

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510103611.X

[51] Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12P 13/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100410366C

[51] Int. Cl. (续)

C12P 13/14 (2006.01)

C12P 13/24 (2006.01)

C12N 15/69 (2006.01)

[22] 申请日 1999. 12. 30

[21] 申请号 200510103611.X

分案原申请号 99127522.5

[30] 优先权

[32] 1998. 12. 30 [33] RU [31] 98124016

[32] 1999. 3. 9 [33] RU [31] 99104431

[73] 专利权人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 V·A·利夫希茨

N·P·扎卡特瓦 中西一夫

V·V·阿列申 P·V·特罗申

I·L·托克马科瓦

[56] 参考文献

US4980285A 1990. 12. 25

CN1182133A 1998. 5. 20

审查员 魏 聪

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 34 页

[54] 发明名称

具有产生 L-氨基酸能力的埃希氏菌属细菌以及生产 L-氨基酸的方法

[57] 摘要

本发明涉及具有产生 L-氨基酸能力的埃希氏菌属细菌和使用该细菌生产 L-氨基酸的方法,其中所述细菌产生 L-氨基酸的能力通过增加 L-氨基酸分泌蛋白的表述量得以提高。

1. 一种生产 L-氨基酸的方法，包括下列步骤：

在培养基中培养一种细菌，以便在培养基中产生和积累 L-氨基酸，和

从培养基中回收 L-氨基酸，

其中所述细菌是具有产生 L-氨基酸能力的埃希氏菌属细菌，其中产生 L-氨基酸能力通过增加具有序列表中 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的蛋白 的表达量得到提高。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述 L-氨基酸为 L-谷氨酸。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述 L-氨基酸为 L-组氨酸。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述 L-氨基酸为 L-脯氨酸。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述 L-氨基酸为 L-苏氨酸。

6. 权利要求 1 到 5 任一项的方法，其中所述细菌细胞中编码所述蛋白的 DNA 的拷贝数增加。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述 DNA 携带在细胞中的多拷贝载体上。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述 DNA 携带在细胞中的转座子上。

具有产生 L-氨基酸能力的埃希氏
菌属细菌以及生产 L-氨基酸的方法

本申请是申请号为 99127522.5、申请日为 1999 年 12 月 30 日、发明名称为“生产 L-氨基酸的方法”的发明专利申请的分案申请。

本发明涉及生产氨基酸的方法。具体而言，本发明涉及属于埃希氏菌属的产 L-氨基酸细菌和使用该细菌生产 L-氨基酸的方法，更具体而言是生产 L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-组氨酸、L-脯氨酸、L-精氨酸、L-缬氨酸和 L-异亮氨酸的方法。

为了通过发酵生产 L-氨基酸，使用了分离自自然界的菌株或该菌株的人工突变体来提高产量。例如，在生产 L-赖氨酸时，已知有多种产 L-赖氨酸的人工突变体，其中大多数是 S-2-氨基半胱氨酸(AEC)抗性突变体，属于短杆菌属、棒杆菌属、芽孢杆菌属或埃希氏菌属。而且，已提出了一些增加氨基酸产量的途径，如使用通过重组 DNA 法获得的转化体(美国专利 4,278,765)。

这些途径多数基于提高参与氨基酸生物合成途径的酶的活性，使该酶转变成对抑制不敏感等(关于埃希氏菌属细菌，参见日本专利申请公开号 56-18596(1981)和国际公开 WO 95/16042)。

另一方面，作为通过增加氨基酸分泌蛋白而提高氨基酸产率的例子，已知有一种属于棒杆菌属的细菌，其中 L-赖氨酸分泌蛋白基因 LysE 被增加。然而，对于属于埃希氏菌的细菌，甚至还不知道是否存在 L-氨基酸分泌蛋白。因此，使用埃希氏菌属细菌时，不知道增加 L-氨基酸分泌蛋白对 L-氨基酸生产是否有效。

尽管属于埃希氏菌属的大肠杆菌 K-12 菌株的全部核苷酸序列已经确定(Science, 277, 1453-1474, 1997)，但其中有大量蛋白的功能还不知道。

本发明的目的是获得参与 L-氨基酸分泌的蛋白，从而提供 L-氨基酸产率提高的菌株和通过发酵生产 L-氨基酸的改良方法。

发明人已对参与 L-氨基酸分泌的蛋白进行了筛选。结果，发明人发现当增强一种特定基因时，基于消耗的糖的 L-氨基酸产量增加

了。基于这一发现完成了本发明。

因此，本发明提供了具有产生 L-氨基酸能力的埃希氏菌属细菌，其中产 L-氨基酸的能力通过增加至少一种选自以下(A)到(H)的蛋白的表达量而得到提高（以下称为“本发明的细菌”）：

(A) 具有序列表中 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的蛋白；

(B) 具有在序列表中 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列中有一个或几个氨基酸缺失、置换、插入、增加或倒位的氨基酸序列的蛋白，该蛋白具有增加含该蛋白的细菌产生 L-氨基酸的能力的活性；

(C) 具有序列表中 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的蛋白；

(D) 具有在序列表中 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列中有一个或几个氨基酸缺失、置换、插入、增加或倒位的氨基酸序列的蛋白，该蛋白具有增加含该蛋白的细菌产生 L-氨基酸的能力的活性；

(E) 具有序列表中 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的蛋白；

(F) 具有在序列表中 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列中有一个或几个氨基酸缺失、置换、插入、增加或倒位的氨基酸序列的蛋白，该蛋白具有增加含该蛋白的细菌产生 L-氨基酸的能力的活性；

(G) 具有序列表中 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的蛋白；或

(H) 具有在序列表中 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列中有一个或几个氨基酸缺失、置换、插入、增加或倒位的氨基酸序列的蛋白，该蛋白具有增加含该蛋白的细菌产生 L-氨基酸的能力的活性。

本发明的细菌优选一种产 L-赖氨酸细菌，其中选自(A)到(D)，(G)和(H)的至少一种蛋白的表达量增加；一种产 L-谷氨酸细菌，其中选自(A)到(H)的至少一种蛋白的表达量增加；一种产 L-丙氨酸细菌，其中选自(C)和(D)的至少一种蛋白的表达量增加；一种产 L-缬氨酸细菌，其中选自(C)和(D)的至少一种蛋白的表达量增加；一种产 L-组氨酸细菌，其中选自(C)到(F)的至少一种蛋白的表达量增加；一种产 L-脯氨酸细菌，其中选自(A)到(F)的至少一种蛋白的表达量增加；一种产 L-苏氨酸细菌，其中选自(E)和(F)的至少一种蛋白的表达量增加；一种产 L-精氨酸细菌，其中选自(G)和(H)的至少一种蛋白的表达量增加；或一种产 L-异亮氨酸细菌，其中选自(C)和(D)的至少一种蛋白的表达量增加。

优选，本发明的细菌中编码细胞中所述蛋白的 DNA 的拷贝数量增

加。该 DNA 优选携带于细胞中的多拷贝质粒或转座子上。

本发明还提供了生产 L-氨基酸的方法，包括以下步骤：

在培养基中培养本发明的细菌，在培养基中产生和积累 L-氨基酸；

由培养基中回收 L-氨基酸（以下也称为“本发明的细菌”）。

本发明的方法优选一种使用产 L-赖氨酸细菌生产 L-赖氨酸的方法，所述细菌中选自 (A) 到 (D)，(G) 和 (H) 的至少一种蛋白的表达量增加；一种使用产 L-谷氨酸细菌生产 L-谷氨酸的方法，所述细菌中选自 (A) 到 (H) 的至少一种蛋白的表达量增加；一种使用产 L-丙氨酸细菌生产 L-丙氨酸的方法，所述细菌中选自 (C) 和 (D) 的至少一种蛋白的表达量增加；一种使用产 L-缬氨酸细菌生产 L-缬氨酸的方法，所述细菌中选自 (C) 和 (D) 的至少一种蛋白的表达量增加；一种使用产 L-组氨酸细菌生产 L-组氨酸的方法，所述细菌中选自 (C) 到 (F) 的至少一种蛋白的表达量增加；一种使用产 L-脯氨酸细菌生产 L-脯氨酸的方法，所述细菌中选自 (A) 到 (F) 的至少一种蛋白的表达量增加；一种使用产 L-苏氨酸细菌生产 L-苏氨酸的方法，所述细菌中选自 (E) 和 (F) 的至少一种蛋白的表达量增加；一种使用产 L-精氨酸细菌生产 L-精氨酸的方法，所述细菌中选自 (G) 和 (H) 的至少一种蛋白的表达量增加；或一种使用产 L-异亮氨酸细菌生产 L-异亮氨酸的方法，所述细菌中选自 (C) 和 (D) 的至少一种蛋白的表达量增加。

优选，本发明的方法中编码细菌细胞中所述蛋白的 DNA 的拷贝数量增加。该 DNA 优选携带于细胞中的多拷贝质粒或转座子上。

根据本发明，埃希氏菌属细菌产 L-氨基酸的能力可以被提高。生产 L-氨基酸的方法的 L-氨基酸的产率也可以被提高。

以下详述本发明。以下除非另外说明氨基酸指 L-构型。

(1) 本发明的细菌

本发明的细菌是具有产生氨基酸能力的埃希氏菌属细菌，其中产生氨基酸的能力通过增加一种蛋白的表达量得以提高，所述蛋白具有增加所述细菌产生氨基酸能力的活性，或增加对氨基酸或氨基酸类似物的抗性的活性。以下，为方便起见该蛋白被称为“氨基酸分泌蛋白”。但使用该术语并不意味着该蛋白的功能仅限于氨基酸分泌。

氨基酸分泌蛋白的实例包括具有 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列

的蛋白，具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的蛋白，具有 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的蛋白，具有 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的蛋白。

氨基酸分泌蛋白对氨基酸可以具有选择性。适合于每一种氨基酸的氨基酸分泌蛋白可以通过以下方法确定：让氨基酸分泌蛋白在属于埃希氏菌属并具有产氨基酸能力的细菌中表达，测定氨基酸产量的增加或者氨基酸或氨基酸类似物的最小抑制浓度（MIC）的增加。

例如，在氨基酸为赖氨酸时，具有 SEQ ID NO: 10, 12 或 16 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为谷氨酸时，具有 SEQ ID NO: 10, 12, 14 或 16 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为丙氨酸时，具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为缬氨酸时，具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为组氨酸时，具有 SEQ ID NO: 12 或 14 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为脯氨酸时，具有 SEQ ID NO: 10, 12 或 14 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为苏氨酸时，具有 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为精氨酸时，具有 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的蛋白是有效的；在氨基酸为异亮氨酸时，具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的蛋白是有效的。

本文中术语“表达量增加”通常是指表达量大于大肠杆菌野生型菌株如 MG1655 或 W3110 的表达量。该术语也包括当通过遗传工程技术等手段修饰得到一种菌株时，表达量大于修饰前。氨基酸分泌蛋白的表达量可通过测定氨基酸分泌蛋白直接确定，或通过测定氨基酸或氨基酸类似物的 MIC，或者属于埃希氏菌属并具有氨基酸分泌蛋白的细菌的氨基酸产量间接确定。

增加氨基酸分泌蛋白表达量的方法的实例可以是增加细菌细胞中编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 的拷贝数。

为了增加细胞中的拷贝数，编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 片段可以与在埃希氏菌属细菌中有功能的载体连接，产生重组 DNA，将其导入宿主中使宿主转化。转化菌株的细胞中编码氨基酸分泌蛋白的基因（氨基酸分泌蛋白基因）的拷贝数增加，从而增加氨基酸分泌蛋白的表达量。该载体优选为多拷贝载体。

在细胞中增加拷贝数可以通过允许宿主染色体 DNA 上存在氨基酸分泌蛋白基因的多个拷贝实现。向埃希氏菌属细菌染色体 DNA 上引入氨基酸分泌蛋白基因的多个拷贝可以通过同源重组实现,使用在染色体 DNA 上有多个拷贝的序列作为靶。在染色体 DNA 上有多个拷贝的序列可以使用转座因子末端存在的重复 DNA 和倒转重复。或者,优选如日本专利申请公开号 2-109985 (1990) 中公开的,多个拷贝可以通过以下方法引入染色体 DNA: 使氨基酸分泌蛋白基因携带于转座子上,让转座子转座。根据上述任一种方法,在转化体菌株中氨基酸分泌蛋白基因的拷贝数增加,从而增加氨基酸分泌蛋白的表达量。

多拷贝载体的实例可以是 pBR322, pMW118, pUC19 等质粒载体和 λ 1059, λ BF101, M13mp9 等噬菌体载体。转座子的实例可以是 Mu, Tn10, Tn5 等。

向埃希氏菌属细菌引入 DNA 可以通过以下方法进行: D. M. Morrison (酶学方法 68, 326, 1979) 的方法,或受体细菌细胞用氯化钙处理以增加 DNA 的通透性的方法 (Mandel, M. & Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159, 1970) 等。

除了上述基因扩增方法,增加氨基酸分泌蛋白的表达量也可以通过用作用较强的表达调节序列取代氨基酸分泌蛋白基因的启动子等表达调节序列来实现 (参见日本专利申请公开号 1-215280(1989))。例如,已知 lac 启动子、trp 启动子、tac 启动子、 λ 噬菌体 P_R 启动子和 P_L 启动子等为强启动子。取代启动子提高了氨基酸分泌蛋白的表达,从而增加了氨基酸分泌蛋白的表达量。表达调节序列的增强可以与增加氨基酸分泌蛋白基因的拷贝数联合使用。

在本发明的细菌中,多种氨基酸分泌蛋白的表达量可以增加。

氨基酸分泌蛋白已知由 yahN 基因、yeaS 基因、yfiK 基因和 yggA 基因编码,其功能还不清楚。因此,编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 可以通过以下方法获得: 根据已知序列 (例如大肠杆菌 K-12 菌株的全部核苷酸序列已经确定 (Science, 277, 1453-1474(1997))) 合成引物,使用埃希氏菌属细菌的染色体 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。目标 DNA 片段也可以根据已知序列制备探针,再通过杂交从埃希氏菌属细菌的染色体 DNA 文库中选择。或者,编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 可根据已知序列合成。编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 的核苷酸序列的实例见

序列表中 SEQ ID NO: 9, 11, 13 或 15.

制备染色体 DNA、制备染色体 DNA 文库、杂交、PCR、制备质粒 DNA、消化和连接 DNA、转化、选择作为引物的寡核苷酸等的方法可以是本领域技术人员熟知的普通方法。这些方法可参见 Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 《分子克隆：实验室指南》第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等。

氨基酸分泌蛋白可以在一个或多个位置有一个或几个氨基酸的置换、缺失、插入、增加或倒位，只要增加属于埃希氏菌属并含有该蛋白的细菌产氨基酸能力的活性未被破坏即可。“几个”取决于蛋白立体结构中的位置和氨基酸残基的种类可以有所变化。这是因为有些氨基酸如异亮氨酸和缬氨酸彼此高度类似，这些氨基酸之间的差异不会明显影响蛋白的立体结构。

编码作为上述氨基酸分泌蛋白的基本相同蛋白的 DNA 可以通过以下方法获得：例如利用定点诱变修饰核苷酸序列使得特定位点的一个或多个氨基酸残基发生置换、缺失、插入、增加或倒位。如上修饰的 DNA 可以通过常规的已知突变处理获得。突变处理包括用羟胺体外处理编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 的方法，和用紫外辐射或 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NG) 和亚硝酸等常用于诱变处理的诱变剂处理携带有编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 的微生物的方法，所述微生物如埃希氏菌属细菌。

一个或几个氨基酸残基的置换、缺失、插入、增加或倒位包括天然产生的突变或变异，它是由具有氨基酸分泌蛋白的单个微生物之间和种、菌株等之间的差异产生的。

编码作为氨基酸分泌蛋白的基本相同蛋白的 DNA 可以通过以下方法获得：让具有上述突变的 DNA 在属于埃希氏菌属的合适细菌细胞中表达，确定细胞中氨基酸产量的增加。

编码作为氨基酸分泌蛋白的基本相同蛋白的 DNA 也可以通过以下方法获得：由编码具有突变的氨基酸分泌蛋白的 DNA 或含所述 DNA 的细胞中，分离在严紧条件下与具有序列表中 SEQ ID NO: 9、11、13 或 15 所示核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA，该 DNA 编码具有增加埃希氏菌属细菌产氨基酸能力的活性的蛋白。本文中“严紧条件”指形成特异杂交体而不形成非特异杂交体的条件。该条件难以用数值明确

地表示。但是，严紧条件包括例如彼此具有高同源性的 DNA 可杂交而低于该同源性的 DNA 不能杂交的条件，所述高同源性 DNA 如同源性不低于 70%，或相当于普通 Southern 杂交洗涤条件的 60 °C，1×SSC，0.1% SDS，优选 0.1×SSC，0.1% SDS 的盐浓度的条件。

尽管在上述条件下杂交的基因中可能存在终止密码子位于中间的基因，或编码由于活性中心突变而失去活性的蛋白的基因，但这些基因通过以下方法易于消除：将基因与市售活性表达载体连接，确定增加上述埃希氏菌属细菌产生氨基酸能力的活性。

本文中“编码蛋白的 DNA”是指双链 DNA 中一条链编码该蛋白的 DNA。

通过在上述属于埃希氏菌属、产氨基酸的细菌中增加氨基酸分泌蛋白的表达量，可增加氨基酸的产生量。作为其中氨基酸分泌蛋白的表达量待增加的埃希氏菌属细菌，使用具有产生所需氨基酸能力（氨基酸生产力）的菌株。此外，可以将产生某种氨基酸的能力赋予其中氨基酸分泌蛋白表达量已增加的细菌。属于埃希氏菌属的产氨基酸细菌的实例包括大肠杆菌 AJ13199（法国专利 2747689）和可从已知材料获得的菌株（例如以下实施例所述的大肠杆菌 W3110 (tyrA)/pCABD2，大肠杆菌 VL614，大肠杆菌 VL2054，大肠杆菌 VL2160，大肠杆菌 VL2151，大肠杆菌 W3350 argE::Tn10/pKA10）。

作为参考，本发明的氨基酸分泌蛋白如下文所述首次进行鉴定。

发明人鉴定了埃希氏菌属细菌的 rhtB 和 rhtC 作为苏氨酸分泌蛋白基因。发明人根据氨基酸分泌蛋白可能具有共同的结构这一设想进行了检索。即对 GenBank CDS，PDB，SWISS-PROT，Spupdate 和 PIR 进行了 rhtB 编码蛋白同源性的 BLAST 和 PSI-BLAST 检索(Altschul, S. F. et al., Nucleic Acid Res., 25, 3389-3402 (1997))。对未完成的微生物基因组进行了 Tblastn 检索。对 SWALL 数据库进行了 BLITZ 检索 (Sturrock, S. S. & Collins, J. F., Mpsch 版本 1.3. 生物计算机研究小组，爱丁堡大学，英国，1993)。对翻译本和 SWISS-PROT 数据库进行了 SMART 检索(Ogiwara, I. et al., Protein Sci., 5, 1991-1999, 1996)。从找到的 60 多个序列样品中，YeaS（相当于 GenBank 入藏号 AE000274 的 f212），YahN（相当于 GenBank 入藏号 AE000140 的 f223），YfiK（相当于 GenBank 入藏号 AE000344 的

o195), YggA (相当于 GenBank 入藏号 AE000375 的 f211) 在来自大肠杆菌的蛋白中为与 RhtB 功能类似的蛋白。由于这些基因的功能均为未知, 实际获得这些基因, 其对氨基酸和氨基酸类似物的 MIC 和氨基酸产生的影响通过提高其活性进行研究。结果, 发现 YeaS, YfiK, YahN 和 YggA 增加某些氨基酸和类似物的 MIC。进一步研究证实, 这些基因编码的蛋白具有增加氨基酸积累的作用, 但它们可能具有某些氨基酸选择性。

(2) 本发明的方法

本发明的方法包括在培养基中培养本发明的细菌, 在培养基中产生和积累氨基酸, 由培养基中回收氨基酸。

合适的氨基酸包括赖氨酸、谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸、高丝氨酸、脯氨酸和苏氨酸。

本发明的方法中, 培养埃希氏菌属细菌, 由液体培养基中收集和纯化氨基酸可以按照与使用细菌通过发酵生产氨基酸的常规方法类似的方式进行。培养中使用的培养基可以是合成培养基或天然培养基, 只要培养基包括所用的细菌生长必需的适量碳源、氮源和矿物质, 必要时含有营养素。碳源可以包括葡萄糖和蔗糖等碳水化合物和各种有机酸。根据所用的细菌的同化能力, 包括乙醇和甘油的醇类也可以使用。氮源可以使用氨、硫酸铵等铵盐、胺等含氮化合物、蛋白胨、大豆水解物和消化的发酵微生物等天然氮源。矿物质可以使用磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、碳酸钙。

培养优选在好气条件下进行, 如振荡培养、通气培养和搅动培养。培养温度通常为 20 到 40 °C, 优选 30 到 38 °C。培养 pH 通常为 5 到 9, 优选 6.5 到 7.2。培养液的 pH 可以用氨、碳酸钙、各种酸、各种碱和缓冲剂调节。通常, 培养 1 到 3 天可在培养基中积累目标氨基酸。

回收氨基酸可按以下方法进行: 培养后通过离心或膜过滤除去细胞等固体物质, 然后通过离子交换、浓缩和结晶分级等方法收集和纯化目标氨基酸。

以下参考实施例更具体地解释本发明。

实施例 1 制备编码氨基酸分泌蛋白的 DNA 片段

大肠杆菌 K-12 菌株染色体的全部核苷酸序列已经确定 (Science, 277, 1453-1474, 1997)。根据报导的核苷酸序列, 合成引物, 通过 PCR 扩增 yahN, yfiK, yeaS 和 yggA 基因。

(1) 使用大肠杆菌 MG1655 菌株染色体 DNA 作为模板

通过常规方法制备染色体 DNA (Sambrook, J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989) 《分子克隆: 实验室指南》第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。在 PCR 反应中, 使用文献中所述的标准条件(《PCR 操作: 方法和应用》White, B. A 编辑, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993)。所得的 PCR 产物如下所述通过常规方法纯化和用限制酶消化。

使用引物 1 和引物 2 扩增 yahN 基因。

引物 1: gtgtggaaccgacgccggat (互补于 GenBank 入藏号 AE000140 的登记核苷酸序列 1885 到 1904 号碱基, SEQ ID NO: 17), 引物 2: tggtgtatggtacgggggttcgag (上述序列中 223 到 245 号碱基, SEQ ID NO: 18)。纯化后所得的 PCR 产物用限制酶 PstI 和 StuI 消化, 使用连接试剂盒与 PstI 和 EcoRV 消化的载体 pUC21 连接 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991)。然后用产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞 (Sambrook, J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989) 《分子克隆: 实验室指南》第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), 将细胞涂布于含有 10 mg/ml IPTG (异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷) 和 40 mg/ml X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷) 以及 100 mg/ml 氨苄西林的 L 培养基 (10 g/l 细菌用胰胨, 5 g/l 酵母提取物, 5 g/l NaCl, 15 g/l 琼脂, pH7.0), 培养过夜。挑取出现的白色菌落, 进行单菌落分离以获得转化子。使用碱抽提法由转化子提取质粒, 命名为 pYAHN。

使用引物 3 和引物 4 扩增 yeaS 基因

引物 3: ctttgccaatcccgtctccc (互补于 GenBank 入藏号 AE000274 的登记核苷酸序列 7683 到 7702 号碱基, SEQ ID NO: 19); 引物 4: gccccatgcataacggaaag (上述序列中 5542 到 5561 号碱基, SEQ ID NO: 19)。纯化后所得的 PCR 产物用限制酶 AvaI 消化, 并与载体 pUC19 连接。同上转化大肠杆菌 TG1 后, 获得称为 pYEAS 的质粒。

使用引物 5 和引物 6 扩增 yfiK 基因

引物 5: gaagatcttgtaggccggataaggcg (GenBank 入藏号 AE000344 的登记核苷酸序列 4155 到 4177 号碱基, 在其 5' 端加上了限制酶 BglIII 位点, SEQ ID NO: 21)

引物 6: tggttttaccaattggccgc (互补于上述序列的 6307 到 6326 号碱基, SEQ ID NO: 22)。

纯化后获得的 PCR 产物用限制酶 BglIII 和 MunI 消化, 并与限制酶 BglIII 和 EcoRI 消化的载体 pUC21 连接。同上转化大肠杆菌 TG1 后, 获得称为 pYFIK 的质粒。

使用引物 7 和引物 8 扩增 yggA 基因

引物 7: acttctcccgcgagccagttc (互补于 GenBank 入藏号 AE000375 的登记核苷酸序列 9606 到 9626 号碱基, SEQ ID NO: 23)。

引物 8: ggcaagcttagcgccctctgtt (上述序列的 8478 到 8498 号碱基, SEQ ID NO: 24)。

纯化后获得的 PCR 产物用限制酶 HindIII 和 ClaI 消化, 与用同样限制酶消化的载体 pOK12 连接 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991)。同上转化大肠杆菌 TG1, 获得称为 pYGGA 的质粒。

(2) 用大肠杆菌 W3110 菌株的染色体 DNA 作为模板

使用引物 9 (SEQ ID NO: 1) 和引物 10 (SEQ ID NO: 2) 扩增 yahN 基因。

使用引物 11 (SEQ ID NO: 3) 和引物 12 (SEQ ID NO: 4) 扩增 yeaS 基因。

使用引物 13 (SEQ ID NO: 5) 和引物 14 (SEQ ID NO: 6) 扩增 yfiK 基因。

使用引物 15 (SEQ ID NO: 7) 和引物 16 (SEQ ID NO: 8) 扩增 yggA 基因。

纯化所获得的 PCR 产物, 用限制酶 SacI 和 XbaI (yggA 则为 EcoRI 和 PstI) 消化, 并与质粒 pMW118 连接 (Nippon Gene)。插入了序列与报导的序列相同的 DNA 片段的质粒称为:

携带 yahN: pMW118::yahN

携带 yeaS: pMW118::yeaS

携带 yfiK: pMW118::yfiK

携带 yggA: pMW118::yggA

实施例 2 某些氨基酸和氨基酸类似物抗性的大肠杆菌中 yahN, yeaS, yfiK 和 yggA DNA 片段扩增的作用

yahN, yeaS, yfiK 和 yggA 基因产物与谷氨酸棒杆菌赖氨酸转运者 LysE(Vrljic et al., Mol. Microbiol., 22, 815-826, 1996) 和参与高丝氨酸分泌的 RhtB 蛋白的同源性, 表明这些蛋白的功能类似。已知增加与抗生素和重金属外排有关的基因的表达导致对药物的抗性增加(Nikaido, H. J. Bacteriology, 178, 5853-5859, 1996)。因此, 测试了 pYEAS, pYAHN, pYFIK 和 pYGGA 质粒对 TG1 菌株对某些氨基酸和氨基酸类似物敏感性的作用。大肠杆菌 TG1/pYEAS, TG1/pYAHN, TG1/pYFIK, TG1/pYGGA 和对照菌株 TG1/pUC21, TG1/pUC19 和 TG1/pOK12 在含有合适抗生素的 M9 基本培养基中在摇床上过夜培养 (10^9 cfu/ml), 用 M9 基本培养基 1: 100 稀释, 在同一培养基中再培养 5 小时。这样获得的对数期培养物稀释, 大约 10^4 活细胞涂布于含双倍量氨基酸或类似物的 M9 琼脂的干的测试平板上。获得这些化合物的最小抑制浓度(MIC)。

结果示于表 1。由表 1 可见, 多个拷贝的 yfiK 基因使得对脯氨酸、高丝氨酸、组氨酸、苏氨酸、谷氨酸、赖氨酸、 α -氨基- β -羟基戊酸(AHVA)、S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)和 α -氨基丁酸的抗性增加; 多个拷贝的 yahN 基因使得对脯氨酸的抗性增加; 多个拷贝的 yeaS 基因使得对苏氨酸、高丝氨酸、赖氨酸、谷氨酸、组氨酸、脯氨酸和 α -氨基丁酸的抗性增加; 多个拷贝的 yggA 基因使得对 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)、赖氨酸和精氨酸的抗性增加。这些结果表明, 除了 YahN, 每一种推定的转运者均对几种底物(氨基酸和氨基酸类似物)有特异性, 或由于扩增显示非特异性作用。

表 1

底物	携带质粒的大肠杆菌 TG1 的 MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	pUC21	pYFIK	pYAHN	pYEAS	pYGGA
L-高丝氨酸	500	1000	500	1000	500
L-苏氨酸	30000	40000	30000	50000	30000
L-赖氨酸	5000	7500	5000	7500	15000
L-谷氨酸(钠盐)	5000	10000	5000	20000	5000
L-组氨酸	5000	10000	5000	30000	5000
L-缬氨酸	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
L-脯氨酸	1000	5000	2000	2000	1000
L-精氨酸	10000	10000	10000	10000	20000
AHVA	100	200	100	100	100
AEC	5	10	5	5	200
α -氨基丁酸	2500	5000	2500	>10000	2500
4-氯-DL-亮氨酸	100	100	100	100	100

实施例 3 yeaS, yahN 和 yfiK DNA 片段扩增对谷氨酸生成的影响
 大肠杆菌 AJ13199 菌株(法国专利 2747689)用载体 pUC21 和质粒 pYAHN, pYEAS 和 pYFIK 分别转化. 获得菌株 AJ13199/pUC21(VKPM B-7728), AJ13199/pYAHN(VKPM B-7729), AJ13199/pYEAS (VKPM B-7731)和 AJ13199/pYFIK(VKPM B-7730).

这些菌株在 37°C 分别于含有 100 mg/l 氯苄西林的营养肉汤中培养 18 小时, 0.3 ml 所得的培养物接种 20×200 mm 试管中的 3 ml 含有 100 mg/l 氯苄西林的发酵培养基, 37 °C 振荡培养 48 小时. 培养后, 通过已知方法确定培养基中积累的谷氨酸量。

发酵培养基的组成 (g/l) :

葡萄糖	80
硫酸铵	22
磷酸氢二钾	2
氯化钠	0.8
七水硫酸镁	0.8
七水硫酸亚铁	0.02

五水硫酸锰	0.02
盐酸硫胺素	0.0002
酵母提取物	1.0
碳酸钙	30.0

180°C 干热灭菌 2 小时，葡萄糖和磷酸氢二钾单独灭菌。

所得结果示于表 2。如表 2 所示，菌株 AJ13199/pYAHN, AJ13199/pYEAS 和 AJ13199/pYFIK 积累的谷氨酸较氨基酸分泌蛋白的表达量未提高的 AJ13199/pUC21 更高。

表 2

菌株	谷氨酸, g/l
AJ13199/pUC21	21.9
AJ13199/pYAHN	27.9
AJ13199/pYEAS	29.7
AJ13199/pYFIK	28.4

实施例 4 yeaS, yahN 和 yfiK DNA 片段扩增对赖氨酸生成的影响

(1) 作为产赖氨酸的埃希氏菌属细菌，使用引入了质粒 pCABD2 (国际公开 WO 95/16042) 的大肠杆菌 W3110 (TyrA) (欧洲专利公开号 488424)。具体而言，质粒 pCABD2 和 pMW118::yahN, pMW118::yeaS, pMW118::yfiK 和 pMW118 分别引入大肠杆菌菌株 W3110 (TyrA) 以获得下列菌株：

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yahN

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yeaS

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yfiK

W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118

这些菌株的赖氨酸生产力通过培养估计。所用的培养基的组成如下 (g/l)：

葡萄糖	40.0
七水硫酸镁	1.0
硫酸铵	16.0
磷酸氢二钾	1.0

七水硫酸亚铁	0.01
七水硫酸锰	0.01
酵母提取物(Difco)	2.0
酪氨酸	0.1

调 pH 为 7.0, 115 °C 高压灭菌 10 分钟。(葡萄糖和七水硫酸镁单独灭菌)

药用级碳酸钙 25 g/l (180 °C 干热灭菌 2 小时)
根据质粒的种类, 加入 20 mg/l 链霉素和 50 mg/l 氯霉素。在 37°C 以 115rpm 振荡培养 30 小时。结果示于表 3。

表 3

菌株	赖氨酸(g/l)	产量(%)
W3110 (tyrA)	0.08	0.2
W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118	12.2	30.5
W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yahN	13.8	34.5
W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yeaS	12.7	31.8
W3110 (tyrA)/pCABD2+pMW118::yfiK	12.2	30.5

表 3 结果表明, 由于 YahN 和 YeaS 增强, 赖氨酸的产生量和基于消耗的糖的产量增加了。

(2) 作为产赖氨酸的埃希氏菌属细菌, 使用大肠杆菌 VL614. 该菌株是已知的大肠杆菌 VL613 (SU Patent No. 1354458) 的衍生菌株。菌株 VL613 从已知菌株 Gif102 (Theze, J. & Saint Girons. J. Bacteriol., 118, 990-998, 1974) 分三步获得:

第一步, 选择对 2 mg/ml S-(2-氯乙基)-L-半胱氨酸有抗性的突变体, 其中发现菌株 VL611 能产生 L-赖氨酸。

第二步, 利用噬菌体 P1 介导的转导将参与蔗糖利用、定位于转座子 Tn2555 (Doroshenko et al., Mol. Biologiya, 22, 645-658, 1988) 的基因引入 VL611, 获得菌株 VL612。

第三步, 来自菌株 VKPMB-3996 的突变 rhtA23 赋予对苏氨酸和高丝氨酸的抗性 (美国专利 5,175,107), 通过噬菌体 P1 转导将其引入 VL612, 获得菌株 VL613。

大肠杆菌菌株 VL614 通过将来自大肠杆菌菌株 VKPM B-6204 (MG1655 zbi3058::Tn10) *rhtA* 基因的野生型等位基因转导进入 VL613 获得。转导子在含有 10 mg/l 四环素的 L-培养基中选择, 其中发现有对 10 g/l 高丝氨酸敏感的菌株 VL614 (*rhtA*⁺)。

菌株 VL614 用 pYGGA 质粒或 pOK12 载体转化, 获得菌株 VL614/pYGGA (VKPM B-7719) 和 VL614/pOK12 (VKPM B-7722)。

这些菌株在 37°C 分别于含 50 mg/l 卡那霉素的营养肉汤中培养 18 小时, 0.3 ml 所得的培养物接种 20×200 mm 试管中的 3 ml 含有 0.3 g/l 苏氨酸、0.3 g/l 甲硫氨酸和 50 mg/l 卡那霉素的发酵培养基 (实施例 3), 37°C 振荡培养 48 小时。培养后, 通过已知方法确定培养基中积累的赖氨酸和谷氨酸量。

结果示于表 4。

表 4

菌株	赖氨酸 (g/l)	谷氨酸 (g/l)
VL614/pOK12	2.6	0.8
VL614/pYGGA	3.6	2.2

如表 4 所示, 菌株 VL614/pYGGA 较 *yggA* 基因未增强的菌株 VL614/pOK12 积累的赖氨酸更多。此外, 菌株 VL614/pYGGA 较菌株 VL614/pOK12 积累的谷氨酸更多。

实施例 5 *yeaS*, *yahN* 和 *yfiK* DNA 片段扩增对苏氨酸、丙氨酸、缬氨酸和异亮氨酸生成的影响

作为产苏氨酸的埃希氏菌属细菌, 使用大肠杆菌菌株 VL2054。该菌株按如下方法由已知的大肠杆菌菌株 VKPM B-3996 (美国专利 5,175,107) 衍生。

最初, 新的受体菌株由几个步骤构建:

- 菌株 VKPM B-3996 的无质粒衍生物在自发消除 pVIC40 质粒后选择。

- 来自大肠杆菌菌株 VKPM B-6204 (MG1655 zbi3058::Tn10) 的 *rhtA* 基因的野生型等位基因通过实施例 4 中的噬菌体 P1 介导的转导引入所得的菌株。

•在 NG 诱变和选择仍能不降解苏氨酸的卡那霉素敏感细胞后，获得插入 *tdh* 基因中的 Tn5 转座子中 *kan* 基因灭活的突变。因而获得 VL2053 菌株。

另一方面，来自 pVIC40 的苏氨酸操纵子被克隆进入 λ 噬菌体的 P_R 启动子控制下的整合 Mud 载体。此外，赋予对氯霉素抗性的 Tn9 的 *cat* 基因被克隆进同一载体。由此获得的构建物通过已知方法（美国专利 5,595,889）插入大肠杆菌 C600 菌株的染色体，并由所获得的菌株转导进入 VL2053，得到新的无质粒产苏氨酸菌株 VL2054。该菌株也在培养液中积累丙氨酸、缬氨酸和异亮氨酸。

菌株 VL2054 用质粒 pYEAS, pYFIK 和载体 pUC21 分别转化，获得大肠杆菌菌株 VL2054/pYEAS (VKPM B-7707), VL2054/pYFIK (VKPM B-7712) 和 VL2054/pUC21 (VKPM B-7708)。

这些菌株分别在 37°C 于含有 100 mg/l 氯苄西林的营养肉汤中培养 18 小时，0.3 ml 所得的培养物接种 20×200 mm 试管中含 100 mg/l 氯苄西林的 3ml 发酵培养基（实施例 3），37 °C 振荡培养 48 小时。培养后，培养基中积累的苏氨酸、丙氨酸、缬氨酸和异亮氨酸量通过已知方法确定。

结果示于表 5。

如表 5 所示，菌株 VL2054/pYFIK 积累的苏氨酸较 *yfiK* 基因未被增强的菌株 VL2054/pUC21 更多。此外，菌株 VL2054/pYEAS 积累的丙氨酸、缬氨酸和异亮氨酸较 *yeaS* 基因未被增强的菌株 VL2054/pUC21 更多。

表 5

菌株	氨基酸积累, g/l			
	苏氨酸	丙氨酸	缬氨酸	异亮氨酸
VL2054/pUC21	5.8	0.4	0.31	0.15
VL2054/pYEAS	5.2	1.4	0.52	0.45
VL2054/pYFIK	8.8	0.5	0.22	0.14

实施例 6 *yeaS* 和 *yfiK* DNA 片段扩增对组氨酸生成的影响

作为产组氨酸的埃希氏菌属细菌，使用大肠杆菌菌株 VL2160。

该菌株是通过噬菌体 P1 介导将 $hisG^R$ 突变自菌株 CC46 转导至已知菌株 NK5526 $hisG::Tn10$ (VKPM B-3384) 获得, 所述突变使 ATP 磷酸核糖基转移酶脱敏 (Astvatsaturianz et al., Genetika, 24, 1928-1934, 1988)。大肠杆菌菌株 VL2160 用质粒 pYEAS, pYFIK 和载体 pUC21 分别转化获得大肠杆菌菌株 VL2160/pYEAS (VKPM B-7753), VL2160/pYFIK (VKPM B-7754) 和 VL2160/pUC21 (VKPM B-7752)。

这些菌株分别在 37°C 于含有 100 mg/l 氨苄西林的营养肉汤中培养 18 小时, 0.3 ml 所得的培养物接种 20×200 mm 试管中含有浓度提高的酵母提取物 (3 g/l) 和 100 mg/l 氨苄西林的 3ml 发酵培养基 (实施例 3), 34 °C 振荡培养 68 小时。

培养后, 培养基中组氨酸的积累量通过已知方法确定。结果示于表 6。

表 6

菌株	组氨酸, g/l
VL2160/pUC21	1.2
VL2160/pYEAS	1.8
VL2160/pYFIK	1.4

如表 6 所示, 大肠杆菌菌株 VL2160/pYEAS 和 VL2160/pYFIK 积累的组氨酸较 *yeaS* 和 *yfiK* 基因未被增强的菌株 VL2160/pUC21 更多。

实施例 7 *yahN*, *yeaS* 和 *yfiK* DNA 片段扩增对脯氨酸生成的影响
作为产脯氨酸的埃希氏菌属细菌, 使用大肠杆菌菌株 VL2151 (W3350 $proB^+ \Delta putAP Tn10$)。该菌株通过以下方法获得: 将与 Tn10 连锁的 $\Delta putAP$ 突变转导进入 W3350, 选择不能利用脯氨酸作为唯一碳源的四环素抗性转导子。将所获得的菌株 W3350 $\Delta putAP Tn10$ 用 NG 诱变, 选择对 20 mg/l 3,4-脱氢-DL-脯氨酸有抗性的突变体。其中, 发现菌株 VL2151 (W3350 $proB^+ \Delta putAP Tn10$) 能够产生脯氨酸。

大肠杆菌菌株 VL2151 用质粒 pYEAS, pYFIK, pYAHN 和载体 pUC21 分别转化获得大肠杆菌菌株 VL2151/pYEAS (VKPM B-7714),

VL2151/pYFIK (VKPM B-7713), VL2151/pYAHN (VKPM B-7748) 和 VL2151/pUC21 (VKPM B-7715).

这些菌株分别在 37°C 于含有 100 mg/l 氨苄西林的营养肉汤中培养 18 小时, 0.3 ml 所得的培养物接种 20×200 mm 试管中含有 100 mg/l 氨苄西林的 3ml 发酵培养基 (实施例 3), 37 °C 振荡培养 48 小时。培养后, 培养基中脯氨酸的积累量通过已知方法确定。结果示于表 7。

表 7

菌株	脯氨酸, g/l
VL2151/pUC21	1.8
VL2151/pYAHN	2.2
VL2151/pYEAS	2.1
VL2151/pYFIK	2.5

如表 7 所示, 大肠杆菌菌株 VL2151/pYFIK、VL2151/pYAHN 和 VL2151/pYEAS 积累的脯氨酸较 yfiK, yahN 和 yeaS 基因未被增强的菌株 VL2151/pUC21 更多。yfiK 基因的扩增效果最明显。

实施例 8 yggA DNA 片段扩增对精氨酸生成的影响

作为产精氨酸的埃希氏菌属细菌, 使用大肠杆菌菌株 W3350 argE::Tn10/pKA10。该菌株携带质粒 pKA10, 其中含有来自黄色棒杆菌 (短杆菌) 的 DNA 区, 它至少与受体菌株大肠杆菌 K12 中的 argA 和 argE 突变互补 (Kharitonov A. & Tarasov A.P. Molecular Genetics, Microbiology and Virology, No.9, 29-33, 1986)。

大肠杆菌菌株 W3350 argE::Tn10/pKA10 用质粒 pYGGA 或载体 pOK12 分别转化获得大肠杆菌菌株 W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA (VKPM B-7716) 和 W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12 (VKPM B-7718)。

所得的转化子分别在 37°C 于含有 100 mg/l 氨苄西林和 50 mg/l 卡那霉素的营养肉汤中培养 18 小时, 0.3 ml 所得的培养物接种 20×200 mm 试管中含有 100 mg/l 氨苄西林和 50 mg/l 卡那霉素的 3ml 发酵培养基 (实施例 3), 37 °C 振荡培养 48 小时。培养后, 培养基中精氨酸的积累量通过已知方法确定。

结果示于表 8。

表 8

菌株	精氨酸, g/l
W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12	0.11
W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA	0.46

如表 7 所示, 大肠杆菌菌株 W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA 积累的精氨酸较 yggA 基因未被增强的菌株 W3350 argE::Tn10/pKA10, pUC21 更多。

根据国际保藏的布达佩斯条约, 下列大肠杆菌菌株于 1998 年 11 月 29 日保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心 (VKPM), 括号中为保藏号。

AJ13199/pUC21 (VKPM B-7728)
AJ13199/pYAHN (VKPM B-7729)
AJ13199/pYEAS (VKPM B-7731)
AJ13199/pYFIK (VKPM B-7730)
VL614/pYGGA (VKPM B-7719)
VL614/pOK12 (VKPM B-7722)
VL2054/pYEAS (VKPM B-7707)
VL2054/pYFIK (VKPM B7712)
VL2054/pUC21 (VKPM B7708)
VL2160/pYEAS (VKPM B-7753)
VL2160/pYFIK (VKPM B-7754)
VL2160/pUC21 (VKPM B-7752)
VL2151/pYFIK (VKPM B-7713)
VL2151/pYEAS (VKPM B-7714)
VL2151/pYAHN (VKPM B-7748)
VL2151/pUC21 (VKPM B-7715)
W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA (VKPM B-7716)
W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12 (VKPM B-7718)

序列表

(110) Livshits, Vitaliy Arkadievich

Zakataeva, Natalia Pavlovna

Nakanishi, Kazuo

Aleshin, Vladimir Veniaminovich

Troshin, Petr Vladimirovich

Tokhmakova, Irina Lyvovna

(120) 生产 L-氨基酸的方法

(130)

(160) 24

(210) 1

(211) 27

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yahN 基因的引物

(400) 1

ggcgagctcc cagtaaccgg aaataag

27

(210) 2

(211) 27

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yahN 基因的引物

(400) 2

cgctctagaa aggaccacgc attacgg

27

(210) 3

(211) 27

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yeaS 基因的引物

(400) 3

ggcgagctca gattggttag catattc

27

(210) 4

(211) 27

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yeaS 基因的引物

(400) 4

cggtctagaa tcagcgaaga atcaggg

27

(210) 5

(211) 27

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yfiK 基因的引物

(400) 5

ggcgagctca tggtccgtgt cgggtac

27

(210) 6

(211) 27

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述：扩增大肠杆菌 yfiK 基因的引物

(400) 6

ggctctagat agcaagttac taagcgg

27

(210) 7

(211) 35

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述：扩增大肠杆菌 yggA 基因的引物

(400) 7

ctctgaattc tctcttatta gtttttctga ttgcc

35

(210) 8

(211) 38

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述：扩增大肠杆菌 yggA 基因的引物

(400) 8

cgtgacctgc agcgttctca cagcgcgta gcctttaa

38

(210) 9

(211) 672

(212) DNA

(213) 大肠杆菌

(220)

(221) CDS

(222) (1)..(672)

(400) 9

atg atg cag tta gtt cac tta ttt atg gat gaa atc act atg gat cct	48
Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro	
1 5 10 15	
ttg cat gcc gtt tac ctg acc gta gaa ctg ttc gtg att act ttt ttt	96
Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe	
20 25 30	
aat ccg gga gcc aat ctc ttt gtg gta gta caa acc agc ctg gct tcc	144
Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser	
35 40 45	
ggt cga cgc gca ggg gtg ctg acc ggg ctg ggc gtg gcg ctg ggc gat	192
Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp	
50 55 60	
gca ttt tat tcc ggg ttg ggt ttg ttt ggt ctt gca acg cta att acg	240
Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr	
65 70 75 80	
cag tgt gag gag att ttt tcg ctt atc aga atc gtc ggc ggc gct tat	288
Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr	
85 90 95	
ctc tta tgg ttt gcg tgg tgc agc atg cgc cgc cag tca aca ccg caa	336
Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln	
100 105 110	
atg agc aca cta caa caa ccg att agc gcc ccc tgg tat gtc ttt ttt	384
Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe	
115 120 125	

```

cgc cgc gga tta att acc gat ctc tct aac ccg caa acc gtt tta ttt 432
Arg Arg Gly Leu Ile Thr Asp Leu Ser Asn Pro Gln Thr Val Leu Phe
130 135 140
ttt atc agt att ttc tca gta aca tta aat gcc gaa aca cca aca tgg 480
Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp
145 150 155 160
gca cgt tta atg gcc tgg gcg ggg att gtg ctc gca tca att atc tgg 528
Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp
165 170 175
cga gtt ttt ctt agt cag gcg ttt tct ttg ccc gct gtg cgt cgt gct 576
Arg Val Phe Leu Ser Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala
180 185 190
tat ggg cgt atg caa cgc gtt gcc agt cgg gtt att ggt gca att att 624
Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile
195 200 205
ggg gta ttc gcg cta cgc ctg att tac gaa ggg gtg acg cag cgg tga 672
Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg
210 215 220

```

(210) 10

(211) 223

(212) PRT

(213) 大肠杆菌

(400) 10

```

Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro
1 5 10 15
Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe
20 25 30
Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser
35 40 45
Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp
50 55 60
Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr
65 70 75 80
Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr
85 90 95
Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln
100 105 110

```

```

Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe
      115              120              125
Arg Arg Gly Leu Ile Thr Asp Leu Ser Asn Pro Gln Thr Val Leu Phe
      130              135              140
Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp
      145              150              155              160
Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp
              165              170              175
Arg Val Phe Leu Ser Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala
              180              185              190
Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile
              195              200              205
Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg
      210              215              220

```

(210) 11

(211) 639

(212) DNA

(213) 大肠杆菌

(220)

(221) CDS

(223) (1)..(639)

(400) 11

```

gtg ttc gct gaa tac ggg gtt ctg aat tac tgg acc tat ctg gtt ggg 48
Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
  1              5              10              15
gcc att ttt att gtg ttg gtg cca ggg cca aat acc ctg ttt gta ctc 96
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
              20              25              30
aaa aat agc gtc agt agc ggt atg aaa ggc ggt tat ctt gcg gcc tgc 144
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
              35              40              45
ggg gta ttt att ggc gat gcg gta ttg atg ttt ctg gca tgg gct gga 192
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
      50              55              60

```

```

gtg gcg aca tta att aag acc acc ccg ata tta ttc aac att gta cgt 240
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
65          70          75          80
tat ctt ggt gcg ttt tat ttg ctc tat ctg ggg agt aaa att ctt tac 288
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
85          90          95
gcg acc ctg aag ggt aaa aat agc gag gcc aaa tcc gat gag ccc caa 336
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
100         105         110
tac ggt gct att ttt aaa cgc gcg tta att ttg agc ctg act aat ccg 384
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro
115         120         125
aaa gcc att ttg ttc tat gtg tcg ttt ttc gta cag ttt atc gat gtt 432
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
130         135         140
aat gcc cca cat acg gga att tca ttc ttt att ctg gcg gcg acg ctg 480
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
145         150         155         160
gaa ctg gtg agt ttc tgc tat ttg agc ttc ctg att ata tct ggt gct 528
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
165         170         175
ttt gtc acg cag tac ata cgt acc aaa aag aaa ctg gct aaa gtt ggc 576
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
180         185         190
aac tca ctg att ggt ttg atg ttc gtg ggt ttc gct gcc cga ctg gcg 624
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
195         200         205
acg ctg caa tcc tga 639
Thr Leu Gln Ser
210

```

(210) 12

(211) 212

(212) PRT

(213) 大肠杆菌

(400) 12

```

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

```

(210) 13

(211) 588

(212) DNA

(213) 大肠杆菌

(220)

(221) CDS

(222) (1).. (588)

(400) 13

```

gtg aca ccg acc ctt tta agt gct ttt tgg act tac acc ctg att acc 48
Met Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr
1 5 10 15
gct atg acg cca gga ccg aac aat att ctc gcc ctt agc tct gct acg 96
Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr
20 25 30
tcg cat gga ttt cgt caa agt acc cgc gtg ctg gca ggg atg agt ctg 144
Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu
35 40 45
gga ttt ttg att gtg atg tta ctg tgt gcg ggc att tca ttt tca ctg 192
Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu
50 55 60
gca gtg att gac ccg gca gcg gta cac ctt ttg agt tgg gcg ggg gcg 240
Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala
65 70 75 80
gca tat att gtc tgg ctg gcg tgg aaa atc gcc acc agc cca aca aag 288
Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys
85 90 95
gaa gac gga ctt cag gca aaa cca atc agc ttt tgg gcc agc ttt gct 336
Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala
100 105 110
ttg cag ttt gtg aac gtc aaa atc att ttg tac ggt gtt acg gca ctg 384
Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu
115 120 125
tcg acg ttt gtt ctg ccg caa aca cag gcg tta agc tgg gta gtt gcc 432
Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly
130 135 140
gtc agc gtt ttg ctg gcg atg att ggg acg ttt ggc aat gtg tgc tgg 480
Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp
145 150 155 160
gcg ctg gcg ggg cat ctg ttt cag cga ttg ttt cgc cag tat ggt cgc 528
Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg
165 170 175
cag tta aat atc gtg ctt gcc ctg ttg ctg gtc tat tgc gcg gta cgc 576
Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg
180 185 190
att ttc tat taa 588
Ile Phe Tyr
195

```

(210) 14

(211) 195

(212) PRT

(213) 大肠杆菌

(400) 14

```

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

```

(210) 15

(211) 636

(212) DNA

(213) 大肠杆菌

(220)

(221) CDS

(222) (1)..(636)

(400) 15

```

gtg ttt tct tat tac ttt caa ggt ctt gca ctt ggg gcg gct atg atc 48
Met Phe Ser Tyr Tyr Phe Gln Gly Leu Ala Leu Gly Ala Ala Met Ile
  1           5           10           15
cta ccg ctc ggt cca caa aat gct ttt gtg atg aat cag ggc ata cgt 96
Leu Pro Leu Gly Pro Gln Asn Ala Phe Val Met Asn Gln Gly Ile Arg
      20           25           30
cgt cag tac cac att atg att gcc tta ctt tgt gct atc agc gat ttg 144
Arg Gln Tyr His Ile Met Ile Ala Leu Leu Cys Ala Ile Ser Asp Leu
      35           40           45
gtc ctg att tgc gcc ggg att ttt ggt ggc agc gcg tta ttg atg cag 192
Val Leu Ile Cys Ala Gly Ile Phe Gly Gly Ser Ala Leu Leu Met Gln
      50           55           60
tcg ccg tgg ttg ctg gcg ctg gtc acc tgg ggc ggc gta gcc ttc ttg 240
Ser Pro Trp Leu Leu Ala Leu Val Thr Trp Gly Gly Val Ala Phe Leu
      65           70           75           80
ctg tgg tat ggt ttt gcc gct ttt aaa aca gca atg agc agt aat att 288
Leu Trp Tyr Gly Phe Gly Ala Phe Lys Thr Ala Met Ser Ser Asn Ile
      85           90           95
gag tta gcc agc gcc gaa gtc atg aag caa ggc aga tgg aaa att atc 336
Glu Leu Ala Ser Ala Glu Val Met Lys Gln Gly Arg Trp Lys Ile Ile
      100          105          110
gcc acc atg ttg gca gtg acc tgg ctg aat ccg cat gtt tac ctg gat 384
Ala Thr Met Leu Ala Val Thr Trp Leu Asn Pro His Val Tyr Leu Asp
      115          120          125
act ttt gtt gta ctg gcc agc ctt gcc ggg caa ctt gat gtg gaa cca 432
Thr Phe Val Val Leu Gly Ser Leu Gly Gly Gln Leu Asp Val Glu Pro
      130          135          140
aaa cgc tgg ttt gca ctc ggg aca att agc gcc tct ttc ctg tgg ttc 480
Lys Arg Trp Phe Ala Leu Gly Thr Ile Ser Ala Ser Phe Leu Trp Phe
      145          150          155          160
ttt ggt ctg gct ctt ctc gca gcc tgg ctg gca ccg cgt ctg cgc acg 528
Phe Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Trp Leu Ala Pro Arg Leu Arg Thr
      165          170          175
gca aaa gca cag cgc att atc aat ctg gtt gtg gga tgt gtt atg tgg 576
Ala Lys Ala Gln Arg Ile Ile Asn Leu Val Val Gly Cys Val Met Trp
      180          185          190
ttt att gcc ttg cag ctg gcg aga gac ggt att gct cat gca caa gcc 624
Phe Ile Ala Leu Gln Leu Ala Arg Asp Gly Ile Ala His Ala Gln Ala
      195          200          205
ttg ttc agt tag 636
Leu Phe Ser
      210

```

(210) 16

(211) 211

(212) PRT

(213) 大肠杆菌

(400) 16

```

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

```

(210) 17

(211) 20

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yahN 基因的引物

(400) 17

gtgtggaacc gacgccgat

20

(210) 18

(211) 23

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yahN 基因的引物

(400) 18

tgttgatatgg tacggggttc gag

23

(210) 19

(211) 20

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 yeaS 基因的引物

(400) 19

ctttgccaat cccgtctccc

20

(210) 20

(211) 20

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 *yeaS* 基因的引物

(400) 20

gccccatgca taacggaaag

20

(210) 21

(211) 26

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 *yfiK* 基因的引物

(400) 21

gaagatcttg taggccgat aaggcg

26

(210) 22

(211) 20

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 *yfiK* 基因的引物

(400) 22

tggttttacc aattggccgc

20

(210) 23

(211) 21

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 *yggA* 基因的引物

(400) 23

acttctcccg cgagccagtt c

21

(210) 24

(211) 21

(212) DNA

(213) 人工序列

(220)

(223) 人工序列描述: 扩增大肠杆菌 *yggA* 基因的引物

(400) 24

ggcaagctta gcgcctctgt t

21