操纵子”和“单个转录单元”可互换使用，用于表示由一个或多个控制元件(例如启动子)协同调节的两个或多个相邻的编码区(编码基因产物如 RNA 或蛋白质的核苷酸序列)。如本文所用，术语“基因产物”指 DNA 编码的 RNA(或反之)或是 RNA 或 DNA 编码的蛋白质，其中，基因典型地包括一个或多个编码蛋白质的核苷酸序列，还可包括内含子和非编码的核苷酸序列。

术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，用于表示任意长度的氨基酸聚合形式，它可包括编码和非编码的氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸和具有修饰的肽骨架的多肽。

术语“天然来源”在本文中应用于核酸、细胞或生物体，表示天然存在的核酸、细胞或生物体。例如，可从天然来源分离并且尚未在实验室中有目的地经人工修饰的生物体(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列是天然来源的。

如本文所用，术语“异源核酸”指具有至少一个以下性质的核酸：(a)对于给定的宿主微生物或宿主细胞来说，核酸是外来的(“外源性”)(即不是天然存在的)；(b)核酸包含给定宿主微生物或宿主细胞中天然存在(例如，“内源性”)的核苷酸序列(例如，核酸包含宿主微生物或宿主细胞的内源性核酸序列)；但是，在异源核酸的涵义中，细胞中可产生非天然量(例如，大于期望或大于天然

存在)的所述内源性存在的同一核苷酸序列,或者细胞中可产生非天然量(例如,大于期望或大于天然存在)的包含与内源性核苷酸序列的序列不同但与内源性序列编码相同蛋白质(具有相同或基本上相同的氨基酸序列)的核苷酸序列的核酸;(c)核酸包含两个或多个其相互关系与天然相互关系不同的核苷酸序列,例如,核酸是重组的。异源核酸的一个例子是可操作地连接于转录控制元件(例如,启动子)的编码 HMGR 的核苷酸序列,编码 HMGR 的内源性(天然来源)序列正常情况下没有可操作地连接于该序列。异源核酸的另一个例子是包含编码 HMGR 的核苷酸序列的高拷贝数质粒。异源核酸的另一个例子是编码 HMGR 的核酸,其中,用编码 HMGR 的核酸遗传修饰不能正常产生 HMGR 的宿主细胞;因此编码 HMGR 的核酸在宿主细胞中并非天然存在,核酸对遗传修饰的宿主细胞来说是异源的。

如本文所用,“重组”表示特定的核酸(DNA 或 RNA)是克隆、限制(restriction)和/或连接步骤的各种组合的产物,形成具有与天然系统中存在的内源性核酸不同的结构编码序列或非编码序列的构建物。通常,可从 cDNA 片段和短的寡核苷酸接头、或从一系列合成的寡核苷酸装配形成编码结构编码序列的 DNA 序列,以提供能够在细胞中所含的重组转录单元或在无细胞转录和翻译系统中得以表达的合成核酸。这种序列可以是未被真核基因中通常存在的内含子或内部非翻译序列间隔的开放式读码框形式。包含相关序列的基因组 DNA 也可用于形成重组基因或转录单元。非翻译的 DNA 序列可存在于开放式读码框的 5'或 3'末端,这些序列不会影响编码区的操纵和表达,实际上可用于通过各种机制调节所需产物的产生(参见下述“DNA 调节序列”)。

因此,例如,术语“重组”多核苷酸或核酸指不是天然存在的,例如,通过人工介入使两个原本分离的序列区段人工组合而制备的多核苷酸或核酸。这种人工组合常常通过化学合成途径、或通过人工操纵分离的核酸区段(例如基因工程技术)来完成。通常,用编码相同或保守氨基酸的冗余密码子代替密码子,同时典型地引入或除去序列识别位点来完成重组。或者,将具有所需功能的核酸区段连接在一起以形成所需的功能组合来进行重组。这种人工组合常常通过化学合成方式,或通过人工操纵分离的核酸区段,例如基因工程技术来实现。

“构建物”指重组核酸，通常指重组 DNA，产生构建物的目的是为了特定核酸序列的表达，或用于构建其它重组核苷酸序列。

如本文所用，术语“外源性核酸”指在天然给定细菌、生物体或细胞中不是正常或天然存在的核酸。如本文所用，术语“内源性核酸”指在天然给定细菌、生物体或细胞中正常存在和/或正常产生的核酸。“内源性核酸”也可指“天然核酸”或给定细菌、生物体或细胞中“天然”的核酸。例如，实施例 1 中编码 HMGS、甲羟戊酸激酶和磷酸甲羟戊酸激酶的核酸代表了大肠杆菌外源性核酸。这些甲羟戊酸途径核酸从酿酒酵母 (*Sacchromyces cerevisiae*) 中克隆。在酿酒酵母中，染色体上编码 HMGS、MK 和 PMK 的基因序列是“内源性”核酸。

术语“DNA 调节序列”、“控制元件”和“调节元件”可互换使用，用于表示转录和翻译控制序列，例如启动子、增强子、多腺苷酸化信号、终止子、蛋白降解信号等，在宿主细胞中提供和/或调节编码序列的表达和/或经编码的多肽的产生。

术语“转化”在本文中可与“遗传修饰”互换使用，用于表示在细胞中引入新的核酸(例如，细胞的外源性 DNA)之后所诱导的暂时或永久性遗传改变。遗传改变(“修饰”)可通过将新的 DNA 引入宿主细胞基因组，或通过暂时或稳定维持新的 DNA 作为附加体元件来实现。当细胞是真核细胞时，通常通过将 DNA 引入细胞基因组来实现永久性遗传改变。在原核细胞中，永久性改变可引入染色体或通过染色体外元件如质粒和表达载体引入，这些染色体外元件可包含一种或多种可选择的标记以利于其在重组宿主细胞中维持。

“可操作地连接”指并置，其中所述组分的关系能使它们以所需的方式起作用。例如，若启动子可影响编码序列的翻译或表达，则启动子可操作地连接于编码序列。如本文所用，术语“异源启动子”和“异源控制区”指通常不与天然特定核酸相连的启动子或其它控制区。例如，“对编码区异源的转录控制区”是通常不与天然编码区相连的转录控制区。

如本文所用，“宿主细胞”指体内或体外真核细胞、原核细胞或来自以单细胞实体培养的多细胞生物(例如，细胞株)的细胞，其中，真核或原核细胞可以是、或已经用作核酸(例如，包含编码一个或多个生物合成途径基因产物如甲

羟戊酸途径基因产物的核苷酸序列的表达载体)接受体,包括经核酸遗传修饰的原始细胞的后代。应理解,由于天然、偶然或故意突变,单个细胞的后代在形态或在基因或整套 DNA 方面并不一定与原始亲代完全相同。“重组宿主细胞”(也称为“遗传修饰宿主细胞”)指,已引入异源核酸(例如表达载体)的宿主细胞。例如,本发明原核宿主细胞指,通过将异源核酸,例如对原核宿主细胞外源(不是天然存在)的外源性核酸或原核宿主细胞中不是正常存在的重组核酸引入合适的原核宿主细胞所产生的遗传修饰的原核宿主细胞(例如,细菌);本发明真核宿主细胞指,通过将异源核酸,例如对真核宿主细胞外源的外源性核酸或真核宿主细胞中不是正常存在的重组核酸引入合适的真核宿主细胞所产生的遗传修饰的真核宿主细胞。

如本文所用,术语“分离的”用于描述处于与多核苷酸、多肽或细胞天然存在的环境不同的环境中的多核苷酸、多肽或细胞。分离的遗传修饰宿主细胞可存在于遗传修饰宿主细胞混合群中。

可制备表达盒,它包括转录起始或转录控制区(例如,启动子)、感兴趣蛋白质的编码区和转录终止区。转录控制区包括:提供感兴趣蛋白质在遗传修饰宿主细胞中过度表达的区域;提供可诱导表达的区域,使得当将诱导剂加入到培养介质中时,诱导感兴趣蛋白质编码区的转录或使转录增加至比诱导前高的水平。

当某核酸单链形式可在合适的温度和溶液离子强度条件下与另一个核酸退火,则该核酸与所述另一个核酸如 cDNA、基因组 DNA 或 RNA 是“可杂交的”。杂交条件和洗涤条件是众所周知的,参见 Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis, T.的《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), 具体是第 11 章和其中的表 11.1; 以及 Sambrook, J.和 Russell, W.的《分子克隆:实验室手册》, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001)。温度和离子强度条件决定了杂交的“严谨性”。可调节严谨性条件以筛选中度类似的片段(例如来自远源生物体的同源序列)到高度类似片段(例如从近源生物体复制功能酶的基因)。杂交条件和杂交后的洗涤可用于获得确定所需的杂交严谨条件。一组示例性杂交后洗涤是以下一系列洗涤过程:室

温下,从 $6\times\text{SSC}$ (其中,SSC 是 0.15 M NaCl 和 15 mM 柠檬酸缓冲液)、0.5% SDS 开始,洗涤 15 分钟;然后在 45℃下,用 $2\times\text{SSC}$ 、0.5%SDS 重复洗涤 30 分钟;然后在 50℃下,用 $0.2\times\text{SSC}$ 、0.5% SDS 洗涤 30 分钟,重复两次。通过使用更高的温度可获得其它严谨条件,其中,洗涤过程与上述相同,但是 $0.2\times\text{SSC}$ 、0.5% SDS 中最后两次 30 分钟洗涤的温度升高至 60℃。另一组高度严谨条件采用 65℃下,在 $0.1\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS 中进行最后两次洗涤。另一严谨杂交条件的例子是在 50℃或更高的温度下,在 $0.1\times\text{SSC}$ (15 mM 氯化钠/1.5 mM 柠檬酸钠)中进行杂交。另一严谨杂交条件的例子是在 42℃下,在以下溶液中过夜孵育: 50%甲酰胺, $5\times\text{SSC}$ (150 mM NaCl, 15 mM 柠檬酸三钠), 50 mM 磷酸酯钠(pH 7.6), $5\times\text{Denhardt's}$ 溶液, 10% 硫酸葡聚糖和 20 $\mu\text{g/ml}$ 变性剪切鲑鱼精子 DNA; 然后在约 65℃下,在 $0.1\times\text{SSC}$ 中洗涤滤液。严谨杂交条件和杂交后洗涤条件是至少像上述代表性条件那样严谨的杂交条件和杂交后洗涤条件。

杂交要求两个核酸包含互补序列,虽然根据杂交的严谨性,碱基间也可能存在错配。用于杂交核酸的适当严谨性取决于核酸长度和互补程度,其变化是本领域众所周知的。两个核苷酸序列间的相似或同源程度越大,具有这些序列的核酸杂交体的熔点(T_m)值越高。核酸杂交的相对稳定性(对应于较高的 T_m)以下面的顺序降低: RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。对于长度大于 100 个核苷酸的杂交体来说,演绎了用于计算 T_m 的方程(参见 Sambrook 等,同上, 9.50-9.51)。对于较短核酸即寡核苷酸的杂交来说,错配位置显得更加重要,寡核苷酸的长度决定其特异性(参见 Sambrook 等,同上, 11.7-11.8)。典型地,可杂交核酸的长度至少约为 10 个核苷酸。可杂交核酸的示例性最小长度为:至少约 15 个核苷酸;至少约 20 个核苷酸;以及至少约 30 个核苷酸。而且,技术人员将明白,根据诸如探针长度等因素,可按需要调节温度和洗涤溶液盐浓度。

术语“保守氨基酸取代”指具有类似侧链的氨基酸残基蛋白质的可互换性。例如,具有脂族侧链的氨基酸组由甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸组成;具有脂族羟基侧链的氨基酸组由丝氨酸和苏氨酸组成;具有含酰胺侧链的氨基酸组由天冬酰胺和谷氨酰胺组成;具有芳族侧链的氨基酸组由苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸组成;具有碱性侧链的氨基酸组由酪氨酸、精氨酸和组氨

酸组成；和具有含硫侧链的氨基酸组由半胱氨酸和蛋氨酸组成。示例性保守氨基酸取代组是：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、酪氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

“合成核酸” 可从采用本领域技术人员已知的方法化学合成的寡核苷酸结构单元 (building blocks) 组装而成。连接并退火这些结构单元以形成基因区段，然后酶组装这些基因片段来构建整个基因。“化学合成”用于 DNA 序列时是指核苷酸元件是体外组装的。采用公知方法可完成 DNA 的手动化学合成，或采用多种市售机器中的一种来进行自动化学合成。根据反映宿主细胞密码子偏倚的核苷酸序列最优化，可修饰核酸的核苷酸序列以实现最优表达。本领域技术人员应理解成功表达的可能性，如果密码子选择偏向宿主所偏好的密码子。优选密码子的确定可根据来自可获得序列信息的宿主细胞的基因研究。

多核苷酸或多肽与另一种多核苷酸或多肽具有某百分数的“序列相同性”，是指当比对时，该百分数的碱基或氨基酸相同，当比较两个序列时，该百分数的碱基或氨基酸在相同的相对位置中。可通过许多不同的方法来确定序列相似性。为了确定序列相同性，可采用来自互联网 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST 的方法和计算机程序，包括 BLAST，来比对序列。例如，参见 Altschul 等，(1990), J. Mol. Biol. 215:403-10。另一种比对算法是 FASTA，一种来自 Madison, Wisconsin, USA (Oxford Molecular Group, Inc. 的附属公司) 的 Genetics Computing Group (GCG) 数据包。其它比对技术参见：《酶方法学》(Methods in Enzymology)，第 266 卷：大分子序列分析的计算机方法 (Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis) (1996)，Doolittle 编，Academic Press, Inc., Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA 的分部。尤其感兴趣的是允许序列中存在缺口的比对程序。The Smith-Waterman 是一种允许序列比对中存在缺口的算法。参见 Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)。而且，可采用使用 Needleman & Wunsch 比对法的 GAP 程序来比对序列。参见 J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)。

在进一步描述本发明之前，要了解的是本发明并不限于所描述的具体实施方案，这些实施方案当然是可以变化的。还需要了解的是既然本发明的范围仅受附加的权利要求限制，文中使用的术语仅是为了描述具体的实施方案而不是

用来限制本发明。

在提供数值范围之处，应了解在该范围上下限之间的各中间数值(除非文中另有明确规定,该中间数值到下限单位的十分之一)、以及所述范围中任何其它规定的值或中间数值也包括在内。这些较小范围的上下限可独立地包括在该小范围内，并且也包括在本发明中，服从于所述范围中任何具体排除的限值。在规定的范围包括上下限之一或两者时，排除包括上下限之一或两者的范围也包括在本发明内。

除非另有定义，本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的意思相同。虽然任何类似或等同于文中所描述的方法和材料均可用于实践和测试本发明，现在将描述优选的方法和材料。文中提及的所有出版物均纳入本文作为参考来公开和描述所引用的出版物相关的方法和/或材料。

必须注意的是，除非文中另有明确规定，用在文中和所附权利要求中的单数形式“一个”、“一”与“该”均包括复数对象。因此，例如，“遗传修饰的宿主细胞”包括多个这种宿主细胞，“该 HMG-CoA 还原酶”包括一种或多种本领域技术人员已知的 HMG-CoA 还原酶及其等价形式，等等。还应注意，所附权利要求可能排除了任何任选因素。这样，该声明还可用作与权利要求元素的描述联合使用的排他性术语“单独”、“仅仅”等、或使用“负(negative)”限制的在先基础。

文中提供讨论的出版物仅是因为其公开早于本申请的申请日。不应理解为承认由于在先发明而使本发明不具资格先于这种出版物。此外，所提供的出版物日期可能与实际发表日期不符，这需要独立地证实。

发明详述

本发明提供了在用于产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的遗传修饰宿主细胞中减少 HMG-CoA 抑制性累积的方法，以及在这些宿主细胞中通过消除上述毒性来增加类异戊二烯或类异戊二烯前体的产生的方法。该方法通常包括：调节宿主细胞中羟甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)的水平，以使 HMG-CoA 的水平对宿主细胞没有毒性，和/或不显著抑制宿主细胞的细胞生长。本发明还提供了适用于本发明方法的遗传修饰的宿主细胞。本发明还提供了用于产生本发明遗传修饰宿主细胞的重组核酸构建物。本发明还提供了鉴定可缓解

HMG-CoA 累积诱导的毒性的变体 HMGR 多肽的方法。该方法通常涉及确定试验 HMGR 变体对 HMG-CoA 累积诱导的细胞毒性的作用(如果有的话)。本发明还提供了用于鉴定 HMGS 抑制剂的方法。该方法通常涉及确定试验化合物对 HMG-CoA 累积诱导的细胞毒性的作用(如果有的话)。

本发明部分地基于以下意外观察发现：当甲羟戊酸途径中的中间体 HMG-CoA 在遗传修饰以通过甲羟戊酸途径产生异戊烯焦磷酸酯(IPP)或 IPP 前体的微生物宿主中累积时是有毒的。通过在转化(“遗传修饰”)有一种或多种包含编码一个或多个甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的异源核酸的宿主细胞中(例如，宿主微生物)，研究类异戊二烯化合物(和/或前体，例如甲羟戊酸、IPP 和多异戊烯二磷酸酯)产生的增多中得到了这种发现。甲羟戊酸途径酶如图 2 所示。甲羟戊酸途径包括以下酶反应：(a)两分子乙酰辅酶 A 缩合形成乙酰乙酰辅酶 A；(b)乙酰乙酰辅酶 A 与乙酰辅酶 A 缩合形成 HMG-CoA；(c)HMG-CoA 转化形成甲羟戊酸；(d)甲羟戊酸磷酸化形成甲羟戊酸 5-磷酸酯；(e)甲羟戊酸 5-磷酸酯转化形成甲羟戊酸 5-焦磷酸酯；和(f)甲羟戊酸 5-焦磷酸酯转化形成异戊烯焦磷酸酯。以下发现是料想不到的：即甲羟戊酸途径表达水平的增加导致细胞生长的抑制。

可通过在细菌中表达甲羟戊酸途径来产生类异戊二烯化合物(合适的构建物和方法，参见美国专利公开 20030148479 和 20040005678；和 Martin 等，(2003)Nature Biotech. 21(7):796-802)。产生 IPP 所需的甲羟戊酸途径酶是可变的，这取决于培养条件。例如，在一些实施方式中，产生类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物的宿主细胞是用两种或多种异源核酸遗传修饰的细胞，所述异源核酸含有编码甲羟戊酸激酶(MK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)和甲羟戊酸焦磷酸酯脱羧酶(MPD)(以及任选地异戊烯焦磷酸酯异构酶)的核苷酸序列；并且在含甲羟戊酸的培养基中培养宿主细胞。在其它实施方式中，产生类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物的宿主细胞是用两种或多种含有编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶(HMGS)、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGR)、MK、PMK 和 MPD(以及任选地 IPP 异构酶)的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞。

为了在遗传改变以包含外源性甲羟戊酸途径的宿主或已含有天然(内源性)

甲羟戊酸途径的宿主中增加类异戊二烯产生的水平，可增加细胞内该途径中各个酶的活性水平。一种常用于调节细胞内工程改造的酶的活性水平的方法是调节编码该酶的 mRNA 的转录速率。一种实现该目标的尝试是将启动子(转录起始或转录控制序列)改成更强的启动子。

在表达甲羟戊酸途径的宿主细胞中，通常希望，通过改变控制整个甲羟戊酸途径表达的启动子强度来改变类异戊二烯产生的水平。例如，当从修饰的乳糖可诱导性启动子(例如 pBluescript 和 pBBR1MCS 质粒中的启动子)改变为更强的启动子(例如，共有的 (consensus) 阿拉伯糖-或乳糖-可诱导性启动子)时，通常希望各个酶的表达增加，从而增加类异戊二烯产生的水平。因为甲羟戊酸途径依赖丰富的细胞前体乙酰辅酶 A，预计前体产生不会限制 IPP 的产生。与预计的相反，观察到，上半部分甲羟戊酸途径表达水平增加(即乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 表达水平的增加))导致细胞生长抑制，而所需的类异戊二烯产物的量没有增加。

当将重组 DNA 分子引入生物体以产生酶时，无论该酶用于细胞内催化还是从细胞纯化，均可观察到毒性作用(B.R. Glick. (1995)Biotech Advances. 13(12): 247-261)。这些作用是由于利用了宿主细胞的资源，或者由于该酶意外的活性或毒性中间体的累积。后一种情况可由该途径最终产物水平的增加而引起，或者是单个酶所特有的，该酶的活性与途径中其它酶的活性失去平衡，导致中间体累积至对细胞产生毒性的水平。而且，难以推理预测所引入途径的代谢物在什么水平是有毒的指标，或这些代谢物开始显示毒性作用的水平，因为化学类似中间体可具有显著不同的细胞内作用。

例如，乙酰辅酶 A 在细胞内的水平可非常高，而没有任何毒性作用。丙酰辅酶 A 已显示对生长在葡萄糖上的构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 有毒(Brock 等, Eur J. Biochem. 271,3227-3241 (2004))。采用丙酰辅酶 A 合成酶工程改造以累积 PHA 的大肠杆菌并不显示明显的丙酰辅酶 CoA 诱导的生长抑制作用，并可生长至高的细胞密度(Choi 等, Appl. Environ. Microbio. 65 4363-4368 (1999))。可能是由于羟基桂皮烯醛基辅酶 A 的累积，在敲除羟基桂皮烯醛基辅酶 A 水合酶/裂合酶的不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 菌株中观察到对咖啡酸盐、p-香豆素盐和阿魏酸盐的敏感性(Parke 等, Appl. Environ. Microbio. 70,2974-2983

(2004))。同一参考文献表明,可能由于羟基桂皮烯醛基辅酶 A 的累积,在过度表达 *hcaC* 的大肠杆菌中观察到对上述三种底物的敏感性。 β -酮酰基载体蛋白合成酶 II (KAS II)在大肠杆菌中的过度产生导致丙二酸单酰辅酶 A 累积至抑制生长的水平。丙二酸单酰辅酶 A:ACP 酰基转移酶(催化丙二酸单酰辅酶 A 转化为丙二酸单酰 ACP 的酶)的表达,以及 KAS II 部分地缓解上述毒性(Subrahmanyam 等, J. Bact. 180 4596-4602 (1998))。丙二酸单酰/甲基丙二酸单酰辅酶 A 连接酶在大肠杆菌中的表达结合给予丙二酸甲酯,可导致甲基丙二酸单酰辅酶 A 累积至高达 90%的脂酰辅酶 A 库。尚未报道在该菌株中的生长抑制作用(Murli 等. J Ind. Microbiol. Biotechnol. 30 500-509 (2003))。

大多数含甲羟戊酸途径的生物体,例如智人,利用 HMGR 作为类异戊二烯产生的调节点。为了限制类异戊二烯的产生,这些生物体降低 HMGR 活性,自然地促进了其前体 HMG-CoA 的累积。可以设想,这种 HMG-CoA 的累积也可在摄取降低胆固醇药物[(例如,他汀类药物阿托伐他汀(立普妥)、氟伐他汀(来适可)、洛伐他汀(Altacor,美降脂)、普伐他汀(普拉固)、罗苏伐他汀(Crestor)和辛伐他汀(舒降之))]]的患者中发生,抑制了 HMGR 的活性。他汀类药物的广泛使用而没有 HMG-CoA 累积引起的系统性毒性表明, HMG-CoA 是智人的无毒性代谢物。

在甲羟戊酸途径酶表达导致毒性的情况下,采用液相色谱-质谱法的代谢物分析将生长抑制表型与途径中间体 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)的累积连接在一起。该发现表明,在工程改造(“遗传修饰”)微生物宿主细胞中,中间体 HMG-CoA 可累积并导致细胞死亡或阻止细胞进一步生长,因此,通过抑制细胞生长和/或在碳向所需类异戊二烯转移的过程中产生瓶颈,从而阻碍了 IPP 的产生。

HMG-CoA 的累积表明,在工程改造的甲羟戊酸途径中, HMG-CoA 的产生与 HMG-CoA 向甲羟戊酸的后续转化之间存在不平衡。通过增加 HMG-CoA 还原酶(HMGR)(将 HMG-CoA 转化为甲羟戊酸的酶)的总体活性,可克服上述毒性,导致甲羟戊酸和从甲羟戊酸合成的类异戊二烯的产生增加。另一种降低 HMG-CoA 累积的方法是通过降低 HMG-CoA 合酶(HMGS,将乙酰乙酰辅酶 A 转化为 HMG-CoA 的酶)的总体活性来限制 HMG-CoA 的产生。另一种降低

HMG-CoA 累积的方法是降低影响乙酰乙酰辅酶 A(HMG-CoA 的直接前体)产生的酶(例如乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶)的水平和/或活性。

根据本发明方法,可将 HMG-CoA 水平调节至消除毒性并允许微生物细胞适当生长的水平,从而允许类异戊二烯或类异戊二烯前体产生的显著增加。应注意,虽然调节 HMG-CoA 水平可能不会导致每个细胞产生的类异戊二烯的增加,甚至可导致降低,但是细胞生长的增加可不仅仅抵消了这种损失,导致培养物中产生更多的类异戊二烯。例如,如果调节 HMGS 的活性,使得细胞内 HMG-CoA 的水平降低,每个细胞类异戊二烯的水平降低 10%但细胞生长加倍,事实上,培养物中总的生产力(每个细胞的活性乘以培养物中的细胞数量)将增加。因此,通过在细胞中降低 HMG-CoA 合酶的活性水平和/或通过增加 HMG-CoA 还原酶活性水平可增加 IPP 或类异戊二烯化合物的产生

调节(增加或降低)细胞中活性 HMGS 和/或 HMGR 的活性可通过一些方式实现: 1)调节(增加或降低)编码该酶的核酸的转录; 2)调节(增加或降低)编码该酶的 mRNA 的翻译; 3)调节(增加或降低)编码该酶的 mRNA 的稳定性; 4)调节(增加或降低)该酶本身的稳定性; 和 5)调节(增加或降低)该酶的酶活性。为了降低或消除 HMG-CoA 的毒性作用和增加类异戊二烯和/或类异戊二烯前体的产生,本发明还提供了细胞,用于制备该细胞的核酸和表达载体,其中,已重新设计甲羟戊酸途径以使 HMG-CoA 水平无毒。

实现较高 IPP 产生的努力集中在推定的速率限制酶如 HMGR 在含有内源性甲羟戊酸途径的细胞中的过度表达。例如,参见 Polakowski 等, (1998)Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 67- 71 (产生类异戊二烯角鲨烯); Donald 等, (1997)Appl. Env. Microbiol. 63:3341- 3344 (产生类异戊二烯角鲨烯); 和 Jackson 等, (2003)Org. Letters 5:1629-1632 (产生类异戊二烯表柏木脑)。这些报道没有描述通过表达 HMGR 缓解 HMG-CoA 诱导的毒性,而是由以下发现驱使的: 在许多生物体中, HMGR 是在天然利用甲羟戊酸途径产生类异戊二烯的生物体中产生类异戊二烯的进化调节点。在这些情况下,由于 HMGR 的过度表达,类异戊二烯的产生分别增加了 3-10 倍。

以下研究探索了大肠杆菌中的甲羟戊酸途径酶。Hamano 等((2001)Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 1627-1635)报道了用含有来自链霉菌属的甲羟戊酸途

径聚簇 (cluster) 的高拷贝构建物 pGEM-MEV 转化大肠杆菌菌株 DYMI 的尝试是不成功的。用含有相同甲羟戊酸途径聚簇的低拷贝构建物 pMW-MEV 转化相同菌株的尝试是成功的。该作者认为, 链霉菌属甲羟戊酸途径基因在大肠杆菌中的高表达可能是致死的。Wilding 等, (2000) *J Bacteriol* 182(15): 4319-27) 报道, 在甲羟戊酸的存在下, 革兰氏阳性菌肺炎链球菌 (*S.pneumoniae*), 缺少 HMG-CoA 合酶和 HMG-CoA 还原酶的突变体能够存活, 而仅缺少 HMG-CoA 合酶的突变体则不能存活。

此外, 本发明还提供了鉴定具有 HMG-CoA 解毒活性的基因产物的筛选方法。该方法通常包括: a) 通过将含有编码候选基因产物的核苷酸序列的外源性核酸引入遗传修饰的宿主细胞来产生试验细胞, 其中, 在没有上述外源性核酸的存在下, 所述遗传修饰的宿主细胞产生 HMG-CoA, HMG-CoA 的水平能有效抑制遗传修饰的宿主细胞的生长; 以及 b) 确定候选基因产物的表达对试验细胞生长的影响(如果有的话)。生长抑制的降低表明, 该外源性核酸编码具有足以缓解 HMG-CoA 毒性的活性的基因产物。

此外, 本发明还提供了鉴定抑制 HMG-CoA 累积的化合物的筛选方法。该方法通常包括: a) 使产生可有效抑制其生长的 HMG-CoA 的试验细胞与试验化合物相接触; 以及 b) 确定试验化合物与细胞的接触对细胞生长的影响(如果有的话)。生长抑制的降低表明, 该外源性化合物具有足以缓解 HMG-CoA 毒性的活性。

如上所述, 大多数含甲羟戊酸途径的生物体, 例如智人, 采用 HMGR 作为类异戊二烯产生的调节点。为了限制类异戊二烯的产生, 这些有机体降低 HMGR 活性, 导致其前体 HMG-CoA 的累积。这种 HMG-CoA 累积也可在摄取抑制 HMGR 活性的降低胆固醇药物的患者中发生。

为了帮助理解本发明, 提供图 1-3, 这些图示意性显示了导致类异戊二烯或类异戊二烯前体产生的生物合成途径。

图 1 显示了类异戊二烯途径, 包括用异戊烯基转移酶修饰异戊烯二磷酸酯 (IPP) 和/或其异构体二甲基烯丙基二磷酸酯 (DMAPP), 产生多异戊烯二磷酸酯牻牛儿基二磷酸酯 (GPP)、法呢基二磷酸酯 (FPP) 和牻牛儿基牻牛儿基二磷酸酯 (GGPP)。GPP 和 FPP 进一步由萜合成酶修饰, 分别产生单萜和倍半萜; GGPP

进一步由萜合成酶修饰，形成二萜和类胡萝卜素。IPP 和 DMAPP 由以下两种途径中的一种产生：甲羟戊酸(MEV)途径和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸酯(DXP)途径。

图 2 示意性显示了 MEV 途径，其中，乙酰辅酶 A 通过一系列反应转化为 IPP。

图 3 示意性显示了 DXP 途径，其中，丙酮酸酯和 D-甘油醛-3-磷酸酯通过一系列反应转化为 IPP 和 DMAPP。除植物细胞之外的真核细胞仅利用 MEV 类异戊二烯途径以使乙酰辅酶 A 转化为 IPP，然后异构化为 DMAPP。植物同时利用 MEV 和甲羟戊酸非依赖性、或 DXP 途径来合成类异戊二烯。原核生物，除一些例外情况，利用 DXP 途径通过分支点分别产生 IPP 和 DMAPP。

缓解 HMG-CoA 毒性以及提高类异戊二烯和类异戊二烯前体产生的方法

本发明提供了在包含、或遗传修饰以包含含有编码甲羟戊酸途径中一种或多种酶的核苷酸序列的核酸的宿主细胞中产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的方法。该方法通常包括：调节细胞中 HMG-CoA 的水平，以使 HMG-CoA 的水平对细胞没有毒性和/或不显著抑制细胞生长，但该 HMG-CoA 水平可使细胞中类异戊二烯或类异戊二烯前体的产生增加。该方法通常包括：在合适的介质中培养遗传修饰的宿主细胞，其中，所述遗传修饰的宿主细胞是用一种或多种对宿主细胞异源的核酸遗传修饰的细胞，所述一种或多种核酸包含编码一种或多种可缓解或降低 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制或毒性的多肽的核苷酸序列。这些可缓解或降低 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制或毒性的多肽包括但不限于：HMG-CoA 还原酶(HMGR)、HMG-CoA 合酶(HMGS)以及影响乙酰乙酰辅酶 A(HMG-CoA 的前体)或甲羟戊酸水平的酶。遗传修饰宿主细胞中产生的类异戊二烯化合物(和/或 HMG-CoA 下游的类异戊二烯前体，例如甲羟戊酸、异戊烯焦磷酸酯(IPP)或多异戊烯二磷酸酯)比没有用一种或多种编码 HMGS 和/或 HMGR 的核酸遗传修饰的对照(“亲代”)宿主细胞中产生的类异戊二烯化合物(和/或 HMG-CoA 下游的类异戊二烯前体，例如甲羟戊酸、IPP 或多异戊烯二磷酸酯)的水平高。本发明还提供了适用于本发明方法的遗传修饰的宿主细胞。本发明还提供用于产生本发明遗传修饰宿主细胞的重组核酸构建物。

在一些实施方式中，本发明提供了通过甲羟戊酸途径在宿主细胞中降低 HMG-CoA 毒性和提高类异戊二烯或类异戊二烯前体产生的方法，其中，所述宿主细胞通过甲羟戊酸途径产生类异戊二烯或类异戊二烯前体。该方法通常包括：(a)遗传修饰宿主细胞以包含一种或多种编码一种或多种酶的异源核酸，与没有用所述异源核酸遗传修饰的对照亲代宿主细胞相比，所述酶一旦在细胞中产生可降低 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制；以及(b)在能使遗传修饰宿主细胞中产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体的水平高于对照亲代宿主细胞中产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体的水平的条件下，培养所述遗传修饰的宿主细胞。

通过降低细胞中 HMGS 的活性水平和/或通过增加 HMGR 的活性水平和/或通过平衡 HMGS 活性和 HMGR 的活性水平来调节亲代宿主细胞中 HMG-CoA 的水平，以缓解 HMG-CoA 累积诱导的细胞毒性。亲代宿主细胞中 HMG-CoA 的水平也可通过促进代谢物通过甲羟戊酸途径的平衡流动的遗传修饰来调节，如下详细所述。

本发明可应用于通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或甲羟戊酸的宿主细胞。这些宿主细胞在本文中称为“亲代”宿主细胞，包含、或遗传修饰以包含：含有编码一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的核苷酸序列的核酸(从而通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或甲羟戊酸)。亲代宿主细胞具有 HMG-CoA 累积诱导的毒性，其中，在没有其它遗传修饰的情况下，细胞内 HMG-CoA 水平可抑制细胞生长，如下所述；因此，例如，亲代宿主细胞如果没有下述的遗传修饰，可在细胞内累积 HMG-CoA 并显示 HMG-CoA 累积诱导的毒性。遗传修饰亲代宿主细胞以包含一种或多种对宿主细胞异源的核酸，其中，所述一种或多种核酸包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列，可在细胞中增加 HMGR 活性水平和/或降低 HMGS 活性水平。与没有用一种或多种包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的亲代宿主细胞相比，用一种或多种包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的宿主细胞中，HMG-CoA 累积诱导的生长抑制降低。用一种或多种包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰宿主细胞导致：a)细胞内 HMGS 活性水平降低；b)细胞内 HMGR 活性水平增加；c)细胞内 HMGS 活性水平降低且

HMGR 活性水平增加; 或 d)HMGS 活性水平与 HMGR 活性水平之间达到平衡, 从而缓解细胞内 HMG-CoA 累积诱导的毒性。

因此, 例如, 可遗传修饰“亲代”(或“亲本”)宿主细胞以包含一种或多种对宿主细胞异源的核酸, 其中, 所述一种或多种核酸包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列。亲代宿主细胞是通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸的细胞。亲代细胞包含、或遗传修饰以包含: 含有编码一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的核苷酸序列的核酸(并且通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸)。亲代细胞显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制。

遗传修饰以包含一种或多种对宿主细胞异源的核酸的亲代细胞被称为“遗传修饰的宿主细胞”, 其中, 所述一种或多种核酸包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列。与没有用一种或多种包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的亲代宿主细胞相比, 在遗传修饰的宿主细胞中 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制降低。此外, 与亲代宿主细胞相比, 遗传修饰的宿主细胞中类异戊二烯或类异戊二烯前体的产生增加。因此, 例如, 与亲代宿主细胞相比, 遗传修饰的宿主细胞中类异戊二烯或类异戊二烯前体的产生增加至少约 10%、至少约 20%、至少约 50%、至少约 2 倍、至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 75 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 300 倍、至少约 400 倍或至少约 500 倍或更多。

降低 HMGS 活性水平和/或增加 HMGR 活性水平

在一些实施方式中, 本发明降低宿主细胞中 HMG-CoA 累积诱导的细胞毒性的方法包括: 降低细胞内 HMGS 活性水平和/或增加细胞内 HMGR 活性水平。降低细胞内 HMGS 活性水平包括降低细胞内 HMGS 多肽的总量; 和降低细胞内 HMGS 多肽的比活。因此, 在一些实施方式中, 通过降低细胞内 HMGS 总量降低细胞内 HMGS 的活性水平。在另一些实施方式中, 通过降低细胞内 HMGS 的比活来降低细胞内 HMGS 的活性水平。类似地, 增加细胞内 HMGR 活性水平包括增加细胞内 HMGR 多肽的总量; 和增加细胞内 HMGR 多肽的比

活。因此,在一些实施方式中,通过增加细胞内 HMGR 总量来增加细胞内 HMGR 的活性水平。在另一些实施方式中,通过增加细胞内 HMGR 的比活性来增加 HMGR 的活性水平。

可通过许多途径降低细胞内 HMGS 的活性水平,包括但不限于:1)降低编码 HMGS 的核酸的转录;2)降低编码 HMGS 的 mRNA 的翻译;3)降低编码 HMGS 的 mRNA 的稳定性;4)降低 HMGS 多肽的稳定性;和 5)降低 HMGS 酶的酶活性。可通过许多途径增加细胞内 HMGR 的活性水平,包括但不限于:1)增加编码 HMGR 的核酸的转录;2)增加编码 HMGR 的 mRNA 的翻译;3)增加编码 HMGR 的 mRNA 的稳定性;4)增加 HMGR 酶的稳定性;和 5)增加 HMGR 酶的酶活性。

因此,在本发明的一些实施方式中,通过调节细胞内 HMG-CoA 合酶和 HMG-CoA 还原酶的活性水平,实现所需的 HMG-CoA 的无毒水平。在一个实施方式中,亲代宿主细胞为天然来源的酵母细胞,或大肠杆菌宿主细胞,用含有 HMGS 和 HMGR 编码序列的载体遗传修饰这些细胞。细胞中产生编码的 HMGS 和 HMGR 酶,不会达到 HMG-CoA 的毒性水平,并实现通过该途径的最佳流动,从而提供高产率的所需产物(类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物)。在一些实施方式中, HMGS 和 HMGR 编码区由不同的启动子控制。在另一个实施方式中, HMGS 和 HMGR 编码区在不同的载体上, HMGS 编码序列任选地位于较低拷贝数目的载体上。在一个实施方式中, HMGS 和 HMGR 编码序列在相同的操纵子上,但 HMGR 编码序列位于 HMGS 编码序列的上游,这种排列不同于含有 HMGS 和 HMGR 编码序列的天然来源的操纵子。

在一些实施方式中,降低细胞内 HMGS 活性水平和/或增加 HMGR 活性水平可降低细胞内 HMG-CoA 的水平,从而降低 HMG-CoA 的毒性和/或生长抑制作用。因此,在一些实施方式中,与显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的对照亲代细胞相比,降低细胞内 HMGS 活性水平和/或增加 HMGR 活性水平可降低 HMG-CoA 的水平至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%或至少约 90%。采用液相色谱-质谱法等可容易地测得细胞中 HMG-CoA 的水平。

在一些实施方式中，降低细胞内 HMGS 活性水平和/或增加 HMGR 活性水平可减少细胞内 HMG-CoA 累积导致的生长抑制作用。因此，在一些实施方式中，与显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的对照细胞相比，降低细胞内 HMGS 活性水平和/或增加 HMGR 活性水平可降低 HMG-CoA 累积介导的生长抑制作用至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%或至少约 90%。采用众所周知的方法，例如约 600nm(OD₆₀₀)处细菌液体培养物的光密度(OD)测定；集落大小；生长速率；等等，来确定遗传修饰的宿主细胞的生长。

在一个示例性实施方式中，对照亲代细胞是用一种或多种包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的原核宿主细胞，其中，HMG-CoA 在细胞内产生和累积的水平可对细胞造成生长抑制或毒性。作为非限制性的例子，对照亲代细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞，所述表达构建物包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列，所述核苷酸序列在质粒或染色体上以所述顺序位于一个多顺反子操纵子中；而遗传修饰的宿主细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌，所述表达构建物包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGR 和 HMGS 的核苷酸序列，所述核苷酸序列在质粒或染色体上以调整的所述顺序位于一个多顺反子操纵子中。作为其它非限制性的例子，对照亲代细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞，所述表达构建物包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列，所述核苷酸序列在中等拷贝质粒上以所述顺序位于一个多顺反子操纵子中；而遗传修饰的宿主细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌，所述表达构建物包含以所述顺序位于低拷贝质粒上的编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶和 HMGS 的核苷酸序列，和在单独的高拷贝质粒上的 HMGR 核苷酸序列。作为其它非限制性的例子，对照亲代细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞，所述表达构建物包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列，所述核苷酸序列在中等拷贝质粒上以所述顺序位于一个多顺反子操纵子中；而遗传修饰的宿主细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌，所述表达构建物包含以所述顺序位于中等拷贝质粒上的

编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶和 HMGS 的核苷酸序列(其中, 改变核糖体结合位点以减少翻译), 和在单独的中等拷贝质粒上的核苷酸序列 HMGR(在该序列中, 启动子已变为较强的启动子)。作为其它非限制性的例子, 对照亲代细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞, 所述表达构建物包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列, 所述核苷酸序列在中等拷贝质粒上以所述顺序位于一个多顺反子操纵子中; 而遗传修饰的宿主细胞是用表达构建物遗传修饰的大肠杆菌, 所述表达构建物包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、具有工程改造蛋白酶位点的 HMGS、以及融合有高度溶解性蛋白(如谷胱甘肽转移酶)的 HMGR 的核苷酸序列, 所述核苷酸以所述顺序位于中等拷贝质粒上。

如上所述, 遗传改造引起蛋白质氨基酸序列的改变将导致 HMGS 和 HMGR 相对催化活性的改变(以 $V_{\max}$ 或 $V_{\max}/K_m$ 衡量)。因此, 在一些实施方式中, 与亲代宿主细胞相比, 以每细胞 HMGR/HMGS 计, 降低 HMGS 活性水平和/或增加 HMGR 活性水平导致遗传修饰的宿主细胞中 HMGR 催化活性与 HMGS 催化活性的比例增加至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 75 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 300 倍、至少约 400 倍或至少约 500 倍或更多。采用众所周知的方法, 例如约 600nm(OD_{600})处细菌液体培养物的光密度(OD)测定; 集落大小; 生长速率; 等等, 可容易地测定遗传修饰宿主细胞的生长。

在另一个实施方式中, 对照亲代细胞是真核细胞, 例如酵母细胞如酿酒酵母。在一些实施方式中, 对照亲代真核细胞在内源性丙酮酸脱羧酶基因中包含一个或多个突变, 使得丙酮酸脱羧酶基因功能损伤, 从而使得 HMG-CoA 在细胞内累积至抑制细胞生长或对细胞有毒的水平。在实施本发明的过程中, 可通过修饰编码 HMGR 或其控制元件的核酸进一步修饰对照亲代细胞, 以增加转录、翻译、或比活水平, 产生遗传修饰的宿主细胞。在一个实施方式中, 通过引入质粒上的、受诱导型启动子控制的 HMGR 来进一步修饰对照亲代细胞。

通过降低 HMG-CoA 合酶的活性水平减少 HMG-CoA 累积的修饰

通过参考本说明书，本领域技术人员将理解，HMG-CoA 水平至少部分地依赖于细胞内 HMGS 的活性水平。在一些实施方式中，上述 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制作用的降低和/或细胞内 HMG-CoA 水平的降低可通过调节细胞内 HMGS 活性水平来实现。因此，在一些实施方式中，减轻 HMG-CoA 累积诱导的毒性和/或 HMG-CoA 的无毒性水平可通过调节细胞内 HMG-CoA 合酶的活性水平来实现。在这些实施方式中，遗传修饰亲代宿主细胞以包含对宿主细胞异源的核酸，所述亲代宿主细胞包含、或遗传修饰以包含：含有编码一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的核苷酸序列的核酸(并通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或甲羟戊酸)，其中，所述核酸包含编码 HMGS 的核苷酸序列，与未用包含编码 HMGS 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的亲代宿主细胞相比，在用包含编码 HMGS 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的宿主细胞中，HMG-CoA 累积诱导的生长抑制降低。

在一个实施方式中，使用编码 HMGS 的异源核酸代替所有或一部分内源性 HMGS 基因。在另一个实施方式中，亲代宿主细胞是遗传修饰以含有外源性 HMGS 基因的细胞；亲代宿主细胞的外源性 HMGS 基因被提供较低 HMGS 活性水平的（例如，HMGS 的量和/或 HMGS 的活性比亲代宿主细胞中的要低）修饰的 HMGS 基因所取代。在另一个实施方式中，降低 HMGS 活性水平的异源核酸编码 HMGS 抑制剂或减少 HMGS 转录物翻译的反义 RNA。在这两种情况下，虽然与亲代菌株相比，修饰的宿主细胞的特异性类异戊二烯或类异戊二烯前体产生速率可能降低，但对 HMG-CoA 有关生长抑制作用的缓解将导致更大的细胞密度，引起类异戊二烯或类异戊二烯前体的产生总体上增加。

在一些实施方式中，将异源核酸引入亲代宿主细胞，异源核酸与编码 HMGS 的内源性核酸重组，从而遗传修饰亲代宿主细胞。在一些实施方式中，与控制内源性 HMGS 转录的内源性启动子相比，异源核酸包含较低启动子强度的启动子，重组事件导致内源性启动子被异源启动子所取代。在其它实施方式中，与内源性 HMGS 相比，异源核酸包含编码显示较低酶活性的 HMGS 的核苷酸序列，重组事件导致内源性 HMGS 编码序列被异源 HMGS 编码序列所取

代。

适用于本发明方法的遗传修饰的宿主细胞被一种或多种异源核酸、包括含有编码 HMGS 的核苷酸序列的核酸遗传修饰，从而降低细胞内 HMGS 的活性水平。与未用一种或多种含有编码 HMGS 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的亲代宿主细胞相比，细胞内 HMGS 的活性水平降低至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%或至少约 90%。亲代宿主细胞显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制。

在一个示例性实施方式中，对照亲代细胞是用一种或多种含有编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的原核宿主细胞，其中，HMG-CoA 在细胞内可产生和累积至抑制生长或对细胞有毒的水平。作为非限制性的例子，对照亲代细胞是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞；而遗传修饰的宿主细胞是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的修饰版本的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌，其中，HMGS 上游的核糖体结合位点已改变以减少翻译。作为非限制性的例子，对照亲代细胞是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞；而遗传修饰的宿主细胞是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的修饰版本的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌，其中，HMGS 的编码区中已引入 RNase 位点。作为非限制性的例子，对照亲代细胞是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞；而遗传修饰的宿主细胞是用包含 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌。例如，参见图 5 和实施例 2。作为非限制性的例子，对照亲代细胞是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞；而遗传修饰的宿主细胞是用包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:8 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌。

在另一个实施方式中，对照亲代细胞是真核细胞，例如酵母细胞如酿酒酵母。在一些实施方式中，对照亲代真核细胞在内源性丙酮酸脱羧酶基因中包含一个或多个突变，使得丙酮酸脱羧酶基因功能损伤，从而使得 HMG-CoA 在细胞内累积至抑制细胞生长或对细胞有毒的水平。

可通过许多方法降低遗传修饰的宿主细胞中 HMGS 的活性水平,包括但不限于: 1)降低与 HMGS 编码区可操作地连接的启动子的启动子强度; 2)降低包含编码 HMGS 的核苷酸序列的质粒的拷贝数; 3)降低 HMGS mRNA 的稳定性(其中,“HMGS mRNA”指包含编码 HMGS 的核苷酸序列的 mRNA); 4)修饰 HMGS mRNA 核糖体结合位点的序列,从而降低 HMGS mRNA 的翻译水平; 5)改变 HMGS mRNA 的核糖体结合位点与 HMGS 编码序列起始密码子之间的距离和/或序列,从而降低 HMGS mRNA 的翻译水平; 6)改变 HMGS 编码序列起始密码子 5'端的整个顺反子间区域,从而降低 HMGS mRNA 的翻译水平; 7)改变 HMGS 的密码子选择,从而降低 HMGS mRNA 的翻译水平; 8)降低 HMGS 的酶稳定性; 9)降低 HMGS 的比活性(单位活性/单位蛋白质); 以及 10)当 HMGS 编码在操纵子上时,改变多顺反子 mRNA 上编码区的顺序。可进行两种或多种上述修饰,以降低遗传修饰宿主细胞中 HMGS 的活性水平。

在一些实施方式中,通过使用低拷贝数质粒, HMGS 活性水平相对于对照亲代细胞中的 HMGS 活性降低,其中,所述质粒包含编码 HMGS 的核苷酸序列。降低含有编码 HMGS 的核苷酸序列的载体的质粒拷贝数可通过选择已知为低拷贝数质粒的质粒骨架来实现。低拷贝数质粒通常具有少于约 20 质粒拷贝/细胞,例如从约 5 质粒拷贝/细胞到约 20 质粒拷贝/细胞。合适的低拷贝数质粒包括但不限于: pACYC184、pBR332、pBAD33、pBBR1MCS 和 pSC101。例如,细胞内存在的 pSC101 通常为 5 拷贝/细胞。在本发明的一个实施方式中,通过将两个基因设置在两种不同的表达载体上来调节 HMGS 和 HMGR 的水平,使得 HMGS 编码序列位于低拷贝载体上,而 HMGR 编码区位于高拷贝载体上。在本发明的另一个实施方式中,基因位于相同的载体上、但在不同启动子的控制下, HMGS 编码序列在两个启动子中较弱启动子的控制下。

通过增加 HMG-CoA 还原酶活性水平减少细胞内 HMG-CoA 累积的修饰

通过参考本说明书,本领域技术人员将理解, HMG-CoA 水平至少部分地依赖于细胞内 HMGR 的活性水平。上述 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制作用的降低和/或细胞内 HMG-CoA 水平的降低可通过调节细胞内 HMGR 活性水平来实现。因此,在一个实施方式中, HMG-CoA 的无毒性水平和/或缓解

HMG-CoA 累积诱导的毒性可通过调节细胞内 HMG-CoA 还原酶的活性水平来实现。在这些实施方式中，遗传修饰亲代宿主细胞以包含对宿主细胞异源的核酸，所述亲代宿主细胞包含、或遗传修饰以包含：含有编码一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的核苷酸序列的核酸，并通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或甲羟戊酸，其中，所述核酸包含编码 HMGR 的核苷酸序列，与未用包含编码 HMGR 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的对照亲代宿主细胞相比，在用包含编码 HMGR 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的宿主细胞中，HMG-CoA 累积诱导的生长抑制降低。

适用于本发明方法的遗传修饰的宿主细胞被一种或多种异源核酸、包括含有编码 HMGR 的核苷酸序列的核酸遗传修饰，从而升高细胞内 HMGR 的活性水平。与没有用一种或多种含有编码 HMGR 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的对照宿主细胞相比，细胞内 HMGR 的活性水平升高至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%或至少约 90%。

在一个示例性实施方式中，对照亲代细胞是用一种或多种含有编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的原核宿主细胞，其中，HMG-CoA 在细胞内可产生和累积至抑制生长或对细胞有毒的水平。在一个实施方式中，对照亲代细胞是天然情况下不含有甲羟戊酸途径的原核宿主细胞，遗传修饰所述细胞以产生甲羟戊酸；而遗传修饰的宿主细胞可进一步工程改造以改变 HMGR 活性，使得细胞内 HMG-CoA 的水平对细胞没有抑制作用或无毒。在一个示例性实施方式中，对照亲代细胞是遗传修饰以产生甲羟戊酸的大肠杆菌宿主细胞；而遗传修饰的宿主细胞是用除下述参考文献中所列构建物以外的构建物增强的对照亲代细胞遗传修饰版本的大肠杆菌：Kato-Emori 等，Mol Genet Genomics (2001)265:135-42，Learned RM 等，PNAS. (1989)86:2779-83，T. Dai 等，Mol Gen Genet (2000)262: 957 – 964，Allen 等，Appl Environ. Microbio. (1997). 63:3341-3344，Hedl 等，J Bacteriol, (2002), 184: 2116- 2122，Jackson 等，Org. Lett. (2003)5: 1629-1632，Randolph Y. Hampton 等，(1994)Cell,125:299-312，Markus Veen 等，FEMS Yeast Res (2003)4:87-95，Beach MJ 等，J Bacteriol (1989)171:2994-3001，Bischoff KM 等，Protein Sci

(1997)6:156-161, Friesen JA 等, Biochemistry. (1997)36:2173-7, Frimpong 等, J Biol Chem. (1994)269:11478-83, Panda 等, Appl Microbiol Biotechnol (2004)66: 143-152。

作为非限制性的例子, 对照亲代细胞是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞; 而遗传修饰的宿主细胞是用包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:8 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌。例如, 参见图 6 和 7 以及实施例 3 和 4。作为非限制性的例子, 对照亲代细胞是用包含 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌宿主细胞; 而遗传修饰的宿主细胞是用包含 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:9 所示核苷酸序列的表达构建物遗传修饰的大肠杆菌。例如, 参见图 10 和实施例 6。

在另一个实施方式中, 对照亲代细胞是真核细胞, 例如酵母细胞如酿酒酵母。在一些实施方式中, 对照亲代真核细胞在内源性丙酮酸脱羧酶基因中包含一个或多个突变, 使得丙酮酸脱羧酶基因功能损伤, 从而使得 HMG-CoA 在细胞内累积至抑制细胞生长或对细胞有毒的水平。

可以多种方式增加遗传修饰的宿主细胞中的 HMGR 活性水平, 这些方式包括但不限于: 1)增加与 HMGR 编码区可操作地连接的启动子的启动子强度; 2)增加包括编码 HMGR 的核苷酸序列的质粒的拷贝数; 3)增加 HMGR mRNA 的稳定性(其中, “HMGR mRNA”是包含编码 HMGR 的核苷酸序列的 mRNA); 4)修饰 HMGR mRNA 核糖体结合位点的序列, 以提高 HMGR mRNA 的翻译水平; 5)修饰 HMGR mRNA 的核糖体结合位点与 HMGR 编码序列起始密码子之间的序列, 以提高 HMGR mRNA 的翻译水平; 6)修饰 HMGR 编码区起始密码子 5'端的整个顺反子间区域, 以提高 HMGR mRNA 的翻译水平; 7)修饰 HMGR 的密码子应用以提高 HMGR mRNA 的翻译水平; 8)表达 HMGR 中使用的稀有密码子 tRNA 以提高 HMGR mRNA 的翻译水平; 9)增加 HMGR 的酶稳定性; 或 10)增加 HMGR 的比活性(单位活性/单位蛋白质)。可进行两种或多种上述修饰以提高 HMGR 的活性水平。

在 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列中, HMGR 编码区在 p_{BAD} 启动子的转录控制下。在一些实施方式中, 与 HMGR 编码区可操作地连接的启动子是比 p_{BAD}

启动子强效的启动子，例如，mRNA 的转录水平比采用 pBAD 启动子的 mRNA 的转录水平高至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍或更多。合适的启动子包括但不限于：共有（consensus）lac 启动子、trp 启动子、tac 启动子、trc 启动子、 λ 启动子和 T7 启动子。

增加质粒拷贝数可通过选择已知为中等或高拷贝数质粒的质粒骨架来实现。低拷贝数质粒通常提供少于约 20 个质粒拷贝/细胞。中等拷贝数质粒通常提供约 20-50 个质粒拷贝/细胞，或约 20-80 个质粒拷贝/细胞。高拷贝数质粒通常提供约 80-200 个质粒拷贝/细胞或更多。在许多实施方式中，包含编码 HMGR 的核苷酸序列的核酸是包含含有编码 HMGR 的核苷酸序列的核酸的高拷贝数质粒载体。合适的高拷贝数质粒包括但不限于：pUC 载体(例如，pUC8、pUC18、pUC19 等)、pBluescript 载体、pGEM 载体和 pTZ 载体。

通过参考本说明书，本领域技术人员将理解，通过调节细胞中 HMGS 和 HMGR 的相对活性水平可调节细胞内 HMG-CoA 的水平。因此，在本发明的一个实施方式中，同时调节细胞内 HMG-CoA 合酶和 HMG-CoA 还原酶的活性来实现所需的 HMG-CoA 无毒水平。在一个实施方式中，亲代宿主细胞是用含有 HMGS 和 HMGR 编码序列的载体遗传修饰的天然来源的酵母或大肠杆菌宿主细胞。细胞中产生编码的 HMGS 和 HMGR 酶，不会达到 HMG-CoA 的毒性水平并实现通过该途径的最佳流动，提供高产率的所需产物(类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物)。在一个实施方式中，通过不同的启动子控制 HMGS 和 HMGR 编码区。在另一个实施方式中，HMGS 和 HMGR 编码序列在不同的载体上，HMGS 编码序列任选地位于较低拷贝数的载体上。在一个实施方式中，HMGS 和 HMGR 编码区在相同的操纵子上，但 HMGR 编码区位于 HMGS 编码序列的上游，这种排列不同于天然来源的含有 HMGS 和 HMGR 编码序列的操纵子。

通过平衡甲羟戊酸途径中的流动降低 HMG-CoA 累积的修饰

在一些实施方式中，通过平衡所述途径中的代谢物流动来降低 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制或毒性。可以多种方式平衡代谢物流动，这些方式包括但

不限于：1)HMGS 上游酶(即 AtoB、AtoC、AtoA、AtoD)的突变，限制该酶所能获得的底物(乙酰乙酰辅酶 A)；2)HMGS 上游酶(例如，A-C、A-A、A-D、以及涉及脂肪酸生物合成的酶)表达的改变，限制该酶所能获得底物(乙酰乙酰辅酶 A)；3)HMGR 下游酶(即 MK、PMK、MVD)表达的改变，耗竭甲羟戊酸的供应，因而促进 HMG-CoA 转化为甲羟戊酸；4)改变 HMGR 下游酶(即 MK、PMK、MVD)催化特征的突变，耗竭甲羟戊酸的供应，因而促进 HMG-CoA 转化为甲羟戊酸；5)HMGR 与上游酶(即乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS)的蛋白质融合，以配合 HMG-CoA 产生酶表达为 HMGR；6)HMGS 与下游酶(即 MK)的蛋白质融合，以配合 HMG-CoA 产生酶表达为负责使代谢物移动远离 HMG-CoA 的酶。

增加类异戊二烯或类异戊二烯前体的产生

上述方法缓解了细胞中 HMG-CoA 累积诱导的毒性和/或生长抑制；并可增加细胞内类异戊二烯化合物和/或类异戊二烯前体化合物的产生。因此，本发明提供了增加细胞中类异戊二烯化合物或类异戊二烯前体化合物的方法，该方法通常包括调节细胞中 HMG-CoA 的水平以使 HMG-CoA 的水平保持低于毒性或生长抑制水平，然而该水平足够高以增加类异戊二烯化合物或类异戊二烯前体化合物的产生。

本发明提供了增加细胞或细胞培养物产生的类异戊二烯化合物、或类异戊二烯化合物前体(例如，甲羟戊酸、IPP、多异戊烯二磷酸酯等)的方法。该方法通常包括在显示 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的细胞中提高 HMGR 的活性水平和/或降低 HMGS 的活性水平。在一些实施方式中，显示 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的细胞是不能通过甲羟戊酸途径正常合成 IPP 或甲羟戊酸、并且用一种或多种包含编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的核酸的遗传修饰的亲代宿主细胞，所述酶产生的水平可导致细胞中毒性或生长抑制水平 HMG-CoA 的累积。在一些实施方式，显示 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的细胞是不能通过甲羟戊酸途径正常合成 IPP 或甲羟戊酸、但遗传修饰以使细胞内 HMG-CoA 累积在生长抑制或毒性水平的亲代宿主细胞。在一个实施方式中，化合物是类异戊二烯前体化合物 IPP。在一个实施方式中，宿主细胞是大肠杆菌细胞。在另一个实施方式中，宿主细胞是酵母细胞。

在一些实施方式中，在细胞中降低 HMGS 活性水平和/或提高 HMGR 活性水平可增加遗传修饰的宿主细胞、或遗传修饰宿主细胞的培养物产生的甲羟戊酸。因此，在一些实施方式中，与亲代宿主细胞相比，在细胞中降低 HMGS 活性水平和/或增加 HMGR 活性水平可增加遗传修饰的宿主细胞产生的甲羟戊酸至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 75 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 300 倍、至少约 400 倍、或至少约 500 倍或更多。使用众所周知的方法，例如气相色谱-质谱、液相色谱-质谱、离子色谱-质谱、薄层色谱、脉冲安培检测、uv-vis 光谱测定等，可容易地测定甲羟戊酸的产生。

在一些实施方式中，降低细胞中 HMGS 活性水平和/或提高 HMGR 活性水平可增加遗传修饰的宿主细胞、或遗传修饰的宿主细胞培养物所产生的 IPP。因此，在一些实施方式中，与亲代宿主细胞相比，降低细胞中 HMGS 活性水平和/或提高 HMGR 活性水平可增加遗传修饰的宿主细胞产生的 IPP 至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 75 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 300 倍、至少约 400 倍、或至少约 500 倍或更多。使用众所周知的方法，例如液相色谱-质谱、薄层色谱、离子色谱-质谱、脉冲安培检测、uv-vis 光谱测定等，可容易地测定 IPP 的产生。

在一些实施方式中，降低细胞中 HMGS 活性水平和/或提高 HMGR 活性水平可增加遗传修饰的宿主细胞产生的类异戊二烯。因此，在一些实施方式中，与亲代宿主细胞相比，降低细胞中 HMGS 活性水平和/或提高 HMGR 活性水平可增加遗传修饰的宿主细胞产生的甲羟戊酸至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、

至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 75 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 300 倍、至少约 400 倍、或至少约 500 倍或更多。使用众所周知的方法，例如气相色谱-质谱、液相色谱-质谱、离子色谱-质谱、脉冲安培检测、uv-vis 光谱测定等，可容易地测定类异戊二烯的产生。

在一些实施方式中，本发明方法可提高每个细胞产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体，例如，以每个细胞计，采用本发明方法产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物的量比对照亲代细胞产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物的量高至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 75 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 300 倍、至少约 400 倍、或至少约 500 倍或更多。通过测量细胞干重或测量细胞培养物的光密度测定细胞的量。

在其它实施方式中，本发明方法可提高每单位体积细胞培养物产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体，例如，以每单位体积细胞培养物计算，采用本发明方法产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物的量比对照亲代细胞产生的类异戊二烯或类异戊二烯前体化合物的量高至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 75 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 300 倍、至少约 400 倍、或至少约 500 倍或更多。

在一些实施方式中，提高类异戊二烯化合物或类异戊二烯前体化合物产生的本发明方法包括调节培养宿主细胞的培养基组成，以增加甲羟戊酸途径中间体(例如，乙酰辅酶 A)的水平。在一些实施方式中，培养基包含醋酸酯，它可增加乙酰辅酶 A 的水平，从而增加细胞中 HMG-CoA 的水平。

可采用本发明方法产生的类异戊二烯包括但不限于：单萜，包括但不限于

柠檬烯、citranellol、香叶醇、薄荷脑、紫苏醇(perillyl alcohol)、芳樟醇、侧柏酮；倍半萜，包括但不限于蜚蠊酮 B、银杏内酯 B(gingkolide B)、紫穗槐二烯、青蒿素、青蒿酸(artemisinic acid)、瓦伦烯、努特卡酮、表-柏木脑、表-马兜铃烯(epi-aristolochene)、法呢醇、棉酚、sanonin、蜚蠊酮和福斯高林；二萜，包括但不限于 casbene、eleutherobin、紫杉醇、蔓生素(prostratin)和伪蕨素；三萜，包括但不限于 arbruside E、鸦胆丁(bruceantin)、甾酮、孕酮、可的松、洋地黄毒苷。类异戊二烯还包括但不限于：类胡萝卜素，如番茄红素、 α -和 β -胡萝卜素、 α -和 β -玉米黄质、胭脂树橙、玉米黄素、虾青素和黄体素。类异戊二烯还包括但不限于：三萜、甾体化合物、以及由被其它化学基团修饰的类异戊二烯组成的化合物如混合的萜-生物碱和辅酶 Q-10。

遗传修饰的宿主细胞

本发明提供了遗传修饰的宿主细胞；以及包含遗传修饰的宿主细胞的组合物。遗传修饰的宿主细胞可用于产生类异戊二烯化合物或类异戊二烯前体化合物，如上所述。

如上所述，本发明产生类异戊二烯或类异戊二烯前体的方法通常包括在合适的培养基中培养遗传修饰的宿主细胞。遗传修饰的宿主细胞指用一种或多种包含编码一种或多种酶的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的宿主细胞，当在细胞中产生时，所述酶可缓解细胞中 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制(毒性)。亲代细胞(例如，没有遗传修饰一种或多种包含编码一种或多种酶的核苷酸序列的异源核酸，当在细胞中产生时，这些酶可缓解细胞中 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制和/或毒性)指产生、或遗传修饰以通过甲羟戊酸途径产生 IPP 的细胞。

因此，例如，“亲代”(或“亲本”)宿主细胞指遗传修饰以包含一种或多种对宿主细胞异源的核酸，其中，所述一种或多种核酸包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列。亲代宿主细胞通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸。亲代细胞包含、或遗传修饰以包含：含有编码一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的核苷酸序列的核酸(并通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸)。遗传修饰亲代细胞以包含一种或多种对宿主细胞异源的核酸，其中，所述一种或多种核酸包含编码 HMGR 和/或

HMGS 的核苷酸序列，这种细胞称为“遗传修饰的宿主细胞”。与未用一种或多种包含编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的亲代宿主细胞相比，遗传修饰的亲代宿主细胞中 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制降低。而且，遗传修饰的宿主细胞显示甲羟戊酸或类异戊二烯产物水平的提高，这种提高是每个细胞产生的甲羟戊酸的增加和/或细胞活力的增加的组合导致的。应理解，可反复应用本发明以逐步增加类异戊二烯化合物的产生，从而在一种情况下，特定的细胞株可以是遗传修饰的宿主细胞，而然后在下一种情况中，它可以是用作进一步改进的起始点的亲代宿主细胞。或者，本发明描述了 HMG-CoA 累积的毒性，允许从头构建避免与高水平类异戊二烯产生相关的 HMG-CoA 毒性的遗传系统及相关宿主细胞。因此，如果遗传修饰的宿主细胞可进一步遗传修饰以产生由于 HMG-CoA 累积导致细胞活力降低的细胞，所述进一步遗传修饰的细胞相对于最初遗传修饰的宿主细胞实际上是亲代宿主细胞。

在一些实施方式中，亲代细胞是不能通过甲羟戊酸途径正常产生 IPP 或甲羟戊酸的细胞；例如，亲代细胞指用一种或多种包含编码一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞。例如，亲代细胞是不能通过甲羟戊酸途径正常产生 IPP 或甲羟戊酸的原核细胞，该细胞遗传修饰有一种或多种包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列的核酸，其中，乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶和 HMGS 的活性水平可使细胞内 HMG-CoA 累积至抑制生长或产生毒性的水平。一个例子是用包含 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。亲代宿主细胞的第二个例子是用包含 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。

在其它实施方式中，亲代细胞是可通过甲羟戊酸途径正常合成 IPP 和/或甲羟戊酸的细胞，例如，亲代细胞是包含编码一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的内源性核酸的细胞。在这些实施方式中，遗传修饰亲代细胞，使得 HMG-CoA 在细胞内累积至对细胞产生毒性或生长抑制的水平。例如，在可通过甲羟戊酸途径正常产生 IPP 和/或甲羟戊酸的宿主细胞的丙酮酸脱羧酶基因中引入一个或多个突变，使得丙酮酸脱羧酶基因功能损伤，从而使得 HMG-CoA 在细胞内

累积至对细胞产生毒性的水平。在这种情况下，亲代细胞是可通过甲羟戊酸途径正常产生 IPP 和/或甲羟戊酸的宿主细胞，遗传修饰这种细胞以在内源性丙酮酸脱羧酶中引入一个或多个突变，使得丙酮酸脱羧酶基因功能损伤。

为产生本发明遗传修饰的宿主细胞，采用已确立的技术，包括但不限于：电穿孔、硫酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染等，将一种或多种包含编码可缓解 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的酶的核苷酸序列的核酸稳定地或暂时引入亲代宿主细胞。为实现稳定转化，核酸通常还包含可选择性标记，例如，任何已知的可选择性标记如新霉素抗性、氨苄西林抗性、四环素抗性、氯霉素抗性、卡那霉素抗性等。

甲羟戊酸途径酶

如上所述，亲代细胞是产生、或遗传修饰以通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸的宿主细胞，该细胞显示 HMG-CoA 累积诱导的毒性或生长抑制。甲羟戊酸途径包括：(a)两分子乙酰辅酶 A 缩合形成乙酰乙酰辅酶 A；(b)乙酰乙酰辅酶 A 与乙酰辅酶 A 缩合形成 HMG-CoA；(c)HMG-CoA 转化形成甲羟戊酸；(d)甲羟戊酸磷酸化形成甲羟戊酸 5-磷酸酯；(e)甲羟戊酸 5-磷酸酯转化形成甲羟戊酸 5-焦磷酸酯；和(f)甲羟戊酸 5-焦磷酸酯转化形成异戊烯焦磷酸酯。产生 IPP 所需的甲羟戊酸途径酶可不同，取决于培养条件。

在一些实施方式中，亲代宿主细胞是用一种或多种包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞，而且亲代宿主细胞是产生甲羟戊酸的细胞。亲代宿主细胞的非限制性例子是用包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列或编码与 SEQ ID NO:1 编码的酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。亲代宿主细胞的另一个非限制性例子是用包含 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列或编码与 SEQ ID NO:2 编码的酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。亲代宿主细胞的另一个非限制性例子是用包含 SEQ ID NO:7 所示核苷酸序列或编码与 SEQ ID NO:7 编码的酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的酵母细胞。亲代宿主细胞的另一个非限制性例子是用一种或多种包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ

ID NO:6 所示核苷酸序列或编码与 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:6 编码的酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。亲代宿主细胞的另一个非限制性例子是用一种或多种包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:7 所示核苷酸序列或编码与 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:7 编码的酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。亲代宿主细胞的另一个非限制性例子是用一种或多种包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:11 所示核苷酸序列或编码与 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:11 编码的酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。亲代宿主细胞的另一个非限制性例子是用包含 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 编码的甲羟戊酸途径基因的核苷酸序列、或编码与 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 编码的甲羟戊酸途径酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的酵母细胞。亲代宿主细胞的另一个非限制性例子是用包含 SEQ ID NO:11 编码的甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列或编码与 SEQ ID NO:11 编码的那些酶功能类似的酶的核苷酸序列的构建物遗传修饰的酵母细胞。

在其它实施方式中，亲代宿主细胞是用一种或多种包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS、HMGR、甲羟戊酸激酶(MK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)和甲羟戊酸焦磷酸酯脱羧酶(MPD)(以及任选地 IPP 异构酶)的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞。亲代宿主细胞的一个例子是用包含 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。亲代宿主细胞的另一个例子是用包含 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。

在一些实施方式中，亲代宿主细胞是用一种或多种包含编码甲羟戊酸激酶(MK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)和甲羟戊酸焦磷酸酯脱羧酶(MPD)(以及任选地异戊烯焦磷酸酯异构酶)的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞；并在包含甲羟戊酸的培养基中培养亲代宿主细胞。

在其它实施方式中，亲代宿主细胞是用一种或多种包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶(HMGS)、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGR)、MK、PMK 和 MPD (以及任选地 IPP 异构酶)的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞。

在其它实施方式中，亲代宿主细胞是用一种或多种包含编码 MK、PMK、

MPD、IPP 异构酶和异戊烯基转移酶的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞。在其它实施方式中,亲代宿主细胞是用一种或多种包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS、HMGR、MK、PMK、MPD、IPP 异构酶和异戊烯基转移酶的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞。亲代宿主细胞的一个例子是用包含 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。另一个例子是用包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示核苷酸序列的构建物遗传修饰的大肠杆菌细胞。

在其它实施方式中,亲代宿主细胞是具有天然(内源性)甲羟戊酸途径并经过遗传修饰而使 HMG-CoA 的水平相对于未经修饰的宿主细胞提高的细胞,导致 HMG-CoA 累积引起生长抑制。在一个示例性实施方式中,亲代细胞株是经遗传修饰以提高乙酰辅酶 A 产生的酿酒酵母,其中通过引入一种或多种遗传修饰以使磷酸转乙酰酶、乳酸脱氢酶和丙酮酸脱羧酶功能损伤(例如,通过敲除)。

在许多实施方式中,宿主细胞(包括亲代宿主细胞和遗传修饰的宿主细胞)是单细胞生物,或在培养基中以单细胞生长。在一些实施方式中,宿主细胞是真核细胞。合适的真核宿主细胞包括但不限于:酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞、真菌细胞和藻类细胞。合适的真核宿主细胞包括但不限于:巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、海藻毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、*Pichia koclamae*、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、仙人掌毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、*Pichia salictaria*、*Pichia guercuum*、*Pichia pijperi*、*Pichia stiptis*、甲醇型毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母属(*Saccharomyces sp.*)、多形汉森酵母(*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces sp.*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉素(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、*Chrysosporium lucknowense*、镰孢霉属(*Fusarium sp.*)、*Fusarium gramineum*、镰孢霉(*Fusarium venenatum*)、粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)等。在一些实施方式中,宿主细胞是除植物细胞以外的真核细胞。

在其它实施方式中,宿主细胞是原核细胞。合适的原核细胞包括但不限于

以下多种实验室株中的任一种：大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳酸菌属(*Lactobacillus sp.*)、沙门氏菌属(*Salmonella sp.*)、志贺氏菌属(*Shigella sp.*)等。例如，参见 Carrier 等，(1992)*J. Immunol.* 148:1176-1181；美国专利 6,447,784；和 Sizemore 等，(1995)*Science* 270:299-302。本发明中可使用的沙门氏菌株的例子包括但不限于：伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)和鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)。合适的志贺氏菌株包括但不限于：弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*)和 *Shigella dysenteriae*。典型地，所述实验室株是非致病性的。其它合适的细菌的非限制性例子包括但不限于：枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、普氏假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、*Pseudomonas mevalonii*、球形红色细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、荚膜红色细菌(*Rhodobacter capsulatus*)、深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、红球菌属(*Rhodococcus sp.*)等。在一些实施方式中，宿主细胞是大肠杆菌。

如上所述，在一些实施方式中，亲代宿主细胞是用一种或多种包含编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的异源核酸遗传修饰的细胞。为了遗传修饰亲代宿主细胞使其通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或通过甲羟戊酸途径产生甲羟戊酸，采用已确立的技术，包括但不限于：电穿孔、硫酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染等，将一种或多种包含编码一种或多种甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的核酸稳定地或暂时引入宿主细胞。为实现稳定转化，核酸通常还包含可选择性标记，例如，任何已知的可选择性标记如新霉素抗性、氨苄西林抗性、四环素抗性、氯霉素抗性、卡那霉素抗性等。

在许多实施方式中，用于遗传修饰宿主细胞使其可通过甲羟戊酸途径产生 IPP 和/或甲羟戊酸的宿主细胞是包含含有编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的核酸的表达载体。类似地，在许多实施方式中，用于遗传修饰亲代宿主细胞从而降低 HMG-CoA 累积诱导的毒性和/或细胞生长抑制的核酸是包含含有编码一种或多种可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性和/或细胞生长抑制的酶的核苷酸序列的核酸的表达载体。合适的表达载体包括但不限于：杆状病毒载体、噬菌体载体、质粒、噬菌粒、粘粒、fosmid、细菌人工染色体、病毒载体(例如，基于牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、腺伴随病毒、SV40、单纯疱疹病毒等的病毒载体)、基于 P1 的人工染色体、酵母质粒、酵母人工染色体以及对特定

感兴趣宿主(例如大肠杆菌和酵母)特异的任何其它载体。因此,例如,用于表达甲羟戊酸途径基因产物的多种表达载体的任一种中包含编码甲羟戊酸途径基因产物的核酸。这些载体包含染色体、非染色体以及合成的 DNA 序列。

许多合适的表达载体是本领域技术人员已知的,许多可商业获得。提供以下载体是示例性的;对于细菌宿主细胞:pQE 载体(Qiagen)、pBluescript 质粒、pNH 载体、 λ -ZAP 载体(Stratagene);pTrc99a、pKK223-3、pDR540 和 pRIT2T (Pharmacia);对于真核宿主细胞:pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVLSV40 (Pharmacia)。但是,也可使用任何其它质粒或其它载体,只要它们与宿主细胞相容。

为了产生包含一种或多种含有编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的异源核酸的亲代宿主细胞,将编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列插入表达载体中。表达载体中编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列可操作地连接于合适的表达控制序列(例如,启动子),以指导编码的基因产物的合成。类似地,为了从亲代宿主细胞产生遗传修饰的宿主细胞,使用包含编码例如 HMGS 和/或 HMGR 的核苷酸序列的表达载体。HMGS 和/或 HMGR 编码序列可操作地连接于合适的表达控制序列,以指导编码的基因产物的合成。根据所采用的宿主/载体系统,表达载体中可使用许多合适的转录和翻译控制元件,包括组成型启动子和诱导型启动子、转录增强元件、转录终止子等(例如,参见 Bitter 等,(1987)Methods in Enzymology,153:516-544)。

用于原核宿主细胞的合适的启动子包括但不限于:细菌噬菌体 T7 RNA 聚合物启动子;trp 启动子;lac 操纵子启动子;杂合启动子,例如 lac/tac 杂合启动子、tac/trc 杂合启动子、trp/lac 启动子、T7/lac 启动子;trc 启动子;tac 启动子等;araBAD 启动子;体内调节启动子,例如 ssaG 启动子或相关启动子(例如,参见美国专利公开 20040131637)、pagC 启动子(Pulkkinen 和 Miller, J Bacteriol,1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda 等, PNAS,1992; 89(21): 10079-83)、nirB 启动子(Harborne 等,(1992)Mol. Micro. 6:2805-2813)等(例如,参见 Dunstan 等,(1999)Infect. Immun. 67:5133-5141;McKelvie 等,(2004)Vaccine 22:3243-3255;和 Chatfield 等,(1992)Biotechnol. 10:888-892);sigma70 启动子,例如共有 sigma70 启动子(例如,参见 GenBank 登录号 AX798980、AX798961

和 AX798183); 稳定期启动子, 例如 *dps* 启动子、*spv* 启动子等; 来源于致病岛 SPI-2 的启动子(例如, 例如 WO96/17951); *actA* 启动子(例如, 参见 Shetron-Rama 等, (2002) *Infect. Immun.* 70:1087-1096); *rpsM* 启动子(例如, 参见 Valdivia 和 Falkow (1996). *Mol. Microbiol.* 22:367-378); *tet* 启动子(例如, 参见 Hillen, W. 和 Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. 和 Heinemann, U. (编), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, 第 10 卷, 第 143-162 页); SP6 启动子(例如, 参见 Melton 等, (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7035-7056); 等等。

合适的真核启动子的非限制性例子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、来自逆转录病毒的 LTR 和鼠金属球蛋白-I 的启动子。选择合适的载体和启动子在本领域普通技术人员的能力范围内。表达载体还可包含用于翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。表达载体还可包含用于扩增表达的适当序列。

此外, 在许多实施方式中, 表达载体包含一个或多个可选择的标记基因以提供用于选择转化的宿主细胞的表型特性, 例如真核细胞培养物的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性, 或者例如原核宿主细胞如大肠杆菌的四环素或氨苄西林抗性。

通常, 重组表达载体包括复制起点和允许宿主细胞转化的可选择性标记, 例如大肠杆菌的氨苄西林抗性基因、酿酒酵母 *TRP1* 基因等; 来源于高表达基因的启动子以指导编码序列的转录。这些启动子可来源于编码糖酵解酶如 3-磷酸甘油酸酯激酶(PGK)、 α -因子、酸性磷酸酶或热休克蛋白等的操纵子。

在许多实施方式中, 亲代宿主细胞包含可操作地连接于诱导型启动子的编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列。类似地, 在许多实施方式中, 遗传修饰的宿主细胞包括可操作地连接于诱导型启动子的编码 HMGR 和/或 HMGS 的核苷酸序列。诱导型启动子是本领域众所周知的。合适的诱导型启动子包括但不限于: 噬菌体 λ 的 *pL*; *Plac*; *P_{trp}*; *P_{tac}* (*P_{trp}*-*lac* 杂合启动子); 异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)-诱导型启动子, 例如 *lacZ* 启动子; 四环素诱导型启动子; 阿拉伯糖诱导型启动子, 例如 *pBAD* (例如, 参见 Guzman 等, (1995) *J. Bacteriol.* 177:4121-4130); 木糖-诱导型启动子, 例如 *P_{xyl}*(例如, 参见 Kim 等, (1996) *Gene*

181:71-76); GAL1 启动子; 色氨酸启动子; lac 启动子; 醇诱导型启动子, 例如甲醇诱导型启动子、乙醇诱导型启动子; 棉子糖诱导型启动子; 热诱导型启动子, 例如热诱导型 λ P_L 启动子、热敏感阻抑物控制的启动子(例如, CI857-阻抑性 λ -基表达载体; 例如, 参见 Hoffmann 等, (1999)FEMS Microbiol Lett. 177(2):327-34); 等等。

在许多实施方式中, 用包含编码甲羟戊酸途径基因产物的核苷酸序列的核酸修饰宿主细胞产生亲代宿主细胞, 其中, 所述编码甲羟戊酸途径基因产物的核苷酸序列可操作地连接于组成型启动子。类似地, 在一些实施方式中, HMGS 和/或 HMGR 编码序列可操作地连接组成型启动子。原核细胞中使用的合适的组成型启动子是本领域已知的, 包括但不限于 sigma70 启动子, 例如共有 sigma70 启动子。

在酵母中, 可使用许多含组成型或诱导型启动子的载体。参见《最新分子生物学方法》(Current Protocols in Molecular Biology), 第 2 卷, 1988, Ausubel 等编, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 第 13 章; Grant 等, 1987, 《酵母的表达与分泌载体》(Expression and Secretion Vectors for Yeast), Methods in Enzymology, Wu & Grossman 编, 31987, Acad. Press, N. Y., 第 153 卷, 第 516-544 卷; Glover, 1986, 《DNA 克隆》(DNA Cloning), 第 II 卷, IRL Press, Wash., D. C., 第 3 章; 和 Bitter, 1987, 《酵母的异源基因表达》(Heterologous Gene Expression in Yeast), Methods in Enzymology, Berger & Kimmel 编, Acad. Press, N. Y., 第 152 卷, 第 673-684 页; 和《酵母的分子生物学》(The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*), 1982, Strathern 等编, Cold Spring Harbor Press, 第 I 和 II 卷。可使用组成型酵母启动子如 ADH 或 LEU2 或诱导型启动子如 GAL(《酵母克隆》(Cloning in Yeast), 第 3 章, R. Rothstein In: DNA Cloning 第 11 卷, A Practical Approach, DM Glover 编, 1986, IRL Press, Wash., D.C.)。或者, 可使用促进外源 DNA 序列整合进入酵母染色体的载体。

当亲代宿主细胞经遗传修饰产生两种或多种甲羟戊酸途径酶时, 在一些实施方式中, 编码两种或多种酶的核苷酸序列可各自包含在独立的表达载体上。当宿主细胞经遗传修饰表达一种或多种甲羟戊酸途径酶时, 在一些实施方式中, 编码一种或多种甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列在单个表达载体上。当编码

一种或多种甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列包含在单个表达载体上时，在一些实施方式中，核苷酸序列将可操作地连接于共同控制元件(例如，启动子)，例如，共同控制元件控制单个表达载体上所有编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的表达。

当编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列包含在单个表达载体上时，在一些实施方式中，所述核苷酸序列将可操作地连接于不同的控制元件(例如，启动子)，例如不同的控制元件分别控制在单个表达载体上的各个编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的表达。

当用一种或多种包含编码可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的酶的核苷酸序列的核酸遗传修饰亲代宿主细胞时，在一些实施方式中，所述酶将编码在两个不同(独立)的表达构建物中。例如，在一些实施方式中，在相同启动子的控制下，HMGR 由高拷贝质粒表达，而 HMGS 由低拷贝质粒表达。在其它实施方式中，HMGR 和 HMGS 由类似拷贝数的质粒表达，表达 HMGR 的启动子强于 HMGS。当用一种或多种包含编码可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的酶的核苷酸序列的核酸遗传修饰亲代宿主细胞时，在一些实施方式中，所述酶编码在单个表达构建物上。例如，在一些实施方式中，HMGR 和 HMGS 将在单个启动子的控制下由单个质粒表达，但 HMGR 的工程化转录物稳定性高于 HMGS。

当编码可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的酶的核苷酸序列包含在单个表达构建物中时，在一些实施方式中，所述核苷酸序列可操作地连接于不同的控制元件(例如，启动子)，例如，不同的控制元件分别控制在单个表达构建物上的各个可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的酶的表达。例如，在一些实施方式中，HMGR 和 HMGS 由单个质粒表达，表达 HMGR 的启动子强于 HMGS。

编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列

编码 MEV 途径基因产物的核苷酸序列是本领域已知的，可采用任何已知的编码 MEV 途径基因产物的核苷酸序列来产生本发明遗传修饰的宿主细胞。例如，编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS、HMGR、MK、PMK、MPD 和 IDI 的核苷酸序列是本领域已知的。下面是已知的编码 MEV 途径基因产物的核

苷酸序列的非限制性例子，各个 MEV 途径酶之后的括号里是 GenBank 登录号和生物体：乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶：(NC_000913 REGION: 232413 L..2325315；大肠杆菌)、(D49362；脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*))和(L20428；酿酒酵母)；HMGS：(NC_001145. 互补 19061..20536；酿酒酵母)、(X96617；酿酒酵母)、(X83882；拟南芥(*Arabidopsis thaliana*))、(AB037907；*Kitasatospora griseola*)和(BT007302；智人(*Homo sapiens*))；HMGR：(NM_206548；黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*))、(NM_204485；红原鸡(*Gallus gallus*))、(AB015627；链霉菌属 KO-3988)、(AF542543；野生烟草(*Nicotiana attenuate*))、(AB037907；*Kitasatospora griseola*)、(AX128213，提供编码截短 HMGR 的序列；酿酒酵母)和(NC_001145：互补(115734..118898；酿酒酵母))；MK：(L77688；拟南芥)和(X55875；酿酒酵母)；PMK：(AF429385；橡胶树(*Hevea brasiliensis*))、(NM_006556；智人)、(NC_001145.互补 712315..713670；酿酒酵母)；MPD：(X97557；酿酒酵母)、(AF290095；屎肠球菌(*Enterococcus faecium*))和(U49260；智人)；以及 IDI：(NC_000913, 3031087..3031635；大肠杆菌)和(AF082326；雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*))。

在一些实施方式中，HMGR 编码区如 SEQ ID NO: 13 所示，编码缺少野生型 HMGR 跨膜区的截短形式的 HMGR (“tHMGR”)。HMGR 的跨膜区包含酶的调节部分，并且没有催化活性。

可以本领域已知的各种方式改变任何已知 MEV 途径酶的编码序列，以在所编码的酶的氨基酸序列中产生定向改变。变体 MEV 途径酶的氨基酸通常基本类似于任何已知 MEV 途径酶的氨基酸序列，即至少一个氨基酸不同、至少 2 个、至少 5 个、至少 10 个或至少 20 个氨基酸不同，但通常不多于约 50 个氨基酸。序列改变可以是取代、插入或删除。例如，如下所述，可改变核苷酸序列，产生特定宿主细胞的密码子偏倚。此外，可引入一个或多个核苷酸序列差异，在经编码的蛋白质中形成保守氨基酸改变。在一个实施方式中，通过表达改变的 HMGS 或 HMGR 蛋白质或两者可实现 HMGS 和 HMGR 的所需相对水平以及 HMG-CoA 的非毒性水平。

异戊烯基转移酶

在一些实施方式中，遗传修饰本发明遗传修饰的宿主细胞以包含：一种或多种含有编码一种或多种甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的核酸，如上所述；以及含有编码异戊烯基转移酶的核苷酸序列的核酸。

异戊烯基转移酶是一大类催化 IPP 连续缩合形成各种链长度异戊烯二磷酸酯的酶。合适的异戊烯基转移酶包括：催化 IPP 与烯丙型引物底物缩合形成类异戊二烯化合物的酶，所述类异戊二烯化合物具有约 2-6000 个异戊二烯单元或更多，例如 2 个异戊二烯单元(牻牛儿基焦磷酸酯合酶)、3 个异戊二烯单元(法呢基焦磷酸酯合酶)、4 个异戊二烯单元(牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸酯合酶)、5 个异戊二烯单元、6 个异戊二烯单元(十六烷基焦磷酸酯合酶)、7 个异戊二烯单元、8 个异戊二烯单元(八氢番茄红素合酶、八异戊烯焦磷酸酯合酶)、9 个异戊二烯单元(九异戊烯焦磷酸酯合酶)、10 个异戊二烯单元(十异戊烯焦磷酸酯合酶)、约 10-15 个异戊二烯单元、约 15-20 个异戊二烯单元、约 20-25 个异戊二烯单元、约 25-30 个异戊二烯单元、约 30-40 个异戊二烯单元、约 40-50 个异戊二烯单元、约 50-100 个异戊二烯单元、约 100-250 个异戊二烯单元、约 250-500 个异戊二烯单元、约 500-1000 个异戊二烯单元、约 1000-2000 个异戊二烯单元、约 2000-3000 个异戊二烯单元、约 3000-4000 个异戊二烯单元、约 4000-5000 个异戊二烯单元、或约 5000-6000 个异戊二烯单元或更多。

合适的异戊烯基转移酶包括但不限于：E-异戊二烯二磷酸酯合酶，包括但不限于牻牛儿基二磷酸酯(GPP)合酶、法呢基二磷酸酯(FPP)合酶、牻牛儿基牻牛儿基二磷酸酯(GGPP)合酶、六异戊烯基二磷酸酯(HexPP)合酶、七异戊烯基二磷酸酯(HepPP)合酶、八异戊烯基(OPP)二磷酸酯合酶、茄呢酰二磷酸酯(SPP)合酶、十异戊烯基二磷酸酯(DPP)合酶、糖胶合酶和杜仲胶合酶；以及 Z-异戊二烯基二磷酸酯合酶，包括但不限于九异戊烯基二磷酸酯(NPP)合酶、十一异戊烯基二磷酸酯(UPP)合酶、去氢多萜基二磷酸酯合酶、二十异戊烯基二磷酸酯合酶、天然橡胶合酶和其它 Z-异戊二烯基二磷酸酯合酶。

来自多个物种的许多异戊烯基转移酶的核苷酸序列是已知的，可用于或修饰后用于产生本发明遗传修饰的宿主细胞。编码异戊烯基转移酶的核苷酸序列是本领域已知的。参见，例如，人法呢基焦磷酸酯合酶 mRNA(GenBank 登录号 J05262；智人)；法呢基二磷酸酯合酶(FPP)基因(GenBank 登录号 J05091；

酿酒酵母); 异戊烯基二磷酸酯: 二甲基烯丙基二磷酸酯异构酶基因(J05090; 酿酒酵母); Wang 和 Ohnuma (2000)Biochim. Biophys. Acta 1529:33-48; 美国专利 6,645,747; 拟南芥法呢基焦磷酸酯合酶 2 (FPS2)/ FPP 合酶 2 / 法呢基二磷酸酯合酶 2 (At4gl7190)mRNA(GenBank 登录号 NM_202836); 银杏(*Ginkgo biloba*)牻牛儿基牻牛儿基二磷酸酯合酶(ggpps)mRNA(GenBank 登录号 AY371321); 拟南芥牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸酯合酶(GGPS1)/ GGPP 合酶/法呢基转移酶(farnesyltransferase)(At4g36810)mRNA(GenBank 登录号 NM_119845); 法呢基、牻牛儿基牻牛儿基、牻牛儿基法呢基、六异戊烯基、七异戊烯基二磷酸酯合酶的 *Synechococcus elongatus* 基因 (SelF-HepPS)(GenBank 登录号 AB016095); 等等。

密码子选择

在一些实施方式中, 修饰编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列, 使这些核苷酸序列反映特定宿主细胞的密码子偏好。例如, 在一些实施方式中, 可修饰核苷酸序列产生酵母密码子偏好。例如, 参见 Bennetzen 和 Hall (1982)J. Biol. Chem. 257(6): 3026-3031。作为另一个非限制性的例子, 在其它实施方式中, 修饰核苷酸序列产生大肠杆菌密码子偏好。例如, 参见 Gouy 和 Gautier (1982)Nucleic Acids Res. 10(22):7055-7074; Eyre-Walker (1996)Mol. Biol. Evol. 13(6):864-872。也可参见 Nakamura 等, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):292。

如上所述, 在一些实施方式中, 修饰 HMGS 编码序列的密码子选择以降低 HMGS mRNA 的翻译水平。通过修饰序列以包含稀有或宿主细胞不常见的密码子, 可实现通过修饰密码子选择而降低 HMGS mRNA 的翻译水平。可获得许多生物体的密码子表, 这些密码子表总结了特定生物体利用特定密码子编码氨基酸的时间百分数。某些密码子比其它“稀有”密码子更常用。序列中使用“稀有”密码子通常能降低其翻译速率。因此, 例如, 通过引入一个或多个稀有密码子修饰编码序列可影响翻译速率, 但不会影响已翻译酶的氨基酸序列。例如, 编码精氨酸的有 6 个密码子: CGT、CGC、CGA、CGG、AGA 和 AGG。在大肠杆菌中, 密码子 CGT 和 CGC(各自在大肠杆菌中编码大约 40%的精氨酸)比密码子 AGG(在大肠杆菌中编码大约 2%的精氨酸)要常用得多。将基因序列中

的 CGT 密码子变为 AGG 密码子不会改变酶的序列，但可能会降低基因翻译速率。

其它遗传修饰

在一些实施方式中，本发明遗传修饰的宿主细胞指经过以下修饰的宿主细胞：遗传修饰以包含一种或多种含有编码可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的酶的核苷酸序列的核酸；以及进一步遗传修饰以提高萜生物合成途径中间体产生，和/或进一步遗传修饰以提高类异戊二烯或类异戊二烯前体产生，和/或进一步遗传修饰以使内源性萜生物合成途径基因功能损伤。如本文所用，术语“功能损伤”指遗传修饰核酸，导致该核酸编码的基因产物的产量低于正常水平，和/或没有功能。与亲代菌株相比，这些遗传修饰可减少菌株单位 IPP 或甲羟戊酸产率(每个细胞的产量)，但 HMG-CoA 诱导的毒性的缓解将使细胞密度增加，从而培养物总产率(单位产率乘以培养物的细胞密度)将增加。

提高内源性萜生物合成途径中间体产量的遗传修饰包括但不限于：导致宿主细胞中磷酸转乙酰酶水平和/或活性降低的遗传修饰。通过增加乙酰辅酶 A 的细胞内浓度而增加类异戊二烯生物合成途径中间体的细胞内浓度。大肠杆菌将大量的醋酸酯形式的细胞内乙酰辅酶 A 分泌入培养基中。编码磷酸转乙酰酶(*pta*，负责乙酰辅酶 A 转化形成醋酸酯的第一个酶)的基因的缺失将减少醋酸酯分泌。降低原核宿主细胞中磷酸转乙酰酶的水平 and/或活性的遗传修饰是特别有用的，其中，亲代宿主细胞是用包含编码一种或多种 MEV 途径基因产物的核苷酸序列的核酸遗传修饰的宿主细胞。

因为乙酰辅酶 A 同时是 HMG-CoA 合成过程中乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶和 HMGS 的反应物，在一些宿主细胞中，细胞内乙酰辅酶 A 量的增加将导致细胞内 HMG-CoA 量的增加，HMG-CoA 量的增加又将导致毒性作用。因此，降低磷酸转乙酰酶总活性的遗传修饰由于 HMG-CoA 的累积，将导致生长速率或最终细胞密度降低，产生可用本发明方法修饰的亲代菌株。或者，增加磷酸转乙酰酶总活性的遗传修饰可用于克服 HMG-CoA 累积导致的毒性作用。

在一些实施方式中，导致原核宿主细胞中磷酸转乙酰酶水平降低的遗传修饰是使原核宿主细胞编码磷酸转乙酰酶的内源性 *pta* 基因功能损伤的遗传突

变。可以多种方式使 *pta* 基因功能损伤，包括：插入可动遗传因子(例如，转座子等)；删除所有或部分基因，导致不形成基因产物、或产物被截短且在将乙酰辅酶 A 转化为醋酸酯的过程中没有功能；基因突变，导致不形成基因产物、产物被截短且在将乙酰辅酶 A 转化为醋酸酯的过程中没有功能；删除或突变一个或多个控制 *pta* 基因表达的控制元件，导致不产生基因产物；等等。

在一些实施方式中，删除了遗传修饰宿主细胞的内源性 *pta* 基因。可使用任何删除基因的方法。*pta* 基因删除方法的一个非限制性例子是使用 λ Red 重组系统。Datsenko 和 Wanner (2000)Proc Natl Acad Sci USA 97(12): 第 6640-5 页。在一些实施方式中，*pta* 基因在用包含编码 MK、PMK、MPD 和 IDI 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的宿主细胞(例如，大肠杆菌)中缺失。在一些实施方式中，*pta* 基因在用包含编码 MK、PMK、MPD 和 IPP 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的宿主细胞(例如，大肠杆菌)中缺失。在一些实施方式中，*pta* 基因在用包含编码 MK、PMK、MPD、IPP 和异戊烯基转移酶的核苷酸序列的核酸遗传修饰的宿主细胞(例如，大肠杆菌)中缺失。

增加乙酰辅酶 A 细胞内水平的其它修饰包括但不限于：降低细胞内乳酸脱氢酶总活性的修饰，降低细胞内乙酸激酶总活性的修饰，降低细胞内醇脱氢酶总活性的修饰，阻断三羧酸循环的修饰，例如那些降低 2-酮戊二酸脱氢酶总活性的修饰，或阻断氧化磷酸化作用的修饰，例如那些降低(F1F0)H⁺-ATP 合酶总活性的修饰，或它们的组合。

降低乙酰辅酶 A 细胞内水平的其它修饰包括但不限于：增加细胞内乳酸脱氢酶总活性的修饰，增加细胞内乙酸激酶总活性的修饰，和增加细胞内醇脱氢酶总活性的修饰，或它们的组合。

在一些实施方式中，亲代宿主细胞是如上所述遗传修饰以增加 HMG-CoA 水平的宿主细胞；进一步遗传修饰导致内源性 DXP 生物合成途径基因功能损伤。这种遗传修饰的宿主细胞可用于筛选使 HMG-CoA 转化为甲羟戊酸的酶，如下详细所述，因为细胞依赖甲羟戊酸途径产生所需的类异戊二烯可加剧 HMG-CoA 的毒性。

在其它实施方式中，本发明遗传修饰的宿主细胞指经过以下修饰的宿主细胞：遗传修饰以包含一种或多种含有编码 DXP 生物合成途径基因产物的核苷

酸序列的核酸；以及进一步遗传修饰导致内源性 MEV 生物合成途径基因功能损伤。若出于技术原因，能够在天然利用甲羟戊酸途径产生类异戊二烯的生物体中非常轻易地筛选出与 HMG-CoA 毒性有关的酶时，这种宿主细胞是有用的。

在一些实施方式中，当本发明遗传修饰的宿主细胞是用包含编码一种或多种 MEV 途径基因产物的核苷酸序列的核酸遗传修饰的原核宿主细胞时，可进一步遗传修饰宿主细胞，以使一种或多种内源性 DXP 途径基因功能损伤。可发生功能损伤的 DXP 途径基因包括一种或多种编码任何以下 DXP 基因产物的基因：1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸酯合酶、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸酯还原酮异构酶(reductoisomerase)、4-二磷酸胞苷基(diphosphocytidyl)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶、4-二磷酸胞苷基-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶、2C-甲基-D-赤藓糖醇 2,4-环二磷酸酯合酶和 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基 4-二磷酸酯合酶。

可以多种方式使内源性 DXP 途径基因功能损伤，包括插入可动遗传因子(例如，转座子等)；删除所有或部分基因，导致不形成基因产物、或产物被截短且没有酶活性；基因突变，导致不形成基因产物、产物被截短且没有酶功能；删除或突变一个或多个控制基因表达的控制元件，导致不产生基因产物；等等。

包含本发明遗传修饰宿主细胞的组合物

本发明还提供包含本发明遗传修饰宿主细胞的组合物。本发明组合物包含本发明遗传修饰的宿主细胞；并且在一些实施方式中还包含一种或多种其它成分，这些成分的选择部分地基于遗传修饰宿主细胞的特定用途。合适的成分包括但不限于：盐；缓冲剂；稳定剂；蛋白酶抑制剂；细胞膜和/或细胞壁保存化合物，例如甘油、二甲亚砜等；适合细胞的营养介质；等等。

核酸

本发明提供包含编码 HMGS 和/或 HMGR 的核苷酸序列的核酸，其中，当所述核酸被引入包含或遗传修饰以包含(核酸)的亲代宿主细胞时，可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性或生长抑制。因此，当本发明核酸被引入显示 HMG-CoA 累积诱导的毒性的宿主细胞中时，可缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性或生长抑制。在一些实施方式中，本发明核酸包含可操作地连接于强启动子

的编码 HMGR 的核苷酸序列。

在一些实施方式中，本发明核酸是包含编码 HMGR 的核苷酸序列的表达构建物。在一些实施方式中，表达构建物是用于在原核细胞中合成经编码的 HMGR 的构建物。在一些实施方式中，表达构建物是用于在真核细胞中合成经编码的 HMGR 的构建物。在一些实施方式中，本发明核酸包含编码 HMGR 的核苷酸序列，其中，所述核酸是中等拷贝数的质粒。在一些实施方式中，本发明核酸包含编码 HMGR 的核苷酸序列，其中，所述核酸是高拷贝数的质粒。在一些实施方式中，本发明核酸包含可操作地连接于强启动子的编码 HMGR 的核苷酸序列，其中，所述核酸是高拷贝数的质粒。在一些实施方式中，本发明核酸包含可操作地连接于强启动子的编码 HMGR 的核苷酸序列，其中，所述核酸是中等拷贝数的质粒。在一些实施方式中，本发明核酸包含在中等拷贝数质粒上可操作地连接于弱启动子的编码 HMGR 的核苷酸序列。

在一些实施方式中，本发明核酸包含编码融合蛋白的核苷酸序列，所述融合蛋白包含可操作地连接于 HMGR 的乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶。在一些实施方式中，通过将乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶与 HMGR 的编码序列相连产生编码乙酰乙酰辅酶 A/HMGR 融合蛋白的核酸。在一些实施方式中，融合蛋白是天然存在的。在另一些实施方式中，融合蛋白是天然存在的，除了 Hedl 等，((2002)J.Bacteriol. 184:2116-2122)所述融合蛋白以外。在一些实施方式中，本发明核酸包含编码含有乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶和 HMGS 的融合蛋白的核苷酸序列。在一些实施方式中，本发明核酸包含编码含有乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的融合蛋白的核苷酸序列。在一些实施方式中，本发明核酸包含编码含有 HMGS 和 HMGR 的融合蛋白的核苷酸序列。

在一些实施方式中，本发明核酸是包含编码 HMGR 的核苷酸序列的表达构建物，其中，所述表达构建物是除了以下参考文献所述表达构建物以外的构建物：Kato-Emori 等，Mol Genet Genomics (2001)265:135-42，Learned RM 等，PNAS. (1989)86:2779-83，T. Dairi 等，Mol Gen Genet (2000)262: 957-964，Allen 等，Appl Environ. Microbio. (1997). 63:3341-3344，Hedl 等，J Bacteriol,(2002),184:2116-2122，Jackson 等，Org. Lett. (2003)5:1629-1632，Randolph Y. Hampton 等，(1994)Cell,125:299-312，Markus Veen 等，FEMS Yeast

Res (2003)4:87-95, Beach MJ 等, J Bacteriol (1989)171:2994-3001, Bischoff KM 等, Protein Sci (1997)6:156-161, Friesen JA 等, Biochemistry. (1997)36:2173-7, Frimpong 等, J Biol Chem. (1994)269:11478-83, Panda 等, Appl Microbiol Biotechnol (2004)66: 143-152。

筛选方法

本发明提供了鉴定具有 HMG-CoA 解毒活性的基因产物的筛选方法；以及鉴定抑制 HMG-CoA 累积的试剂的方法。在一些实施方式中，鉴定的基因产物是编码 HMGR，如变体 HMGR 的基因产物。在一个实施方式中，鉴定的基因产物是编码变体 HMGR 的基因产物，其中，变体 HMGR 可增加细胞中总的 HMGR 活性。在另一个实施方式中，鉴定的基因产物产生降低 HMGS 活性的产物。在另一个实施方式中，鉴定的基因产物产生了利用甲羟戊酸作为底物的产物。在另一个实施方式中，鉴定的基因产物产生了编码 MK 的产物。在另一个实施例中，鉴定的基因产物可从细胞转运甲羟戊酸。在另一个实施方式中，鉴定的基因产物是 HMG-CoA 裂解酶或编码 HMG-CoA 裂解酶。在另一个实施方式中，鉴定的基因产物编码琥珀酰-羟甲基戊二酸酯辅酶 A-转移酶，或是琥珀酰-羟甲基戊二酸酯辅酶 A-转移酶。

为了鉴定可降低 HMG-CoA 累积诱导的毒性的基因产物，方法通常包括：a)将包含编码候选基因产物的核苷酸序列的外源性核酸引入宿主细胞，以产生试验细胞，其中宿主细胞产生 HMG-CoA 的水平可有效抑制宿主细胞的生长；和 b)确定候选基因产物的表达对试验细胞生长的作用（如果有的话）。为了鉴定降低细胞内 HMG-CoA 累积、和/或降低细胞内 HMGS 活性水平的试剂，方法通常包括：a)试验细胞与受试试剂相接触，其中，试验细胞通过甲羟戊酸途径合成甲羟戊酸，并且试验细胞显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制，和 b)确定受试试剂对 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的作用（如果有的话）。如本文所用，术语“确定”指定量和定性测定，这样，在本文中术语“确定”可与“分析”、“测量”等互换使用。

本发明筛选方法是基于细胞的体外试验。可使用多种细胞。在一些实施方式中，试验所用细胞是真核细胞，如上所述。在另一些实施方式中，试验所用

细胞是原核细胞，如上所述。

鉴定具有 HMG-CoA 解毒活性的基因产物的方法

本发明提供了鉴定具有 HMG-CoA 解毒活性的基因产物的体外筛选方法。所鉴定的基因产物可用于缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性，因而可用于产生类异戊二烯化合物或类异戊二烯前体的方法中。该方法通常包括：a)将包含编码候选基因产物的核苷酸序列的外源性核酸引入宿主细胞，以产生试验细胞，其中宿主细胞产生 HMG-CoA 的水平可有效抑制宿主细胞的生长；和 b)确定与宿主细胞相比，候选基因产物的表达对试验细胞生长的作用（如果有的话）。由候选基因产物降低 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的能力确定候选基因产物减少 HMG-CoA 累积和缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的作用。与宿主细胞相比，试验细胞中生长抑制的降低表明，该外源性核酸编码具有缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的充分活性的基因产物。宿主细胞是产生一种或多种甲羟戊酸途径中的酶的细胞，以产生 HMG-CoA。在一些实施方式中，宿主细胞是不能通过甲羟戊酸途径正常产生甲羟戊酸，并且用一种或多种包含编码一种或多种甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的核酸遗传修饰的细胞，以使 HMG-CoA 在细胞内产生和累积至生长抑制水平。在其它实施方式中，宿主细胞是天然产生生长抑制水平的 HMG-CoA、或除了通过引入一种或多种外源性 MEV 途径基因以外的遗传修饰以达到这种作用的细胞。

宿主细胞中产生的 HMG-CoA 的量可抑制宿主细胞的生长，例如，HMG-CoA 的细胞内浓度可抑制宿主细胞的生长。典型地，HMG-CoA 在宿主细胞中累积，与不产生 HMG-CoA 的对照宿主细胞的生长速率相比，或与在不利于合成生长抑制量的 HMG-CoA 的条件下培养的宿主细胞的生长速率相比，累积的量可抑制宿主细胞生长至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、或至少约 90%或更多。在一些实施方式中，HMG-CoA 在宿主细胞的细胞内累积的量对宿主细胞是致死性的，例如诱导宿主细胞的死亡。

在一些实施方式中，显示 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的宿主细胞是不能通过甲羟戊酸途径正常合成甲羟戊酸或 IPP、并且已用一种或多种包含

编码甲羟戊酸途径酶的核苷酸序列的核酸遗传修饰的细胞。例如，在一些实施方式中，显示 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的宿主细胞是用一种或多种包含编码乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的核苷酸序列的核酸遗传修饰的原核细胞，其中，细胞中产生的乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、HMGS 和 HMGR 的量将导致 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制。

在另一些实施方式中，显示 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的宿主细胞是通过甲羟戊酸途径正常合成甲羟戊酸或 IPP、并且经遗传修饰的细胞，使得 HMG-CoA 细胞内水平增加，导致 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制。

在能使 HMG-CoA 在细胞内累积至抑制生长和/或诱导死亡的量的条件下，体外培养试验细胞。在一些实施方式中，在诱导编码 HMGS 或 HMGR 的核苷酸序列表达的诱导物存在下培养试验细胞，所述核苷酸序列在诱导型启动子的控制下。采用任何检测细胞生长抑制的标准方法可确定试验细胞中存在的 HMG-CoA 的量是否抑制试验细胞的生长。例如，当细胞在液体培养基中生长时，通常由光密度的增加测定生长；可通过将产生生长抑制量 HMG-CoA 的宿主细胞液体培养物的光密度(例如，在 600nm 处)与产生生长抑制量中间体的相同宿主细胞液体培养物的光密度进行比较，检测生长抑制。也可通过视觉观察接种在含有合适的生长培养基的琼脂上的细胞集落的大小来检测生长抑制。

本发明筛选方法包括：将外源性核酸引入宿主细胞，产生试验细胞，其中，宿主细胞是当产生的 HMG-CoA 达到生长抑制量时显示生长抑制作用的细胞。当将包含编码 HMGR 的核苷酸序列的外源性核酸引入宿主细胞时，可缓解试验细胞的生长抑制。因此，生长抑制作用的降低表明，外源性核酸编码 HMGR，编码的 HMGR 达到可缓解 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的水平和/或活性。生长抑制的降低包括生长抑制降低至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%或更多。在一些实施方式中，外源性核酸编码的 HMGR 降低生长抑制作用，使得细胞生长速率恢复至在不产生生长抑制量 HMG-CoA 的条件下生长时宿主细胞的细胞生长速率。

在一些实施方式中，例如，当外源性核酸是多种外源性核酸(例如，cDNA 文库、基因文库、核酸群，各自编码具有不同氨基酸序列的 HMGR，等等)时，

将外源性核酸引入多种宿主细胞，形成多种试验细胞。在一些实施方式中，在能使 HMG-CoA 在细胞内累积至生长抑制和/或诱导死亡的量的条件下，试验细胞在液体培养基中生长；包含含有编码 HMGR 的核苷酸序列的外源性核酸的试验细胞将比不包含含有编码 HMGR 的核苷酸序列的外源性核酸的试验细胞生长得快，或者包含含有编码 HMGR 的核苷酸序列的外源性核酸的试验细胞存活，而不包含含有编码 HMGR 的核苷酸序列的外源性核酸的试验细胞将死亡。

在一些实施方式中，方法还包括从试验细胞分离外源性核酸，其中，外源性核酸是在本发明筛选方法中能缓解生长抑制的核酸。从试验细胞分离外源性核酸的方法是本领域众所周知的。合适的方法包括但不限于：本领域标准的碱裂解方法中的任一种。

在一些实施方式中，本发明筛选方法还包括进一步表征候选基因产物。在这些实施方式中，从试验细胞分离包含编码 HMGR 的核苷酸序列的外源性核酸；在细胞中和/或在体外无细胞转录/分离系统中表达基因产物。在一些实施方式中，对外源性核酸进行核苷酸序列分析，由核苷酸序列推断基因产物的氨基酸序列。在一些实施方式中，将基因产物的氨基酸序列与氨基酸序列公共数据库中的其它氨基酸序列进行比较，以确定与已知蛋白质的氨基酸序列是否存在任何显著程度的氨基酸序列相同性。此外，在细胞中和/或在体外无细胞转录/翻译系统中表达基因产物；分析基因产物对代谢途径中间体或其它代谢物的作用。

适合引入宿主细胞以产生试验细胞的外源性核酸包括但不限于：从细胞分离的天然来源的核酸；从细胞分离之前或之后经修饰(例如，突变)的天然来源的核酸；合成核酸，例如，在实验室里采用标准核酸化学合成方法合成的核酸，或通过重组方法合成的核酸；在细胞中或在无细胞系统中经体外扩增的合成或天然来源的核酸；等等。

适合引入宿主细胞的外源性核酸包括但不限于：基因组 DNA；RNA；从细胞分离的 mRNA 的互补 DNA (cDNA)拷贝；重组 DNA；以及诸如采用 DNA 合成的标准无细胞体外方法体外合成的 DNA。在一些实施方式中，外源性核酸是从细胞(原核细胞或真核细胞)制备的 cDNA 文库。在一些实施方式中，外源性核酸是从细胞(原核细胞或真核细胞)制备的基因组 DNA 文库。

在一些实施方式中，核酸在引入宿主细胞之前发生突变。使核酸突变的方法是本领域公知的，包括已确立的化学突变方法、辐射诱导的诱变以及合成期间使核酸突变的方法。DNA 突变的化学方法包括：使 DNA 接触化学诱变原，例如甲磺酸乙酯(EMS)、甲磺酸甲酯(MMS)、N-亚硝基脲(ENU)、N-甲基-N-硝基-N'-亚硝基胍、4-硝基喹啉 N-氧化物、硫酸二乙酯、苯芘、环磷酰胺、博来霉素、三乙醇胺、丙烯酰胺单体、氮芥、长春新碱、双环氧烷烃(例如，双环氧丁烷)、ICR-170、甲醛、盐酸丙卡巴肼、环氧乙烷、二甲基亚硝胺、7,12 二甲基苯蒽、苯丁酸氮芥、六甲基磷酸酰胺、重硫酸盐等。辐射突变诱导剂包括：紫外线辐射、 γ -照射、X-射线和快速中子轰击。使用例如三甲补骨脂素与紫外光也可将突变引入核酸。随机或定向插入可动 DNA 因子如转座因子是产生突变的另一种合适的方法。也可在例如采用聚合酶链反应(PCR)技术如易错 PCR 的无细胞体外系统的扩增过程中将突变引入核酸。可采用 DNA 改组技术(例如，外显子改组、功能区切换等)体外将突变引入核酸。突变被引入核酸也可以是细胞中 DNA 修复酶缺陷的结果，例如，预计细胞中存在编码突变体 DNA 修复酶的突变体基因可在细胞基因组中产生高频率突变(即约 1 个突变/100 个基因-1 个突变/10,000 基因)。编码 DNA 修复酶的基因包括但不限于：Mut H、Mut S、Mut L 和 Mut U、和其它物种中的同系物(例如，MSH 1-6、PMS 1-2、MLH 1、GTBP、ERCC-I 等)。使核酸突变的方法是本领域公知的，并且任何已知的方法都是适用的。例如，参见 Stemple (2004)Nature 5:1-6; Chiang 等, (1993) PCR Methods Appl 2(3): 210-217; Stemmer (1994)Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:10747-51; 以及美国专利 6,033,861 和 6,773,900。

在许多实施方式中，将外源性核酸插入表达载体。适用于原核和真核宿主细胞的表达载体是本领域已知的，并且可使用任何合适的表达载体。合适的表达载体如上所述。

如上所述，在一些实施方式中，在其天然环境中从细胞或生物体中分离外源性核酸。在一些实施方式中，从细胞或生物体分离核酸之前使细胞或生物体的核酸发生突变。在其它实施方式中，体外无细胞系统中合成外源性核酸。

适合引入宿主细胞的外源性核酸包括：从与宿主细胞不同物种的细胞或生物体分离的核酸。外源性核酸合适的来源包括但不限于：六界中的任何细胞或

生物体，例如细菌(例如，真细菌)；古细菌；原生生物；真菌；植物界；和动物界。外源性核酸合适的来源包括原生生物界类似植物的成员，包括但不限于藻类(例如，绿藻、红藻、共生藻、蓝细菌)；原生生物界类似真菌的成员，例如粘菌、水霉等；原生生物界类似动物的成员，例如，鞭毛类(例如，裸藻)、类变形虫(例如，阿米巴)、孢子虫(例如，顶复合器门、粘原虫门、微孢子虫)和纤毛虫(例如，草履虫)。外源性核酸合适的来源包括真菌界的成员，包括但不限于以下各门的成员：担子菌门(珊瑚菌；例如蘑菇、鹅膏菌、牛肝菌、*Cantherellus* 等的成员)；子囊菌门(子囊菌，包括例如酵母)；菌藻植物门(地衣)；接合菌门(结合真菌)；和不完全菌门。外源性核酸合适的来源包括植物界的成员，包括但不限于任何以下各门的成员：苔鲜植物门(例如，苔藓)、角苔门(例如，金鱼藻)、*Hepaticophyta* (例如，地钱)、石松植物门(例如，石松)、楔叶植物门(例如，木贼)、裸蕨植物门(例如，*whisk ferns*)、瓶尔小草门、蕨类植物门(例如，厥类)、苏铁植物门、*Gingkophyta*、松柏植物门、买麻藤植物门和被子植物门(例如，显花植物)。外源性核酸合适的来源包括动物界的成员，包括但不限于任何以下各门的成员：海绵动物门(海绵动物)；扁盘动物门；直泳虫门(海洋无脊椎动物寄生虫)；菱形虫门；腔肠动物门(珊瑚、海葵、水母、海鳃、海肾、海黄蜂)；栉水母动物门(栉水母)；扁形动物门(扁虫)；纽形动物门(纽形动物)；有腭动物门(*Ngathostomulida*)(有腭动物)；腹毛动物门；轮虫动物门；鳃曳动物门；动吻动物门；铠甲动物门；棘头动物门；内肛动物门；*Nemotoda*；线形动物门；环口动物门；软体动物门(软体动物)；星虫动物门(星虫动物)；环节动物门(环节动物)；缓步动物门(缓步动物)；有爪动物门(有爪动物)；节肢动物门(包括以下亚门：螯肢动物亚门、多足动物亚门、六足亚门和甲壳亚门，其中，螯肢动物亚门包括例如蜘蛛、肢口纲和海蜘蛛类，多足动物亚门包括例如唇足亚纲(蜈蚣)、倍足亚纲(千足虫)、*Paropoda* 和综合纲，六足亚门包括昆虫，甲壳亚门包括虾、磷虾、藤壶等；帚虫动物门；外肛动物门(苔藓动物)；腕足动物门；棘皮动物门(例如，海星、海洋雏菊、毛头星、海胆、海参、海蛇尾、*brittle baskets* 等)；毛颚动物门(毛颚动物)；半索动物门(橡实虫)；和脊索动物门。脊索动物门合适的成员包括任何以下亚门中的成员：尾索动物亚门(海鞘；包括海鞘纲、*Thaliacea* 和 *Larvacea*)；头索动物亚门(文昌鱼)；盲鳗亚门(盲鳗)；脊椎动物亚

门, 其中, 脊椎动物亚门包括例如以下各纲中的成员: 八目鳗纲(Petromyzontida) (八目鳗)、软骨鱼纲(软骨鱼)、辐鳍鱼纲(辐鳍鱼)、Actinista(coelocanth)、肺鱼纲(肺鱼)、爬行纲(爬行类动物, 例如蛇、钝吻鳄、鳄鱼、蜥蜴等)、鸟纲(鸟类); 和哺乳纲(哺乳动物)。合适的植物包括任何单子叶植物和双子叶植物。

因此, 例如, 合适的细胞包括来自以下生物体的细胞, 包括但不限于: 原生动物、植物、真菌、藻类细胞、酵母、爬行动物、两栖动物、哺乳动物、海洋微生物、海洋无脊椎动物、节肢动物、等脚动物、昆虫、蜘蛛类动物、原始细菌和真细菌。

在一些实施方式中, 从取自生物体的组织、从分离自生物体的特定细胞或细胞群等分离外源性核酸。例如, 当生物体是植物时, 在一些实施方式中, 从木质部、韧皮部、形成层、叶、根等分离外源性核酸。当生物体是动物时, 在一些实施方式中, 从特定组织(例如, 肺、肝、心脏、肾、脑、脾、皮肤、胚胎组织等), 或特定细胞型(例如, 神经元细胞、上皮细胞、内皮细胞、星形细胞、巨噬细胞、神经胶质细胞、胰岛细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等)分离外源性核酸。

在一些实施方式中, 外源性核酸是合成核酸。在一些实施方式中, 合成核酸包含编码变体 HMGR, 例如与天然来源的 HMGR 或其它亲代 HMGR 在氨基酸序列上有一个或多个氨基酸不同的 HMGR 的核苷酸序列。在一些实施方式中, 与天然来源亲代 HMGR 的氨基酸序列相比, 变体 HMGR 在氨基酸序列上有一个氨基酸、两个氨基酸、三个氨基酸、四个氨基酸、五个氨基酸、六个氨基酸、七个氨基酸、八个氨基酸、九个氨基酸、或氨基酸、或更多个氨基酸不同。在一些实施方式中, 与天然来源亲代 HMGR 的氨基酸序列相比, 变体 HMGR 在氨基酸序列上有约 10 个氨基酸到约 15 个氨基酸、约 15 个氨基酸到约 20 个氨基酸、约 20 个氨基酸到约 25 个氨基酸、约 25 个氨基酸到约 30 个氨基酸、约 30 个氨基酸到约 35 个氨基酸、约 35 个氨基酸到约 40 个氨基酸、约 40 个氨基酸到约 50 个氨基酸、约 50 个氨基酸到约 60 个氨基酸或更多个氨基酸不同。

在一些实施方式中, 变体 HMGR 由在严谨杂交条件下与编码已知 HMGR 的核酸杂交的核酸所编码。在另一些实施方式中, 变体 HMGR 由在温和杂交条

件下与编码已知 HMGR 的核酸杂交的核酸所编码。在另一些实施方式中，变体 HMGR 由在低严谨杂交条件下与编码已知 HMGR 的核酸杂交的核酸所编码。

在一些实施方式中，采用任何已确立的方法，使包含编码天然来源 HMGR 的核苷酸序列的核酸发生突变，产生包含编码变体 HMGR 的核苷酸序列的核酸。合适的诱变方法包括但不限于：化学突变方法、辐射诱导的诱变以及合成期间使核酸突变的方法，如上所述。因此，例如，使包含编码天然来源 HMGR 的核苷酸序列的核酸接触化学诱变剂，如上所述，或经历辐射突变、或经历易错 PCR，并将诱变处理的核酸引入如上所述遗传修饰的宿主细胞。使用细菌“增变”株的随机诱变方法也是本领域公知的，可用于产生变体 HMGR。例如，参见 Greener 等，“使用大肠杆菌增变株的有效随机诱变技术”(“An Efficient Random Mutagenesis Technique Using an E. coli Mutator Strain”), *Methods in Molecular Biology*, 57:375-385 (1995)。利用聚合酶链反应(PCR)的饱和诱变技术也是本领域公知的，也可以使用。例如，参见美国专利 6,171,820。由缓解 HMG-CoA 累积引起的生长抑制的能力来鉴定包含编码变体 HMGR 的核苷酸序列的核酸。

编码 HMGR 的核苷酸序列是本领域已知的，可改变任何已知的 HMGR 编码核苷酸序列，以产生本发明方法中使用的合成核酸。

在一些实施方式中，尤其感兴趣的是鉴定酶活性增加、从而降低 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的变体 HMGR。与亲代 HMGR 相比，酶活性增加的变体 HMGR 的酶活性增加至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 2 倍、至少约 2.5 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、或至少约 25 倍、或更多。

鉴定减少 HMG-CoA 累积的试剂的方法

本发明还提供了鉴定抑制或减少 HMG-CoA 累积的试剂的体外筛选方法；鉴定降低细胞中 HMGS 活性水平的试剂的方法；鉴定抑制 HMG-CoA 产生的试剂的方法；以及鉴定使 HMG-CoA 转化为或加速转化为其它化合物的试剂的方法。这些方法通常包括：a)使试验细胞与受试试剂相接触，其中，试验细胞通过甲羟戊酸途径合成甲羟戊酸，试验细胞显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制；

和 b)确定受试试剂对 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的作用（如果有的话）。生长抑制的降低表明，该试剂降低生长抑制水平的 HMG-CoA 在细胞内的累积。

抑制或减少细胞中 HMG-CoA 累积并促进细胞生长的试剂可用于增加类异戊二烯化合物的产生，如本文所述。抑制或减少细胞中 HMG-CoA 累积的试剂，并降低细胞中 HMGS 活性水平的试剂也可用于降低胆固醇生物合成，因而可用于治疗多种与高血胆固醇水平有关的病症。

术语“候选试剂”、“受试试剂”、“试剂”、“物质”和“化合物”在本文中可互换使用。候选试剂包括多种化学类型，典型地为合成、半合成或天然来源的无机或有机分子。候选试剂包括合成或天然化合物大库中的试剂。例如，合成化合物库可从 Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK)、ComGenex (South San Francisco, CA) 和 MicroSource (New Milford, CT) 商业获得。稀有候选库可从 Aldrich (Milwaukee, Wis.) 获得，也可使用。或者，细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库可从 Pan Labs (Bothell, WA) 获得或可容易地制备。

候选试剂可以是分子量大于 50 且小于约 2,500 道尔顿的小的有机或无机化合物。候选试剂可包括与蛋白质结构相互作用所需的官能团，特别是氢键，至少包括胺、羰基、羟基或羧基，并可包含至少两个官能化学基团。候选试剂可包含被一个或多个上述官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳族或多芳族结构。候选试剂也可以是生物分子，包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、它们的衍生物、结构类似物或组合。

本发明试验包括对照，合适的对照包括没有受试试剂时显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的细胞。通常，平行给予不同试剂浓度的多种试验混合物，以获得对不同浓度的差异性响应。典型地，这些浓度中的一个用作阴性对照，即零浓度或低于检测限水平。

试剂与细胞接触的合适的持续时间可通过经验确定，通常持续的时间足以使试剂进入细胞并使试剂对 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制具有可检测的作用。通常，合适的时间为 10 分钟到 24 小时，或约 1 小时到约 8 小时。

可以许多不同的方式设计筛选方法，其中，可采用多种试验构型和方案，如本领域所知。例如，可将试验细胞（显示 HMG-CoA 累积诱导的生长抑制的细

胞)接种在多孔板(例如, 96 孔板、384 孔板等)的孔中, 在板的各孔中分别加入各种受试试剂。筛选方法可以是自动化的。

采用众所周知的试验, 例如台盼蓝染色排斥试验、MTT(溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H-四唑盐)试验等, 评价候选试剂对试验中所用细胞的任何细胞毒活性。将不显示细胞毒活性的试剂视作候选试剂。

感兴趣的受试试剂是指与没有受试试剂的对照相比, 降低 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制至少约 10%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或更多的试剂。采用标准方法可容易地测定受试试剂对细胞生长抑制是否具有作用, 如上所述。

在一些实施方式中, 受试试剂指降低细胞中 HMGS 活性水平的试剂。感兴趣的受试试剂指与没有受试试剂的对照相比, 可降低 HMGS 活性水平至少约 10%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或更多的试剂。

采用多种试验方法可容易地测定受试试剂是否能降低细胞中 HMGS 的活性水平。作为一个非限制性的例子, 在来自受试试剂降低 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制的细胞样品的细胞裂解物中测定 HMGS 酶活性。HMGS 的测定可通过以下方法进行: 将过量乙酰辅酶 A 和乙酰乙酰辅酶 A 加入到含有细胞提取物或纯化酶的缓冲溶液(例如, 100 mM Tris-HCl)中。5 分钟后, 终止反应(例如, 通过冷冻样品), LC-MS 测定产生的 HMG-CoA。

作为另一个例子, 测定细胞中的 HMGS mRNA 水平。可采用许多方法来测定核酸的存在和/或细胞中特定 mRNA 的水平。可直接测定 mRNA 或逆转录成 cDNA 进行测定。可通过常规技术, 例如聚合酶链反应(PCR)扩增核酸, 提供足够量用于分析。聚合酶链反应的使用参见 Saiki 等, (1985), Science 239:487 所述; 技术综述参见 Sambrook 等, 《分子克隆: 实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), CSH Press 1989, 第 14.2-14.33 页; 并且各种 PCR 方案如许多教科书中所述, 包括, 例如《PCR 方案》(PCR Protocols) J. Bartlett 和 D. Stirling 编, (2003)Humana Press。

扩增反应中可包含可检测的标记。合适的标记包括荧光染料,例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、得克萨斯红、藻红蛋白、别藻蓝蛋白、6-羧基荧光素(6-FAM)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、5-羧基荧光素(5-FAM)或N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、放射性标记如³²P、³⁵S、³H;等等。标记可以是两阶段系统,其中扩增的DNA与具有高亲和结合配体如亲和素、特定抗体等的生物素、半抗原等偶联,结合配体与可检测的标记偶联。标记可偶联于一个或两个引物。或者,标记扩增中所使用的核苷酸,以将标记加入到扩增产物中。

许多测定样品中核酸丰度的不同方法是本领域技术人员已知的,其中,特别感兴趣的方法包括:Pietu等, *Genome Res.* (1996年6月)6: 492-503; Zhao等, *Gene* (1995年4月24日)156: 207-213; Soares, *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997年10月)8: 542-546; Raval, J. *Pharmacol Toxicol Methods* (1994年11月)32: 125-127; Chalifour等, *Anal. Biochem* (1994年2月1日)216: 299-304; Stolz & Tuan, *Mol. Biotechnol.* (1996年12月)6: 225-230; Hong等, *Bioscience Reports* (1982)2: 907; 和 McGraw, *Anal. Biochem.* (1984)143: 298 中所述的方法。还感兴趣的是 WO 97/27317 中所述的方法,该专利的内容被纳入本文作为参考。

可获得许多测定特定样品中蛋白质表达水平的方法。例如,检测可利用细胞染色或具有对蛋白质特异的标记抗体的组织切片,根据常规方法进行。透化处理细胞以染色胞质分子。将感兴趣抗体加入到细胞样品中,孵育一定时间以结合表位,通常至少约10分钟。抗体可标记有放射性同位素、酶、荧光剂、化学发光剂或其它标记以直接检测。或者,可使用第二阶段抗体或反应物来扩大信号。这些反应物是本领域众所周知的。例如,第一抗体可偶联生物素,加入辣根过氧化物酶结合的亲和素作为第二阶段反应物。最终检测采用在过氧化物酶存在下发生颜色变化的底物。或者,第二抗体偶联荧光化合物,例如荧光素、罗丹明、得克萨斯红等。可通过多种方法,包括离解细胞的流式细胞术、显微镜、发射成像、闪烁计数等来测定抗体结合的存在或不存在。

实施例

给出下面的实施例是为了提供给本领域普通技术人员如何制备和使用本发明的全面描述和说明，而不是为了限制本发明者所认为的本发明的范围，也不表示下面的实验是所有或仅仅进行的实验。已尽量确保所用数字(例如，量、温度等)的准确性，但应考虑到一些实验误差和偏差。除非另有说明，份数是重量份数，分子量是重量平均分子量，温度是摄氏度、压力为大气压或接近大气压。可使用标准缩写，例如，bp 碱基对；kb 千碱基；pl 皮升；s 或 sec 秒；min 分钟；h 或 hr 小时；aa 氨基酸；kb,千碱基；bp 碱基对；nt 核苷酸；i.m.肌内；i.p.腹膜内；s.c 皮下；等等。

实施例 1：体内产生甲羟戊酸限制紫穗槐二烯的产生

下面的实施例中使用以下菌株、载体、生长条件和分析方法。

菌株、质粒构建和生长培养基

菌株

使用都来自 Invitrogen 的大肠杆菌菌株 TOP10 和 DH10B 进行克隆和质粒构建。使用大肠杆菌 DH10B 进行类异戊二烯产生、生长和代谢物分析。

生长培养基

为克隆和增殖带有本文所述各重组载体的大肠杆菌菌株，使用 Miller 改良的 Luria 肉汤培养基(Sigma-Aldrich)，培养基中含有适量抗生素以进行质粒选择。对于生产、生长和代谢物试验，使工程改造(“遗传修饰”或“重组”)的大肠杆菌菌株在 Miller 改良的 Luria 肉汤培养基(LB)、1% (重量/体积)甘油和适量抗生素中生长。通过将 1 体积 2 M DL-甲羟戊酸内酯(Sigma-Aldrich)与 1.02 体积 2 M KOH 混合，37℃下孵育 30 分钟，制备用作培养基补充物的 DL-甲羟戊酸(Campos 等，(2001)Biochem. J. 353:59-67)。为维持质粒，合适的话，将所需的抗生素加入到生长培养基中。使用来自 Roche 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和来自 Sigma-Aldrich 的 L-阿拉伯糖来引入启动子系统。

质粒/操纵子构建

根据美国专利申请号 20030148479 和 20040005678，以及 Martin 等，(2003)Nat. Biotech. 21(7):796-802 所述组装异源甲羟戊酸途径多基因操纵子。

MevT 操纵子编码来自大肠杆菌的基因 *atoB*, 来自酿酒酵母的 *HMGS* 和来自酿酒酵母的截短形式的 *HMGR1* 称为 “*tHMGR..*”。MevT 操纵子编码负责乙酰辅酶 A 转化为甲羟戊酸的酶(图 2)。采用 Invitrogen TOPO TA 克隆系统 (Carlsbad,CA), 将组装的操纵子克隆入 pCR4 TOPO 载体, 进行序列测定。根据生产商的说明, 进行与 pCR4 TOPO 载体的连接和大肠杆菌 TOP10 的转化。

由于生物化学途径的表达常常在特定表达水平下最佳, 因而将 MevT 操纵子克隆入多种表达载体来确定质粒拷贝数和启动子强度对克隆的途径表达的作用。通过用 *SaII* 限制酶消化空白载体和 pCR4 TOPO 中的 MevT 操纵子并用 T4 DNA 连接酶连接, 将 MevT 操纵子克隆入 pBAD24 (中等拷贝数、阿拉伯糖诱导型质粒) (Guzman 等, (1995)J Bacteriology 177:4121-4130), M. Ehrmann 等, (1997)Proc. Natl. Acad Sci USA 94: 13111-13115)的 *SaII* 位点。所得质粒称为 pBAD24MevT (SEQ ID NO:1) (美国专利申请序列号公开号 20030148479、20040005678)。

通过用 *XmaI* 和 *PstI* 限制酶消化空白载体和 pCR4 TOPO 中的 MevT 操纵子并用 T4 DNA 连接酶连接, 也将 MevT 操纵子克隆入 pBAD33 (低拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒) (Guzman 等, (1995)J. Bacteriology 177:4121 -4130); Hisczynska-Sawicka.(1997)PLASMID 38: 174- 179)的 *XmaI-PstI* 位点。所得质粒称为 pBAD33MevT (SEQ ID NO:2), 参见 Martin 等, (2003)同上。

为了将 MevT 操纵子置于修饰的 P_{LAC} 启动子(较弱的启动子)的控制下, 用含有修饰的 P_{LAC} 启动子的 pBBR1MCS 的 *NsiI-XmaI* 片段(Kovach 等, (1995)Gene 166:175-176)代替 pBAD33MevT 的 *araC-pBAD NsiI-XmaI* 片段。用 *NsiI* 和 *XmaI* 限制酶消化 pBAD33MevT 和 pBBR1MCS 并用 T4 DNA 连接酶连接。所得质粒称为 pMevT (SEQ ID NO:3), 参见美国专利申请公开号 20040005678 以及 Martin 等, (2003)同上。

为产生 pMevT 的空质粒对照, 用 *SaII* 限制酶从 pMevT 上切掉 MevT 操纵子。所得只含有 P_{LAC} 启动子的质粒称为 pLac33 (Martin 等, (2003)同上)。

为从甲羟戊酸得到 FPP、IPP 和 DMAPP, 根据美国专利申请公开号 20030148479、20040005678 和 Martin 等, (2003)同上所述, 构建称为 MBIS 的操纵子。MBIS 包含来自酿酒酵母的基因 MK、PMK 和 MPD 和来自大肠杆菌

的 *ispA*(图 2)。如上所述,在修饰的 P_{LAC} 启动子的控制下,在质粒 pBBR1MCS-3(Kovach 等, (1995)同上)中组装 MBIS 操纵子。IPTG 诱导型质粒称为 pMBIS (SEQ ID NO: 4)。

为了从 FPP 产生紫穗槐-4,11-二烯,根据美国专利申请公开号 2004000567 和 Martin 等, (2003)同上所述,产生合成的紫穗槐烯合酶基因。将合成基因克隆入载体 pTrc99A (Amann 等, (1988)Gene 69:301-315),如上所述, IPTG 诱导型质粒称为 pADS (SEQ ID NO:5)。

为了确定 *MevT* 操纵子表达增加导致的毒性来源,将各个 *MevT* 操纵子的基因及其组合扩增并克隆入表达载体。

采用标准 PCR 方法以及与 *AtoB* 基因 5'和 3'端互补的引物扩增 pBAD24*MevT* 的 *AtoB*。通过用 *XmaI* 和 *SalI* 限制酶消化空白载体和 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接,将 *AtoB* 克隆入 pBAD33 (低拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒)的 *XmaI-SalI* 位点。所得质粒称为 p*AtoB* (SEQ ID NO 6)。

采用标准 PCR 方法以及与 HMGS 基因 5'和 3'端互补的引物扩增 pBAD24*MevT* 的 HMGS。通过用 *XmaI* 和 *SalI* 限制酶消化空白载体和 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接,将 HMGS 克隆入 pBAD33 (低拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒)的 *XmaI-SalI* 位点。所得质粒称为 pHMGS (SEQ ID NO: 7)。

采用标准聚合酶链反应(PCR)方法以及与截短 HMGR 基因 5'和 3'端互补的引物从 pBAD24*MevT* 中扩增截短的 HMGR。通过用 *XmaI* 和 *SalI* 限制酶消化空白载体以及 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接,将截短的 HMGS(tHMGR)克隆入 pBAD33 (低拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒)和 pBAD18 (中等拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒) (Guzman 等, (1995)J. Bacteriology 177:4121- 4130)的 *XmaI-SalI* 位点。所得低拷贝数质粒称为 pHMGR (SEQ ID NO: 8),所得中等拷贝数质粒称为 pBAD18HMGR (SEQ ID NO: 9)。

采用标准 PCR 方法以及与 HMGS 的 5'端和 HMGR 的 3'端互补的引物,扩增 pBAD24*MevT* 的两个基因区段,产生只含有 HMGS 和截短 HMGR 的操纵子。通过用 *SalI* 限制酶消化空白载体和 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接,将 HMGS 和 HMGR 片段克隆入 pBAD33 (低拷贝阿拉伯糖诱导型质粒)的 *SalI* 位点。所得质粒称为 pHMGSR (SEQ ID NO: 10)。

实施例中所述的质粒构建物的核苷酸序列如图 13A-C 到图 24A-C 所示；并突出了各个特征。编码序列、终止子和起始位点由粗体或粗体带下划线的文字表示。启动子序列在方框中。图 13A-C 和图 21A-C 所示“修饰的 pBR322 起始位点”包括截短的 *rop* 基因，因而提供拷贝数比(未修饰的) pBR322 起始位点高的质粒；含修饰的 pBR322 起始位点的质粒的质粒拷贝数估计约为 30-50 拷贝/细胞。例如，参见 Guzman 等，((1995)J. Bacteriol. 177:4121-4130；和 Ehrmann 等，((1997)Proc. Natl. Acad. Sci USA 94:13111-13115)。

测定细胞生长

通过测定 600 nm (OD_{600})处的光密度，测量大肠杆菌培养物的细胞生长。使用 UV-分光光度计(Beckman)测定取自具挡板(baffled)烧瓶的样品的 OD_{600} ，而使用微量测定板读数仪(SpectraMax, Molecular Devices)测定微量 96-孔板中培养物的 OD_{600} 。

紫穗槐-4,11-二烯测定

在玻璃气相色谱(GC)管中，用 0.7 ml 乙酸乙酯(Sigma-Aldrich)萃取 0.7 mL 样品，测定紫穗槐-4,11-二烯的浓度。然后，将样品在 Fisher Vortex Genie 2 混合机(Fischer Scientific)上以最大速率震摇 3 分钟。静置样品以使乙酸乙酯-水乳液分离。

在 Hewlett-Packard 6890 气相色谱/质谱仪(GC/MS)上分析乙酸乙酯培养物提取物。设定 LEAP 技术自动注射程序以使取样针延伸入两相混合液的乙酸乙酯层。使用 DB-5 柱(例如，得自 Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Calif.)和氮载气，在 GC 上分离 1 μ L 样品。各样品的柱温循环为 80°C 持续 2 分钟，以 30°C/分钟升温至 160°C，以 3°C/分钟升温至 170°C，以 50°C/分钟升温至 300°C，并在 300°C 下保持 2 分钟。由监测离子 189 和 204 m/z 的 5973 型 Hewlett-Packard 质量选择性检测器分析分离的(resolved)样品。上述质谱显示，紫穗槐-4,11-二烯合酶产物是紫穗槐二烯，且在该 GC 方法中紫穗槐二烯的保留时间为 7.9 分钟。因为不能获得紫穗槐-4,11-二烯纯的标准品，必须以石竹烯当量定量浓度。基于来自 Sigma (St. Louis, Mo.)的纯标准品，过去已测定了石竹烯的标准曲线。

紫穗槐-4,11-二烯浓度是基于两种化合物质谱中 189 和 204 m/z 离子相对于总离子丰度的相对丰度。

3-羟基-3-甲基戊二酸单酰-辅酶 A (HMG-CoA)测定

通过从生长培养基分离大肠杆菌，终止细胞代谢并用三氯醋酸(TCA)从细胞提取 HMG-CoA，液相色谱/质谱法(LC/MS)测定 HMG-CoA 浓度，来测定细胞内 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰-辅酶 A(HMG-CoA)水平。为了快速终止细胞代谢和从培养基分离细胞，采用层状 TCA 提取。从细胞培养基取样之前，制备层状 TCA 和硅油样品管。在 15 毫升 Falcon 管(Fischer Scientific)中，将 500 微升 10%三氯醋酸在氧化氙(都来自 Sigma- Aldrich)中的溶液加入到试管底部，然后加入 2 毫升硅油层(Fluka 的 AR200)。将制备的样品管置于冰/水浴上，使硅油层变得更加粘稠，以避免取样时的层转化。

将 10 毫升细胞培养基小心加入到 15 毫升样品管的硅油层上。使用 Alegria 离心机将样品管在 4℃下以最高速率快速离心 3 分钟。离心期间，离心力使细胞通过硅油层进入 TCA 层，从而从培养基分离细胞并且同时裂解细胞和终止代谢。

细胞旋转停止后，抽吸除去培养基层。然后，将 TCA 层转移至 2 毫升离心管，用 1 毫升 0.5 M 三正辛基胺在 1,1,2-三氯-1,2,2-三氟乙烷(都来自 Aldrich)中的溶液中和。取出水层，过滤并通过 LC/MS 测定。

在 Hewlett-Packard 1100 LC/MS 上测定水性 TCA 提取物。在 C-18 反相 HPLC 柱(Varian)上采用两组分梯度溶剂系统分离 50 微升样品。溶剂 A 是 100 mM pH 6 的醋酸铵缓冲液，溶剂 B 是 70%100 mM 醋酸铵缓冲液和 30%乙腈。每次运行前用 8%溶剂 B(92%溶剂 A)平衡 HPLC 柱 10 分钟。梯度方案为 0 分钟时 8%溶剂 B 到 15 分钟时 100%溶剂 B，在 100%溶剂 B 下平衡直到 28 分钟。

由质量选择性检测器监测离子 912 m/z，分析分离的 (resolved) HMG-CoA 样品。用市售 HMG-CoA(Sigma)验证提取的 HMG-CoA 的保留时间和质谱图。

甲羟戊酸测定

GC/MS 分析测定工程改造大肠杆菌培养物中甲羟戊酸(甲羟戊酸)的浓度。

将 560 微升大肠杆菌培养物与 140 微升 300 毫摩尔 HCl 在玻璃 GC 管中混合，以使甲羟戊酸从酸转化为内酯形式，从甲羟戊酸转化为甲羟戊酸内酯。将 700 微升乙酸乙酯加入到各管中，然后在 Fisher Vortex Genie 2 混合机(Fischer Scientific)上以最大速率震摇 3 分钟。

在 Hewlett-Packard 6890 气相色谱/质谱仪(GC/MS)上测定酸化培养物的乙酸乙酯提取物。设定 LEAP 技术自动注射程序以使取样针延伸进入两相混合液的乙酸乙酯层。在 GC 上用 DB-5 柱(例如，得自 Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Calif.)和氦载气分离 1 微升样品。各样品的柱温循环是 B. H. Woollen 等，(B. H. Woollen 等，J Chromatogr. B. 760 (2001)179-184)所述方法的改进版本。各样品的柱温循环为 75℃持续 2 分钟，以 20℃/分钟升温至 150℃，以 15℃/分钟升温至 250℃，以 50℃/分钟升温至 300℃，在 300℃下保持 2 分钟。由 Hewlett-Packard 型号 5973 质量选择性检测器监测离子 71 m/z，分析分离的 (resolved) 样品。采用市售 DL-甲羟戊酸内酯(Sigma)验证提取的甲羟戊酸内酯的保留时间和质谱图。

结果

工程改造以含有外源性甲羟戊酸途径的大肠杆菌中类异戊二烯的产生常常受到甲羟戊酸产生的限制。甲羟戊酸产生的增加可导致该宿主细胞工程改造需产生的类异戊二烯的增加。缓解 HMG-CoA 毒性导致甲羟戊酸产生增加，因而使类异戊二烯产生增加。

为了提高大肠杆菌中从甲羟戊酸途径产生的类异戊二烯，应测定该异源途径的限制步骤。为此，通过标准方法将上述质粒 pMevT、pMBIS 和 pADS 转化入单个大肠杆菌 DH10B 菌株。在含 50 µg/ml 羧苄西林、5 µg/ml 四环素和 25 µg/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将单个菌株集落从 LB 琼脂平板转移至 5 毫升含相同抗生素的 LB 液体培养基。通过在 37℃下震摇培养种子培养物，直到生长达到稳定期。

用 IPTG 诱导操纵子和 ADS 表达可从乙酰辅酶 A 大肠杆菌来源产生紫穗槐二烯。为确定哪个操纵子限制紫穗槐二烯的产生，在多个由 LB 培养基及 1%(重量/体积)甘油和合适的抗生素组成的液体培养基摇瓶中孵育含所有三种

质粒的大肠杆菌。摇瓶接种有 5 毫升种子培养物。连续震荡下，37℃ 孵育培养物。接种后 2 小时，将 0.5 mM IPTG 加入到各个培养物中，以诱导操纵子的表达。此外，接种后 2 小时将 10 mM 和 20 mM 甲羟戊酸加入到不同的培养物中。连续震荡下，37℃ 孵育培养物。在多个时间点，测定菌株细胞生长和紫穗槐二烯的产生。

如图 4 所示，增加加入到培养物中的甲羟戊酸的量增加了由表达所有三种操纵子的大肠杆菌菌株产生的紫穗槐二烯。该结果表明，在这些试验体系中，MevT 操纵子体内产生的甲羟戊酸限制了倍半萜紫穗槐二烯的产生。

图 4. 比较了在不同浓度的外源性甲羟戊酸下，大肠杆菌菌株利用工程改造的甲羟戊酸途径[pMevT, pMBIS, pADS]产生的紫穗槐二烯。含 1% 甘油的 LB 培养基不补充甲羟戊酸(0 mM)、补充 10 mM 甲羟戊酸或 20 mM 甲羟戊酸。

实施例 2：由较强启动子系统和较高拷贝数质粒载体产生的 MevT 操纵子表达的增加导致生长抑制

下面的实施例表明，甲羟戊酸途径“上半部分”(乙酰乙酰基硫解酶、HMGS 和 HMGR)过度表达的增加可导致修饰的宿主细胞生长抑制。

为增加大肠杆菌体内产生的甲羟戊酸，将 MevT 操纵子转化至可使 MevT 基因表达增加的表达系统。用以下 MevT 质粒转化大肠杆菌 DH10B，以表达增加的顺序排列：pMevT 和 pTrc99A(其中，pMevT 和 pTrc99A 都转化入相同的宿主细胞)、pBAD33MevT 和 pBAD24MevT。此外，将对应的空白对照质粒转化入大肠杆菌 DH10B：pLac33 和 pTrc99A (两种质粒在相同的宿主中)、pBAD33 和 pBAD24。pMevT 和 pLac33 与 pTrc99A 共转化，以用 pTrc99A 上的 *LacI*^Q 控制 pMevT 和 pLac33 的修饰的 P_{LAC} 启动子。

在含 50 µg/ml 羧苄西林和 50 µg/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择含有 pMevT 和 pTrc99A、或 pLac33 和 pTrc99A 的菌株转化体。在含 50 µg/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择其它菌株转化体。将各个菌株的单个集落从 LB 琼脂平板转移至 5 毫升含有相同抗生素的 LB 液体培养基。通过在 37℃ 下震荡培养种子培养物，直到生长达到稳定期。使用这六种种子培养物接种含 LB 培养基及 1% (重量/体积)甘油和抗生素的 96-孔滴定板。在微量滴定板读数仪上 37℃

下连续震摇 2 小时后,用 0.5 mM IPTG (用于诱导 pMevT 和 pLac33)或 2 mM 阿拉伯糖(用于诱导 pBAD33MevT、pBAD24MevT、pBAD33 和 pBAD24)诱导菌株。诱导之后,37°C 连续震摇下继续孵育培养物。微量滴定板读数仪每 10 分钟测定各 0.2 mL 培养物的细胞生长。

如图 5 所示,与空白质粒对照(pLac33/pTrc99A、pBAD33 和 pBAD24)相比,由 pMevT 中的弱、修饰的 P_{LAC} 启动子诱导 MevT 没有引起细胞生长显著变化。但是,由 pBAD33MevT 的 araC- P_{BAD} 启动子系统诱导的 MevT 操纵子的表达增加引起生长抑制。保留 araC- P_{BAD} 启动子系统但增加质粒拷贝数,因此进一步增加 MevT 的总表达,如 pBAD24MevT 中那样,仅加剧了生长抑制问题。如这些数据所示,从具有修饰的 P_{LAC} 启动子系统的中等拷贝质粒,到具有 araC- P_{BAD} 启动子系统的中等拷贝质粒,再到具有 araC- P_{BAD} 启动子系统的高拷贝质粒,MevT 操纵子的表达增加,导致对工程改造菌株的毒性增加。

图 5. MevT 操纵子表达增加对大肠杆菌细胞生长的影响。比较了包含空白质粒 pLac33 + pTrc99A、pBAD33 和 pBAD24 的大肠杆菌与包含 MevT 操纵子 pMevT+pTrc99A、pBAD33MevT 和 pBAD24MevT 的大肠杆菌(以表达增加的顺序排列)。

实施例 3: HMGS 表达增加导致生长抑制,但 HMGS 和 HMGR 一起表达增加不抑制生长。

下面的实施例显示,甲羟戊酸途径上半部分表达增加导致的生长抑制,如实施例 2 所述,是由于催化 HMG-CoA 产生的 HMGS 的表达。在本发明方法中,催化 HMG-CoA 为反应物的反应的 HMGR 的表达,与 HMGS 一起,能够避免毒性。

为了确定 MevT 操纵子表达增加引起的毒性的来源,将各个 MevT 操纵子的基因及其组合扩增并克隆入表达载体中。采用标准 PCR 方法以及与 *AtoB* 基因 5'和 3'端互补的引物扩增 pBAD24MevT 的 *AtoB*。通过用 *XmaI* 和 *SalI* 限制酶消化空白载体和 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接,将 *AtoB* 克隆入 pBAD33 (低拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒)的 *XmaI-SalI* 位点。所得质粒称为 pAtoB (SEQ ID NO 6)。采用标准 PCR 方法以及与 HMGS 基因 5'和 3'端互补的引物扩增

pBAD24MevT 的 HMGS。通过用 *Xma*I 和 *Sal*I 限制酶消化空白载体和 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接, 将 HMGS 克隆入 pBAD33 (低拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒) 的 *Xma*I-*Sal*I 位点。所得质粒称为 pHMGS (SEQ ID NO 7)。采用标准聚合酶链反应(PCR)方法以及与截短 HMGR 基因 5'和 3'端互补的引物从 pBAD24MevT 中扩增截短的 HMGR。通过用 *Xma*I 和 *Sal*I 限制酶消化空白载体以及 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接, 将截短的 HMGR(tHMGR)克隆入 pBAD33 (低拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒) 和 pBAD18 (中等拷贝、阿拉伯糖诱导型质粒)(Guzman 等, (1995)J. Bacteriology 177:4121- 4130)的 *Xma*I-*Sal*I 位点。所得低拷贝数质粒称为 pHMGR (SEQ ID NO: 8), 所得中等拷贝数质粒称为 pBAD18HMGR (SEQ ID NO: 9)。

采用标准 PCR 方法以及与 HMGS 的 5'端和 HMGR 的 3'端互补的引物, 从 pBAD24MevT 中扩增 HMGS 和截短的 HMGR 这两个基因区段, 产生只含有 HMGS 和截短 HMGR 的操纵子。通过用 *Sal*I 限制酶消化空白载体和 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接, 将 HMGS 和 HMGR 片段克隆入 pBAD33 (低拷贝阿拉伯糖诱导型质粒) 的 *Sal*I 位点。所得质粒称为 pHMGSR (SEQ ID NO: 10)。

为了确定与 MevT 操纵子表达增加有关的生长抑制的原因, 将操纵子分解成各个组件。如上所述构建表达单个基因的质粒 pAtoB、pHMGS 和 pHMGR、以及表达 HMGS 和 HMGR 的组合物 pHMGSR。采用标准方法, 将这四种质粒、pBAD33 (空白质粒对照) 和 pBAD33MevT 转化入大肠杆菌 DH10B。在含 50 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将各菌株的单个集落从 LB 琼脂平板转移至 5 毫升含有相同抗生素的 LB 液体培养基。通过 37°C 转移孵育该种子培养物, 直到生长达到稳定期。

使用这六种培养物接种含 0.2 毫升 LB 培养基、1% (重量/体积) 甘油和抗生素的 96-孔微量滴定板。将 96-孔板培养物置于微量滴定板读数仪上 37°C 下连续震荡, 并在接种后 2 小时用 2 mM 阿拉伯糖诱导培养物。各培养物的细胞生长如图 6 所示。

如图 6 所示, 与空白质粒对照相比, 大肠杆菌(分别携带质粒 pAtoB 和 pHMGR 的菌株中)中 *atoB* 和 *HMGR* 表达增加对细胞生长没有显著影响。但是, HMGS 表达增加(在携带 pHMGS 的菌株中)导致显著的生长抑制。有趣的是,

随着 HMGS 和 HMGR(在包含 pHMGSR 的菌株中)共表达增加, 细胞生长恢复至空白质粒对照的水平。假定这种毒性缓解是由于 HMGR 能够将 HMGS 产生的 HMG-CoA(并且在大肠杆菌中不会被任何已知的酶所降解)转化为甲羟戊酸。然后, 甲羟戊酸通过细胞膜进入培养基, 如 Campos 等, (2001)Biochem. J. 353:59-67; 和 Martin 等, (2003) Nature Biotech. 21(7):796-802 所述。但是, MevT 操纵子中所有三种基因(包含 pBAD33MevT 的菌株)表达增加又可抑制细胞生长。因为数据表明, 仅 *atoB* 表达增加不引起生长抑制, *atoB* 与 HMGS 和 HMGR 共表达增加引起的毒性可能是由于 *atoB* 产生的乙酰乙酰辅酶 A 增加。大肠杆菌酮硫解酶(*atoB*)表达增加导致的乙酰乙酰辅酶 A 产生增加, 从而提供给 HMGS 更多的底物并显著增加了甲羟戊酸的产生(T. Kuzuyama. (2004)Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(4): 931-934)。但是, 如果 HMGS 的总活性大于 HMGR, HMG-CoA 将累积并可能引起生长抑制。为了证实上述假设, 在工程改造株中测定乙酰辅酶 A 途径中间体。

图 6. 比较了高水平表达单个 MevT 基因及其组合的大肠杆菌的细胞生长。携带质粒 pBAD33 (空白质粒对照)、pAtoB、pHMGR、pHMGS、pHMGSR 和 pBAD33MevT 的大肠杆菌的细胞生长。

实施例 4: HMGS 表达增加导致的毒性是因为该蛋白质酶活性增加而不仅仅是蛋白质本身产生的增加。

下面的实施例表明, HMGS 表达中观察到的毒性不是因为酶的表达, 而是因为其活性-从乙酰乙酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 产生 HMG-CoA。就是说, 观察到的生长抑制不是因为产生更多的酶所带来的代谢负荷, 而是通过细胞中酶的作用。

产生全长但无催化活性的 HMGS

仅酿酒酵母 HMGS 在大肠杆菌中的高表达所导致的毒性可能是因为异源蛋白质高水平产生所导致的毒性(B.R. Glick. (1995)Biotech Advances. 13(12): 247-261), 与 HMGS 的代谢活性不同。为了区分这两种可能性, 形成全长但无催化活性的 HMGS。通过将酵母 HMGS 蛋白质序列与 L.L. Rokosz 等,

((1994)Arch. Biochem. Biophysics. 312(1),1-13) 中所列的一些哺乳动物 HMGS 蛋白的活性位点序列进行比较, 确定野生型酿酒酵母 HMGS 蛋白的活性位点。酿酒酵母 HMGS 的活性位点残基与哺乳动物 HMG-CoA 合酶的活性位点氨基酸残基相同。

如 Rokosz 等, ((1994)同上)所述, 将人 HMG-CoA 合酶的催化半胱氨酸氨基酸变为丙氨酸可形成无催化活性的全长 HMG-CoA 合酶蛋白。因此, 利用定向诱变(QuickChange 定向诱变数据包, Stratagene), pBAD33MevT 中酿酒酵母 HMGS 活性位点的催化半胱氨酸氨基酸被丙氨酸替代。由整个操纵子的 DNA 序列证实, 酵母 HMGS 中氨基酸位置 159 处的半胱氨酸突变为丙氨酸, 称为 HMGS(C159A)。含 HMGS(C159A)突变的质粒 pBAD33MevT 称为 pBAD33MevT(C159A)(SEQ ID NO 11)。通过 LC 串联 MS(液相色谱串联质谱)测定, pBAD33MevT(C159A)在大肠杆菌 DH10B 中的高表达未产生可检测到的甲羟戊酸, 或者通过液相色谱-质谱测定, 未产生可检测到的 MHG-CoA。该结果表明, HMGS(C159A)突变体也没有催化活性。

为了构建仅表达突变 HMG-CoA 合酶的质粒, 采用标准 PCR 方法以及与 HMGS(C159A)的 5'端和 3'端互补的引物, 扩增 pBAD33MevT (C159A)的 HMGS(C159A)。通过用 *Xma*I 和 *Sa*II 限制酶消化空白载体和 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶连接, 将 HMGS(C159A)基因克隆入 pBAD33 (低拷贝数阿拉伯糖诱导型质粒)的 *Xma*I-*Sa*II 位点。所得质粒称为 pHMGS(C159A)(SEQ ID NO 12)。

测定生长抑制的原因

为了确定 HMGS 在大肠杆菌中高表达导致生长抑制的原因, 将野生型 HMGS 高表达的作用与全长度无催化活性的 HMGS、HMGS(C159A)高表达的作用进行比较。采用标准方法将质粒 pBAD33 (空白质粒对照)、pHMGS、pHMGS(C159A)、pBAD33MevT 和 pBAD33MevT(C159A)转化入大肠杆菌 DH10B。在含 50 µg/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板选择转化体。将各菌株的单个集落从 LB 琼脂平板转移至 5 毫升含相同抗生素的 LB 液体培养基中。通过在 37 °C 下震荡孵育该种子培养物, 直到生长达到稳定期。

使用这五种不同的种子培养物接种含 0.2 毫升 LB 培养基、1%(重量/体积)

甘油和抗生素的 96-孔微量滴定板。将 96-孔板培养物置于微量滴定板读数仪上 37℃ 下连续震摇，并在接种后 2 小时用 2 mM 阿拉伯糖诱导培养物。各培养物的细胞生长如图 7 所示。

如图 7 所示，与对照(带有 pBAD33 的菌株)相比，HMGS 在大肠杆菌(带有 pHMGS 的菌株中)中的高表达导致生长抑制，而 HMGS(C159A)突变体在大肠杆菌(带有 pHMGS(C159A)的菌株)中的高表达不会导致生长抑制。由于 pHMGS 和 pHMGS(C159A)之间唯一差异是催化半胱氨酸转化为丙氨酸，该结果表明，野生型 HMGS 的高表达引起的毒性是因为蛋白质的酶活性而不仅仅是异源蛋白质高表达可引起的生长抑制(B.R. Glick. (1995)Biotech Advances. 13(12): 247-261)。而且，高水平表达无活性 MevT 操纵子的大肠杆菌(带有 pBAD33MevT (C159A)的菌株中)具有与对照相同的生长分布图，而功能型 MevT 操纵子(带有 pBAD33MevT 的菌株中)高表达抑制细胞生长。该结果表明，不是 MevT 操纵子中所有基因的高表达导致的生长抑制都是因为异源蛋白质高表达导致的生长抑制。

此外，图 7 显示通过降低 HMGS 活性，可缓解细胞内 HMG-CoA 累积(参见实施例 5 和 6，如上所述)引起的 MevT 操纵子高表达所导致的毒性。虽然在本实施例中 HMGS 的活性降低至零，但有些降低的 HMGS 活性水平将缓解生长抑制而仍然允许产生甲羟戊酸。酶活性平衡的途径的高表达使每体积细胞培养物产生的甲羟戊酸增加。

图 7。无催化活性的 HMGS 高表达对大肠杆菌细胞生长的影响。比较了带有质粒 pBAD33(空白质粒对照)、pBAD33MevT、pBAD33MevT(C159A)(含有无活性 HMGS)、pHMGS 和 pHMGS(C159A)(含有无活性 HMGS)的大肠杆菌的细胞生长。

实施例 5：过度表达 MevT 操纵子的大肠杆菌生长抑制是因为 HMG-CoA 的细胞内累积。

下面的实施例表明，表达 MevT 操纵子后所观察到的生长抑制是因为 HMG-CoA 的累积。

非诱导条件下，37℃、5 毫升 LB 培养基和抗生素中，将带有质粒 pBAD33

(空白质粒对照)、pHMGS、pHMGR 和 pBAD33MevT 的大肠杆菌 DH10B 菌株培养过夜。使用过夜培养物接种含有 100 毫升 LB 培养基、1%(重量/体积)甘油和抗生素的具挡板的摇瓶。37℃下连续震荡培养物，并在接种后 2 小时用 2 mM 阿拉伯糖诱导培养物。测定各菌株中 HMG-CoA 的细胞内水平以及各培养物的生长抑制，结果分别如图 8 和 9 所示。

如图 8 和 9 所示，与空白载体对照(带有 pBAD33 的菌株)相比，HMGS 高表达(带有 pHMGS 的菌株)导致 HMG-CoA 累积和生长抑制。有趣的是，HMGS 和 HMGR 同时高表达(带有 pHMGR 的菌株)不导致生长抑制且检测不到累积的 HMG-CoA，在这些方面基本上类似于对照。但是，大肠杆菌中 MevT 操纵子的 *atoB*、HMGS 和 HMGR 一起高表达(带有 pBAD33MevT 的菌株)在晚些时候导致生长抑制和 HMG-CoA 累积。

大肠杆菌从 *atoB* 的天然表达和短链脂肪酸的降解自发产生低水平的乙酰乙酰辅酶 A。图 8 和 9 所示结果表明，大肠杆菌中仅 HMGS 高表达可从乙酰乙酰辅酶 A 天然来源产生 HMG-CoA。因为 HMG-CoA 不是大肠杆菌天然具有的，还不知道大肠杆菌中任何一种酶对其起作用，并且其不会透过细胞膜；因此，HMG-CoA 在细胞中累积。在某一水平，HMG-CoA 抑制细胞过程。但是，HMGS 和 HMGR 一起高表达可使由 HMGS 从乙酰乙酰辅酶 A 天然来源产生的 HMG-CoA 转化为甲羟戊酸。甲羟戊酸将透过细胞膜并在培养基中累积。此外，甲羟戊酸高的细胞外浓度似乎对大肠杆菌的生长没有明显影响(Martin 等，(2003)同上)。

图 8.表达甲羟戊酸途径构建物的大肠杆菌菌株的细胞内 HMG-CoA 水平。HMG-CoA 在带有 pBAD33 (空白质粒对照)、pHMGS、pHMGR 和 pBAD33MevT 的大肠杆菌中的累积。

图 9.表达甲羟戊酸途径构建物的大肠杆菌菌株的细胞生长。比较了带有质粒 pBAD33(空白质粒对照)、pHMGS、pHMGR 和 pBAD33MevT 的大肠杆菌的细胞生长。

atoB 与 HMGS 和 HMGR 一起可提供给 HMGS 更多的底物并显著增加甲羟戊酸的产生(T. Kuzuyama. (2004)Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(4): 931-934); 但是，如果 HMGS 的总活性大于 HMGR，中间体 HMG-CoA 将再次累积并导

致生长抑制。因此，在一个实施方式中，本发明提供了缓解 HMG-CoA 在细胞中累积导致的生长抑制毒性的方法，该方法包括修饰细胞以增加 HMGR 相对于 HMGS 的表达。在一个实施方式中，HMGR 活性提高至约等于 HMGS 活性的水平。在其它实施方式中，HMGR 活性提高至 HMGS 活性的 1.5 倍、2.5 倍和 10 倍的水平。

实施例 6： HMGR 表达的增加缓解 MevT 高表达引起的生长抑制，减少 HMG-CoA 的累积，增加甲羟戊酸的产生。

下面的实施例显示，如何由于 HMGR 过度表达而增加甲羟戊酸产生和克服 HMG-CoA 累积所导致的毒性问题。

为了阐述 HMG-CoA 细胞内累积对大肠杆菌的毒性和开始优化该途径以校正该问题，增加 HMGR 在高水平表达 MevT 操纵子的菌株中的活性。用两种质粒的下列组合转化大肠杆菌 DH10B 形成三种二元质粒体系：pBAD33 和 pBAD18(空白质粒对照菌株)、pBAD33MevT 和 pBAD18、以及 pBAD33MevT 和 pBAD18HMGR。在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 羧苄西林和 50 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素的 LB 琼脂平板上选择转化体。将各菌株的单个集落从 LB 琼脂平板转移至 5 毫升含有相同抗生素的 LB 液体培养基中。通过在 37°C 下震荡孵育种子培养物，直到达到稳定期。

使用上述三种不同的种子培养物接种含有 100 毫升 LB 培养基、1%(重量/体积)甘油和抗生素的具挡板(baffled)的摇瓶。37°C 连续震荡培养物，并在接种后 2 小时用 2mM 阿拉伯糖诱导培养物。根据实施例 1 所述方法，测定各培养物的细胞生长、各菌株中 HMG-CoA 的细胞内水平和各培养物中产生的甲羟戊酸。上述三种二元质粒体系的结果分别在图 10、11 和 12 中显示。

如图 10 和 11 所示，与对照菌株(带有 pBAD33 和 pBAD18 的菌株)相比，带有 pBAD33MevT 和 pBAD18 的菌株中 MevT 高表达又导致生长抑制和 HMG-CoA 累积。但是，高水平表达 MevT 的菌株(带有 pBAD33MevT 和 pBAD18HMGR 的菌株)中 HMGR 表达增加部分地缓解生长抑制并减少 HMG-CoA 累积。此外，如图 12 所示，HMGR 表达增加导致甲羟戊酸产生的增加。增加 HMGR 的表达仅仅是本发明提高大肠杆菌细胞中 HMGR 活性的一种

示例性方法。本发明中提高 HMGR 活性的其它方法也可产生类似的结果。

MBIS 和 ADS 在 HMGR 活性增加和 MevT 高表达的菌株中的表达可使紫穗槐二烯的产生增加。此外,增加 HMGR 的活性和缓解 MevT 高表达引起的毒性可提高任何类异戊二烯的产生,只要从甲羟戊酸到感兴趣类异戊二烯的酶途径是共表达的。

图 10. HMGR 表达增加对表达 MevT 操纵子的大肠杆菌细胞生长的影响。带有质粒 pBAD33+pBAD18(空白载体对照)、pBAD33MevT+pBAD18 和 pBAD33MevT+pBAD18HMGR 的大肠杆菌的细胞生长。

图 11. HMGR 表达增加对表达 MevT 操纵子的大肠杆菌 HMG-CoA 水平的影响。带有质粒 pBAD33+pBAD18(空白载体对照)、pBAD33MevT+pBAD18 和 pBAD33MevT+pBAD18HMGR 的大肠杆菌的细胞内 HMG-CoA 水平。

图 12. HMGR 表达增加对表达 MevT 操纵子的大肠杆菌的甲羟戊酸产生的影响。带有质粒 BAD33+pBad18(空白载体对照)、pBAD33MevT+pBAD18 和 pBAD33MevT+pBAD18HMGR 的大肠杆菌培养物中的甲羟戊酸水平。

实施例 7: 本发明方法在产生甲羟戊酸的宿主细胞中的应用

本实施例描述了如何将本发明方法应用于任何产生甲羟戊酸的宿主细胞,其中,宿主细胞中 HMG-CoA 水平累积至毒性水平。一般来说,以某种方式修饰宿主细胞,试图实现较高水平的类异戊二烯或类异戊二烯前体(例如,甲羟戊酸、IPP、多异戊烯二磷酸酯等),以形成“亲代”细胞。合适的修饰包括,例如,增加细胞内乙酰辅酶 A 含量的修饰,增加乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶活性水平的修饰、增加 HMGS 活性水平的修饰。通过旨在改变转录水平、酶水平或酶的比活的遗传或化学改变或处理可实现上述修饰。

观察亲代宿主细胞的生长特征,并与未修饰宿主细胞的生长特征进行比较。如果亲代宿主细胞的生长明显慢于未修饰宿主细胞,那么观察到的生长抑制可能是由于 HMG-CoA 的毒性,所得甲羟戊酸或类异戊二烯产生的水平是最佳水平以下的(suboptimal)。

通过已确定的提取和 LC-MS 技术(参见实施例 1)测定宿主细胞和亲代细胞中的 HMG-CoA 水平,以验证预测的生长抑制原因。如果修饰的宿主细胞中每

单位生物量(由干细胞重量或者通过在例如 600nm 处测定光密度来确定生物量)的 HMG-CoA 水平较高,那么这些测定支持毒性是由于 HMG-CoA 累积的结论,如果是这样,那么降低细胞内 HMG-CoA 水平可缓解毒性和增加总的甲羟戊酸、IPP 或类异戊二烯的产生。虽然在本发明缓解 HMG-CoA 累积诱导的毒性的方法中,在生长受到抑制的产生 HMG-CoA 的细胞中测定 HMG-CoA 水平不是必需步骤,但在一些实施方式中可时不时地进行这种测定。

通过实施本发明可缓解 HMG-CoA 毒性和改善类异戊二烯或类异戊二烯前体的产生。例如,可以许多方式遗传修饰亲代宿主细胞,形成与亲代宿主细胞相比,能够产生更高水平 HMGR 的遗传修饰的宿主细胞。例如,通过(例如)用在启动子控制下表达 HMGR 的高拷贝数质粒遗传修饰亲代宿主细胞,增加亲代宿主细胞内包含编码 HMGR 核苷酸序列的载体的拷贝数。作为另一个例子,例如通过用包含在较强启动子控制下的编码 HMGR 的核苷酸序列的构建物遗传修饰亲代宿主细胞,增加亲代细胞中的 HMGR mRNA 水平。作为另一个例子,修饰亲代宿主细胞中 *hmgR* 上游的核糖体结合位点,形成 HMGR 产生水平提高的遗传修饰的宿主细胞。通过观察遗传修饰宿主细胞的生长特征并将它们与亲代宿主细胞的生长特征进行比较,当遗传修饰的宿主细胞不显示或很少显示亲代细胞的生长抑制时,可以确定方法是成功的。随着生长速率的增加和/或培养物最终细胞密度的增加,可观察到 HMG-CoA 毒性的缓解。

作为另一个实施例,通过增加 HMG-CoA 在具有内源性甲羟戊酸途径的细胞中的水平,形成亲代宿主细胞。例如,通过将突变引入(遗传修饰的)酵母细胞,酵母细胞如酿酒酵母内乙酰辅酶 A 的细胞内水平增加,产生“亲代”宿主细胞。例如,通过将突变引入染色体上的丙酮酸脱羧酶基因,增加细胞内乙酰辅酶 A 水平。这可利用一步法基因破坏 (Rothstein,RJ. (1983)Methods Enzymol. 101 202-211 酵母中的一步法基因破坏(One-step gene disruption in yeast))以破坏丙酮酸脱羧酶来实现。类似地,通过在酵母中进行整合 DNA 转化形成丙酮酸脱羧酶的无活性或部分活性等位基因(Rothstein,R. (1991)Methods Enzymol. 194 281-301)。采用现有敲除技术在不同的酿酒酵母菌株,例如菌株 S288C 中实现基于 PCR 的丙酮酸脱羧酶破坏 (Reid 等, Yeast. 2002 Mar 15;19(4):319-28.,Mehdi,K. Yeast 2002 Jun 30;19(9):803)。这种改变减少丙酮酸酯

通过乙醛形成乙醇并间接地增加了乙酰辅酶 A 水平。

细胞内乙酰辅酶 A 水平增加又可使乙酰乙酰辅酶 A 水平增加, 导致细胞内 HMG-CoA 水平增加。为增加 HMG-CoA 水平, 可进一步遗传修饰宿主细胞以提高细胞内乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶活性和/或 HMGS 活性水平, 增加乙酰辅酶 A 转化形成 HMG-CoA, 形成具有高细胞内 HMG-CoA 水平的亲代酵母宿主细胞。可使用任何设计成在酵母中复制和选择并包含在酵母中有活性的启动子、典型地还包含启动子下游的酵母终止子的载体, 在酵母中表达基因。酵母复制子的例子包括 2 μ 或 CEN 复制子如 CEN6/ARSH4; 可选择的标记的例子包括 HIS3、TRP1、LEU2 或 URA3 标记; 酵母启动子的例子包括 CYC1、ADH、TEF 或 GPD 启动子; 酵母终止子的例子是酵母 CYC1 终止子。表达载体的例子参见 Mumberg D, Muller R, Funk M., *Gene*. 1995 Apr 14;156(1):119-22。存在许多酵母载体, 以在不同的遗传背景中进行异源蛋白质的受控制的表达。酵母表达载体的另一个例子是 pYES2 (Invitrogen Corporation)。

通过在选择表达感兴趣基因的质粒的标准生长培养基中、标准条件下分别培养各细胞, 将亲代宿主酵母细胞的生长特征与未修饰宿主酵母细胞进行比较。酵母培养基的例子包括酵母提取物蛋白胨葡萄糖(YPD)、合成葡萄糖基本培养基(SD)、补充的基本培养基(SMM)和合成的完全(SC 或 CM)培养基 (Sambrook 和 Russell (2001) 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: A laboratory manual) . ISBN 0-87969-577-3)。

如果亲代宿主细胞的生长速率显著慢于未修饰宿主酵母细胞的生长速率, HMG-CoA 累积可能是这种毒性/生长抑制的原因。为克服 HMG-CoA 累积诱导的细胞生长抑制, 根据本发明方法遗传修饰亲代酵母细胞。例如, 用编码缺少 N-端调节区域的 HMGR 的核酸取代酿酒酵母染色体上的内源性 HMGR 基因来遗传修饰亲代酵母宿主细胞 (Donald 等, *Appl Environ Microbiol*. 1997 Sep;63(9):3341-4. Polakowski 等, *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998 Jan; 49(1):66-71), 从而增加细胞内 HMG-CoA 活性水平。如果遗传修饰宿主酵母细胞的生长特征与亲代宿主酵母细胞的生长特征的比较显示生长速率显著增加, 则生长速率的增加可归因于细胞内 HMG-CoA 毒性水平的降低。

所以, 与亲代宿主菌株相比, 遗传修饰宿主菌株产生的类异戊二烯或类异

戊二烯前体的总水平将增加。

例如，工程改造亲代和遗传修饰的酿酒酵母以表达紫穗槐二烯合酶。例如，将紫穗槐二烯合酶的基因(天然青蒿素 (*Artemisia annua*) 基因、大肠杆菌密码子优化基因(Martin 等, 2003)或酵母密码子优化基因)克隆入 pYES2 多克隆位点，以使紫穗槐二烯合酶基因在 GAL1 启动子的控制下转录。用重组质粒转化宿主酵母细胞，选择尿嘧啶营养缺陷型。在缺少尿嘧啶和葡萄糖的培养基中生长之后，加入半乳糖诱导紫穗槐二烯合酶的表达。通过引入一个或多个突变，产生紫穗槐二烯合酶的酵母细胞中的 HMG-CoA 细胞内水平增加，如上所述，形成亲代宿主酵母细胞。如上所述遗传修饰亲代宿主酵母细胞，以增加 HMGR 在细胞中的水平。比较亲代宿主酵母细胞和遗传修饰宿主酵母细胞的培养物中紫穗槐二烯的产生；遗传修饰宿主细胞产生的紫穗槐二烯水平大于亲代宿主细胞产生的紫穗槐二烯水平。采用 GC-MS 分析可容易地测定紫穗槐二烯水平，

作为另一个例子，在工程改造以表达甲羟戊酸途径的亲代大肠杆菌细胞中观察 HMG-CoA 的毒性。通过遗传修饰亲代细胞（例如）以增加细胞中 HMGR 的水平，可缓解 HMG-CoA 毒性。该实施例概括描述于上述实施例 1-6。本领域技术人员将理解，根据本说明书，本发明方法可用于任何宿主细胞或任何构建物。

虽然参考具体实施方式描述了本发明，本领域技术人员应理解，不背离本发明的真实精神和范围可进行各种改变和替换等价形式。此外，可进行许多改进以使特定情况、材料、物质组成、方法、方法步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有改进都包括在所附权利要求书的范围内。

<110> J.D. 基斯林(Jay D. Keasling)

J.D. 纽曼(Jack D. Newman)

D.J. 皮特拉(Douglas J. Pitera)

<120>提高类异戊二烯化合物的产生的方法

<130> BERK-034W0

<150> 60/573,492

<151> 2004-05-21

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 8759

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pBAD24MevT 质粒

<400> 1

```
atcgatgc ataatgctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaa cctatgctac 60
tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcggt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
ttcacttttt cttcacaacc ggcaacgaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
aatacccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
ggcatccggg tgggtgctcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctgcgccag 300
cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag 360
caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgtgatg 420
tactgacaag cctcgcttac ccgattatcc atcggtggat ggagcgactc gttaatcgct 480
tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
ccttccccctt gcccgcggtt aatgatttgc ccaaacaggt cgtgaaatg cggctggtgc 600
gcttcatccg ggcgaagaa ccccgatttg gcaaatttg acggccagtt aagccattca 660
tgccagtagg cgcgcggaag aaagtaaac cactgggtgat accattcgcg agcctccgga 720
tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa 780
acaaattctc gtccctgatt ttccaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata 840
taacctttta ttcccagcgg tgggtcgata aaaaaatga gataaccgtt ggctcaatc 900
ggcgtaaacc ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaaccaa ttgtccatat 1020
tgcacagac attgccgta ctgcgtcttt tactggtctt tctcgctaac caaacggta 1080
accccgctta taaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt 1140
aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttga cggegtcaca 1200
```


ctttctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
 tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg tttttttggg ctagcaggag gaattcacca 1320
 tggtagccgg ggaatcctta gagtcgacta ggaggaatat aaaatgaaaa attgtgtcat 1380
 cgtcagtgcg gtacgtactg ctatcggtag ttttaacggt tcactcgcct ccaccagcgc 1440
 catcgacctg gggcgacag taattaaagc cgccattgaa cgtgcaaaaa tcgattcaca 1500
 acacgttgat gaagtgatta tgggtaacgt gttacaagcc gggtggggc aaaatccggc 1560
 gcgtcaggca ctgttaaaaa gcgggctggc agaaacggtg tgcggattca cggtaataa 1620
 agtatgttgt tcgggtctta aaagtgtggc gcttgccgcc caggccattc aggcagggtca 1680
 ggcgagagc attgtggcgg ggggtatgga aaatatgagt ttagccccct acttactcga 1740
 tgcaaaagca cgctctggtt atcgtcttgg agacggacag gtttatgacg taatcctgcg 1800
 cgatggcctg atgtgcgcca cccatggtta tcatatgggg attaccgccg aaaacgtggc 1860
 taaagagtac ggaattaccc gtgaaatgca ggatgaactg gcgtacatt cacagcgtaa 1920
 agcggcagcc gcaattgagt ccggtgcttt tacagccgaa atcgtcccg taaatgttgt 1980
 cactcgaag aaaaccttcg tcttcagta agacgaattc ccgaaagcga attcaacggc 2040
 tgaagcgta ggtgcattgc gcccgccctt cgataaagca ggaacagtca ccgtgggaa 2100
 cgctcttgtt attaacgacg gtgctgccgc tctgtgtatt atggaagaat ctgcggcgct 2160
 ggcagcaggc ctaccccc tggtcgcgat taaaagtatt gccagcgggt gcgtgcccc 2220
 cgcatgtag ggtatggggc cagtacctgc cagcaaaaa gcgttacaac tggcggggct 2280
 gcaactggcg gatattgatc tcattgaggc taatgaagca tttgctgcac agttccttgc 2340
 cgttgggaaa aacctgggct ttgattctga gaaagtgaat gtcaacggcg gggccatgc 2400
 gctcgggcat cctatcggtg ccagtgtgct tcgtattctg gtcacactat tacatgccat 2460
 gcaggcacgc gataaaacgc tggggctggc aacactgtgc attggcggcg gtcagggaat 2520
 tgcgatggg attgaacggg tgaattaagg aggacagcta aatgaaactc tcaactaaac 2580
 tttgttgtg ttgtattaaa ggaagactta ggccgcaaaa gcaacaaca ttacacaata 2640
 caaacttgca aatgactgaa ctaaaaaac aaaagaccgc tgaacaaaa accagacctc 2700
 aaaatgtcgg tattaaagg atccaaattt acatcccaac tcaatgtgtc aaccaatctg 2760
 agctagagaa atttgatggc gtttctcaag gtaaatcac aattggctcg ggccaaacca 2820
 acatgtcttt tgtcaatgac agagaagata tctactgat gtccctaact gttttgtcta 2880
 agttgatcaa gagttacaac atcgacacca acaaaattgg tagattagaa gtcgtactg 2940
 aaactctgat tgacaagtc aagtctgtca agtctgtctt gatgcaattg ttgtgtgaaa 3000
 acactgacgt cgaaggtatt gacacgtta atgcctgtta cgggtgtacc aacgcgttgt 3060
 tcaactcttt gaactggatt gaatctaacg catgggatgg tagagacgcc attgtagttt 3120
 gcggtgatat tgccatctac gataagggtg ccgcaagacc aaccggtgtt gccgtactg 3180
 ttgctatgtg gatcggtcct gatgtccaa ttgtatttga ctctgtaaga gcttcttaca 3240
 tggaacacgc ctacgatttt tacaagccag atttcaccag cgaatatcct tacgtcgatg 3300
 gtcatttttc attaacttgt tacgtcaagg ctcttgatca agtttacaag agttattcca 3360
 agaaggctat ttctaaaggg ttggttagcg atcccgttg ttccgatgct ttgaacgttt 3420
 tgaaatattt cgactacaac gttttccatg ttccaacctg taaattggc acaaaatcat 3480
 acggtagatt actatataac gatttcagag ccaatcctca attgttcca gaagttgacg 3540
 ccgaattagc tactcgcgat tatgacgaat cttaaccga taagaacatt gaaaaactt 3600
 ttgttaatgt tgctaagcca ttccacaaag agagagttgc ccaatcttgc attgttcca 3660
 caaacacagg taacatgtac accgcatctg tttatgccgc ctttgcatt ctattaaact 3720
 atgttgatc tgacgactta caaggcaagc gtgttggttt attttcttac ggttccggtt 3780
 tagctgcac tctatattct tgcaaaattg ttggtgacgt ccaacatatt atcaaggaat 3840
 tagatattac taacaattta gccaaagaa tcaccgaaac tccaaaggat tacgaagctg 3900
 ccatcgaatt gagagaaaat gcccatttga agaagaactt caaacctcaa gtttccattg 3960

agcatttgca aagtgggtgt tactacttga ccaacatcga tgacaaaattt agaagatctt 4020
 acgatgttaa aaaataagga ggattacact atggttttta ccaataaaac agtcattttct 4080
 ggatcgaaag tcaaaagtgt atcatctgcg caatcgagct catcaggacc ttcatcatct 4140
 agtgaggaag atgattcccc cgatattgaa agcttgata agaaaatacg tccttttagaa 4200
 gaattagaag cattattaag tagtggaat acaaaacaat tgaagaacaa agaggtcgct 4260
 gccttggtta ttacaggtaa gttacctttg tacgcttttg agaaaaaatt aggtgatact 4320
 acgagagcgg ttgcggtagc taggaaggct ctttcaattt tggcagaagc tcctgtatta 4380
 gcatctgacg gtttaccata taaaaattat gactacgacc gcgtatttgg cgcttggtgt 4440
 gaaaatgtta taggttacat gcctttgccc gttgggttta taggcccctt gggtatcgat 4500
 ggtacatctt atcatatacc aatggcaact acagagggtt gtttggtagc ttctgccatg 4560
 cgtggctgta aggcaatcaa tgctggcggg ggtgcaacaa ctgttttaac taaggatggt 4620
 atgacaagag gccagtagt ccgtttccca actttgaaa gatctgggtg ctgtaagata 4680
 tggtagact cagaagaggg acaaaacgca attaaaaaag cttttaactc tacatcaaga 4740
 tttgcacgtc tgcaacatat tcaaaactgt ctacgaggag atttactctt catgagattt 4800
 agaacaacta ctggtagcgc aatgggtatg aatatgattt cttaaagggt cgaatactca 4860
 ttaaagcaaa tggtagaaga gtatggctgg gaagatatgg aggttggtctc cgtttctggt 4920
 aactactgta ccgacaaaaa accagctgcc atcaactgga tcgaaggctg tggttaagagt 4980
 gtcgtcgagc aagctactat tcctggtgat gttgtcagaa aagtgttaaa aagtgatgtt 5040
 tccgcatagg ttgagttgaa cattgctaag aatttggttg gatctgcaat ggctgggtct 5100
 gttggtggat ttaacgcaca tgcagctaat ttagtgacag ctgttttctt ggcattagga 5160
 caagatcctg cacaaaatgt tgaaagttcc aactgtataa cattgatgaa agaagtggac 5220
 ggtgatttga gaatttccgt atccatgcc a tccatcgaag taggtacat cggtgggtgt 5280
 actgttctag aaccacaagg tgccatgttg gacttattag gtgtaagagg cccgcatgct 5340
 accgctcctg gtaccaacgc acgtcaatta gcaagaatag ttgcctgtgc cgtcttgga 5400
 ggtgaattat ccttatgtgc tgccctagca gccggccatt tggttcaaag tcatatgacc 5460
 cacaacagga aacctgctga accaacaata cctaacaatt tggacgccac tgatataaat 5520
 cgtttgaaag atgggtccgt cacctgcatt aaatcctaag tcgacctgca ggcatgcaag 5580
 ctggtgtgtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc 5640
 agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct ggccggcagta gcgcgggtgt cccacctgac 5700
 cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcggcgatg gtagtgtggg gtctcccat 5760
 gcgagagtag ggaactgcc a ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc 5820
 ctttcgtttt atctgttgtt tgcgggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg 5880
 agcggatttg aacgttgca agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata 5940
 aactgccagg catcaaatta agcagaaggc catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct 6000
 aaaaactctt ttgtttattt ttctaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat 6060
 aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc 6120
 gtgtcgccct tattcccttt ttgcccgt tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa 6180
 cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac 6240
 tggatctcaa cagcggtgaa atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga 6300
 tgagcacttt taaagtctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtgttgac gccgggcaag 6360
 agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca 6420
 cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgt gccataacca 6480
 tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa 6540
 ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc 6600
 tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa 6660
 cggtgcgcaa actattaact ggcgaaactac ttactctagc ttcccgcaa caattaatag 6720

actggatgga ggccgataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct 6780
 ggtttatigc tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac 6840
 tggggccaga tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa 6900
 ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt 6960
 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttacgcgcc ctgtagcggc 7020
 gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc 7080
 ctagegcccc ctcttttcgc tttcttcct tctttctcg ccacgttcgc cggtttccc 7140
 cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta ggttccgat ttagtgctt acggcacctc 7200
 gaccccaaaa aacttgattt ggtgatggt tcacgtagt ggccatcgcc ctgatagacg 7260
 gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg tttttaata gtggactctt gttccaaact 7320
 tgaacaacac tcaaccctat ctcgggctat tcttttgatt tataagggtt ttgcccatt 7380
 tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa 7440
 atattaacgt ttacaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 7500
 caaaatccct taacgtgagt ttctgtcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 7560
 aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac 7620
 accgctacca gcggtggtt ttttgccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt 7680
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagttagc ctagttagg 7740.
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc 7800
 agtggctgct gccagtggcg ataagtcgt tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 7860
 accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga 7920
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt 7980
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 8040
 cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 8100
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaa 8160
 cgccagcaac gcggccttt tacggttcct ggccctttgc tggcctttg ctcacatgtt 8220
 ctttctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga 8280
 taccgctgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagtgca gtgagcgagg aagcggaaga 8340
 gcgcctgat cggtatttct tcttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcatagggtc 8400
 atggctgcgc ccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc 8460
 ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt 8520
 tcaccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag caaggagatg gcgccaaca gtccccggc 8580
 cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgtc atgagcccga agtggcgagc 8640
 ccgatcttcc ccatcggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaacgcac ctgtggcgcc 8700
 ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatctgc tcatgtttga cagcttacc 8759

<210> 2

<211> 9573

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pBAD33MevT 质粒

<400> 2

atcgtatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac 60
 tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
 ttactttttt cttcacaacc ggcacgggac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
 aatacccgcg agaaatagag ttgatcgtca aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
 ggcacccggg tgggtgctca aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctgcgccag 300
 cttaaagacg taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgga cggcgacaag 360
 caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgtgatg 420
 tactgacaag cctcgcgtac cggattatcc atcgttggat ggagcgactc gttaatcgct 480
 tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
 cttccccctt gcccggcgtt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggctgggtgc 600
 gcttcatccg ggcgaagaa ccccgatttg gcaaatattg acggccagtt aagccattca 660
 tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaac cactgggtgat accattcgcg agcctccgga 720
 tgacgaccgt agtgaatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggctggcaa 780
 acaaattctc gtccctgatt ttccaccacc cctgaccgc gaatggtgag attgagaata 840
 taacctttca tcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggcccaatc 900
 ggcgttaaac ccgccaccag atgggcattt aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
 tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaaccaa ttgtccatat 1020
 tgcatcagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct tctcgctaac caaacggta 1080
 accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt 1140
 aacaaaagt tctataatca cgcgagaaaa gtccacattg attatttgca cggcgtcaca 1200
 ctttgcctat ccatagcatt ttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
 tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagegaatt cgagctcgg 1320
 acccggggat cctctagagt cgactaggag gaatataaaa tgaaaaattg tgtcatcgtc 1380
 agtgcggtac gtactgctat cggtagtttt aacggttcac tcgcttccac cagcgcctac 1440
 gacctggggg cgacagtaat taaagccgcc attgaacgtg caaaaatcga ttcacaacac 1500
 gttgatgaag tgattatggg taacgtgtta caagccgggc tggggcaaaa tccggcgcgt 1560
 caggcactgt taaaaagcgg gctggcagaa acggtgtgcg gattcacggt caataaagta 1620
 tgtggttcgg gtcttaaaag tgtggcgtt gccgcccagg ccattcaggc aggtcaggcg 1680
 cagagcattg tggcgggggg tatggaaaat atgagtttag cccctactt actcgatgca 1740
 aaagcacgct ctggttatcg tcttgagac ggacagggtt atgacgtaat cctgcgcgat 1800
 ggcttgatgt gcgccacca tggttatcat atggggatta ccgccgaaa cgtggctaaa 1860
 gactacggaa ttaccctga aatgcaggat gaactggcgc tacattcaca gcgtaaagcg 1920
 gcagccgcaa ttgagtcgg tgcttttaca gccgaaatcg tcccggtaaa tgttgtcact 1980
 cgaaagaaa ccttcgtctt cagtcaagac gaattccga aagcgaattc aacggtgaa 2040
 gcgttaggtg cattgcgcc ggccttcgat aaagcaggaa cagtcaccgc tgggaacgcg 2100
 tctggtatta acgacggtgc tgcgctctg gtgattatgg aagaatctgc ggcgtggca 2160
 gcaggcctta cccccctggc tcgcattaaa agttatgcca gcggtggcgt gcccccgca 2220
 ttgatgggta tggggccagt acctgccacg caaaaagcgt tacaactggc ggggctgcaa 2280
 ctggcggata ttgatctcat tgaggctaat gaagcatttg ctgcacagtt ccttgccgtt 2340
 gggaaaaacc tgggctttga ttctgagaaa gtgaatgtca acggcggggc catcgcgctc 2400
 gggcactcta tcggtgccag tgggtcctgt attctgttca cactattaca tgccatgcag 2460
 gcacgcgata aaacgctggg gctggcaaca ctgtgcattg gcggcggta gggaattgcg 2520
 atggtgattg aacggttga ttaaggagga cagctaaatg aaactctcaa ctaaaccttg 2580
 ttggtgtggt attaaaggaa gacttaggcc gcaaaagcaa caacaattac acaatacaaa 2640
 cttgcaaatg actgaactaa aaaaacaaaa gaccgctgaa caaaaaacca gacctcaaaa 2700
 tgtcgttatt aaaggtatcc aaatttcat cccaactcaa tgtgtcaacc aatctgagct 2760

agagaaattt gatggcgttt ctcaaggtaa atacacaatt ggtctgggcc aaaccaacat 2820
 gtcttttgtc aatgacagag aagatatcta ctcatgtcc ctaactgttt tgtctaagtt 2880
 gatcaagagt tacaacatcg acaccaacaa aattggtaga ttagaagtcg gtactgaaac 2940
 tctgattgac aagtccaagt ctgtcaagtc tgtcttgatg caattgtttg gtgaaaacac 3000
 tgacgtcgaa ggtattgaca cgcttaatgc ctgttacggt ggtaccaacg cgttgttcaa 3060
 ctctttgaac tggattgaat ctaacgcatg ggatggtaga gacgccattg tagtttgcgg 3120
 tgatattgcc atctacgata agggtgccgc aagaccaacc ggtggtgccg gtactgttgc 3180
 tatgtggatc ggtcctgatg ctccaattgt attgactct gtaagagctt cttacatgga 3240
 acacgcctac gatttttaca agccagattt caccagcgaa tatccttacg tcgatgtgca 3300
 tttttcatta acttgttacg tcaaggctct tgatcaagtt tacaagagtt attccaagaa 3360
 ggctatttct aaagggttgg ttagcgatcc cgtgggttcg gatgcttga acgttttgaa 3420
 atatttcgac tacaacgttt tccatgttcc aacctgtaaa ttggtcaca aatcatacgg 3480
 tagattacta tataacgatt tcagagccaa tctcaattg ttcccagaag ttgacgccga 3540
 attagctact cgcgattatg acgaatcttt aaccgataag aacattgaaa aaacttttgt 3600
 taatgttgct aagccattcc acaaagagag agttgcccaa tctttgattg ttccaacaaa 3660
 cacaggtaac atgtacaccg catctgttta tgccgccttt gcctctctat taaactatgt 3720
 tggatctgac gacttacaag gcaagcgtgt tggtttattt tcttacggtt ccggtttagc 3780
 tgcctctcta tattcttgca aaattgttgg tgacgtccaa catattatca aggaattaga 3840
 tattactaac aaattagcca agagaatcac cgaaactcca aaggattacg aagctgccat 3900
 cgaattgaga gaaaatgccc atttgaagaa gaacttcaaa cctcaaggtt ccattgagca 3960
 ttgcaaagt ggtgtttact acttgaccaa catcgatgac aaatttagaa gatcttacga 4020
 tgttaaaaaa taaggaggat tacactatgg ttttaaccaa taaaacagtc atttctggat 4080
 cgaaagtcaa aagtttatca tctgcgcaat cgagctcctc aggaccttca tcatctagt 4140
 aggaagatga ttcccgcgat attgaaagct tggataagaa aatacgtcct ttagaagaat 4200
 tagaagcatt attaagtagt ggaaatacaa aacaattgaa gaacaaagag gtcgctgcct 4260
 tggttattca cggtaagtta cctttgtacg ctttgagaa aaaattaggt gatactacga 4320
 gagcggttgc ggtacgtagg aaggctcttt caattttggc agaagctcct gtattagcat 4380
 ctgatcggtt accatataaa aattatgact acgaccgcgt atttggcgct tgttgtgaaa 4440
 atgttatagg ttacatgcct ttgcccgttg gtgttatagg ccccttggtt atcgatggt 4500
 catcttatca tataccaatg gcaactacag agggttgttt ggtagcttct gccatgcgtg 4560
 gtgttaaggc aatcaatgct ggcggtggtg caacaactgt tttactaag gatggtatga 4620
 caagaggccc agtagtccgt ttcccaactt tgaaaagatc tgggtccctgt aagatatggt 4680
 tagactcaga agagggacaa aacgcaatta aaaaagcttt taactctaca tcaagatttg 4740
 cacgtctgca acatattcaa acttgtctag caggagattt actcttcatg agatttagaa 4800
 caactactgg tgacgcaatg ggtatgaata tgatttctaa aggtgtcgaa tactcattaa 4860
 agcaaatggt agaagagtat ggctgggaag atatggaggt tgtctccgtt tctggttaact 4920
 actgtaccga caaaaaacca gctgccatca actggatcga aggtcgtggt aagagtgtcg 4980
 tcgcagaagc tactattcct ggtgatgttg tcagaaaagt gttaaaaagt gatgtttccg 5040
 cattggttga gttgaacatt gctaagaatt tggttggatc tgcaatggct ggtctgtttg 5100
 gtggatttaa cgcacatgca gctaatttag tgacagctgt tttcttgga ttaggacaag 5160
 atcctgcaca aaatgttgaa agttccaact gtataacatt gatgaaagaa gtggacggtg 5220
 atttgagaat ttccgtatcc atgccatcca tcgaagtagg taccatcggg ggtggtagctg 5280
 ttctagaacc acaagtgcc atgttggaact tattaggtgt aagaggccc catgctaccg 5340
 ctcttggtac caacgcacgt caattagcaa gaatagttgc ctgtgccgtc ttggcaggtg 5400
 aattatcctt atgtgtgcc ctagcagcgg gccatttggg tcaaagtc atgaccaca 5460
 acaggaaacc tgctgaacca acaaaacct acaatttga cgccactgat ataatcgtt 5520

tgaagatgg gtccgtcacc tgcattaaat cctaagtcga cctgcaggca tgcaagcttg 5580
 gctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa 5640
 gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc ggtgggtccca cctgacccca 5700
 tgccgaactc agaagtgaag cgccgtagcg ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcga 5760
 gagtagggaa ctgccaggca tcaataaaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt 5820
 cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctcttagta ggacaaatcc gccgggagcg 5880
 gatttgaacg ttgcgaagca acggcccggg ggggtggcggg caggacgccc gccataaact 5940
 gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgacggaig gcctttttgc gtttctacaa 6000
 actcttttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc 6060
 ctgataaatg cttaataaat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt 6120
 cgccttatt cccttttttg cggcattttg ccttctgtt ttgtctcacc cagaaacgct 6180
 ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcagca aactattaac tggcgaacta 6240
 ctactctag ctccccggca acaattaata gactggatgg aggcgataa agttgcagga 6300
 ccacttctgc gctcgccct tccggtggc tggttttatg ctgataaatc tggagccggt 6360
 gagcgtgggt ctgcgggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagc ctcctgcatc 6420
 gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct 6480
 gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata 6540
 cttagattg atttacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtgttac 6600
 gcgcagcgtg accgtacac ttgccagcg cctagcgccc gctcctttcg ctttcttccc 6660
 ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc cgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt 6720
 agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt tgggtgatgg 6780
 ttcacgtagt gggccatcg cctgatagac ggtttttcgc ccttgacgt tggagtccac 6840
 gttctttaat agtggactct tgttccaaac ttgaacaaca ctcaacccta tctcgggcta 6900
 ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttccgcctat tggttaaaa atgagctgat 6960
 ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg tttaaatat aaaaggatct 7020
 aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc 7080
 actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc 7140
 gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttcggg 7200
 atcaagagct accaactctt ttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 7260
 atactgtcct tctagttag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 7320
 ctacatacct cgtctgcta atcctgttac cagtggggca ttgagaagc acacggtcac 7380
 actgcttccg gtagtcaata aaccggtaaa ccagcaatag acataagcgg ctatttaacg 7440
 accctgccct gaaccgacga ccgggtcgaa tttgctttcg aatttctgcc attcatccgc 7500
 ttattatcac ttattcagcg gtagcaccag gcgtttaagg gcaccaataa ctgccttaaa 7560
 aaaattacgc cccgccctgc cactcatcgc agtactgttg taattcatta agcattctgc 7620
 cgacatggaa gccatcacag acggcatgat gaacctgaat cgccagcggc atcagcacct 7680
 tgtcgccttg cgtataatat ttgccatgg tgaaaacggg ggcgaagaag ttgtccatat 7740
 tggccacgtt taaatcaaaa ctggtgaaac tcaccagggt attggtgag acgaaaaaca 7800
 tattctcaat aaaccttta gggaaatagg ccaggttttc accgtaacac gccacatctt 7860
 gcgaatatat gtgtagaac tgccggaaat cgtcgtggtt ttactccag agcgatgaaa 7920
 acgtttcagt ttgctcatgg aaaacgggtg aacaagggtg aacactatcc catatcacca 7980
 gtcaccgctc tttcattgcc atacggaatt ccggtatgag attcatcagg cgggcaagaa 8040
 tgtgaataaa ggccgataa aacttgtgct tatttttctt tacggtcttt aaaaaggccg 8100
 taatatccag ctgaacggtc tggttatagg tacattgagc aactgactga aatgcctcaa 8160
 aatgttcttt acgatgccat tgggatatat caacgggtgt atatccagtg atttttttct 8220
 ccatttttagc ttcttagct cctgaaaaac tcgataactc aaaaaatag cccggtagt 8280

```

atcttatttc attatgggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc 8340
gccaaaagtt ggcccagggtc ttcccgggtat caacagggtac accaggattt atttattctg 8400
cgaagtgate ttccgtcaca ggtatttatt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcc 8460
acttactgat ttagtgtatg atgggtgttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc 8520
agctgtccct cctgttcagc tactgacggg gtgggtgcgt acggcaaaag caccgccgga 8580
catcagcgct agcggagtgt atactggctt actatgttgg cactgatgag ggtgtcagtg 8640
aagtgtctca tgtggcagga gaaaaaaggc tgcaccgggt cgtcagcaga atatgtgata 8700
caggatatat tccgttcct cgtcactga ctgcctacgc tcggtcgttc gactgcggcg 8760
agcggaaatg gcttacgaac ggggcggaga tttcctggaa gatgccagga agatacttaa 8820
cagggaagtg agaggccgc ggcaaaaggc ttttccata ggctccgcc ccctgacaag 8880
catcacgaaa tctgacgctc aaatcagtgg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac 8940
caggcgtttc cccctggcgg ctccctcgtg cgctctctg ttcctgcctt teggtttacc 9000
ggtgtcattc cgctgttatg gccgcgtttg tctcattcca cgctgacac tcagttccgg 9060
gtaggcagtt cgctccaagc tggactgtat gcacgaacc cccgttcagt ccgaccgctg 9120
cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggaa agacatgcaa aagcaccact 9180
ggcagcagcc actggtaatt gatttagagg agttagtctt gaagtcatgc gccggttaag 9240
gctaaactga aaggacaagt ttgtgtgact gcgtcctcc aagccagta cctcggttca 9300
aagagttggt agctcagaga accttcgaaa aaccgccctg caaggcgggt tttcgtttt 9360
cagagcaaga gattacgctc agacaaaac gatctcaaga agatcatctt attaatcaga 9420
taaaatattt gctcatgagc ccgaagtggc gagcccgatc ttccccatcg gtgatgtcgg 9480
cgatataggc gccagcaacc gcacctgtgg cgccgggtgat gccggccacg atcggtccgg 9540
cgtagaggat ctgctcatgt ttgacagctt atc 9573

```

<210> 3

<211> 8593

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pMevT 质粒

<400> 3

```

atcgtatgc atgcaccaata cgcaaacgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat 60
gcagctggca cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg 120
tgagttagct cactcattag gcacccagg ctttacctt tatgcttccg gctcgtatgt 180
tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg 240
ccaagcgcgc aattaaccct cactaaaggg aacaaaagct gggtagcggg cccccctcg 300
aggtcgacgg tatcgataag ctgtatatcg aattcctgca gcccggggat cctctagagt 360
cgactaggag gaatataaaa tgaaaaattg tgtcatcgtc agtgcggtag gtactgctat 420
cggtagtttt aacggttcac tcgtttccac cagcgccatc gacctggggg cgacagtaat 480
taaaagccgc attgaacgtg caaaaatcga ttcacaacac gttgatgaag tgattatggg 540
taacgtgtta caagccgggc tggggcaaaa tccggcgcgt caggcactgt taaaaagcgg 600
gctggcagaa acggtgtgct gattcacggt caataaagta tgtggttcgg gtcttaaaag 660
tgtggcgctt gccgccagc ccattcagc aggtcaggcg cagagcattg tggcgggggg 720

```

tatggaaaat atgagtttag cccctactt actcgatgca aaagcacgct ctggttatcg 780
 tcttgagac ggacaggitt atgacgtaat cctgcgcat ggcctgatgt gcgccacca 840
 tggttatcat atggggatta ccgccgaaaa cgtggctaaa gactacggaa ttacccgtga 900
 aatgcaggat gaactggcgc tacattcaca gcgtaaagcg gcagccgcaa ttgagtcgg 960
 tgcttttaca gccgaaatcg tcccggtaaa tgtgtcact cgaaagaaaa cttcgtctt 1020
 cagtcaagac gaattcccga aagcgaattc aacggctgaa gcgttaggtg cattgcgcc 1080
 ggccttcgat aaagcaggaa cagtcaccgc tgggaacgcg tctggtatta acgacggtgc 1140
 tgccgctctg gtgattatgg aagaatctgc ggcgctggca gcagccctta cccccctggc 1200
 tcgcattaaa agttatgcca gcgggtggcg gcccccgca ttgatgggta tggggccagt 1260
 acctgccacg caaaaagcgt tacaactggc ggggctgcaa ctggcggata ttgatctcat 1320
 tgaggctaata gaagcatttg ctgcacagtt ccttgccgtt gggaaaaacc tgggcttga 1380
 ttctgagaaa gtgaatgtca acggcggggc catcgcgctc gggcatccta tcggtgccag 1440
 tgggtgctcg attctgtca cactattaca tgccatgcag gcacgcgata aaacgctggg 1500
 gctggcaaca ctgtgcattg gcggcgggtca gggaattgag atggtgattg aacggttgaa 1560
 ttaaggagga cagctaaatg aaactctcaa ctaaaccttg ttggtgtggt attaaaggaa 1620
 gacttaggcc gcaaaagcaa caacaattac acaatacaaa cttgcaaatg actgaactaa 1680
 aaaaacaaaa gaccgctgaa caaaaaacca gacctcaaaa tgcggtatt aaaggtatcc 1740
 aaatttcat cccaactcaa tgtgtcaacc aatctgagct agagaaattt gatggcggtt 1800
 ctcaaggtaa atacacaatt ggtctggggc aaaccaacat gtcttttgc aatgacagag 1860
 aagatatcta ctcgatgccc ctaactgttt tgcctaagtt gatcaagagt tacaacatcg 1920
 acaccaacaa aattggtaga ttagaagtcg gtactgaaac tctgattgac aagtccaagt 1980
 ctgtcaagtc tgccttgatg caattgtttg gtgaaaacac tgacgtcgaa ggtattgaca 2040
 cgcttaatgc ctgttacggt ggtaccaacg cgttgttcaa ctctttgaac tggattgaat 2100
 ctaacgcatg ggatggtaga gacgccattg tagtttgcgg tgatattgcc atctacgata 2160
 aggggtgccg aagaccaacc ggtggtgccg gtactgttgc tatgtggatc ggtcctgatg 2220
 ctccaattgt atttgactct gtaagagctt cttacatgga acacgcctac gatttttaca 2280
 agccagattt caccagcgaa tatccttacg tcgatggtca ttttctatta acttgttacg 2340
 tcaaggctct tgatcaagtt tacaagagtt attccaagaa ggctatttct aaagggttgg 2400
 ttagcgatcc cgtgtgttcg gatgctttga acgttttgaa atatttcgac tacaacgttt 2460
 tccatgttcc aacctgtaaa ttggtcacaa aatcatacgg tagattacta tataacgatt 2520
 tcagagccaa tcctcaattg ttcccagaag ttgacgccga attagctact cgcgattatg 2580
 acgaatcttt aaccgataag aacattgaaa aaacttttgt taatgttgct aagccattcc 2640
 acaaagagag agttgcccaa tctttgattg ttccaacaaa cacaggtaac atgtacaccg 2700
 catctgttta tgccgccttt gcactcttat taaactatgt tggatctgac gacttacaag 2760
 gcaagcgtgt tggtttattt tcttacggtt ccggtttage tgcactctta tattcttga 2820
 aaattgttgg tgacgtccaa catattatca aggaattaga tattactaac aaattagcca 2880
 agagaatcac cgaaactcca aaggattacg aagctgccat cgaattgaga gaaaatgcc 2940
 atttgaagaa gaacttcaaa cctcaagggt ccattgagca tttgcaaagt ggtgtttact 3000
 acttgacca catcgatgac aaatttagaa gatcttacga tgttaaaaaa taaggaggat 3060
 tacactatgg ttttaaccaa taaaacagtc atttctggat cgaaagtcaa aagtttatca 3120
 tctgcgcaat cgagctcatc aggaccttca tcatctagt aggaagatga ttcccgcat 3180
 attgaaagct tggataagaa aatagtcct ttagaagaat tagaagcatt attagtagt 3240
 ggaaatacaa acaattgaa gaacaaagag gtcgctgcct tggttattca cgtaagtta 3300
 cttttgtacg ctttgagaa aaaattaggt gatactacga gagcggttgc ggtacgtagg 3360
 aaggctcttt caattttgga agaagctcct gtattagcat ctgacgttt accatataaa 3420
 aattatgact acgaccgct atttggcgt tgttgtgaaa atgttatagg ttacatgcct 3480

ttgcccgttg ggttatagg ccccttggtt atcgatggtt catcttatca tataccaatg 3540
 gcaactacag aggggttgtt ggtagcttct gccatgcgtg gctgtaaggc aatcaatgct 3600
 ggcggtggtg caacaactgt tttactaag gatggtatga caagaggccc agtagtccgt 3660
 ttcccaactt tgaaaagatc tgggtgctgt aagataatgt tagactcaga agagggacaa 3720
 aacgcaatta aaaaagcttt taactctaca tcaagatttg cacgtctgca acatattcaa 3780
 acttgtctag caggagattt actcttcacg agatttagaa caactactgg tgacgcaatg 3840
 ggtatgaata tgatttctaa aggtgtcgaa tactcattaa agcaaattgt agaagagtat 3900
 ggctgggaag atatggaggt tgtctccgtt tctggtaact actgtaccga caaaaaacca 3960
 gctgccatca actggatcga aggtcgttgt aagagtgtcg tcgcagaagg tactatttct 4020
 ggtgatgttg tcagaaaagt gttaaaaagt gatgtttccg cattgggtga gttgaacatt 4080
 gctaagaatt tggttggatc tgcaatggct gggctctgtt gtggatttaa cgcacatgca 4140
 gctaatttag tgacagctgt tttcttgcca ttaggacaag atcctgcaca aaatgttgaa 4200
 agttccaact gtataacatt gatgaaagaa gtggacgggt atttgagaat ticcgtatcc 4260
 atgccatcca tcgaagtagg taccatcggg ggtggtactg ttctagaacc acaaggtgcc 4320
 atgttgactt tattaggtgt aagaggcccg catgtaccg ctctgtgac caacgcacgt 4380
 caattagcaa gaatagtgc ctgtgccgtc ttggcaggtg aattatcctt atgtgctgcc 4440
 ctagcagccg gccatttgtt tcaaagtcac atgaccaca acaggaaacc tgctgaacca 4500
 acaaaacctt acaatttga cgccactgat ataaatcgtt tgaaagatgg gtccgtcacc 4560
 tgcattaaat cctaagtcga cctgcaggca tgcaagcttg gctgttttgg cggatgagag 4620
 aagattttca gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat 4680
 ttgcctggcg gcagtagcgc ggttggtccca cctgaccca tgccgaactc agaagtgaat 4740
 cgccgtagcg ccgatggtg tgtgggtctt ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca 4800
 tcaataaaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc 4860
 ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca 4920
 acggcccggg ggggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca 4980
 gaaggccatc ctgacgatg gcccttttgc gtttctacaa actcttttgt ttatttttct 5040
 aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 5100
 attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt cccttttttg 5160
 cggcattttg ccttctgtt tttgtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5220
 aagatcagtt ggggtgcagca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccgca 5280
 acaattaata gactggatg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gtcggccct 5340
 tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat 5400
 cattgcagca ctggggccag atggttaagc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg 5460
 gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat 5520
 taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttacgcgc 5580
 cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgtacac 5640
 ttgccagcgc cctagcggc gtccttttcg ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg 5700
 ccggttttcc ccgtcaagct ctaaactggg ggtcccttt agggttccga tttagtgtt 5760
 tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt tgggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc 5820
 cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 5880
 tgttccaaac ttgaacaaca ctcaacccta tctcgggcta ttcttttgat ttataaggga 5940
 ttttgccgat ttgcgcctat tgggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaa tttaacgcga 6000
 attttaacaa aatattaacg tttaaatat aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 6060
 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 6120
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaactct ctgcttgcaa 6180
 acaaaaaaac caccgtacc agcgggtggt tgtttgccg atcaagagct accaactctt 6240

```

tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 6300
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 6360
atcctgttac cagtggggca ttgagaagc acacggtcac actgcttcg gtagtcaata 6420
aaccggtaaa ccagcaatag acataagcgg ctatttaacg accctgccct gaaccgacga 6480
ccgggtcgaa ttgcttttcg aatttctgcc attcateccg ttattatcac ttattcaggc 6540
gtagcaccag gcgtttaagg gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc cccgccctgc 6600
cactcatcgc agtactgttg taattcatta agcatttctgc cgacatggaa gccatcacag 6660
acggcatgat gaacctgaat cgccagcggc atcagcacct tgcgccttg cgtataatat 6720
ttgcccatgg tgaaaacggg ggcaagaag ttgtccatat tggccacgtt taaatcaaaa 6780
ctggtgaaac tcaccaggg attggctgag acgaaaaaca tttctcaat aaaccttta 6840
gggaaatagg ccaggttttc accgtaacac gccacatctt gcgaatatat gtgtagaaac 6900
tgccggaat cgctcgtgta ttcactccag agcgatgaaa acgtttcagt ttgctcatgg 6960
aaaacgggtg aacaagggtg aacactatcc catacacca gtcaccgctc tttcattgcc 7020
atacgaatt ccggatgagc attcatcagg cgggcaagaa tgtgaataaa ggccggataa 7080
aacttgtctt tatttttctt tacggtcttt aaaaaggccg taatatccag ctgaacggtc 7140
tggttatagg tacattgagc aactgactga aatgcctcaa aatgttcttt acgatgccat 7200
tggtatatat caacggtggt atatccagtg attttttctt ccattttagc ttccttagct 7260
cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatac cccggtatg atcttatttc attatggtga 7320
aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcatttgc gccaaaagtt ggcccagggc 7380
ttcccgtgat caacagggac accaggattt atttattctg cgaagtgatc ttccgtcaca 7440
ggtatttatt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcca acttactgat ttagtgtatg 7500
atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agctgtccct cctgttcagc 7560
tactgacggg gtggtgcgta acggcaaaag caccgccgga catcagcgct agcggagtgt 7620
atactggctt actatgttgg cactgatgag ggtgtcagt aagtgttca tgtggcagga 7680
gaaaaaaggc tgcaccgtg cgtcagcaga atatgtgata caggatatat tccgttcct 7740
cgctcactga ctgcctacgc tcggtcgttc gactgcggcg agcggaaatg gcttacgaac 7800
ggggcggaga tttcctggaa gatgccagga agatacttaa cagggaagt agagggccgc 7860
ggcaaagccg tttttccata ggctccgcc cctgacaag catcacgaaa tctgacgctc 7920
aaatcagtgg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggcgg 7980
ctccctcgtg cgctcctcgt ttcctgcctt tcggtttacc ggtgtcattc cgctgttatg 8040
gccgcgttg tctcattcca cgctgacac tcagttccgg gtaggcagtt cgctccaagc 8100
tggaactgtat gcacgaaccc cccgttcagt ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 8160
gtcttgagtc caaccgggaa agacatgcaa aagcaccact ggcagcagcc actggtaatt 8220
gatttagagg agttagtctt gaagtcatgc gccggttaag gctaaactga aaggacaagt 8280
tttggtgact gcgcctctcc aagccagtta cctcggttca aagagttggt agctcagaga 8340
accttcgaaa aaccgccctg caaggcgggt ttttcgtttt cagagcaaga gattacgcgc 8400
agacaaaac gatcicaaga agatcatctt attaatacaga taaaatattt gctcatgagc 8460
ccgaagtggc gagcccgatc ttcccacatg gtgatgtcgg cgatataggc gccagcaacc 8520
gcacctgttg cgccggtgat gccggccacg atgcgtccgg cgtagaggat ctgctcatgt 8580
ttgacagctt atc 8593

```

<210> 4

<211> 10633

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pMBIS 质粒

<400> 4

```

accttcggga ggcctgaag cccgttctgg acgccctggg gccgttgaat cgggatatgc 60
aggccaaggc cgcgcgcatc atcaaggccg tgggcgaaaa gctgctgacg gaacagcggg 120
aagtcacgcg ccagaaacag gccagcgccc agcaggaacg cgggcgcgca catttcccc 180
aaaagtgcc cctgacgtct aagaaccat tattatcatg acattaacct ataaaaatag 240
gcgtatcacg aggcccttc gtctcaaga attctcatgt ttgacagctt atcatcgata 300
agctttaatg cggtagttaa tcacagttaa attgctaacg cagtcaggca cgtgtatga 360
aatctaaca tgcgtctcgc gtatcctcgc gcaccgtcac cctggatgct gtaggcatag 420
gcttggttat gccggtactg ccgggcctct tgcgggatat cgtccattcc gacagcatcg 480
ccagtcacta tggcgtgctg ctagcgctat atgcgttgat gcaatttcta tgcgcacccg 540
ttctcggagc actgtccgac cgttttgccc gccgccagc cctgctcgtc tcgctacttg 600
gagccactat cgactacgcg atcatggcga ccacaccgt cctgtggatc ctctacgccg 660
gacgcatcgt ggccggcatc accggcgcca cagggtcggg tgctggcgcc tatatcgccg 720
acatcaccga tggggaagat cgggctcgcc acttcgggct catgagcgct tgtttcgccg 780
tgggtatggt ggcaggcccc gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc ttgcatgcac 840
cattccttgc ggccggcggt ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc ttccctaatgc 900
aggagtgcga taaggagag cgctcgaccga tgcccttgag agccttcaac ccagtcagct 960
ccttcgggtg ggccgggggc atgactatcg tcgccgcaact tatgactgtc ttctttatca 1020
tgcaactcgt aggacaggtg ccggcagcgc tctgggtcat ttccggcgag gaccgctttc 1080
gctggagcgc gacgatgac gccctgtcgc ttgcgttatt cggaatcttg cacgccctcg 1140
ctcaagcctt cgtcactggt cccgccacca aacgtttcgg cgagaagcag gccattatcg 1200
ccggcatggc ggccgacgcg ctgggctacg tcttgctggc gttcgcgacg cgaggctgga 1260
tggccttccc cattatgatt ctctcgcctt ccggcgccat cgggatgccc gcgttgacgg 1320
ccatgctgtc caggcaggtg gatgacgacc atcagggaca gcttcaagga tcgctcgcgg 1380
ctcttaccag cctaacttcg atcactggac cgctgatcgt cacggcgatt tatgccgcct 1440
cggcgagcac atggaacggg ttggcatgga ttgtaggcgc cgccctatac ctgtgtctgc 1500
tccccgcgtt gcgtcgcggt gcatggagcc gggccacctc gacctgaatg gaagccggcg 1560
gcacctcgtc aacggattca cactccaag aattggagcc aatcaattct tgcggagaac 1620
tgtgaatgcg caaatgcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca 1680
ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccca ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat 1740
taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggetcg 1800
tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaacagct atgacatga 1860
ttacgccaa cgcgcaatta accctcacta aagggaacaa aagctgggta ccgggcccc 1920
cctcgaggtc gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagtagg aggaattaac 1980
catgtcatta ccgtttctaa ctctgcacc gggaaagggtt attatttttg gtgaacactc 2040
tgctgtgtac aacaagcctg ccgtcgtcgc tagtgtgtct gcgttgagaa cctacctgct 2100
aataagcgag tcatctgcac cagatactat tgaattggac ttcccgaca ttagctttaa 2160
tcataagtgg tccatcaatg atttcaatgc catcacgag gatcaagtaa actcccaaaa 2220
attggccaag gctcaacaag ccaccgatgg ctgtctcag gaactcgta gtcttttga 2280
tccgttgtta gctcaactat ccgaatcctt cactaccat gcagcgtttt gtttctgtga 2340
tatgtttgtt tgcctatgcc cccatgccaa gaatattaag ttttctttaa agtctacttt 2400

```

```

accatcggt gctgggttgg gctcaagcgc ctctatttct gtatcactgg ccttagctat 2460
ggcctacttg ggggggttaa taggatctaa tgacttggaa aagctgtcag aaaacgataa 2520
gcatatagtg aatcaatggg ccttcatagg tgaaaagtgt attcacggta ccccttcagg 2580
aatagataac gctgtggcca cttatggtaa tgccctgcta ttgaaaaag actcacataa 2640
tggaacaata aacacaaaca attttaagtt cttagatgat ttcccagcca ttccaatgat 2700
cctaacctat actagaattc caaggtctac aaaagatctt gttgctcgcg ttctgtgttt 2760
ggtcaccgag aaatttcttg aagtattgaa gccaatctta gatgccatgg gtgaatgtgc 2820
cctacaaggc ttagagatca tgactaagtt aagtaaatgt aaaggcaccg atgacgaggc 2880
ttagaaact aataatgaac tgtatgaaca actattggaa ttgataagaa taaatcatgg 2940
actgcttgtc tcaatcggtg ttctcatccc tggattagaa cttattaaaa atctgagcga 3000
tgatttgaga attggtccca caaaacttac cgggtgctgg ggccggcggtt gctctttgac 3060
tttgttacga agagacatta ctcaagagca aattgacagc ttcaaaaaga aattgcaaga 3120
tgattttagt tacgagacat ttgaaacaga cttgggtggg actggctgct gtttgtaaag 3180
cgcaaaaaat ttgaataaag atcttaaaat caaatcccta glattccaat tatttgaaaa 3240
taaaactacc acaaagcaac aaattgacga tctattatig ccaggaaaca cgaatttacc 3300
atggacttca taggaggcag atcaaatgtc agagttgaga gccttcagtg ccccaggga 3360
agcgttacta gctgggtgat atttagtttt agatacaaaa tatgaagcat ttgtagtcgg 3420
attatcgga agaatgcag ctgtagccca tccttacggt tcattgcaag ggtctgataa 3480
gtttgaagtg cgtgtgaaaa gtaacaatt taaagatggg gagtggctgt accatataag 3540
tcctaaaagt ggcttcattc ctgtttcgat aggcggatct aagaaccctt tcattgaaaa 3600
agttatcgct aacgtattta gctacttta acctaacatg gacgactact gcaatagaaa 3660
cttgttcggt attgatatit tctctgatga tgcctaccat tctcaggagg atagcgttac 3720
cgaacatcgt ggcaacagaa gattgagttt tcattcgcac agaattgaag aagttcccaa 3780
aacagggtcg ggctcctcgg caggtttagt cacagtttta actacagctt tggcctcctt 3840
tttgatatcg gacctggaat ataattgata caaatataga gaagttattc ataatttagc 3900
acaagttgct cattgtcaag ctacaggtaa aattggaagc gggtttgatg tagcggcggc 3960
agcatatgga tctatcagat atagaagatt cccacccgca ttaatctcta atttgccaga 4020
tattggaagt gctacttacg gcagtaaact ggcgcatctg gttagaag aagactggaa 4080
tattacgatt aaaagtaacc atttaccttc gggattaaact ttatggatgg gcgatattaa 4140
gaatggttca gaaacagtaa aactggtcca gaaggtaaaa aattggtatg attcgcatat 4200
gccagaaagc ttgaaaatat atacagaact cgatcatgca aattctagat ttatggatgg 4260
actatctaaa ctagatcgct tacacgagac tcatgacgat tacagcgatc agatatttga 4320
gtctcttgag aggaatgact gtacctgtca aaagtatcct gaaatcacag aagttagaga 4380
tgcatgtgcc acaattagac gttcctttag aaaaataact aaagaatctg gtgccgatat 4440
cgaacctccc gtacaaacta gcttattgga tgattgccag acctaaaag gatttcttac 4500
ttgcttaata cctggtgctg gtggttatga cgccattgca gtgattacta agcaagatgt 4560
tgatcttagg gctcaaaccc ctaatgacaa aagattttct aagggttcaat ggctggatgt 4620
aactcaggct gactgggggtg ttaggaaaga aaaagatccg gaaacttata ttgataaata 4680
ggaggttaata ctatgaccg ttacacagc atccgttacc gcacccgtca acatcgcaac 4740
ccttaagtat tgggggaaaa gggacacgaa gttgaatctg cccaccaatt cgtccatatc 4800
agtacttta tcgcaagatg acctcagaac gttgacctct gcggctactg cacctgagtt 4860
tgaacgcgac actttgtggt taaatggaga accacacagc atcgacaatg aaagaactca 4920
aaattgtctg cgcgacctac gccaatlaag aaaggaaatg gaatcgaagg acgcctcatt 4980
gcccacatta tctcaatgga aactccacat tgtctccgaa aataactttc ctacagcagc 5040
tggttttagct tcctccgctg ctggctttgc tgcattggtc tctgcaattg ctaagttata 5100
ccaattacca cagtcaactt cagaaatata tagaatagca agaaaggggt ctggttcagc 5160

```

ttgtagatcg ttgtttggcg gatactgggc ctgggaaatg ggaaaagctg aagatggta 5220
 tgattccatg gcagtacaaa tcgcagacag ctctgactgg cctcagatga aagcttgtgt 5280
 cctagtgtgc agcgatatta aaaaggatgt gagttccact cagggtatgc aattgaccgt 5340
 ggcaacctcc gaactattta aagaaagaat tgaacatgtc gtaccaaaga gatttgaagt 5400
 catgcgtaaa gccattgttg aaaaagattt cgccaccttt gcaaaggaaa caatgatgga 5460
 ttccaactct ttccatgcca catgtttgga ctctttccct ccaatattct acatgaatga 5520
 cacttccaag cgtatcatca gttagtgcca caccattaat cagttttacg gagaaacaat 5580
 cgttgcatag acgtttgatg caggccaaa tgctgtgttg tactacttag ctgaaaatga 5640
 gtcgaaactc ttgcatatta tctataaatt gtttggctct gtctctggat gggacaagaa 5700
 atttactact gagcagcttg aggctttcaa ccatcaattt gaatcatcta actttactgc 5760
 acgtgaattg gatcttgagt tgcaaaagga tgttgccaga gtgattttaa ctcaagtcgg 5820
 ttcaggccca caagaaacaa acgaatcttt gattgacgca aagactggtc taccaaagga 5880
 ataactgcag cccgggagga ggattactat atgcaaacgg aacacgtcat ttatttgaat 5940
 gcacagggag ttcccacggg tacgctggaa aagtatgccg cacacacggc agacaccgcg 6000
 ttacatctcg cgttctccag ttggctgttt aatgccaaag gacaattatt agttaccgcg 6060
 cgcgactga gcaaaaaagc atggcctggc gtgtggacta actcggtttg tgggcaccca 6120
 caactgggag aaagcaacga agacgcagt atccgccgtt gccgttatga gcttggcgtg 6180
 gaaattacgc ctctgaatc tatctatcct gactttcgct acccgccac cgatccgagt 6240
 ggcatgttg aaaatgaagt gtgtccgta ttgccgcac gcaccactag tgcgttacag 6300
 atcaatgatg atgaagtgat ggattatcaa tgggttgatt tagcagatgt attacacggt 6360
 atigatgcca cgccgtgggc gttcagtcg tggatggta tgcaggcgac aaatcgcgaa 6420
 gccagaaaac gattatctgc atttaccag cttaaataac ccgggggac cactagtctt 6480
 agagcgccg ccaccgcgga ggaggaatga gtaatggact ttccgcagca actcgaagcc 6540
 tgcgttaagc aggccaacca ggcgctgagc cgttttatcg cccactgcc ctttcagaac 6600
 actccgtgg tcgaaaccat gcagtatggc gcattattag gtgtaagcg cctgcgacct 6660
 ttcttggtt atgccaccg tcatatgttc ggcgttagca caaacacgt ggacgcacc 6720
 gctgccgccc ttgagtgtat ccacgcttac tcattaattc atgatgatt accggcaatg 6780
 gatgatgacg atctgcctg cgttttgcca acctgccatg tgaagtttg cgaagcaaac 6840
 gcgattctcg ctggcgacgc tttaacaacg ctggcgttct cgattttaag cgatgccgat 6900
 atgccggaag tgcggaccg cgacagaatt tcgatgatt ctgaactggc gagcgccagt 6960
 ggtattgccg gaatgtcgg tggtcaggca ttagatttag acgcggaagg caaacacgta 7020
 cctctggacg cgcttgagcg tattcatcgt cataaaaccg gcgcattgat tcgcgccgc 7080
 gttcgcctt gtgcattaag cgccggagat aaaggacgct gtgctctgcc ggtactcgac 7140
 aagtatgcag agagcatcgg ccttgccctc caggttcagg atgacatcct ggatgtggtg 7200
 ggagatactg caacgttggg aaaacgccag ggtgccgacc agcaacttgg taaaagtacc 7260
 taccctgcac ttctgggtct tgagcaagcc cgggaagaaag cccgggatct gatcgacgat 7320
 gcccgtcagt cgctgaaaca actggctgaa cagtcactcg atacctcggc actggaagcg 7380
 ctacgggact acatcatcca gcgtaataaa taagagctcc aattcgccct atagtgaagc 7440
 gtattacgcg cgctactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt 7500
 taccgaactt aatgccttg cagcacatcc ccttttcgcc agctggcgta atagcgaaga 7560
 ggcgcgacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggaaattgta 7620
 agcgtaata ttttgttaaa attcgcgtta aattttgtt aaatcagctc atttttaac 7680
 caataggccg actcgatga gtggcagggc ggggcgtaat tttttaagg cagttattgg 7740
 tgcccttaaa cgcttggtgc tacgcctgaa taagtataa taagcggatg aatggcagaa 7800
 attcgaaagc aaattcgacc cggctcgtcg ttccaggcag ggtcgttaaa tagccgctta 7860
 tgtctatigc tggtttaccg gtttatigac taccggaagc agtgtgaccg tgtgctctc 7920

```

aaatgcctga ggccagtttg ctcaggtctt ccccgtagg gtaataattg acgatatgat 7980
catttattct gcctcccaga gcctgataaa aacgggtgaat ccgttagcga ggtgccgccc 8040
gcttccattc aggtcagagg ggcccggctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag 8100
acaaggataa gggcggcgag gcggctacag ccgatagtct ggaacagcgc acttacgggt 8160
tgctgcgcaa cccaagtgtt accggcgccg cagcgtgacc cgtgtcggcg gctccaacgg 8220
ctcgccatcg tccagaaaaa acgggtcatc ggcatcggc aggcgtgtct gcccgcgccg 8280
ttccatttcc tccgtttcgg tcaaggctgg caggtctggt tccatgcccg gaatgccggg 8340
ctggctgggc ggctcctcgc cggggccggt cggtagttgc tgctcgcccg gatacagggt 8400
cgggatgcgg cgcaggctgc catgccccaa cagcgattcg tcctggctgt cgtgatcaac 8460
caccacggcg gcactgaaca ccgacaggcg caactggctg cgggctggc cccacgccac 8520
gcggtcattg accacgtagg ccgacacggt gccggggccc ttgagcttca cgacggagat 8580
ccagcgtcgc gccaccaagt ccttgactgc gtattggacc gtccgcaaag aacgtccgat 8640
gagcttggaa agtgtcttct ggctgaccac caccgcttc tgggtggcca tctgcgccac 8700
gaggtgatgc agcagcattg ccgccgtggg ttctctcga ataagcccgg cccacgcctc 8760
atgcgctttg cgttccgttt gcaccagtg accgggcttg ttcttgctt gaatgccgat 8820
ttctctggac tgcgtggcca tgettattc catgcggtag ggtgccgcac ggttgcggca 8880
ccatgcgcaa tcagctgcaa cttttcggca gcgcgacaac aattatgctg tgcgtaaaag 8940
tggcagtcga ttacagattt tctttaacct acgcaatgag ctattgcggg ggggtgccga 9000
atgagctgtt gcgtaccccc cttttttaag ttgttgattt ttaagtcttt cgcatttcgc 9060
cctatatcta gttcttttgt gcccaaagaa gggcacccct gcgggggttc cccacgcctt 9120
cggcgccggt cccctccgg caaaaagtgg cccctccggg gcttgttgat cgactgcgcg 9180
gccttcggcc ttgcccgaag tggcgtgcc cccttggaac ccccgcactc gccgccgtga 9240
ggctcggggg gcaggcgggc gggcttcgcc ttcgactgcc cccactcgca taggcttggg 9300
tcgttccagg cgcgtcaagg ccaagccgct gcgcggctgc tgcgcgagcc ttgaccgcc 9360
ttccacttgg tgtccaaccg gcaagcgaag cgcgcaggcc gcaggccgga ggcttttccc 9420
cagagaaaaa taataaaatt gatggggcaa ggccgcaggc cgcgcagttg gagccgttgg 9480
glatgtgttc gaaggctggg tagccggttg gcaatccctg tggtaagct cgtgggcagg 9540
cgcagcctgt ccatcagctt gtccagcagg gttgtccacg ggccgagcga agcagaccag 9600
ccggtggccg ctgcggcca tcgtccacat atccacgggc tggcaaggga gcgcagcgac 9660
cgcgcagggc gaagcccgga gagcaagccc gtagggcgcc gcagccgccg taggcggtca 9720
cgactttgcg aagcaaagtc tagtgagtat actcaagcat tgagtggccc gccggaggca 9780
ccgccttgcg ctgccccgtt cgagccggtt ggacaccaa agggaggggc aggcattgctg 9840
gcatacgca tcatgcgatg caagaagctg gcgaaaatgg gcaacgtggc ggccagtctc 9900
aagcacgcct accgcgagcg cgagacgccc aacgctgacg ccagcaggac gccagagaac 9960
gagcactggg cggccagcag caccgatgaa gcgatgggccc gactgcgcga gttgtgtcca 10020
gagaagcggc gcaaggacgc tgtgttggcg gtcgagtacg tcatgacggc cagcccggaa 10080
tgggtggaagt cggccagcca agaacagcag gcggcgttct tcgagaaggc gcacaagtgg 10140
ctggcggaac agtacggggc ggatcgcatc gtgacggcca gcatccaccg tgacgaaacc 10200
agcccgcaca tgaccgcgtt cgtgtgtccg ctgacgcagg acggcaggct gtcggccaag 10260
gagttcatcg gcaacaaagc gcagatgacc cgcgaccaga ccacgtttgc ggcgctgtg 10320
gccgatctag ggctgcaacg gggcatcgag ggcagcaagg cacgtcacac gcgcattcag 10380
gcgttctacg aggccttggg gcggccacca gtggggccacg tcaccatcag cccgcaagcg 10440
gtcgagccac gcgcctatgc accgcaggga ttggccgaaa agctgggaat ctcaaagcgc 10500
gttgagacgc cggaagccgt ggccgaccgg ctgacaaaag cggttcggca ggggtatgag 10560
cctgccctac aggcgcgccg aggagcgcgt gagatgcgca agaaggccga tcaagcccaa 10620
gagacggccc gag 10633

```

<210> 5

<211> 5799

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pADS 质粒

<400> 5

```

caattcgcgc gcgaaggcga agcggcatgc atttacgttg acaccatcga atggtgcaaa 60
accttttcgcg gtatggcatg atagcgcccga gaagagagtc aattcagggg ggtgaatgtg 120
aaaccagtaa cggttatacga tgcgcagag tatgccgggtg tctcttatca gaccgtttcc 180
cgcggtggtga accaggccag ccacgtttct gcgaaaacgc gggaaaaagt ggaagcggcg 240
atggcggagc tgaattacat tccaaccgc gtggcacaac aactggcggg caaacagtcg 300
ttgtgattg gcgttgccac ctccagtctg gccctgcacg cgccgtcgca aattgtcgcg 360
gcgattaaat ctgcgcgcga tcaactgggt gccagcgtgg tgggtgcgat ggtagaacga 420
agcggcgtcg aagcctgtaa agcggcgggt cacaatcttc tcgcgcaacg cgtcagtggg 480
ctgatcatta actatccgct ggatgaccag gatgccattg ctgtggaagc tgcctgact 540
aatgttccgg cgttatttct tcatgtctct gaccagacac ccatcaacag tattattttc 600
tcccatgaag acggtacgcg actgggcgtg gagcatctgg tcgcattggg tcaccagcaa 660
atcgcgctgt tagcggggccc attaatgtct gtctcggcgc gtctcgctct ggctggctgg 720
cataaatatc tcaactgcaa tcaaatcag ccgatagcgg aacgggaagg cgactggagt 780
gccatgtccg gtttcaaca aaccatgcaa atgctgaatg agggcatcgt tccactgcg 840
atgctgggtg ccaacgatca gatggcgtg ggcgcaatgc gcgccattac cgagtccggg 900
ctgcgcgttg gtgcggatat ctgcgtagtg ggatacgacg ataccgaaga cagctcatgt 960
tatatcccg cgtaaccac catcaaacg gattttcgcc tgctggggca aaccagcgtg 1020
gaccgcttgc tgcaactctc tcagggccag gcggtgaagg gcaatcagct gttgcccgtc 1080
tcaactggta aaagaaaaac caccctggcg cccaatacgc aaaccgcctc tcccgcgcg 1140
ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 1200
gcgcaacgca attaatgtga gttagcgcga attgatctgg ttgacagct tatcatcgac 1260
tgacagggtc accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg 1320
caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg 1380
ttttttgcgc cgacatcata acggttcttg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt 1440
aatcatccgg ctggtataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 1500
agaccatggc cctgaccgaa gagaaaccga tccgcccgat cgctaacttc ccgccgtcta 1560
tctgggggtg ccagttcctg atctacgaaa agcaggttga gcagggtgtt gaacagatcg 1620
taaacgacct gaagaaagaa gttcgtcagc tgctgaaaga agctctggac atcccgatga 1680
aacacgctaa cctgctgaaa ctgatcgacg agatccagcg tctgggtatc ccgtaccact 1740
tcgaacgcga aatcgaccac gcactgcagt gcattctaga aacctacggc gacaactgga 1800
acggcgaccg ttcttctctg tggtttcgtc tgatgcgtaa acagggtac tacgttacct 1860
gtgacgtttt taacaactac aaggacaaga acggtgcitt caaacagtct ctggctaacg 1920
acgttgaagg cctgctggaa ctgtacgaag cgacctccat gcgtgtaccg ggtgaaatca 1980
tcctggagga cgcgctgggt ttacccggtt ctgctctgtc cattatgact aaagacgctt 2040

```

tctctactaa cccggctctg ttcaccgaaa tccagcgtgc tctgaaacag ccgctgtgga 2100
aacgtctgcc gcgtatcgaa gcagcacagt acattccgtt ttaccagcag caggactctc 2160
acaacaagac cctgctgaaa ctggctaagc tggaattcaa cctgctgcag tctctgcaca 2220
aagaagaact gtctcacgtt tgtaagtggg ggaaggcatt tgacatcaag aaaaacgcgc 2280
cgtgcctgcg tgaccgtatc gttgaatggt acttctgggg tctgggttct ggttatgaac 2340
cacagtactc ccgtgcacgt gtgttcttca ctaaagctgt agctgttata accctgatcg 2400
atgacactta cgatgcttac ggcacctacg aagaactgaa gatctttact gaagctgtag 2460
aacgtgggtc tatcacttgc ctggacactc tgccggagta catgaaaccg atctacaaac 2520
tgttcatgga tacctacacc gaaatggagg aattcctggc aaaagaaggc cgtaccgacc 2580
tgttcaactg cggtaaagag ttgtttaaag aattcgtacg taacctgatg gttgaagcta 2640
aatgggctaa cgaaggccat atccccacta ccgaagaaca tgacccggtt gttatcatca 2700
ccggcggtgc aaacctgctg accaccactt gctatctggg tatgtccgac atctttacca 2760
aggaatctgt tgaatgggct gtttctgcac cgccgctgtt ccgttactcc ggtattctgg 2820
gtcgtcgtct gaacgacctg atgaccacaa aagcagagca ggaacgtaaa cactcttcct 2880
cctctctgga atctacatg aaggaatata acgttaacga ggagtacgca cagactctga 2940
tctataaaga agttgaagac gtatggaaag acatcaaccg tgaatacctg actactaaa 3000
acatcccgcg ccgctgctg atggcagtaa tctacctgtg ccagttcctg gaagtacagt 3060
acgtggtaa agataacttc actcgcatgg gcgacgaata caaacacctg atcaaatccc 3120
tgctggttta ccgatgtcc atctgatecc ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat 3180
gcaagcttgg ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag 3240
aacgcagaag cggctctgata aaacagaatt tgccctggcg cagtagcgcg gtggtccac 3300
ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc 3360
cccatgcgag agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac 3420
tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tctgagtag gacaaatccg 3480
ccgggagcgg atttgaacct tgcgaagcaa cggcccgag ggtggcgggc aggacgccc 3540
ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cttttttgcg 3600
tttctacaaa ctctttttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3660
gacaataacc ctgataaatg cttaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3720
atttccgtgt cgccttatt ccttttttgc cgcatcttg ccttccgtt tttgctcacc 3780
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 3840
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 3900
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt gttgacgccg 3960
ggcaagagca actcggctgc gcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4020
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4080
taacatgag tgataaact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4140
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgcttgat cgttgggaac 4200
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct acagcaatgg 4260
caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggaacaat 4320
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4380
ctggctgggt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4440
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4500
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4560
atttgtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4620
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4680
aacgtgagtt ttctgtccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4740
gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag 4800

cgggtggtttg ttgtccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 4860
 gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 4920
 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 4980
 ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5040
 cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5100
 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5160
 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5220
 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5280
 agcgtcgatt ttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5340
 cggccttttt acggttccgt gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5400
 tatccccga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5460
 gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgcctgatgc 5520
 ggtatittct cttacgcat ctgtgcggta ttacacaccg catatgggtc actctcagta 5580
 caatctgtc tgatgccga tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 5640
 ggtcatggt gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct 5700
 gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 5760
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagcagat 5799

<210> 6

<211> 6545

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAtoB 质粒

<400> 6

atcgatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac 60
 tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcggt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
 ttcaactttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
 aatacccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
 ggcatccggg tgggtgtcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctcgcgccag 300
 cttagagcgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag 360
 caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatac aaattgctgt ctgccagggt atcgctgatg 420
 tactgacaag ctcgcgtac ccgattatcc atcgggtggat ggagcgactc gttaatcgct 480
 tccatgcgcc gcagtaacaa ttgtcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
 ccttccccct gcccgcggtt aatgatattg ccaaacaggt cgctgaaatg cggtggtgc 600
 gcttcatccg ggcgaagaa ccccgatttg gcaaatattg acggccagtt aagccattca 660
 tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaac cactgggtgat accattcgcg agcctccgga 720
 tgacgaccgt agtcatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa 780
 acaaattctc gtccctgatt ttaccacc ccctgaccgc gaatgggtgag attgagaata 840
 taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggctcaatc 900
 ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacagtatc ccgacgagc gggatcattt 960
 tgcgttcag ccatactttt catactccc ccattcagag aagaaccaa ttgtccatat 1020

tgcacagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct tctcgtaac caaacggta 1080
 accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt 1140
 aacaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttga cggcgtcaca 1200
 ctttgcctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
 tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagegaatt cgagctcgg 1320
 acccggttag gaggaatata aaatgaaaa ttgtgtcatc gtcagtgcgg tacgtactgc 1380
 tatcggtagt tttaacggtt cactcgttc caccagcgcc atcgacctgg gggcgacagt 1440
 aattaaagcc gccattgaac gtgcaaaaat cgattcaca cacgttgatg aagtgattat 1500
 gggtaacgtg ttacaagccg ggctggggca aaatccggcg cgtcaggcac tgttaaaaag 1560
 cgggctggca gaaacggtgt gcggattcac ggtcaataaa gtatgtggtt cgggtcttaa 1620
 aagtgtggcg cttgccgccc aggcattca ggcaggtcag gcgcagagca ttgtggcggg 1680
 gggataggaa aatatgagtt tagcccccta cttactcgat gcaaaagcac gctctggtta 1740
 tcgtcttga gacggacagg tttatgacgt aatcctgcgc gatggcctga tgtgcgccac 1800
 ccatggttat catatgggga ttaccgccga aaacgtggct aaagagtacg gaattaccg 1860
 tgaatgcag gatgaactgg cgtacattc acagcgtaa gcggcagccg caattgagtc 1920
 cgggtgcttt acagccgaaa tcgtccgggt aaatgttgc actcgaaaga aaaccttcgt 1980
 cttcagtcga gacgaattcc gaaagcgaa ttcaacggct gaagcgtag gtgcattgcg 2040
 cccggccttc gataaagcag gaacagtcac cgctgggaac gcgtctggtta ttaacgacgg 2100
 tgctgccgt ctggtgatta tggaagaatc tgcggcgctg gcagcaggcc ttacccccct 2160
 ggctcgcatt aaaagttag ccagcgggtg cgtcccccc gcattgatgg gtatggggcc 2220
 agtacctgcc acgcaaaaag cgttacaact ggcggggctg caactggcgg atattgatct 2280
 catlgaggt aatgaagcat ttgctgcaca gtcccttgc gttgggaaaa acctgggctt 2340
 tgattctgag aaagtgaatg tcaacggcgg gccatcgcg ctcgggcac ctatcggtgc 2400
 cagtgggtct cgtattctg tcacactatt acatgccatg caggcacgcg ataaaacgct 2460
 ggggctggca acactgtgca ttggcggcgg tcagggaatt gcgatggtga ttgaacggtt 2520
 gaattaagtc gacctgcagg catgcaagct tggctgtttt ggcggatgag agaagatttt 2580
 cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggctcg ataaaacaga atttgcctgg 2640
 cggcagtagc gcggtggtcc cacctgacct catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag 2700
 ccccgatggt agtgtggggt ctccccatgc gagagtaggg aactgccagg catcaataa 2760
 aacgaaagc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttggtt tcggtgaacg 2820
 ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttcggaag caacggccc 2880
 gaggggtgag ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaatgaag cagaaggcca 2940
 tcctgacgga tggccttttt gcgtttctac aaactctttt gtttttttt ctaaatacat 3000
 tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaa 3060
 aggaagagta tgagtattca acatttcctg gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt 3120
 tgccttcctg tttttgctca ccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 3180
 ttgggtgcag caaactatta actggcgaac tactactct agcttcccg caacaattaa 3240
 tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccattct gcgctcgcc cttccggctg 3300
 gctggtttat tgctgataaa tctggagcgg gtgagcgttg gtctcgggt atcattgcag 3360
 cactggggcc agatggtaag ccctcccgt tctagtatt ctacacgacg gggagtcagg 3420
 caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 3480
 ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttacgc gccctgtagc 3540
 ggcgcattaa gcgcggcggg ttggttggtt acgcgcagcg tgaccgtac acttgccagc 3600
 gccctagcgc ccgtccttt cgtttcttc ctttccttc tgcacggtt cgcggcctt 3660
 ccccgtaag ctctaaatcg ggggtccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac 3720
 ctgcaccca aaaaacttga ttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gcctgatag 3780

acggtttttt gccctttgac gttggagtc acgttcttta atagtggact cttgttccaa 3840
 acttgaacaa cactcaaccc tatctcgggc tattcttttg atttataagg gattttgccg 3900
 atttcggcct attggttaaa aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac 3960
 aaaatattaa cgtttacaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat 4020
 gacccaaaac ccttaacgtg agttttcgtt ccaactgagcg tcagacccecg tagaaaagat 4080
 caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgetgcttgc aaacaaaaaa 4140
 accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 4200
 ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc ctcttagtgt agccgtagtt 4260
 aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt 4320
 accagtgggg catttgagaa gcacacggtc acactgcttc cggtagtcaa taaaccggta 4380
 aaccagcaat agacataagc ggctatttaa cgaccctgcc ctgaaccgac gaccgggtcg 4440
 aatttgcttt cgaatttctg ccattcatcc gcttattatc acttattcag gcgtagcacc 4500
 aggcgtttta gggcaccaat aactgcctta aaaaaattac gccccgcct gccactcatc 4560
 gcagtactgt tgtaattcat taagcattct gccgacatgg aagccatcac agacggcatg 4620
 atgaacctga atgccagcg gcatacgcac cttgtcgctt tgcgtataat atttgcccat 4680
 ggtgaaaacg ggggcgaaga agttgtccat attggccacg tttaaatcaa aactggtgaa 4740
 actcaccagc ggattggctg agacgaaaaa catattctca ataaaccctt tagggaaata 4800
 ggccaggttt tcaccgtaac acgccacatc ttgcgaatat atgtgtagaa actgccgaa 4860
 atcgtcgtgg tattcactcc agagcgatga aaacgtttca gtttgcctat ggaaaacggt 4920
 gtaacaaggg tgaacactat cccatatac cagctcaccg tctttcattg ccatacggaa 4980
 ttccggatga gcattcatca ggcgggcaag aatgtgaata aaggccggat aaaacttgtg 5040
 cttatttttc ttaccggtc ttaaaaaggc cgtaatatcc agctgaacgg tctggttata 5100
 ggtacattga gcaactgact gaaatgcctc aaaatgttct ttacgatgcc attgggatat 5160
 atcaacggtg gtatatccag tgattttttt ctccatttta gcttccttag ctctgaaaa 5220
 tctcgataac tcaaaaaata cgcccggtag tgatcttatt tcattatggt gaaagttgga 5280
 acctcttacg tgccgatcaa cgtctcattt tcgccaaaag ttggcccagg gcttcccgtt 5340
 atcaacaggg acaccaggat ttatttattc tgcgaagtga tcttccgtca caggtattta 5400
 ttccggcga aagtgcgtcg gtgatgctgc caacttactg atttagtgta tgatggtgtt 5460
 tttgaggtgc tccagtggct tctgtttcta tcagctgtcc ctctgttca gctactgacg 5520
 ggggtggtgc taacggcaaa agcaccgccc gacatcagcg ctacgggagt gtatactggc 5580
 ttactatgtt ggcactgatg aggggtgcag tgaagtgtt catgtggcag gagaaaaaag 5640
 gctgcaccgg tgcgtcagca gaatatgtga tacaggatat attccgcttc ctgcctcact 5700
 gactcgtacg gctcggctgt tcgactcggc cgagcggaaa tggcttacga acggggcgga 5760
 gatttcttgg aagatgccag gaagatactt aacagggaag tgagagggcc gcggcaaagc 5820
 cgtttttcca taggtctcgc cccctgaca agcatcacga aatctgacgc tcaaatcagt 5880
 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctggc ggctccctcg 5940
 tgcgctctcc tgttcttgc tttcggttta ccggtgtcat tccgctgtta tggccgctt 6000
 tgtctcattc cagccctgac actcagttcc gggtaggcag ttcgtccaa gctggactgt 6060
 atgcacgaac cccccgttca gtcgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag 6120
 tccaaccggg aaagacatgc aaaagcacca ctggcagcag ccaactggta ttgatattaga 6180
 ggagttagtc ttgaagtcac gcgccggtta aggctaaact gaaaggacaa gttttggtga 6240
 ctgcgctcct ccaagccagt tacctcggtt caaagagttg gtagctcaga gaaccttca 6300
 aaaaccgccc tgcaaggcgg ttttttcgtt ttcagagcaa gagattacgc gcagacaaa 6360
 acgatctcaa gaagatcatc ttattaatca gataaaatat ttgctcatga gcccgaagt 6420
 gcgagccgga tcttccccat cggtagtgc ggcatatag gcgccagcaa ccgcacctgt 6480
 ggccgctgtg atgccggcca cgatgcgtcc ggcttagagg atctgctcat gtttgacagc 6540

ttatc

6545

<210> 7

<211> 6835

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pHMGs 质粒

<400> 7

```

atcgatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcagga ttctgcaaac cctatgctac 60
tccgtcaagc cgtaattgt ctgattcgtt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
ttcacttttt cttcacaaac ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
aatacccgcg agaaatagag ttgatcgtca aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
ggcatccggg tgggtgctcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctgcgccag 300
cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag 360
caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgctgatg 420
tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc atcgggtgat ggagcgactc gttaatcgct 480
tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
ccttccccct gcccgcgctt aatgatattg ccaaacaggt cgctgaaatg cggctggtgc 600
gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgatttg gcaaatattg acgcccagtt aagccattca 660
tgccagtagg cgcgcgacg aaagtaaacc cactggtgat accattcgcg agcctccgga 720
tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa 780
acaaattctc gtccctgatt ttaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata 840
taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggctcaatc 900
ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaccaa ttgtccatat 1020
tgcacagac attgcgctca ctgcgtcttt tactggctct tctcgctaac caaacggta 1080
accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgct 1140
aacaanaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttgca cggcgtcaca 1200
ctttgctatg ccatagcatt ttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagcgaatt cgagctcggg 1320
acccgggagg aggacagcta aatgaaactc tcaactaaac tttgttggtg tggattataa 1380
ggaagactta ggccgcaaaa gcaacaacaa ttacacaata caaacttgca aatgactgaa 1440
ctaaaaaac aaaagaccgc tgaacaaaa accagacctc aaaatgtcgg tattaagggt 1500
atccaaattt acatcccaac tcaatgtgtc aaccaatctg agctagagaa attgatggc 1560
gtttctcaag gtaaatacac aattggtctg ggccaaacca acatgtcttt tgtaaatgac 1620
agagaagata tctactcgat gtccctaact gtttgtctc agttgatcaa gagttacaac 1680
atcgacacca acaaaattgg tagattagaa gtcggtactg aaactctgat tgacaagtcc 1740
aagtctgtca agtctgtctt gatgcaattg tttggtgaaa aactgacgt cgaaggtatt 1800
gacacgctta atgcctgtta cgggtgtacc aacgcgttgt tcaactcttt gaactggatt 1860
gaatctaacg catgggatgg tagagacgcc attgtagttt gcggtgatat tgccatctac 1920
gataagggtg ccgcaagacc aaccggtggt gccggtactg ttgctatgtg gatcggtcct 1980

```

gatgctccaa ttgtatttga ctctgtaaga gcttcttaca tggaacacgc ctacgatttt 2040
tacaagccag atttcaccag cgaatatcct tacgtcgatg gtcatTTTTtC attaacTTgt 2100
tacgtcaagg ctcttgatca agtttacaag agttattcca agaaggctat ttctaaaggg 2160
ttggttagcg atccccgtgg ttccgatgct ttgaacgttt tgaaatattt cgactacaac 2220
gttttccatg ttccaacctg taaattggtc acaaaatcat acggtagatt actatataac 2280
gatttcagag ccaatcctca attgttccca gaagttgacg ccgaattagc tactcgcgat 2340
tatgacgaat ctttaaccga taagaacatt gaaaaaactt ttgttaatgt tgctaagcca 2400
ttccacaaaag agagagttgc ccaatctttg attgttccaa caaacacagg taacatgtac 2460
accgcatctg tttatgccgc ctttgcattc ctattaaact atgttggatc tgacgactta 2520
caaggcaagc gtgttggttt attttcttac ggttccggtt tagctgcacg tctatattct 2580
tgcaaaatig ttggtgacgt ccaacatatt atcaaggaaat tagatattac taacaaatta 2640
gccaaagaaa tcaccgaaac tccaaaggat tacgaagctg ccatcgaatt gagagaaaat 2700
gcccatttga agaagaactt caaacctcaa ggttccattg agcatttgca aagtgggtgt 2760
tactacttga ccaacatcga tgacaaattt agaagatctt acgatgttaa aaaataagtc 2820
gacctgcagg catgcaagct ttgctgtttt ggccgatgag agaagatttt cagcctgata 2880
cagattaaat cagaacgcag aagcggctcg ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc 2940
gcggtgggcc cacctgaccc catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt 3000
agtgtggggt ctccccatgc gagagtaggg aactgccagg catcaaataa aacgaaaggc 3060
tcagtcgaaa gactgggcct ttctgtttat ctgttgtttg tcggtgaacg ctctcctgag 3120
taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttcggaag caacggcccc gaggggtggc 3180
ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga 3240
tgcccttttt gcgtttctac aaactctttt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt 3300
atccgctcat gagacaataa ccttgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta 3360
tgagtattca acatttccgt gtgcacctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg 3420
tttttgctca ccgagaaacg ctgggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcag 3480
caaactatta actggcgaac tacttactct agcttccccg caacaattaa tagactggat 3540
ggagcgggat aaagttgcag gaccatttct gcgctcgcc cttccggctg gctggtttat 3600
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc 3660
agatggtaag ccctcccgta tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 3720
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 3780
agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttacgc gccctgtagc ggcgcattaa 3840
gcgcggcggg tgtgggtggt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc 3900
ccgctctttt cgctttcttc ctttcttttc tcgccacgtt cgcgggcttt ccccgtaag 3960
ctctaaatcg ggggctccct ttaggggtcc gatttagtgc ttacggcac ctcgacccca 4020
aaaaacttga ttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc 4080
gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa acttgaacaa 4140
cactcaaccc tatctcgggc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct 4200
attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa 4260
cgtttacaat taaaaggat ctagggtgaag atcctttttg ataatctcat gacccaaatc 4320
ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 4380
tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 4440
ccagcgggtg ttgttttgc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc 4500
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 4560
ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtgggg 4620
catttgagaa gcacacggtc acactgttc cggtagtcaa taaaccggta aaccagcaat 4680
agacataagc ggctatttaa cgaccctgcc ctgaaccgac gaccgggtcg aatttgcttt 4740

```

cgaatttctg ccattcatcc gcttattatc acttattcag gcgtagcacc aggcgtttaa 4800
gggcaccaat aactgcctta aaaaaattac gccccgccct gccactcadc gcagtactgt 4860
tgtaattcat taagcattct gccgacatgg aagccatcac agacggcatg atgaacctga 4920
atcgccagcg gcacacgac cttgtcgcct tgcgtataat atttgcccat ggtgaaaacg 4980
ggggcgaaag agttgtccat attggccacg tttaaatcaa aactggtgaa actcacccag 5040
ggattggctg agacgaaaaa catattctca ataaaccctt tagggaaata ggccaggttt 5100
tcaccgtaac acgccacatc ttgcgaatat atgtgtagaa actgccggaa atcgtcgtgg 5160
tattcactcc agagcgatga aaacgtttca gtttgcctat ggaaaacggt gtaacaaggg 5220
tgaacactat cccatatcac cagctcaccg tctttcattg ccatacgaa ttccggatga 5280
gcattcatca ggccggcaag aatgtgaata aaggccggat aaaacttgtg cttatttttc 5340
tttacggtct ttaaaaagcg cgtaatatcc agctgaacgg tctggttata ggtacattga 5400
gcaactgact gaaatgcctc aaaatgttct ttacgatgcc attgggatat atcaacggtg 5460
gtatatccag tgattttttt ctccatttta gcttccttag ctccgaaaa tctcgataac 5520
tcaaaaaata cgcccggtag tgatcttatt tcattatggt gaaagttgga acctcttacg 5580
tgccgatcaa cgtctcattt tcgccaaaag ttggcccagg gcttcccggg atcaacaggg 5640
acaccaggat ttatttattc tgcgaagtga tcttcctga caggatatta ttccggcga 5700
agtgcgtcgg gtgatgctgc caacttactg atttagtgta tgatggtgtt tttgaggtgc 5760
tccagtggct tctgtttcta tcagctgtcc ctctgttca gctactgacg ggggtggtgcg 5820
taacggcaaa agcaccgcgc gacatcagcg ctacgggagt gtatactggc ttactatgtt 5880
ggcactgatg aggggtgtcag tgaagtgtt catgtggcag gaaaaaaag gctgcaccgg 5940
tgcgtcagca gaatatgtga tacaggatat attccgcttc ctgcctcact gactcgtac 6000
gctcggctgt tcgactgcgg cgagcggaaa tggcttacga acggggcgga gatttcctgg 6060
aagatgccag gaagatactt aacagggaag tgagagggcc gcggcaaacg cgtttttcca 6120
taggctccgc cccctgaca agcatcacga aatctgacgc tcaaatcagt ggtggcgaaa 6180
cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctggc ggctcccctc tgcgtctcc 6240
tgttctgcc tttcggttta ccggtgtcat tccgtgtta tggccgcgtt tgtctcattc 6300
cacgcctgac actcagttcc gggtaggcag ttcgtccaa gctggactgt atgcacgaac 6360
ccccgttca gtcgaccgcg tgcgcttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccggg 6420
aaagacatgc aaaagcacca ctggcagcag ccactggtaa ttgatttaga ggagttagtc 6480
ttgaagtcac gcgccggtta aggctaaact gaaaggacaa gttttggtga ctgcgtcct 6540
ccaagccagt tacctcggtt caaagagttg gtagctcaga gaaccttcga aaaaccgccc 6600
tgcaaggcgg tttttctgtt ttcagagcaa gagattacgc gcagaccaa acgatctcaa 6660
gaagatcadc ttattaatca gataaaatat ttgctcatga gcccgaagt gcgagcccga 6720
tcttccccat cggatgatgc ggcgatatag gcgccagcaa ccgcacctgt ggccgagggtg 6780
atgccggcca cgatgcgtcc ggcgtagagg atctgctcat gtttgacagc ttatc 6835

```

<210> 8

<211> 6868

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pHMGR 质粒

<400> 8

```

atcgatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac 60
tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
ttcacttttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
aatacccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
ggcatccggg tgggtgctca aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctgcgccag 300
cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag 360
caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgctgatg 420
tactgacaag cctcgcgtac cggattatcc atcgttggat ggagcgactc gttaatcgct 480
tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
ccttccccctt gcccggcgtt aatgatttgc ccaaacaggt cgtgaaatg cggctgggtgc 600
gcttcatccg ggcgaagaa ccccgatttg gcaaatttg acggccagtt aagccattca 660
tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaac cactgggtgat accattcgcg agcctccgga 720
tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa 780
acaaattctc gtccctgatt ttaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata 840
taacctttca tcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggctcaatc 900
ggcgtaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaaccaa ttgtccatat 1020
tgcatcagac attgcgctca ctgcgtcttt tactggctct tctcgctaac caaacggta 1080
accccgctta taaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt 1140
aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttgca cggcgtcaca 1200
ctttgctatg ccatagcatt ttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagcgaatt cgagctcgg 1320
acccgggagg aggattacac tatggtttta accaataaaa cagtcatttc tggatcgaaa 1380
gtcaaaaagt tatcatctgc gcaatcgagc tcatcaggac ctatcatc tagtgaggaa 1440
gatgattccc gcgatattga aagcttggat aagaaaatac gtcctttaga agaattagaa 1500
gcattattaa gtagtggaat taaaaacaa ttgaagaaca aagaggtcgc tgccttggtt 1560
attcacggta agttaccitt gtacgctttg gagaaaaat taggtgatac tacgagagcg 1620
gttgcggtac gtaggaaggc tctttcaatt ttggcagaag ctctgtatt agcatctgat 1680
cgtttaccat ataaaaatta tgactacgac cgcgtatttg gcgcttggtg tgaatatgtt 1740
ataggttaca tgcctttgcc cgttgggtgt atagggccct tggttatcga tggtagatct 1800
tatcatatac caatggcaac tacagagggt tgtttgtag ctctgccat gcgtggctgt 1860
aaggcaatca atgctggcgg tggtgcaaca actgttttaa ctaaggatgg tatgacaaga 1920
ggcccagtag tccgtttccc aactttgaaa agatctgggt cctgtaagat atggttagac 1980
tcagaagagg gacaaaacgc aattaaaaaa gcttttaact ctacatcaag atttgcacgt 2040
ctgaacata ttcaaaactg tctagcagga gatttactct tcatgagatt tagaacaact 2100
actggtgacg caatgggtat gaatatgatt tctaaagggt tcgaatactc attaaagcaa 2160
atggtagaag agtatggctg ggaagatag gaggttgtct ccgtttctgg taactactgt 2220
accgacaaaa aaccagctgc catcaactgg atcgaaggtc gtgtaagag tgcgtcgca 2280
gaagctacta ttcctgggtg tgtgtcaga aaagtgttaa aaagtgatgt ttccgcattg 2340
gttgagttga acattgctaa gaatttggtt ggatctgcaa tggctgggtc tgttgggtga 2400
tttaacgcac atgcagctaa tttagtaca gctgttttct tggcattagg acaagatcct 2460
gcacaaaatg ttgaaagttc caactgtata acattgatga aagaagtgga cggtagtttg 2520
agaatttccg tatccatgcc atccatcgaa gtaggtacca tcggtgggtg tactgttcta 2580
gaaccacaag gtgccatgtt ggacttatta ggtgtaagag gcccgcagtc taccgctcct 2640
ggtaccaacg cagtcatt agcaagaata gttgcctgtg ccgtcttggc aggtgaatta 2700

```

tccttatgtg ctgccctagc agccggccat ttggttcaaa gtcatatgac ccacaacagg 2760
 aaacctgctg aaccaacaaa acctaacaat ttggacgcca ctgatataaa tcgtttgaaa 2820
 gatgggtccg tcacctgcat taaatcctaa gtcgacctgc aggcattgcaa gcttggtgt 2880
 tttggcggat gagagaagat tttagcctg atacagatta aatcagaacg cagaagcgg 2940
 ctgataaaac agaatttgcc tggcggcagt agcgcggtgg tcccacctga ccccatgccg 3000
 aactcagaag tgaacgccc tagcgccgat ggtagtgtgg ggctcctcca tgcgagagta 3060
 gggaactgcc aggcattcaaa taaaacgaaa ggctcagtcg aaagactggg cctttcgttt 3120
 tatctgttgt ttgtcggta acgctctcct gagtaggaca aatccgccgg gagcggattt 3180
 gaacgttgcg aagcaacggc ccggagggtg gcgggcagga cggccgccat aaactgccag 3240
 gcatcaaat aagcagaagg ccattcctgac ggatggcctt ttgctgttc tacaaactct 3300
 tttgtttatt ttctaaata cattcaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat 3360
 aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 3420
 ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga 3480
 aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cagcaacta ttaactggcg aactacttac 3540
 tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagtig caggaccact 3600
 tctgcgctcg gcccttcgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg 3660
 tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt 3720
 tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 3780
 aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 3840
 gattgattta cgcgcctgt agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca 3900
 gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cggccgctcc ttctgcttc ttcccttct 3960
 ttctgcccac gtteggcggc ttcccccgtc aagctctaaa tcgggggctc ctttaggg 4020
 tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttgggt gatggttcac 4080
 gtagtgggcc atcgccctga tagacggtt ttcccccctt gacgttggag tccacgttct 4140
 ttaatagtgg actctgttc caaacttgaa caacactcaa ccctatctcg ggctattctt 4200
 ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac 4260
 aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aatttaaaag gatctaggtg 4320
 aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagtttc gttccactga 4380
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaaagg tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 4440
 atctgtgtgt tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccgatcaa 4500
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 4560
 gtctttctag ttagccgta gtagggccac cactcaaga actctgtac accgcctaca 4620
 tacctgctc tgctaactct gttaccagt gggcatttga gaagcacacg gtcacactgc 4680
 ttccgtagt caataaacg gtaaacacg aatagacata agcggctatt taacgacct 4740
 gccctgaacc gacgaccggg tcgaatttgc tttcgaatt ctgccattca tccgttatt 4800
 atcatttatt caggcgtagc accaggcgtt taaggccacc aataactgcc ttaaaaaat 4860
 tacgccccgc cctgccactc atcgagtagc tgttgtaatt cattagcat tctgcccaga 4920
 tggaagccat cacagacggc atgatgaacc tgaatcgcca gcggcatcag caccttgtcg 4980
 ccttgctat aatatttgcc catggtgaaa acgggggcga agaagttgtc catattggcc 5040
 acgtttaa atcaaaactg gaaactcacc cagggttgg ctgagacgaa aaacatatc 5100
 tcaataaacc ctttagggaa ataggccagg ttttaccgt aacacgccac atcttgcgaa 5160
 tatatgtgta gaaactgcc gaaatcgctg tggatttcac tccagagcga tgaaaacgtt 5220
 tcagtttgct catggaaaac ggtgtaacaa ggggtgaacac tatcccatat caccagctca 5280
 ccgtcttca ttgccatag gaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga 5340
 ataaaggccg gataaaactt gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata 5400
 tccagctgaa cgggtctggt ataggtagat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt 5460


```

tctttacgat gccattggga tatatcaacg gtggtataac cagtgatatt tttctccatt 5520
ttagcttccct tagctcctga aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccg tagtgatctt 5580
atttcattat ggtgaaagt ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcca 5640
aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag 5700
tgatcttccg tcacaggtat ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta 5760
ctgatttagt gtatgatggt gtttttgagg tgctccagt gcttctgttt ctatcagctg 5820
tcctctctgt tcagctactg acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca 5880
gcgctagcgg agtgataact ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg 5940
cttcattgtg caggagaaaa aaggctgcac cgggtcgctc gcagaatatg tgatacagga 6000
tatattccgc ttctcgtctc actgactcgc tacgctcggc cgttcgactg cggcgagcgg 6060
aaatggctta cgaacggggc ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg 6120
aagtgaagg gcccgggcaa agccgttttt ccataggctc gccccccctg acaagcatca 6180
cgaatctga cgtcaaatc agtggtagcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 6240
gtttccccct ggcggtccc tcgtgcgtc tcctgttctt gcctttcggc ttaccggtgt 6300
cattccgctg ttatggcgc gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg 6360
cagttcgtc caagctggac tgtatgcac aacccccgt tcagtcgcac cgtgcgcct 6420
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca cacttgagc 6480
cagccactgg taattgatt agaggagtta gtctgaagt catgcgccg ttaaggctaa 6540
actgaaagca caagttttg tgactgcgt cctccaagcc agttacctc gttcaaagag 6600
ttgtagctc agagaacct cgaaaaaccg cctgcaagg cggtttttc gtttcagag 6660
caagagatta cgcgcagacc aaaacgatc caagaagatc atcttattaa tcagataaaa 6720
tatttgctca tgagcccgaa gtggcgagcc cgtcttccc catcggtgat gtcggcgata 6780
taggcgccag caaccgcacc tgtggcgccg gtgatgccg ccacgatgcg tccggcgtag 6840
aggatctgct catgtttgac agcttatc 6868

```

<210> 9

<211> 6125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pBAD18HMGR 质粒

<400> 9

```

atcgatgcat aatgtgctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac 60
tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattaig acaacttgac ggctacatca 120
ttcacttttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
aatacccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
ggcatccggg tgggtgctca aagcagcttc gcctggctga tacgttggc ctcgcgccag 300
cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag 360
caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgtgatg 420
tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc atcggtagg ggagcgactc gttaatcgct 480
tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
ccttccccct gcccgcggtt aatgatttgc ccaacagggt cgctgaaat cggtgtgtgc 600

```

gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgatttg gcaaattattg acggccagtt aagccattca 660
 tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaacc cactggigat accattcgcg agcctccgga 720
 tgacgaccgt agtcatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggctcgcaa 780
 acaaatcttc gtccctgatt ttaccacc ccctgaccgc gaatggtag attgagaata 840
 taacctttca tccccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggcctcaatc 900
 ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
 tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaaccaa ttgtccatat 1020
 tgcacagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct tctcgtaac caaacggta 1080
 accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt 1140
 aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttgca cggcgtcaca 1200
 ctttgctatg ccatagcatt ttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
 tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctacgaatt cgagctcgg 1320
 acccgggagg aggattacac tatggtttta accaataaaa cagtcatttc tggatcga 1380
 gtcaaaagt tcatctctgc gcaatcgagc tcatcaggac cttcatcacc tagtgaggaa 1440
 gatgattccc gcgatatga aagcttgat aagaaaatac gtcctttaga agaattagaa 1500
 gcattattaa gtatgggaaa taaaaacaa ttgaagaaca aagaggtcgc tgccttggtt 1560
 attcacggta agttaccttt gtacgctttg gagaaaaat tagtgatac tacgagagcg 1620
 gttgcggtac gttagaaggc tctttcaatt ttggcagaag ctctgtatt agcatctgat 1680
 cgtttaccat ataaaaatta tgactacgac cgcgtatttg gcgcttggtg tgaaaatgtt 1740
 ataggttaca tgcctttgcc cgttggtgtt ataggccctt tggttatcga tggtagatct 1800
 tatcatatac caatggcaac tacagagggt tgtttggtag ctctgccat gcgtggctgt 1860
 aaggcaatca atgctggcgg tggtgcaaca actgttttaa ctaaggatgg tatgacaaga 1920
 ggcccagtag tccgtttccc aactttgaaa agatctgggt cctgtaagat atggttagac 1980
 tcagaaggagg gacaaaacgc aattaaaaaa gcttttaact ctacatcaag atttcacgt 2040
 ctgcaacata ttcaaacttg tctagcagga gatttactct tcatgagatt tagaacaact 2100
 actggtgacg caatgggtat gaatatgatt tctaaagggt tcgaatactc attaaagcaa 2160
 atggtagaag agtatggctg ggaagatatg gaggttgtct ccgtttctgg taactactgt 2220
 accgacaaaa aaccagctgc catcaactgg atcgaaggctc gtgtaagag tgcctcgcga 2280
 gaagctacta ttccctggtg tgtgtcaga aaagtgttaa aaagtgatgt ttccgcattg 2340
 gttgagttga acattgctaa gaatttggtt ggatctgcaa tggctgggtc tgttggtgga 2400
 tttaacgcac atgcagctaa tttagtga gctgttttct tggcattagg acaagatcct 2460
 gcacaaaatg ttgaaagttc caactgtata acattgatga aagaagtgga cggatgattt 2520
 agaatttccg tatccatgcc atccatcga gtaggtacca tcggtgggtg tactgttcta 2580
 gaaccacaag gtgccatgtt ggacttatta ggtgtaagag gcccgcatgc taccgtcct 2640
 ggtaccaacg cacgtcaatt agcaagaata gttgcctgtg ccgtcttggc aggtgaatta 2700
 tccttatgtg ctgccctagc agccggccat ttggttcaaa gtcatatgac ccacaacagg 2760
 aaacctgctg aaccaacaaa acctaacaat ttggacgcca ctgatataaa tcgtttgaaa 2820
 gatgggtccg tcacctgcat taaatcctaa gtcgacctgc aggcattgcaa gcttggtgt 2880
 tttggcggat gagagaagat ttccagcctg atacagatta aatcagaacg cagaagcgg 2940
 ctgataaaac agaatttgcc tggcggcagt agcgcgggtg tcccacctga ccccatgcc 3000
 aactcagaag tgaaacccg tagcggcgat ggtagtgtgg ggtctcccca tgcgagagta 3060
 gggaactgcc aggcattcaaa taaaacgaaa ggctcagtcg aaagactggg cctttcgttt 3120
 tatctgttgt ttgtcgttga acgctctcct gagtaggaca aatccgccgg gagcggattt 3180
 gaacgttgcg aagcaacggc ccggagggtg gcgggcagga cggccgccat aaactgccag 3240
 gcatcaaatt aagcagaagg ccacctgac ggatggcctt ttgcgtttc tacaactct 3300
 tttgttiatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat 3360

aaatgcttca ataattattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 3420
 ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga 3480
 aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cagcagtggtg ttacatcgaa ctggatctca 3540
 acacgggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 3600
 ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgccgggcaa gagcaactcg 3660
 gtcgccgcat acactattct cagaatgact tgggtgagta ctcaccagtc acagaaaagc 3720
 atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata 3780
 acactgcggc caacttactt ctgacaacga tggaggagacc gaaggagcta accgcttttt 3840
 tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 3900
 ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgcagc aatggcaaca acgttgcgca 3960
 aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 4020
 aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccctt tccggctggc tggttttatg 4080
 ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcgggtat cattgcagca ctggggccag 4140
 atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtccaggca actatggatg 4200
 aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag 4260
 accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc 4320
 gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc 4380
 gctcctttcg ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg ccgcttttcc ccgtcaagct 4440
 ctaaactcggg ggctcccttt agggttccga tttagtctt tacggcacct cgaccccaaa 4500
 aaacttgatt tgggtgatgg ttacagtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc 4560
 cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac ttgaacaaca 4620
 ctcaacccta tctcgggcta ttcttttgat ttataaggga ttttgcgat ttcggcctat 4680
 tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgga attttaacaa aatattaacg 4740
 tttacaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 4800
 ttaactgtgag ttttcgttc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 4860
 ttgagatcct tttttctgc gcgtaactct ctgcttgcaa aaaaaaac caccgtacc 4920
 agcgggtggt tgtttgcgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 4980
 cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagttag ccgtagttag gccaccactt 5040
 caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 5100
 tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 5160
 ggcgacggc tgggctgaa cggggggttc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac 5220
 ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc tccccgaagg 5280
 gaaaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 5340
 gcttccaggg gaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 5400
 tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 5460
 cgcgcccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt tctttctgc 5520
 gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagttagctg ataccgctcg 5580
 ccgcagccga acgaccgagc gcagcagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgctgat 5640
 gcggtatttt ctccctacgc atctgtgcgg tatctcacac cgcatatggt gcactctcag 5700
 tacaatctgc tctgatccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac 5760
 tgggtcatgg ctgcgccccg acaccgcca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt 5820
 ctgctcccg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag 5880
 aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgc aggcagcaag gagatggcgc ccaacagtcc 5940
 cccggccacg gggcctgcca ccataccac gccgaacaa gcgctcatga gcccgagtg 6000
 gcgagcccg tcttccccat cgggtgatgc ggcgatatag gcgccagcaa ccgcacctgt 6060
 ggcgccggtg atgccgcca cgtgcgtcc ggcgtagagg atctgctcat gtttgacagc 6120

ttatc

6125

<210> 10

<211> 8374

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pHMGSR 质粒

<400> 10

```

atcgatgc atgtgcctg tcaaatggac gaagcagga ttctgcaa cctatgctac 60
tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
ttcacttttt ctteacaacc ggcaaggaa tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
aatccccgcg agaaatagag ttgatcgtca aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
ggcatccggg tggctgctca aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctgcgccag 300
cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgca cggcgacaag 360
caaacatgct gtgcgacgct ggcatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgtgatg 420
tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc atcggtggat ggagcgactc gttaatcgct 480
tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
ccttcccctt gcccggcgtt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggctgggtc 600
gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgatttg gcaaatattg acggccagtt aagccattca 660
tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaacc cactgggtgat accattcgcg agcctccgga 720
tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggctggcaa 780
acaaattctc gtccctgatt ttaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata 840
taacctttta ttcccaggc tggctcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggctcaatc 900
ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaaccaa ttgtccatat 1020
tgcatcagac attgcgctca ctgcgtcttt tactggctct tctcgctaac caaacggta 1080
accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt 1140
aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttgca cggcgtcaca 1200
ctttgctatg ccatagcatt ttatccata agattagcgg atcctacctg acgtttttta 1260
tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagegaatt cgagctcgg 1320
acccggggat cctctagagt cgacaggagg acagctaaat gaaactctca actaaacttt 1380
gttggtgtgg tattaagga agacttaggc cgcaaaagca acaacaatta cacaatacaa 1440
acttgcaaat gactgaacta aaaaaacaaa agaccgctga acaaaaaacc agacctcaaa 1500
atgtcggtat taaaggatc caaatttaca tcccactca atgtgtcaac caatctgagc 1560
tagagaaatt tgatggcgtt tctcaaggta aatacacaat tggctcgggc caaaccaaca 1620
tgtcttttgt caatgacaga gaagatatct actcgatgtc cctaactgtt ttgtctaagt 1680
tgatcaagag ttacaacatc gacaccaaca aaattggtag attagaagtc ggtactgaaa 1740
ctctgattga caagtccaag tctgtcaagt ctgtcttgat gcaattgttt ggtgaaaaca 1800
ctgacgtcga aggtattgac acgcttaatg cctgttacgg tggtagcaac gcgtgttca 1860
actctttgaa ctgattgaa tctaacgcat gggatggtag agacgccatt gtagtttgcg 1920
gtgatattgc catctacgat aagggtgccg caagaccaac cgggtgtgcc ggtactgttg 1980

```

ctatgtggat cggctcctgat gctccaattg tatttgactc tgtaagagct tcttacatgg 2040
 aacacgccta cgatttttac aagccagatt tcaccagcga atatccttac gtcgatggtc 2100
 atttttcatt aacttgttac gtcaaggctc ttgatcaagt ttacaagagt tattccaaga 2160
 aggcattttc taaagggttg gtttagcgtc ccgctgggtc ggatgctttg aacgttttga 2220
 aatatttcga ctacaacgtt ttccatgttc caacctgtaa attggtcaca aaatcatacg 2280
 gtagattact atataacgat ttccagagcca atcctcaatt gttcccagaa gttgacgccg 2340
 aattagctac tcgcgattat gacgaatctt taaccgataa gaacattgaa aaaacttttg 2400
 ttaatgttgc taagccattc cacaaagaga gagttgccca atctttgatt gttccaacaa 2460
 acacaggtaa catgtacacc gcactgtttt atgccgcctt tgcactctta ttaactatg 2520
 ttggatctga cgacttaciaa ggcaagcgtg ttggtttatt ttcttacggt tccggtttag 2580
 ctgcatctct atattcttgc aaaattgttg gtgacgtcca acataattac aaggaattag 2640
 atattactaa caaattagcc aagagaatca ccgaaactcc aaaggattac gaagctgcc 2700
 tcgaattgag agaaaatgcc catttgaaga agaacttcaa acctcaaggt tccattgagc 2760
 atttgcaag tggtgtttac tacttgacca acatcgatga caaatttaga agatcttacg 2820
 atgttaaaaa ataaggagga ttacactatg gttttaacca ataaaacagt catttctgga 2880
 tcgaaagtca aaagtttacc atctgcgcaa tcgagctcat caggaccttc atcatctagt 2940
 gaggaagatg attcccgca tattgaaagc ttggataaga aaatacgtcc tttagaagaa 3000
 ttagaagcat tattaagtag tggaaataca aaacaattga agaacaaaga ggtcgtgcc 3060
 ttggttattc acggttaagt acctttgtac gctttggaga aaaaattagg tgatactacg 3120
 agagcgggtg cggtagctag gaaggtctct tcaattttgg cagaagctcc tgtattagca 3180
 tctgatcggt taccatataa aaattatgac tacgaccgcg tatttggcgc ttgttgtgaa 3240
 aatgttatag gttacatgcc ttgtcccggt ggtgttatag gccccttgggt tatcgatggt 3300
 acatcttacc atataccaat ggcaactaca gagggttgtt tggtagcttc tgccatgcgt 3360
 ggctgtgaag caatcaatgc tggcgggtgt gcaacaactg ttttaactaa ggatggtatg 3420
 acaagaggcc cagtagtccg ttcccaact ttgaaaagat ctggtgcctg taagatatgg 3480
 ttagactcag aagagggaca aaacgcaatt aaaaaagctt ttaactctac atcaagattt 3540
 gcacgtctgc aacatattca aacttgtcta gcaggagatt tactcttcat gagatttaga 3600
 acaactactg gtgacgcaat gggatgaat atgatttcta aagggtcga atactcatta 3660
 aagcaaatgg tagaagagta tggctgggaa gatatggagg ttgtctccgt ttctggtaac 3720
 tactgtaccg acaaaaaacc agctgccatc aactggatcg aaggctgtgg taagagtgtc 3780
 gtcgcagaag ctactattcc tggtagtgtt gtcagaaaag tgttaaaaag tgatgtttcc 3840
 gcattggttg agttgaacat tgctaagaat ttggttggat ctgcaatggc tgggtctgtt 3900
 ggtggattta acgcacatgc agctaattta gtgacagctg ttttcttggc attaggacaa 3960
 gatcctgcac aaaatgttga aagttccaac tgtataacat tgatgaaaga agtgacgggt 4020
 gatttgagaa tttccgtatc catgccatcc atcgaagtag gtaccatcgg tgggtgtact 4080
 gttctagaac cacaagggtc catgttggac ttattaggtg taagaggccc gcatgctacc 4140
 gtcctggta ccaacgcacg tcaattagca agaatagttg cctgtgccgt cttggcaggt 4200
 gaattatcct tatgtgctgc cctagcagcc ggccatttgg ttcaaagtca tatgaccac 4260
 aacaggaaac ctgctgaacc aacaaaacct aacaatttgg acgccactga tataaatcgt 4320
 ttgaaagatg ggtccgtcac ctgcattaaa tcctaagtcg acctgcaggc atgcaagctt 4380
 ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc agaacgcaga 4440
 agcggctcga taaaacagaa ttggcctggc ggcagtagcg cgggtgtccc acctgacccc 4500
 atgccgaact cagaagtga acgcctagc gccgatggta gtgtggggtc tcccatgcg 4560
 agagtaggga actgccaggc atcaataaaa acgaaaggct cagtcgaaag actgggcctt 4620
 tcgttttacc tgttgtttgt cgggtgaacg tctcctgagt aggacaaatc cgccgggagc 4680
 ggatttgaac gttgcgaagc aacggccccg aggggtggcg gcaggacgcc cgccataaac 4740

tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg cgtttctaca 4800
 aactcttttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 4860
 cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 4920
 tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttctgtg ttttgcacac ccagaaacgc 4980
 tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcagc aaactattaa ctggcgaact 5040
 acttactcta gcttcccgcc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagtgcagg 5100
 accacttctg cgctcgcccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg 5160
 tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggttaag cctcccgtat 5220
 cgtagtatac tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc 5280
 tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat 5340
 actttagatt gatttacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 5400
 cgcgcagcgt gaccgctaca ctggccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc 5460
 ctccctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 5520
 tagggttccg atttagtget ttaeggcacc tcgaccccaa aaaacttgat ttgggtgatg 5580
 gtacacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 5640
 cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctgaacaac actcaaccct atctcgggct 5700
 attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 5760
 ttaacaaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt taaaaggatc 5820
 taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 5880
 cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg 5940
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg 6000
 gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 6060
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg 6120
 cctacatacc tcgctctgct aatctgttta ccagtggggc atttgagaag cacacgttca 6180
 cactgcttcc ggtagtcaat aaaccggtta accagcaata gacataagcg gctatttaac 6240
 gaccctgcc tgaaccgacg accgggtcga atttgccttc gaatttctgc cattcatccg 6300
 cttattatca cttattcagg cgtagacca ggcgtttaag ggcaccaata actgccttaa 6360
 aaaaattacg ccccgccctg ccactcatcg cagtactgtt gtaattcatt aagcattctg 6420
 ccgacatgga agccatcaca gacggcatga tgaacctgaa tcgccagcgg catcagcacc 6480
 ttgtcgctt gcgtataata ttgcccctg gtgaaaacgg gggcgaagaa gttgtccata 6540
 ttggccacgt ttaaatcaaa actggtgaaa ctacccagg gattggctga gacgaaaaac 6600
 atattctcaa taaacccttt agggaaatag gccaggtttt caccgtaaca cgccacatct 6660
 tgcgaatata tgtgtagaaa ctgccgaaa tcgtcgttgt attcactcca gagcgtatga 6720
 aacgtttcag tttgctcatg gaaaacggtg taacaagggt gaacactatc ccatatcacc 6780
 agctcaccgt ctttcattgc cataggaat tccggatgag cattcatcag gcgggcaaga 6840
 atgtgaataa aggcgggata aaacttgctc ttatttttct ttacggtctt taaaaaggcc 6900
 gtaatatcca gctgaacggt ctggttatag gtacattgag caactgactg aaatgcctca 6960
 aaatgttctt tacgatgcca ttgggatata tcaacggtgg tataaccagt gatttttttc 7020
 tccattttag cttccttagc tcctgaaaat ctcgataact caaaaaatac gcccggtagt 7080
 gatcttattt cattatgggt aaagtggaa cctcttacgt gccgatcaac gtctcatttt 7140
 cgccaaaagt tggcccaggg ctcccggtta tcaacaggga caccaggatt tatttattct 7200
 gcgaagtgat cttccgtcac aggtatttat tcggcgcaaa gtgcgtcggg tgatgctgcc 7260
 aacttactga tttagtgtat gatggtgttt ttgaggtgct ccagtggctt ctgtttctat 7320
 cagctgtccc tcctgttcag ctactgacgg ggtggtgcgt aacggcaaaa gcaccgccgg 7380
 acatcagcgc tagcggagtg tatactggct tactatgttg gcaactgatga ggggtgcagt 7440
 gaagtgttc atgtggcagg agaaaaaagg ctgcaccggt gcgtcagcag aatatgtgat 7500

acaggatata ttccgcttcc tcgctcactg actcgctacg ctcggtcggt cgactgcggc 7560
 gagcggaat ggcttacgaa cggggcggag atttcctgga agatgccagg aagatactta 7620
 acagggaagt gagagggccg cggcaaagcc gtttttccat aggctccgcc cccctgacaa 7680
 gcatcacgaa atctgacgct caaatcagt gtagcgaaac cggacaggac tataaagata 7740
 ccaggcgttt ccccttgccg gctccctcgt gcgctctcct gttcctgcct ttcggtttac 7800
 cgggtgtcatt ccgctgttat ggccgcgttt gtctcattcc acgcctgaca ctcagttccg 7860
 ggtaggcagt tcgctccaag ctggactgta tgcacgaacc ccccgttcag tccgaccgct 7920
 gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccgga aagacatgca aaagcaccac 7980
 tggcagcagc cactggtaat tgatttagag gagttagtct tgaagtcag cgccgggtta 8040
 ggctaaactg aaaggacaag ttttggtgac tgcgctcctc caagccagtt acctcggttc 8100
 aaagagttgg tagctcagag aaccttcgaa aaaccgccct gcaaggcggg ttttctgtt 8160
 tcagagcaag agattacgag cagacaaaa cgatctcaag aagatcatct tattaatcag 8220
 ataaaaatatt tgctcatgag ccgaagtgg cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg 8280
 gcgatatagg cggcagcaac cgcacctgtg gcgccggtga tgcgggccac gatgcgtccg 8340
 gcgtagagga tctgctcatg ttgacagct tacc 8374

<210> 11

<211> 9573

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pBAD33MevT(C159A) 质粒

<400> 11

atcgatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac 60
 tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
 ttacattttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
 aatacccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
 ggcatccggg tgggtctcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctcgcccag 300
 cttagagcgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgca cgcgacaag 360
 caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgtgatg 420
 tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc atcgggtgat ggagcgactc gttaatcgt 480
 tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
 ctttccctt gcccgcggtt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggtggtgc 600
 gttcatccg ggcgaaagaa ccccgatttg gcaaatattg acggccagtt aagccattca 660
 tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaac cactgggtgat accattcgcg agcctccgga 720
 tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggctcgcaa 780
 acaaatcttc gtccctgatt ttaccacc cctgaccgc gaatgggtgag attgagaata 840
 taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggcctcaatc 900
 ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
 tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaaccaa ttgtccatat 1020
 tgcatcagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct tctcgctaac caaacggta 1080
 accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgct 1140

aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attattttgca cggcgtcaca 1200
 ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
 tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg tttttttggg ctagegaatt cgagctcggg 1320
 acccggggat cctctagagt cgactaggag gaatataaaa tgaaaaattg tgtcatcgtc 1380
 agtgcggtac gtactgctat cggtagtttt aacggttcac tcgcttcac cagcgccatc 1440
 gacctggggg cgacagtaat taaagccgcc attgaacgtg caaaaatcga ttcacaacac 1500
 gttgatgaag tgattatggg taacgtgta caagccgggc tggggcaaaa tccggcgcgt 1560
 caggcacigt taaaaagcgg gctggcagaa acggtgtgcg gattcacggg caataaagta 1620
 tgttggtcgg gtcttaaaag tgtggcgct gccgccagg ccattcaggc aggtcaggcg 1680
 cagagcattg tggcggggg tatggaaaat atgagtttag cccctactt actcgatgca 1740
 aaagcacgct ctggttatcg tcttgagac ggacaggttt atgacgtaat cctgcgcgat 1800
 ggctgatgt gcgccacca tggttatcat atggggatta ccgccgaaaa cgtggctaaa 1860
 gactacggaa ttaccctga aatgcaggat gaactggcg tacattcaca gcgtaaagcg 1920
 gcagccgcaa ttgagtcgg tgcttttaca gccgaaatc tcccggtaaa tgttgact 1980
 cgaaagaaaa ccttcgtctt cagtaagac gaattccga aagcgaattc aacggctgaa 2040
 gcgttaggtg cattgcgcc gcccttcgat aaagcaggaa cagtaccgc tgggaacgcg 2100
 tctggtatta acgacggtgc tgcgctctg gtgattatgg aagaatctgc ggcgctggca 2160
 gcaggcctta ccccttggc tcgcattaaa agttatgcca gcggtggcgt gcccccgca 2220
 ttgatgggta tggggccagt acctgccacg caaaaagcgt tacaactggc ggggctgcaa 2280
 ctggcggata ttgatctcat tgaggcta atgaacattg ctgcacagtt ctttgcgtt 2340
 gggaaaaacc tgggctttga tctgagaaa gtgaatgtca acggcggggc catcgcgctc 2400
 gggcatccta tcggtgccag tgggtgctgt attctggtca cactattaca tgccatgcag 2460
 gcacgcgata aaacgtggg gctggcaaca ctgtgcattg gcggcggta gggaaattgcg 2520
 atggtgattg aacggttgaa ttaaggagga cagctaaatg aaactctcaa ctaaactttg 2580
 ttggtgtggt attaaaggaa gacttaggcc gcaaaagcaa caacaattac acaatacaaa 2640
 cttgcaaatg actgaactaa aaaaacaaaa gaccgctgaa caaaaacca gacctcaaaa 2700
 tgtcggtatt aaaggtatcc aaatttcat cccaactcaa tgttcaacc aatctgagct 2760
 agagaaattt gatggcgtt ctcaaggtaa atacacaatt ggtctgggc aaaccaacat 2820
 gtcttttgtc aatgacagag aagatatcta ctgatgtcc ctaactgtt tgtctaagtt 2880
 gatcaagagt tacaacatcg acaccaacaa aattggtaga ttagaagtcg gtactgaaac 2940
 tctgattgac aagtcgaagt ctgtcaagtc tgtcttgat caattgtttg gtgaaacac 3000
 tgacgtcgaa ggtattgaca cgcttaatgc cgcgtacggt ggtaccaacg cgttgttcaa 3060
 ctctttgaac tggattgaat ctaacgcatg ggatggtaga gacgccattg tagtttgcgg 3120
 tgatattgcc atctacgata aggggtgccg aagaccaacc ggtggtgccg gtactgttcg 3180
 tatgtggatc ggtcctgat ctccaattgt atttgactct gtaagagctt cttacatgga 3240
 acacgcctac gatttttaca agccagattt caccagcgaa tacccttac tcgatggta 3300
 tttttcatta acttgttacg tcaaggctct tgatcaagtt tacaagagtt attccaagaa 3360
 ggctatttct aaagggttg ttagcgatcc cgtgggttcg gatgctttga acgttttgaa 3420
 atatttcgac tacaacgttt tccatgttcc aacctgtaaa ttggtcacia aatcatacgg 3480
 tagattacta tataacgatt tcagagccaa tcctcaattg tcccgagaag ttgacgccga 3540
 attagctact cgcgattatg acgaatcttt aaccgataag aacattgaaa aaacttttgt 3600
 taatgttgct aagccattcc acaaagagag agttgcccc tctttgattg ttccaacaaa 3660
 cacaggtaac atgtacaccg catctgttta tgccgccttt gcattcttat taaactatgt 3720
 tggatctgac gacttacaag gcaagcgtgt tggtttattt tcttacggtt ccggttttagc 3780
 tgcatctcta tattcttgca aaattgttgg tgacgtccaa catattatca aggaattaga 3840
 tattactaac aaattagcca agagaatcac cgaaactcca aaggattacg aagctgccat 3900

cgaattgaga gaaaaatgcc atttgaagaa gaacttcaaa cctcaagggt ccattgagca 3960
 ttgtcaaaagt ggtgtttact acttgaccaa catcgatgac aaatttagaa gatcttacga 4020
 tgttaaaaaa taaggaggat tacactatgg tttaaccaa taaaacagtc atttctggat 4080
 cgaaagtcaa aagtttatca tctgcgcaat cgagctcatc aggaccttca tcatctagtg 4140
 aggaagatga ttcccgcgat attgaaagct tggataagaa aatacgtcct ttagaagaat 4200
 tagaagcatt attaaagtagt ggaaatacaa aacaattgaa gaacaaagag gtcgctgcct 4260
 tggttattca cggtaagtta cctttgtacg ctttggagaa aaaattaggt gatactacga 4320
 gagcggttgc ggtacgtagg aaggctcttt caattttggc agaagctcct gtattagcat 4380
 ctgatcggtt accatataaa aattatgact acgaccgcgt atttggcgct tgttgtgaaa 4440
 atgttatagg ttacatgcct ttgcccggtt gtgttatagg ccccttgggt atcgatggta 4500
 catcttatca tataccaatg gcaactacag agggttgttt ggtagcttct gccatgcgtg 4560
 gctgtaaggc aatcaatgct ggcggtgggt caacaactgt ttaactaag gatggtatga 4620
 caagaggccc agtagtccgt ttcccaactt tgaaaagatc tgggtgcctgt aagatatggt 4680
 tagactcaga agagggacaa aacgcaatta aaaaagcttt taactctaca tcaagatttg 4740
 cacgtctgca acatattcaa acttgtctag caggagattt actcttcatg agatttagaa 4800
 caactactgg tgacgcaatg ggtatgaata tgatttctaa aggtgtcgaa tactcattaa 4860
 agcaaatggt agaagagtat ggctgggaag atatggaggt tgtctccgtt tctggttaact 4920
 actgtaccga caaaaaacca gctgccatca actggatcga aggtcgtggt aagagtgtcg 4980
 tcgcagaagc tactattcct ggtgatgttg tcagaaaagt gttaaaaagt gatgtttccg 5040
 cattggttga gttgaacatt gctaagaatt tggttggatc tgcaatggct gggctctgtt 5100
 gtggatttaa cgcacatgca gctaatttag tgacagctgt ttctttggca ttaggacaag 5160
 atctgcaca aatgttgaa agttccaact gtataacatt gatgaaagaa gtggacggtg 5220
 atttgagaat ttccgtatcc atgccatcca tcgaagtagg taccatcggt ggtggtactg 5280
 ttctagaacc acaaggtgcc atgttgactt tattaggtgt aagaggcccg catgctaccg 5340
 ctctgggtac caacgcagct caattagcaa gaatagtgc ctgtgccgtc ttggcagggtg 5400
 aattatcctt atgtgtgcc ctacgagccg gccatttgggt tcaaagtcac atgaccacac 5460
 acaggaaacc tgetgaacca acaaaaccta acaatttga cgcactgat ataatcggtt 5520
 tgaaagatgg gtccgtcacc tgcattaaat cctaagtcga cctgcaggca tgcaagcttg 5580
 gctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa 5640
 gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc ggtggtecca cctgacccca 5700
 tgccgaactc agaagtgaac cgccgtagcg ccgatggtag tgtgggtctt ccccatgcga 5760
 gagtagggaa ctgccaggca tcaataaaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt 5820
 cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg 5880
 gatttgaacg ttgcgaagca acggcccgga ggggtggcggg caggacgccc gccataaact 5940
 gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa 6000
 actcttttgt ttatttttct aaatacattc aaataatgat ccgctcatga gacaataacc 6060
 ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt 6120
 cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct 6180
 ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcagca aactattaac tggcgaacta 6240
 ctactctag ctcccgga acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga 6300
 ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt 6360
 gagcgtgggt ctgcgggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagcc ctcccgtatc 6420
 gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct 6480
 gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata 6540
 cttagattg atttacgcgc cctgtagcgg cgcattaaag cgcgcgggtg tgggtgttac 6600
 gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc ctagcgccc gctcctttcg ctttcttccc 6660

ttcttttctc gccacgttcg ccggttttcc ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt 6720
 agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt tgggtgatgg 6780
 ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac 6840
 gtcttttaat agtggactct tgttccaaac ttgaacaaca ctcaacccta tctcgggcta 6900
 ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat 6960
 ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg tttacaattt aaaaggatct 7020
 aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaataccc ttaacgtgag ttttcgttcc 7080
 actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc 7140
 gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg 7200
 atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 7260
 atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 7320
 ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggggca tttgagaagc acacggtcac 7380
 actgcttcgc gtagtcaata aaccggtaaa ccagcaatag acataagcgg ctatttaacg 7440
 accctgccct gaaccgacga ccgggtcgaa tttgctttcg aatttctgcc attcatccgc 7500
 ttattatcac ttattcaggc gtagcaccag gcgtttaagg gcaccaataa ctgccttaa 7560
 aaaattacgc ccgcctctgc cactcatcgc agtactgtt taaticatta agcattctgc 7620
 cgacatggaa gccatcacag acggcatgat gaacctgaat cgccagcggc atcagcacct 7680
 tgtcgccttg cgtataatat ttgccatgg tgaacacggg ggcaagaag ttgtccatat 7740
 tggccacgtt taaatcaaaa ctggtgaaac tcaccaggg attggctgag acgaaaaaca 7800
 tattctcaat aaaccttta gggaaatagg ccaggtttt accgtaacac gccacatctt 7860
 gcgaatatat gtgtagaaac tgccggaaat cgtcgttgta ttcactccag agcgaigaaa 7920
 acgtttcagt ttgtcatgg aaaacggtgt aacaagggtg aacactatcc catatcacca 7980
 gctcaccgtc tttcattgcc atacggaatt ccgatgagc attcatcagg cgggcaagaa 8040
 tgtgaataaa ggccggataa aacttgtgtc tatitttctt tacggtcttt aaaaaggccg 8100
 taatatccag ctgaacggtc tggttatagg tacattgagc aactgactga aatgcctcaa 8160
 aatgttcttt acgatgccat tgggataat caacggtggt atatecagtg atttttttct 8220
 ccattttage ttcccttagc cctgaaaac tcgataactc aaaaaatacg cccggtagt 8280
 atcttatttc attatggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc 8340
 gccaaaagt ggcccaggc ttcgccgtat caacaggac accaggattt atttattctg 8400
 cgaagtgate ttccgtcaca ggtatttatt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcca 8460
 acttactgat ttagtgtatg atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc 8520
 agctgtccct cctgttcagc tactgacggg gtggtgcgta acggcaaaag caccgccgga 8580
 catcagcgtc agcggagtgt atactggctt actatgttgg cactgatgag ggtgtcagt 8640
 aagtgttca tgtggcagga gaaaaaggc tgcaccggtg cgtcagcaga atatgtgata 8700
 caggatatat tccgttctc cgtcactga ctcgtacgc tcggtcgttc gactgcggcg 8760
 agcggaaatg gcttacgaac ggggcggaga tttcctggaa gatgccagga agatacttaa 8820
 cagggaagt agagggccgc ggcaagccg tttttccata ggctccgcc cctgacaag 8880
 catcacgaaa tctgacgctc aaatcagtgg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac 8940
 caggcgtttc cccctggcgg ctcctcgtg cgctctcctg ttctgcctt tcggtttacc 9000
 ggtgtcattc cgctgttatg gccgcgttt tctcattcca cgctgacac tcagttccgg 9060
 gtaggcagtt cgctccaagc tggactgtat gcacgaacct cccgttcagt ccgaccgctg 9120
 cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggaa agacatgcaa aagcaccact 9180
 ggcagcagcc actggtaatt gatttagagg agttagtctt gaagtcatgc ccgggttaag 9240
 gctaaactga aaggacaagt ttgtgtgact gcgtcctcc aagccagtta cctcgttca 9300
 aagagttggt agctcagaga accttcgaaa aaccgccctg caaggcgtt ttttcgtttt 9360
 cagagcaaga gattacgcgc agacaaaac gatctcaaga agatcatctt attaatcaga 9420

taaaatattt gctcatgagc ccgaagtggc gagcccgatc ttcccatcg gtgatgtcgg 9480
cgatataggc gccagcaacc gcacctgtgg cgccggtgat gccggccacg atgcgtccgg 9540
cgtagaggat ctgctcatgt ttgacagctt atc 9573

<210> 12

<211> 6835

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pHMG5(C159A)质粒

<400> 12

atcgaatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac 60
tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattatg acaacttgac ggctacatca 120
ttcacttttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta 180
aatacccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 240
ggcatccggg tgggtgctca aagcagcttc gcctgggtga tacgtttgtc ctgcgccag 300
cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgca cggcgacaag 360
caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgtctgat 420
tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc atcgttggat ggagcgactc gttaatcgct 480
tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 540
ccttccccct gcccgcgctt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggctggtgc 600
gttcatccg ggcgaagaa ccccgatttg gcaaatttg acggccagtt aagccattca 660
tgccagtagg cgcgcggaac aaagtaaac cactgggtgat accattcgcg agcctccgga 720
tgacgaccgt agtgaatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa 780
acaaattctc gtccctgatt ttaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata 840
taacctttca tccccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggctcaatc 900
ggcgtaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 960
tgcgcttcag ccatactttt cactaccg ccattcagag aagaaacaa ttgtccatat 1020
tgcacagac atggcgtca ctgcgtcttt tactggctct tctcgtaac caaacggta 1080
accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt 1140
aacaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttga cggcgtcaca 1200
ctttgctatg ccatagcatt ttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta 1260
tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagegaatt cgagctcgg 1320
acccgggagg aggacagcta aatgaaactc tcaactaaac ttgtttggtg tggattataa 1380
ggaagactta ggcgcgaaaa gcaacaacaa ttacacaata caaacttgca aatgactgaa 1440
ctaaaaaac aaaagaccgc tgaacaaaa accagacctc aaaaatgtcg tattaaaggt 1500
atccaaattt acatcccaac tcaatgtgtc aaccaatctg agctagagaa atttgatggc 1560
gtttctcaag gtaaatcac aattggtctg ggccaaacca acatgtcttt tgtcaatgac 1620
agagaagata tctactgat gtcctaact gttttgtcta agttgatcaa gagttacaac 1680
atcgacacca acaaaattgg tagattagaa gtcggtactg aaactctgat tgacaagtcc 1740
aagtctgtca agtctgtctt gatgcaattg ttgtgtgaaa acactgacgt cgaaggtatt 1800
gacacgctta atgccgcgta cgggtgtacc aacgcgttgt tcaactcttt gaactggatt 1860

gaatctaacg catgggatgg tagagacgcc attgtagttt gcggtgatat tgccatctac 1920
 gataaggggtg ccgcaagacc aaccgggtgt gccggtactg ttgctatgtg gatcgggtcct 1980
 gatgctccaa ttgtatttga ctctgtaaga gcttcttaca tggaacacgc ctacgatttt 2040
 tacaagccag atttcaccag cgaatatacct tacgtcgatg gtcatttttc attaaacttgt 2100
 tacgtcaagg ctcttgatca agtttacaag agttattcca agaaggctat ttctaaaggg 2160
 ttggtttagcg atcccgcgtg ttcggatgct ttgaacgttt tgaatatatt cgactacaac 2220
 gttttccatg ttccaacctg taaattggtc acaaatcat acggtagatt actatataac 2280
 gatttcagag ccaatcctca attgttccca gaagttgacg ccgaattage tactcgcgat 2340
 tatgacgaat ctttaaccga taagaacatt gaaaaaactt ttgttaatgt tgctaagcca 2400
 ttccacaaag agagagttgc ccaatctttg attgttccca caaacacagg taacatgtac 2460
 accgcactctg tttatgccgc ctttgcactct ctattaaact atgttggatc tgacgactta 2520
 caaggcaagc gtgttggttt attttcttac ggttccggtt tagctgcac tctatatct 2580
 tgcaaaattg ttggtgacgt ccaacatatt atcaaggaat tagatattac taacaaatta 2640
 gccaaagaaa tcaccgaaac tccaaaggat tacgaagctg ccacgaatt gagagaaaat 2700
 gcccatTTga agaagaactt caaacctcaa ggttccattg agcatttgca aagtgggtgtt 2760
 tactacttga ccaacatcga tgacaaattt agaagatctt acgatgttaa aaaataagtc 2820
 gacctgcagg catgcaagct tggctgtttt ggccggtgag agaagatttt cagcctgata 2880
 cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc 2940
 gcggtgggtcc cacctgaccc catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt 3000
 agtgtggggt cttcccatgc gagagtaggg aactgccagg catcaaataa aacgaaaggc 3060
 tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttgtttg tcggtgaacg ctctcctgag 3120
 taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttgcgaag caacggcccc gaggggtggc 3180
 ggacaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga 3240
 tggccttttt cgtttcttac aaactctttt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt 3300
 atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta 3360
 tgagtattca acatttccgt gtccccccta ttcctttttt tgcggcattt tgccttctg 3420
 tttttgtca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcag 3480
 caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat 3540
 ggagcgggat aaagtgcag gaccacttct gcgctcgcc cttccggctg gctggtttat 3600
 tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt atcattgcag cactggggcc 3660
 agatggtaag ccttcccgta tcgtagtat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 3720
 tgaacgaat agacagatcg ctgagatagg tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc 3780
 agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttacgc gccctgtagc ggccgattaa 3840
 gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgtac acttgccagc gccctagcgc 3900
 ccgtccttt cgtttcttc ccttcccttc tcgccaggtt cgcgggttt ccccgtaag 3960
 ctctaaatcg ggggtccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctgcaccca 4020
 aaaaacttga ttgggtgat ggttcacgta gtgggccac gccctgatag acggtttttc 4080
 gcccttgac gttggagtc acgttcttta atagtggact cttgttccaa acttgaacaa 4140
 cactcaacc tatctcgggc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct 4200
 attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatatata 4260
 cgtttacaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataactcat gaccaaatac 4320
 ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagacccc tagaaaagat caaaggatct 4380
 tcttgatgc cttttttct gcgcgtaac tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 4440
 ccagcgggtg tttgttgcc ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc 4500
 ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 4560
 ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcgtctgc taatcctgtt accagtgggg 4620

```

catttgagaa gcacacggtc acactgcttc cggtagtcaa taaaccggta aaccagcaat 4680
agacataagc ggctatttaa cgacctgcc ctgaaccgac gaccgggtcg aatttgcttt 4740
cgaatttctg ccattcatcc gcttattatc acttattcag gcgtagcacc aggcgtttta 4800
gggcaccaat aactgcctta aaaaaattac gccccgccct gccactcacc gcagtactgt 4860
tgtaattcat taagcattct gccgacatgg aagccatcac agacggcatg atgaacctga 4920
atcgccagcg gcacacgac cttgtcgcct tgcgtataat atttgcccat ggtgaaaacg 4980
ggggcgaaga agttgtccat attggccacg tttaaatcaa aactggtgaa actcaccag 5040
ggattggctg agacgaaaa cataattctca ataaaccctt tagggaaata ggccaggttt 5100
tcaccgtaac acgccacacc ttgcgaatat atgtgtagaa actgccggaa atcgctgtgg 5160
tattcactcc agagcgatga aaacgtttca gtttgcctat ggaaaacggt gtaacaaggg 5220
tgaacactat ccataatcac cagctcaccg tctttcattg ccatacggaa ttccggatga 5280
gcattcatca ggggggcaag aatgtgaata aaggccggat aaaacttgtg cttatttttc 5340
tttacggctc ttaaaaaggc cgtaatatcc agctgaacgg tctggttata ggtacattga 5400
gcaactgact gaaatgcctc aaaatgttct ttacgatgcc attgggatat atcaacgggtg 5460
gtatatccag tgattttttt ctccatttta gcttcccttag ctctgaaaa tctcgataac 5520
tcaaaaaata cgcccgtag tgatcttatt tcattatggt gaaagtggga acctcttacg 5580
tgccgatcaa cgtctcattt tcgcaaaaag ttggcccagg gcttcccgtt atcaacaggg 5640
acaccaggat ttattttatt tgcgaagtga tcttccgtca caggatttta ttccggcgaa 5700
agtgcgtcgg gtgatgctgc caacttactg atttagtgta tgatggtgtt tttagaggtc 5760
tccagtggct tctgtttcta tcagctgtcc ctctgttca gctactgacg ggggtggtgcg 5820
taacggcaaa agcaccgccg gacatcagcg ctagcggagt gtatactggc ttactatgtt 5880
ggcactgatg aggggtgcag tgaagtgtt catgtggcag gagaaaaag gctgcaccgg 5940
tgcgtcagca gaatatgtga tacaggatat attccgcttc ctgctcact gactcgtac 6000
gctcggtcgt tcgactcgg cgagcggaaa tggcttacga acggggcgga gatttcctgg 6060
aagatgccag gaagatactt aacagggaag tgagagggcc gcggcaaagc cgtttttcca 6120
taggctccgc cccctgaca agcatcacga aatctgacgc tcaaatcagt ggtggcgaaa 6180
ccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctggc ggctccctcg tgcgtctcc 6240
tgttctgcc tticggttta ccggtgtcat tccgtgtta tggccgcgtt tgtctcattc 6300
cacgcctgac actcagttcc gggtaggcag ttcgtccaa gctggactgt atgcacgaac 6360
ccccgttca gtccgaccgc tgcgccttat ccggttaact tcgtcttgag tccaaccgg 6420
aaagacatgc aaaagcacca ctggcagcag ccactggtaa ttgatttaga ggagttagtc 6480
ttgaagtcac gcgccgtta aggctaaact gaaaggacaa gttttggtga ctgcgtcct 6540
ccaagccagt tacctcgggt caaagagttg gtagctcaga gaaccttcga aaaaccgcc 6600
tgcaaggcgg ttttttcgtt ttcaagcaa gagattacgc gcagaccaa acgatctcaa 6660
gaagatcac ttattaatca gataaaatat ttgctcatga gcccgaagtg gcgagccga 6720
tcttccccat cggtagtgtc ggcgatatag gcgccagaa ccgcacctgt ggcgccgtg 6780
atgccggcca cgatgcgtcc ggcgtagagg atctgtcat gttgacagc ttatc 6835

```

<210> 13

<211> 1509

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短 HMGR 编码序列

<400> 13

```

atggttttaa ccaataaaac agtcatttct ggatcgaaag tcaaaagttt atcatctgcg 60
caatcgagct catcaggacc ttcatcatct agtgaggaag atgattcccg cgatattgaa 120
agcttggata agaaaatacg tcctttagaa gaattagaag cattattaag tagtggaat 180
acaaaacaat tgaagaacaa agaggtcgct gccttggta ttacaggtaa gttaccttg 240
tacgctttgg agaaaaaatt aggtgatact acgagagcgg ttgcggtacg taggaaggct 300
ctttcaattt tggcagaagc tcctgtatta gcatctgac gttaccata taaaaattat 360
gactacgacc gcgtatttgg cgcttgtgt gaaaatgtta taggttacat gcctttgcc 420
gttgggtgta taggcccctt gggtatcgat ggtacatctt atcatatacc aatggcaact 480
acagagggtt gtttggtagc ttctgccatg cgtggctgta aggcaatcaa tgctggcgg 540
gggtcaacaa ctgttttaac taaggatggt atgacaagag gccagtagt ccgtttcca 600
actttgaaaa gatctggtgc ctgtaagata tggtagact cagaagaggg acaaacgca 660
attaaaaaag cttttaactc tacatcaaga ttgacgctc tgcaacatat tcaacttgt 720
ctagcaggag atttactctt catgagattt agaacaacta ctggtgacgc aatgggtatg 780
aatatgattt ctaaagggtg cgaatactca ttaaagcaaa tggtagaaga gtatggctgg 840
gaagatatgg aggttgtctc cgcttctggt aactactgta ccgacaaaaa accagctgcc 900
atcaactgga tcgaaggctg tggtaagagt gtcgtcgag aagctactat ccctgggat 960
gttgtcagaa aagtgttaaa aagtgatgtt tccgattgg ttgagttgaa cattgctaag 1020
aatttgggtg gatctgcaat ggctgggtct gttgtggat ttaacgcaca tgcagctaat 1080
ttagtgacag ctgttttctt ggcattagga caagatcctg cacaaaatgt tgaaagttcc 1140
aactgtataa cattgatgaa agaagtgac ggtgatttga gaatttccgt atccatgcca 1200
tccatcgaag taggtacat cggtgggtgt actgttctag aaccacaagg tgccatgttg 1260
gacttattag gtgtaagagg cccgatgct accgctctg gtaccaacgc acgtcaatta 1320
gcaagaatag ttgccigtgc cgtcttgca ggtgaattat cttatgtgc tgccttagca 1380
gccggccatt tggttcaaag tcatatgacc cacaacagga aacctgctga accaacaaaa 1440
cctaacaatt tggacgccac tgatataaat cgtttgaaag atgggtccgt cacctgcatt 1500
aatcctaa
1509

```

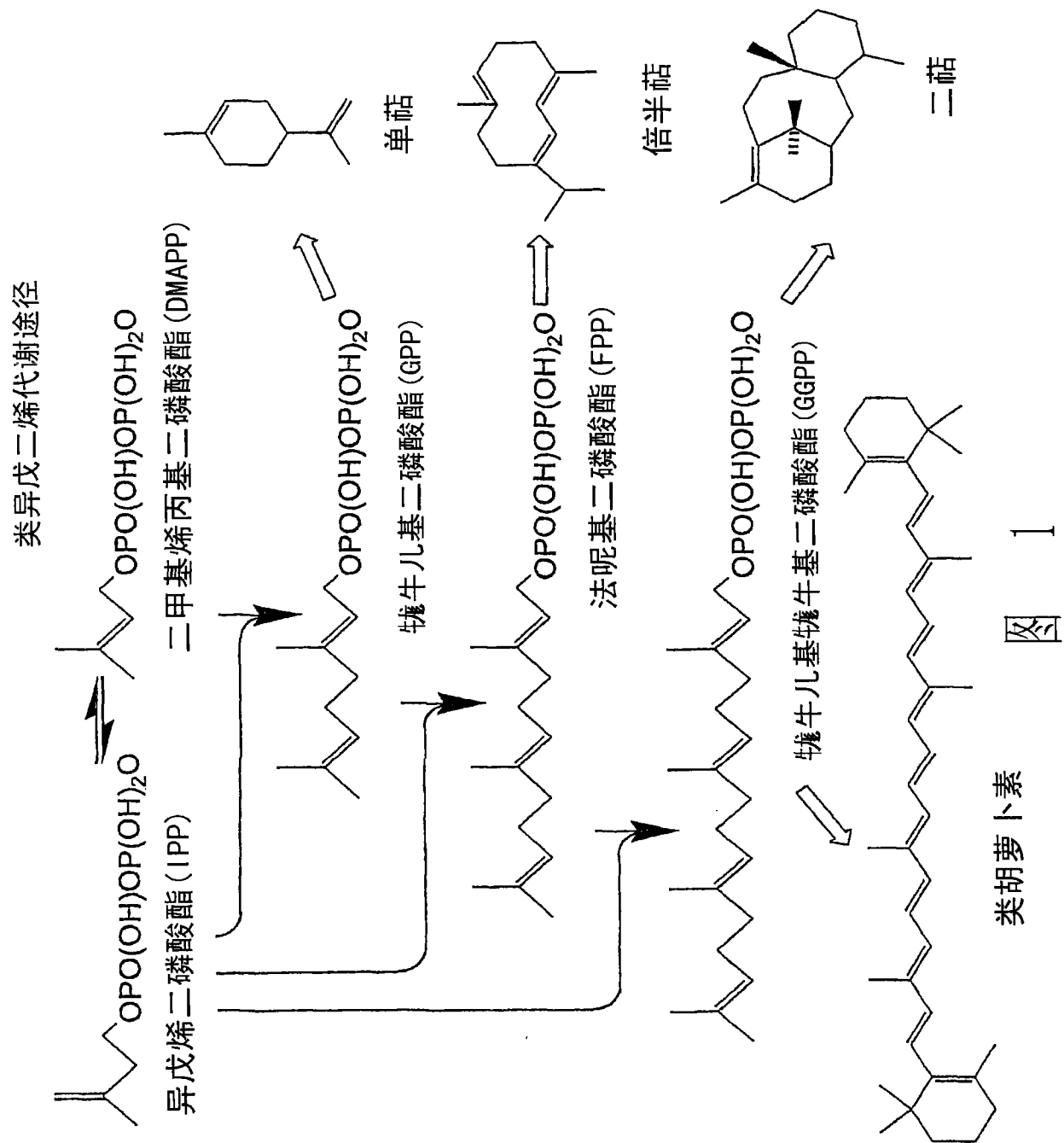


图 1

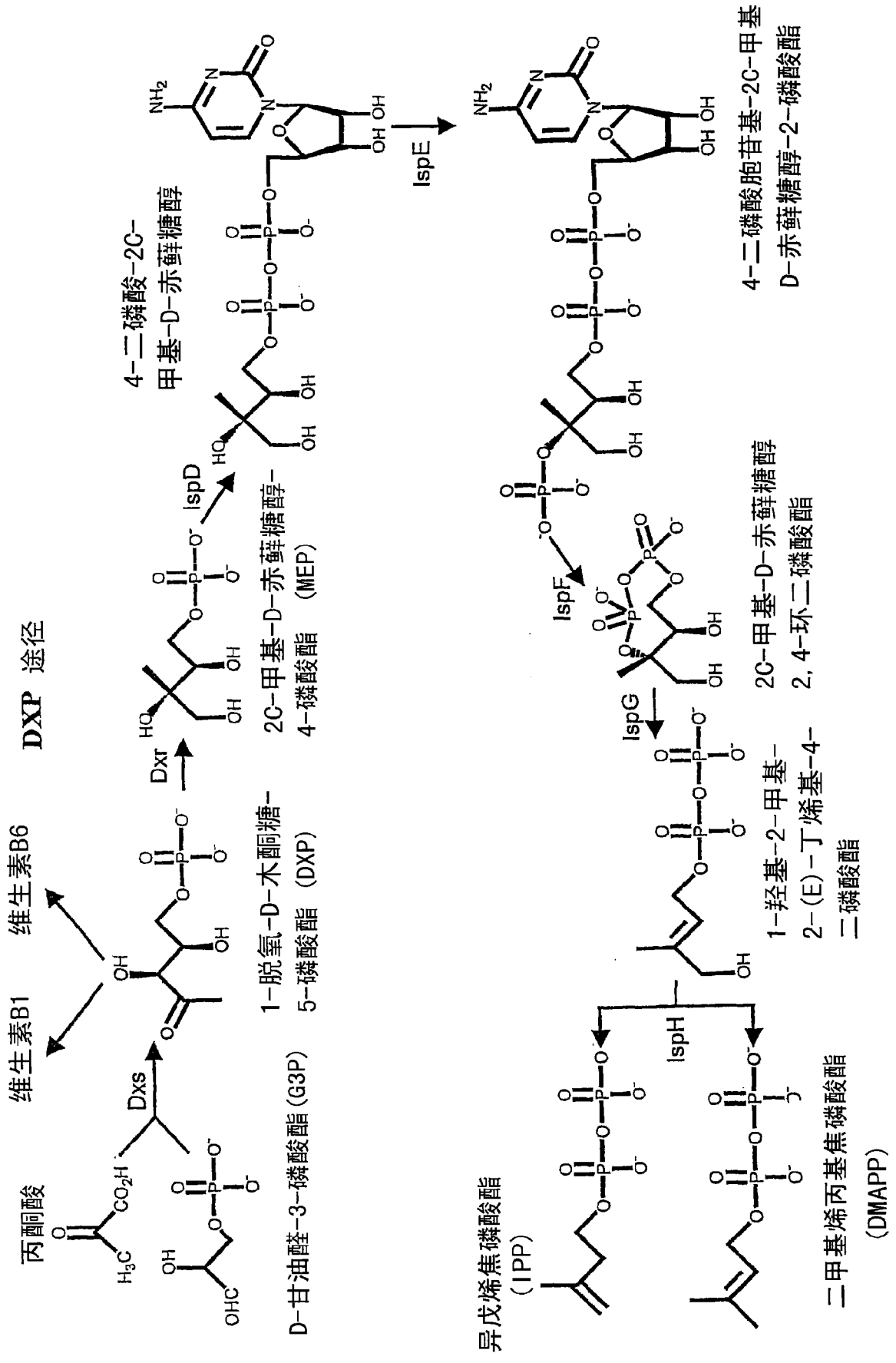


图 3

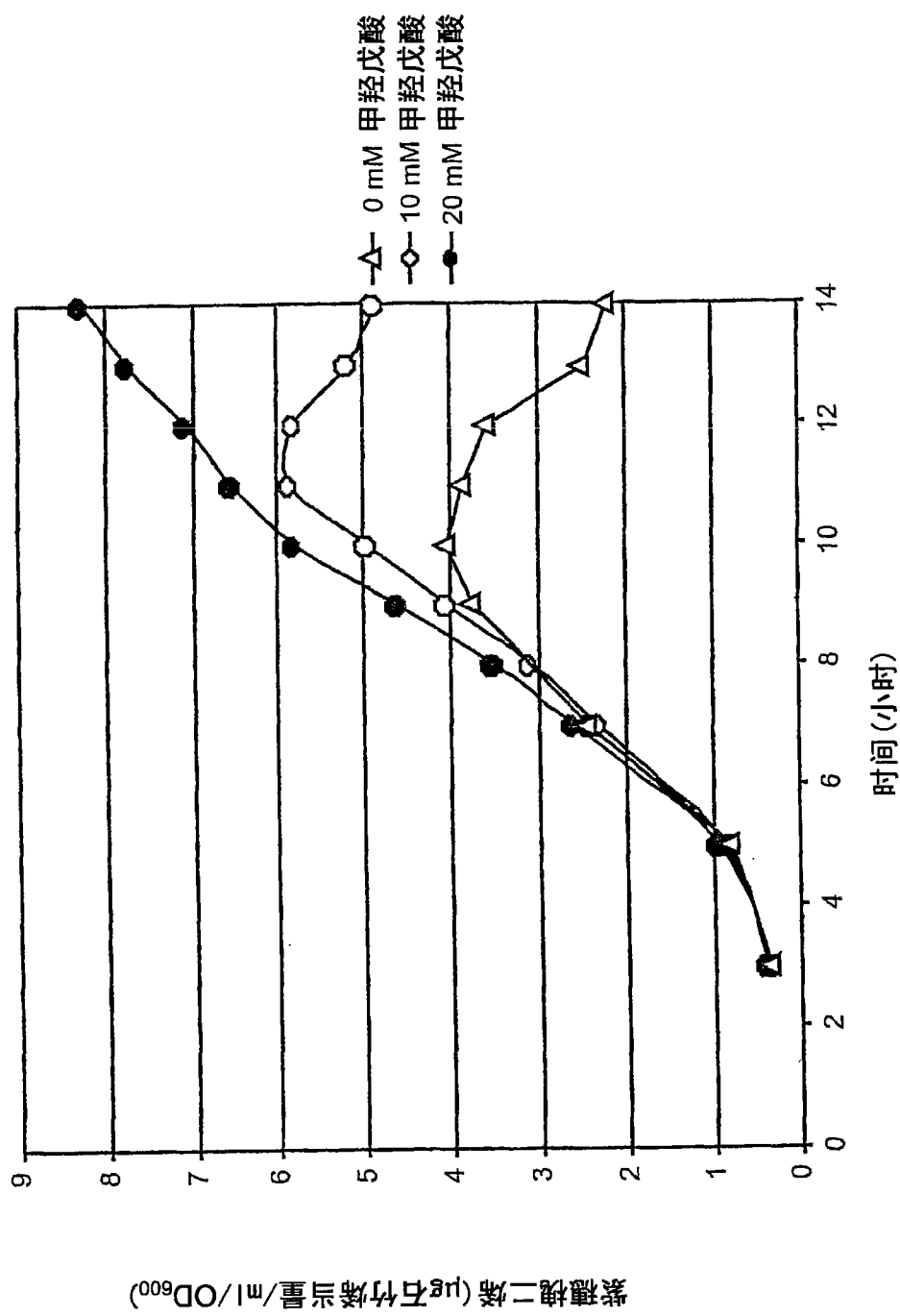


图 4

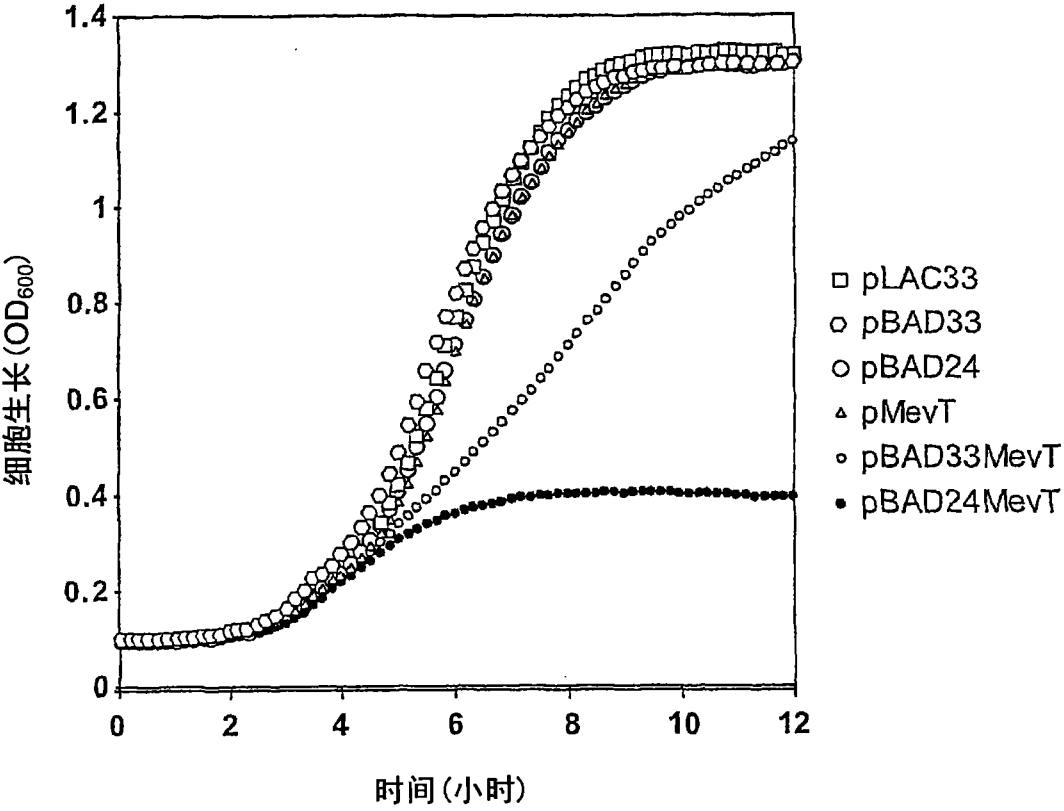


图 5

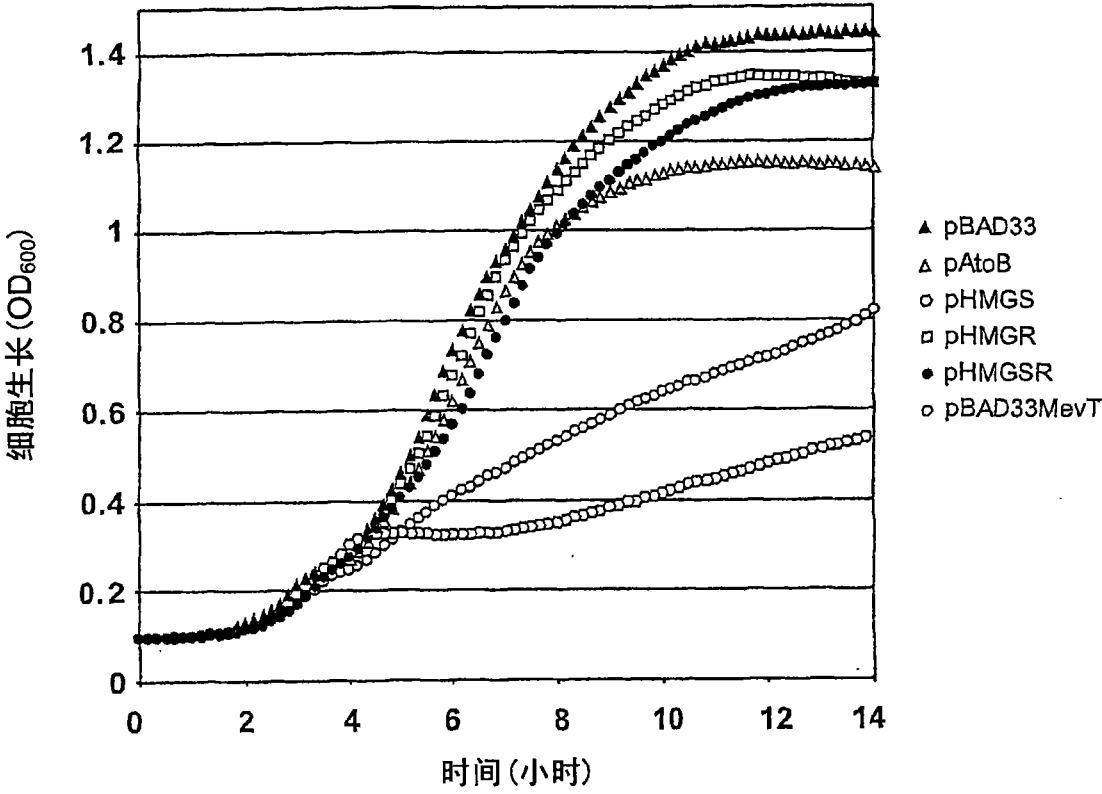


图 6

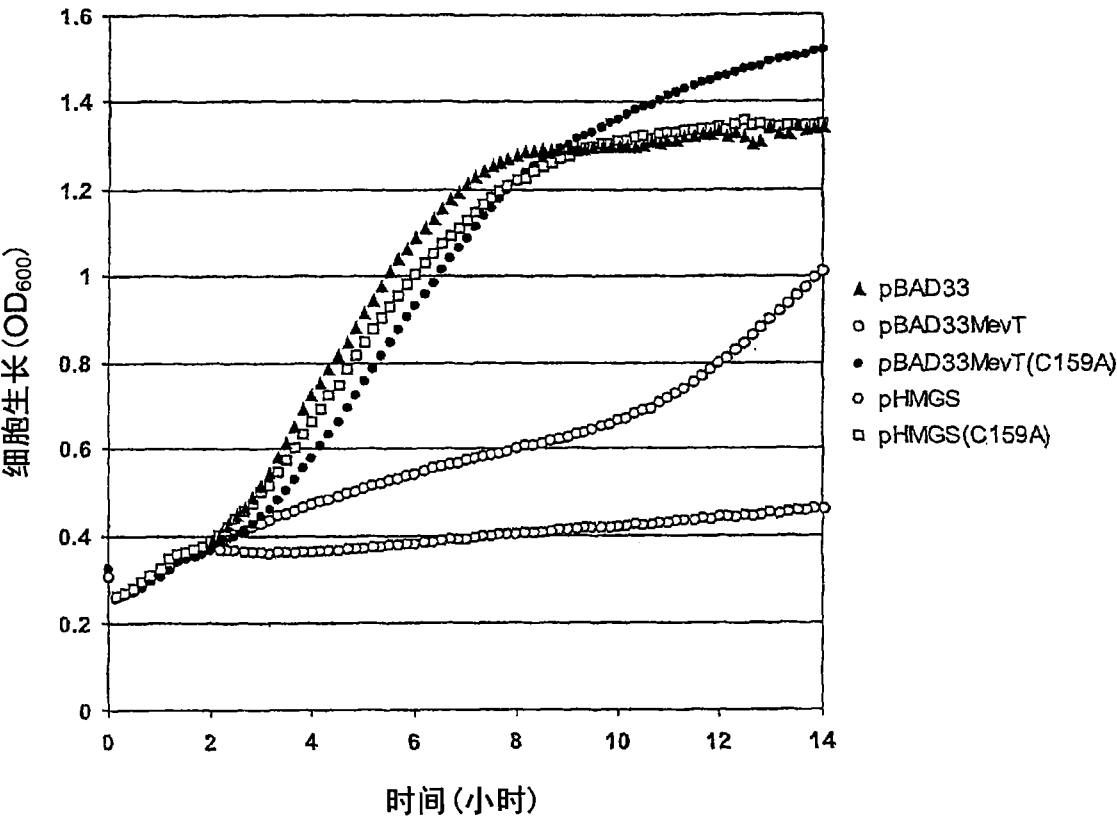


图 7

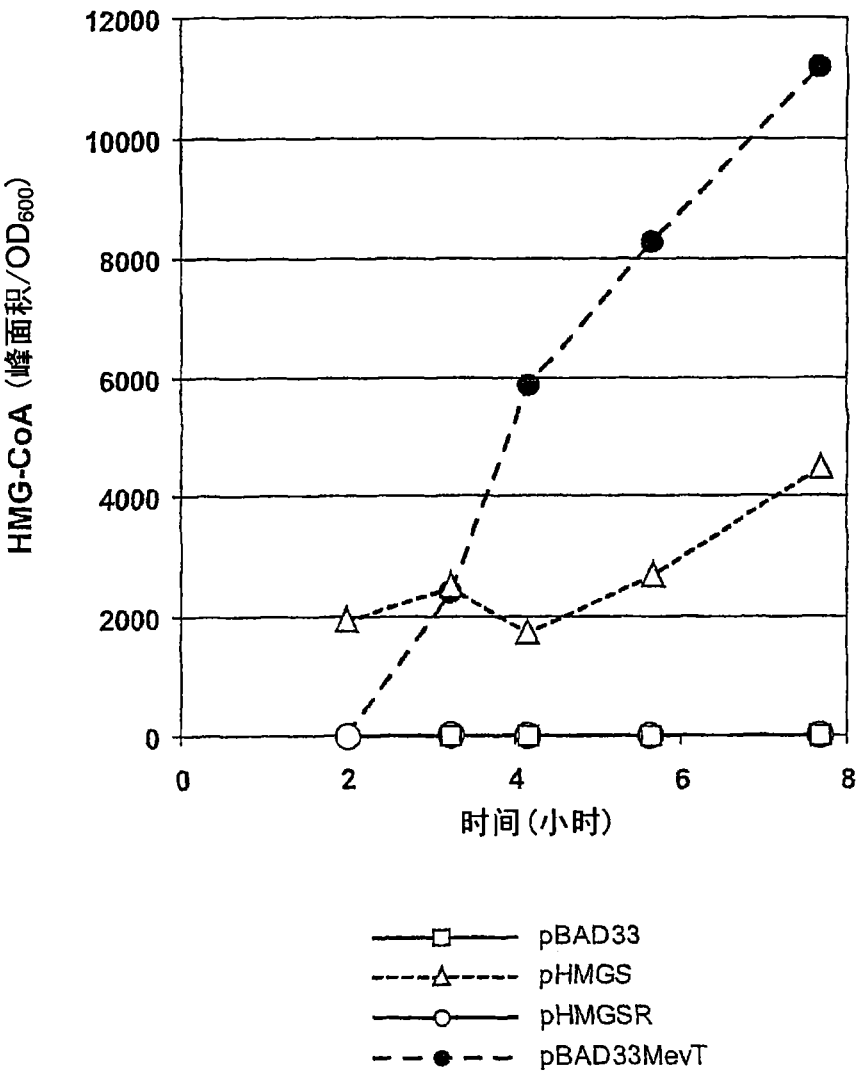


图 8

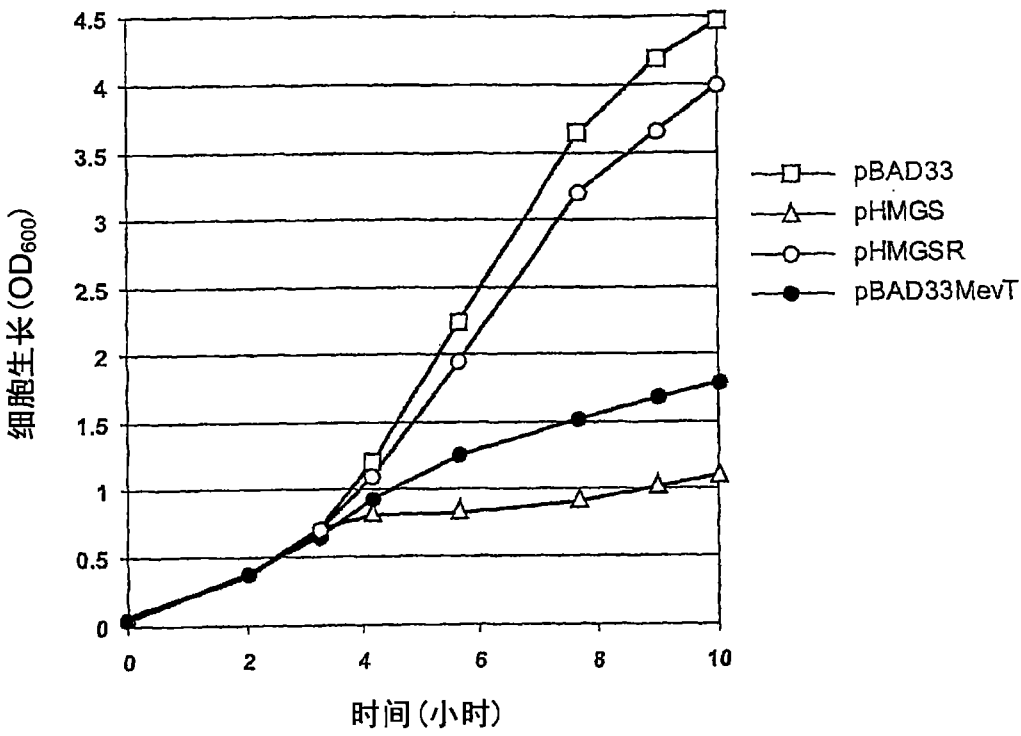


图 9

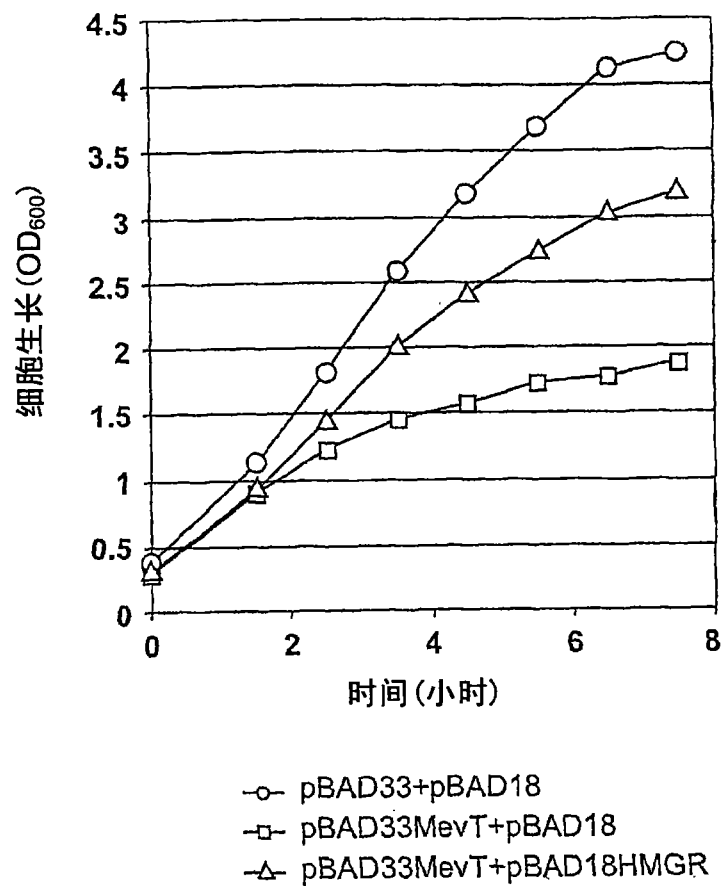


图 10

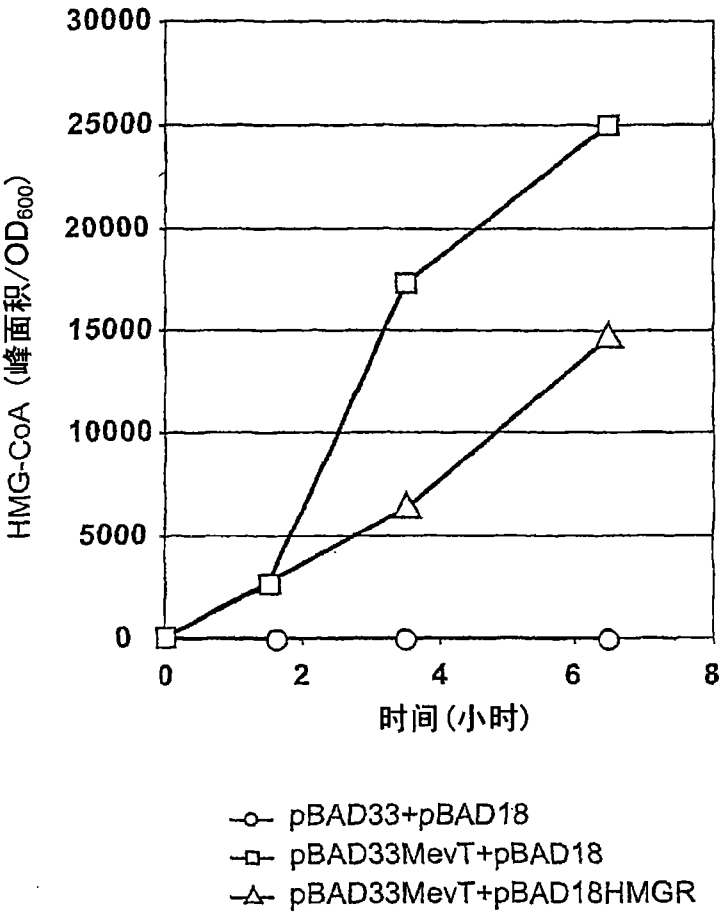


图 11

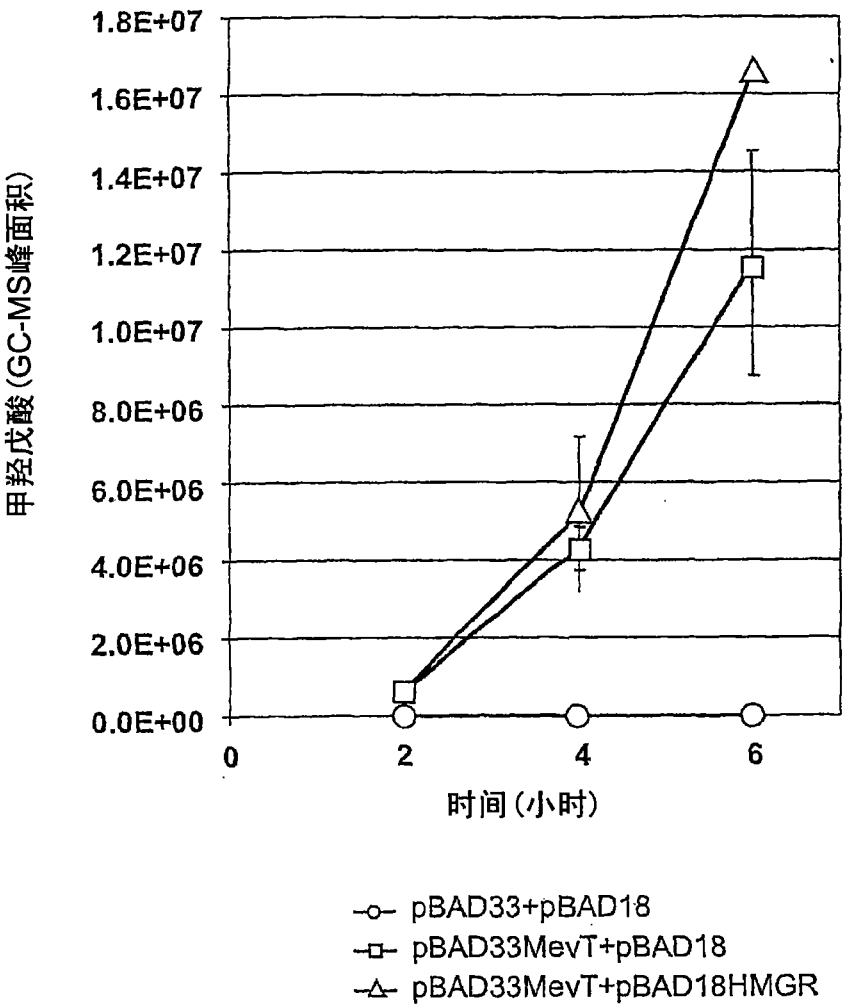


图 12

pBAD24MevT 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCATGCTACTCCGTCAAGCCGTCA
ATTGT

└─▶ araC

CTGATTCGTTACCAATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTACATTTTTCCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCT
CGGGCTGGCCCCGGTGCAATTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAACCAACATTGCGACCGAC
GGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAGCAGCTTCGCCCTGGCTGATACGTTGGTCCCTCGCGCCAGCTTAA
GACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACCGGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCT
GGCGATATCAAATTTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGG
TGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTC
CGAATAGCGCCCTTCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCTTC
ATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCAAGCCAGTAGGCGCGCGGACG
AAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTGGCGGGAA
CAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAAACAAATTCCTCGTCCCTGATTTTTCACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAG
ATTGAGAATATAACCTTTTCATTCACGCGGTGCGTGCATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCCTCAATCGGCGT
TAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTT

araC ◀─┐

TGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGC
CGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATTAAAAGCATTCGTAAACAA
AGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTAT
TTGCACGGCGTCACA

└─▶ P_{BAD} 启动子

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACT
GTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCAGGAGGAATTCACCATGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACTA
GGAGGAATAT

└─▶ atoB

AAAATGAAAAATTGTGTATCGTCAGTGCGGTACGTACTGCTATCGGTAGTTTAAACGGTTCCTCGCTTCCACC
AGCGCCATCGACCTGGGGGCGACAGTAATTAAAGCCGCCATTGAACGTGCAAAAATCGATTACAAACACGTTGAT
GAAGTGATTATGGGTAACGTGTTACAAGCCGGGCTGGGGCAAAATCCGGCGCGTCAGGCACGTGTTAAAAAGCGGG
CTGGCAGAAACGGGTGTGCGGATTACCGGTCAATAAAGTATGTGGTTCGGGTCTTAAAGTGTGGCGCTTGCCGCC
CAGGCCATTACAGGCAGGTACAGGCGCAGAGCATTTGTTGGCGGGGGGTATGGAAAATATGAGTTTAGCCCCCTACTTA
CTCGATGCAAAAGCAGCTCTCGTTATCGTCTTGGAGACGGACAGGTTTATGACGTAATCCTGCGCGATGGCCTG
ATGTGCGCCACCCATGGTTATCATATGGGGATTACCGCCGAAAACGTGGCTAAAGAGTACGGAATTACCCGTGAA
ATGCAGGATGAACCTGGCGCTACATTACAGCGTAAAGCGGCAGCCGCAATTGAGTCCGGTGCTTTTACAGCCGAA
ATCGTCCCGGTAAATGTTGTCACCTCGAAAGAAAACCTTCGTCCTTCAGTCAAGACGAATTCCCGAAAGCGAATTCA
ACGGCTGAAGCGTTAGGTGCATTGCGCCCGGCTTCGATAAAGCAGGAACAGTACCCGCTGGGAACGCGTCTGGT
ATTAACGACGGTGCTGCCGCTCTGGTGATTATGGAAGAATCTGCGGCGCTGGCAGCAGGCCTTACCCCCCTGGCT
CGCATTAACACTGGCGGGGCTGCAACTGGCGGATATTGATCTCATTGAGGCTAATGAAGCATTTGCTGCACAGTTC
CTTGCCGTTGGGAAAAACCTGGGCTTTGATTCTGAGAAAGTGAATGTCAAACGGCGGGGCCATCGCGCTCGGGCAT
CCTATCGGTGCCAGTGGTGCTCGTATTCTGGTCACACTATTACATGCCATGCAGGCACGCGATAAAACGC
TGGGGCTGGCAACACTGTGCATTGGCGGCGGTGAGGAATTGCGATGGTGATTGAACGGTTGAATTAAGGAGGAC
AGCTA

└─▶ HMGS

AATGAACTCTCAACTAACTTTTGTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCAAAAGCAACAACAATTACA
CAATACAACTTGCAAATGACTGAACTAAAAAACAAGACCGCTGAACAAAAACCAGACCTCAAAATGTCCG
TATTAAAGGTATCCAAATTTACATCCAACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTC
TCAAGGTAAATACACAATTGGTCTGGGCCAAACCAACATGTCTTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGAT
GTCCCTAA

图 13A

CTGTTTTGTCTAAGTTGATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAAATTGGTAGATTAGAAGTCGGTACTGAAA
CTCTGATTGACCAAGTCCAAGTCTGTCAAGTCTGTCTTGATGCAATTGTTTGGTGAAAACACTGACGTCGAAGGTA
TTGACACGCTTAATGCTGTGTACGGTGGTACCAACGCTTGTTCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACGCAT
GGGATGGTAGAGACGCCATTGTAGTTTGGCGTGATATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTG
GTGCCGCTACTGTTGCTATGTGGATCGGTCTCGATGCTCCAATTGTATTTGACTCTGTAAAGAGCTTCTTACATGG
AACACGCTTACGATTTTACAAGCCAGATTTACCAGCGAATATCCTTACGTCGATGGTCAATTTTTCATTAACATT
GTTACGTCGAAGGCTCTTGATCAAGTTTACAAGAGTTATTTCCAAGAAGGCTATTTCTAAAGGGTTGGTTAGCGATC
CCGCTGGTTTCGGATGCTTTGAACGTTTGAATAATTTGACTACAACGTTTCCATGTTCCAACCTGTAAATTGG
TCACAAAATCATACGGTAGATTACTATATAACGATTTTCAGAGCCAATCCTCAATTGTTCCAGAAAGTTGACGCCG
AATTAGCTACTCGCGATTATGACGAATCTTTAACCGATAAGAACATTTGAAAAAACCTTTTCTTAATGTTGCTAAGC
CATTCACAAAAGAGAGAGTTGCCCAATCTTTGATTGTTTCCAACAAACACAGGTAACATGTACACCGCATCTGTTT
ATGCCGCTTTGCATCTCTATTAACTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGGCAAGCGTGTGGTTTTATTTCTT
ACGGTTCCGGTTTAGCTGCATCTCTATATTCTTGCAAAATTGTTGGTGACGTCCAACATATTATCAAGGAATTAG
ATATTACTAACAAATTAGCCAAGAGAATCACCGAACTCCAAGGATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAA
ATGCCCATTTGAAGAAGAACTTCAAACCTCAAGGTTCCATTGAGCATTTGCAAAGTGCTGTTTACTACTTGACCA
ACATCGA

HMGS



截短的 HMGR

TCACAAATTTAGAAGATCTTACGATGTTAAAAATAAGGAGGATTACACTATGGTTTAAACCAATAAAACAGTCA
TTTCTGGATCGAAAGTCAAAGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATCTAGTGAGGAAG
ATGATTCCCAGCATATTGAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCTTTAGAAGAAATAGAAGCATTTAAGTAGTG
GAAATACAAAACAATTGAAGAACAAGAGGTCGCTGCCTTGGTTATTACCGTAAGTTACCTTTGTACGCTTTGG
AGAAAAAATTAGGTGATCTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTTCAATTTTGGCAGAAGCTCCTG
TATTAGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAAATTATGACTACGACCGCGTATTTGGCGCTTGTGTTGAAAAATGTTA
TAGGTTACATGCTTTGCCCGTTGGTGTATAGGCCCTTGGTTATCGATGGTACATCTTATCATATAACCAATGG
CAACTACAGAGGGTTGTTTGGTAGCTTCTGCCATGCGTGGCTGTAAGGCAATCAATGCTGGCGGTGGTGCAACAA
CTGTTTTAACTAAGGATGGTATGACAAGAGGCCCCAGTAGTCCGTTTCCCAACTTTGAAAAGATCTGGTGCTGT
AGATATGGTTAGACTCAGAAGAGGGACAAAACGCAATTAAGAAAGCTTTTAACTCTACATCAAGATTTCACGTC
TGCAACATATTCAAACCTGTCTAGCAGGAGATTTACTCTTCATGAGATTAGAACAACCTACTGGTGACGCAATGG
GTATGAATATGATTTCTAAAGGTGTGCAATACTCATTAAGCAAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGG
AGGTTGTCTCCGTTTCTGGTAACTACTGTACCGACAAAAAACAGCTGCCATCAAATGGATCGAAGGTGCTGGTA
AGAGTGTCTGTCGAGAAGCTACTATTCTGGTGATGTTGTGCAAAAAGTGTAAAAAGTGATGTTTCCGCATTGG
TTGAGTTGAACATTGCTAAGAATTTGGTTGGATCTGCAATGGCTGGGTCTGTTGGTGGATTAAACGCACATGCAG
CTAATTTAGTGACAGCTGTTTCTTGGCATTAGGACAAGATCCTGCACAAAATGTTGAAAGTTCCAACCTGTATAA
CATTGATGAAAGAAGTGGACGGTGATTTGAGAATTTCCGTATCCATGCCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGTG
GTGGTACTGTTCTAGAACCACAAGGTGCCATGTTGGACTTATTAGGTGTAAGAGGCCCGCATGCTACCGCTCCCTG
GTACCAACGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTGCCCTGTGCCGTCTTGGCAGGTGAATTATCCTTATGTGCTGCCC
TAGCAGCCCGCCATTTGGTTCAAAGTCATATGACCCACAACAGGAAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAAATT
TGGACGCCACTGATATAAAAT

截短的 HMGR



rrnB 终止子



CGTTTGAAAGATGGGTCCGTCACCTGCATTAATCCTAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTGGC
GGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCCT
GGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAATCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGT
GTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGC
CTTTCGTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGT
TGCGAAGCAACGGCCCGGAGGTTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGC
CATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTCT

氨苄西林耐药盒

rrnB



ACAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGC
TTCAA

图 13B

TAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGC
 CTTCCCTGTTTTTGCCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT
 TACATCGAAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC
 ACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTCACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTTCGCCGCATA
 CACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
 GAATTATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG
 AAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAAT
 GAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTGACCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAC
 GGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT
 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
 ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATG
 GATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTTGGT
 AACTGTGACACCAAGTTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCG
 GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCT
 TCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGT
 GCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG
 GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTTGAACAACACTCAAC
 CCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATT
 TAACAAAATTTAACGCGAATTTTAACAA

修饰的 pBR322 起始位点

ATATTAACGTTTACAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACG
 TGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCG
 CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
 TCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG
 CCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
 TGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
 GGGGGGTTCTGTGCACAGCCAGCTTGGAGCGAACCACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG
 AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG
 CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCG
 TCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCCT
 GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC
 CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA
 GCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATAGGGTCATGGCTGCGCCCCGA
 CACCCGCCAACACCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACC
 GTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCATACCCGAACGCGCGAGGCAGCAAGGATGGCGCC
 CAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCAGCCGAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGC
 CCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCAC
 GATGCGTCCGGCGTAGAGGATCTGCTCATGTTTGACAGCTTATC (SEQ ID NO:1)

图 13C

pBAD33MevT 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCA
ATTGT

CTGATTTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACCTTTTCTTCAACCCGGCACGGAACTCGCT
CGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGAC
GGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGTCTAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTTCCTCGCGCCAGCTTAA
GACGCTAATCCCTAACTGTCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCT
GGCGATATCAAAATTCGTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGG
TGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTATCGCCAGCAGCTC
CGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCCCGGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGGCTTC
ATCCGGGCGAAAGAACCCTGATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACG
AAAGTAAACCCCACTGGTGATACCATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAA
CAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAAACAAATTCCTGCTCCCTGATTTTTCACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAG
ATTGAGAAATATAACCTTTTCATTCCAGCGGTGGTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGT
TAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTT

TGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTGAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGC
CGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAAACCGGTAACCCCGCTTATTAAGGACATTCTGTAAACAA
AGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGCTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTAT
TTGCACGGCGTCAACA

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACT
GTTC

TCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACTAGGAGGAATA
TAAATGAAAAATTGTGTCAATCGTCAGTGCAGTACGCTATCGGTAGTTTTAACGGTTCACTCGCTTCCAC
CAGCGCCATCGACCTGGGGGCGACAGTAATTAAAGCCGCCATTGAACGTGCAAAAAATCGATTACAAACAGCTTGA
TGAAGTGATTATGGGTAACTGTTACAAGCCGGGCTGGGGCAAATCCGGCGCGTCAGGCACGTGTTAAAAGCGG
GCTGGCAGAAACGGTGTGCGGATTACCGGTCAATAAAGTATGTGGTTGCGGTCTTAAAAGTGTGGCGCTTGCCGC
CCAGGCCATTACAGGCAGGTGAGCGCAGAGCATTTGTGGCGGGGGCTATGGAAAATATGAGTTTAGCCCCCTACTT
ACTCGATGCAAAAGCACGCTCTGGTTATCGTCTTGGAGACGGACAGSTTTATGACGTAATCCTGCGCGATGGCCT
GATGTGCGCCACCATGGTTATCATATGGGGATTACCGCCGAAAACGTGGCTAAAGAGTACGGAATTACCCGTGA
AATGCAGGATGAACCTGGCGCTACATTCACAGCGTAAAGCGGCAGCCGCAATTGAGTCCGGTGCCTTTTACAGCCGA
AATCGTCCCGGTAAATGTTGTCACCTCGAAAGAAAACCTTCGTCTTCAGTCAAGACGAATTCGCCAAAGCGAATTC
AACGGCTGAAGCGTTAGGTGCATTGCGCCCGGCCCTTCGATAAAGCAGGAACAGTCACCGCTGGGAACGCGTCTGG
TATTAACGACCGGTGCTGCCGCTCTGGTGATTATGGAAGAATCTGCGCGCTGGCAGCAGGCCCTACCCCCCTGGC
TCGCATTAAAAGTTATGCCAGCGGTGGCGTGCCCCCGCATTTGATGGGTATGGGGCCAGTACCTGCCACGCAAAA
AGCGTTACAACCTGGCGGGGCTGCAACTGGCGGATATTGATCTCATTGAGGCTAATGAAGCATTTGCTGCACAGTT
CCTTGCCGTTGGGAAAACCTGGGCTTTGATTCTGAGAAAGTGAATGTCAACGGCGGGGCGCATCGCGCTCGGGCA
TCCTATCGGTGCCAGTGGTGCTCGTATTCGCTCACACATTACATGCCATGCAGGCACGCGATAAAACGCTGGG

GCTGGCAACACTGTGCATTGGCGGCGGTACGGGAATTGCGATGGTGATTGAACGGTTGAATTAAGGAGGACAGCT
AAATGAACTCTCAACTAACTTTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCAAAAGCAACAACAATTAC
ACAATACAACTTGCAAATGACTGAACATAAAAAACAAAAGACCGCTGAACAAAAAACAGACCTCAAATGTGCG
GTATTAAAGGTATCC

图 14A

AAATTTACATCCCAACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTCTCAAGGTAAATACA
CAATTGGTCTGGGCCAAACCAACATGTCTTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGATGTCCCTAACTGTTT
TGTCTAAGTTGATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAATTTGGTAGATTAGAAGTCGGTACTGAACTCTGA
TTGACAAGTCCAAGTCTGTCAAGTCTGTCTTGATGCAATTGTTTGGTGAAAACACTGACGTCGAAGGTATTGACA
CGCTTAATGCCTGTTACGGTGGTACCAACGGGTTGTTCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACGCATGGGATG
GTAGAGACGCCATTGTAGTTTGGCGGTGATATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTGGTGCCG
GTAAGTGTGCTATGTGGATCGGTCTGATGCTCCAATTGTATTGTACTCTGTAAGAGCTTCTTACATGGAACACG
CCTACGATTTTTTACAAGCCAGATTTTACCAGCGAATATCCTTACGTCGATGGTCATTTTTTCATTAACCTTGTACG
TCAAGGCTCTTGATCAAGTTTACAAGAGTTATTCCAAGAAGGCTATTTCTAAAGGGTTGGTTAGCGATCCCGCTG
GTTCCGATGCTTTGAACGTTTTGAAATATTTGACTACAACGTTTTCCATGTTTCAACCTGTAAATTGGTCACAA
AATCATACGGTAGATTACTATATAACGATTTTACAGGCCAATCCTCAATTGTTCCAGAAGTTGACGCCGAATTAG
CTACTCGCGATTATGACGAATCTTTAACCGATAAGAACATTGAAAAAACTTTTTGTTAATGTTGCTAAGCCATTCC
ACAAAGAGAGATTGGCCCAATCTTTGATTGTTCCAAACAAACACAGGTAACATGTACACCGCATCTGTTTATGCCG
CCTTTGCTATCTATTAACTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGGCAAGCGTGTGGTTTATTTTCTTACGGTT
CCGGTTTAGCTGCATCTCTATATTCTTGCAAAATTGTTGGTGACGTCACATATTATCAAGGAATTAGATATTA
CTAACAAATTAGCCAAGAGAATCACCGAAATCCAAAGGATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAAATGCC
ATTTGAAGAAGAACTTCAAACCTCAAGGTTCCATTGAGCATTGCAAGTGCTTTACTACTTGACCAACATCG
ATGAC

HMGS



截短的 HMGR

AAATTTAGAAGATCTTACGATGTTAAAAATAAGGAGGATTACACTATGGTTTTTAACCAATAAACAGTCATTTCT
TGGATCGAAAGTCAAAAGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATCTAGTGAGGAAGATGA
TTCCCGCGATATTGAAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCTTTAGAAGAATTAGAAGCATTATTAAAGTAGTGGAAA
TACAAAACAATTGAAGAACAAAGAGGTCGCTGCCCTGGTTATTACGGTAAGTTACCTTTGTACGCTTTGGAGAA
AAAATTAGGTGATACTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTTCAATTTTGGCAGAAGCTCCTGTATT
AGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAAATTATGACTACGACCGCGTATTTGGCGCTTGTGTGAAAATGTTATAGG
TTACATGCCTTTGGCCGTTGGTGTATAGGCCCTTGGTTATCGATGGTACATCTTATCATATACCAATGGCAAC
TACAGAGGGTTGTTTGGTAGCTTCTGCCATCGCTGGCTGTAAGGCAATCAATGCTGGCGGTGGTGCAACAACCTGT
TTTAACTAAGGATGGTATGACAAGAGGCCAGTAGTCCGTTTCCCAACTTTGAAAAGATCTGGTGCCTGTAAAGAT
ATGGTTAGACTCAGAAGAGGGACAAAACGCAATTAAAAAGCTTTTAACTCTACATCAAGATTTGCACGCTGCA
ACATATTCAAACCTGTCTAGCAGGAGATTTACTCTTCATGAGATTTAGAACAACCTACTGGTGACGCAATGGGTAT
GAATATGATTTCTAAAGGTGTGCAATACTCATTAAGCAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGGAGGT
TGCTCTCCGTTTCTGGTAACCTACTGTACCGACAAAAACCAGCTGCCATCAACTGGATCGAAGGTCTGGTAAGAG
TGTCGTGCGAGAAGCTACTATTCTGGTGATGTTGTGCAAAAAGTGTTAAAAAGTGATGTTTCCGCATTGGTTGA
GTTGAACATTGCTAAGAATTTGGTTGGATCTGCAATGGCTGGGTCTGTTGGTGGATTTAACGCACATGCAGCTAA
TTTAGTGACAGCTGTTTTCTTGGCATTAGGACAAGATCCTGCACAAAATGTTGAAAGTTCCAACCTGTATAACATT
GATGAAAGAAGTGGACGGTGATTTGAGAATTTCCGTATCCATGCCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGTGGTGG
TACTGTTCTAGAACCACAAGGTGCCATGTTGGACTTATTAGGTGTAAGAGGCCCGCATGCTACCGCTCCTGGTAC
CAACGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTGCCGTGTGCCGTCTTGGCAGGTGAATTATCCTTATGTGCTGCCCTAGC
AGCCGGCCATTTGGTTCAAAGTCATATGACCCACAACAGGAAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAAATTTGGA
CGCCACTGATATAAATCGTT

截短的 HMGR



rmb 终止子

TGAAAGATGGGTCCGTCACCTGCATTAAATCCTAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGAT
GAGAGAAGATTTTACGCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAACGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCG
GCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGG
GGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTT
CGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCG
AAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATC
CTGACGGATGGCCTTTTTTGGCTTTCTACAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCT
CATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGT
CGCCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGA
TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATA
GACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTATGTCTGAT
AAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC
GTAGTTATCTACAGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCA
CTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTACGCGC

图

14B

CCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAG
CGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGG
GGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCAC
GTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
TGTTCCAACTTTGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGG
CCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTT
AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGA
GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAA
ACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAC
GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAATCT
GTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGGGCATTGAGAAGCACACGGTCACACTGC
TTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCTGCCCCTGAACCGACGA
CCGGGTCGAATTTGCTTTTGAATTTCTGCCATTATCCGCTTATTATCACTTATTTCAGG

氯霉素的耐药基因

GTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAATTACGCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTAC
TGTTGTAAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGGCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGC
ATCAGCACCTTGTGCGCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCC
ACGTTTAAATCAAACCTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTA
GGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAATCGTCG
TGGTATTCACCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCC
CATATCACCAGCTCACCGTCTTTCAATTGCCATACGGAATTCGGGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGA
ATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTC
TGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCCTCAA

AATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCT
TAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCAATTATGGTGAAAGTTGGAAC
CTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAG
GATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCA
ACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGT
TCAGCTACTGACGGGGTGGTGCGTA

pACYC184 起始位点

ACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTATACCTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGT
CAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATAT
TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTGCTTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGC
GGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCCGCGCAAAGCCGTTTTTCCATA
GGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCCTGCCTTTCCGTTTACCGGTGTCAATC
CGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCTGACACTCAGTTCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGCAC
TGTATGCACGAACCCCCCGTTCACTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAA
AGACATGCAAAAGCACCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGG
TTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGT
AGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACC
AAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTTGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATC
TTCCCCATCGGTGATGTGCGGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCG
TCCGGCGTAGAGGATCTGCTCATGTTTGACAGCTTATC (SEQ ID NO:2)

图 14C

pMevT 质粒序列

ATCGATGCATGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCACA
GGTTT

CCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTA
CACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGAC
CATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCCCCTCGAGGTC
GACGGTATCGATAAG

CTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACTAGGAGGAATATAAAATGAAAAATGTGTCA
TCGTCACTGCGGTACGTACTGCTATCGGTAGTTTAAACGGTTCACCTCGCTTCCACCAGCGCCATCGACCTGGGGG
CGACAGTAATTAAGCCGCCATTGAACGTGCAAAAATCGATTCAACAACAGTTGATGAAGTGATTATGGGTAAACG
TGTTACAAGCCGGGCTGGGGCAAAAATCCGGCGCGCTCAGGCAGTGTAAAAAGCGGGCTGGCAGAAACGGTGTGCG
GATTCACCGTCAATAAAGTATGTGGTTCGGGTCTTAAAGTGTGGCGCTTCCCGCCAGGCCATTAGGCAGGTC
AGGCGCAGAGCAATTGTGGCGGGGGTATGAAAAATAGAGTTAGCCCCCTACTTACTCGATGCAAAAGCAGCCT
CTGGTTATCGTCTTGGAGACGGACAGGTTATGACGTAATCCTGCGCGATGGCCTGATGTGCGCCACCCATGGTT
ATCATATGGGGATTACCGCCGAAAACGTGGCTAAAGAGTACGGAATTACCGTGAAATGCAGGATGAACCTGGCGC
TACATTCACAGCGTAAAGCGGCAGCCGCAATTGAGTCCGGTGCCTTTACAGCCGAAATCGTCCCGGTAAATGTG
TCACTCGAAAGAAAACCTTCGTCTTCAGTCAAGACGAATTCGCCGAAAGCGAATTCACCGCTGAAGCGTTAGGTG
CATTGCGCCCGGCTTCGATAAAGCAGGAACAGTCACCGCTGGGAACCGCTCTGGTATTAACGACGGTGTGCGG
CTCTGGTGAATTATGGAAGAAATCTGCGGCGCTGGCAGCAGGCCTTACCCCCCTGGCTCGCATTAAAAGTTATGCCA
GCGGTGGCGTGCCCCCGCATTGATGGGTATGGGGCCAGTACCTGCCACGCAAAAAGCGTTACAACCTGGCGGGGC
TGCAACTGGCGGATATTGATCTCATTGAGGCTAATGAAGCATTGCTGCACAGTTCCTTGCCGTTGGGAAAAACC
TGGGCTTTGATTCTGAGAAAGTGAATGTCAACGGCGGGGCCATCGCGCTCGGGCATCCTATCGGTGCCAGTGGTG
CTCGTATTCTGGTCACACTATTACATGCCATGCAGGCACGCGATAAAAACGCTGGGGCTGGCAACACTGTGCATTG

GCGGCGGTCAAGGAATTGCGATGGTGATTGAACGGTTGAATTAAGGAGGACAGCTAAATGAACTCTCAACTAAA
CTTTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCAAAAGCAACAACATTACACAATACAACTTGCAAAATG
ACTGAACATAAAAAACAAAAGACCGCTGAACAAAAAACAGACCTCAAAATGTGGTATTAAAGGTATCCAAATT
TACATCCCAACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTCTCAAGGTAAATACACAATT
GGTCTGGGCCAAACCAACATGTCTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGATGTCCCTAACTGTTTTGTCT
AAGTTGATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAAATTGGTAGATTAGAAGTCCGGTACTGAAACTCTGATTGAC
AAGTCCAAGTCTGTCAAGTCTGTCTTGAATGCAATTGTTTTGGTGAACAACTGACGTGCAAGGTATTGACACGCTT
AATGCCCTGTTACGGTGGTACCAACGCGTTGTTCAACTCTTTGAACCTGGAATTGAATCTAACCGCATGGGATGGTAGA
GACGCCATTGTAGTTTGGCGTGATATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTGGTGCCGGTACT
GTTGCTATGTGGATCGGTCCGTGATGCTCCAATTGTATTGACTCTGTAAGAGCTTCTTACATGGAACACGCCTAC
GATTTTTACAAGCCAGATTTACAGCGCAATATCCTTACGTCGATGGTCATTTTTTCACTTAACTTGTTACGTCAAG
GCTCTTGATCAAGTTTACAAGAGTTATTCCAAGAAGGCTATTTCTAAAGGGTTGGTTAGCGATCCCGCTGGTTCCG
GATGCTTTGAACGTTTTGAAATATTTTCGACTACAACGTTTTTCCATGTTTCCAACCTGTAAATTTGGTCACAAAATCA
TACGGTAGATTACTATATAACGATTTTCAGAGCCAATCCTCAATTGTTTCCAGAAGTTGACGCCGAATTAGCTACT
TCGGATTATGACGAATCTTTAACCATAAGAACATTGAAAAACTTTTGTTAATGTTGCTAAGCCATTCCACAAA
GAGAGAGTTGCCCAATCTTTGATTGTTTCCAACAAACACAGGTAACATGTACACCGCATCTGTTTATGCCGCTTT
GCATCTCTATTAACTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGGCAAGCGTGTGTTGTTTATTTTCTTACGGTTCGGGT
TTAGCTGCATCTCTATATTCTTGCAAAATTTGTTGGTGACGTCCAACATATTATCAAGGAATTAGATATTACTAAC
AAATTAGCCAAGAGAATCACCGAACTCCAAGGATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAAATGCCCATTTG
AAGAAGAACTTCAAACCTCAAGTTCCATTGAGCATTGTGCAAGTGGTGTCTTACTACTTGACCAACATCGATGAC
AAATTTAGAAGATCTTACGA

HMGS ← | → 截短的 HMGR
TGTTAAAAATAAGGAGGATTACACTATGGTTTTTAACCAATAAAACAGTCATTTCTGGATCGAAAGTCAAAAGTT
TATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATCTAGTGAGGAAGATGATTCCCGCGATATTGAAAGCT
TGGATAAGAAAATACGTCTTTAGAAGAATTAGAAGCATTATTAAGTAGTGGAATACAAAACAATTGAAGAACA
AAGAGGTGCTGCTT

图 15A

TGGTTATTTCACGGTAAGTTACCTTTGTACGCTTTGGAGAAAAAATTAGGTGATACTACGAGAGCGGTTGCGGTAC
GTAGGAAGGCTCTTTCAATTTTGGCAGAAGCTCCTGTATTAGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAATTATGACT
ACGACCGCGTATTTTGGCGCTTTGTTGTGAAAAATGTTATAGGTTACATGCCCTTTGCCCGTTGGTGTATAGGCCCT
TGGTTATCGATGGTACATCTTATCATATACCAATGGCAACTACAGAGGGTTGTTTGGTAGCTTCTGCCATGCGTG
GCTGTAAGGCAATCAATGCTGGCGGTGGTGCAACAACCTGTTTTAACTAAGGATGGTATGACAAGAGGCCAGTAG
TCCGTTTCCCAACTTTGAAAAGATCTGGTGCTGTAAAGATATGGTTAGACTCAGAAGAGGGACAAAACGCAATTA
AAAAAGCTTTTAACTCTACATCAAGATTTGCACGCTCTGCAACATATTCAAACCTTGTCTAGCAGGAGATTTACTCT
TCATGAGATTTAGAACAACACTACTGGTGACGCAATGGGTATGAATATGATTTCTAAAGGTGTGCAATACTCATTA
AGCAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGGAGGTTGTCTCCGTTTCTGGTAACTACTGTACCGACAAAA
AACCAGCTGCCATCAACTGGATCGAAGGTCTGGTAAAGAGTGTCTGCGCAGAAGCTACTATTCTGGTGATGTTG
TCAGAAAAGTGTAAAAAGTGATGTTTCCGCATTGGTTGAGTTGAACATTGCTAAGAATTTGGTTGGATCTGCAA
TGGCTGGGTCTGTTGGTGGATTTAACGCACATGCAGCTAATTTAGTGACAGCTGTTTTCTTGGCATTAGGACAAG
ATCCTGCACAAAATGTTGAAAGTTCCAACCTGTATAACATTGATGAAAGAAGTGGACGGTGATTTGAGAATTTCCG
TATCCATGCCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGTGGTGGTACTGTTCTAGAACCACAAGGTGCCATGTTGGACT
TATTAGGTGTAAGAGGCCCGCATGCTACCGCTCCTGGTACCAACGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTGCCTGTG
CCGTCTTGGCAGGTGAATTATCCTTATGTGCTGCCCTAGCAGCCGGCCATTGGTTCAAAGTCATATGACCCACA
ACAGGAAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAAATTTGGACGCCACTGATATAAATCGTTTGAAGATGGGTCCG
TCACC

截短的 *HMGR*



rrnB 终止子

TGCATTAAATCCTAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTG
ATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCA
CCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCCGAGAGTA
GGGAACCTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCTGTTTTATCTGTTGTTTTGTC
GGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCCAAGCAACGGCCCGGAGGGTG
GCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCG
GTTTTCTACAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGAT
AATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTG
CGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGTCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTG
CAGCAAATATTAACTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAA
AGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCG
TGGGTCTCGCGGTATCATTTGAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG
GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTG
TGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCCT
TTCTCGCCACGTTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT
TACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTTGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTGCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTTGAACAACACTCAACCCTA
TCTCGGGCTATTCTTTTGAATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC
AAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGAT
AATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTT
TGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACT
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCTGCTCTGCTA
ATCCTGTTACCAAGTGGGGCATTTGAGAAGCACAGGTCACACTGCTTCCGCTAGTCAATAAACCGGTAAACCGAC
AATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCCTGCCCTGAACCGACGCGGTCGAATTTGCTTTTGAATTTCTGCC
ATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCACCGGCTTTAAGG



氯霉素耐药基因

GCACCAATAACTGCCTTAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCAT
TCTGCCGACATGGAAGCCATCAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTG
CGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGT
GAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTTC
ACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAATCGTCTGGTATTCACTCCAGAGCGA
TGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGAAAACGGTGTAAACAGGGTGAACACTATCCCATATCACAGCTCACCGTCT
TTTCATTGCCATACGGAATTCGGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTT
GTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGC
AACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCAT

图 15B

←

TGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGAT
 AACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACG
 TCTCATTTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAG
 TGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGATG
 ATGGTGTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCTGCTACTGACGGGGTGGT
 GCGTAACGGCAAAGCACC GCCCGGA

pACYC184 起始位点

CATCAGCGCTAGCGGAGTGATATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCAGTGAAGTGCTTCATGTGG
CAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCTCTGCTCACTGA
CTCGCTACGCTCGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAAACGGGGCGGAGATTTCTTGAAGATGC
CAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAG
CATCAGCAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
GGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCCTGCCTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGCCGCGCTTG
TCTCATTTCCACGCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGCACTGTATGCACGAACCCCCCGT
TCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAGACATGCAAAAGCACCCT
GGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGA
CAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAA
AACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATC
ATCTTATTAATCAGATAAAATATTTGCTCATGAGCCCGAAGTGCGGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTCGG
CGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGCGCGCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCTGCT
 CATGTTTGACAGCTTATC (SEQ ID NO:3)

图 15C

pMBIS 质粒序列

ACCTTCGGGAGCGCCTGAAGCCCGTTCTGGACGCCCTGGGGCCGTTGAATCGGGATATGCAGGCCAAGGCCGCCG
CGATCATCAAGGCCGTGGGCGAAAAGCTGCTGACGGAACAGCGGGAAGTCCAGCGCCAGAAACAGGCCCAGCGCC
AGCAGGAACGCGGGCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATT
AACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA
AGCTTTAATGCGGTAGTTTA



四环素耐药基因

TCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACC
GTCACCCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGTTATGCCGGTACTGCCGGGCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCC
GACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTC
GGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCG
ATCATGGCGACACACCCCGTCTGTGGATCCTCTACGCCGAGCATCGTGGCCGGCATCACCGCGCCACAGGT
GCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTGGGGCTCATGAGCGCT
TGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTC
CTTGCGCGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAG
CGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCGGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCC
GCACTTATGACTGTCTTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTTCGGCGAG
GACCGCTTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTGCTTGGCGTATTGGGAATCTTGACGCCCTCGCTCAA
GCCTTCGTCACCTGGTCCCGCACCAACCGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCG
CTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTCCGACCGCAGGCTGGATGGCCTTCCCATTTATGATTCTTCTCGCTTCGGCG
GGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGACAGCTTCAAGGA
TCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTATGCGCGCTCGGCG
AGCATGGAAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGT
GCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCGCGCGCACCTCGCTAACGGATTCAACACTCCAAGAATTG
GAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAATGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCA



修饰的 P_{LAC} 启动子

TTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCT
CACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
ATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAGCT
GGGTACCGGGCCCC



MK

CCTCGAGGTGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGTAGGAGGAATTAACCATGTCAATTACCGTT
CTTAACTTCTGCACCGGGAAAGGTTATTATTTTTGGTGAACACTCTGCTGTGTACAACAAGCCTGCCGTGCTGC
TAGTGTGTCTGCGTTGAGAACCTACCTGCTAATAAGCGAGTCATCTGCACCAGATACTATTGAATTGGACTTCCC
GGACATTAGCTTTAATCATAAGTGGTCCATCAATGATTTCAATGCCATCACCGAGGATCAAGTAACCTCCAAAA
ATTGGCCAAGGCTCAACAAGCCACCGATGGCTGTCTCAGGAACCTGTTAGTCTTTTGGATCCGTTGTTAGCTCA
ACTATCCGAATCCTTCCACTACCATGCAGCGTTTGTTCCTGTATATGTTTGTGCTTATGCCCCCATGCCAA
GAATATTAAAGTTTTCTTTAAAGTCTACTTTACCCATCGGTGCTGGGTTGGGCTCAAGCGCCTCTATTTCTGTATC
ACTGGCCTTAGCTATGGCCTACTTGGGGGGTTAATAGGATCTAATGACTTGAAAAGCTGTGAGAAAACGATAA
GCATATAGTGAATCAATGGGCCTTCATAGGTGAAAAGTGTATTACGGTACCCCTTCAGGAATAGATAACGCTGT
GGCCACTTATGGTAATGCCCTGCTATTTGAAAAGACTCACATAATGGAACAATAAACACAAACATTTTAAGTT
CTTAGATGATTTCCAGCCATTCCAATGATCCTAACCTATACTAGAATTCCAAGGTCTACAAAAGATCTTGTTC
TCGCGTTTCGTGTGTTGGTCACCGAGAAATTTCTGAAGTTATGAAGCCAATTCATAGATGCCATGGGTGAATGTGC
CCTACAAGGCTTAGAGATCATGACTAAGTTAAGTAAATGTAAAGGCACCGATGACGAGGCTGTAGAAACTAATAA
TGAAGTGTATGAACAACATTTGGAATTGATAAGAATAAATCATGGACTGCTTGTCTCAATCGGTGTTTCTCATCC
TGGATTAGAAGTTATTAAAAATCTGAGCGATGATTTGAGAATTGGCTCCACAAAACCTTACCGGTGCTGGTGGCGG
CGGTTGCTCTTTGACTTGTGTTACGAAGAGACATTACTCAAGAGCAAAATTGACAGCTTCAAAAAGAAATTGCAAGA
TGATTTTAGTTACGAGACATTTGAAAACAGACTTGGGTGGGACTGGCTGCTGTTTGTGTTAAGCGCAAAAAATTGAA
TAAAGATCTTAAAAATCAAATCCCTAGTATTTCCAATTATTTGAAAATAAACTACCACAAAGCAACAAATTGACGA
TCTATTATTG

图

16A

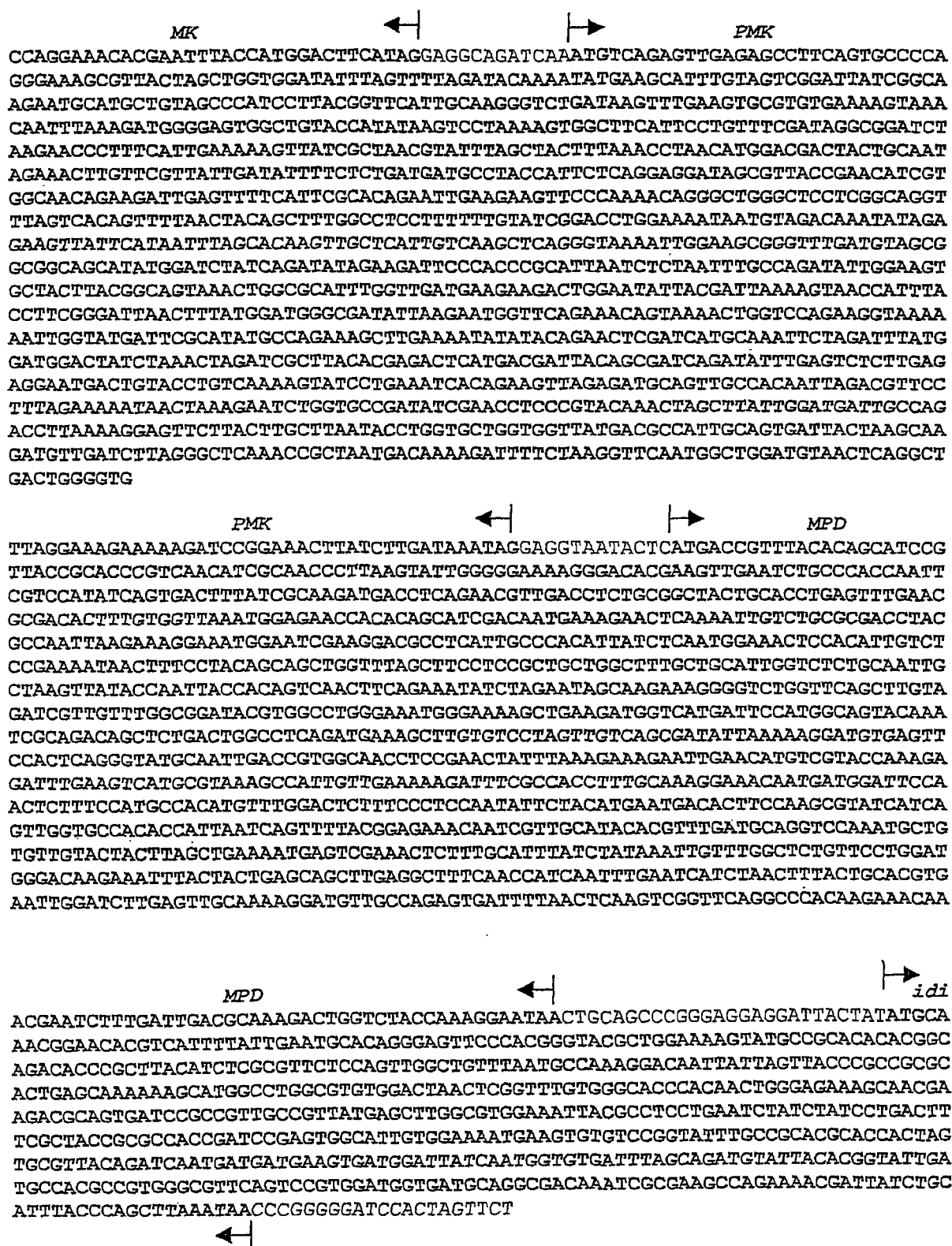


图 16B

└─▶ *lspA*

AGAGCGGCCGCCACCGCGGAGGAGGAATGAGTAATGGACTTTCCGCAGCAACTCGAAGCCTGCGTTAAGCAGGCC
 AACCAGGCGCTGAGCCGTTTATCGCCCCACTGCCCTTTTCAGAACACTCCCCTGGTTCGAAACCATGCAGTATGGC
 GCATTATTAGGTGGTAAGCGCCTGCGACCTTTCCCTGGTTATGCCACCGGTCATATGTTCCGGCGTTAGCACAAAC
 ACGCTGGACGCACCCGCTGCCGCCGTTGAGTGTATCCACGCTTACTCATTAATTCATGATGATTACCGGCAATG
 GATGATGACGATCTGCGTGGCGGTTTGCCAACCTGCCATGTGAAGTTTGGCGAAGCAAACGCGATTCTCGCTGGC
 GACGCTTTACAAACGCTGGCGTTCTCGATTTTAAGCGATGCCGATATGCCGGAAGTGTCCGACCGCGACAGAATT
 TCGATGATTTCTGAAGTGGCGAGCGCCAGTGGTATTCGCCGAATGTGCGGTGGTCAGGCATTAGATTTAGACGCG
 GAAGGCAAACACGTACCTCTGGACGCGCTTGAGCGTATTCATCGTCATAAAACCGGCGCATTTGATTCCGCCGCC
 GTTCGCCCTTGGTGCATTAAAGCGCCGGAGATAAAAGGACGTCGTGCTCTGCCGGTACTCGACAAGTATGCAGAGAGC
 ATCGGCCCTTGCTTCCAGGTTTCAAGATGACATCCTGGATGTGGTGGGAGATACTGCAACGTTGGGAAAACGCCAG
 GGTGCCGACCAGCAACTTGGTAAAGTACCTACCCTGCATTTCTGGGTCTTGAGCAAGCCCGGAAGAAAGCCCGG
 GATCTGATCGACGATGCCCGTCAGTCGCTGAAACAACCTGGCTGAACAGTCACTCGATACCTCGGCACCTGGAAGCG
 CTAGCGGACTACATCATCCAGCGTAATAAATAA

←┐

GAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
 AAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
 CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTA
 AAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAACCAATAGGCCGACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGG
 GCGTAATTTTAAAGGCGATTATTGGTGCCTTAAACGCGCTGGTGTACGCTGAATAAGTGATAATAAGCGGA
 TGAATGGCAGAAATTCGAAAGCAAATTCGACCCGCTCGTCGGTTCAGGCGAGGTCGTAAATAGCCGCTTATGT
 CTATTGCTGTTTACCCTGTTTATTGACTACCGGAAGCAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCGTGAGGCCAGTT
 TGCTCAGGCTCTCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATATGATCATTTATTCTGCCTCCAGAGCCTGATAAAAAAC
 GGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGCTTCCATTCAAGGTCGAGGTGGCCCGCTCCATGCACCGCGACGCAAC
 GCGGGGAGGCAGACAAGGTATAGGGCGGCGAGGCGGTACAGCCGATAGTCTGGAACAGCGCACTTACGGGT

复制起始位点

TGCTGCGCAACCCAAGTGCTACCGGCGCGGCAGCGTGACCGGTGTCGGCGGGCTCCAACGGCTCGCCATCGTCCAG
 AAAACACGGCTCATCGGGCATCGGCAGGCGCTGCTGCCCGCGCCGCTTCCCATTCCTCCGTTTCGGTCAAGGCTGG
 CAGGTCTGGTTCCATGCCCGGAATGCCGGGCTGGCTGGGCGGCTCCTCGCCGGGGCCGGTCGGTAGTTGCTGCTC
 GCCCGGATACAGGCTCGGGATGCGGCGCAGGTGCGCATGCCCAACAGCGATTGCTCCTGGTCTGCTGATCAAC
 CACCACGGCGGCACTGAACACCGACAGGCGCAACTGGTTCGGGGGGCTGGCCCCACGCCACGCGGTCATTGACCAC
 GTAGGCCGACACGGTGCCGGGGCCGTTGAGCTTCACGACGGAGATCCAGCGCTCGGCCACCAAGTCTTTGACTGC
 GTATTGACCGTCCGCAAAGAAGCTCCGATGAGCTTGGAAAGTGTCTTCTGGCTGACCACCAAGCGGTTCTGGTG
 GCCCATCTGCGCCACGAGGTGATGCAGCAGCATTGCCGCGCTGGGTTTCCCTCGCAATAAGCCCGGCCACGCCCTC
 ATGCGCTTTGCGTTCCGTTTGCACCCAGTGACCGGCTTTGTTCTTGGCTTGAATGCCGATTTCTCTGGAAGTGGCT
 GGCCATGCTTATCTCCATGCGGTAGGGTGCCGCACGCTTGGCGCACCATGCGCAATCAGCTGCAACTTTTCGGCA
 GCGCGACAACATTTATGCGTTGCGTAAAGTGGCAGTCAATTACAGATTTTCTTTAACCTACGCAATGAGCTATT
 GCGGGGGGTGCCGCAATGAGCTGTTGCGTACCCCCCTTTTAAAGTTGTGATTTTTAAGTCTTTTCGATTTTCGC
 CCTATATCTAGTTCTTTGGTGCCCAAAGAAGGGCACCCCTGCGGGGTTCCCCCACGCTTCGGCGCGGCTCCCCC
 TCCGGCAAAAAGTGGCCCCCTCGGGGCTTGTGATCGACTGCGCGGCTTCGGCTTGCCTAAGGTGGCGCTGCC
 CCCTTGAACCCCCGCACTCGCCGCCGTGAGGCTCGGGGGCAGGCGGGCGGGCTTCGCCCTTCGACTGCCCCAC
 TCGCATAGGCTTGGGTGCTTCCAGGCGGCTCAAGGCCAAGCCGCTGCGCGGTGCTGCGCGAGCCTTGACCCGCC
 TTCCACTTGGTGTCCAACCGCAAGCGAAGCGCGCAGGCCGAGGCTTTTCCCAGAGAAAATTAATA
 AAATTGATGGGGCAAGGCCGAGGCCGCGCAGTTGGAGCCGGTGGGTATGTGGTCAAGGCTGGGTAGCCGGTGG
 GCAATCCCTGTGGTCAAGCTCGTGGGCAGGCGCAGCCTGTCCATCAGCTTGTCCAGCAGGGTGTCCACGGGCCG
 AGCGAAGCGAGCCAGCCGCTGGCGCTCGCGGCCATCGTCCACATATCCACGGGCTGGCAAGGGAGCGCAGCGAC
 CGCGCAGGGCGAAGCCCGGAGAGCAAGCCCGTAGGGCGCCGACCGCCGTAGGCGGTACGACTTTGCGAAGCA
 AAGTCTAGTGAGTATACTCAAGCATGAGTGGCCCGCGGAGGCACCGCTTGCCTGCCCGCTCGAGCCGGTT
 GGACACCAAAAGGGAGGGGAGGCATGGCGGCATACGCGATCATGCGATGCAAGAAGCTGGCGAAAATGGGCAAC
 GTGGCGGCCAGTCTCAAGCACGCTTACCGCAGCGCAGCAGCCCAACGCTGACGCCAGCAGGACGCCAGAGAAC
 GAGCACTGGGCGGCCAGCAGCACCGATGAAGCGATGGGCGGCTGCGCGAGTTGCTGCCAGAGAAGCGGCGCAAG
 GACGCTGTGTTGGCGGTGAGTACGTGATGACGGCCAGCCGGAATGGTGGAAAGTGGGCCAGCCAAGAAGCAGCAG
 GCGGCGTTCTTCGAGAAGGCGCACAAAGTGGCTGGCGGACAAGTACGGGGCGGATCGCATCGTGACGGCCAGCATC
 CACCGTGACGAAACAGCCGACATGACCGCGTTCTGTTGGTGCCGCTGACGCAGGACGGCAGGCTGTGGGCCAAG

图 16C

GAGTTCATCGGCAACAAAGCGCAGATGACCCGCGACCAGACCACGTTTGCGGCCGCTGTGGCCGATCTAGGGCTG
CAACGGGGCATCGAGGGCAGCAAGGCACGTCACACGCGCATTTCAGGCGTTCTACGAGGCCCTGGAGCGGCCACCA
GTGGGCCACGTCACCATCAGCCCGCAAGCGGTCGAGCCACGCGCCTATGCACCGCAGGGATTGGCCGAAAAGCTG
GGAATCTCAAAGCGCGTTGAGACGCCGGAAGCCGTGGCCGACCGGCTGACAAAAGCGGTTTCGGCAGGGGTATGAG
CCTGCCCTACAGGCCGCCGAGGAGCGCGTGAGATGCGCAAGAAGGCCGATCAAGCCCAAGAGACGGCCCGAG
(SEQ ID NO: 4)

图 16D

pADS 质粒序列

CAATTCGCGCGCGAAGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGCGGTATG
 GCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACAGTAAACGTTATACGATGTGCGCAGAG
 TATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGGTGGTGAACAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAA
 AAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCG
 TTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCGGTGCGAAATTGTGCGGGCGATTAAATCTCGC
 GCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTG
 CACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTG
 GAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTC
 TCCCATGAAGACCGTACCGGACTGGGCGTGGAGCATCTGCTCGCATTTGGGTCAACAGCAAATCGCGCTGTTAGCG
 GGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAG
 CCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGC
 ATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGG
 CTGCGCGTTGGTGGCGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTCA
 ACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAG
 GCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACACCCCTGGCGCCCAATACGCAAACC
 GCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGA

GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCGCGAATTGATCTGGTTTGACAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAA
 TGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCTGTGTC
 GCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCGACATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAAT
 GAGCTGTTGACAATT

AATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGGCCCTGA
 CCGAAGAGAAACCGATCCGCCCGATCGCTAACTTCCCGCGCTCTATCTGGGGTGACCAGTTTCTGATCTACGAAA
 AGCAGGTTGAGCAGGGTGTGTAACAGATCGTAAACGACCTGAAGAAAGAAGTTTCGTGAGCTGCTGAAAGAAGCTC
 TGGACATCCCGATGAAACACGCTAACCTGCTGAAACTGATCGACGAGATCCAGCGTCTGGGTATCCCGTACCACT
 TCGAACCGCAATCGACCACGCACTGCAGTGCATCTACGAAACCTACGGCGACAACCTGGAACGGCGACCGTTCTT
 CTCTGTGTTTTGCTGTGATGCGTAAACAGGGCTACTACGTTACCTGTGACGTTTTTAACAACCTACAAGGACAAGA
 ACGGTGCTTTCAAACAGTCTCTGGCTAACGACGTTGAAGGCCTGCTGGAACCTGTACGAAGCGACCTCCATGCGTG
 TACCGGGTGAAATCATCTCTGGAGGACGCGCTGGGTTTACCCGTTCTCGTCTGTCCATTATGACTAAAGACGCTT
 TCTCTACTAACCCGGCTCTGTTACCGGAAATCCAGCGTGCTCTGAAACAGCGCTGTGGAAACGTCTGCCGCGTA
 TCGAAGCAGCACAGTACATTCCGTTTTTACCAGCAGCAGGACTCTCACAACAAGACCCCTGCTGAAACTGGCTAAGC
 TGGAAATCAACCTGCTGCAGTCTCTGCACAAAGAAGAACTGTCTCACGTTTGTAAAGTGGTGAAGGCATTGACA
 TCAAGAAAAACGGCGCGTGCCTGCGTGACCGTATCGTTGAATGTTACTTCTGGGGTCTGGGTTCTGGTTATGAAC
 CACAGTACTCCCGTGCACGTGTGTTCTTCACTAAAGCTGTAGCTGTTATCACCCGATCGATGACACTTACGATG
 CTTACGGCACCTACGAAGAACTGAAGATCTTTACTGAAGCTGTAGAAGCTGGTCTATCACTTGCCCTGGACACTC
 TGCCGGAGTACATGAAACCGATCTACAACTGTTTCATGGATACCTACACCGAAATGGAGGAATTCTGGCAAAAG
 AAGGCCGTACCGACCTGTTCAACTGCGGTAAAGAGTTTGTAAAGAATTCTGACGTAACCTGATGGTTGAAGCTA
 AATGGGCTAACGAAGGCCATATCCGACTACCGAAGAACATGACCGGTTGTTATCATCACCGGCGGTGCAAACC
 TGCTGACCACCACTTGCTATCTGGGTATGTCGACATCTTTACCAAGGAATCTGTTGAATGGGCTGTTTCTGCAC
 CGCGCTGTTCCGTTACTCCGGTATTCTGGGTGCTGCTGTAACGACCTGATGACCCACAAAGCAGACAGGAAC
 GTAAACACTCTTCTCTCTCTGGAATCCTACATGAAGGAATATAACGTTAACGAGGAGTACGCACAGACTCTGA
 TCTATAAAGAAGTTGAAGACGTATGGAAGACATCAACCGTGAATACCTGACTACTAAAAACATCCCGCGCCCGC
 TGCTGATGGCAGTAATCTACCTGTGCCAGTTCCTGGAAGTACAGTACGCTGGTAAAGATAACTTCACTCGCATGG
 GCGACGAATACAAACACCTGATCAAATCCC

图 17A

ADS ←

rrnB 终止子

TGCTGGTTTACCCGATGTCCATCTGATCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTT
 TTGGCCGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATT
 TCCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATG
 GTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGAC
 TGGGCTTTTCGTTTATCTGTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTG
 AACGTTGCGAAGCAACGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAG
 AAGGCCATCCTGACGATGGCCTTTTTCGCTTCTACAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATG

→ 氨基西林耐药基因

CTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCA
 TTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
 GTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATG
 ATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
 CGCATACACTATTTCTCAGAAAGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACA
 GTAAGAGAATTATGCAAGTCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCCGCCAACTTACTTCTGACAACCATCGGA
 GGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTCTGCTTGGGAACCGGAG
 CTGAATGAAGCCATACCAAACGAGCGGTGACACCAAGATGCCTACAGCAATGGCAACAAGTTGCGCAAACTA
 TTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGA
 CCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTGCG
 GGTATCTGCGAGCAGTGGCGGCGAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGACGGGGAGTCAGGCA
 ACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTTGGTAAGTGTGAGACCA
 GTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
 GATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGCTAGAAAAGATCAAA
 GGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTG
 GTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAT
 ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTG
 CTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTA
 CCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAAGCAGCTACACC
 GAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG
 GTAAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCTT
 GTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC
 GCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCC
 CCTGATTCTGTGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAAGTGTATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGC
 AGCGAGTCAGTGAGCGAGGAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA
 CACCGCATATGGTGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGC
 TACGTGACTGGGTGATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCC
 CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCTCCGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCTACCCGA
 AACGCGCGAGGCAGCAGAT (SEQ ID NO:5)

图 17B

pAtoB 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCA
ATTGT

└─▶ **araC**

CTGATTGCTTACCAATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTACATTTTCTTTCACAACCGGCACGGAACTCGCT
CGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAACCAACATTGCGACCGAC
GGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGTCAAAGCAGCTTCGCCCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCTTAA
GACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGGCAGCGGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCT
GGCGATATCAAATGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGG
TGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTC
CGAATAGCGCCCTTCCCTTGCCCCGGCGTTAATGATTGCCCCAAACAGGTGCGTGAAATGCGGCTGGTGGCGTTC
ATCCGGGCGAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACG
AAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTCGCGGGAA
CAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAACAAATTCCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAG
ATTGAGAATATAACCTTTCATTCCAGCGGTGCGTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGT
TAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTT

└─▶ **araC**

TGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGC
CGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGTAACCAAACCGGTAAACCCGCTTATTAAAGCATTCTGTAAACA
AGCGGGACCAAAGCCATGACAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTAT
TTGCACGGCGTCACA

└─▶ **P_{BAD} 启动子**

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACT
GTTTTC

└─▶ **atoB**

TCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGTAGGAGGAATATAAAATGAAAAATTGTG
TCATCGTCAGTGCGGTACGTACTGCTATCGGTAGTTTTTAACGGTTCCTCGCTTCCACCAGCGCCATCGACCTGG
GGGCGACAGTAATTAAAGCCGCCATTGAACGTGCAAAAATCGATTACAAACACGTTGATGAAGTGATTATGGGTA
ACGTGTTACAAGCCGGGCTGGGGCAAAATCCGGCGCGTCAGGCACGTGTTAAAAGCGGGCTGGCAGAAACGGTGT
GCGGATTACGGTCAATAAAGTATGTGGTTCGGGTCTTAAAAGTGTGGCGCTTGCCGCCAGGCCATTACGGCAG
GTCAGGCGCAGAGCATTGTGGCGGGGGGTATGGAAAATATGAGTTTAGCCCCCTACTTACTCGATGCAAAAGCAC
GCTCTGGTTATCGTCTTGGAGACGGACAGGTTTATGACGTAATCCTGCGCGATGGCCTGATGTGCGCCACCCATG
GTTATCATATGGGGATTACCGCCGAAAACGTGGCTAAAGAGTACGGAATTACCCGTGAAATGCAGGATGAAGTGG
CGCTACATTACAGCGTAAAGCGGCAGCCGCAATTGAGTCCGGTGTCTTTTACAGCCGAAATCGTCCCGGTAAATG
TTGTCACCTCGAAAGAAAACCTTCGTCTTCAGTCAAGACGAATTCGGAAAGCGAATTCACCGGCTGAAGCGTTAG
GTGCATTGCGCCCGGCTTCGATAAAGCAGGAACAGTCACCGCTGGGAACGCGTCTGGTATTAACGACCGGTGCTG
CCGCTCTGGTGAATTATGGAAGAATCTGCGCGCTGGCAGCAGGCCCTTACCCCTGGCTCGCATTAAGTTATG
CCAGCGGTGGCGTGCCCCCGCATTGATGGGTATGGGGCCAGTACCTGCCACGCAAAAAGCGTTACAAGTGGCGG
GGCTGCAACTGGCGGATATTGATCTCATTGAGGCTAATGAAGCATTGCTGCACAGTTCTTGGCGTTGGGAAAA
ACCTGGGCTTTGATTCTGAGAAAGTGAATGTCAACGGCGGGGCCATCGCGCTCGGGCATCCTATCGGTGCCAGTG
GTGCTCGTATTCTGGTCACACTATTACATGCCATGCAGGCACGCGATAAAACGCTGGGGCTGGCAACACTGTGCA

└─▶ **atoB**

TTGGCGGCGGTACAGGAATTGCGATGGTGATTGAACGGTTGAATTAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT

rrnB 终止子

GGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAAGCGGTCTGATAAAA
CAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGC
GCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTC
GAAAGACTGGGC

图 18A

CTTTCGTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGT
 TCGGAAGCAACGCGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCCATAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGC
 CATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTCTACAACTCTTTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC
 CGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC
 GTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTGCTTCCCTGTTTTCGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
 AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT
 AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGC
 TGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCG
 TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC
 CTCCTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTACGCGCCCTGTA
 GCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCG
 CTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
 CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTTACGTTAGTG
 GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAAGTCTTGTTC
 AAATTTGAACAACACTCAACCTTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGCCCTATT
 GGTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAAGG
 ATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
 GACCCCGTGAAGAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGGTAATCTGCTTGCAGAAACAAA
 AAACACCGCTTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTC
 AGCAGAGCGCAGATACCAAAATACTGTCTTCTAGTGATGCGGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCA
 CCGCTTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGCGGCATTTGAGAAGCACACGGTTCACACTGCTTCCGG
 TAGTCAATAAACCGGTAAACAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCTGCCCTGAACCGACGACCGGGT
 CGAATTTGCTTTCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTATTTCAGGC

氯霉素耐药基因

GTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAATTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTAC
 TGTGTAAATTCATTAAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGC
 ATCAGCACCTTGTGCGCTTGGCTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCC
 ACGTTTAAATCAAACTGGTGAACTCACCCAGGGATTTGGCTGAGACGAAAAACATATTTCTCAATAAACCCCTTA
 GGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTCCGAATATATGCTGTAGAACTGCCGGAATCGTGC
 TGGTATTACTCCAGCGCATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGTTGAACACTATCC
 CATATCACCACTGCTACCGCTCTTTTCATTGCCATACGGAATTCGGATGAGCATTCATCAGCGCGGCAAGAATGTGA
 ATAAAGGCCGGATAAAAATTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTC
 TGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACG
 GTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCAT

TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCAATTATGGTG
 AAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAAGCTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAAC
 AGGGACACCAGGATTTATTTATTTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATTTATTCGGCGCAAGTGCGTCCGG
 TGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGATGATGGTGTTCGAGGTGCTCCAGTGCGCTTCTGTTCTATCAGCT
 GTCCCTCCTGTTACGCTACTGACGGGGTGGTGCGTA

pACYC184 起始位点

ACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGATATCTAGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGT
 CAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATAT
 TCCGCTTCCTCGCTCAGTCTGCTACGCTACGCTCGGTGCTTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGC
 GGAGATTTCTTGAAGATGCCAGGAAGATACCTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAGCCGTTTTTCCATA
 GGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCAGGAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
 GATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTTCCCTGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTC
 CGCTGTTATGGCCGCGTTTTGTCTCATTCCACGCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCCGCTCCAAGCTGGAC
 TGTATGCACGAACCCCCCGTTTCACTCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAA
 AGACATGCAAAAGCACCACCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGG
 TTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGT
 AGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGCGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACC
 AAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTTTGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATC
 TTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCACGATGCG
 TCGGCGTAGAGGATCTGCTCATGTTTGACAGCTTATC (SEQ ID NO: 6)

图 18B

pHMGS 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCA
ATTGT

└─▶ araC

CTGATTGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTCTTCACAACCGGCACGGAACTCGCT
CGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGAC
GGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGTCTCAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCCTCGCGCCAGCTTAA
GACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCT
GGCGATATCAAATTTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGG
TGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTC
CGAATAGCGCCCTTCCCTTGGCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGGCGCTTC
ATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACG
AAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTGCGGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTCGGCGGGAA
CAGCAAAATATCAACCCGGTCCGCAAAACAATTCTCGTCCCTGATTTTACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAG
ATTGAGAATATAACCTTTTCAATCCAGCGGTGGTTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCCTCAATCGGCGT
TAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTT

araC ◀─┐

TGCGCTTCAGCCATACTTTTCTACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGC
CGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATTAAAAGCATTCTGTAACAA
AGCGGGACCAAAGCCATGACAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTAT
TTGCACGGCGTCACA

└─▶ P_{BAD} 启动子

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTTATCGCAACTCTCTACT
GTTTT

└─▶ HMGS

TCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGAGGAGGACAGCTAAATGAAACTCTCAAC
TAAACTTTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCAAAAGCAACAACAATTACACAATACAAACTTGCA
AATGACTGAATCAAAAAACAAAGACCGCTGAACAAAAACAGACCTCAAATGTCGGTATTAAAGGTATCCA
AATTTACATCCCAACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTTCTCAAGGTAAATACAC
AATTGGTCTGGGCCAAACCAACATGTCTTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGATGTCCCTAACTGTTTT
GTCTAAGTTGATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAAATTGGTAGATTAGAAGTCGGTACTGAAACTCTGAT
TGACAAGTCCAAGTCTGTCAAGTCTGTCTTGATGCAATTGTTTGGTGAAAACACTGACGTGCAAGGTATTGACAC
GCTTAATGCCTGTTACGGTGGTACCAACGCGTTGTTCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACGCATGGGATGG
TAGAGACGCCATTGTAGTTTGGCGTGATATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTGGTGCCGG
TACTGTTGCTATGTGGATCGGTCTGATGCTCCAATTGTATTTGACTCTGTAAGAGCTTCTTACATGGAACACGC
CTACGATTTTTTACAAGCCAGATTTTACCAGCGAATATCCTTACGTGATGGTCATTTTTTCATTAACCTGTTACGT
CAAGGCTCTTGATCAAGTTTACAAGAGTTATTCCAAGAAGGCTATTTCTAAAGGGTTGGTTAGCGATCCCGCTGG
TTCCGGATGCTTTGAACGTTTTGAAATATTTGCACTACAACGTTTTTCCATGTTCCAACCTGTAAATTTGGTCACAAA
ATCATACGGTAGATTACTATAAAGATTTTCAGAGCCAATCCTCAATTGTTCCAGAAGTTGACGCCGAATTAGC
TACTCGCGATTATGACGAATCTTTAACCGATAAGAACATTGAAAAACTTTTGTTAATGTTGCTAAGCCATTCCA
CAAAGAGAGAGTTGCCAATCTTTGATTGTTCCAACAAACACAGGTAACATGTACACCGCATCTGTTTATGCGCG
CTTTGTCATCTCTATTAACTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGGCAAGCGTGTTGGTTTATTTCTTACGGTTC
CGGTTTAGCTGCATCTCTATATTCTTGCAAAATTTGTTGGTGACGTCCAACATATTATCAAGGAATTAGATATTAC
TAACAAATTAGCCAAGAGATCAACCGAACTCCAAGGATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAAATGCCCA
TTTGAAGAAGAACTTCAAACCTCAAGGTTCCATTGAGCATTTGCAAAGTGGTGTTTACTACTTTGACCAACATCGA
TGACAAATTTAGAAGATCTT

HMGS ◀─┐ rrnB 启动子

ACGATGTTAAAAATAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCC
TGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCC
CACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTTGGGTCTCCCCATGCGAGAG
TAGCGA

图 19A

ACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTG
 AACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGG
 GCAGGACGCCCGCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTT
 CTACAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAT
 GCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGC
 ATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAGC
 AAATATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT
 GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGG
 TCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT
 CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCA
 GACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGT
 GGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCT
 CGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTAGTGCTTTACG
 GCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG
 CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACCTGAACAACACTCAACCTTATCTC
 GGGTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTTCGGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAA
 ATTTAACGCGAATTTTAACAAATATTAACGTTTACAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATC
 TCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
 CTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
 TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCC
 TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC
 TGTTACCAGTGGGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATA
 GACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGACGACCGGGTCAATTTGCTTTTCAATTTCTGCCATTC
 ATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGC

氯霉素耐药基因

GTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTAC
 TGTGTGAATTCATTAAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGC
 ATCAGCACCTTGTGCGCTTGGCTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCC
 ACGTTTAAATCAAACTGGTGAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAACATATTCTCAATAAACCTTTTA
 GGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCACATCTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCG
 TGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGTCTCATGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCC
 CATATCACCAGCTCACCGTCTTTTATTGCCATACGGAATTCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGA
 ATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTC
 TGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACG
 GTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCAT

TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTG
 AAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAAC
 AGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTCCGTACAGGTATTTATTTCGGCGCAAAGTGCGTCGGG
 TGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGATGATGGTGTTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCT
 GTCCCTCCTGTTTCAGCTACTGACGGGGTGGTGCGTA

pACYC184 起始位点

ACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGATATCTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGT
 CAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATAT
 TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTGCTGCACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGC
 GGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAGCCGTTTTTCCATA
 GGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
 GATACCAGGCGTTTTCCCTTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTTCCGCTTTCGGTTTTACCGGTGTCTTC
 CGCTGTTATGGCCGCGTTTTGTCTCATTTCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCCGCTCCAAGCTGGAC
 TGTATGCACGAACCCCGGTTCACTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGA
 AGACATGCAAAAGCACCACCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGG
 TTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGT
 AGCTCAGAGAACCTTCGAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACC
 AAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAAATCAGATAAAATATTTGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATC
 TTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCACGATGCG
 TCCGCGGTAGAGGATCTGCTCATGTTTGACAGCTTATC (SEQ ID NO:7)

图 19B

pHMGR 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCATGCTACTCCGTCAAGCCGTCA
ATTGT

→ *araC*

CTGATTTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACCTTTTCTTTCACAACCGGCACGGAACTCGCT
CGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGAC
GGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGTCTCAAAGCAGCTTCGCTGGCTGATACGTTGGTCCCTCGCGCCAGCTTAA
GACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCT
GGCGATATCAAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGG
TGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTAACAAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTC
CGAATAGCGCCCTTCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTGCCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTC
ATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAAATATGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACG
AAAGTAAACCCACTGGTGTATACCATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTCGCGGGAA
CAGCAAAATATCACCCGGTCGCGCAACAAATCTCGTCCCTGATTTTTCACCACCCCTGACCSCGAATGGTGAG
ATTGAGAATATAACCTTTTCATTCACGCGGTGCGTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGT
TAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCGCGCAGCAGGGGATCATTT

← *araC*

TGCGCTTCAGCCATACCTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGC
CGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAACCGGTAAACCCGCTTATTAAAGCATTCTGTAAACAA
AGCGGGACCAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTAT
TTGCACGGCGTCA

→ *P_{BAD}* 启动子

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACT
GTTTC

→ *HMGR*

TCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTTCGAGCTCGGTACCCGGGAGGAGGATTACACTATGGTTTTAACCAA
TAAACAGTCATTTCTGGATCGAAAGTCAAAGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATC
TAGTGAGGAAGATGATTCCCGCGATATTGAAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCCTTTAGAAGAATTAGAAGCATT
ATTAAGTAGTGGAATAACAAAACAAATTGAAGAACAAGAGGTCGCTGCCCTTGGTTATTCACGGTAAGTTACCTTT
GTACGCTTTGGAGAAAAAATTAGGTGATCTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTTCAATTTTGGC
AGAAGCTCCTGTATTAGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAAATTATGACTACGACCGCGTATTTGGCGCTTGTG
TGAAAATGTTATAGGTTACATGCCCTTTGCCCGTTGGTGTTATAGGCCCTTGGTTATCGATGGTACATCTTATCA
TATACCAATGGCAACTACAGAGGGTTGTTGGTAGCTTCTGCCATGCGTGGCTGTAAGGCAATCAATGCTGGCGG
TGGTGCAACAACTGTTTTAACTAAGGATGGTATGACAAGAGGCCAGTAGTCCGTTTCCCAACTTTGAAAAGATC
ATTTGCACGCTCTGCAACATAATTCAAACCTTGTCTAGCAGGAGATTTACTCTTCATGAGATTTAGAACAACACTGG
TGACGCAATGGGTATGAATATGATTTCTAAAGGTGTGCGAATACTCATTAAAGCAAATGGTAGAAGAGTATGGCTG
GGAAGATATGGAGGTTGTCTCCGTTTCTGGTAACTACTGTACCGACAAAAACCAGCTGCCATCAACTGGATCGA
AGGTGCTGGTAAGAGTGTGCTCGCAGAAGCTACTATTCCTGGTGATGTTGTGCAAAAAGTGTAAAAAGTGATGT
TTCCGCATTGGTTGAGTTGAACATTGCTAAGAATTTGGTTGGATCTGCAATGGCTGGGTCTGTTGGTGGATTAA
CGACATGCAGCTAATTTAGTGACAGCTGTTTTCTTGGCATTAGGACAAGATCCTGCACAAAATGTTGAAAGTTC
CAACTGTATAACATTGATGAAAGAAGTGACGGTGATTTGAGAATTTCCGTATCCATGCCATCCATCGAAGTAGG
TACCATCGGTGGTGGTACTGTTCTAGAACCACAAGGTGCCATGTTGGACTTATTAGGTGTAAGAGGCCCGCATGC
TACCGCTCCTGGTACCAACGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTGCCCTGTGCCGTCTTGGCAGGTGAATTATCCTT
ATGTGCTGCCCTAGCAGCCGCCATTTGGTTCAAAGTCATATGACCCACAACAGGAAACCTGCTGAACCAACAAA
ACCTAACAATTTGGACGCCA

← *HMGR* *rrnB* 终止子

CTGATATAAATCGTTTTGAAAGATGGGTCCGTACCTGCATTAAATCCTAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG
GCTGTTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAAC
AGAA

图 20A

TTTGCCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGA
 TGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCCAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAG
 ACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGCAGCGGATT
 TGAACGTTGCCAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGC
 AGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTGGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAAT
 ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA
 CATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTG
 AAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGTCAGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGC
 AACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGT
 TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
 CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA
 TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTACGCG
 CCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTA
 GCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCGCCGTCAAGCTCTAAATCGG
 GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCA
 CGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTC
 TTGTTCCAACTTGAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCG
 GCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTTAACGCGAATTTTAACAATAATTAACGTTTACAATT
 TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTG
 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
 AACAAAAAACACCGCTACACGCGGTGGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
 TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTC
 TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTG
 CTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCCTGCCCTGAACCGACG
 ACCGGGTCAATTTGCTTTCGAATTTCTGCCATTATCCGCTTATTATCACTTATTACAGC

氯霉素耐药基因

GTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCGGCCCTGCCACTCATCGCAGTAC
 TGTGTAAATTCATTAAGCATTTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGC
 ATCAGCACCTTGTGCGCTTGGGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCC
 ACGTTTAAATCAAACTGGTGAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATAATCTCAATAAACCCCTTA
 GGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTTCG
 TGGTATTCACTCCAGACGATGAAAACGTTTCAGTTTGTCTCATGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCC
 CATATCACCGCTCACCGTCTTTTCATTGCCATACGGGAATTCGGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGA
 ATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTC
 TGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACG
 GTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCAT

TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCAATTATGGTG
 AAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGCTCTCATTTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAAC
 AGGGACACCAGGATTTATTTATTTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGG
 TGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTGTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCT
 GTCCCTCCTGTTTCAGCTACTGACGGGGTGGTGCCTA

pACYC184 起始位点

ACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGT
 CAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATAT
 TCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGC
 GGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAAGCCGTTTTTCCATA
 GGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
 GATACCAGGCGTTTTCCCTTGGCGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTTCCCTGCCTTTCGGTTTTACCGGTGTCTTC
 CGCTGTTATGGCCGCGTTTTGTCTCATTTCCACGCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTTCGCTCCAAGCTGGAC
 TGTATGCACGAACCCCCGTTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAA
 AGACATGCAAAAGCACCACTGCGCAGCCACTGGTAATTCATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGG
 TTAAGGCTAAACTGAAAGACAAGTTTTGGTGAATGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGT
 AGCTCAGAGAACCTTCGAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTTCTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACC

图 20B

AAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTTGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATC
TTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCG
TCCGGCGTAGAGGATCTGCTCATGTTTGACAGCTTATC (SEQ ID NO:8)

图 20C

pBAD18HMGR 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAAT
TGT



araC

CTGATTGCTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTCACAACCGGCACGGAACTCGCTCG
GGCTGGCCCCGGTGCAATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTCGACCCGACGGTG
GCGATAGGCATCCGGGTGGTGCCTCAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCCCTCGCGCCAGCTTAAGACGCT
AATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCCACGCTGGCGATAT
CAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGC
GACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCC
TTCCCTTTGCCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCGTGAAATGCGGCTGGTGGCTTCATCCGGGCGAAAGA
ACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGG
TGATAACCATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGG
TCGGCAAACAAATTCCTGCTCCCTGATTTTTACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCA
TTCCAGCGGTGCGTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGCGCTTAAACCCGCCACCAGATGGGCA
TTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTT

araC



TGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCG
TCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGTAACCAAACCGGTAACCCGCTTATTAAAAGCATTCTGTAACAAAGCG
GGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCAC
GGCGTCACA

P_{BAD} 启动子

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGT
TTC



截短的 HMGR

TCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGAGGAGGATTACACTATGGTTTTTAAACCAATA
AAACAGTCATTTCTGGATCGAAAGTCAAAAGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATCTAGT
GAGGAAGATGATTCCCGCGATATTGAAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCTTTAGAAGAATTAGAAGCATTATTAAG
TAGTGGAATAACAAAACAATTGAAGAACAAAGAGGTGCGTGCCTTGGTTATTCACGGTAAGTTACCTTTGTACGCTT
TGGAGAAAAAATTAGGTGATACTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTTCAATTTTGGCAGAAGCTCCT
GTATTAGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAATATGACTACGACCGCGTATTTGGCGCTTGTGTGAAAAATGTTAT
AGGTTACATGCCCTTTGCCCGTTGGTGTATTAGGCCCTTGGTTATCGATGGTACATCTTATCATATAACCAATGGCAA
CTACAGAGGGTTGTTTGGTAGCTTCTGCCATGCGTGGCTGTAAAGCAATCAATGCTGGCGGTGGTGCAACAACTGTT
TTAACTAAGGATGGTATGACAAGAGGCCAGTAGTCCGTTTCCCACTTTGAAAAGATCTGGTGCCTGTAAGATATG
GTTAGACTCAGAAGAGGGACAAAACGCAATTAAAAAGCTTTTAACTCTACATCAAGATTTGCAGTCTGCAACATA
TTCAAACCTTGCTAGCAGGAGATTTACTCTTCATGAGATTTAGAACAACACTACTGGTGACGCAATGGGTATGAATATG
ATTTCTAAAGGTGTCGAATACTCATTAAGCAAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGGAGGTTGTCTCCGT
TTCTGGTAAGTACTGTACCGACAAAAACCAGCTGCCATCAACTGGATCGAAGGTGCTGGTAAGAGTGTGCTCGCAG
AAGCTACTATTCTGGTGTATGTTGTCAGAAAAGTGTAAAAAGTGATGTTTCCGCATTGGTTGAGTTGAACATTGCT
AAGAATTTGGTTGGATCTGCAATGGCTGGGTCTGTGGTGGATTTAACGCACATGCAGCTAATTTAGTGACAGCTGT
TTTCTTGGCATTAGGACAAGATCCTGCACAAAATGTTGAAAGTTCCAAGTGTATAACATTGATGAAAGAAGTGGACG
GTGATTGAGAAATTTCCGTATCCATGCCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGTGGTGGTACTGTTCTAGAACCCAA
GGTGCCATGTTGGACTTATTAGGTGTAAGAGGCCCGCATGCTACCGCTCCTGGTACCAACGCACGTCATTTAGCAAG
AATAGTTGCTGTGCCGTCTTGGCAGGTGAATTATCCTTATGTGCTGCCCTAGCAGCCGGCCATTTGGTTCAAAGTC
ATATGACCCACAACAGGAAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAAATTTGGACGCCA

图

21A

GTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGG
GCCTGCCACCATACCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGT
CGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCTGC
TCATGTTTGACAGCTTATC (SEQ ID NO:9)

图 21C

pHMGSR 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAAT
TGT

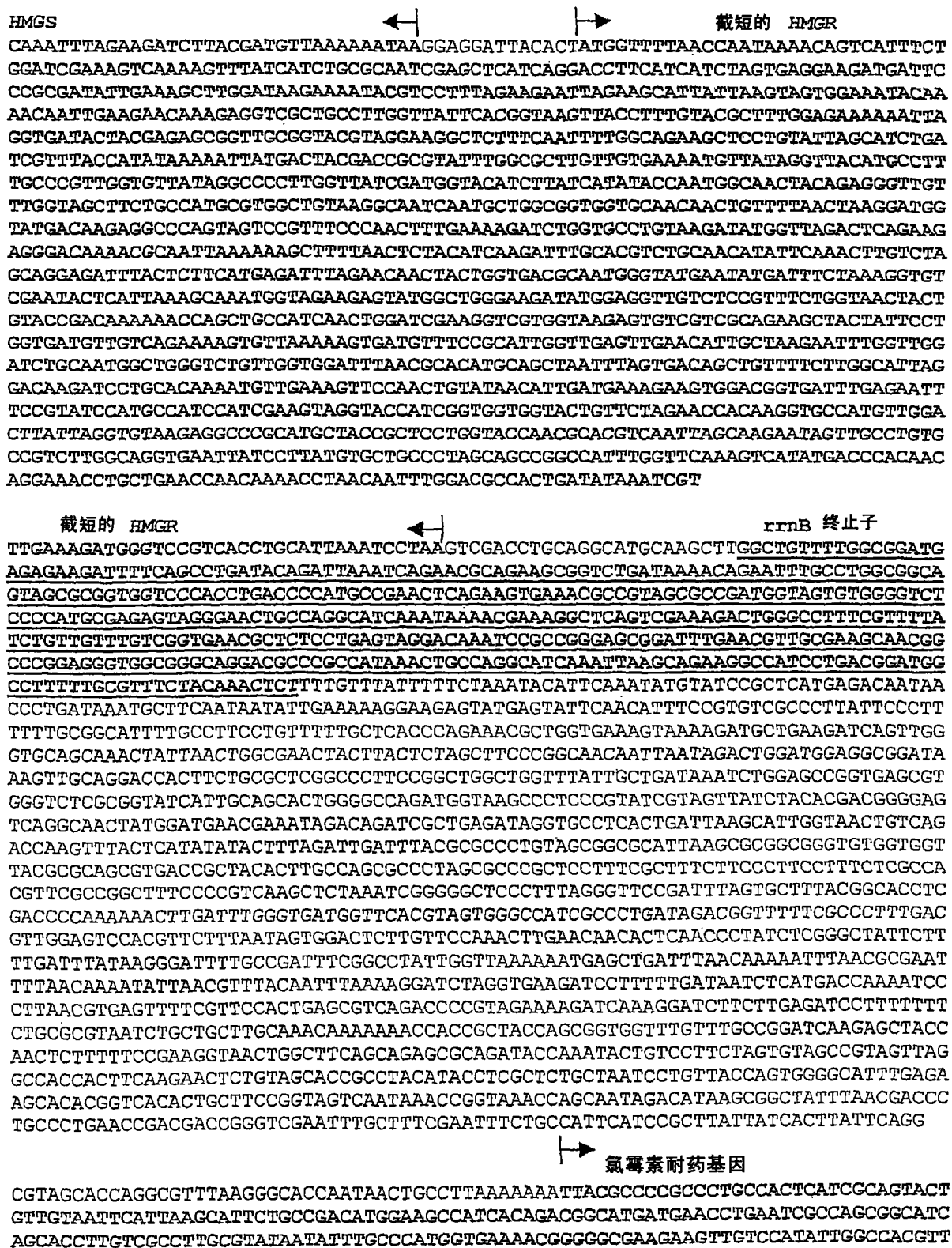
CTGATTTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTCTTCACAACCGGCACGGAACTCGCTCG
GGCTGGCCCCGGTGCAATTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTG
GCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCGCCCTGGCTGATACGTTGGTCCCTCGCGCCAGCTTAAGACGCT
AATCCCTAACTGCTGCGCGAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATAT
CAAAATGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGC
GACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCC
TTCCCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTTCGCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGGCTTCATCCGGGCGAAAGA
ACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGG
TGATACCAATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAATATCACCCGG
TCGGCAAACAAATTCGCTCCCTGATTTTTACACACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCA
TTCCAGCGGTTCGGTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACAGATGGGCA
TTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATT

TGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCG
TCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAACCGGTAACCCCGCTTATTAAAGCATTCTGTAACAAAGCG
GGACCAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCAC
GGCGTCACA
CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGT
TTC

TCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACAGGAGGACAGCTA

TGAAACTCTCAACTAACTTTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCAAAAGCAACAACAATTACACAAT
ACAAACTTGCAAATGACTGAACATAAAAAACAAAGACCGCTGAACAAAAACCAGACCTCAAAATGTGGTATTAA
AGGTATCCAAATTTACATCCCAACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTCTCAAGGTA
AATACACAATTGGTCTGGGCCAAACCAACATGTCTTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGATGTCCCTAACT
GTTTTGTCTAAGTTGATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAAATTGGTAGATTAGAAGTCGGTACTGAAACTCT
GATTGACAAGTCCAAGTCTGTCAAGTCTGTCTTGATGCAATTGTTTGGTGAAAACACTGACGTCGAAGGTATTGACA
CGCTTAATGCCGTGTTACGGTGGTACCAACGCGTTGTTCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACCGCATGGGATGGT
AGAGACGCCATTGTAGTTTGGGTGATATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTGGTGCCGGTAC
TGTTGCTATGTGGATCGGTCTGATGCTCCAATTGTATTGACTCTGTAAGAGCTTCTTACATGGAACACGCCTACG
ATTTTTACAAGCCAGATTTACCAGCGAATATCCTTACGTCGATGGTCATTTTTTCATTAACCTGTTACGTCAGGCT
CTTGATCAAGTTTACAAGAGTTATTCCAAGAAGGCTATTTCATAAGGGTTGGTTAGCGATCCCGCTGGTTTCGGATGC
TTTGAACGTTTTTGAATATTTCGACTACAACGTTTTCCATGTTCCAACCTGTAAATTTGGTCACAAAATCATACGGTA
GATTACTATATAACGATTTCAGAGCCAATCCTCAATTGTTCCGAGAAGTTGACGCGAATTAGCTACTCGCGATTAT
GACGAATCTTTAACCAGATAAGAACATTGAAAAAATTTTGTAAATGTTGCTAAGCCATTCCACAAAGAGAGATTGC
CCAATCTTTGATTGTTCCAACAAACACAGGTAACATGTACACCGCATCTGTTTATGCGGCTTTGCATCTCTATTAA
ACTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGGCAAGCGTGTGGTTTATTTCTTACGGTTCCGGTTTAGCTGCATCTCTA
TATTCTTGCAAATTTGTTGGTGACGTCCAACATATTATCAAGGAATTAGATATTACTAACAAATTAGCCAAGAGAA
CACCGAAACTCCAAGGATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAAATGCCATTTGAAGAAGAACTTCAAACCTC
AAGGTTCCATTGAGCATTTGCAAAGTGGTGTTTACTACTTGACCAACATCGATGA

图 22A



图

22B

FIG. 22C

TAAATCAAACCTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAAT
 AGGCCAGGTTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCA
 CTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACTATCCCATATCACCAG
 CTCACCGTCTTTTCATTGCCATACGGAATTCGGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGAT
 AAACTTGTGCTTATTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACAT
 TGAGCAACTGACTGAAATGCCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGAT
 TTTTTTCTCCAT

TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTATGGTGAA
 AGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGG
 ACACCAGGATTTATTTATCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGGTCTGGGTGATGC
 TGCCAACTTACTGATTTAGTGATGATGGTGTGTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCC
 TGTTTCAGCTACTGACGGGGTGGTGCGT

pACYC184 起始位点

AACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGCAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTC
 AGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAAATATGTGATACAGGATATATTCC
 GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAGA
 TTTCTTGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCG
 CCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG
 CGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCCTGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCGCTGTATGG
 CCGCGTTTGTCTCATTTCCACGCTGACACTCAGTTCGGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAAC
 CCCCCGTTTCACTCCGACCGCTCCGCTTATCCGGTAAGTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAGACATGCAAAAGCA
 CCACTGGCAGCAGCCACTGCTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAA
 GGACAAGTTTTGGTGACTCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAA
 AAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCA
 TCTTATTAATCAGATAAAATATTTGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGA
 TATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCTGCTCATGT
 TTGACAGCTTATC (SEQ ID NO:10)

图

22C

pBAD33MevT(C159A) 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAAT
TGT

CTGATTTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCCTTCACAACCGGCACGGAACTCGCTCG
GGCTGGCCCCGGTGCATTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTG
GCGATAGGCATCCGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGACGCT
AATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATAT
CAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGC
GACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCC
TTCCCCTTGCCCGSCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGA
ACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTGATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGG
TGATACCATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGG
TCGGCAAACAAATCTCGTCCCTGATTTTTCACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCA
TTCCCAGCGGTGCGTTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCA
TTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTT

araC ←

TGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTGAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCG
TCACTGCGTCTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAACCGGTAACCCCGCTTATTAAGCAATTCTGTAACAAAGCG
GGACCAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAGTCCACATTGATTATTTGCAC
GGCGTCACA

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGT
TTC

P_{BAD} 启动子

TCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACTAGGAGGAATATA
AA

atoB

ATGAAAAATTGTGTCATCGTCAGTGCGGTACGTACTGCTATCGGTAGTTTTTAACGGTTCAGTTCGCTTCCACCAGCGC
CATCGACCTGGGGGCGACAGTAATTAAAGCCGCCATTGAACGTGCAAAATCGATTCAACACAGTTGATGAAGTGA
TTATGGGTAACGTGTTACAGCCGGGCTGGGGCAAAATCCGGCGCGTCAGGCACGTGTTAAAAAGCGGGCTGGCAGAA
ACGGTGTGCGGAATTCACGGTCAATAAAGTATGTGGTTTCGGGTCTTAAAGTGTGGCGCTTGCCGCCAGGCCATTCA
GGCAGGTGAGGCGCAGAGCAATTGTGGCGGGGGTATGGAAAATATGAGTTTAGCCCCCTACTTACTCGATGCAAAAG
CACGCTCTGGTTATCGTCTTGGAGACGGACAGGTTTATGACGTAATCCTGCGCGATGGCTGATGTGCGCCACCCAT
GGTTATCATATGGGATTACCGCCGAAAACGTGGCTAAAGAGTACGGAATTACCCGTGAAATGCAGGATGAAGTGGC
GCTACATTCACAGCGTAAAGCGGCAGCGCAATTGAGTCCGGTGCTTTTACAGCCGAAATCGTCCCGGTAAATGTTG
TCACTCGAAAGAAAACCTTCGCTCTCAGTCAAGACGAATTCGGAAAGCGAATTCACGGCTGAAGCGTTAGGTGCA
TTGCGCCCGGCCCTTCGATAAAGCAGGAACAGTCACCGCTGGGAACGCGTCTGGTATTAACGACGGTGCTGCGCTCT
GGTGATTATGGAAGAATCTGCGGCGCTGGCAGCAGGCCTTACCCCCCTGGCTCGCATTAAGTTATGCCAGCGGTG
CGCTGCCCCCGCATTTGATGGGTATGGGGCCAGTACCTGCCACGCAAAAAGCGTTACAACCTGGCGGGGCTGCAACTG
GCGGATATTGATCTCATTTAGGCTAATGAAGCAATTTGCTGCACAGTTCCTTGCCGTTGGGAAAAACCTGGGCTTTGA
TTCTGAGAAAGTGAATGTCAACGGCGGGGCCATCGCGCTCGGGCATCCTATCGGTGCCAGTGGTGTCTGCTATTTCTGG
TCACACTATTACATGCCATGCAGGCACGCGATAAAACGCTGGG

atoB ←

GCTGGCAACACTGTGCATTGGCGGCGGTGAGGGAATTGCGATGGTGATTGAACGGTTGAATTAAGGAGGACAGCTAA

HMGS

ATGAAACTCTCAACTAACTTTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCAAAAGCAACAACAATTACACAA

图 23A

TACAACTTGCAAATGACTGAACTAAAAAACAAAAGACCGCTGAACAAAAACCAGACCTCAAAATGTCCGTATTA
AAGGTATCCAAATTTACATCCCACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTCTCAAGGT
AAATACACAATTTGGTCTGGGCCAAACCAACATGTCTTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGATGTCCCTAAC
TGTTTTGTCTAAGTTGATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAAATTTGGTAGATTAGAAGTCGGTACTGAAACTC
TGATTGACAAGTCCAAGT

(C159A)

CTGTCAAGTCTGTCTTGATGCAATTGTTTGGTGAAACACTGACGCTCGAAGGTATTGACACGCTTAATGCCGCGTAC
GGTGGTACCAACGCGTTGTTCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACGCATGGGATGGTAGAGACGCCATTGTAGT
TTGCGGTGATATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTGGTGCCGCTACTGTTGCTATGTGGATCG
GTCTGTATGCTCCAATTGTATTTGACTCTGTAAAGAGCTTCTTACATGGAACACGCCCTACGATTTTTACAAGCCAGAT
TTCACCAGCGAATATCCTTACGTGATGGTCATTTTTCATTAACTTGTACGTCAAGGCTCTTGATCAAGTTTACAA
GAGTTATTCCAAGAAGGCTATTTCTAAAGGGTTGGTTAGCGATCCCGCTGGTTCCGATGCTTTGAACGTTTGAAT
ATTTGCACTACAACGTTTTCATGTTCCAACCTGTAAATTTGGTCACAAAATCATACGGTAGATTACTATATAACGAT
TTCAGAGCCAATCCTCAATTGTTCCAGAAAGTTGACGCCGAATTAGCTACTCGCGATTATGACGAATCTTTAACC
TAAGAACATTGAAAAAATTTTGTAAATGTTGCTAAGCCATTCCACAAAGAGAGAGATTGCCCAATCTTTGATTGTTT
CAACAAACACAGGTAACATGTACACCGCATCTGTTTATGCCGCCCTTTCATCTCTATTAAACTATGTTGGATCTGAC
GACTTACAAGGCAAGCGTGTGGTTTATTTTCTTACGGTTCCCGTTTACGCTGCATCTCTATATTCTTGCAAAATGTT
TGGTGACGTCCAACATATTATCAAGGAATTAGATATTACTAACAAATTAGCCAAGAGAATCACCGAACTCCAAGG
ATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAAATGCCCATTTGAAGAAGAACTTCAAACCTCAAGGTTCCATTGAGCAT
TTGCAAAGTGGTGTCTTACTACTTGACCAACATCGATGAC

HMGS



截短的 HMGR

AAATTTAGAAGATCTTACGATGTTAAAAATAAGGAGGATTACACTATGGTTTTAACCAATAAAACAGTCATTTCTG
GATCGAAAGTCAAAAGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATCTAGTGAGGAAGATGATTC
CGCGATATTGAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCTTTAGAAGAATTAGAAGCATTATTAAGTAGTGGAATACAAA
ACAATTGAAGAACAAGAGGTCGCTGCCCTTGGTTATTCACGGTAAGTTACCTTTGTACGCTTTGGAGAAAAAATTAG
GTGATACTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTTCAATTTTGGCAGAAGCTCCTGTATTAGCATCTGAT
CGTTTACCATATAAAAAATTATGACTACGACCGCGTATTTGGCGCTTGTGTGAAAATGTTATAGGTTACATGCCCTT
GCCCGTTGGTGTATAGGCCCTTGGTTATCGATGGTACATCTTATCATATACCAATGGCAACTACAGAGGGTTGTT
TGGTAGCTTCTGCCATGCCGTGGCTGTAAGGCAATCAATGCTGCCGTTGGTGCAACAAGCTGTTTAACTAAGGATGGT
ATGACAAGAGGGCCAGTAGTCCGTTTCCCACTTTGAAAAGATCTGGTGCCCTGTAAGATATGGTTAGACTCAGAAGA
GGGACAAAACGCAATTA AAAAAGCTTTTAACTCTACATCAAGATTTGCACGCTCTGCAACATATTCAAACCTGTCTAG
CAGGAGATTTACTCTTCATGAGATTTAGAACAAGTCTGGTGACGCAATGGGTATGAATATGATTTCTAAAGGTGTC
GAATCTCATTAAGCAAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGGAGGTTGCTCTCCGTTTCTGGTAACTACTG
TACCGACAAAAACCAGCTGCCATCAACTGGATCGAAGGTCGTGGTAAAGAGTGTGTCGCGAGAAGCTACTATTCCCTG
GTGATGTTGTGCAAAAAGTGTAA AAAAGTGTATTTCCGCATTGGTTGAGTTGAACATTGCTAAGAAATTTGGTTGGA
CTGCAATGGCTGGGCTCTGTTGGTGGATTTAACGCACATGCAGCTAAATTTAGTGACAGCTGTTTTCTTGGCATTAGG
ACAAGATCCTGCACAAAATGTTGAAAGTTCCAAGTGTATAACATTTGATGAAGAAGTGGACGGTGATTTGAGAATTT
CCGTATCCATGCCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGTGGTGGTACTGTTCTAGAACCAAGGTCATGTTGGAC
TTATTAGGTGTAAGAGGCGCCGATGCTACCGCTCCTGGTACCAACGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTGCCTGTGC
CGTCTTGGCAGGTGAATTATCCTTATGTGCTGCCCTAGCAGCCGCCATTTGGTTCAAAGTCATATGACCCACAACA
GGAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAAATTTGGACGCCACTGATATAAATCGTT

截短的 HMGR



rrnB 终止子

TGAAAGATGGGTCCGTCACCTGCATTAAATCCTAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGA
GAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAAATTTGCCTGGCGGCAG
TAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAATCAGAAGTGAACGCGGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTC
CCCATGCCAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTAT
CTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCCGAAGCAACGGC
CCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAAATTAAGCAGAAGGCCATCTGACGGATGGC
CTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC
CCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTT

图

23B

TTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGG
TGCAGCAAACCTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAA
AGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTGAGA
CCAAGTTTACTCATATATACTTTTAGATTGATTTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTT
ACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCAC
GTTCCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACG
TTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGAACAACACTCAACCCCTATCTCGGGCTATTCTTT
TGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATT
TTAACAAAAATATTAACGTTTACAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTC
TGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCA
ACTCTTTTCCGAAGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG
CCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTTACATACCTCGCTGTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGGGCATTTGAGAA
GCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCT
GCCCTGAACCGACGACCGGGTCAATTTGCTTTCGAATTTCTGCCATTATCCGCTTATTATCACTTATTTCAGGC

氯霉素耐药基因

GTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTG
TTGTAATTCATTAAGCATTCCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCA
GCACCTTGTGCGCTTGCCTATAATATTGCCCATGGTGAACACGGGGGCGAAGAAGTTGTCATATTGGCCACGTTT
AAATCAAACTGGTGAACCTCACCCAGGGATTTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATA
GGCCAGGTTTTACCCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAATCGTCTGGTATTAC
TCCAGAGCGGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGAAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGC
TCACCGTCTTTTATTGCCATACGGAATTCGGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGCCGGATA
AAACTTGTGCTTATTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATT
GAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATT
TTTTTCTCCAT

TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAA
AGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGSTATCAACAGGG
ACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCCTCGGGTGATGC
TGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTGTAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCC
GTTCAGCTACTGACGGGGTGGTGCGTA

pACYC184 起始位点

ACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGATATACTGGCTTACTATGTTTGGCACTGATGAGGGTGTCA
GTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCGG
CTTCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTCTGCTGCTGCGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGCGGAGAT
TTCTTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTCTTCCGCTTTCCGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGC
CGCGTTTGTCTCATTCACGCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACC
CCCCGTTTCACTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAGACATGCAAAAGCAC
CACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAG
GACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAA
AACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCAT
CTTATTAATCAGATAAAATATTTGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCCGGCGAT
ATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCTGCTCATGTT
TGACAGCTTATC (SEQ ID NO:11)

图 23C

pHMGS(C159A) 质粒序列

ATCGATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAAT
TGT

CTGATTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCTCG
GGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTG
GCGATAGGCATCCGGGTGGTGCCTCAAAGCAGCTTCGCCCTGGCTGATACGTTGGTCCCTCGCGCCAGCTTAAGACGCT
AATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATAT
CAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGC
GACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCC
TTCCCTTGCCCGCGCTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCGTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGA
ACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGG
TGATACCATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGG
TCGGCAAACAAATTCTCGTCCCTGATTTTTACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCA
TTCCACGCGGTTCGGTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACAGATGGGCA
TTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATT

TGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCG
TCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAACCGGTAACCCGCTTATTAAGCATTCTGTAACAAAGCG
GGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCAC
GGCGTCACA

CTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGT
TTC

TCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTTCGAGCTCGGTACCCGGGAGGAGGACAGCTAAATGAAACTCTCAACTA
AACTTTTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCCAAAAGCAACAACAATTACACAATACAACTTGCAAATG
ACTGAACTAAAAAAACAAAGACCGCTGAACAAAAACCAGACCTCAAAATGTCGGTATTAAAGGTATCCAAATTTA
CATCCCACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTCTCAAGGTAAATACACAATTGGTC
TGGGCCAAACCAACATGTCTTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGATGTCCCTAACTGTTTTGTCTAAGTTG
ATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAATTTGGTAGATTAGAAGTCGGTACTGAACTCTGATTGACAAGTCCAA
GTCGTGTCAGTCTGTCTT

GATGCAATTGTTTGGTGAAAACACTGACGTCGAAGGTATTGACACGCTTAATGCCGCGTACGGTGGTACCAACGCGT
TGTTCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACGCATGGGATGGTAGAGACGCCATTGTAGTTTGCGGTGATATTGCC
ATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTGGTGCCGGTACTGTTGCTATGTGGATCGGTCTCTGATGCTCCAAT
TGTTATTTGACTCTGTAAGAGCTTCTTACATGGAACACGCCTACGATTTTTTACAAGCCAGATTTCACCAGCGAATATC
CTTACGTCGATGGTCATTTTTTCAATTAACCTTGTACGTCAAGGCTCTTGATCAAGTTTACAAGAGTTATTCCAAGAAG
GCTATTTCTAAAGGGTTGGTTAGCGATCCCGCTGGTTCCGATGCTTTGAACGTTTTGAAATATTTGACTACAACGT
TTTCCATGTTCCACCTGTAAATTGGTCACAAATCATACGGTAGATTACTATATAACGATTTCAGAGCCAAATCCTC
AATTGTTCCCGAAGTTGACGCCGAATTAGCTACTCGCGATTATGACGAATCTTTAACCAGATAAGAACATTGAAAAA
ACTTTTGTAAATGTTGCTAAGCCATTCCACAAAGAGAGATTGCCAATCTTTGATTGTTCCAAACAAACACAGGTAA
CATGTACACCGCATCTGTTTATGCGGCCTTTGCATCTCTATTAACCTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGGCAAGC
GTGTTGGTTTTATTTCTTACGGTTCCGGTTTAGCTGCATCTCTATATCTTGCAAAATGTTGGTGACGTCCAACAT
ATTATCAAGGAATTAGATATTACTAACAAATTAGCCAAGAGAATCACCGAACTCCAAAGGATTACGAAGCTGCCAT
CGAATTGAGAGAAAAAGCCATTGGAAGAAGAACTCAAACCTCAAGGTTCCATTGAGCAATTGCAAGTGGTGT
ACTACTTGACCAACATCGATGACAAATTTAGAAGATCTT

图 24A

HMGS ← | rrnB 终止子
 ACGATGTTAAAAATAAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTG
 ATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAAGCGGTCTGATAAAACAGAAATTTGCCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACC
 TGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGA
 ACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAA
 CGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGGGCAG
 GACGCCCCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTCTACAA
 ACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAAT
 AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTT
 CCTGTTTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAAGATCAGTTGGGTGCAGCAAACTATTAAGT
 GCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTCAGGACCACTTCT
 GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTG
 CAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
 CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATAT
 ACTTTAGATTGATTTACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCT
 ACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCTCCG
 TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATT
 TGGGTGATGGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT
 AATAGTGGACTCTTGTTCCAACTTGAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTATTCTTTTATAGGGATTTT
 GCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTTAACGCGAATTTTAAACAAATATTAACGT
 TTACAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTT
 CCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
 TGCAACAAAAAACACCGCTACCGAGCGGTGGTTTGGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCGAAGGTA
 ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTC
 TGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGGGCATTTGAGAAGCACACGGTTCACACTGCT
 TCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCCTGCCCTGAACCGACGACCG
 GGTGAATTTGCTTTTCAATTTCTGCCATTATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGC

→ 氯霉素耐药基因

GTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAATTACGCCCGGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTG
 TTGTAATTCATTAAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCA
 GCACCTTGTGCGCTTGCCTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTT
 AAATCAAACTGGTGAACTCAGCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATA
 GGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTACAC
 TCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGC
 TCACCGTCTTTTCACTGCCATACGGAATTCGGGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATA
 AAACCTTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATT
 GAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATT
 TTTTCTCCAT

TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAA
 AGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGG
 ACACCAGGATTTATTTATTTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCCTCGGGTGATGC
 TGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCC
 TGTTACAGCTACTGACGGGGTGGTGCGTA

pACYC184 起始位点

ACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGCGGTGTCA
 GTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCGG

图 24B

CTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTCGTTCTGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAGAT
TTCTTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCTGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGC
CGCGTTTGCTCATTTCCACGCCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACC
CCCCGTTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGAAAGACATGCAAAAGCAC
CACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATCGCCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAG
GACAAGTTTGGTGA CTGCGCTCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAA
AACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCAT
CTTATTAATCAGATAAAATATTTGCTCATGAGCCCGAAGTGCGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTGCGCGAT
ATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCTGCTCATGTT
TGACAGCTTATC (SEQ ID NO:12)

图 24C