



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103773745 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201210398902. 6

C12N 1/21 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 18

C12N 5/10 (2006. 01)

(71) 申请人 中粮生物化学(安徽)股份有限公司

C12P 13/08 (2006. 01)

地址 233010 安徽省蚌埠市大庆路 73 号

C12P 13/12 (2006. 01)

申请人 天津工业生物技术研究所

C12P 13/06 (2006. 01)

C12Q 1/48 (2006. 01)

(72) 发明人 岳国君 孙际宾 郑平 刘娇

李庆刚 夏令和 周永生 罗虎

周勇 满云 卢宗梅 马延和

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

代理人 崔佳佳 马莉华

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006. 01)

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书15页

序列表10页 附图1页

(54) 发明名称

天冬氨酸激酶 III 突变体及其宿主细胞和应用

(57) 摘要

本发明提供一种天冬氨酸激酶,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基为非天冬氨酸。本发明的天冬氨酸激酶能高效解除 L- 赖氨酸的反馈抑制,并且能有效用于生产 L- 赖氨酸。本发明还提供包含编码所述天冬氨酸激酶的基因的宿主细胞以及利用所述宿主细胞或天冬氨酸激酶产生 L- 赖氨酸的方法。本发明的天冬氨酸激酶或包含本发明天冬氨酸激酶的宿主细胞还用于产生 L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸。本发明还提供利用所述天冬氨酸激酶或宿主细胞产生 L- 天冬氨酰 -4- 基磷酸的方法。

1. 一种天冬氨酸激酶,其特征在于,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基为非天冬氨酸。

2. 编码权利要求 1 所述天冬氨酸激酶的基因。

3. 包含权利要求 2 所述编码基因的载体。

4. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有权利要求 2 所述编码基因。

5. 权利要求 4 所述宿主细胞在生产 L- 氨基酸中的应用。

6. 一种制备 L- 氨基酸的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

a. 培养权利要求 4 所述的宿主细胞,使之产生 L- 氨基酸 ;和

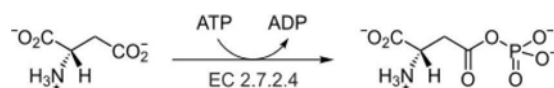
b. 从培养液中分离 L- 氨基酸。

7. 权利要求 1 所述天冬氨酸激酶在生产 L- 氨基酸中的应用。

8. 如权利要求 5-7 所述的应用或方法,其特征在于,所述的 L- 氨基酸为 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸。

9. 一种制备 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

a. 利用权利要求 1 所述的天冬氨酸激酶 (EC 2.7.2.4),催化从 L- 天冬氨酸生成 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸过程中的以下反应,进而获得 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸,



L- 天冬氨酸

L- 天冬氨酰 -4- 基磷酸 ;和

b. 从以上反应体系中分离 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸。

10. 制备权利要求 1 所述天冬氨酸激酶的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

a. 改造 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的编码序列,使得编码的氨基酸序列中对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基突变为非天冬氨酸 ;

b. 将 a 得到的编码序列直接转染合适的宿主细胞或经载体引入合适的宿主细胞 ;

c. 培养 b 得到的宿主细胞 ;

d. 从步骤 c 得到的培养体系中分离所述宿主细胞产生的天冬氨酸激酶 ;和

e. 测定所述天冬氨酸激酶解除赖氨酸反馈抑制的能力。

11. 改造野生型天冬氨酸激酶使之解除赖氨酸反馈抑制的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

a. 将野生型天冬氨酸激酶的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列作比对 ;和

b. 改造所述野生型天冬氨酸激酶的编码序列,使得编码的氨基酸序列中对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基突变为非天冬氨酸 ;

c. 将 b 得到的编码序列直接转染合适的宿主细胞或经载体引入合适的宿主细胞 ;

d. 培养 c 得到的宿主细胞 ;

e. 从步骤 d 得到的培养体系中分离所述宿主细胞产生的天冬氨酸激酶 ;和

f. 测定所述天冬氨酸激酶解除赖氨酸反馈抑制的能力。

天冬氨酸激酶 III 突变体及其宿主细胞和应用

技术领域

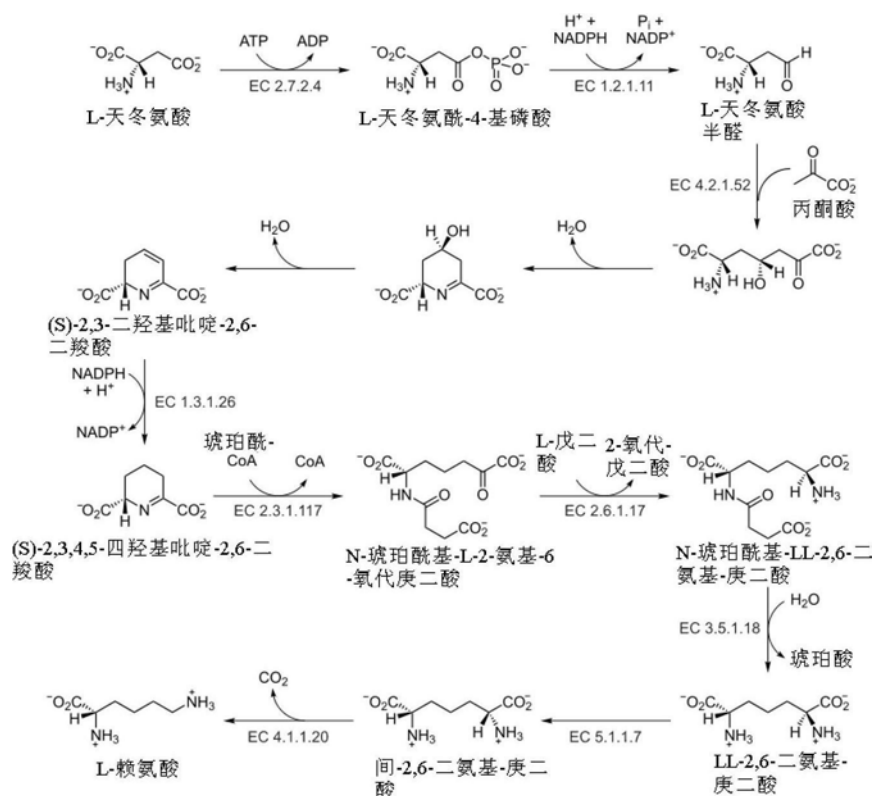
[0001] 本发明涉及生物技术领域。具体地说,本发明涉及天冬氨酸激酶 III(简称 AK III,又称 LysC)的突变体及其应用。

背景技术

[0002] L-赖氨酸是人类和动物营养中最重要的必需氨基酸,在食品工业、养殖业和饲料工业中有着十分重要的地位。近年来,其市场需求稳步增加,世界市场销售量已经突破百万吨规模。目前,赖氨酸主要采用微生物发酵法来生产。

[0003] 在许多微生物中 L-赖氨酸的合成途径是以天冬氨酸为前体的,包括两步和甲硫氨酸和苏氨酸等氨基酸共用的步骤。在大肠杆菌中,L-赖氨酸生物合成途径经过九步的酶催化过程(如下式所示)。其中,天冬氨酸激酶催化赖氨酸生物合成的第一步反应,是赖氨酸生产的限速步骤,它的活力决定着代谢流流向 L-赖氨酸合成途径的比例。在大肠杆菌中有三个天冬氨酸激酶,分别命名为天冬氨酸激酶 I(AK I,由 thrA 基因编码)、天冬氨酸激酶 II(AK II,由 metL 基因编码)、天冬氨酸激酶 III(AK III,由 lysC 基因编码,其编码基因的核苷酸序列如 SEQ IDNO:1 所示,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示)。AK I 和 AK II 是双功能酶,都还具有高丝氨酸脱氢酶活性。AK I 在酶活性水平受到苏氨酸和赖氨酸的反馈抑制,AK III 在酶活性水平受终产物赖氨酸的反馈抑制(Bearer CF, Neet KE ;Stadtman, E. R., Cohen, G. N., LeBras, G., Robichon-Szulmajster, H. (1961). "Feed-back Inhibition and Repression of Aspartokinase Activity in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae." J. Biol. Chem.). AK II 在酶活水平不受天冬氨酸家族氨基酸的反馈抑制但是受到转录水平严谨调控(X Dong, PJ Quinn, X Wang. (2011). "Metabolic engineering of Escherichia coli and Corynebacterium glutamicum for the production of L-threonine." Biotechnology advances)。

[0004]



[0005] 从天冬氨酸到 L- 赖氨酸的生物合成途径

[0006] 目前大肠杆菌已经被多家企业改造用来进行赖氨酸的工业化生产。由于天冬氨酸激酶活性收到赖氨酸严谨的调控,解除赖氨酸对天冬氨酸激酶的反馈抑制是发展高产赖氨酸菌株的必经之路。杜邦公司通过随机突变筛选获得了两种解除反馈抑制的 AK III 突变体,分别是将 352 苏氨酸用异亮氨酸替换 (T352I) 和 318 位甲硫氨酸用异亮氨酸替换 (M318I) (EP1394257)。日本味之素公司也获得部分解除赖氨酸反馈抑制的 AK III 突变体 (US005661012、US2010190216、US2010173368)。

[0007] 此外,由于天冬氨酸激酶是 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸和 L- 甲硫氨酸的合成途径所共用的酶,例如,中国专利 CN 1071378C 公开了一种解除反馈抑制的天冬氨酸激酶以及利用该激酶和包含该激酶的宿主生产 L- 苏氨酸的方法。如果能够获得具有高比活和有效解除 L- 赖氨酸反馈抑制的天冬氨酸激酶,对于 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸和 L- 甲硫氨酸,甚至以 L- 苏氨酸为前体合成的其他代谢物,包括 L- 异亮氨酸和 L- 缬氨酸的生产都具有重要的意义。

[0008] 因此,综上所述,本领域急需具有高酶活和有效解除 L- 赖氨酸反馈抑制天冬氨酸激酶突变体。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供具有高酶活和解除 L- 赖氨酸反馈抑制的 AK III 突变体以及此类突变体的应用与使用方法。

[0010] 在第一方面,本发明提供一种天冬氨酸激酶,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基为非天冬氨酸。

[0011] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶来源于埃希氏菌属细菌,优选地,来源于大肠杆菌。

[0012] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶:

[0013] a. 具有如 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列且第 340 位的氨基酸残基为非天冬氨酸,或

[0014] b. 具有 a) 所限定的序列经过一个或几个氨基酸残基,优选 1-20 个、更优选 1-15 个、更优选 1-10 个、更优选 1-3 个、最优选 1 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的序列,且基本具有 a) 所限定的天冬氨酸激酶功能的由 a) 衍生的天冬氨酸激酶。

[0015] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自以下氨基酸的至少一种:Pro、Ala、Arg、Lys、Gln、Asn、Val、Ile、Leu、Met 和 Phe。

[0016] 在进一步优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自 Pro、Arg 或 Val。

[0017] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶:

[0018] a. 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、6 或 8 所示;或

[0019] b. 包含 (a) 所限定的序列经过一个或几个氨基酸残基,优选 1-20 个、更优选 1-15 个、更优选 1-10 个、更优选 1-3 个、最优选 1 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的序列,且基本具有 a 所限定的天冬氨酸激酶功能的由 a 衍生的天冬氨酸激酶。

[0020] 在进一步优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、6 或 8 所示。

[0021] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶解除赖氨酸反馈抑制。

[0022] 在另一优选的实施方式中,在 10mM 浓度的 L- 赖氨酸存在下,所述的天冬氨酸激酶至少保留 20% 以上的活性;优选地,30%-40% 以上的活性;更优选地,50%-60% 以上的活性;更优选地,70%-80% 以上的活性;最优选,90% 以上的活性。

[0023] 在进一步优选的实施方式中,所述的天冬氨酸激酶在 20mM 浓度的 L- 赖氨酸存在下,所述的天冬氨酸激酶至少保留 20% 以上的活性;优选地,30%-40% 以上的活性;更优选地,50%-60% 以上的活性;更优选地,70% 以上的活性;最优选,80% 以上的活性。

[0024] 在更进一步优选的实施方式中,所述的天冬氨酸激酶在 100mM 浓度的 L- 赖氨酸存在下,所述的天冬氨酸激酶至少保留 20% 以上的活性;优选地,30%-40% 以上的活性;更优选地,50%-60% 以上的活性;更优选地,70% 以上的活性;最优选,80% 以上的活性。

[0025] 在第二方面,本发明提供编码本发明第一方面所述天冬氨酸激酶的基因。

[0026] 在优选的实施方式中,所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3、5 或 7 所示。

[0027] 在第三方面,本发明提供包含本发明第二方面所述编码基因的载体。

[0028] 在第四方面,本发明提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有本发明第二方面所述的编码基因。

[0029] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自以下氨基酸的至少一种:Pro、Ala、Arg、Lys、Gln、Asn、Val、Ile、Leu、Met 和 Phe。

[0030] 在进一步优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自 Pro、Arg 或 Val。

[0031] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶:

- [0032] a. 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、6 或 8 所示 ;或
- [0033] b. 包含 a 所限定的序列经过一个或几个氨基酸残基,优选 1-20 个、更优选 1-15 个、更优选 1-10 个、更优选 1-3 个、最优选 1 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的序列,且基本具有 a 所限定的天冬氨酸激酶功能的由 a 衍生的天冬氨酸激酶。
- [0034] 在另一优选的实施方式中,所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3、5 或 7 所示。
- [0035] 在优选的实施方式中,所述宿主细胞来自埃希氏菌属 (*Escherichia*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、短杆菌属 (*Brevibacterium* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 或弧菌属 (*Vibrio*)。
- [0036] 在进一步优选的实施方式中,所述宿主细胞是大肠杆菌 (*E. Coli*) 或谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)。
- [0037] 在优选的实施方式中,所述宿主细胞染色体上整合有本发明第二方面所述的编码基因或含有本发明第三方面所述的载体。
- [0038] 在优选的实施方式中,所述宿主细胞表达本发明的天冬氨酸激酶。
- [0039] 在另一优选的实施方式中,所述宿主细胞中选自以下的一个或多个基因被弱化或表达降低 :
- [0040] a. 编码乙醇脱氢酶的 *adhE* 基因 ;
- [0041] b. 编码乙酸激酶的 *ackA* 基因 ;
- [0042] c. 编码磷酸乙酰转移酶的 *pta* 基因 ;
- [0043] d. 编码乳酸脱氢酶的 *ldhA* 基因 ;
- [0044] e. 编码甲酸转运蛋白的 *focA* 基因 ;
- [0045] f. 编码丙酮酸甲酸裂解酶的 *pflB* 基因 ;
- [0046] g. 编码丙酮酸氧化酶的 *poxB* 基因 ;
- [0047] h. 编码天冬氨酸激酶 I/ 高丝氨酸脱氢酶 I 双功能酶的 *thrA* 基因 ;
- [0048] i. 编码高丝氨酸激酶的 *thrB* 基因 ;
- [0049] j. 编码赖氨酸脱羧酶的 *ldcC* 基因 ;和
- [0050] h. 编码赖氨酸脱羧酶的 *cadA* 基因。
- [0051] 在另一优选的实施方式中,所述宿主细胞中选自以下的一个或多个基因被增强或过表达 :
- [0052] a. 编码解除赖氨酸反馈抑制的二氢二吡啶合成酶的 *dapA* 基因 ;
- [0053] b. 编码二氢二吡啶二羧酸还原酶的 *dapB* 基因 ;
- [0054] c. 编码二氨基庚二酸脱氢酶的 *ddh* 基因 ;
- [0055] d. 编码四氢吡啶二羧酸琥珀酰酶的 *dapD* 和编码琥珀酰二氨基庚二酸脱酰酶的 *dapE* ;
- [0056] e. 编码天冬氨酸 - 半醛脱氢酶的 *asd* 基因 ;
- [0057] f. 编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的 *ppc* 基因 ;或
- [0058] g. 编码烟酰胺腺嘌呤二核苷酸转氢酶的 *pntAB* 基因。
- [0059] 在第五方面,本发明提供本发明第四方面所述宿主细胞在生产 L- 氨基酸中的应用。
- [0060] 在第六方面,本发明提供一种制备 L- 氨基酸的方法,所述方法包括以下步骤 :

[0061] a. 培养权利要求 4 所述的宿主细胞,使之产生 L- 氨基酸 ;和

[0062] b. 从培养液中分离 L- 氨基酸。

[0063] 在优选的实施方式中,所述方法在 30-45℃,更优选在 37℃ 实施。

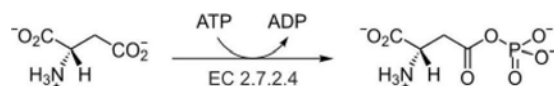
[0064] 在第七方面,本发明提供本发明第一方面所述的天冬氨酸激酶在生产 L- 氨基酸中的应用。

[0065] 在本发明第六方面和第七方面的优选实施方式中,所述的 L- 氨基酸为 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸。

[0066] 在第八方面,本发明提供一种制备 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸方法,所述方法包括以下步骤:

[0067] a. 利用本发明第一方面所述的天冬氨酸激酶 (EC 2.7.2.4),催化从 L- 天冬氨酸生成 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸过程中的以下反应,进而获得 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸,

[0068]



[0069] L- 天冬氨酸 L- 天冬氨酰 -4- 基磷酸 ;和

[0070] b. 从以上反应体系中分离 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸。

[0071] 在第九方面,本发明提供制备本发明第一方面所述天冬氨酸激酶的方法,所述方法包括以下步骤:

[0072] a. 改造 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的编码序列,使得编码的氨基酸序列中对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基突变为非天冬氨酸;

[0073] b. 将 a 得到的编码序列直接转染合适的宿主细胞或经载体引入合适的宿主细胞;

[0074] c. 培养 b 得到的宿主细胞;

[0075] d. 从步骤 c 得到的培养体系中分离所述宿主细胞产生的天冬氨酸激酶 ;和

[0076] e. 测定所述天冬氨酸激酶解除赖氨酸反馈抑制的能力。

[0077] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自以下氨基酸的至少一种 :Pro、Ala、Arg、Lys、Gln、Asn、Val、Ile、Leu、Met 和 Phe。

[0078] 在进一步优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自 Pro、Arg 或 Val。

[0079] 在本发明的第十方面,本发明提供改造野生型天冬氨酸激酶使之解除赖氨酸反馈抑制的方法,所述方法包括以下步骤:

[0080] a. 将野生型天冬氨酸激酶的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列作比对 ;和

[0081] b. 改造所述野生型天冬氨酸激酶的编码序列,使得编码的氨基酸序列中对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基突变为非天冬氨酸;

[0082] c. 将 b 得到的编码序列直接转染合适的宿主细胞或经载体引入合适的宿主细胞;

[0083] d. 培养 c 得到的宿主细胞;

[0084] e. 从步骤 d 得到的培养体系中分离所述宿主细胞产生的天冬氨酸激酶 ; 和

[0085] f. 测定所述天冬氨酸激酶解除赖氨酸反馈抑制的能力。

[0086] 在优选的实施方式中, 所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自以下氨基酸的至少一种 :Pro、Ala、Arg、Lys、Gln、Asn、Val、Ile、Leu、Met 和 Phe。

[0087] 在进一步优选的实施方式中, 所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自 Pro、Arg 或 Val。

[0088] 应理解, 在本发明范围内中, 本发明的上述各技术特征和在下文 (如实施例) 中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合, 从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅, 在此不再一一累述。

附图说明

[0089] 图 1 比较了本发明的 AK III 突变体和野生型 AK III 的粗酶液相对酶活。

[0090] 图 2 显示了含 6-His Tag 的本发明天冬氨酸激酶 (D340R) 以及 I418T、F413A、G401K 和 Y420A 的突变体和野生型 AK III 的纯酶相对酶活。

具体实施方式

[0091] 发明人经过广泛而深入的研究, 出乎意料地发现对大肠杆菌来源的天冬氨酸激酶 III 的第 340 位进行遗传改造, 获得的天冬氨酸激酶 III 突变体不仅具有优秀的酶活性, 还有效解除了 L- 赖氨酸的反馈抑制, 从而能用于高效生产 L- 赖氨酸。在此基础上完成了本发明。

[0092] 本发明的天冬氨酸激酶

[0093] 本文所用的术语“本发明的天冬氨酸激酶”和“本发明的多肽”可互换使用, 并具有本领域普通技术人员通常理解的含义。本发明的天冬氨酸激酶具有将磷酸基团转移到天冬氨酸的活性。

[0094] 在具体的实施方式中, 本发明天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基为非天冬氨酸。

[0095] 在优选的实施方式中, 本发明天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自以下氨基酸的至少一种 :Pro、Ala、Arg、Lys、Gln、Asn、Val、Ile、Leu、Met 和 Phe。

[0096] 在优选的实施方式中, 本发明天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自 Pro、Arg 或 Val。

[0097] 在优选的实施方式中, 本发明天冬氨酸激酶 :

[0098] (a) 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、6 或 8 所示 ; 或

[0099] (b) 包含 (a) 所限定的序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的序列, 且基本具有 (a) 所限定的天冬氨酸激酶功能的由 (a) 衍生的天冬氨酸激酶。

[0100] 在具体的实施方式中, 本发明的天冬氨酸激酶在 10mM 以上浓度的赖氨酸存在下, 优选地 20mM, 更优选地, 在 100mM 以上浓度的赖氨酸存在下, 有效解除赖氨酸反馈抑制。

[0101] 本领域普通技术人员不难知晓, 在多肽的某些区域, 例如非重要区域改变少数氨

氨基酸残基基本上不会改变生物活性,例如,适当替换某些氨基酸得到的序列并不会影响其活性(可参见 Watson 等, Molecular Biology of The Gene, 第四版, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co. P224)。因此,本领域普通技术人员能够实施这种替换并且确保所得分子仍具有所需生物活性。

[0102] 因此,本发明的多肽可以在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基为非天冬氨酸的基础上作进一步突变而仍具备本发明天冬氨酸激酶的功能和活性。例如本发明的天冬氨酸激酶 (a) 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、6 或 8 所示;或 (b) 包含 (a) 所限定的序列经过一个或多个氨基酸残基,优选 1-20 个、更优选 1-15 个、更优选 1-10 个、更优选 1-3 个、最优选 1 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的序列,且基本具有 (a) 所限定的多肽功能的由 (a) 衍生的多肽。

[0103] 在本发明中,本发明的天冬氨酸激酶包括与氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、6 或 8 所示的天冬氨酸激酶相比,有至多 20 个、较佳地至多 10 个,再佳地至多 3 个,更佳地至多 2 个,最佳地至多 1 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成的突变体。这些保守性变异的突变体可根据,例如下表所示进行氨基酸替换而产生。

[0104]

初始残基	代表性的取代残基	优选的取代残基
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu

[0105]

[0106] 本发明还提供了编码本发明多肽的多核苷酸。术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和 / 或非编码序列的多核苷酸。

[0107] 因此,本文所用的“含有”,“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、“和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

[0108] 对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基

[0109] 本领域普通技术人员均知道,可在某个蛋白的氨基酸序列中对一些氨基酸残基作

出各种突变,例如取代、添加或缺失,但得到的突变体仍能具备原蛋白的功能或活性。因此,本领域普通技术人员可对本发明具体公开的氨基酸序列作出一定改变而得到仍具有所需活性的突变体,那么这种突变体中与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基相对应的氨基酸残基可能就不是第 340 位,但如此得到的突变体仍应落在本发明的保护范围内。

[0110] 本文所用的术语“对应于”具有本领域普通技术人员通常理解的意义。具体地说,“对应于”表示两条序列经同源性或序列相同性比对后,一条序列与另一条序列中的指定位置相对应的位置。因此,就“对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基”而言,如果在 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的一端加上 6-His 标签,那么所得突变体中对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位就可能是第 346 位;而如果删除 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列中的少数氨基酸残基,那么所得突变体中对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位就可能是第 338 位,等等。再例如,如果一条具有 400 个氨基酸残基的序列与 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 20-420 位具有较高的同源性或序列相同性,那么所得突变体中对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位就可能是第 320 位。

[0111] 在具体的实施方式中,所述同源性或序列相同性可以是 80% 以上,优选 90% 以上,更优选 95%-98%,最优选 99% 以上。

[0112] 本领域普通技术人员公知的测定序列同源性或相同性的方法包括但不限于:计算机分子生物学 (Computational Molecular Biology), Lesk, A. M. 编,牛津大学出版社,纽约,1988;生物计算:信息学和基因组项目 (Biocomputing: Informatics and Genome Projects), Smith, D. W. 编,学术出版社,纽约,1993;序列数据的计算机分析 (Computer Analysis of Sequence Data), 第一部分, Griffin, A. M. 和 Griffin, H. G. 编, Humana Press, 新泽西, 1994; 分子生物学中的序列分析 (Sequence Analysis in Molecular Biology), von Heinje, G., 学术出版社, 1987 和序列分析引物 (Sequence Analysis Primer), Gribskov, M. 与 Devereux, J. 编 M Stockton Press, 纽约, 1991 和 Carillo, H. 与 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)。测定相同性的优选方法要在测试的序列之间得到最大的匹配。测定相同性的方法编译在公众可获得的计算机程序中。优选的测定两条序列之间相同性的计算机程序方法包括但不限于: GCG 程序包 (Devereux, J. 等, 1984)、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S. F. 等, 1990)。公众可从 NCBI 和其它来源得到 BLASTX 程序 (BLAST 手册, Altschul, S. 等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S. 等, 1990)。熟知的 SmithWaterman 算法也可用于测定相同性。

[0113] 宿主细胞

[0114] 本文所用的术语“宿主细胞”具有本领域普通技术人员通常理解的含义,即,能够产生本发明天冬氨酸激酶的宿主细胞。换言之,本发明可以利用任何宿主细胞,只要本发明的天冬氨酸激酶能在该宿主细胞中表达。

[0115] 例如,在具体的实施例中,本发明利用的是包含外源性的本发明天冬氨酸激酶编码基因的宿主细胞,优选 AK 缺陷型大肠杆菌菌株。但本领域普通技术人员应该知道,本发明不限于包含外源性编码基因的宿主细胞。例如,本发明的宿主细胞中包含的天冬氨酸激酶的编码基因不仅可以是重组载体或质粒,还有可能是基因组上整合有所述酶的编码基因,即,在基因组整合上的酶的编码基因可能是通过转入 质粒进行同源重组得到,也有可

能在基因组上定点突变相应的位点而得到。

[0116] 在具体的实施方式中,本发明的宿主细胞能够高效产生 L- 氨基酸,且具有对 L- 赖氨酸的抗反馈抑制能力。

[0117] 在具体的实施方式中,本发明的宿主细胞能够产生 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸或 L- 缬氨酸。

[0118] 在具体的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自以下氨基酸的至少一种:Pro、Ala、Arg、Lys、Gln、Asn、Val、Ile、Leu、Met 和 Phe。

[0119] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 340 位的氨基酸残基选自 Pro、Arg 或 Val。

[0120] 在优选的实施方式中,所述天冬氨酸激酶:

[0121] (a) 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、6 或 8 所示;或

[0122] (b) 包含 (a) 所限定的序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的序列,且基本具有 (a) 所限定的天冬氨酸激酶功能的由 (a) 衍生的天冬氨酸激酶。

[0123] 在优选的实施方式中,所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3、5 或 7 所示。

[0124] 在优选的实施方式中,所述的宿主细胞来自埃希氏菌属 (*Escherichia*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、短杆菌属 (*Brevibacterium* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 或弧菌属 (*Vibrio*)。

[0125] 在优选的实施方式中,所述的宿主细胞是大肠杆菌 (*E. Coli*) 或谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)。

[0126] 在优选的实施方式中,所述宿主细胞中选自以下的一个或多个基因被弱化或表达降低:

[0127] a. 编码乙醇脱氢酶的 *adhE* 基因;

[0128] b. 编码乙酸激酶的 *ackA* 基因;

[0129] c. 编码磷酸乙酰转移酶的 *pta* 基因;

[0130] d. 编码乳酸脱氢酶的 *ldhA* 基因;

[0131] e. 编码甲酸转运蛋白的 *focA* 基因;

[0132] f. 编码丙酮酸甲酸裂解酶的 *pflB* 基因;

[0133] g. 编码丙酮酸氧化酶的 *poxB* 基因;

[0134] h. 编码天冬氨酸激酶 I/ 高丝氨酸脱氢酶 I 双功能酶的 *thrA* 基因;

[0135] I. 编码高丝氨酸激酶的 *thrB* 基因;

[0136] j. 编码赖氨酸脱羧酶的 *ldcC* 基因;和

[0137] h. 编码赖氨酸脱羧酶的 *cadA* 基因。

[0138] 此外,本领域普通技术人员应理解,就 L- 赖氨酸的生产而言,细胞中特定生物合成途径、糖酵解、回补代谢中一种或多种酶的增强或过表达是有益的。因此,在一些实施方式中,除本发明所述基因外,可同时增强或过表达其它相关基因,例如,选自以下的一个或多个基因被增强或过表达:

[0139] a. 编码解除赖氨酸反馈抑制的二氢二吡啶合成酶的 *dapA* 基因 (EP1477564);

[0140] b. 编码二氢二吡啶二羧酸还原酶的 *dapB* 基因 (EP1253195);

[0141] c. 编码二氨基庚二酸脱氢酶的 ddh 基因 (EP1253195)。

[0142] d. 编码四氢吡啶二羧酸琥珀酰酶的 dapD 和编码琥珀酰二氨基庚二酸脱酰酶的 dapE (EP1253195)；

[0143] e. 编码天冬氨酸 - 半醛脱氢酶的 asd 基因 (EP1253195)；

[0144] f. 编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的 ppc 基因 (EP1253195)；或

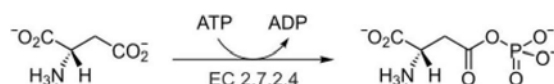
[0145] g. 编码烟酰胺腺嘌呤二核苷酸转氢酶的 pntAB 基因 (EP1253195)。

[0146] 此外,出于实验便利的目的,本发明利用本身的天冬氨酸激酶失活的突变菌株检测本发明天冬氨酸激酶突变体的酶活以及解除赖氨酸反馈抑制的能力。但本领域普通技术人员应该知道在设置对照的前提下,本身的天冬氨酸激酶未失活的天然菌株也可用于检测本发明天冬氨酸激酶突变体的酶活以及解除赖氨酸反馈抑制的能力。

[0147] 本发明多肽或本发明宿主细胞的应用

[0148] 本发明多肽可作为天冬氨酸激酶催化从 L- 天冬氨酸合成 L- 赖氨酸过程中的以下反应,进而获得 L- 赖氨酸：

[0149]



[0150] L- 天冬氨酸

L- 天冬氨酰 -4- 基磷酸

[0151] 此外,本领域普通技术人员已知天冬氨酸激酶是 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸和 L- 甲硫氨酸以及从 L- 苏氨酸合成 L- 异亮氨酸和 L- 缬氨酸的共同合成途径所用的酶。因此,本领域普通技术人员结合本发明的教导和现有技术,不难明白本发明的多肽或宿主细胞不仅可用于生产 L- 赖氨酸,还可用于生产 L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸和 L- 缬氨酸。

[0152] 进一步地,本领域普通技术人员不难明白,也可分离本发明天冬氨酸激酶高水平产生的中间体,L- 天冬氨酰 -4- 基磷酸,以便用于,例如 L- 苏氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 异亮氨酸和 L- 缬氨酸等各种下游产物的生产。

[0153] 在具体的实施方式中,本发明的宿主细胞可以在 30-45℃,优选 37℃ 产生 L- 赖氨酸。

[0154] 解除赖氨酸反馈抑制

[0155] 本领域技术人员应理解,本文所用的术语“解除赖氨酸反馈抑制”是指一种原本受到赖氨酸反馈抑制的酶,在经过改造后令其受赖氨酸抑制程度降低。这种降低是通过两种酶在相同赖氨酸浓度下的抑制程度比较获得的。“解除赖氨酸反馈抑制”包含了反馈抑制的部分解除到全部解除。而抑制程度是指在一定浓度的赖氨酸存在下,与不存在赖氨酸时相比,天冬氨酸激酶酶活性损失(即受到抑制)的比例。在这种条件下,天冬氨酸激酶酶活性保留下来的比例,称为酶活残存比例或酶活保留比例或相对酶活,由于：

[0156] 酶活损失比例 + 酶活残存比例 = 100%，

[0157] 所以经常用酶活残存比例表示抑制程度。酶活残存比例越高,抑制程度越低。相应的,“解除赖氨酸反馈抑制”也通常用改造前后两个酶残存酶活比例的比较来刻画。

[0158] 在具体的实施方式中,在 10mM L- 赖氨酸存在下,本发明的天冬氨酸激酶至少能保留 20% 以上的活性,与野生型天冬氨酸激酶相比,解除了赖氨酸反馈抑制；优选地,保留 30-40% 以上的活性；更优选,50%-60% 以上的活性；更优选,70%-80% 以上的活性；更优选,

90% 以上的活性。

[0159] 在优选的实施方式中,本发明的天冬氨酸激酶在 20mM 浓度的 L- 赖氨酸存在下,本发明的天冬氨酸激酶至少能保留 20% 以上的活性,与野生型天冬氨酸 激酶相比,解除了赖氨酸反馈抑制;优选地,保留 30-40% 以上的活性;更优选,保留 50%-60% 以上的活性;更优选,保留 70% 以上的活性;更优选,保留 80% 以上的活性。

[0160] 在优选的实施方式中,本发明的天冬氨酸激酶在 100mM 浓度的 L- 赖氨酸存在下,至少能保留 20% 以上的活性,与野生型天冬氨酸激酶相比,解除了赖氨酸反馈抑制;优选地,保留 30-40% 以上的活性;更优选,保留 50%-60% 以上的活性;更优选,保留 70% 以上的活性;更优选,保留 80% 以上的活性。

[0161] 增强 / 弱化

[0162] 本发明中术语“增强”是指微生物由 DNA 编码的一种或多种酶的胞内活性的增加,包括但不限于通过增加编码基因的拷贝数,通过增强转录或翻译强度,或换用编码具有升高活性的酶的基因或等位基因,及任选地组合使用这些方法。

[0163] 本发明中术语“弱化”是指微生物中由 DNA 所编码的一种或多种酶或蛋白质的胞内活性降低或消除,包括但不限于通过删除部分或全部编码基因、基因阅读框移码突变、弱化转录或翻译强度、或使用编码具有较低活性的相应酶或蛋白质的基因或等位基因,及任选地组合使用这些方法。

[0164] 固定化酶

[0165] 本文所用的术语“固定化酶”具有本领域普通技术人员常规理解的含义。具体地说,该术语表示水溶性酶经物理或化学方法处理后,使酶与水不溶性大分子载体结合或把酶包埋在其中,使得酶在水中溶性凝胶或半透膜的微囊体从而导致流动性降低。

[0166] 固定化的酶仍具有酶活性,在催化反应中以固相状态作用于底物。酶经固定化后一般稳定性增加,易从反应系统中分离,且易于控制,能反复多次使用。便于运输和贮存,有利于自动化生产。固定化酶是近十余年发展起来的酶应用技术,在工业生产、化学分析和医药等方面有诱人的应用前景。

[0167] 本领域普通技术人员鉴于本文的教导,不难将本发明的天冬氨酸激酶处理成固定化酶,进而用于催化从天冬氨酸到 L- 赖氨酸的反应,从而既能高效地产生 L- 赖氨酸,又能有效解除赖氨酸反馈抑制。

[0168] 本发明的应用与优点

[0169] 1. 本发明提供的各种天冬氨酸激酶、其编码基因以及包含所述编码具有的宿主细胞可以在工业上应用以产生 L- 赖氨酸和其它氨基酸;

[0170] 2. 本发明提供的各种天冬氨酸激酶是一种高比活和有效解除 L- 赖氨酸反馈抑制的天冬氨酸激酶。因此,本发明的各种天冬氨酸激酶、其编码基因以及包含所述编码基因的宿主细胞不仅能高效地产生 L- 赖氨酸,还能有效解除赖氨酸反馈抑制,在工业上的应用前景广阔;

[0171] 3. 本发明提供的各种天冬氨酸激酶以及它们的编码基因有助于阐明与理解 L- 赖氨酸生物合成途径以及反馈抑制的相关机理,从而为进一步利用基因工程手段改造相关蛋白质或宿主细胞提供了理论基础与材料。

[0172] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明

而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0173] 实施例 1. AK III 突变体的获得

[0174] 1. AK III 野生型基因的克隆

[0175] 将 E. coli MG1655(获自 ATCC 700926, 可参考 Blattner FR 等, The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. Science 277:1453-62(1997)) 在 LB 培养基(胰蛋白胨 10g/L, 酵母粉 5g/L, 氯化钠 10g/L, pH 7.0) 中, 37°C, 200rpm, 培养 12-16h 后, 收集细胞, 采用 Biomiga 基因组小提试剂盒提取基因组 DNA。以大肠杆菌基因组为模板, 通过三轮 PCR 获得在野生型 lysC 基因前加上组成型启动子及合适的 SD 序列, 并在片段两端加上合适的酶切位点。

[0176] 具体操作为:

[0177] 第一轮 PCR: 以 CTAGCACTAGTGAAAGAGGAGAAATACTAGATGTCTGAAATTGTTGTCTCCAAAT (SEQ ID NO:9) 和 TTACTCAAACAAATTACTATGCAGTTTTTG (SEQ ID NO:10) 为引物, 从 E. coli MG1655 基因组 DNA 上扩增 lysC 基因(野生型 lysC 的编码基因, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2, 其核苷酸序列为 SEQ ID NO:1); 然后以第一轮 PCR 产物为模板, 以 TTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCACTAGTGAAAGAGGAGAAATACTAG (SEQ ID NO:11) 和 TTACTCAAACAAATTACTATGCAGTTTTTG (SEQ ID NO:10) 为引物进行第二轮 PCR; 再以第二轮的 PCR 产物为模板, 以 GCGTCTAGATTGACGGCTAGCTCAGTCCTAG (SEQ ID NO:12) 和 GGCGAGCTCTTACTCAAACAAATTACTATGCAGTTTTTG (SEQ ID NO:13) 为引物进行第三轮 PCR, 最后所获得的 DNA 片段带上了 XbaI 和 SacI 的酶切位点。通过 XbaI 和 SacI 将最后获得的 DNA 片段克隆至 pWSK29 质粒, 所得质粒命名为 pWSK29-lysC。

[0178] 2. AK III 的定点突变

[0179] 利用 Stratagene 系列 QuikChange[®] XL- II 定点突变试剂盒, 通过引物 D340P-F/D340P-R(见表 1) 对质粒 pWSK29-lysC 进行 PCR 引入突变位点, 获得的质粒经过 PCR 产物回收, 除去 PCR 体系中的酶及缓冲体系中的盐离子后, 采用 DpnI 酶切 1h 除去甲基化的模板质粒 DNA, 处理后的质粒转入感受态细胞 Tran10(购自北京全式金生物技术有限公司), 所获得的正确突变质粒命名为 pSLL1, 携带的 lysC 突变体核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示, 翻译的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0180] 再通过引物 D340V-F/D340V-R(见表 1) 对质粒 pWSK29-lysC 进行 PCR 引入突变位点, 获得的质粒经过 PCR 产物回收, 除去 PCR 体系中的酶及缓冲体系中的盐离子后, 采用 DpnI 酶切 1h 除去甲基化的模板质粒 DNA, 处理后的质粒转入感受态细胞 Tran10, 所获得的正确突变质粒命名为 pSLL2, 携带的 lysC 突变体核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示, 翻译的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0181] 最后通过引物 D340R-F/D340R-R(见表 1) 对质粒 pWSK29-lysC 进行 PCR 引入突变位点, 获得的质粒经过 PCR 产物回收, 除去 PCR 体系中的酶及缓冲体系中的盐离子后, 采用 DpnI 酶切 1h 除去甲基化的模板质粒 DNA, 处理后的质粒转入感受态细胞 Tran10, 所获得的正确突变质粒命名为 pSLL3, 携带的 lysC 突变体核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示, 翻译的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

[0182] 表 1. 点突变所用引物表

[0183]

SEQ ID NO:14	D340P-F	CCTCGCGCGGCATAATATTTTCGGTACCGTTAATCACCACG
SEQ ID NO:15	D340P-R	CGTGGTGATTAACGGTACCGAAATATTATGCCGCGCGAGG
SEQ ID NO:16	D340V-F	CGCGGCATAATATTTTCGGTAGTCTTAATCACCACG
SEQ ID NO:17	D340V-F	CGTGGTGATTAAGACTACCGAAATATTATGCCGCG
SEQ ID NO:18	D340R-F	CGCGCGGCATAATATTTTCGGTACGCTTAATCACCACG
SEQ ID NO:19	D340R-R	CGTGGTGATTAAGCGTACCGAAATATTATGCCGCGCG

[0184] 实施例 2. AK III 突变体的体外效果检测

[0185] 1. AK III 的表达

[0186] 将前面构建好的野生型质粒 pWSK29-lysC 以及突变体质粒 pSLL1、pSLL2 和 pSLL3 分别电转化至 E.coli GT3(参见 Theze, J., Margarita, D., Cohen, G. N., Borne, F., and Patte, J. C., Mapping of the structural genes of the three aspartokinases and of the two homoserine dehydrogenases of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol., 117, 133-143(1974); 另可参见 US005661012A) 菌株, 依次获得的菌株分别命名为 E.coliGT3(pWSK29-lysC)、E.coliGT3(pSLL1)、E.coliGT3(pSLL2) 和 E.coliGT3(pSLL3), 以实现其组成型表达。

[0187] 2. AK III 的酶活检测

[0188] 将 E.coliGT3(pWSK29-lysC)、E.coliGT3(pSLL1)、E.coliGT3(pSLL2) 和 E.coliGT3(pSLL3) 菌株分别在 LB 培养基上 37℃ 过夜培养, 然后按照 2% 转接装有 50ml LB 培养基的 500ml 三角瓶, 补加 50mg/L 的氨苄青霉素, 37℃, 200rpm 培养至 OD600 约为 0.6。收集培养好的菌体, 用 20mM 的 Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液洗一次, 再重悬在 3ml 含 20mM 的 Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中, 200W 超声破碎 10min(每超声 1 秒停 3 秒), 然后在 13000rpm 离心 30min, 取上清作为粗酶液。

[0189] 酶活测定: 1ml 反应液中含有 200mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10mM L-天冬氨酸、10mM ATP、160mM 盐酸羟胺和适量的粗酶液及所需浓度的 L-赖氨酸, 37℃ 反应 20min, 加入 1ml 5%(w/v) FeCl_3 终止酶活, 取 200ul 在酶标仪上测定 OD540 (Black and Wright, 1954)。

[0190] 结果见图 1 所示, 野生型的 AK III 在 1mM 的赖氨酸时只残存约 80% 的酶活, 10mM 时残存约 40% 的酶活, 说明酶活受到赖氨酸的反馈抑制; 而 3 个突变体的酶活在高达 100mM 的残存酶活达到 100%, 说明 340 位氨基酸突变能够有效的解除赖氨酸的反馈抑制。

[0191] 实施例 3. 野生型和突变型 AK III 产生 L-Lys 的能力

[0192] 将前面构建好的野生型质粒 pWSK29-lysC 以及突变体质粒 pSLL1、pSLL2、和 pSLL3 分别电转化至 SCEcL3(实验室构建的一株大肠杆菌突变株, E. Coli MG1655 $\Delta adhE \Delta ackA \Delta pta \Delta ldhA \Delta focA \Delta pflB \Delta poxB \Delta thrAB \Delta lcdC$) 菌株(可参照文献 Kaemwich Jantama, Xueli Zhang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, S. A. Svoronos, L. O. Ingram Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of Escherichia coli C. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 101, No. 5, December 1, 2008 所述, 以 E.coliMG1655 为出发菌株, 通过 red 重组技术依次敲除 adhE、ackA、pta、ldhA、focA、pflB、poxB、thrA、thrB 和 lcdC 十个基因的编码序列获得突变株), 依次获得的菌株分别命名为 SCEcL3(pWSK29-lysC)、SCEcL3(pSLL1)、SCEcL3(pSLL2) 和

SCEcL3 (pSLL3), 用于发酵产生赖氨酸。

[0193] 发酵培养基如下: 葡萄糖 40g/L, 硫酸铵 10g/L, 磷酸 0.6mL/L, 氯化钾 0.8g/L, 甜菜碱 0.4g/L, 硫酸镁 1.2g/L, 硫酸锰 0.03g/L, 硫酸亚铁 0.03g/L, 玉米浆有机氮 0.4g/L, 5% 消泡剂 0.5mL/L, 苏氨酸 0.2g/L。采用汇和堂的可控 pH 的高通量摇床发酵, 500ml 三角瓶装 100mL 发酵培养基, 补加 50ug/mL 的氨苄青霉素, 接种 2mL LB 过夜培养的菌液在 37℃、200rpm、稀释的氨水控制 pH 6.8, 发酵 20h。

[0194] 在 SCEcL3 菌株中过表达 AK III 野生型和突变体的赖氨酸产量见表 2 所示, 过表达 AK III 野生型和突变体的生长及耗糖情况基本一致, 但在 20 小时糖几乎耗尽时, 过量表达突变的 AK III 可以产 0.28-0.54g/L 的赖氨酸, 而过量表达野生型的 AK III 几乎不产赖氨酸, 突变体比野生型菌株赖氨酸产量有明显提高。

[0195] 表 2. 过表达 AK III 野生型和突变体的赖氨酸产量

[0196]

菌株	赖氨酸产量 (g/L)
SCEcL3 (pWSK29-lysC)	0.06
SCEcL3 (pSLL1)	0.54
SCEcL3 (pSLL2)	0.37
SCEcL3 (pSLL3)	0.28

[0197]

[0198] 实施例 4. 不含赖氨酸时野生型和突变型 AK III 的比酶活

[0199] 参照实施例 2 的实验方法, 利用 BCA 蛋白定量分析试剂盒 (购自伯乐公司, 货号: 23227) 进行粗酶液的总蛋白定量, 不含赖氨酸时野生型和突变型 AK III 的比酶活测定结果如表 3 所示。

[0200] 表 3. 不含赖氨酸时野生型和突变型 AK III 的比酶活

[0201]

编号	不加赖氨酸时的比酶活 (U /mg)
野生型	258
340P	264
340V	145
340R	122

[0202] 结果显示 340 位的天冬氨酸突变为脯氨酸得到的突变型 AK III (340P) 的绝对酶活不但没有下降, 还略有升高; 而 340 位的天冬氨酸突变为缬氨酸 (340V) 或精氨酸 (340R) 得到的突变型 AK III 的绝对酶活相对于野生型 AK III 有所降低。但结合实施例 2 和 3 的结果, 发明人出乎意料地发现, 340V、340R 以及 340P 具备优秀的解除赖氨酸反馈抑制能力。在产物赖氨酸存在下, 340V 或 340R 的相对酶活与 340P 的相似。

[0203] 实施例 5. 6-His tag 标记的本发明多肽

[0204] 将 lysC 的野生型基因、带有 D340R 点突变和带有 I418T 点突变的 lysC 基因, 通过 NdeI 和 XhoI 限制性内切酶位点克隆至质粒 pET21a+ (购自 NOVAGEN 公司), 所得质粒通过电转化的方式转入大肠杆菌 E. coli BL21 (DE3) 中, 这就能够实现 LysC 蛋白的表达, 并且在 C 端带上了 6-His tag 标记。蛋白纯化采用 His SpinTrap columns (购自 GE 公司, 产品货号 28-4013-53), 具体方法参照产品说明书, 纯化后的蛋白采用实施例 2 所示的方法进行酶活测定, 结果如图 2 所示, 由于本实施例的酶活都是用纯化后的酶测定的, 所以与前面实施例粗酶测定相比有一定的差异, 但体现的效果是一致的。

[0205] 本实施例的实验结果证明在本发明多肽的任一侧加上少数氨基酸残基得到的进一步突变的多肽也能具备与本发明多肽相同相似的功能和活性。

[0206] 实施例 6. 双突变所得 AK III 的解除反馈抑制

[0207] 采用前述实施例的方法,利用下述引物(表 4),发明人还对野生型 AK III 的 413 位、401 位、418 位和 420 位进行突变,并检测所得突变体的相对酶活,发现野生型 AK III 的 413 位、401 位这两个突变体并没有解除赖氨酸反馈抑制,野生型 AK III 的 418 位、420 位这两个突变体解除赖氨酸反馈抑制的能力弱于野生型 AK III 的 340 位突变体(图 2)。

[0208] 表 4. 点突变所用引物表

[0209]

SEQ ID NO:20	Y420A-F	CGCATGATTGTGCTGGCGCATCCAGCCATAACC
SEQ ID NO:21	Y420A-R	GGTTATGGCTGGATGCGCCAGCACAAATCATGCG
SEQ ID NO:22	I418T-F	CATTCGCATGACTTGTTATGGCGCATCCAGCC
SEQ ID NO:23	I418T-R	GGCTGGATGCGCCATAACAAGTCATGCCAATG
SEQ ID NO:24	F413A-F	GTATTCGGCGTACTGGAACCGGCCAACATTCGC
SEQ ID NO:25	F413A-R	GCGAATGTTGGCCGTTCCAGTACGCCGAATAC
SEQ ID NO:26	G401K-F	CCTGTCAAAAGCCTGCAAGGTGGCAAAGAGGTATTCGGC
SEQ ID NO:27	G401K-R	GCCGAATACCTCTTTGCCAACCTTGCAGGCTTTTGACAGG

[0210] 发明人在 AK III 第 340 位突变的基础上将 413 位、401 位作了进一步突变,并检测了所得突变体的相对酶活,发现得到的双突变 AK III 突变体,例如 F413A 和 G401K 的抗赖氨酸反馈抑制与本发明的天冬氨酸激酶相似。

[0211] 综上所述,本实施例的实验结果证明 340 位对于天冬氨酸激酶解除赖氨酸反馈抑制的能力至关重要,而在本发明天冬氨酸激酶的基础上作进一步突变得到的多肽也能具备与本发明天冬氨酸激酶相同相似的功能和活性。

[0212] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 中粮生物化学(安徽)股份有限公司
天津工业生物技术研究所

<120> 天冬氨酸激酶III突变体及其宿主细胞和应用

<130> P2012-0992

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1350

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 (*E coli*)

<400> 1

```

gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgate      540
accagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggctgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc      600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg      660
accgacgtcc cggcagcctt caccaccgat ccacgcgtag ttccgcgcgc aaaacgcatt      720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat      780
ccggcaacgt tgctaccgcg agtacgcgcg gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa      840
gacccacgcg caggtggtag gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc      900
gctctggcgc ttctgcgcaa tcagactctg ctcaactttg acagcctgaa tatgctgcat      960
tctcgcggtt tctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac     1020
ttaatcacca cgtcagaagt gacgctggca ttaacccttg ataccaccgg tcaacctcc      1080
actggcgata cgttgcgtac gcaatctctg ctgatggagc ttccgcactg gtgtcggtg      1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc      1200
ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcat gatttggtat      1260
ggcgcaccca gccataacct gtgcttctct gtgcccgccg aagatgccga gcaggtggtg      1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa      1350

```

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (*E coli*)

<400> 2

```

MSEIVVSKFG GTSVADFDAM NRSADIVLSD ANVRLVLSA SAGITNLLVA LAEGLEPGER      60
FEKLDAIRNI QFAILERLRY PNVIREEIER LLENITVLA EAAALATSPAL TDELVSHGEL     120
MSTLLFVEIL RERDVQAQWF DVRKVMRTND RFGRAEPDIA ALAELAAQL LPRLNEGLVI     180
TQGFIGSENK GRITTLGRGG SDYTAALLAE ALHASRVDIW TDVPGIYTTD PRVVSAAKRI     240
DEIAFAEAAE MATFGAKVLH PATLLPAVRS DIPVFGSSK DPRAGGTLVC NKTENPPLFR     300
ALALRRNQTL LTLHSLNMLH SRGFLAEVFG ILARHNISVD LITTSEVSVA LTLDTTGSTS     360
TGDILLTQSL LMELSALCRV EVEEGLALVA LIGNDSLKAC GVGKEVFGVL EPNFIRMICY     420

```

[0002]

GASSHNL CFL VPGEDAEQVV QKLHSNLFE

449

<210> 3
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

<400> 3
 atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggt 120
 tctgctggta tctaatactt gctggctcgt ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcgccgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcagcg acagtgttt 420
 gatgtacgta aagtgatgctg taccaacgac cgatttggc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgtac 540
 acccagggat ttatcggtag cgaataataa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggagcg 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
 accgacgtcc cgggcaccta caccaccgat ccacgcgtag ttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
 ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
 gaccacgcgc caggttgttac gctgggtgtc aataaaactg aaaatccgc gctgttccgc 900
 gctctggcgc ttctgcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgtgtcat 960
 tctcgcggtt tctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtaccg 1020
 ttaatcacca cgtcagaagt gacgctggca ttaacccttg ataccaccg ttcaacctcc 1080
 actggcgata cgttgtctgac gcaatctctg ctgatggagc ttccgcact gtgtcgggtg 1140
 gaggtggaag aaggtctggc gctggctcgc ttgattggca atgacctgc aaaagcctgc 1200
 ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcat gatttgttat 1260
 ggcgcaccca gccataacct gtgcttctg gtgcccgcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 4
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 多肽

<400> 4
 MSEIVVSKFG GTSVADFDAM NRSADIVLSD ANVRLVLSA SAGITNLLVA LAEGLEPGER 60

[0003]

FEKLDAIRNI QFAILERLRY PNVIREEIER LLENITVLAE AAALATSPAL TDELVSHGEL	120
MSTLLFVEIL RERDVQAQWF DVRKVMRTND RFGRAEPDIA ALAELAALQL LPRLNEGLVI	180
TQGFIGSENK GRTTTLGRGG SDYTAALLAE ALHASRVDIW TDVPGIYTTD PRVVSAAKRI	240
DEIAFAEAAE MATFGAKVLH PATLLPAVRS DIPVFGSSK DPRAGGTLVC NKTENPPLFR	300
ALALRRNQL LTLHSLNMLH SRGFLAEVFG ILARHNISVP LITTSEVSVA LTLDTTGSTS	360
TGDTLLTQSL LMELSALCRV EVEEGLALVA LIGNDLSKAC GVGKEVFGVL EPFNIRMICY	420
GASSHNLCFL VPGEDAEQVV QKLHSNLF	449

<210> 5

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 多核苷酸

<400> 5

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatgttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg	60
aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggt	120
tctgctggta tcaactaatct gctggctgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga	180
ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac	240
ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa	300
gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgtg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg	360
atgtcgaccc tgcgtgttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcaggc acagtgtttt	420
gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc	480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgtac	540
accagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttg cgtggagge	600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg	660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag ttccgcagc aaaacgcatt	720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaa agtactgcat	780
ccggcaacgt tgcataccgc agtacgcagc gatataccgg tctttgtcgg ctccagcaaa	840
gacccacgcg caggtgttac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc	900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcaactttgc acagcctgaa tatgtgcat	960
tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagtc	1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc	1080
actggcgata cgttgcgtgac gcaatctctg ctgatggagc ttccgcact gtgtcgggtg	1140
gaggtggaag aaggctcggc gctggcgcg ttgattggca atgacctgac aaaagcctgc	1200
ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcat gatttgttat	1260
ggcgcaccca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg	1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa	1350

<210> 6

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

[0004]

<220>

<221> misc_feature

<223> 多肽

<400> 6

MSEIVVSKFG GTSVADFDAM NRSADIVLSD ANVRLVVLSA SAGITNLLVA LAEGLEPGER	60
FEKLDAIRNI QFAILERLRY PNVIREEEIER LLENITVLAE AAALATSPAL TDELVSHGEL	120
MSTLLFVEIL RERDVQAQWF DVRKVMRTND RFGRAEPDIA ALAELAALQL LPRLNEGLVI	180
TQGFIGSENK GRTTTLGRGG SDYTAALLAE ALHASRVDIW TDVPGIYTTD PRVVSAAKRI	240
DEIAFAEAAE MATFGAKVLH PATLLPAVRS DIPVFGSSK DPRAGGTILVC NKTENPPLFR	300
ALALRRNQL LTLHSLNMLH SRGFLAEVFG ILARHINISV LITTSEVSVA LTLDTTGSTS	360
TGDTLLTQSL LMELSALCRV EVEEGLALVA LIGNDSLKAC GVGKEVFGVL EPFNIRMICY	420
GASSHNLCFL VPGEDAEQVV QKLHSNLF	449

<210> 7

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 多核苷酸

<400> 7

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg	60
aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggt	120
tctgctggta tcaactaatct gctggctcgt ttagctgaag gactggaacc tgccgagcga	180
ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac	240
ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa	300
gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg	360
atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcaggc acagtgttt	420
gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc	480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc	540
accagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc	600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg	660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag ttccgcagc aaaacgcatt	720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaa agtactgcat	780
ccggcaacgt tgctaccgcg agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa	840
gacccacgcg caggtgttac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc	900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat	960
tctcgcggtt tctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtacgc	1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc	1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc ttccgcact gtgtcgggtg	1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggctcgc ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc	1200
ggcgttggca aagaggtatt cggcgactg gaaccgttca acattcgcat gatttgttat	1260
ggcgcatcca gccataacct gtgttctctg gtgcccgcg aagatgccga gcaggtggtg	1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa	1350

[0005]

<210> 8
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 多肽

<400> 8
 MSEIVVSKFG GTSVADFDAM NRSADIVLSD ANVRLVLSA SAGITNLLVA LAEGLEPGER 60
 FEKLDAIRNI QFAILERLRY PNVIREEIER LLENITVLAE AAALATSPAL TDELVSHGEL 120
 MSTLLFVEIL RERDVQAQWF DVRKVMRTND RFGRAEPDIA ALAELAAQL LPRLNEGLVI 180
 TQGFVIGSENK GRTTTLGRGG SDYTAALLAE ALHASRVDIW TDVPGIYTTD PRVVSAAKRI 240
 DEIAFAEAAE MATFGAKVLH PATLLPAVRS DIPVFGSSK DPRAGGTLVC NKTENPPLFR 300
 ALALRRNQL LTLHSLNMLH SRGFLAEVFG ILARHNISVR LITTSEVSV LTLDTTGSTS 360
 TGDTLTQSL LMELSALCRV EVEEGLALVA LIGNDSLKAC GVGKEVFGVL EPFNIRMICY 420
 GASSHNLCFL VPGEDAEQVV QKLHSNLFE 449

<210> 9
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物

<400> 9
 ctagcactag tgaaagagga gaaatactag atgtctgaaa ttgttgtctc caaat 55

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物

<400> 10
 ttactcaaac aaattactat gcagtttttg 30

<210> 11
 <211> 60

[0006]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	11	
	ttgacggcta gtcagtcct aggtacagtg ctagcactag tgaaagagga gaaatactag	60
<210>	12	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	12	
	gcgtctagat tgacggctag ctcagtccta g	31
<210>	13	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	13	
	ggcgagctct tactcaaaca aattactatg cagtttttg	39
<210>	14	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	14	

[0007]

cctcgcgagg cataatattt cggtaccgtt aatcaccacg

40

<210> 15
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 15
cgtggtgatt aacggtaccg aaatattatg ccgcgcgagg

40

<210> 16
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 16
cgcggcataa tatttcggtg gtcttaata caacg

35

<210> 17
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 17
cgtggtgatt aagactaccg aaatattatg ccgcg

35

<210> 18
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

[0008]

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	18	
	cgcgcgcat aatatttcgg tacgttaat caccacg	37
<210>	19	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	19	
	cgtggtgatt aagcgaccg aaatattatg ccgcgcg	37
<210>	20	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	20	
	cgcattgattt gtgctggcgc atccagccat aacc	34
<210>	21	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	21	
	ggttatggct ggatgcgcca gcacaaatca tgcg	34
<210>	22	

[0009]

<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 22
cattcgcatg acttggtatg gcgcatccag cc

32

<210> 23
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 23
ggctggatgc gccataacaa gtcatgcgaa tg

32

<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 24
gtattcggcg tactggaacc ggccaacatt cgc

33

<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

[0010]

<400>	25	
	gcgaatgttg gccggtcca gtacgccgaa tac	33
<210>	26	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	26	
	cctgtcaaaa gcctgcaagg ttggcaaaga ggtattcggc	40
<210>	27	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	27	
	gccgaatacc tctttgccaa ccttgcaggc ttttgacagg	40

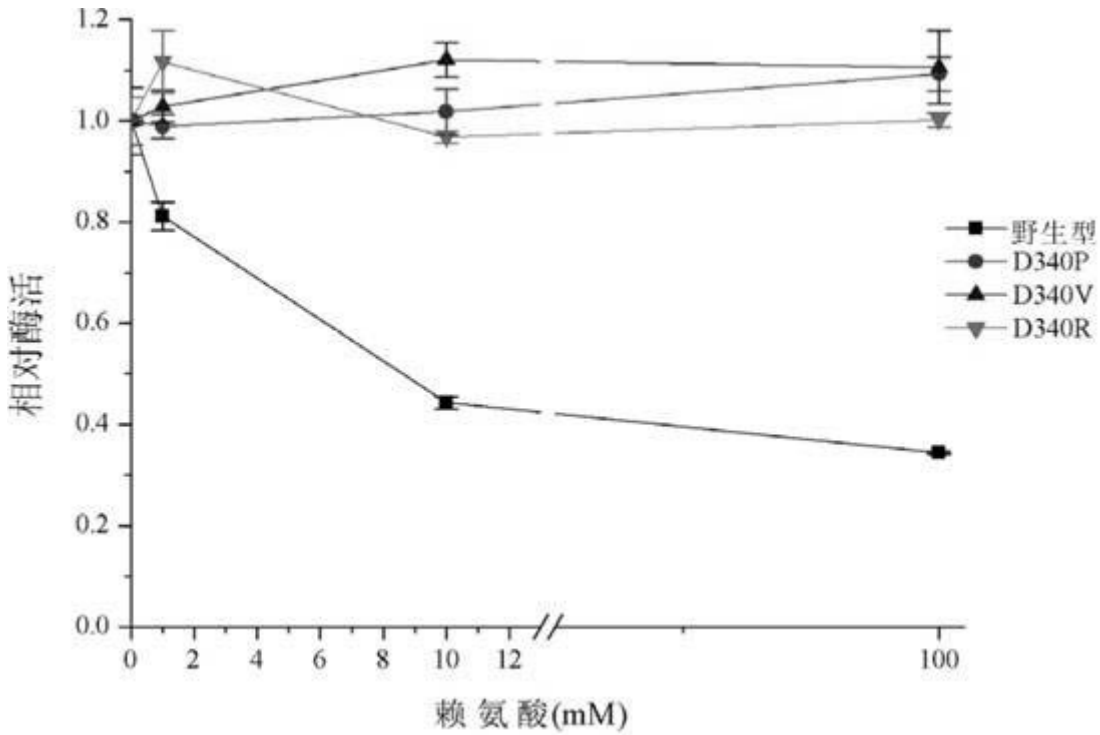


图 1

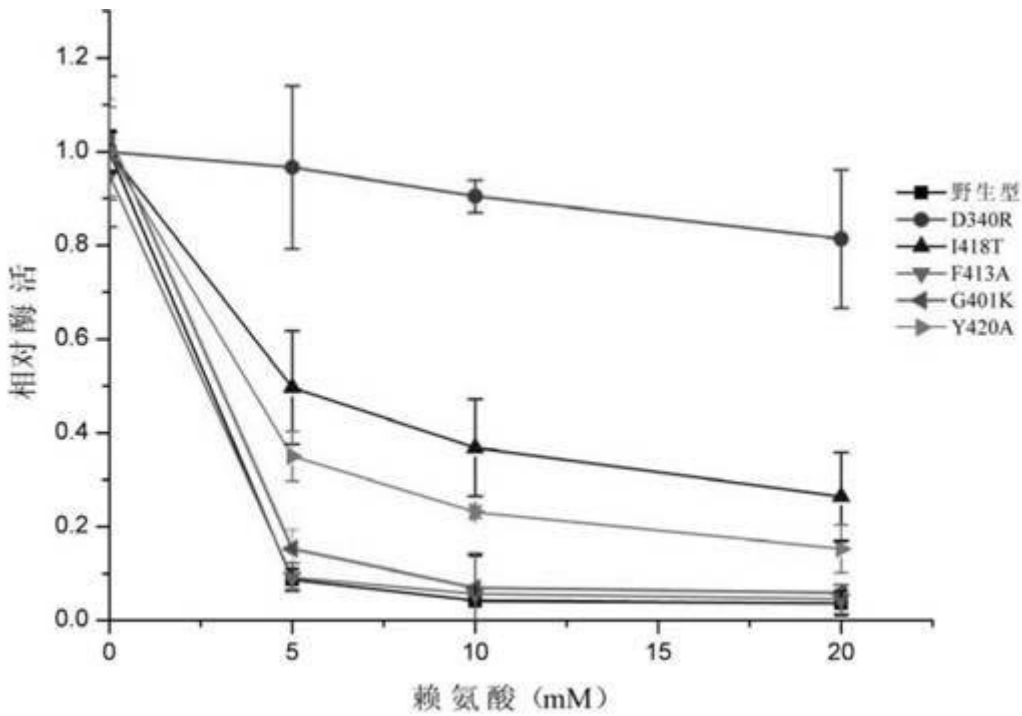


图 2