(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779476 A
(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680044382.5

(22)申请日 2016.06.30

(30)优先权数据
15174554.4 2015.06.30 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.01.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/065389 2016.06.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/001606 EN 2017.01.05

(71)申请人 道达尔销售服务公司
地址 法国皮托
申请人 中国科学院青岛生物能源与过程研究所

(72)发明人 L.富拉格 F.劳费尔 H.施特鲁布 王允 徐健 徐卉芳 李盛英

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张文辉

(51)Int.Cl.
C12P 5/02(2006.01)
C12N 9/88(2006.01)

权利要求书2页 说明书23页
序列表13页 附图10页

(54)发明名称

α-烯烃的生产

(57)摘要

本发明涉及α-烯烃的生物合成。特别是本发明提供了使用对8至14个碳的游离脂肪酸(特别是对C_8-C_{12}游离脂肪酸,更特别是对C_{12}游离脂肪酸)具有脱羧酶活性的多肽,或者使用表达或过表达所述多肽的基因工程宿主细胞生产中链α-烯烃(更特别是C_{11}α-烯烃)的方法。

CN 108779476 A

1.生产C_7-C_{11}α-烯烃的方法，其包括将包含编码脱羧酶的重组核酸的重组宿主细胞在适于由所述重组宿主细胞生产C_7-C_{11}α-烯烃的条件下培养，其中所述脱羧酶的优选底物是C_8-C_{12}游离脂肪酸。

2.权利要求1的方法，其中编码脱羧酶的所述核酸包含与SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约75％、优选至少约80％、更优选至少约95％序列同一性的核苷酸序列，并且其中所述重组核酸确保所述脱羧酶的表达或过表达。

3.根据权利要求1或2的方法，其中所述核酸编包含与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6具有至少80％、优选至少90％同一性的氨基酸序列的多肽或所述多肽的活性片段。

4.根据权利要求1至3中任一项的方法，其中所述核酸编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的多肽。

5.根据权利要求1至4中任一项的方法，其中C_{12}游离脂肪酸是所述脱羧酶的优选底物，并且其中所述α-烯烃是C_{11}α-烯烃。

6.根据权利要求1至5中任一项的方法，其中在包含C_8-C_{12}游离脂肪酸，优选C_{12}游离脂肪酸的培养基中培养所述宿主细胞。

7.根据权利要求1至6中任一项的方法，其中所述宿主细胞已经进一步地被基因工程化以生产或过量生产C_8-C_{12}游离脂肪酸，优选C_{12}游离脂肪酸。

8.根据权利要求7的方法，其中所述宿主细胞包含编码如下酶的重组核酸：所述酶参与具有包含8至12之间碳链长度的游离脂肪酸，更特别是C_{12}游离脂肪酸的生产。

9.根据权利要求8的方法，其中所述宿主细胞包含编码对C_8至C_{12}酰基-ACP，优选对C_{12}酰基-ACP具有活性的硫酯酶的重组核酸。

10.根据权利要求1至9中任一项的方法，其中所述宿主细胞是产油宿主细胞。

11.根据权利要求1至10中任一项的方法，其中所述宿主细胞选自下组，所述组包含细菌、酵母、真菌、植物和藻类。

12.根据权利要求1至11中任一项的方法，其还包括从所述宿主细胞或所述培养基中回收α-烯烃的步骤。

13.生产聚α-烯烃的方法，其包括以下步骤：

i)根据权利要求1至12中任一项的方法生产C_7-C_{11}α-烯烃；和

ii)使用在步骤i)中获得的α-烯烃作为单体进行低聚反应以生产低聚物；和任选地，

iii)氢化步骤ii)中生产的低聚物。

14.根据权利要求13的方法，其中所述聚α-烯烃是C33聚α-烯烃，其中步骤i)包含生产C_{11}α-烯烃，且其中步骤ii)中的低聚反应是三聚反应。

15.组合物，其包含可通过根据权利要求14的方法获得的聚α-烯烃，其中所述聚α-烯烃的至少85％、优选至少90％、更优选至少95％是C33聚α-烯烃。

16.具有脱羧酶活性的多肽，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:13具有至少80％，优选至少90％同一性的氨基酸序列。

17.编码具有脱羧酶活性的酶的分离的核酸，其中所述核酸包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:5具有至少约80％，更优选至少约95％序列同一性的核苷酸序列。

18.根据权利要求16的多肽或根据权利要求17的分离的核酸，其中C_8至C_{14}游离脂肪酸，

优选C_8至C_{12}游离脂肪酸，更优选C_{12}游离脂肪酸是所述脱羧酶的优选底物。

19.根据权利要求17或18的分离的核酸，其中所述核酸包含与SEQ ID NO:7具有至少约95％序列同一性的核苷酸序列。

20.载体，其包含可操作地偶联至权利要求17至19中任一项的核酸序列的至少一个调节序列。

21.宿主细胞，其包含整合入其基因组的根据权利要求17至19中任一项的核酸或根据权利要求20的载体。

22.权利要求21的宿主细胞，其是产油真核微藻或产油酵母。

23.根据权利要求21或22的宿主细胞用于润滑油的工业生产的用途。

24.润滑油，其包含可通过根据权利要求13或14的方法获得的聚α-烯烃。

25.根据权利要求24的润滑油，其中所述聚α-烯烃是生物源的聚α-烯烃。

26.根据权利要求24或25的润滑油，其中所述聚α-烯烃的至少50％、优选至少85％由C_{33}聚α-烯烃组成。

27.根据权利要求24至26中任一项的润滑油，其中所述润滑油是汽车润滑油。

α-烯烃的生产

技术领域

[0001] 本申请总体上涉及生物合成方法。具体而言，本申请涉及α-烯烃(olefin)的生物合成。

背景技术

[0002] 不饱和烃如α-烯烃是工业上重要的一组分子，其除了用作燃料外，还可用作用于润滑油和表面活性剂的前体，或作为原料用于进一步化学转化为例如燃料、聚合物、塑料、纺织品、溶剂、粘合剂等。

[0003] α-烯烃，更具体地说是直链α-烯烃，传统上是通过乙烯的低聚从石油来源生产的，但是寻找生产此类α-烯烃的替代方法，特别是从可再生资源生产生产此类α-烯烃的替代方法将是有利的。此外，化学合成产生显示不同碳链长度的直链α-烯烃的混合物。作为用于进一步化学转化例如生产感兴趣的聚α-烯烃的原料，此类混合物可能不是合意的。

[0004] 已经报道了烯烃的微生物生产。例子包括在藤黄微球菌(Micrococcus luteus)中负责通过两个脂肪酰基-辅酶A(酰基-CoA)分子的头对头缩合产生具有内部双键的烯(链烯烃，alkene)的三基因簇(Beller et al.2010 Appl Environ Microbiol 76:1212-1223)；来自Jeotgalicoccus sp.ATCC 8456的独特的P450脱羧酶$OleT_{JE}$，其在H_2O_2存在下直接将C_{12}至C_{20}游离脂肪酸脱羧以形成α-烯烃(WO 2009/085278,Rude et al.2011 Appl Environ Microbiol 77:1718-1727,Liu et al.2014 Biotechnology for Biofuels 7:28)；另一种cyp152 P450酶家族的酶，即来自枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168的$P450_{BSβ}$的酶，已经显示了其对棕榈酸的脱羧酶活性(WO 2009/085278,Rude et al.2011)；以及来自聚球蓝细菌(Synechococcus sp.)PCC 7002的I型聚酮合酶(polyketide synthase)，其能够经由顺序的聚酮合酶链延伸、酮还原、由其磺基转移酶结构域介导的磺化作用、以及通过硫酯酶结构域催化的偶联水解和脱羧来将脂肪酰基-ACP转化为α-烯烃(Mendez-Perez et al.2011 Appl Environ Microbiol 77:4264-4267)。

[0005] 总的来说，需要α-烯烃的替代生产方法，并且更特别是允许以更低的成本生产α-烯烃和/或更环境友好的改善方法。也期望提供允许定制α-烯烃的碳链长度的生产方法，更特别是用于中链α-烯烃(即，具有7-13的碳链长度的α-烯烃)，更特别是C_{11}α-烯烃的生产方法。

发明内容

[0006] 本发明解决了现有技术中的一个或多个上述问题。具体而言，提供了用于生产α-烯烃的方法，该方法允许控制α-烯烃的碳链长度。

[0007] 本发明至少部分基于这样的发现：酸热脂环酸杆菌(Alicyclobacillus acidocaldarius)和Staphylococcus massiliensis的某些基因组序列编码具有游离脂肪酸脱羧酶活性的酶。这些生物体没有一个之前被报道过生产末端烯烃。进一步地已经发现可以鉴定某些多肽，所述多肽对中链游离脂肪酸(特别是C_8至C_{12}游离脂肪酸，更特别是C_{12}游

离脂肪酸)具有特异性脱羧酶活性,从而生产中链α-烯烃,特别是C_7至C_{11}α-烯烃,更特别是C_{11}α-烯烃。本申请提供了其实例,更特别是在Staphilococcus massiliensis中鉴定的烯烃生产酶(Sm46)、来自枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168的$P450_{BSβ}$脂肪酸羟化酶、以及在酸热脂环酸杆菌中鉴定的脱羧酶对C_{12}游离脂肪酸具有特异性脱羧酶活性,从而生产C_{11}α-烯烃。这些酶的鉴定有助于进一步鉴定来自其他生物体的相似酶。

[0008] 本发明特别是通过以下编号的方面和实施方案(i)至(xvii)的任一个或一个或多个的任意组合来获取,其中:

[0009] (i)生产C_7-C_{11}α-烯烃的方法,其包括将包含编码脱羧酶的重组核酸的重组宿主细胞在适于由所述重组宿主细胞生产C_7-C_{11}α-烯烃的条件下培养,其中所述脱羧酶的优选底物是C_8-C_{12}游离脂肪酸。

[0010] (ii)根据(i)的方法,其中编码脱羧酶的所述核酸包含与SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约75%、优选至少约80%、更优选至少约95%序列同一性的核苷酸序列,并且其中所述重组核酸确保所述脱羧酶的表达或过表达。

[0011] (iii)根据(i)或(ii)的方法,其中所述核酸编码包含与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6具有至少80%、优选至少90%同一性的氨基酸序列的多肽或所述多肽的活性片段。

[0012] (iv)根据(i)至(iii)中任一项的方法,其中所述核酸编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的多肽。

[0013] (v)根据(i)至(iv)中任一项的方法,其中C_{12}游离脂肪酸是所述脱羧酶的优选底物,并且其中所述α-烯烃是C_{11}α-烯烃。

[0014] (vi)根据(i)至(v)中任一项的方法,其中在包含C_8-C_{12}游离脂肪酸,优选C_{12}游离脂肪酸的培养基中培养所述宿主细胞。

[0015] (vii)根据(i)至(vi)中任一项的方法,其中所述宿主细胞进一步被基因工程化以生产或过量生产C_8-C_{12}游离脂肪酸,优选C_{12}游离脂肪酸。

[0016] (viii)根据(vii)的方法,其中所述宿主细胞包含编码酶的重组核酸,所述酶参与具有包含8至12之间碳链长度的游离脂肪酸,更特别是C_{12}游离脂肪酸的生产。

[0017] (ix)根据(viii)的方法,其中所述宿主细胞包含编码对C_8至C_{12}酰基-ACP,优选对C_{12}酰基-ACP具有活性的硫酯酶的重组核酸。

[0018] (x)根据(i)至(ix)中任一项的方法,其中所述宿主细胞是产油(含油,oleaginous)宿主细胞。

[0019] (xi)根据(i)至(x)中任一项的方法,其中所述宿主细胞选自下组,所述组包含细菌、酵母、真菌、植物和藻类。

[0020] (xii)根据(i)至(xi)中任一项的方法,其还包括从宿主细胞或培养基中回收α-烯烃的步骤。

[0021] (xiii)生产聚α-烯烃的方法,其包括以下步骤:

[0022] i)按照根据(i)至(xii)中任一项的方法生产C_7-C_{11}α-烯烃;和

[0023] ii)使用在步骤i)中获得的α-烯烃作为单体进行低聚反应以生产低聚物;和任选地,

[0024] iii)氢化步骤ii)中生产的低聚物。

[0025] (xiv)根据(xiii)的方法，其中所述聚α-烯烃是C33聚α-烯烃，其中步骤i)包含生产C_{11}α-烯烃，且其中步骤ii)中的低聚反应是三聚反应。

[0026] (xv)组合物，其包含可通过根据(xiv)的方法获得的聚α-烯烃，其中所述聚α-烯烃的至少85％、优选至少90％、更优选至少95％是C33聚α-烯烃。

[0027] (xvi)具有脱羧酶活性的多肽，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:13具有至少80％，优选至少90％同一性的氨基酸序列。

[0028] (xvii)编码具有脱羧酶活性的酶的分离的核酸，其中所述核酸包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:5具有至少约80％，更优选至少约95％序列同一性的核苷酸序列。

[0029] (xviii)根据(xvi)的多肽或根据(xvii)的分离的核酸，其中C_8至C_{14}游离脂肪酸，优选C_8至C_{12}游离脂肪酸，更优选C_{12}游离脂肪酸是所述脱羧酶的优选底物。

[0030] (xix)根据(xvii)或(xviii)的分离的核酸，其中所述核酸包含与SEQ ID NO:7具有至少约95％序列同一性的核苷酸序列。

[0031] (xx)载体，其包含可操作地偶联至(xvii)至(xix)中任一项的核酸序列的至少一个调节序列。

[0032] (xxi)宿主细胞，其包含整合入其基因组的根据陈述(xvii)至(xix)中任一项的核酸或根据权利要求20的载体。

[0033] (xxii)(xxi)的宿主细胞，其是产油真核微藻或产油酵母。

[0034] (xxiii)根据(xxi)或(xxii)的宿主细胞用于工业生产润滑油的用途。

[0035] (xxiv)润滑油，其包含可通过根据(xiii)或(xiv)的方法获得的聚α-烯烃。

[0036] (xxv)根据(xxiv)的润滑油，其中所述聚α-烯烃是生物来源的聚α-烯烃。

[0037] (xxvi)根据(xxiv)或(xxv)的润滑油，其中所述聚α-烯烃的至少50％、优选至少85％由C_{33}聚α-烯烃组成。

[0038] (xxvii)根据(xxiv)至(xxvi)中任一项的润滑油，其中所述润滑油是汽车润滑油。

附图说明

[0039] 通过所附的附图来说明本申请的教导，这些附图应被认为仅是说明性的，且不以任何方式限制权利要求的范围。

[0040] 图1：$OleT_{JE}$(A,B)、Bs168(C,D)、Aa162(E,F)和Sm46(G,H)的核苷酸(A,C,E,G)和氨基酸(B,D,F,H)序列。

[0041] 图2：pET28a的质粒图谱。

[0042] 图3：大肠杆菌中编码$OleT_{JE}$、Bs168、Aa162和Sm46的基因的异源表达。携带包含编码OleTJ、Bs168、Aa162或Sm46的基因的重组质粒，在诱导转基因的表达(0.4mM IPTG)或不表达(未诱导)的条件下培养的大肠杆菌细胞的裂解物的SDS-PAGE分析。M:蛋白质标记物。

[0043] 图4：通过$OleT_{JE}$、Bs168、Aa162和Sm46体外生产α-烯烃。编码OleTJ、Bs168、Aa162和Sm46的基因在大肠杆菌中重组表达。大肠杆菌裂解物的上清液用于在C_{12}、C_{14}或C_{16}脂肪酸底物(1mM)和H_2O_2(500μM)存在下的α-烯烃生物合成的体外测定。气相色谱(GC)峰下的面积指示不同酶的C_{11}、C_{13}和C_{15}α-烯烃生产。

[0044] 图5：(A)经密码子优化的核苷酸序列(用于在大肠杆菌中表达)，其编码具有侧翼限制性位点的Sm46和在N端具有29个氨基酸缺失的截短变体Sm46-del29(分别为SEQ ID

NO:9和SEQ ID NO:10)。显示了经密码子优化的(用于在大肠杆菌中表达)编码Sm46的核苷酸序列(SEQ ID NO:9);Nde I和Xho I限制性位点以粗体表示,编码截短变体Sm46-del29的缺失序列以下划线显示。(B)Sm46-del29的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)。

[0045] 图6:通过Sm46的截短变体(Sm46-del29)体外将游离脂肪酸转化为α-烯烃。显示了游离脂肪酸底物(A)和相应的α-烯产物(B)的转化百分率。

[0046] 图7:通过Aa162、Bs168和Sm46-del29体外生产α-烯烃。将重组表达的和纯化的酶(0.2μM)用于体外测定在C_{14}脂肪酸底物存在下的α-烯烃生物合成。从左到右显示了C_{14}游离脂肪酸底物、C_{13}α-烯烃、α-羟基C_{14}脂肪酸、β-羟基C_{14}脂肪酸的转化率百分率。

具体实施方式

[0047] 除非另外定义,否则用于公开本发明的所有术语(包括技术和科学术语)具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。通过进一步指导的方式,包含了术语定义以更好地理解本发明的教导。

[0048] 如本文所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一(a)”,“一个(an)”和“该(the)”包括单数和复数指示物两者。

[0049] 如本文所用的术语“包含(comprising)”,“包含(comprises)”和“包含(comprised)”与“包括(including)”,“包括(includes)”或“含有(containing)”,“含有(contains)”同义,并且是包含性的或开放式的,且不排除另外的、未列举的成员、要素或方法步骤。在提及包括某些要素或步骤的实施方案时,这也包括基本上由所述要素或步骤组成的实施方案。

[0050] 通过端点进行的数值范围的列举包括包含在相应范围内的所有数字和部分,以及所列举的端点。

[0051] 如本文所用的术语“约”当涉及诸如参数、量、持续时间等的可测量值时意指涵盖详述值的或者距离距离详述值的+/-10%或更小,优选+/-5%或更小,更优选+/-1%或更小,和还更优选+/-0.1%或更小的变化,只要此类变化适合于在所公开的发明中执行即可。应该理解,修饰语“约”所涉及的值本身也具体地并且优选地被公开。

[0052] 本说明书中引用的所有文献都通过引用以其整体并入本文。

[0053] 阐述生物化学一般原理的标准参考著作包括Biochemical Pathways:An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology,ed.Michal,G,John Wiley and Sons,Inc.,New York,US,1999。

[0054] 术语“烯烃”或“烯”在本文中指由碳和氢组成的含有至少一个碳-碳双键的分子。含有一个碳-碳双键的烯烃在本文中称作单不饱和烃并且具有化学式C_nH_{2n},其中n等于至少2。

[0055] “Alpha-烯烃”、“α-烯烃”、“1-烯”或“末端烯烃”在本文中用作同义词并且表示在伯或alpha(α)位置处具有双键的烯烃或烯。如本文所用的“直链α-烯烃”或“LAO”指具有直链烃链的α-烯烃,而“支链α-烯烃”在烃链的一个或多个碳原子上具有分支。术语“中链α-烯烃”在本文中用于表示具有7至13个碳的α-烯烃并且涵盖C_7α-烯烃、C_8α-烯烃、C_9α-烯烃、C_{10}α-烯烃、C_{11}α-烯烃、C_{12}α-烯烃和C_{13}α-烯烃中的任何一种或多种。术语“非偶数α-烯烃”指其中碳原子数量不是偶数的α-烯烃。因此,非偶数α-烯烃包含C_7、C_9、C_{11}和C_{13}α-烯烃。

[0056] 如本文所用，术语“脂肪酸”或“游离脂肪酸”意指具有式RCOOH的羧酸或其盐(RCOO-)。R代表脂族基团，优选烷基。脂肪酸可以是饱和的、单不饱和的或多不饱和的。如本文所用的术语“中链脂肪酸”或“中链游离脂肪酸”表示具有8至14个碳原子的脂肪酸或游离脂肪酸。术语“偶数脂肪酸”指其中碳原子数目是偶数的脂肪酸。因此偶数中链脂肪酸涵盖C_8、C_{10}、C_{12}和C_{14}脂肪酸。

[0057] 如本文所用，术语“宿主细胞”指可用于生产如本文所述的α-烯烃的细胞。宿主细胞可以是在培养物中生长的分离的细胞或细胞系，或者存在于活组织或生物体中的细胞。

[0058] 如本文所用，术语“微生物(microbial)”、“微生物生物体(microbial organism)”或“微生物体(micro-organism)”旨在意指作为包含于古细菌，细菌或真核生物域中的微观细胞存在的任何生物体。因此，该术语意指涵盖原核或真核细胞或具有微观尺寸的生物体，并包含细菌、古菌和真细菌(如蓝藻的所有种以及真核微生物体如真菌，包括酵母和藻类)。该术语还包括可培养用于生物化学生产的任何物种的细胞培养物。

[0059] 如本文关于宿主细胞所用的术语“产油(oleaginous)”表示以其脂质积累能力为特征的细胞。通常，它们的生物质在干物质中含有超过20%的脂质。

[0060] “藻类”组涵盖，但不限于，(i)数个真核门，包括红藻门(红藻)、绿藻门(绿藻)、双鞭毛虫门、定鞭藻门，(ii)来自真核生物不等鞭毛门(Heterokontophyta)的数个纲，这包括但不限于硅藻纲(Bacillariophycea)(硅藻类)、真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)、褐藻纲(褐藻)、黄藻纲(黄绿藻)和金黄藻纲(金藻)，以及(iii)原核蓝藻门(蓝绿藻)。

[0061] 术语“藻类”包括例如选自以下的属：曲壳藻属(Achnanthes)、双眉藻属(Amphora)、项圈藻属(Anabaena)、纤维藻属(Anikstrodesmis)、Arachnoidiscusm、Aster、葡萄藻属(Botryococcus)、角毛藻属(Chaetoceros)、衣藻属(Chlamydomonas)、小球藻属(Chlorella)、绿球藻属(Chlorococcum)、Chorethron、卵形藻属(Cocconeis)、圆筛藻属(Coscinodiscus)、小环藻属(Cyclotella)、细柱藻属(Cylindrotheca)、杜氏藻属(Dunaliella)、Emiliana、眼虫属(Euglena)、管状藻属(Fistulifera)、拟脆杆藻属(Fragilariopsis)、布纹藻属(Gyrosigma)、红球藻属(Hematococcus)、等鞭金藻属(Isochrysis)、Lampriscus、Monochrysis、单针藻属(Monoraphidium)、Nannochloris、Nannnochloropsis、舟形藻属(Navicula)、新绿藻属(Neochloris)、肾鞭藻属(Nephrochloris)、Nephroselmis、菱形藻属(Nitzschia)、节球藻属(Nodularia)、念珠藻属(Nostoc)、Odontella、卵囊藻属(Oocystis)、Oscillartoria、三角褐指藻(Phaeodactylum)、Playtmonas、Pleurochrysis、紫菜属(Porhyra)、Pseudoanabaena、Pyramimonas、裂丝藻属(Stichococcus)、聚球藻属(Synechococcus)、集胞藻属(Synechocystis)、周氏扁藻属(Tetraselmis)、海链藻属(Thalassiosira)，和束毛藻属(Trichodesmium)。

[0062] 如本文关于宿主细胞所用的术语“基因工程的”或“遗传修饰的”或“重组”表示非天然存在的宿主细胞以及其重组子代，其具有至少一个在参考物种天然存在的菌株(包括参考物种的野生型菌株)中不存在的基因改变。此类遗传修饰通常通过经由人类干预的技术手段(即非天然地)实现，所述干预可以包括例如异源核酸的引入和/或内源核酸的修饰、过表达或缺失。

[0063] 如本文所用的术语“异源”或“外源(foreign)”意指参考分子特别是核酸不天然存

在于宿主细胞中。

[0064] 如本文所用的术语“内源”或“天然(native)”表示参考分子特别是核酸存在于宿主细胞中。

[0065] 当提及重组宿主中的核酸时，“重组核酸”意指所述核酸的至少一部分不天然存在于宿主细胞的相同基因组位置中。例如，重组核酸可以包含异源启动子控制下的天然存在于宿主细胞中的编码序列，或它可以是天然存在于宿主细胞中基因的额外拷贝，或者重组核酸可以包含内源启动子控制下的异源编码序列。

[0066] “核酸”意指基本上由核苷酸(如脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸)组成的任何长度的寡聚物和聚合物。核酸可包含嘌呤和/或嘧啶碱基和/或其他天然(例如黄嘌呤、肌苷、次黄嘌呤)，化学或生物化学修饰(例如甲基化)，非天然或衍生的核苷酸碱基。核酸的骨架可以包含通常可在RNA或DNA中发现的糖和磷酸基团，和/或一种或多种经修饰或取代的糖和/或一种或多种经修饰或取代的磷酸基团。可以引入磷酸基团或糖的修饰以改善稳定性、对酶促降解的抗性，或一些其他有用的特性。“核酸”可以是例如双链的，部分双链的或单链的。当是单链时，核酸可以是有义链或反义链。“核酸”可以是环形或线形的。如本文所用的术语“核酸”优选涵盖DNA和RNA，特别包括基因组、hnRNA、pre-mRNA、mRNA、cDNA、包含载体的重组或合成核酸。

[0067] “编码”意指凭借所讨论生物体的遗传密码，核酸序列或其部分对应于特定氨基酸序列(如期望多肽或蛋白质的氨基酸序列)。例如，“编码”特定多肽或蛋白质(如酶)的核酸可以涵盖基因组、hnRNA、pre-mRNA、mRNA、cDNA、重组或合成核酸。

[0068] 优选地，编码特定多肽或蛋白质的核酸可以包含编码所述多肽或蛋白质的开放阅读框(ORF)。“开放阅读框”或“ORF”指编码核苷酸三体的连续(密码子)，其从翻译起始密码子开始并用本身已知的翻译终止密码子结束，并且不含有任何内部框内翻译终止密码子，并且潜在地能够编码多肽或蛋白质。因此，该术语可以与本领域中使用的“编码序列”同义。

[0069] 本文教导的核酸可编码多于一种多肽或蛋白质。此类核酸表示为“多顺反子”核酸并且通常包含数个ORF或编码序列，其各自编码多肽或蛋白质。

[0070] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且通常指通过肽键连接的氨基酸残基的聚合物，并且不限于产物的最小长度。因此，定义内包含肽、寡肽、多肽、二聚体(异源和同源)，多聚体(异源和同源)等等。定义涵盖了全长蛋白质及其片段两者。该术语还包括多肽的表达后修饰，如糖基化、乙酰化、磷酸化等。此外，为了本发明的目的，术语还指当包含对天然蛋白质或多肽序列的修饰(如缺失、添加和取代(如保守的性质))时。

[0071] 如本文所用的术语“酶”表示催化化学反应的生物分子。术语涵盖单一酶(即单一催化实体)，以及包含超过一个催化实体的系统。如本文所述的酶可以自然拥有所述活性或者可以对它们工程化以展现所述活性。

[0072] 如本文所用，“脂肪酸酶”意指参与脂肪酸生物合成的任何酶。如本文所用，术语“脂肪酸生物合成途径”意指生产脂肪酸的生物合成途径。可以在宿主细胞中表达或过表达脂肪酸酶以生产脂肪酸。

[0073] 如本文所用，术语“纯化(purify)”、“纯化的(purified)”或“纯化(purification)”意指通过例如分离或分开将分子从其环境中除去或分离。如本文所用，这些术语还指从样品中除去污染物。例如，当在宿主细胞中生产α-烯烃时，可以通过除去其他

细胞组分(例如核酸、多肽、脂质、碳水化合物或其他碳氢化合物)来纯化该烯烃。术语“纯化(purify)”、“纯化的(purified)”或“纯化(purification)”不要求绝对纯净。它们是相对性术语。

[0074] 如本文所用,术语“同一性(identity)”和“相同(identical)”等指在两个聚合物分子之间,例如在两个核酸分子或多肽之间的序列相似性。用于比较序列和确定序列同一性的方法在本领域中是公知的。例如,序列同一性百分比指这些序列比对后两个序列之间的相同核酸或氨基酸的百分比。可以用本领域已知的各种不同的程序和算法来执行和计算比对和同一性百分比。优选的比对算法包括BLAST(Altschul,1990;例如在NCBI网站上可用)和Clustal(综述于Chenna,2003,例如在EBI网站可用)。优选地,使用BLAST来计算两个序列之间的同一性百分比,如Tatusova和Madden 1999(FEMS Microbiol Lett 174:247-250)中描述的“Blast 2sequences”算法,例如使用发布的默认设置或其它合适的设置(如例如对于BLASTN算法:开启缺口的代价=5,延伸缺口的代价=2,错配罚分=-2,匹配得分=1,缺口x_摘下=50,期望值=10.0,字长=28;或者对于BLASTP算法:矩阵=Blosum62,开启缺口的代价=11,延伸缺口的代价=1,期望值=10.0,字长=3)。

[0075] 术语“可再生”在本文中用于指材料(例如分子,组合物或产品)可以由自然资源生产或者源自自然资源,所述自然资源可以通过陆地、水生或海洋生态系统的植物(如农作物、食用和不可食用的草、森林产品、海草或藻类),或微生物(如细菌、真菌或酵母)的作用来周期性(例如每年或永久)补充。

[0076] 术语“可再生资源”指可以在100年的时间框内补充的自然资源。可以自然地或经由农业技术补充该资源。可再生资源包括,例如但不限于,植物、动物、鱼、细菌、真菌、酵母、藻类和林业产品。它们可以是天然存在的,杂交的(hybrids)或基因工程生物体。耗费超过100年来形成的自然资源(如原油,煤炭,泥炭)不认为是可再生资源。

[0077] 本文中术语“生物基含量(bio-based content)”指材料中来自可再生资源的碳量,其为材料中总有机碳质量的百分比,如通过标准ASTM D6866测定。

[0078] 关于材料(如分子、组合物或产品)的术语“生物来源(的)”意指此类材料来源于可再生源的起始材料(即来自可再生资源)。相应地,受典型测量误差的影响,生物来源的材料具有至少90%、优选至少95%、更优选至少约96%、97%或98%、甚至更优选至少约99%例如约100%的生物基含量。

[0079] 本申请总体上涉及烯烃的生物合成、特别是α-烯烃、更特别是中链α-烯烃的生物合成。

[0080] 更特别地,本申请提供了编码中链游离脂肪酸脱羧酶的核苷酸序列和由其编码的多肽、包含所述核苷酸序列的重组生物体、使用所述多肽或所述重组生物体生产中链α-烯烃的方法、以及由这些方法获得的产物。

[0081] 核苷酸序列

[0082] 本申请提供编码对中链游离脂肪酸具有脱羧酶活性的酶的核酸,这对于生产相应的中链α-烯烃是有意义的。实际上,本发明人鉴定了编码对中链游离脂肪酸具有脱羧酶活性的酶的一些核酸序列。在特定实施方案中,这些核酸编码中链游离脂肪酸是优选底物的脱羧酶。

[0083] 编码具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性(特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性,更特

别是C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性)，并因此适用于本文设想方法的核苷酸序列包括编码来自枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168的$P450_{BSβ}$脂肪酸羟化酶(Bs168)的序列(SEQ ID NO:3)；编码烯烃生产酶(Aa162)的酸热脂环酸杆菌的基因组序列(SEQ ID NO:5)；和编码烯烃生产酶(Sm46)的Staphilococcus massiliensis的基因组序列(SEQ ID NO:7)，以及这些序列的变体。变体核苷酸序列可以例如是用于在选择的宿主细胞中重组表达的密码子优化的序列。例如，与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7具有至少约70％或75％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％序列同一性并编码具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶(特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性，更特别是C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性)的核苷酸序列被设想用在本文中所公开的方法中。SEQ ID NO:7的示例性变体核苷酸序列是SEQ ID NO:9，已对其密码子优化用于在大肠杆菌中的重组表达。

[0084] 在特定实施方案中，本文设想的核酸序列编码的脱羧酶对中链游离脂肪酸(优选C_8-C_{12}游离脂肪酸，更优选C_{12}游离脂肪酸)具有底物偏好性。

[0085] 本发明人是第一个鉴定了编码烯烃生产酶的酸热脂环酸杆菌的核酸序列(SEQ ID NO:5)以及Staphilococcus massiliensis的基因组序列(SEQ ID NO:7)(分别称为Aa162和Sm46)的人。更具体地，发现酸热脂环酸杆菌的核酸序列(SEQ ID NO:5)编码优选作用于中链游离脂肪酸(更特别地作用于C_{12}游离脂肪酸)的脱羧酶(Aa162，SEQ ID NO:6)，这可以确保提高中链α-烯烃(更特别地C_{11}α-烯烃)的生产效率和/或增加所述α-烯烃的纯度。发现Staphilococcus massiliensis的基因组序列(SEQ ID NO:7)编码对中链游离脂肪酸具有脱羧酶活性的烯烃生产酶(Sm46，SEQ ID NO:8)。尤其是，表明Sm46显示了针对C_8-C_{12}游离脂肪酸的底物偏好性，更特别地，发现C_{12}游离脂肪酸是Sm46的优选底物。还有利的是，Sm46多肽显示特异性脱羧酶活性，即在使用所述多肽的情况下当转化游离脂肪酸底物时副产物特别是羟基脂肪酸(如α-和β-羟基脂肪酸)的形成是极少的。

[0086] 这些新序列允许从对应脂肪酸底物生产中链α-烯烃(特别是C_{7-11}α-烯烃)，如从C_{12}游离脂肪酸生产C_{11}α-烯烃。另外，这些序列可用于进一步鉴定编码具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶(包括C_{12}游离脂肪酸是优选底物的脱羧酶)的序列。

[0087] 本文鉴定的序列的变体(或突变体)可以是天然存在的，或者它们可以是(如使用基因工程技术)人造的。此类技术在本领域中是公知的，并且包括，例如但不限于，定点诱变、随机化学诱变、和标准克隆技术。其他示例性的诱变技术是使用现有序列的片段并以新的组合进行混合的重组技术，如DNA改组。

[0088] 本文特别设想了通过以下获得的变体核苷酸序列：筛选SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:7中所列的核苷酸序列间的改组文库，以及SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5中所列的核苷酸序列间的改组文库，用于编码具有期望生物学活性的重组多肽的重组核苷酸序列，所述生物学活性特别是脱羧酶活性，更特别是(特异性)中链游离脂肪酸脱羧酶活性，如C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性，甚至更优选地这些脱羧酶的优选底物是C_8-C_{12}游离脂肪酸。DNA改组的技术在本领域是公知的。对于示例性改组技术可以参考Stemmer(1994.Nature 370:389-391)。

[0089] 本文设想的编码具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶的核苷酸序列对于中链α-烯烃的重组生产特别有意义，所述生产例如通过在以下详细描述的重组宿主细胞中(过)表

达所述核酸序列而进行。

[0090] 重组宿主细胞

[0091] 本申请提供了能够产生中链α-烯烃的基因工程宿主细胞，其中所述宿主细胞的特征在于它们包含编码对C_8至C_{14}游离脂肪酸(优选对C_{12}游离脂肪酸)具有脱羧酶活性(如上文所述)的酶的重组核酸。例如，这些重组宿主细胞可以包含编码中链游离脂肪酸脱羧酶的异源核酸，或者它们可以过表达编码中链游离脂肪酸脱羧酶的内源核酸。在特定的实施方案中，重组宿主细胞包含重组核酸，该重组核酸包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10具有至少约70％或75％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％序列同一性并且编码对具有8-14的碳链长度的游离脂肪酸(优选对C_8-C_{12}游离脂肪酸，更优选对C_{12}游离脂肪酸)具有脱羧酶活性的酶的核苷酸序列。在特定的实施方案中，重组宿主细胞包含重组核酸，该重组核酸包含与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:3,或SEQ ID NO:5具有至少约70％或75％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％序列同一性并且编码对C_8-C_{14}游离脂肪酸(优选对C_8-C_{12}游离脂肪酸，更优选对C_{12}游离脂肪酸)具有优选活性的脱羧酶的核苷酸序列。在特定的实施方案中，重组宿主细胞包含重组核酸，所述重组核酸包含编码以下多肽，或所述多肽的功能性变体，特别是功能性片段的核苷酸序列，该多肽包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0092] 可以通过表达编码参与脂肪酸生物合成途径的酶的一种或多种重组核酸来进一步遗传修饰本文公开的基因工程宿主细胞。例如，可以进一步修饰重组宿主细胞以过表达编码参与内源脂肪酸生物合成途径的酶的核酸，或者可以通过将编码参与脂肪酸合成的酶的异源核酸导入宿主细胞来进一步修饰它们。当表达时，编码参与脂肪酸合成的酶的重组核酸赋予宿主细胞生产或过量生产脂肪酸的能力。

[0093] 可以修改脂肪酸生物合成途径中的每一步以生产或过量生产感兴趣的脂肪酸。例如，可以在宿主细胞中表达或过表达参与脂肪酸合成的已知基因以生产期望的游离脂肪酸，或减弱该已知基因以抑制非期望的脂肪酸的产生。

[0094] 例如，通过硫酯酶确保了从酰基-ACP开始的烃的生产，此后通过脱羧酶催化末端烯烃的生产。因此，参与脂肪酸合成的示例性的基因包括编码硫酯酶的基因。

[0095] 在优选的实施方案中，进一步基因工程化宿主细胞以表达或过表达硫酯酶来诱导或增加游离脂肪酸生产。脂肪酸底物的链长度由硫酯酶控制，并因此通过(过)表达合适的硫酯酶，可以获得具有期望的碳链长度的游离脂肪酸。表1中提供了硫酯酶的非限制性实例。优选地，中链脂肪酸(MCFA)特异性硫酯酶用于在根据本发明重组宿主细胞中(过)表达。

[0096] 表1:硫酯酶

[0097]

GenBank 登录号 (UniProtKB/Swiss-Prot)	来源生物体	基因	生产的

[0098]

			优先产物
AAC73596	大肠杆菌	*tesA* 不含前导序列	$C_{18:1}$
AAC73555	大肠杆菌	*tesB*	
AAA34215 (Q41635); AAC49001	加州月桂(*Umbellularia Californica)*	*fatB*	$C_{12:0}$
AAC49269 (Q39513)	萼距花(*Cuphea hookeriana*)	*fatB2*	$C_{8:0}-C_{10:0}$
AAC49269; AAC72881	萼距花	*fatB3*	$C_{14:0}-C_{16:0}$
AAC49151 (Q39473)	香樟 (*Cinnamonum camphorum*)	*fatB*	$C_{14:0}$
CAA85388	拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)	*fatB*	$C_{16:1}$
NP_189147; NP_193041	拟南芥	*fatA*	$C_{18:1}$
CAC39106	大豆慢生根瘤菌	*fatA*	$C_{18:1}$
AAC72883	萼距花	*fatA*	$C_{18:1}$
AAL79361	油葵(*Helianthus annus*)	*fatA1*	
JF338905	椰子 (*Cocos nucifera*)		$C_{12:0}$

[0099] 硫酯酶可以是天然存在于高等植物中的硫酯酶。高等植物中存在两种酰基-ACP硫酯酶家族:由FatA基因编码的“I类”酰基-ACP硫酯酶,其负责从酰基-ACP切割长链(例如C_{16}

和C_{18})不饱和脂肪酸，和由FatB基因编码的“II类”酰基-ACP硫酯酶，其对饱和脂肪酰基链有活性，并且其对于中链(C_8-C_{14})酰基-ACP可以是特异性的或者其可以对中链和长链脂肪酰基-ACP两者都有活性。MCFA-特异性且天然存在于植物中的，并因此适于在本文描述的重组宿主细胞中(过)表达的硫酯酶的非限制性实例是由FatB基因编码的硫酯酶，或例如在Voelker等人(1992 Science 257:72-74)和Jing等人(2011 Biochemistry 12:44)中描述的硫酯酶。硫酯酶也可以是例如Voelker等人(1994 Journal of Bacteriology 176:7320-7327)中描述的工程化的硫酯酶。

[0100] 取决于感兴趣的α-烯烃，可以诱导(通过将编码所述酶的异源核酸导入宿主细胞)、刺激(通过过表达编码所述酶的内源基因)或减弱(通过修饰编码所述酶的内源基因)硫酯酶的表达。

[0101] 在一些情况下，可通过表达或过表达使用C_{12}-ACP的硫酯酶(例如登录号Q41635和JF338905)并且减弱生产非C_{12}脂肪酸的硫酯酶来生产C_{12}游离脂肪酸。在其他实例中，可通过减弱生产非C_{14}脂肪酸的内源硫酯酶并且(过)表达使用C_{14}-ACP的硫酯酶(例如，登录号Q39473)来生产C_{14}游离脂肪酸。

[0102] 可使用本领域已知方法(例如通过细胞裂解后使用放射性前体、HPLC和GC-MS)来验证乙酰CoA、丙二酰CoA和游离脂肪酸过量生产。

[0103] 对于C_{11}α-烯烃的生产，优选通过导入以下的异源核酸来修饰宿主细胞：其编码具有对C_{12}酰基-ACP底物的优先水解酶活性的硫酯酶如Q41635或JF338905，和/或上调编码具有对C_{12}酰基-ACP的优先水解酶活性的内源基因，以及任选地下调编码生产非C_{12}脂肪酸的硫酯酶的内源基因。

[0104] 本文设想的宿主细胞中由脂肪酸酶生产的中链游离脂肪酸是本文所述脱羧酶的底物。

[0105] 因此，用于生产中链α-烯烃的特别优选的宿主细胞是包含以下的重组宿主细胞：

[0106] -编码具有对中链酰基-ACP底物的优先水解酶活性的硫酯酶的重组核酸；和

[0107] -编码中链游离脂肪酸脱羧酶的重组核酸。

[0108] 用于生产C_{11}α-烯烃的特别优选的宿主细胞是包含以下的重组宿主细胞：

[0109] -编码具有对C_{12}酰基-ACP底物的优先水解酶活性的重组核酸；和

[0110] -编码C_{12}游离脂肪酸脱羧酶的重组核酸。

[0111] 在特定实施方案中，游离脂肪酸脱羧酶是以下酶：其与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13具有至少约70％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％序列同一性，并且具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性，特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性。在特定实施方案中，脂肪酸脱羧酶是Sm46(SEQ ID NO:8)、Sm46-del29(SEQ ID NO:13)、Bs168(SEQ ID NO:4)或Aa162(SEQ ID NO:6)或其功能性变体，因为本文显示出这些酶的中链α-烯烃(特别是C_7-C_{11}α-烯烃，更特别是C_{11}α-烯烃)的特异性生产。因此，在特定的实施方案中，本申请提供了包含重组核酸的基因工程宿主细胞，所述重组核酸包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10具有至少约70％或75％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％序列同一性并且编码具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性(特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性)的酶的核苷酸序列。在进一步的特定实

施方案中，重组核酸包含与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约70％或75％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％序列同一性的核苷酸序列，并且编码C_8-C_{12}游离脂肪酸，更特别是C_{11}游离脂肪酸是其优选底物的具有脱羧酶活性的酶。在优选实施方案中，宿主细胞包含编码具有以下氨基酸序列的多肽的重组核酸，所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6或其功能性变体。在进一步的实施方案中，基因工程宿主细胞还包含编码硫酯酶的重组核酸，该硫酯酶具有对中链酰基-ACP底物(优选对C_8-C_{12}酰基-ACP底物，更优选对C_{12}酰基-ACP底物)的优先水解酶活性。

[0112] 在特定的实施方案中，当上述核苷酸序列是由本发明的宿主细胞内源表达时，想到的是，可以特异性地增加这些序列的表达，以确保商业上相关的中链α-烯烃生产。

[0113] 更特别地，在特定的实施方案中，选择宿主细胞以具有高内源性硫酯酶活性。选择具有特定特性的细胞的方法是本领域已知的。

[0114] 可以适当地转化和/或基因工程化以确保一种或多种描述的重组核酸的(过)表达的任何细胞可以用于本发明的上下文中。本文公开的宿主细胞可以是任何原核或真核生物或细胞。宿主细胞的非限制性实例包括植物细胞、细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞，和藻类细胞。在实施方案中，宿主细胞是基因工程细菌，或基因工程真菌(特别是酵母)，基因工程藻类，或基因工程植物细胞。

[0115] 优选地，宿主细胞是产油宿主细胞。例如，宿主细胞可以是产油细菌、产油真菌、产油酵母或产油藻类。产油酵母的非限制性实例包括Lipomyces starkeyi、圆红冬孢酵母(Rhodosporidium toruloides)、粘红酵母(Rhodotorula glutinis)和耶氏解脂酵母(Yarrowia lipolytica)。产油藻属的非限制性例子包括：葡萄藻属(Botryococcus)、角毛藻属(Chaetoceros)、小球藻属(Chlorella)、绿球藻属(Chlorococcum)、柱藻属(Cylindrotheca)、杜氏藻属(Dunaliella)、Fistulifera、等鞭金藻属(Isochrysis)、微拟球藻属(Nannochloropsis)、新绿藻属(Neochloris)、菱形藻属(nitzschia)、巴夫藻属(Pavlova)、栅藻属(Scenedesmus)、骨条藻属(Skeletonema)、裂丝藻属(Stichococcus)和周氏扁藻属(Tetraselmis)。

[0116] 因此，本文公开的基因工程宿主细胞包含编码本文公开的中链游离脂肪酸脱羧酶的重组核酸，以及任选地一种或多种编码脂肪酸酶(即参与脂肪酸合成的酶)的重组核酸。另外或替代地，可以抑制、降低或限制编码参与中链游离脂肪酸以外的脂肪酸生成的酶的一种或多种基因的表达。

[0117] 用于产生本文所述的基因工程宿主细胞的方法涉及标准的遗传修饰，对于本领域技术人员而言已经良好建立的方法是可用的。

[0118] 在一步或多步中经由设计和构建合适的载体并用这些载体转化宿主细胞来实现对宿主细胞基因工程化以含有编码本文所述的多肽或脂肪酸酶的重组核酸。

[0119] 可使用本领域已知的电穿孔和/或化学(如基于氯化钙或乙酸锂的)转化方法或根癌农杆菌介导的转化方法。

[0120] 本发明上下文中可在宿主细胞中提供的编码脱羧酶和/或脂肪酸酶的重组核酸通常含有置于一种或多种启动子和一种或多种终止子(两者在宿主细胞中均是有功能的)转录控制下的编码脱羧酶和/或脂肪酸酶的编码序列。

[0121] 启动子和终止子序列对于宿主细胞可以是天然的，或者对于宿主细胞可以是异源的。有用的启动子和终止子序列包括在它们的功能部分方面分别与宿主细胞天然的启动子和终止子序列的功能部分高度相同(即具有90％或更高、优选95％或更高、最优选99％或更高的同一性得分)的那些启动子和终止子序列，特别是当在宿主基因组中的特定位点处靶向重组核酸的插入时。使用天然(对于宿主)启动子和终止子以及它们各自的上游和下游侧翼区域可以允许将重组核酸靶向整合进宿主基因组的特定基因座处。

[0122] 另外或替代地，编码序列对宿主细胞可以是天然的，或者对于宿主细胞可以是异源的。

[0123] 多种载体对本领域技术人员是已知的，并且选择合适的载体是选择的问题。载体可以用特定的限制酶切割或用作环形DNA。

[0124] 本文教导的载体优选包含如本文所述的重组核酸(的组合)。特别地，载体包含如本文所述的多肽或脂肪酸酶的编码序列(的组合)和相关的启动子和终止子序列。载体可以含有用于线性化或片段化的各种类型的限制性位点。载体还可以含有骨架部分(如用于在大肠杆菌中复制)，许多骨架方便地获得自市售酵母或细菌载体。载体优选包含一个或多个选择标记基因盒。“选择标记基因”是编码转化细胞在选择性培养基中存活和/或生长所需的蛋白质的基因。典型的选择标记基因编码以下蛋白质：(a)赋予对抗生素或其他毒素如氯霉素、博莱霉素(来自印度斯坦链异壁菌(Streptoalloteichus hindustanus)的sh ble基因)、genetecin、蜜二糖酶(MEL5)、潮霉素(来自大肠杆菌的氨基糖苷类抗生素抗性基因)、氨苄青霉素、四环素或卡那霉素(Tn903的卡那霉素抗性基因)的抗性，(b)补充细胞的营养缺陷。营养缺陷的两个突出实例是氨基酸亮氨酸缺陷(例如LEU2基因)或尿嘧啶缺陷(例如URA3基因)。乳清苷-5’-磷酸脱羧酶阴性的细胞(ura3-)不能在缺乏尿嘧啶的培养基上生长。因此，功能性URA3基因可以用作具有尿嘧啶缺陷的细胞的标记物，并且可以在缺乏尿嘧啶的培养基上选择成功的转化体。仅功能性URA3基因转化的细胞能够合成尿嘧啶并在此类培养基上生长。如果野生型菌株不具有尿嘧啶缺陷(例如，东方伊萨酵母情况如此)，必须制备具有缺陷的营养缺陷型突变体，以便使用URA3作为菌株的选择标记物。实现这一点的方法在本领域中是公知的。选择标记物盒典型地还包括可操作地连接至选择标记基因并且可在宿主中操作的启动子和终止子序列。

[0125] 可以以已知的方式通过利用标记基因贡献的属性，或通过由插入的重组核酸贡献的其他特征(如生产α-烯烃的能力)来选择成功的转化体。还可以通过PCR或Southern分析以确认期望的插入和任选地缺失已经发生来进行筛选以确认拷贝数和以鉴定编码序列整合到宿主基因组中的位点。可使用本文别处所述的已知测定方法来确认通过插入的编码序列编码的多肽的活性(诸如α-烯烃生产活性)。

[0126] 本文还公开的是用于获得如本文所述的能够生产感兴趣的α-烯烃的基因工程宿主细胞的方法，该方法可以包括用编码本文教导的具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶、更特别地产生感兴趣的α-烯烃的脱羧酶的重组核酸，和任选的编码如本文教导的脂肪酸酶、更特别地参与能够产生感兴趣的α-烯烃的游离脂肪酸脱羧酶的底物合成的脂肪酸酶的一种或多种重组核酸转化宿主细胞。特别地，该方法可以包括以下步骤：

[0127] a)用编码如本文教导的具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶的重组核酸，以及任选的编码如本文教导的脂肪酸酶的一种或多种重组核酸转化宿主细胞；和

[0128] b)选择能够产生感兴趣的α-烯烃的宿主细胞。

[0129] 在特定的实施方案中，该方法还包括修饰所述宿主细胞以减少除感兴趣的α-烯烃以外的其它烯烃的内源生产。

[0130] 如上所述，本文设想诱导宿主细胞中中链α-烯烃生产和/或增加(一种或多种特定)中链α-烯烃的产量的不同遗传修饰。因此，本发明还涉及本文所述的基因工程宿主细胞在生产α-烯烃，更特别是中链α-烯烃中的用途。

[0131] 使用重组宿主细胞生产α-烯烃

[0132] 另一方面，本发明提供了生产中链α-烯烃，更特别地C_{11}α-烯烃的方法，所述方法包括提供如上所述的基因工程宿主细胞，并在培养基中培养所述基因工程宿主细胞以允许生产中链α-烯烃。更具体地，宿主细胞在适合确保表达或过表达本文设想的具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶以及任选的参与合成具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶的底物的一种或多种脂肪酸酶的条件下培养。

[0133] 在特定的实施方案中，宿主细胞确保α-烯烃生产(更具体地中链α-烯烃生产)速率，其足够高而是有工业价值的。实际上，本文公开的重组宿主细胞能够以有限的生产成本确保高产出。另外，它们能够生产期望碳链长度的α-烯烃。实际上，本文提供的脱羧酶优选具有针对中链游离脂肪酸(特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸，更特别是C_{12}游离脂肪酸)的底物偏好性。还有利的是，不需要的副产物例如羟基脂肪酸的产生是极小的。实际上，本文提供的多肽优选具有特异性脱羧酶活性。

[0134] 重组宿主细胞在适于由所述宿主细胞生产中链α-烯烃的条件下培养。更具体地，这意味着“足以允许”编码脱羧酶的重组核酸的“(过)表达的条件”，其意指允许宿主细胞(过量)生产本文所述的中链游离脂肪酸脱羧酶或脂肪酸酶的任何条件。合适的条件例如包括发酵条件。发酵条件可以包括许多参数，如温度范围、通气水平和培养基组成。这些条件各自单独和组合允许宿主细胞生长。为了确定条件是否足以允许(过)表达，可以培养宿主细胞例如约4、8、12、18、24、36或48小时。培养期间和/或之后，可以获得并分析样品以确认是否该条件允许(过)表达。例如，可以测试样品中的宿主细胞或宿主细胞在其中生长的培养基以鉴定所需产物的存在。当测试以鉴定所需产品的存在时，可以使用测定，例如但不限于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、TLC、HPLC、GC/FID、GC/MS、LC/MS、MS。

[0135] 示例性培养基包括肉汤或凝胶。微生物体通常在包含碳源的培养基中生长，所述碳源用于微生物体的生长。示例性的碳源包括可直接由微生物体代谢的碳水化合物，例如葡萄糖、果糖、纤维素等。另外，可以将酶添加到培养基中以促进碳源的动员(例如，将淀粉或纤维素解聚成可发酵的糖)以及随后的代谢。培养基可以根据具体菌株的需要任选地含有其他营养物质，包括无机氮源如氨或铵盐等以及矿物质等。

[0136] 其他生长条件例如温度，细胞密度等通常选择成提供经济的方法。在生长阶段和生产阶段的每一个期间的温度可以范围从培养基的冷冻温度以上至约50℃。

[0137] 本发明方法的培养步骤可以以好氧方式，以厌氧方式或基本上以厌氧方式进行。简言之，厌氧条件是指缺乏氧气的环境。基本上厌氧的条件包括例如培养，分批发酵或连续发酵，使得培养基中的溶解氧浓度保持在饱和度的0和10％之间。基本上厌氧的条件还包括在维持以低于1％氧气的气氛的密封室内，在液体培养基中或固体琼脂上生长或静息细胞。所述氧气百分比可以例如通过用N_2/CO_2混合物或其他合适的非氧气气体对培养物进行鼓泡

来维持。

[0138] 本文描述的方法的培养步骤可以连续地，分批地或以其某一组合进行。

[0139] 在其中光养藻类用作宿主细胞的特定的实施方案中，生产中链α-烯烃的方法可包括提供基因工程化以(过量)生产本文教导的中链α-烯烃的藻类，并且使用CO_2和阳光作为原料在光生物反应器中或在开放池系统中培养所述藻类。

[0140] 在某些实施方案中，适合于生产中链α-烯烃的条件可以进一步意味着在包含至少一种脂肪酸底物的培养基中培养宿主细胞，该底物通过包含于宿主细胞中的重组核酸编码的脱羧酶转化为α-烯烃。

[0141] 优选地，脂肪酸底物是饱和游离脂肪酸底物。还优选地，脂肪酸底物是直链游离脂肪酸底物。还优选地，脂肪酸底物是偶数C_8-C_{14}游离脂肪酸底物(即游离C_8、C_{10}、C_{12}或C_{14}游离脂肪酸底物或其任意组合)，优选地偶数C_8-C_{12}游离脂肪酸底物，更优选地C_{12}游离脂肪酸底物。

[0142] 本文特别意图是生产中链α-烯烃，更特别是C_{11}α-烯烃。可以使用本文所述的为了生产中链α-烯烃(更特别是C_{11}α-烯烃)而特别修饰的重组宿主细胞来获得中链α-烯烃(更特别是C_{11}α-烯烃)。

[0143] 在进一步的实施方案中，提供了用于生产中链α-烯烃(更特别是C_{11}α-烯烃)的方法，所述方法除了以上详述的步骤之外，还包括从宿主细胞或培养基中回收α-烯烃的步骤。可以通过本领域技术人员已知的方法诸如通过使用裂解(溶菌，lysis)方法、萃取、离子交换树脂、电渗析、纳滤等进行合适的纯化。

[0144] 因此，提供了用于生产中链α-烯烃(更特别是C_{11}α-烯烃)的方法，该方法包括以下步骤：

[0145] (i)提供如本文所述的基因工程宿主细胞；

[0146] (ii)在适合生产中链α-烯烃的条件下在培养基中培养宿主细胞，和

[0147] (iii)从宿主细胞或培养基中回收α-烯烃。

[0148] 在其中产油酵母用作宿主细胞的特定的实施方案中，生产中链α-烯烃的方法可包括以下步骤：

[0149] (i)提供如本文教导的经基因工程以(过量)生产中链α-烯烃的产油酵母；

[0150] (ii)在发酵罐中培养所述产油酵母；和

[0151] (iii)从产油酵母或培养基中回收α-烯烃。

[0152] 在其中光养藻类用作宿主细胞的特定的实施方案中，生产中链α-烯烃的方法可包括以下步骤：

[0153] (i)提供如本文教导的经基因工程以(过)生产中链α-烯烃的藻类；

[0154] (ii)使用CO_2和阳光作为原料在光生物反应器或开放池系统中培养所述藻类；和

[0155] (iii)从藻类或培养基中回收α-烯烃。

[0156] 在特定的实施方案中，在允许α-烯烃分泌到环境中的条件下培养宿主细胞。

[0157] 通常，在本文提供的生产中链α-烯烃的方法中，宿主细胞不分泌由所述宿主细胞表达的脱羧酶并且α-烯烃在宿主细胞内生产。然而，在特定的实施方案中或对于特定应用，确保本文提供的宿主细胞分泌脱羧酶是感兴趣的。在分泌到其环境中后酶是有活性的情况下，这可以是感兴趣的。为此，可将分泌信号序列可操作地连接至编码游离脂肪酸脱羧酶的

核酸。就此而言，“可操作地连接”表示编码分泌信号肽的序列和编码待分泌多肽的序列在框内或相内(in phase)连接，使得在表达时，信号肽促进与其如此连接的多肽的分泌。

[0158] 多肽

[0159] 本文还公开的是具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性的酶。在特定的实施方案中，这些肽由本文描述的核酸和核苷酸序列编码。因此，本文公开的是由包含核苷酸序列的核酸编码的多肽，所述核苷酸序列与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10具有至少约70％或75％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％的序列同一性，所述多肽具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性，特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性，优选地C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性。实际上，在特定的实施方案中可通过在宿主细胞中重组表达所述核酸来获得具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性、C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性、优选地C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性的酶。用于重组生产多肽的方法是本领域已知的。

[0160] 在特定的实施方案中，作为具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性(特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性，更特别是C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性)的酶的多肽包括具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性，特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性，更特别是C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性的具有包含以下、基本由以下组成或由以下组成的氨基酸序列的多肽和这些多肽的变体，包括活性片段：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13。优选的多肽是由以下氨基酸序列组成的多肽：SEQ ID NO:4(即Bs168)、SEQ ID NO:6(即Aa162)、SEQ ID NO:8(即Sm46)或SEQ ID NO:13(即Sm46-de129)以及这些多肽的功能性变体。实际上，SEQ ID NO:8及其SEQ ID NO:13的活性片段是本文提供的新多肽，其具有中链游离脂肪酸脱羧酶活性，特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性，更特别是C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性。

[0161] 在特定的实施方案中，多肽具有脱羧酶活性和对中链游离脂肪酸(特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸，更特别是C_{12}游离脂肪酸)的优选活性，即这些脱羧酶的优选底物是中链游离脂肪酸，特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸，更特别是C_{12}游离脂肪酸。在特定的实施方案中，这些酶与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:6具有至少约80％、85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％的序列同一性。优选的酶包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6及其功能性变体或由其组成，所述功能性变体诸如但不限于维持包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6或由其组成的酶活性的活性片段或其变体。

[0162] 如本文关于脱羧酶所用的，“优选底物”指对于脱羧酶对其具有最高活性的游离脂肪酸，即当与多个游离脂肪酸反应时，当底物是优选游离脂肪酸底物时该脱羧酶具有最高活性。可以通过测量当脱羧酶酸与游离脂肪酸底物反应时对应α-烯烃产物浓度来确定脱羧酶的活性。可以通过本领域公知的方法，如通过GC/MS分析来测量反应或培养基中α-烯烃浓度。因此可以通过计算测试的每种游离脂肪酸底物到对应α-烯烃产物的转化率来确定脱羧酶的底物偏好性，其中优选底物是具有最高转化率的游离脂肪酸底物。还可以通过计算每种测试的游离脂肪酸底物的转化率来确定脱羧酶的底物偏好性，其中优选底物是具有最高转化率的游离脂肪酸底物。本文中“转化率”或“底物转化率”意指对消耗的底物(例如脂肪酸底物浓度(如以mM计))和生产的反应产物(如α-烯烃浓度(例如以mM计)以及潜在副产物(例如羟基脂肪酸浓度(如以mM))之间的比率进行量化。特定反应产物的转化率或转化百分

率可计算为：消耗的底物(例如脂肪酸底物浓度(如以mM计))和生产的特定反应产物(例如α-烯烃浓度(如以mM计))之间的比率。

[0163] 本文还提供的是本文描述多肽的变体多肽。理解，本文描述的变体多肽可具有保守或非必需的氨基酸取代，其对多肽功能没有实质性的影响。可如Bowie等人(1990)(Science 247:1306 1310)中所描述的那样来确定特定取代是否会被容忍(即，将不利地影响期望的生物学性质)。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)，具有酸性侧链的氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)，具有不带电的极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)，具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有beta-分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)，和具有芳香侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0164] 另外的多肽变体是其中另外的氨基酸与多肽融合的那些，另外的氨基酸诸如分泌信号序列或促进多肽纯化的序列。

[0165] 还其他多肽变体还包括功能性或活性片段，所述片段包含至少约5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100或150个连续的氨基酸，并且其保留与Bs168、Aa162或Sm46相同的生物学功能(如保留烯烃生产活性，更具体地针对中链游离脂肪酸(更优选对C_{12}FFA底物)改善的活性)。示例性的功能或活性片段包括但不限于本文所述多肽的截短形式，其保留Bs168、Aa162或Sm46的脱羧酶活性。因此这些功能性或活性片段至少保留多肽的脱羧酶催化结构域，即参与脱羧酶反应的多肽部分。此类截短形式的具体实例是具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的多肽(由SEQ ID NO:10的核苷酸序列编码)，该多肽是Sm46的功能性片段，其中缺失了29个N-末端氨基酸。

[0166] 本文所述多肽的功能性变体保留了多肽的脱羧酶活性。因此，功能性变体可以包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成：所述氨基酸序列在脱羧酶催化结构域中与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13具有至少约70％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％的序列同一性。多肽变体可具有与SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13基本上相同的氨基酸序列，或者它们可以具有与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13具有至少约70％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％的序列同一性的氨基酸序列。多肽变体(特别是活性或功能性片段)可具有氨基酸序列，其中SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13的40个或更少、优选35个或更少，更优选30个或更少如29个或更少的N末端氨基酸已缺失。

[0167] 本文公开的多肽具有游离脂肪酸脱羧酶活性，特别是对C_8-C_{14}游离脂肪酸、更特别是对偶数C_8-C_{14}游离脂肪酸如对C_8、C_{10}、C_{12}和/或C_{14}游离脂肪酸的脱羧酶活性，甚至更特别是C_8-C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性如C_{12}游离脂肪酸脱羧酶活性。事实上，如实验部分所示，已经显示了$OleT_{JE}$，Bs168，Aa162、Sm46或Sm46-del29的脱羧酶活性，更特别是对C_{12}、C_{14}和C_{16}游离脂肪酸的脱羧酶活性。Sm46、Sm46-del29、Aa162和Bs168酶显示出对C_{12}游离脂肪酸更高的活性，导致更高的C_{11}α-烯烃生产。

[0168] 可以使用常规方法测定多肽的脱羧酶活性。例如，可以在允许多肽发挥功能的条

件下将多肽与底物(特别是游离脂肪酸底物)接触。可以测量底物水平的降低或者α-烯烃水平的增加以测定脱羧酶或烯烃生产活性。

[0169] 本文所述的多肽可以进一步催化脂肪酸的羟基化(特别是脂肪酸的α-和β-羟基化)作为副反应。优选的多肽是脱羧活性是主要活性的那些,即其具有特异性脱羧酶活性。在优选的实施方案中,游离脂肪底物通过多肽向羟基脂肪酸(特别是α-和β-羟基脂肪酸)的转化相较于该脂肪酸底物向对应的α-烯烃的转化仅是微不足道的(如低于总产物的25%、优选低于20%、更优选低于10%)。在实施方案中,羟基脂肪酸的转化百分率低于25%,优选低于20%,更优选低于10%。羟基脂肪酸的转化百分率可计算为:消耗的底物(例如脂肪酸底物浓度(如以mM计))与产生的羟基脂肪酸(例如羟基脂肪酸浓度(如以mM计))之间的比率。具有特异性脱羧酶活性的多肽的具体实例是Sm46或其功能性变体,包括其活性片段,如Sm46的截短形式,其中29个N末端氨基酸是缺失的(即由SEQ ID NO:10的核苷酸序列编码的多肽或SEQ ID NO:13的多肽)。

[0170] 本文提供的多肽可以通过在宿主细胞中重组表达生产。在特定的实施方案中,多肽通过宿主细胞分泌。

[0171] α-烯烃的生产

[0172] 本文还提供的是本文公开的中链游离脂肪酸脱羧酶在生产中链α-烯烃,更特别是C_{11}α-烯烃中的用途。

[0173] 本文描述的一些方法涉及使用本文描述的(纯化的)中链游离脂肪酸脱羧酶和游离脂肪酸底物生产中链α-烯烃,更特别是C_{11}α-烯烃。因此,本文公开的是用于生产中链α-烯烃(更特别是C_{11}α-烯烃)的方法,其包括将中链游离脂肪酸脱羧酶与合适的游离脂肪酸底物相接触以便生产中链α-烯烃,更特别是C_{11}α-烯烃。

[0174] 在特定的实施方案中,中链游离脂肪酸脱羧酶是具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13的氨基酸序列的多肽或所述多肽的功能性变体,包括功能性或活性片段。在特定的实施方案中,中链游离脂肪酸脱羧酶是多肽,其具有与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:13具有至少约70%,优选至少约80%,更优选至少约85%、90%或95%,甚至更优选至少约96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,酶对中链游离脂肪酸(更优选对C_8-C_{12}游离脂肪酸)具有优选活性。最特别地,酶是对C_{12}游离脂肪酸具有优选活性并具有与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6具有至少约85%、90%或95%,甚至更优选至少约96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的脱羧酶。在特定的实施方案中,酶与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6具有95%的氨基酸序列同一性。

[0175] 例如,宿主细胞可以是基因工程化的以过表达本文公开的中链游离脂肪酸脱羧酶。可以在足以允许(过)表达脱羧酶的条件下培养重组宿主细胞。然后可以使用已知方法生成无细胞提取物。例如,可以使用去污剂或通过超声来裂解宿主细胞。可以使用已知方法纯化过表达的多肽,或者无细胞提取物本身可用于烯烃生产。还可以如别处所述对宿主细胞基因工程化以过表达本文公开的中链游离脂肪酸脱羧酶和以将所述多肽分泌到生长培养基中。然后可以将分泌的多肽与生长培养基分离,并任选使用已知方法进行纯化,而不需要获得无细胞提取物。

[0176] 接下来,可以将游离脂肪酸底物添加到无细胞提取物或(纯化的)酶并在允许游离

脂肪酸底物向α-烯烃的转化的条件下保持。然后可以使用已知技术分离和纯化α-烯烃。

[0177] 可以使用描述的方法从具有那些特定的特征的游离脂肪酸底物生产具有特定分支模式、饱和水平和碳链长度的烯烃。例如，脂肪酸底物可以是不饱和的游离脂肪酸底物(如单不饱和游离脂肪酸底物)，或饱和的游离脂肪酸底物。脂肪酸底物可以是直链游离脂肪酸底物、支链游离脂肪酸底物，或包含环状部分(cyclic moiety)的游离脂肪酸底物。

[0178] 优选地，脂肪酸底物是饱和的游离脂肪酸底物。还优选地，脂肪酸底物是直链游离脂肪酸底物。还优选地，脂肪酸底物是偶数C_8-C_{14}游离脂肪酸底物(即C_8、C_{10}、C_{12}和/或C_{14}游离脂肪酸底物)，更优选地偶数C_8-C_{12}游离脂肪酸底物，最优选地C_{12}脂肪酸底物。

[0179] 本文特别意图是C_{11}α-烯烃的生产。可以使用本文描述的C_{12}游离脂肪酸脱羧酶从C_{12}游离脂肪酸获得C_{11}α-烯烃。如实验部分所示，Sm46、Sm46-del29、Bs168和Aa162对C_{12}游离脂肪酸底物特异性地显示脱羧酶活性，即C_{12}游离脂肪酸底物对于Sm46、Sm46-del29、Bs168和Aa162而言是用于α-烯烃生产的优选底物。因此，在特定的实施方案中，本发明涉及用于C_{11}α-烯烃生产的方法，该方法包括接触由核酸编码的C_{12}游离脂肪酸脱羧酶，所述核酸包含与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约70％或75％，优选至少约80％，更优选至少约85％、90％或95％，甚至更优选至少约96％、97％、98％或99％序列同一性的核苷酸序列。在实施方案中，所述方法包括将多肽或所述多肽的功能性变体与C_{12}游离脂肪酸底物、优选十二烷酸(或月桂酸)相接触，所述多肽具有包含由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6或由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6组成的氨基酸序列，优选地，多肽由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6组成。

[0180] 本文还提供的是可由本文公开的方法获得的中链α-烯烃，更特别是C_{11}α-烯烃。

[0181] 中链α-烯烃

[0182] 本文还公开的是由本文描述的方法生产的中链α-烯烃，和包含中链α-烯烃(更特别是C_{11}α-烯烃)的组合物。本文描述的方法有利地导致均质α-烯烃的生产，其中生产的α-烯烃具有均一的碳链长度。这些方法因此比传统方法更有效，所述传统方法导致产生具有不同碳链长度的α-烯烃的混合物并且需要分离不同的α-烯烃用于后续反应。

[0183] 生产后的处理

[0184] 生产的α-烯烃，更特别是中链α-烯烃(如C_{11}α-烯烃)可用作或转化为燃料，特别是生物燃料。这些α-烯烃，更特别是中链α-烯烃(如C_{11}α-烯烃)还可用作用于生产化学品或个人护理添加剂(如聚合物、表面活性剂、塑料、纺织品、溶剂、粘合剂等)的起始材料。它们也可以用作后续反应(如氢化和/或低聚反应)的原料以制备其他产品。

[0185] 本发明的另一个方面涉及生产聚-α-烯烃(PAO)的方法，所述方法包括：

[0186] a)根据本文公开的方法生产α-烯烃，更特别是中链α-烯烃；

[0187] b)将步骤a)中生产的α-烯烃低聚；和任选地

[0188] c)氢化步骤b)中生产的低聚物。

[0189] 在特定的实施方案中，提供了用于生产C_{33}PAO的方法，其包括：

[0190] a)根据本文公开的方法生产C_{11}α-烯烃；

[0191] b)将步骤a)中生产的C_{11}α-烯烃三聚；和任选地

[0192] c)氢化步骤b)中生产的三聚物。

[0193] 催化剂存在下中链α-烯烃的低聚是本领域公知的。可以用于低聚步骤的催化剂例如但不限于，用于阳离子低聚的$AlCl_3$、BF_3、BF_3络合物，和基于金属的催化剂如茂金属(metallocene)。

[0194] 在低聚步骤后，将可能存在于低聚物中的残余不饱和度通过催化氢化而饱和，导致具有一个或多个侧链的饱和脂族烃。

[0195] 通过本文描述方法获得的低聚物通称为聚-α-烯烃(PAO)。本文所述的PAO生产方法有利地导致均质生产明确限定碳链长度的PAO。因此，本申请还提供了可通过本文描述PAO生产方法获得的PAO的组合物，其特征在于至少50％，优选至少85％或90％，更优选至少95％如96％、97％、98％或甚至99％的PAO具有明确限定的碳链长度，如C_{33}PAO。聚-α-烯烃的此类均质组合物以前尚未披露。

[0196] 本文提供的方法允许获得具有明确限定粘度的基础油(base oil)。可通过本文描述方法获得的PAO(更特别是C_{33}PAO)可用作基础油，其显示非常吸引人的粘度指数，其中粘度随碳数量的增加而增加。这些基础油可与添加剂和任选的其它基础油一起用于配制润滑油。特别是，具有约30个碳原子数(更特别是33个碳原子数)的PAO对于汽车润滑油而言是优选的。

[0197] 因此，在另一方面，本发明涉及本文描述的中链游离脂肪酸脱羧酶和重组宿主细胞在工业生产润滑油中的用途。

[0198] 本文还提供的是包含聚-α-烯烃的润滑油，更特别是如下的包含聚-α-烯烃的润滑油：其含有聚-α-烯烃的更均质的组合物，更特别是高浓度的明确限定长度的聚-烯烃，如可通过如本文描述的方法获得的那些。实际上，本发明允许生产基于生物来源的中链α-烯烃生产的润滑油。更具体地，本发明允许提供包含聚-α-烯烃的润滑油，其中至少50％，优选至少85％或90％，更优选至少95％如96％、97％、98％或甚至99％的所述聚-α-烯烃是明确限定碳链长度的聚-α-烯烃，如C_{33}聚-α-烯烃。包含聚-α-烯烃的此类均质组合物的润滑油以前尚未公开。

[0199] 本文还公开的是用于生产烷烃的方法，所述方法包括(a)根据本文公开的方法生产α-烯烃，更特别是中链α-烯烃；和(b)氢化步骤(a)中获得的α-烯烃以生产烷烃。

[0200] 现在将通过以下非限制性实施例进一步说明本发明。

[0201] 实施例

[0202] 实施例1：通过$OleT_{JE}$、Sm46、Bs168和Aa162生产C_{11}α-烯烃

[0203] 材料和方法

[0204] 分子克隆

[0205] 通过标准分子生物学技术，将编码$OleT_{JE}$(SEQ ID NO:1)、Sm46(SEQ ID NO:3)、Bs168(SEQ ID NO:5)和Aa162(SEQ ID NO:7)的基因克隆入pET28a质粒(Novagen，图2)的NdeI/BamHI位点处。

[0206] 蛋白质过表达和纯化

[0207] 在37℃于添加50μg/ml卡那霉素的LB培养基中将携带重组质粒或空PET28a质粒(对照)的大肠杆菌BL21(DE3)细胞(Novagen)培养几个周期以确保最佳生长状态，然后在37℃接种(1:100比率)入含有50μg/ml卡那霉素，1mM硫胺素，10％甘油和稀有盐溶液(6750mg/l $FeCl_3$，500mg/l $ZnCl_2$，500mg/l $CoCl_2$，500mg/l Na_2MoO_4，250mg/l $CaCl_2$，465mg/l

$CuSO_4$,和125mg/l H_3BO_3)的50mL新鲜Terrific Broth培养基中。细胞在37℃生长3至4h直到600nm处的光密度(OD_{600})到达0.6至0.8,在此时间点添加0.2或0.4mM异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和0.5mMδ-氨基乙酰丙酸,然后在16℃培养18h。

[0208] 然后,通过离心(在4℃)回收细胞培养物并且在含有0.1M NaCl的1.5mL50mM,pH 7.5的Tris缓冲液中重悬。通过超声破裂重悬的细胞培养物并且在13,000x g离心30min(4℃)。收集上清液并且在含有0.1M NaCl的1.5mL 50mM,pH 7.5的Tris缓冲液中重悬团粒用于进一步分析。使用与5μL 4x上样缓冲液混合的15μL上清液或团粒溶液,运行SDS凝胶以检查基因的表达(图3)。

[0209] 根据制造商的说明书,使用Pierce BCA试剂盒定量上清液中总蛋白质的量。

[0210] 体外酶促测定法

[0211] 通过将溶于DMSO的终浓度为0.2mM(1:100稀释)或1mM(1:10稀释)的脂肪酸底物和500μM H_2O_2添加到上清液来评价体外烯烃生物合成。反应混合物在28℃温育2-3h,或者使用50μL 10M的HCl在t=0,15,30,60和120min处停止以用于动态测试。然后添加终浓度为0.2mM(1:100稀释)的C_{16}脂肪酸作为内部标准品(内标物)。用等体积的乙酸乙酯萃取各反应条件的300μL反应混合物,并且通过气相色谱/质谱(GC/MS)来分析有机相的烃类。同时,测试不同浓度(0、0.05mM、0.1mM、0.2mM和0.5mM)的十一碳烯以产生标准曲线。

[0212] 结果

[0213] 图4显示了所有测试的酶$OleT_{JE}$、Sm46、Bs168和Aa162的脂肪酸脱羧酶活性。Bs168和Aa162显示出对C_{12}脂肪酸底物的偏好性,因而特异性生产C_{11}α-烯烃。在后面的实验中,Sm46也显示出具有对C_{12}脂肪酸底物的底物偏好性(数据未示出)。

[0214] 实施例2:通过来自Staphylococcus Massiliensis的截短Sm46生产α-烯烃

[0215] 实施例1的构建体pET28b-Sm46在大肠杆菌BL21(DE3)中确实显示出差的表达,其在亚克隆到另一个表达载体pCWori或优化表达条件后并未有所改善。为了最大化表达水平和评估Sm46作为以C_{12}作为优选底物的脱羧酶的潜力,设计了密码子优化的(用于在大肠杆菌中表达)Sm46的截短版本Sm46-del29,其缺失掉N末端29个氨基酸,并且测试了重组截短Sm46-del29的活性。

[0216] 材料和方法

[0217] 材料

[0218] 脂肪酸底物和末端烯可信标准品(authentic standard)购自TCI(中国上海)。抗体获得自Solar-Bio(中国北京)。其他化学品购自Sigma Aldrich(St.Louis,MO,美国)或Ameresco(Solon,OH,美国)。分子克隆试剂盒,如E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep试剂盒和Wizard SV Gel and PCR Clean-up System分别购自OMEGA Bio-Tek(中国济南)和Promega(Madison,WI,美国)。寡核苷酸和密码子优化的基因由Genewiz(中国苏州)合成。Pfu DNA聚合酶和所有限制性核酸内切酶均购自Takara(中国大连)。用于蛋白质纯化的Ni-NTA树脂来自Qiagen(Valencia,CA,美国);Millipore Amicon超离心过滤器(Billerica,MA,美国)和PD-10脱盐柱来自GE Healthcare(Piscataway,NJ,美国)。

[0219] 分子克隆Sm46-del29基因

[0220] 使用Pfu DNA聚合酶从pET28b-Sm46的初始构建体(参见实施例1)PCR扩增截短基因的1,275bp片段Sm46-del29,并随后在Nde I/Xho I限制性位点处亚克隆到pET28b载体

中。所用的引物序列如下:GTCCATATGGCAAAAAAGCTGCCTAAAGTG(Sm46-del29-F,正向引物,SEQ ID NO:11)和GTACTCGAGTTATTTGCGGGCAACACGCGG(Sm46-del29-R,反向引物,SEQ ID NO:12)。所有重组质粒构建体通过DNA测序(Sangon Biotech,中国上海)确认。序列验证后,使用该质粒转化大肠杆菌菌株BL21(DE3)用于蛋白质表达。

[0221] Sm46-del29的异源表达和纯化

[0222] 用重组pET28b-Sm46-del29质粒转化的大肠杆菌BL21(DE3)细胞在含有50μg/ml卡那霉素的LB培养基中以220rpm震荡在37℃过夜生长。过夜培养物用作种子培养物以接种(1:100稀释)到1至3升含4%甘油、1mM硫胺素、微量金属和相应抗生素的修改的Terrific Broth中。然后细胞在37℃生长3至4h直至600nm处的光密度(OD600)到达约0.6,在此时间点补充δ-氨基乙酰丙酸(0.5mM终浓度)并且通过添加0.2mM异丙基β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)来诱导Sm46-del29的表达。然后在18℃降低的温度下进一步培养细胞24h,随后通过于6000rpm,4℃离心收获。将细胞团粒在-80℃下冷冻直至需要。

[0223] 通过微小改动的Liu等人(2014 Biotechnol.Biofuels 7:28)描述的方法进行His-标签化蛋白质的纯化。所有蛋白质纯化步骤在4℃下进行。具体地,解冻细胞团粒并通过涡旋振荡重悬于40ml裂解缓冲液中(50mM NaH_2PO_4,300mM NaCl,10%甘油和10mM咪唑,pH 8.0)。通过超声破碎细胞后,将细胞裂解物以12,000×g离心30分钟以除去细胞碎片。向澄清了的细胞裂解物添加1ml的Ni-NTA树脂并在4℃轻柔混合1h。然后将浆液上样到空柱上,并用约100ml洗涤缓冲液(50mM NaH_2PO_4,300mM NaCl,10%甘油和20mM咪唑,pH 8.0)洗涤直到在流液(flow-through)中不能检测到蛋白质。用洗脱缓冲液(50mM NaH_2PO_4,300mM NaCl,10%甘油和250mM咪唑,pH 8.0)洗脱结合的靶蛋白。将洗脱液汇集并用Amicon超离心过滤器浓缩,并在PD-10柱上将缓冲液交换为存储缓冲液(50mM NaH_2PO_4,300mM NaCl 10%甘油,pH 7.4)。将最终纯化的蛋白质在液氮中快速冷冻,并保存在-80℃以备后用。

[0224] 紫外可见光谱--Sm46-del29的光谱表征

[0225] 在Cary 60紫外可见分光光度计(Varian,UK)上进行Sm46-del29的UV-可见光谱性质的分析。通过将一氧化碳气体缓慢吹泡(bubbling)进铁的P450溶液,并随后用连二亚硫酸钠还原蛋白质来制备Sm46-del29的亚铁-CO络合物(ferrous-CO complex)。通过在加入连二亚硫酸钠之前和之后记录相应的光谱来获得CO结合减少的酶的差异谱(Omura and Sato 1964.J Biol Chem 239:2379-2385,Amaya et al.2016 J Inorg Biochem.158:11-16)。

[0226] 体外酶促测定法

[0227] 在28℃下进行脂肪酸脱羧测定达2h,所述测定含有200μl储存缓冲液中的1.0μM Sm46-del29,200μM脂肪酸底物(从C_8至C_{20}),220μM H_2O_2。通过添加20μl的10M HCl来淬灭该反应。添加作为内部标准品的十七烷酸并且通过200μl乙酸乙酯来提取该混合物。提取后,收集有机相并且如下所述通过气相色谱分析。

[0228] 气相色谱(GC)

[0229] 烃和脂肪酸样品的GC分析方法是改编自Guan等人(2011 J Chromatogr A 1218:8289-8293)的方法。在配备毛细管柱HP-INNOWAX(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,美国;交联聚乙烯甘油,i.d.0.25μm膜厚度,30m乘0.25mm)的Agilent 7890B气相色谱仪上进行分析。氦气流速设定为每分钟1毫升。烘箱温度最初控制在40℃下4分钟,然后以每分

钟10℃的速率增加到250℃，并保持5min。在不分流注射条件下，注射温度设定为280℃，其中注射体积为1μl。如Liu等人(2014 Biotechnol.Biofuels 7:28)中所述通过分析已知可信脂肪酸(C_{10}-C_{20})、1-烯(C_9-C_{19})和1-十七烷酸标准品来确定脂肪酸和烯间的响应因子(response factors)。

[0230] 结果

[0231] Sm46的截短变体(即Sm46-del29)具有脱羧酶活性并且对于α-烯烃生产，在测试的脂肪酸底物中，对C_{12}游离脂肪酸显示出底物偏好性(图6)。Sm46-del29也能使C_{10}游离脂肪酸脱羧，但技术问题(由于挥发性所致)阻碍了形成的C_9α-烯烃的检测。

[0232] 实施例3：通过Sm46-del29、Bs168和Aa162生产α-烯烃和羟基脂肪酸

[0233] 将重组表达和纯化的来自实施例1的Bs168和Aa162以及实施例2的Sm46-del29与C_{14}脂肪酸反应并且分析了脱羧反应产物(C_{13}α-烯烃)和羟化反应产物(α-OH-C_{14}脂肪酸和β-OH-C_{14}脂肪酸)。

[0234] 所有测试的酶都能使肉豆蔻酸(C_{14})脱羧，但也催化了作为副反应的肉豆蔻酸的α-和β-羟化。脂肪酸脱羧是所有测试酶的主要反应，但Sm46-del29形成较少羟基脂肪酸，这说明这些酶具有特异性脱羧酶活性。

序列表
<110> 道达尔炼油化学公司
中国科学院青岛生物能源与过程研究所
(QIBEBT)
<120> α-烯烃的生产
<130> TOTAL-207-PCT
<150> EP15174554.4
<151> 2015-06-30
<160> 13
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 1269
<212> DNA
<213> Jeotgalicoccus sp.
<400> 1
atggcaacac ttaagaggga taagggctta gataatactt tgaaagtatt aaagcaaggt 60
tatctttaca caacaaatca gagaaatcgt ctaaacacat cagttttcca aactaaagca 120
ctcggtggta aaccattcgt agttgtgact ggtaaggaag gcgctgaaat gttctacaac 180
aatgatgttg ttcaacgtga aggcatgtta ccaaaacgta tcgttaatac gctttttggt 240
aaaggtgcaa tccatacggt agatggtaaa aaacacgtag acagaaaagc attgttcatg 300
agcttgatga ctgaaggtaa cttgaattat gtacgagaat taacgcgtac attatggcat 360
gcgaacacac aacgtatgga aagtatggat gaggtaaata tttaccgtga atctatcgta 420
ctacttacaa aagtaggaac acgttgggca ggcgttcaag caccacctga agatatcgaa 480
agaatcgcaa cagacatgga catcatgatc gattcattta gagcacttgg tggtgccttt 540
aaaggttaca aggcatcaaa agaagcacgt cgtcgtgttg aagattggtt agaagaacaa 600
attattgaga ctcgtaaagg gaatattcat ccaccagaag gtacagcact ttacgaattt 660
gcacattggg aagactactt aggtaaccca atggactcaa gaacttgtgc gattgactta 720
atgaacacat tccgcccatt aatcgcaatc aacagattcg tttcattcgg tttacacgcg 780
atgaacgaaa acccaatcac acgtgaaaaa attaaatcag aacctgacta tgcatataaa 840
ttcgctcaag aagttcgtcg ttactatcca ttcgttccat tccttccagg taaagcgaaa 900
gtagacatcg acttccaagg cgttacaatt cctgcaggtg taggtcttgc attagatgtt 960
tatggtacaa cgcatgatga atcactttgg gacgatccaa atgaattccg cccagaaaga 1020
ttcgaaactt gggacggatc accatttgac cttattccac aaggtggtgg agattactgg 1080
acaaatcacc gttgtgcagg tgaatggatc acagtaatca tcatggaaga aacaatgaaa 1140
tactttgcag aaaaaataac ttatgatgtt ccagaacaag atttagaagt ggacttaaac 1200
agtatcccag gatacgttaa gagtggcttt gtaatcaaaa atgttcgcga agttgtagac 1260
agaacataa 1269
<210> 2

<211> 422

<212> PRT

<213> Jeotgalicoccus sp.

<400> 2

Met Ala Thr Leu Lys Arg Asp Lys Gly Leu Asp Asn Thr Leu Lys Val
1 5 10 15

Leu Lys Gln Gly Tyr Leu Tyr Thr Thr Asn Gln Arg Asn Arg Leu Asn
20 25 30

Thr Ser Val Phe Gln Thr Lys Ala Leu Gly Gly Lys Pro Phe Val Val
35 40 45

Val Thr Gly Lys Glu Gly Ala Glu Met Phe Tyr Asn Asn Asp Val Val
50 55 60

Gln Arg Glu Gly Met Leu Pro Lys Arg Ile Val Asn Thr Leu Phe Gly
65 70 75 80

Lys Gly Ala Ile His Thr Val Asp Gly Lys Lys His Val Asp Arg Lys
85 90 95

Ala Leu Phe Met Ser Leu Met Thr Glu Gly Asn Leu Asn Tyr Val Arg
100 105 110

Glu Leu Thr Arg Thr Leu Trp His Ala Asn Thr Gln Arg Met Glu Ser
115 120 125

Met Asp Glu Val Asn Ile Tyr Arg Glu Ser Ile Val Leu Leu Thr Lys
130 135 140

Val Gly Thr Arg Trp Ala Gly Val Gln Ala Pro Pro Glu Asp Ile Glu
145 150 155 160

Arg Ile Ala Thr Asp Met Asp Ile Met Ile Asp Ser Phe Arg Ala Leu
165 170 175

Gly Gly Ala Phe Lys Gly Tyr Lys Ala Ser Lys Glu Ala Arg Arg Arg
180 185 190

Val Glu Asp Trp Leu Glu Glu Gln Ile Ile Glu Thr Arg Lys Gly Asn
195 200 205

Ile His Pro Pro Glu Gly Thr Ala Leu Tyr Glu Phe Ala His Trp Glu
210 215 220

Asp Tyr Leu Gly Asn Pro Met Asp Ser Arg Thr Cys Ala Ile Asp Leu
225 230 235 240

Met Asn Thr Phe Arg Pro Leu Ile Ala Ile Asn Arg Phe Val Ser Phe
245 250 255

Gly Leu His Ala Met Asn Glu Asn Pro Ile Thr Arg Glu Lys Ile Lys
260 265 270

Ser Glu Pro Asp Tyr Ala Tyr Lys Phe Ala Gln Glu Val Arg Arg Tyr

275 280 285
Tyr Pro Phe Val Pro Phe Leu Pro Gly Lys Ala Lys Val Asp Ile Asp
290 295 300
Phe Gln Gly Val Thr Ile Pro Ala Gly Val Gly Leu Ala Leu Asp Val
305 310 315 320
Tyr Gly Thr Thr His Asp Glu Ser Leu Trp Asp Asp Pro Asn Glu Phe
325 330 335
Arg Pro Glu Arg Phe Glu Thr Trp Asp Gly Ser Pro Phe Asp Leu Ile
340 345 350
Pro Gln Gly Gly Gly Asp Tyr Trp Thr Asn His Arg Cys Ala Gly Glu
355 360 365
Trp Ile Thr Val Ile Ile Met Glu Glu Thr Met Lys Tyr Phe Ala Glu
370 375 380
Lys Ile Thr Tyr Asp Val Pro Glu Gln Asp Leu Glu Val Asp Leu Asn
385 390 395 400
Ser Ile Pro Gly Tyr Val Lys Ser Gly Phe Val Ile Lys Asn Val Arg
405 410 415
Glu Val Val Asp Arg Thr
420

<210> 3
<211> 1254
<212> DNA
<213> 枯草芽孢杆菌
<400> 3
atgaatgagc agattccaca tgacaaaagt ctcgataaca gtctgacact gctgaaggaa 60
gggtatttat ttattaaaaa cagaacagag cgctacaatt cagatctgtt tcaggcccgt 120
ttgttgggaa aaaactttat ttgcatgact ggcgctgagg cggcgaaggt gttttatgat 180
acggatcgat tccagcggca gaacgctttg cctaagcggg tgcagaaatc gctgtttggt 240
gttaatgcga ttcagggaat ggatggcagc gcgcatatcc atcggaagat gctttttctg 300
tcattgatga caccgccgca tcaaaaacgt ttggctgagt tgatgacaga ggagtggaaa 360
gcagcagtca caagatggga gaaggcagat gaggttgtgt tatttgaaga agcaaaagaa 420
atcctgtgcc gggtagcgtg ctattgggca ggtgttccgt tgaaggaaac ggaagtcaaa 480
gagagagcgg atgacttcat tgacatggtc gacgcgttcg gtgctgtggg accgcggcat 540
tggaaaggaa gaagagcaag gccgcgtgcg gaagagtgga ttgaagtcat gattgaagat 600
gctcgtgccg gcttgctgaa aacgacttcc ggaacagcgc tgcatgaaat ggcttttcac 660
acacaagaag atggaagcca gctggattcc cgcatggcag ccattgagct gattaatgta 720
ctgcggccta ttgtcgccat ttcttacttt ctggtgtttt cagctttggc gcttcatgag 780
catccgaagt ataaggaatg gctgcggtct ggaaacagcc gggaaagaga aatgtttgtg 840
caggaggtcc gcagatatta tccgttcggc ccgtttttag gggcgcttgt caaaaaagat 900

tttgtatgga ataactgtga gtttaagaag ggcacatcgg tgctgcttga tttatatgga 960
acgaaccacg accctcgtct atgggatcat cccgatgaat tccggccgga acgatttgcg 1020
gagcgggaag aaaatctgtt tgatatgatt cctcaaggcg gggggcacgc cgagaaaggc 1080
caccgctgtc caggggaagg cattacaatt gaagtcatga aagcgagcct ggatttcctc 1140
gtccatcaga ttgaatacga tgttccggaa caatcactgc attacagtct cgccagaatg 1200
ccatcattgc ctgaaagcgg cttcgtaatg agcggaatca gacgaaaaag ttaa 1254

<210> 4
<211> 417
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌
<400> 4

Met Asn Glu Gln Ile Pro His Asp Lys Ser Leu Asp Asn Ser Leu Thr
1 5 10 15
Leu Leu Lys Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Lys Asn Arg Thr Glu Arg Tyr
20 25 30
Asn Ser Asp Leu Phe Gln Ala Arg Leu Leu Gly Lys Asn Phe Ile Cys
35 40 45
Met Thr Gly Ala Glu Ala Ala Lys Val Phe Tyr Asp Thr Asp Arg Phe
50 55 60
Gln Arg Gln Asn Ala Leu Pro Lys Arg Val Gln Lys Ser Leu Phe Gly
65 70 75 80
Val Asn Ala Ile Gln Gly Met Asp Gly Ser Ala His Ile His Arg Lys
85 90 95
Met Leu Phe Leu Ser Leu Met Thr Pro Pro His Gln Lys Arg Leu Ala
100 105 110
Glu Leu Met Thr Glu Glu Trp Lys Ala Ala Val Thr Arg Trp Glu Lys
115 120 125
Ala Asp Glu Val Val Leu Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Leu Cys Arg
130 135 140
Val Ala Cys Tyr Trp Ala Gly Val Pro Leu Lys Glu Thr Glu Val Lys
145 150 155 160
Glu Arg Ala Asp Asp Phe Ile Asp Met Val Asp Ala Phe Gly Ala Val
165 170 175
Gly Pro Arg His Trp Lys Gly Arg Arg Ala Arg Pro Arg Ala Glu Glu
180 185 190
Trp Ile Glu Val Met Ile Glu Asp Ala Arg Ala Gly Leu Leu Lys Thr
195 200 205
Thr Ser Gly Thr Ala Leu His Glu Met Ala Phe His Thr Gln Glu Asp
210 215 220

Gly Ser Gln Leu Asp Ser Arg Met Ala Ala Ile Glu Leu Ile Asn Val
225 230 235 240
Leu Arg Pro Ile Val Ala Ile Ser Tyr Phe Leu Val Phe Ser Ala Leu
245 250 255
Ala Leu His Glu His Pro Lys Tyr Lys Glu Trp Leu Arg Ser Gly Asn
260 265 270
Ser Arg Glu Arg Glu Met Phe Val Gln Glu Val Arg Arg Tyr Tyr Pro
275 280 285
Phe Gly Pro Phe Leu Gly Ala Leu Val Lys Lys Asp Phe Val Trp Asn
290 295 300
Asn Cys Glu Phe Lys Lys Gly Thr Ser Val Leu Leu Asp Leu Tyr Gly
305 310 315 320
Thr Asn His Asp Pro Arg Leu Trp Asp His Pro Asp Glu Phe Arg Pro
325 330 335
Glu Arg Phe Ala Glu Arg Glu Glu Asn Leu Phe Asp Met Ile Pro Gln
340 345 350
Gly Gly Gly His Ala Glu Lys Gly His Arg Cys Pro Gly Glu Gly Ile
355 360 365
Thr Ile Glu Val Met Lys Ala Ser Leu Asp Phe Leu Val His Gln Ile
370 375 380
Glu Tyr Asp Val Pro Glu Gln Ser Leu His Tyr Ser Leu Ala Arg Met
385 390 395 400
Pro Ser Leu Pro Glu Ser Gly Phe Val Met Ser Gly Ile Arg Arg Lys
405 410 415
Ser

<210> 5
<211> 1311
<212> DNA
<213> 酸热脂环酸杆菌
<400> 5

atgaatcagt gcattccgcg cgatcgaacg tttgacagca gcctcgcctt gataaaggaa 60
gggtatttgt tcatcaaaaa tcgagttgat caataccaat ccgacatctt cgaagcgcgt 120
ctcctcctgg aaaatgtggt atgcatgcac ggagcagagg cggcaaaact cttctacaat 180
acggaactgt ttcaacgcca aggtgctctt ccgaagcggg ttcaaaagac gcttttcgga 240
gaaaacgcca tccaaaccct tgatggtaca gcgcatcttc accgtaagca gctgtttctg 300
tcgttgttga cgccggatca agaaaaatcc cttgcgacgc tcgcgacaac gcagtggagg 360
gagtgcgcga aggtatggga gaacgcggat agggttgtgc tatttgaaga ggccaagcgg 420
atgttatgtc ggatcgcatg tcagtggacc ggggttccgc tggatgaatc ggaggtgtca 480
aagcgggccg acgattttgg ggcgatggtg gacgcgtttg gagcggttgg tccgcgacat 540

tggaaaggcc ggagagctcg ggccagagca gaagcatggc tccggcagat gattgacgag 600
atacgaatcg gattgcgtag tgtagatgaa catacgccgc tccatgtggt ggccttttgg 660
cgtgacgtga atggaaacct cttggatgct cagatggttg caatcgagtt aatcaatctg 720
ctacgaccca tcgtagctat ttctactttc atcacgtttt cagccctggc cctgcacgaa 780
cacccgacat ggcgagaccg attgaaggcg cgcaatgaag cggatatcga gatgtttgtg 840
caagaggttc gtcgctacta tccgttcgcg ccatttctcg gtgccagagt gaaaaaggat 900
tttgtgtgga ggggatacga atttaaaaga gggacccttg tgttgctgga tgtgtatgga 960
acccatcatg atgcccgcct ctgggattcc ccaaatgagt ttcgacccga acgattcatg 1020
agaaaaacag ttgggccgtt tgatttgatt cctcaaggtg gaggggactc tcacaccggt 1080
catcgttgcc ctggtgaagg cgccaccatc gagattatga aggcgagcgt ggattttctg 1140
gttaaccaaa ttgacttcga agtgcccgct caggacctca gttacagatt ggatgttatg 1200
ccgacgttgc caaagagcgg atttgtgctg acccatgttc atcggaagtt catagcttct 1260
ccgaccattg ctacacctaa tggttctgaa gctcttcctt cagaagtcta a 1311

<210> 6
<211> 436
<212> PRT
<213> 酸热脂环酸杆菌
<400> 6

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

165 170 175
Gly Pro Arg His Trp Lys Gly Arg Arg Ala Arg Ala Arg Ala Glu Ala
180 185 190
Trp Leu Arg Gln Met Ile Asp Glu Ile Arg Ile Gly Leu Arg Ser Val
195 200 205
Asp Glu His Thr Pro Leu His Val Val Ala Phe Trp Arg Asp Val Asn
210 215 220
Gly Asn Leu Leu Asp Ala Gln Met Val Ala Ile Glu Leu Ile Asn Leu
225 230 235 240
Leu Arg Pro Ile Val Ala Ile Ser Thr Phe Ile Thr Phe Ser Ala Leu
245 250 255
Ala Leu His Glu His Pro Thr Trp Arg Asp Arg Leu Lys Ala Arg Asn
260 265 270
Glu Ala Asp Ile Glu Met Phe Val Gln Glu Val Arg Arg Tyr Tyr Pro
275 280 285
Phe Ala Pro Phe Leu Gly Ala Arg Val Lys Lys Asp Phe Val Trp Arg
290 295 300
Gly Tyr Glu Phe Lys Arg Gly Thr Leu Val Leu Leu Asp Val Tyr Gly
305 310 315 320
Thr His His Asp Ala Arg Leu Trp Asp Ser Pro Asn Glu Phe Arg Pro
325 330 335
Glu Arg Phe Met Arg Lys Thr Val Gly Pro Phe Asp Leu Ile Pro Gln
340 345 350
Gly Gly Gly Asp Ser His Thr Gly His Arg Cys Pro Gly Glu Gly Ala
355 360 365
Thr Ile Glu Ile Met Lys Ala Ser Val Asp Phe Leu Val Asn Gln Ile
370 375 380
Asp Phe Glu Val Pro Ala Gln Asp Leu Ser Tyr Arg Leu Asp Val Met
385 390 395 400
Pro Thr Leu Pro Lys Ser Gly Phe Val Leu Thr His Val His Arg Lys
405 410 415
Phe Ile Ala Ser Pro Thr Ile Ala Thr Pro Asn Gly Ser Glu Ala Leu
420 425 430
Pro Ser Glu Val
435

<210> 7
<211> 1362
<212> DNA
<213> Staphylococcus massiliensis

<400> 7

atgtttgtag attcgatact tgtgttaaga ttaaatttat taaaaacggg tatacaatta 60
gaaatgaaaa atgggggaat caaagtggca aagaaactac ctaaggttaa aggcctagat 120
aacacagtag acattattaa aggcgggtat acatacgtac ctggcaaatt agaagaattt 180
gattctaaag catttgaagt acgcgcatta ggcggtaaga aaattgctgt tatgagcggt 240
aaagaagcgg cagaaatttt ctatgataat gaaaaaatgg aaagacaagg tactttacca 300
aaacgtatcg taaacacttt atttggtaaa ggtgcaattc atacaactgc tggtaagaag 360
cacgttgacc gtaaagcttt atttatgtca cttatgacag atgaaaatct taactactta 420
cgtgaattaa cacgtaatta ttggttcatg aatactgaac gtatgcaaag catggataaa 480
gttaacgtat ataacgaatc aatttatatg ttaactaaaa tcggcttccg ttgggctggt 540
atcatccaaa cgcctgaaga agcagaacaa aatgcgaaag acatggatac tatgattaac 600
tcattcgtat ctttaggttc agcttacaaa ggttataaga aagctaaaaa agcacgtaaa 660
cgtgttgaag atttcttaga aaaacaaatt atcgatgtgc gtaaaggtaa attacaccct 720
gaagaaggta ctgcgttata cgaattcgcg cattgggaag atttaaacga taacccaatg 780
gattctcact tatgtgcagt agacttaatg aacgttgtgc gcccattagc tgcaatcaac 840
cgtttcatca gctatggtgt taaagtatta atcgaattcg atcaagaaaa agaaaaatta 900
cgtcttgaaa ataatgaaga ctatgcgtat aaattcgctc aagaagtacg tcgtatcttc 960
ccattcgtac catacttacc aggtagagca gctgttgatt tagaatatga cggctacaaa 1020
atccctgcag gtatgatgac agcattagat gtttatggta cgacacatga tgaagattta 1080
tgggaaaacc cagaccaatt caatcctaac cgttttgata actgggacgg tagcccattc 1140
gacttaattc cacaaggtgg cggtgacttc tatacgaacc acagatgtgc tggtgagtgg 1200
atcacagtta tcattatgga agaaacaatg aaatatttcg cgaataagat tgaatttgat 1260
gtaccgtctc aagatttatc agttaagctt gataaattac caggtaacgt aacaagcggt 1320
acaatcatta gtaatgtacg tccacgtgtt gcgcgtaaat aa 1362

<210> 8

<211> 453

<212> PRT

<213> Staphylococcus massiliensis

<400> 8

Met Phe Val Asp Ser Ile Leu Val Leu Arg Leu Asn Leu Leu Lys Thr
1 5 10 15
Gly Ile Gln Leu Glu Met Lys Asn Gly Gly Ile Lys Val Ala Lys Lys
20 25 30
Leu Pro Lys Val Lys Gly Leu Asp Asn Thr Val Asp Ile Ile Lys Gly
35 40 45
Gly Tyr Thr Tyr Val Pro Gly Lys Leu Glu Glu Phe Asp Ser Lys Ala
50 55 60
Phe Glu Val Arg Ala Leu Gly Gly Lys Lys Ile Ala Val Met Ser Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ala Ala Glu Ile Phe Tyr Asp Asn Glu Lys Met Glu Arg Gln
85 90 95
Gly Thr Leu Pro Lys Arg Ile Val Asn Thr Leu Phe Gly Lys Gly Ala
100 105 110
Ile His Thr Thr Ala Gly Lys Lys His Val Asp Arg Lys Ala Leu Phe
115 120 125
Met Ser Leu Met Thr Asp Glu Asn Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Leu Thr
130 135 140
Arg Asn Tyr Trp Phe Met Asn Thr Glu Arg Met Gln Ser Met Asp Lys
145 150 155 160
Val Asn Val Tyr Asn Glu Ser Ile Tyr Met Leu Thr Lys Ile Gly Phe
165 170 175
Arg Trp Ala Gly Ile Ile Gln Thr Pro Glu Glu Ala Glu Gln Asn Ala
180 185 190
Lys Asp Met Asp Thr Met Ile Asn Ser Phe Val Ser Leu Gly Ser Ala
195 200 205
Tyr Lys Gly Tyr Lys Lys Ala Lys Lys Ala Arg Lys Arg Val Glu Asp
210 215 220
Phe Leu Glu Lys Gln Ile Ile Asp Val Arg Lys Gly Lys Leu His Pro
225 230 235 240
Glu Glu Gly Thr Ala Leu Tyr Glu Phe Ala His Trp Glu Asp Leu Asn
245 250 255
Asp Asn Pro Met Asp Ser His Leu Cys Ala Val Asp Leu Met Asn Val
260 265 270
Val Arg Pro Leu Ala Ala Ile Asn Arg Phe Ile Ser Tyr Gly Val Lys
275 280 285
Val Leu Ile Glu Phe Asp Gln Glu Lys Glu Lys Leu Arg Leu Glu Asn
290 295 300
Asn Glu Asp Tyr Ala Tyr Lys Phe Ala Gln Glu Val Arg Arg Ile Phe
305 310 315 320
Pro Phe Val Pro Tyr Leu Pro Gly Arg Ala Ala Val Asp Leu Glu Tyr
325 330 335
Asp Gly Tyr Lys Ile Pro Ala Gly Met Met Thr Ala Leu Asp Val Tyr
340 345 350
Gly Thr Thr His Asp Glu Asp Leu Trp Glu Asn Pro Asp Gln Phe Asn
355 360 365
Pro Asn Arg Phe Asp Asn Trp Asp Gly Ser Pro Phe Asp Leu Ile Pro
370 375 380
Gln Gly Gly Gly Asp Phe Tyr Thr Asn His Arg Cys Ala Gly Glu Trp

385 390 395 400
Ile Thr Val Ile Ile Met Glu Glu Thr Met Lys Tyr Phe Ala Asn Lys
405 410 415
Ile Glu Phe Asp Val Pro Ser Gln Asp Leu Ser Val Lys Leu Asp Lys
420 425 430
Leu Pro Gly Asn Val Thr Ser Gly Thr Ile Ile Ser Asn Val Arg Pro
435 440 445
Arg Val Ala Arg Lys
450

<210> 9
<211> 1359
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 密码子优化的编码Sm46的核苷酸序列
<400> 9
ttcgtggata gcattctggt tctgcgcctg aacctgctga agacaggcat ccagctggag 60
atgaagaacg gtggcatcaa agtggcaaaa aagctgccta aagtgaaagg tctggacaac 120
accgtggaca tcatcaaggg tggctatacc tacgtgcctg gcaaactgga ggagttcgac 180
agcaaagcat tcgaagtgcg cgccctgggt ggcaagaaga tcgcagtgat gagcggcaag 240
gaagccgccg agatttttta tgataacgaa aaaatggagc gtcagggtac cctgccgaag 300
cgcatcgtga acacactgtt cggtaaaggc gccattcata ccaccgccgg caagaaacat 360
gtggatcgca aggcactgtt catgagtctg atgaccgatg aaaatttaaa ttatctgcgc 420
gaactgacac gcaactattg gtttatgaat acagaacgca tgcagagcat ggataaagtg 480
aatgtgtaca atgaaagcat ttatatgctg accaaaattg gcttccgctg ggccggtatc 540
attcagaccc ctgaagaggc cgagcagaat gccaaagaca tggacaccat gatcaacagc 600
tttgtgagcc tgggcagcgc ctacaagggt tacaaaaaag ccaagaaagc ccgcaagcgc 660
gtggaagatt ttctggagaa acaaattatc gacgttcgta aaggcaaact gcatccggag 720
gaaggtaccg ccctgtacga attcgcccat tgggaagacc tgaacgataa cccgatggac 780
agccatctgt gcgccgttga tctgatgaac gttgttcgcc cgctggcagc aattaaccgc 840
ttcattagct acggcgttaa agtgctgatc gaattcgacc aggaaaaaga aaagctgcgc 900
ctggagaaca acgaggacta cgcctacaag ttcgcacagg aagtgcgccg tatctttccg 960
ttcgtgcctt acttaccggg tcgcgccgcc gtggatctgg agtatgatgg ctataagatc 1020
ccggccggta tgatgaccgc cctggatgtt tacggtacca cacacgatga ggatctgtgg 1080
gagaatccgg atcagttcaa cccgaatcgt tttgataact gggacggcag tccgtttgat 1140
ctgattccgc agggcggtgg cgatttctac accaatcatc gttgcgccgg cgagtggatc 1200
accgtgatta ttatggaaga aacaatgaaa tactttgcca acaaaattga attcgatgtg 1260
ccgagtcagg acctgagcgt taaactggac aaactgcctg gcaacgtgac cagcggtacc 1320
atcattagca acgtgcgtcc gcgtgttgcc cgcaaataa 1359

<210> 10
<211> 1275
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 密码子优化的编码Sm46-del29的核苷酸序列
<400> 10
gcaaaaaagc tgcctaaagt gaaaggtctg gacaacaccg tggacatcat caagggtggc 60
tatacctacg tgcctggcaa actggaggag ttcgacagca aagcattcga agtgcgcgcc 120
ctgggtggca agaagatcgc agtgatgagc ggcaaggaag ccgccgagat tttttatgat 180
aacgaaaaaa tggagcgtca gggtaccctg ccgaagcgca tcgtgaacac actgttcggt 240
aaaggcgcca ttcataccac cgccggcaag aaacatgtgg atcgcaaggc actgttcatg 300
agtctgatga ccgatgaaaa tttaaattat ctgcgcgaac tgacacgcaa ctattggttt 360
atgaatacag aacgcatgca gagcatggat aaagtgaatg tgtacaatga aagcatttat 420
atgctgacca aaattggctt ccgctgggcc ggtatcattc agacccctga agaggccgag 480
cagaatgcca aagacatgga caccatgatc aacagctttg tgagcctggg cagcgcctac 540
aagggttaca aaaaagccaa gaaagcccgc aagcgcgtgg aagattttct ggagaaacaa 600
attatcgacg ttcgtaaagg caaactgcat ccggaggaag gtaccgccct gtacgaattc 660
gcccattggg aagacctgaa cgataacccg atggacagcc atctgtgcgc cgttgatctg 720
atgaacgttg ttcgcccgct ggcagcaatt aaccgcttca ttagctacgg cgttaaagtg 780
ctgatcgaat tcgaccagga aaaagaaaag ctgcgcctgg agaacaacga ggactacgcc 840
tacaagttcg cacaggaagt gcgccgtatc tttccgttcg tgccttactt accgggtcgc 900
gccgccgtgg atctggagta tgatggctat aagatcccgg ccggtatgat gaccgccctg 960
gatgtttacg gtaccacaca cgatgaggat ctgtgggaga atccggatca gttcaacccg 1020
aatcgttttg ataactggga cggcagtccg tttgatctga ttccgcaggg cggtggcgat 1080
ttctacacca atcatcgttg cgccggcgag tggatcaccg tgattattat ggaagaaaca 1140
atgaaatact ttgccaacaa aattgaattc gatgtgccga gtcaggacct gagcgttaaa 1200
ctggacaaac tgcctggcaa cgtgaccagc ggtaccatca ttagcaacgt gcgtccgcgt 1260
gttgcccgca aataa 1275
<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 11
gtccatatgg caaaaaagct gcctaaagtg 30
<210> 12
<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 12
gtactcgagt tatttgcggg caacacgcgg 30
<210> 13
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Sm46-del29
<400> 13
Ala Lys Lys Leu Pro Lys Val Lys Gly Leu Asp Asn Thr Val Asp Ile
1 5 10 15
Ile Lys Gly Gly Tyr Thr Tyr Val Pro Gly Lys Leu Glu Glu Phe Asp
20 25 30
Ser Lys Ala Phe Glu Val Arg Ala Leu Gly Gly Lys Lys Ile Ala Val
35 40 45
Met Ser Gly Lys Glu Ala Ala Glu Ile Phe Tyr Asp Asn Glu Lys Met
50 55 60
Glu Arg Gln Gly Thr Leu Pro Lys Arg Ile Val Asn Thr Leu Phe Gly
65 70 75 80
Lys Gly Ala Ile His Thr Thr Ala Gly Lys Lys His Val Asp Arg Lys
85 90 95
Ala Leu Phe Met Ser Leu Met Thr Asp Glu Asn Leu Asn Tyr Leu Arg
100 105 110
Glu Leu Thr Arg Asn Tyr Trp Phe Met Asn Thr Glu Arg Met Gln Ser
115 120 125
Met Asp Lys Val Asn Val Tyr Asn Glu Ser Ile Tyr Met Leu Thr Lys
130 135 140
Ile Gly Phe Arg Trp Ala Gly Ile Ile Gln Thr Pro Glu Glu Ala Glu
145 150 155 160
Gln Asn Ala Lys Asp Met Asp Thr Met Ile Asn Ser Phe Val Ser Leu
165 170 175
Gly Ser Ala Tyr Lys Gly Tyr Lys Lys Ala Lys Lys Ala Arg Lys Arg
180 185 190
Val Glu Asp Phe Leu Glu Lys Gln Ile Ile Asp Val Arg Lys Gly Lys
195 200 205

Leu His Pro Glu Glu Gly Thr Ala Leu Tyr Glu Phe Ala His Trp Glu
210 215 220
Asp Leu Asn Asp Asn Pro Met Asp Ser His Leu Cys Ala Val Asp Leu
225 230 235 240
Met Asn Val Val Arg Pro Leu Ala Ala Ile Asn Arg Phe Ile Ser Tyr
245 250 255
Gly Val Lys Val Leu Ile Glu Phe Asp Gln Glu Lys Glu Lys Leu Arg
260 265 270
Leu Glu Asn Asn Glu Asp Tyr Ala Tyr Lys Phe Ala Gln Glu Val Arg
275 280 285
Arg Ile Phe Pro Phe Val Pro Tyr Leu Pro Gly Arg Ala Ala Val Asp
290 295 300
Leu Glu Tyr Asp Gly Tyr Lys Ile Pro Ala Gly Met Met Thr Ala Leu
305 310 315 320
Asp Val Tyr Gly Thr Thr His Asp Glu Asp Leu Trp Glu Asn Pro Asp
325 330 335
Gln Phe Asn Pro Asn Arg Phe Asp Asn Trp Asp Gly Ser Pro Phe Asp
340 345 350
Leu Ile Pro Gln Gly Gly Gly Asp Phe Tyr Thr Asn His Arg Cys Ala
355 360 365
Gly Glu Trp Ile Thr Val Ile Ile Met Glu Glu Thr Met Lys Tyr Phe
370 375 380
Ala Asn Lys Ile Glu Phe Asp Val Pro Ser Gln Asp Leu Ser Val Lys
385 390 395 400
Leu Asp Lys Leu Pro Gly Asn Val Thr Ser Gly Thr Ile Ile Ser Asn
405 410 415
Val Arg Pro Arg Val Ala Arg Lys
420

A) SEQ ID NO: 1: Jeotgalicoccus sp. ATCC 8456 末端烯烃形成脂肪酸脱羧酶基因，完整 cds

ATGGCAACACTTAAGAGGGATAAGGGCTTAGATAATACTTTGAAAGTATTAAAGCAAGGTTATC
TTTACACAACAAATCAGAGAAATCGTCTAAACACATCAGTTTTCCAAACTAAAGCACTCGGTGG
TAAACCATTCGTAGTTGTGACTGGTAAGGAAGGCGCTGAAATGTTCTACAACAATGATGTTGTT
CAACGTGAAGGCATGTTACCAAAACGTATCGTTAATACGCTTTTTGGTAAAGGTGCAATCCATA
CGGTAGATGGTAAAAAACACGTAGACAGAAAAGCATTGTTCATGAGCTTGATGACTGAAGGTAA
CTTGAATTATGTACGAGAATTAACGCGTACATTATGGCATGCGAACACACAACGTATGGAAAGT
ATGGATGAGGTAAATATTTACCGTGAATCTATCGTACTACTTACAAAAGTAGGAACACGTTGGG
CAGGCGTTCAAGCACCACCTGAAGATATCGAAAGAATCGCAACAGACATGGACATCATGATCGA
TTCATTTAGAGCACTTGGTGGTGCCTTTAAAGGTTACAAGGCATCAAAAGAAGCACGTCGTCGT
GTTGAAGATTGGTTAGAAGAACAAATTATTGAGACTCGTAAAGGGAATATTCATCCACCAGAAG
GTACAGCACTTTACGAATTTGCACATTGGGAAGACTACTTAGGTAACCCAATGGACTCAAGAAC
TTGTGCGATTGACTTAATGAACACATTCCGCCCATTAATCGCAATCAACAGATTCGTTTCATTC
GGTTTACACGCGATGAACGAAAACCCAATCACACGTGAAAAAATTAAATCAGAACCTGACTATG
CATATAAATTCGCTCAAGAAGTTCGTCGTTACTATCCATTCGTTCCATTCCTTCCAGGTAAAGC
GAAAGTAGACATCGACTTCCAAGGCGTTACAATTCCTGCAGGTGTAGGTCTTGCATTAGATGTT
TATGGTACAACGCATGATGAATCACTTTGGGACGATCCAAATGAATTCCGCCCAGAAAGATTCG
AAACTTGGGACGGATCACCATTTGACCTTATTCCACAAGGTGGTGGAGATTACTGGACAAATCA
CCGTTGTGCAGGTGAATGGATCACAGTAATCATCATGGAAGAAACAATGAAATACTTTGCAGAA
AAAATAACTTATGATGTTCCAGAACAAGATTTAGAAGTGGACTTAAACAGTATCCCAGGATACG
TTAAGAGTGGCTTTGTAATCAAAAATGTTCGCGAAGTTGTAGACAGAACATAA

B) SEQ ID NO:2

MATLKRDKGLDNTLKVLKQGYLYTTNQRNRLNTSVFQTKALGGKPFVVVTGKEGAEMFYNNDVV
QREGMLPKRIVNTLFGKGAIHTVDGKKHVDRKALFMSLMTEGNLNYVRELTRTLWHANTQRMES
MDEVNIYRESIVLLTKVGTRWAGVQAPPEDIERIATDMDIMIDSFRALGGAFKGYKASKEARRR
VEDWLEEQIIETRKGNIHPPEGTALYEFAHWEDYLGNPMDSRTCAIDLMNTFRPLIAINRFVSF
GLHAMNENPITREKIKSEPDYAYKFAQEVRRYYPFVPFLPGKAKVDIDFQGVTIPAGVGLALDV
YGTTHDESLWDDPNEFRPERFETWDGSPFDLIPQGGGDYWTNHRCAGEWITVIIMEETMKYFAE
KITYDVPEQDLEVDLNSIPGYVKSGFVIKNVREVVDRT

图1

C) SEQ ID NO:3：枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株 168 染色体，完整基因组

ATGAATGAGCAGATTCCACATGACAAAAGTCTCGATAACAGTCTGACACTGCTGAAGGAAGGGT
ATTTATTTATTAAAAACAGAACAGAGCGCTACAATTCAGATCTGTTTCAGGCCCGTTTGTTGGG
AAAAAACTTTATTTGCATGACTGGCGCTGAGGCGGCGAAGGTGTTTTATGATACGGATCGATTC
CAGCGGCAGAACGCTTTGCCTAAGCGGGTGCAGAAATCGCTGTTTGGTGTTAATGCGATTCAGG
GAATGGATGGCAGCGCGCATATCCATCGGAAGATGCTTTTTCTGTCATTGATGACACCGCCGCA
TCAAAAACGTTTGGCTGAGTTGATGACAGAGGAGTGGAAAGCAGCAGTCACAAGATGGGAGAAG
GCAGATGAGGTTGTGTTATTTGAAGAAGCAAAAGAAATCCTGTGCCGGGTAGCGTGCTATTGGG
CAGGTGTTCCGTTGAAGGAAACGGAAGTCAAAGAGAGAGCGGATGACTTCATTGACATGGTCGA
CGCGTTCGGTGCTGTGGGACCGCGGCATTGGAAAGGAAGAAGAGCAAGGCCGCGTGCGGAAGAG
TGGATTGAAGTCATGATTGAAGATGCTCGTGCCGGCTTGCTGAAAACGACTTCCGGAACAGCGC
TGCATGAAATGGCTTTTCACACACAAGAAGATGGAAGCCAGCTGGATTCCCGCATGGCAGCCAT
TGAGCTGATTAATGTACTGCGGCCTATTGTCGCCATTTCTTACTTTCTGGTGTTTTCAGCTTTG
GCGCTTCATGAGCATCCGAAGTATAAGGAATGGCTGCGGTCTGGAAACAGCCGGGAAAGAGAAA
TGTTTGTGCAGGAGGTCCGCAGATATTATCCGTTCGGCCCGTTTTTAGGGGCGCTTGTCAAAAA
AGATTTTGTATGGAATAACTGTGAGTTTAAGAAGGGCACATCGGTGCTGCTTGATTTATATGGA
ACGAACCACGACCCTCGTCTATGGGATCATCCCGATGAATTCCGGCCGGAACGATTTGCGGAGC
GGGAAGAAAATCTGTTTGATATGATTCCTCAAGGCGGGGGGCACGCCGAGAAAGGCCACCGCTG
TCCAGGGGAAGGCATTACAATTGAAGTCATGAAAGCGAGCCTGGATTTCCTCGTCCATCAGATT
GAATACGATGTTCCGGAACAATCACTGCATTACAGTCTCGCCAGAATGCCATCATTGCCTGAAA
GCGGCTTCGTAATGAGCGGAATCAGACGAAAAAGTTAA

D) SEQ ID NO:4

MNEQIPHDKSLDNSLTLLKEGYLFIKNRTERYNSDLFQARLLGKNFICMTGAEAAKVFYDTDRF
QRQNALFKRVQKSLFGVNAIQGMDGSAHIHRKMLFLSLMTPPHQKRLAELMTEEWKAAVTRWEK
ADEVVLFEEAKEILCRVACYWAGVPLKETEVKERADDFIDMVDAFGAVGPRHWKGRRARPRAEE
WIEVMIEDARAGLLKTTSGTALHEMAFHTQEDGSQLDSFMAAIELINVLRPIVAISYFLVFSAL
ALHEHFKYKEWLRSGNSREREMFVQEVRRYYPFGPFLGALVKKDFVWNNCEFKKGTSVLLDLYG
TNHDPRLWDHFDEFRPERFAEREENLFDMIPQGGGHAEKGHRCPGEGITIEVMKASLDFLVHQI
EYDVPEQSLHYSLARMPSLPESGFVMSGIRRKS

图1(续)

E) SEQ ID NO:5：酸热脂环酸杆菌 LAA1 CTG162，全基因组鸟枪 (shotgun) 序列

ATGAATCAGTGCATTCCGCGCGATCGAACGTTTGACAGCAGCCTCGCCTTGATAAAGGAAGGGT
ATTTGTTCATCAAAAATCGAGTTGATCAATACCAATCCGACATCTTCGAAGCGCGTCTCCTCCT
GGAAAATGTGGTATGCATGCACGGAGCAGAGGCGGCAAAACTCTTCTACAATACGGAACTGTTT
CAACGCCAAGGTGCTCTTCCGAAGCGGGTTCAAAAGACGCTTTTCGGAGAAAACGCCATCCAAA
CCCTTGATGGTACAGCGCATCTTCACCGTAAGCAGCTGTTTCTGTCGTTGTTGACGCCGGATCA
AGAAAAATCCCTTGCGACGCTCGCGACAACGCAGTGGAGGGAGTGCGCGAAGGTATGGGAGAAC
GCGGATAGGGTTGTGCTATTTGAAGAGGCCAAGCGGATGTTATGTCGGATCGCATGTCAGTGGA
CCGGGGTTCCGCTGGATGAATCGGAGGTGTCAAAGCGGGCCGACGATTTTGGGGCGATGGTGGA
CGCGTTTGGAGCGGTTGGTCCGCGACATTGGAAAGGCCGGAGAGCTCGGGCCAGAGCAGAAGCA
TGGCTCCGGCAGATGATTGACGAGATACGAATCGGATTGCGTAGTGTAGATGAACATACGCCGC
TCCATGTGGTGGCCTTTTGGCGTGACGTGAATGGAAACCTCTTGGATGCTCAGATGGTTGCAAT
CGAGTTAATCAATCTGCTACGACCCATCGTAGCTATTTCTACTTTCATCACGTTTTCAGCCCTG
GCCCTGCACGAACACCCGACATGGCGAGACCGATTGAAGGCGCGCAATGAAGCGGATATCGAGA
TGTTTGTGCAAGAGGTTCGTCGCTACTATCCGTTCGCGCCATTTCTCGGTGCCAGAGTGAAAAA
GGATTTTGTGTGGAGGGGATACGAATTTAAAAGAGGGACCCTTGTGTTGCTGGATGTGTATGGA
ACCCATCATGATGCCCGCCTCTGGGATTCCCCAAATGAGTTTCGACCCGAACGATTCATGAGAA
AAACAGTTGGGCCGTTTGATTTGATTCCTCAAGGTGGAGGGGACTCTCACACCGGTCATCGTTG
CCCTGGTGAAGGCGCCACCATCGAGATTATGAAGGCGAGCGTGGATTTTCTGGTTAACCAAATT
GACTTCGAAGTGCCCGCTCAGGACCTCAGTTACAGATTGGATGTTATGCCGACGTTGCCAAAGA
GCGGATTTGTGCTGACCCATGTTCATCGGAAGTTCATAGCTTCTCCGACCATTGCTACACCTAA
TGGTTCTGAAGCTCTTCCTTCAGAAGTCTAA

F) SEQ ID NO:6

MNQCIPRDRTFDSSLALIKEGYLFIKNRVDQYQSDIFEARLLLENVVCMHGAEAAKLFYNTELF
QRQGALPKRVQKTLFGENAIQTLDGTAHLHRKQLFLSLLTPDQEKSLATLATTQWRECAKVWEN
ADRVVLFEEAKRMLCRIACQWTGVPLDESEVSKRADDFGAMVDAFGAVGPRHWKGFRARARAEA
WLRQMIDEIRIGLRSVDEHTPLHVVAFWRDVNGNLLDAQMVAIELINLLRPIVAISTFITFSAL
ALHEHPTWRDRLKARNEADIEMFVQEVRRYYPFAPFLGARVKKDFVWRGYEFKRGTLVLLDVYG
THHDARLWDSPNEFRPERFMRKTVGPFDLIPQGGGDSHTGHRCPGEGATIEIMKASVDFLVNQI
DFEVPAQDLSYRLDVMPTLPKSGFVLTHVHRKFIASPTIATPNGSEALPSEV

图1 (续)

G) SEQ ID NO:5：STAPHYLOCOCCUS MASSILIENSIS S46 叠连群 01，全基因组鸟枪序列

ATGTTTGTAGATTCGATACTTGTGTTAAGATTAAATTTATTAAAAACGGGTATACAATTAGAAA
TGAAAAATGGGGGAATCAAAGTGGCAAAGAAACTACCTAAGGTTAAAGGCCTAGATAACACAGT
AGACATTATTAAAGGCGGGTATACATACGTACCTGGCAAATTAGAAGAATTTGATTCTAAAGCA
TTTGAAGTACGCGCATTAGGCGGTAAGAAAATTGCTGTTATGAGCGGTAAAGAAGCGGCAGAAA
TTTTCTATGATAATGAAAAAATGGAAAGACAAGGTACTTTACCAAAACGTATCGTAAACACTTT
ATTTGGTAAAGGTGCAATTCATACAACTGCTGGTAAGAAGCACGTTGACCGTAAAGCTTTATTT
ATGTCACTTATGACAGATGAAAATCTTAACTACTTACGTGAATTAACACGTAATTATTGGTTCA
TGAATACTGAACGTATGCAAAGCATGGATAAAGTTAACGTATATAACGAATCAATTTATATGTT
AACTAAAATCGGCTTCCGTTGGGCTGGTATCATCCAAACGCCTGAAGAAGCAGAACAAAATGCG
AAAGACATGGATACTATGATTAACTCATTCGTATCTTTAGGTTCAGCTTACAAAGGTTATAAGA
AAGCTAAAAAAGCACGTAAACGTGTTGAAGATTTCTTAGAAAAACAAATTATCGATGTGCGTAA
AGGTAAATTACACCCTGAAGAAGGTACTGCGTTATACGAATTCGCGCATTGGGAAGATTTAAAC
GATAACCCAATGGATTCTCACTTATGTGCAGTAGACTTAATGAACGTTGTGCGCCCATTAGCTG
CAATCAACCGTTTCATCAGCTATGGTGTTAAAGTATTAATCGAATTCGATCAAGAAAAAGAAAA
ATTACGTCTTGAAAATAATGAAGACTATGCGTATAAATTCGCTCAAGAAGTACGTCGTATCTTC
CCATTCGTACCATACTTACCAGGTAGAGCAGCTGTTGATTTAGAATATGACGGCTACAAAATCC
CTGCAGGTATGATGACAGCATTAGATGTTTATGGTACGACACATGATGAAGATTTATGGGAAAA
CCCAGACCAATTCAATCCTAACCGTTTTGATAACTGGGACGGTAGCCCATTCGACTTAATTCCA
CAAGGTGGCGGTGACTTCTATACGAACCACAGATGTGCTGGTGAGTGGATCACAGTTATCATTA
TGGAAGAAACAATGAAATATTTCGCGAATAAGATTGAATTTGATGTACCGTCTCAAGATTTATC
AGTTAAGCTTGATAAATTACCAGGTAACGTAACAAGCGGTACAATCATTAGTAATGTACGTCCA
CGTGTTGCGCGTAAATAA

H) SEQ ID NO:8

MFVDSILVLRLNLLKTGIQLEMKNGGIKVAKKLPKVKGLDNTVDIIKGGYTYVPGKLEEFDSKA
FEVRALGGKKIAVMSGKEAAEIFYDNEKMERQGTLPKRIVNTLFGKGAIHTTAGKKHVDRKALF
MSLMTDENLNYLRELTRNYWPMNTERMQSMDKVNVYNESIYMLTKIGFRWAGIIQTPEEAEQNA
KDMDTMINSFVSLGSAYKGYKKAKKARKRVEDFLEKQIIDVRKGKLHPEEGTALYEFAHWEDLN
DNPMDSHLCAVDLMNVVRPLAAINRFISYGVKVLIEFDQEKEKLRLENNEDYAYKFAQEVRRIF
PFVPYLPGRAAVDLEYDGYKIPAGMMTALDVYGTTHDEDLWENPDQFNPNRFDNWDGSPFDLIP
QGGGDFYTNHRCAGEWITVIIMEETMKYFANKIEFDVPSQDLSVKLDKLPGNVTSGTIISNVRP
RVARK

图1(续)

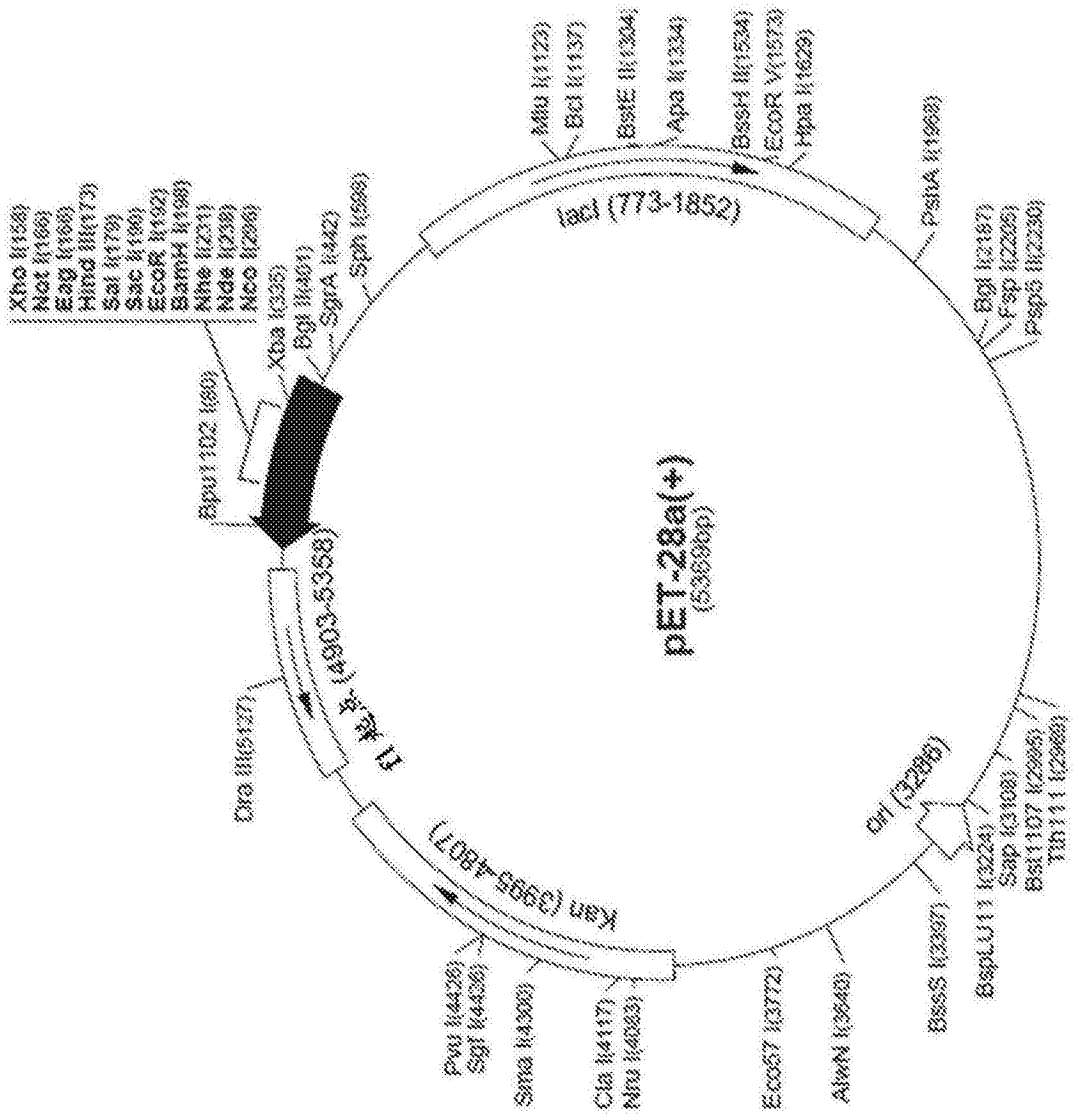
pET-28a(+)
(5369bp)
lacI (773-1852)
f1 起点 (4903-5358)
Kan (3993-4807)
ori (3286)
Xho I(158)
Not I(166)
Eag I(168)
Hind III(175)
Sal I(179)
Sac I(186)
EcoR I(192)
BamH I(198)
Nhe I(231)
Nde I(239)
Nco I(256)
Bpu1102 I(69)
Xba I(535)
Bgl II(401)
SgrA I(442)
Sph I(598)
Mlu I(1123)
Bcl I(1137)
BstE II(1304)
Apa I(1334)
BssH II(1524)
EcoR V(1573)
Hpa I(1629)
PstI/A I(1668)
Bgl I(2187)
Fsp I(2225)
PspO I(2230)
Bsl1107 I(2965)
Tth111 I(2969)
Sap I(3108)
BspLU11 I(3224)
BssS I(3267)
AlwN I(3640)
Eco57 I(3772)
Cla I(4117)
Nru I(4303)
Sma I(4308)
Pvu I(4428)
Sgf I(4429)
Dra III(5107)

图2

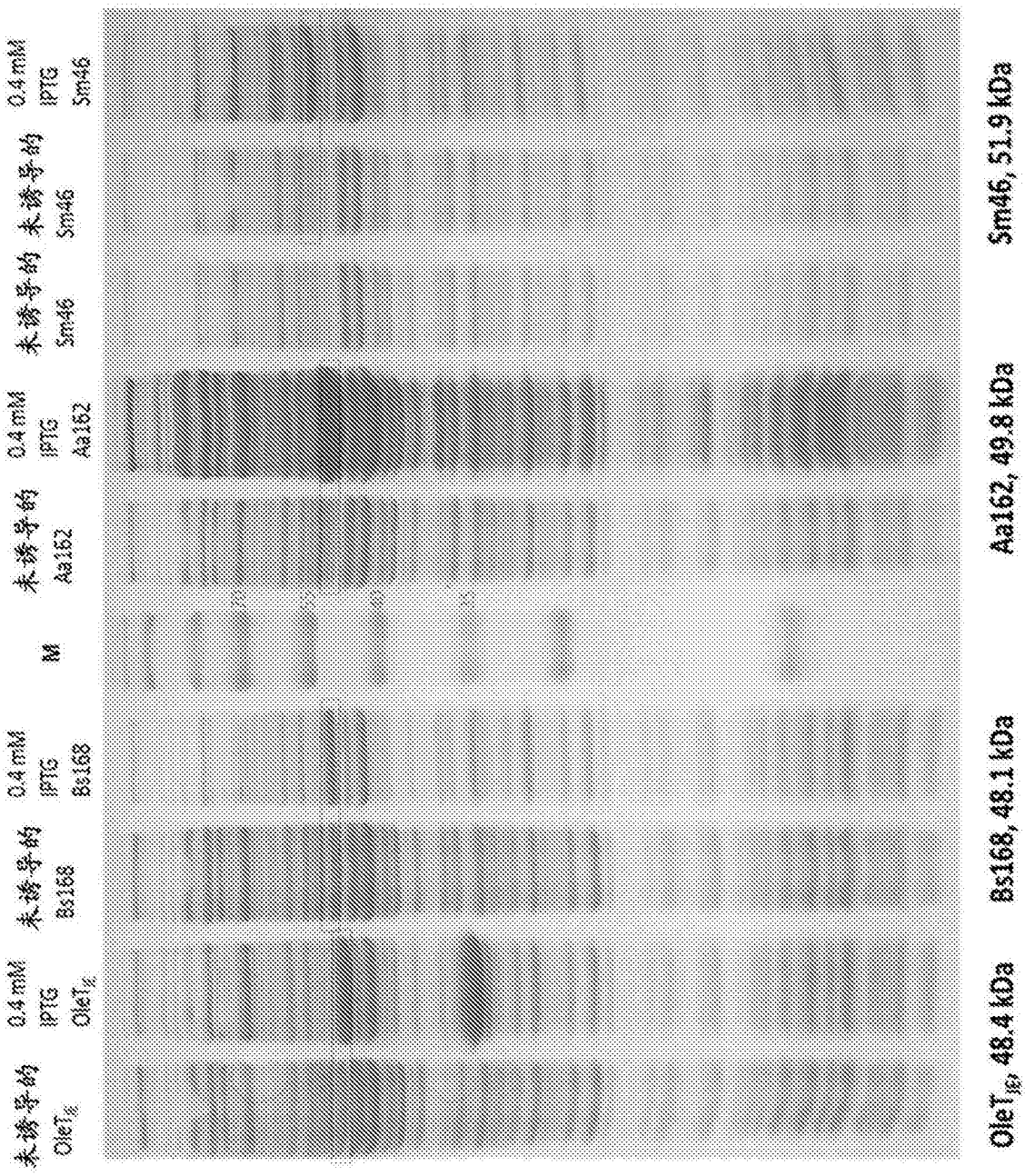
未诱导的 OleT$_{JE}$
0.4 mM IPTG OleT$_{JE}$
未诱导的 Bs168
0.4 mM IPTG Bs168
M
未诱导的 Aa162
0.4 mM IPTG Aa162
未诱导的 Sm46
未诱导的 Sm46
0.4 mM IPTG Sm46
OleT$_{JE}$, 48.4 kDa
Bs168, 48.1 kDa
Aa162, 49.8 kDa
Sm46, 51.9 kDa

图3

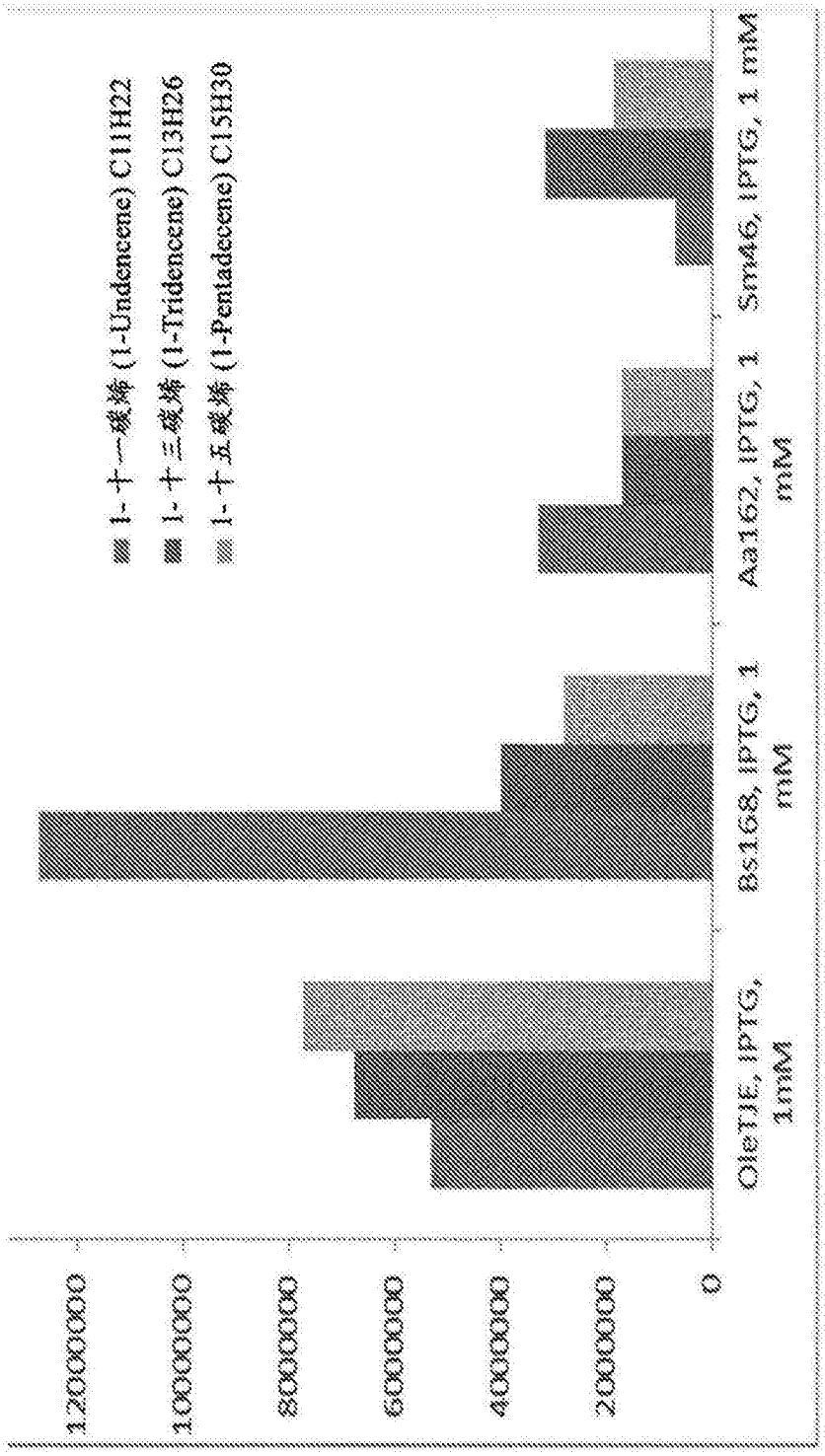
1-十一碳烯 (1-Undencene) C11H22
1-十三碳烯 (1-Tridencene) C13H26
1-十五碳烯 (1-Pentadecene) C15H30
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
OleTJE, IPTG, 1mM
Bs168, IPTG, 1 mM
Aa162, IPTG, 1 mM
Sm46, IPTG, 1 mM

图4

A) 密码子优化的(用于在大肠杆菌中表达)编码来自 Staphylococcus Massiliensis 菌株 S46 的 Sm46 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:9) 和侧翼限制性位点

CATATGTTCGTGGATAGCATTCTGGTTCTGCGCCTGAACCTGCTGAAGACAGGCATCCAGCTGG
AGATGAAGAACGGTGGCATCAAAGTGGCAAAAAAGCTGCCTAAAGTGAAAGGTCTGGACAACAC
CGTGGACATCATCAAGGGTGGCTATACCTACGTGCCTGGCAAACTGGAGGAGTTCGACAGCAAA
GCATTCGAAGTGCGCGCCCTGGGTGGCAAGAAGATCGCAGTGATGAGCGGCAAGGAAGCCGCCG
AGATTTTTTATGATAACGAAAAAATGGAGCGTCAGGGTACCCTGCCGAAGCGCATCGTGAACAC
ACTGTTCGGTAAAGGCGCCATTCATACCACCGCCGGCAAGAAACATGTGGATCGCAAGGCACTG
TTCATGAGTCTGATGACCGATGAAAATTTAAATTATCTGCGCGAACTGACACGCAACTATTGGT
TTATGAATACAGAACGCATGCAGAGCATGGATAAAGTGAATGTGTACAATGAAAGCATTTATAT
GCTGACCAAAATTGGCTTCCGCTGGGCCGGTATCATTCAGACCCCTGAAGAGGCCGAGCAGAAT
GCCAAAGACATGGACACCATGATCAACAGCTTTGTGAGCCTGGGCAGCGCCTACAAGGGTTACA
AAAAAGCCAAGAAAGCCCGCAAGCGCGTGGAAGATTTTCTGGAGAAACAAATTATCGACGTTCG
TAAAGGCAAACTGCATCCGGAGGAAGGTACCGCCCTGTACGAATTCGCCCATTGGGAAGACCTG
AACGATAACCCGATGGACAGCCATCTGTGCGCCGTTGATCTGATGAACGTTGTTCGCCCGCTGG
CAGCAATTAACCGCTTCATTAGCTACGGCGTTAAAGTGCTGATCGAATTCGACCAGGAAAAAGA
AAAGCTGCGCCTGGAGAACAACGAGGACTACGCCTACAAGTTCGCACAGGAAGTGCGCCGTATC
TTTCCGTTCGTGCCTTACTTACCGGGTCGCGCCGCCGTGGATCTGGAGTATGATGGCTATAAGA
TCCCGGCCGGTATGATGACCGCCCTGGATGTTTACGGTACCACACACGATGAGGATCTGTGGGA
GAATCCGGATCAGTTCAACCCGAATCGTTTTGATAACTGGGACGGCAGTCCGTTTGATCTGATT
CCGCAGGGCGGTGGCGATTTCTACACCAATCATCGTTGCGCCGGCGAGTGGATCACCGTGATTA
TTATGGAAGAAACAATGAAATACTTTGCCAACAAAATTGAATTCGATGTGCCGAGTCAGGACCT
GAGCGTTAAACTGGACAAACTGCCTGGCAACGTGACCAGCGGTACCATCATTAGCAACGTGCGT
CCGCGTGTTGCCCGCAAATAA**CTCGAG**

(B) SEQ ID NO: 13

AKKLPKVKGLDNTVDIIKGGYTYVPGKLEEFDSKAFEVRALGGKKIAVMSGKEAAEIFYDNEKM
ERQGTLPKRIVNTLFGKGAIHTTAGKKHVDRKALFMSLMTDENLNYLRELTRNYWFMNTERMQS
MDKVWVYNESIYMLTKIGFRWAGIIQTPEEAEQNAKDMDTMINSFVSLGSAYKGYKKAKKARKR
VEDFLEKQIIDVRKGKLHPEEGTALYEFAHWEDLNDNFMDSHLCAVDLMNVVRPLAAINRFISY
GVKVLIEFDQEKEKLRLENNEDYAYKFAQEVRRIFPFVPYLFGFAAVDLEYDGYKIPAGMMTAL
DVYGTTHDEDLWENFDQFNFNRFDNWDGSPFDLIPQGGGDFYTNHRCAGEWITVIIMEETMKYF
ANKIEFDVPSQDLSVKLDKLFGNVTSGTIISNVRFRVARK

图5

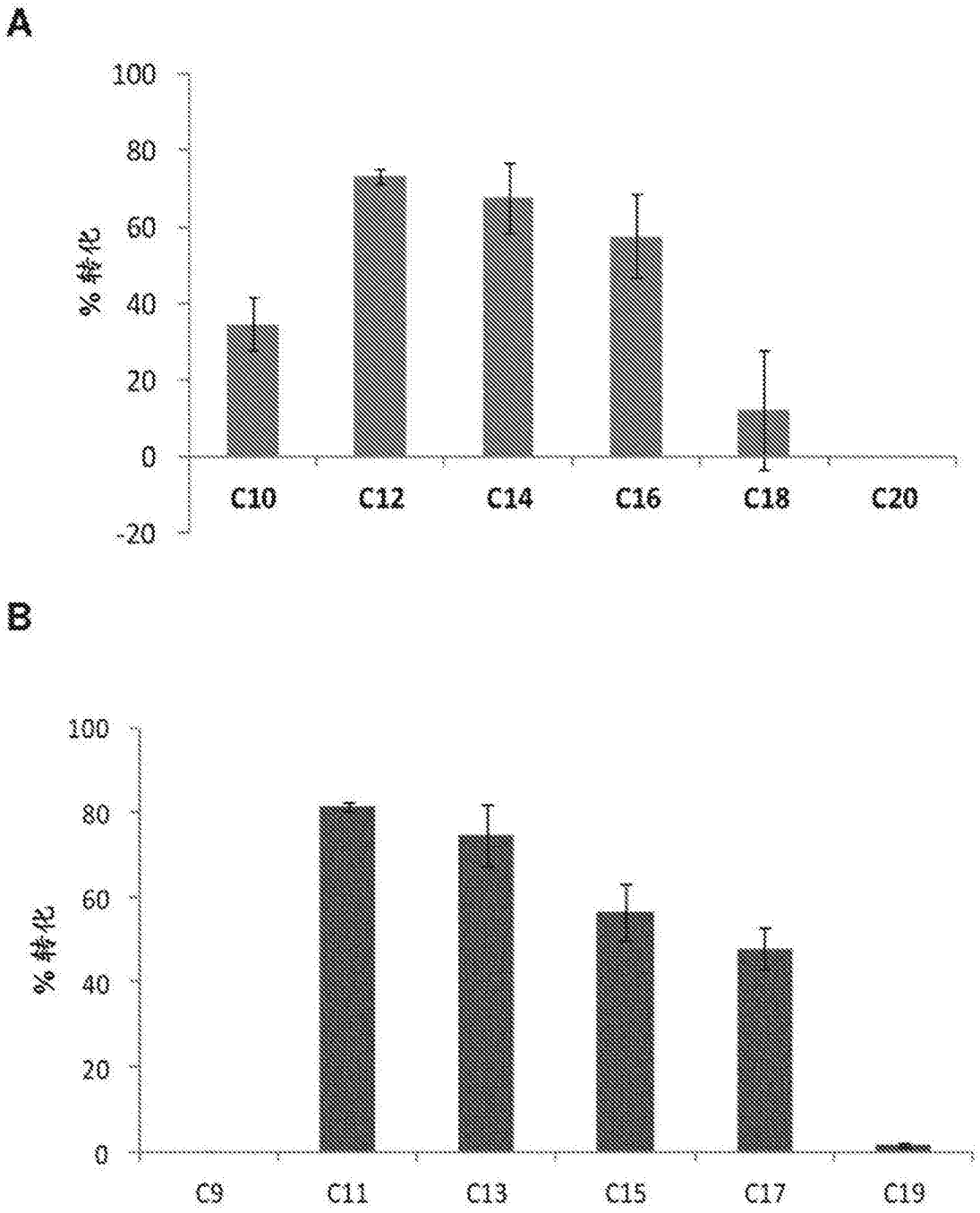
A
100
80
60
40
20
0
-20
% 转化
C10
C12
C14
C16
C18
C20
B
100
80
60
40
20
0
% 转化
C9
C11
C13
C15
C17
C19

图6

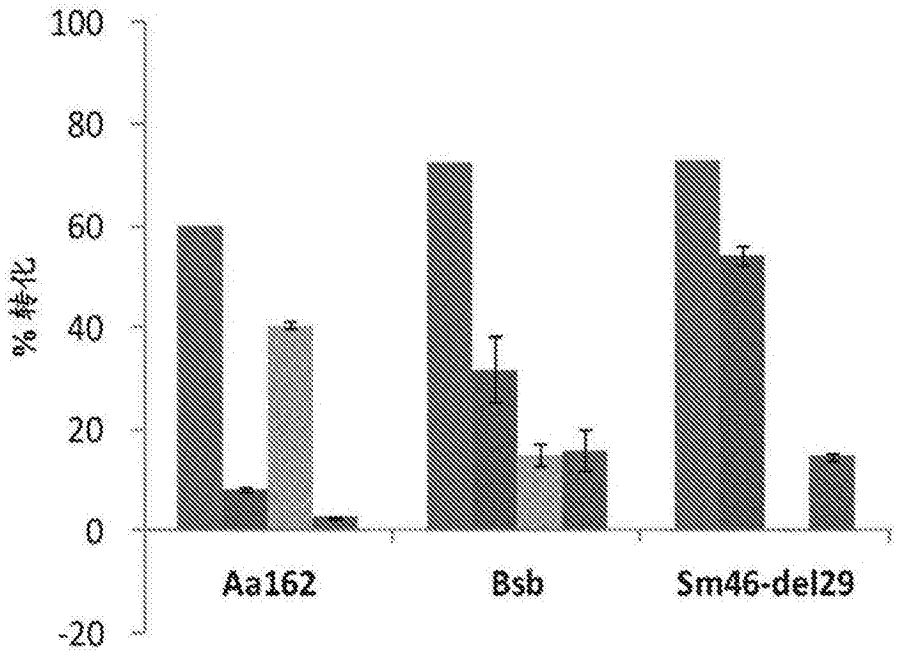

图7