



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105505846 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201610008737. 7

(22) 申请日 2016. 01. 07

(71) 申请人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市新模范马路 5 号

(72) 发明人 应汉杰 王留勤 庄昆 牛欢青

柳东 郭亭 陈晓春 陈勇

吴菁岚 朱晨杰 庄伟

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 15/75(2006. 01)

C12P 13/04(2006. 01)

C12R 1/125(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表6页 附图1页

(54) 发明名称

表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢及其构建方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢,该重组芽孢融合表达枯草芽孢杆菌的锚定蛋白 CotG 与谷氨酸脱氢酶 GDH2,所述的锚定蛋白 CotG,其核苷酸序列如 SEQ ID NO :1 所示;所述的谷氨酸脱氢酶 GDH2,其核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。本发明还提供了该重组芽孢在制备 L-2-氨基丁酸中的应用,重组芽孢上锚定的谷氨酸脱氢酶蛋白发挥全细胞催化剂功能,以 α -酮丁酸为底物,催化生产 L-2-氨基丁酸,发酵液中 L-2-氨基丁酸的浓度可达 38.72g/L,转化率为 95.6%。

1. 表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢, 其特征在于, 该重组芽孢导入了表达枯草芽孢杆菌的锚定蛋白CotG基因与谷氨酸脱氢酶GDH2基因,

所述的锚定蛋白CotG基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示; 所述的谷氨酸脱氢酶GDH2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

2. 根据权利要求1所述的表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢, 其特征在于, 锚定蛋白CotG基因的N端为CotG基因的启动子, 所述的CotG基因的启动子, 其核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

3. 根据权利要求1所述的表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢, 其特征在于, 锚定蛋白CotG基因与谷氨酸脱氢酶GDH2基因之间的连接区域的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

4. 权利要求1表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢的构建方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 将SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列依次连接, 得到整合片段CotG-gdhA;

(2) 将整合片段CotG-gdhA克隆到pEB03质粒的多克隆位点处, 得到重组质粒pEB03-CotG-gdhA;

(3) 将重组质粒pEB03-CotG-gdh2转化至枯草芽孢杆菌WB600, 得到重组枯草芽孢杆菌;

(4) 将步骤(3)得到的重组枯草芽孢杆菌在GYS培养基中培养, 使其产生芽孢, 然后收集菌体, 用溶菌酶裂解, 得到表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢。

5. 根据权利要求3所述表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢的构建方法, 其特征在于, 步骤(2)中, 所述的pEB03质粒, 其核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

6. 根据权利要求2所述表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢的构建方法, 其特征在于, 步骤(4)中, 将重组枯草芽孢杆菌在GYS培养基中, 37°C培养24h, 然后离心收集菌体, 菌体用100mM的pH8.0磷酸盐缓冲液悬浮, 用50mg/L的溶菌酶在37°C裂解1h, 然后12000rpm离心30min, 沉淀用含有1mol/L NaCl、1mol/L KCl和的0.1mol/L、pH8.0磷酸盐缓冲液冲洗, 即可得纯化的表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢。

7. 权利要求1~3任一项所述表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢在制备L-2-氨基丁酸中的应用。

表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢及其构建方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一株表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢及其构建方法与应用。

背景技术

[0002] L-2-氨基丁酸是一种抑制人体神经信息传递的非天然氨基酸,具有加强葡萄糖磷酸酯酶的活性,促进脑细胞代谢的作用。同时,L-2-氨基丁酸也是一种重要的化工原料和很多药物合成的手性中间体,已被广泛用于药物合成,例如,它是抗癫痫药物左乙拉西坦和布瓦西坦的关键生产原料,也是抑菌抗结核药乙胺丁醇盐酸盐的关键手性前体。因此,大量生产L-2-氨基丁酸可以降低这些疾病治疗的成本,同时提高其高效性和安全性。根据文献报道,经过定点突变K92V和T195S的新型谷氨酸脱氢酶能在辅因子NADPH的存在下作用于产L-2-氨基丁酸的代谢过程。

[0003] 芽孢表面展示技术是新近发展起来的一门基因操作技术。芽孢是枯草芽孢杆菌在营养缺乏等逆境条件下,营养细胞分化形成的休眠体。由于芽孢的特殊结构,使其能忍耐一些极端环境如高温、高压、化学药物等。实现芽孢表面展示技术的关键是需要一种高丰富度、表面结合能力强的芽孢衣壳蛋白。外层的芽孢衣壳主要由疏水的衣壳蛋白构成,具有抗酶解、抗药物功能。目前已报道被成功应用的芽孢衣壳蛋白如CotB、CotC、CotG和CotX,都是来源于外层。从现有的文献报道来看,CotB和CotC常用于锚定抗原制备疫苗,而CotG则锚定酶蛋白发挥全细胞催化剂功能。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是,提供一株表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢。

[0005] 本发明还要解决的技术问题是,提供上述表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢的构建方法。

[0006] 本发明最后要解决的技术问题是,提供上述表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢在产L-2-氨基丁酸中的应用。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0008] 表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢,其特征在于,该重组芽孢导入了表达枯草芽孢杆菌的锚定蛋白CotG基因与谷氨酸脱氢酶GDH2基因,

[0009] 所述的锚定蛋白CotG基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;所述的谷氨酸脱氢酶GDH2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0010] 其中,锚定蛋白CotG基因的N端为CotG基因的启动子,所述的CotG基因的启动子,其核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0011] 其中,锚定蛋白CotG基因与谷氨酸脱氢酶GDH2基因之间的连接区域的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0012] 上述表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢的构建方法,包括如下步骤:

[0013] (1)将SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列依次连接,得到整合片段CotG-gdhA;

[0014] (2)将整合片段CotG-gdhA克隆到pEB03质粒的多克隆位点处,得到重组质粒pEB03-CotG-gdh2;

[0015] (3)将重组质粒pEB03-CotG-gdhA转化至枯草芽孢杆菌WB600,得到重组枯草芽孢杆菌pEB03-CotG-GDH2;

[0016] (4)将步骤(3)得到的重组枯草芽孢杆菌在GYS培养基中培养,使其产生芽孢,然后收集菌体,用溶菌酶裂解,得到表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢。

[0017] 步骤(2)中,所述的pEB03质粒,其核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示

[0018] 步骤(4)中,将重组枯草芽孢杆菌在GYS培养基中,37°C培养24h,然后离心收集菌体,菌体用100mM的pH8.0磷酸盐缓冲悬浮,用50mg/L的溶菌酶在37°C裂解1h,然后12000rpm离心30min,沉淀用含有1mol/L NaCl、1mol/L KCl和的0.1mol/L、pH8.0磷酸盐缓冲液冲洗,即可得纯化的表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢。

[0019] 具体的重组枯草芽孢杆菌的构建方法如下:

[0020] (1)以大肠杆菌谷氨酸棒杆菌的基因组为模板,F-GDH(BamHI):CGCGGATCCATGGATCAGACATATTCTCTGGAGT;R-GDH(XhoI):CCGCTCGAGTAAATCACACCCTGCGCCAGC为引物,扩增得到谷氨酸脱氢酶,该基因片段全长1344bp,编码蛋白包含447个氨基酸,通过基因突变,将第92位氨基酸K酸突变为V,第195为氨基酸T突变为S,得到gdhA片段;

[0021] (2)以Bacillus subtilis 168基因组为模板,cotG-F:GTCGACGGTATCGATAAGCTTAGTGTCCCTAGCTCCGAG,cotG-R:TGAACCCACCTCCTTTGTATTTCTTTTGGACTACCCAG为引物,扩增得到锚定蛋白CotG基因及启动子片段;

[0022] (3)将谷氨酸脱氢酶GDH2的基因片段连接到锚定蛋白CotG基因的C端,得到整合片段CotG-gdhA,将CotG-gdhA片段克隆到pEB03质粒上,得到重组质粒pEB03-CotG-gdhA;

[0023] (4)将重组质粒pEB03-CotG-gdhA转化枯草芽孢杆菌WB600,得到重组芽孢杆菌pEB03-CotG-GDH2。

[0024] (5)芽孢的纯化:将含有重组质粒的B.subtilis WB600在37°C条件下,用GYS培养基((NH₄)₂SO₄ 2g/L、酵母膏2g/L、K₂HPO₄ 0.5g/L、葡萄糖1g/L、MgSO₄ 0.41g/L、CaCl₂*H₂O 0.08g/L、MnSO₄*5H₂O 0.07g/L)培养24h,然后离心收集菌体。菌体用100mM的PH8.0磷酸盐缓冲悬浮,用0.5%的溶菌酶在37°C裂解1h,然后12000rpm离心30min,随后用1M NaCl,1M KCl和磷酸酸盐缓冲冲洗,即可得纯化的芽孢细胞,

[0025] 上述表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢的构建方法构建得到的表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢在制备L-2-氨基丁酸中的应用。

[0026] 催化体系如下:取1g纯化后重组芽孢加入100ml催化反应液(0.1mol/L pH 8.0PBS,0.2mol/L L-2-酮丁酸,0.2mol/L NH₄Cl,0.2×10⁻²mol/L NADPH)

[0027] 催化条件如下:温度37°C,260rpm,时间12h。离心留取上清。

[0028] 有益效果:

[0029] 本发明在枯草芽孢杆菌WB600中表面展示谷氨酸脱氢酶,构建并筛选得到一株重组芽孢杆菌,此重组芽孢上锚定的谷氨酸脱氢酶蛋白发挥全细胞催化剂功能,以α-酮丁酸

为底物,催化生产L-2-氨基丁酸,发酵液中L-2-氨基丁酸的浓度可达38.72g/L,转化率为95.6%。枯草芽孢杆菌是GRAS菌种之一,因此它产生的芽孢是无毒的,同时操作简单,稳定性好,安全性高;并且L-2-氨基丁酸的产量较高,底物转化率高,发酵工艺简单高效,没有副产物,易于分离,且易于工业化大生产,具有良好的产业化应用前景。

附图说明

[0030] 图1谷氨酸脱氢酶基因的PCR图。

[0031] 图2谷氨酸脱氢酶基因与T载体连接后提取质粒与酶切验证图。

[0032] 图3谷氨酸脱氢酶基因与pET-28a载体连接后提取质粒与酶切验证图。

具体实施方式

[0033] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0034] 实施例1:谷氨酸脱氢酶基因的克隆与表达。

[0035] (1)谷氨酸脱氢酶基因片段扩增:

[0036] 扩增谷氨酸脱氢酶引物如下:

[0037] F-GDH(BamH I):CGCGGATCCATGGATCAGACATATTCTCTGGAGT

[0038] R-GDH(Xho I):CCGCTCGAGTAAATCACACCCTGCGCCAGC

[0039] 以谷氨酸棒杆菌基因组大肠杆菌DH5 α 基因组为模板,扩增的目的片段全长1344bp,该基因编码蛋白包含447个氨基酸。图为PCR之后所得到的产物,再进行切胶回收目的片段,如图1所示。

[0040] (2)目的片段与T-载体连接转化并进行双酶切(BamH I和EcoR I)验证:

[0041] PCR获得的谷氨酸脱氢酶基因片段与T-载体连接,转化大肠杆菌,以质粒小提试剂盒提取质粒,双酶切鉴定并进行琼脂糖凝胶电泳,双酶切电泳图显示有两条带,通过酶切位点分析,证实片段成功插入到载体(图2)。

[0042] (3)测序正确后,酶切下片段与载体pET-28a连接转化提质粒并进行酶切验证:

[0043] 含目的基因的T载与载体pET-28a分别经BamH I和Xho I双酶切,胶回收的目的基因片段与线性化的载体连接,转化成功后提质粒进行酶切验证连接成功(图3)。

[0044] (4)选出连接成功的一管样品pET-28a-GDH送金唯智公司定点突变为将第92位氨基酸K酸突变为V,第195为氨基酸T突变为S,得到pET-28a-GDH2质粒。

[0045] (5)酶活检测:

[0046] 蛋白表达:

[0047] 酶切鉴定正确后,将pET28a-GDH2重组质粒转化至表达宿主E.coli Rosetta(DE3)感受态细胞,涂布于LB/(Kan+c1)抗性平板培养过夜。从平板中挑取单菌落于5ml LB中37°C 200rpm培养过夜(由于Rosetta具有Cl抗性,pET-28a具有kan抗性,为保证质粒不丢失,液体培养基中均加入千分之一的Cl和Kan抗性)。按照1%的量转接入200ml LB液体中,同时加入抗生素,37°C 200rpm培养至OD=0.8左右加入0.4mM IPTG,30°C 200rpm诱导10h,集菌。

[0048] 粗酶液的获得:

[0049] 用100mmol/L PH8.0的Tris-HCl缓冲将菌泥洗两遍,具体操作为:用缓冲将菌泥重悬,7000rpm 5min,重复一遍。用10ml缓冲重悬,超声(超3秒,停5秒,60次),4℃离心15min,取上清,即获得的粗酶液。

[0050] 酶纯化:

[0051] A、将树脂中的20%的乙醇从纯化管下方滴出;

[0052] B、用10ml超纯水过柱子;

[0053] C、用10ml 500mM咪唑过柱子(目的是洗去上一个人未洗下来的蛋白);

[0054] D、10ml Tris-HCl缓冲过柱子;

[0055] E、重复D;

[0056] F、加粗酶液、摇晃、重悬,将柱子在冰上放置30min左右后弃酶液;

[0057] G、10ml 20mM咪唑洗涤,洗3-4次,在最后快洗完的时候接一管测蛋白浓度;

[0058] H、2ml 500mM咪唑洗脱蛋白,用5ml离心管接住;

[0059] I、用10ml 500mM咪唑继续洗去剩余蛋白,洗2次;

[0060] J、用10ml 20%的乙醇保存。

[0061] 蛋白鉴定:

[0062] 取上清液20 μ L按比例加入2 \times SDS-PAGE上样缓冲液,重悬菌液,煮沸5~10min,进行SDS-PAGE检测。重组蛋白样品通过SDS-PAGE分析,约在51KD处出现显著的特异性条带。

[0063] 蛋白质浓度测定采用Bradford法,以牛血清蛋白为标准样。取3.5ml考马斯亮蓝+0.1ml酶(稀释液),测OD595nm的吸光值,并根据标曲计算蛋白浓度。蛋白浓度为5.93mg/ml。

[0064] 谷氨酸脱氢酶(GDH2)酶活测定:

[0065] 2×10^{-2} mol/L α -酮丁酸,0.2mol/L NH₄Cl, 0.2×10^{-3} mol/L NADPH,0.1mol/L PH8.0的Tris buffer,及适量酶液混合后于室温下反应,用酶标仪在340nm测定反应开始1min内的光吸收变化值。NAD(P)H的摩尔消光系数以6.22计。

[0066] 酶单位定义:每分钟产生1 μ mol NADPH变化所需的酶量为1个酶活动单位,以NADPH μ mol/min表示。

[0067] 粗酶液测得GDH2比酶活为0.511U/mg。经纯化后,其比酶活为20.03U/mg。

[0068] 实施例2:pEB03-CotG-gdh2质粒的构建。

[0069] 菌株:Bacillus subtilis 168、B.subtilisWB 600。

[0070] 质粒:PET-28a-GDH2,抗性kanamycin;

[0071] pEB03:抗性Spectinomycin(终浓度100ug/ml,用水配成100mg/mL的储备液,按千分之一的添加量)

[0072] 酶切位点:HindIII、BamHI。

[0073] 以Bacillus subtilis 168基因组为模板,cotG-F:

[0074] GTCGACGGTATCGATAAGCTTAGTGTCCCTAGCTCCGAG、cotG-R:

[0075] TGAACCCCCACCTCCTTTGTATTTCTTTTGACTACCCAG为引物,用PCR方法从枯草芽孢杆菌W168基因组中扩增出锚定蛋白CotG基因及启动子片段,同时双酶切出GDH2基因片段,并将外源蛋白GDH2片段连接于CotG基因片段的C端,并插入穿梭质粒PEB03中,构建整合型表达载体PEB03-CotG-gdhA。在CotG基因与GDH2片段之间设有linker(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)。

- [0076] 实施例3:枯草芽孢杆菌感受态制备和转化。
- [0077] 试剂配制:
- [0078] SP盐:0.2%(NH₄)₂SO₄,1.4%K₂HPO₄,0.6%KH₂PO₄,0.02%MgSO₄·7H₂O,0.1%柠檬酸钠。
- [0079] CAYE(100×):2%Casamino acid,10%酵母膏。
- [0080] SPI培养基:SP盐溶液加入1%体积浓度为50%葡萄糖溶液,1%体积100×CAYE溶液。
- [0081] SPII培养基:SPI培养基加入1%体积50mmol/L CaCl₂溶液,1%体积250mmol/L MgCl₂溶液。
- [0082] SP-A Salts Solution(500ml):(NH₄)₂SO₄ 2g、K₂HPO₄·3H₂O 14g、1.2%KH₂PO₄ 6g、Trisodium Citrate Dihydrate 1g,121°C灭菌20min。
- [0083] SP-B Salts Solution(500ml):MgSO₄·7H₂O 0.2g,121°C灭菌20min。
- [0084] 100×CAYE Solution(100ml):Casamino acid 2g、Yeast Extract 10g;121°C灭菌20min。
- [0085] SPI Medium(20mL):SP-A Salts Solution 9.8mL、SP-B Salts Solution 9.8mL、(1%V)Glucose(50%w/v,115°C灭菌20min)200μL、(1%V)100×CAYE 200μL。
- [0086] SPII Medium(6mL):SPI Medium:5.88mL、(1%V)50mM CaCl₂ 60μL、(1%V)250mM MgCl₂ 60μL。
- [0087] 100×EGTA Solution:10mmol/L EGTA溶液,溶解时需加少量NaOH至pH8.0。
- [0088] (1)准备新鲜的枯草芽孢杆菌(WB600)单克隆平板,取一环枯草芽孢杆菌甘油菌划LB平板,37°C培养箱培养12h。
- [0089] (2)转化前一天晚间挑单菌落至3ml LB培养基中,37°C,250r/min培养过夜。
- [0090] (3)第二天上午取160μl培养液转接至8ml SPI培养基中,37°C,250r/min培养至对数生长末期(168约4-5h)。
- [0091] (4)取0.2ml生长至对数期末的培养液至2ml SPII培养基中,37°C,100r/min培养90分钟。
- [0092] (5)在上述SPII培养基的菌体中加入20μl 10mmol/L EGTA,再于37°C,100r/min培养10分钟。
- [0093] (6)将上述处理后的菌液分装成0.5ml每管,各加入5μl DNA(DNA量不能过高,不超过5μg),再于37°C,250r/min培养90分钟,取菌液涂布筛选平板。
- [0094] 实施例4:芽孢的纯化。
- [0095] 将含有重组质粒的*B. subtilis* WB600在37°C条件下,用GYS培养基((NH₄)₂SO₄ 2g/L、酵母膏2g/L、K₂HPO₄ 0.5g/L、葡萄糖1g/L、MgSO₄ 0.41g/L、CaCl₂·H₂O 0.08g/L、MnSO₄·5H₂O 0.07g/L)培养24h,然后离心收集菌体。菌体用100mM的pH8.0磷酸盐缓冲液悬浮,用0.5%的溶菌酶在37°C裂解1h,然后12000rpm离心30min,随后用1MNaCl,1M KCl和磷酸盐缓冲液冲洗,即可得纯化的芽孢细胞,用磷酸盐缓冲液悬浮放4°C保存备用。
- [0096] 表面展示GDH2重组菌在温度37°C,pH8.0时酶活最高,酶活单位定义为测定条件下每分钟生成1μmol L-2-氨基丁酸所需要的酶量,达到87.15U/g。这说明通过CotG的N端絮凝功能区,以非共价键的方式将GDH2展示于枯草芽孢杆菌WB600细胞表面。

[0097] 实施例5:催化反应。

[0098] 催化体系:取1g纯化后重组芽孢加入100ml催化反应液(0.1M pH 8.0PBS,0.2mol/L α -酮丁酸,0.2mol/L NH₄Cl,0.2 \times 10⁻²mol/L NADPH)

[0099] 催化条件:温度37 $^{\circ}$ C,260rpm,时间12h。离心留取上清。

[0100] HPLC检测条件:

[0101] 流动相的制备:流动相A 40Mm Na₂HPO₄用NaOH溶液调PH至7.8,流动相B为乙腈:甲醇:水(45:45:10,V/V/V);

[0102] L-2-氨基丁酸测定:OPA衍生后,进样测定L-2-氨基丁酸含量。

[0103] 色谱柱采用安捷伦ZORBAX Eclipse—AAA柱(4.6 \times 150mm),流速为1mL/min,检测波长338nm,柱温40 $^{\circ}$ C。

[0104] HPLC检测L-2-氨基丁酸的产量,反应液中L-2-氨基丁酸的含量为19.6g/L,转化率达到95%。

[0105] 实施例6:催化反应。

[0106] 选择改造后的基因工程菌重组芽孢发酵,进行催化生产氨基丁酸,转化反应器中加入各物质至终浓度如下:20g/L的重组芽孢,2mM NADPH,0.2M NH₄Cl,加入无菌水至1L,控制温度37 $^{\circ}$ C,搅拌转数260r/min,分批补料加入 α -酮丁酸,控制反应体系pH在8.0左右。发酵24h反应结束。离心取上清液,过滤后,HPLC检测,发酵液中L-2-氨基丁酸产量达到38.72g/L,转化率为95.6%,且产物易于分离。

[0001]

SEQUENCE LISTING

- <110> 南京工业大学
 <120> 表面展示谷氨酸脱氢酶的重组芽孢及其构建方法与应用
 <130> SG20160104002
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.5

- <210> 1
 <211> 588
 <212> DNA
 <213> 锚定蛋白 CotG 核苷酸序列
 <400> 1

```

ttgggeact attccattc tgacatcgaa gaageggtga aatccgcaa aaaagaaggt      60
ttaaaggatt atttatacca agagcctcat ggaaaaaac gcagtcataa aaagtcgcac      120
cgcactcaca aaaaatctcg cagccataaa aatcatact getctcaca aaaatctcgc      180
agtcacaaaa aatcattctg ttctcacaaa aaatctcgca gccacaaaa atcatactgc      240
tctcacaaga aatctcgcag ccacaaaaaa tcgtaccgtt ctacaaaaa atctcgcagc      300
tataaaaaat cttaccgttc ttacaaaaaa tctcgtagct ataaaaaatc ttgcegttct      360
tacaaaaaat ctgcagceta caaaaagtct tactgttctc acaagaaaa atctcgeage      420
tataagaagt catgccgcac acacaaaaaa tcttatcggt ccataagaa atactacaaa      480
aaaccgcacc accactgcca cgactacaaa agacacgatg attatgacag caaaaaagaa      540
tactggaaag acggcaattg ctgggtagtc aaaaagaaat acaataa                    588

```

- <210> 2
 <211> 1344
 <212> DNA
 <213> 谷氨酸脱氢酶 GDH2 核苷酸序列
 <400> 2

[0002]

atggatcaga catattctct ggagtcattc ctcaaccatg tccaaaagcg cgaccegaat	60
caaacegagt tegegcgaagc cgttegtgaa gtaatgacca cactctggcc ttttcttgaa	120
caaaatccaa aatatcgcca gatgtcatta ctggagcgtc tggttgaacc ggagcgcgtg	180
atccagtttc gcgtgggatg ggttgatgat cgcaaccaga tacaggteaa ccgtgcatgg	240
cgtgtgcagt tcagctctgc catcggeccg tacaaaggcg gtatgcgctt ccatecgtca	300
gttaaccttt ceattctcaa attcctcggc ttggaacaaa cttcaaaaa tgccctgact	360
actctgccga tgggcggtgg taaaggcggc agcgatttcg atccgaaagg aaaaagcgaa	420
ggtgaagtga tgcgtttttg ccaggcgcgtg atgactgaac tgtatcgcca cctgggcgcg	480
gataccgacg ttccggcagg tgatatcggg gttggtggtc gtgaagtcgg ctttatggcg	540
gggatgatga aaaagctctc caacaatacc gectgcgtct teaccggtaa gggccttca	600
tttggcggca gtettattcg cccggaagct accggetacg gtctggttta tttcacagaa	660
gcaatgctaa aagcccaagg tatgggtttt gaagggatgc gcgtttccgt ttctggetec	720
ggcaacgtcg cccagtaecg tatcgaaaaa gcgatggaat ttggtgctcg tgtgateact	780
gcgtcagact ccageggcac tgtagttgat gaaagcggat tcacgaaaga gaaactggca	840
cgtettatcg aatcaaaagc cagcccgcat ggtegagtgg cagattacgc caaagaattt	900
ggtctggctc atctegaagg ccaacagccg tggctctctac cggttgatat cgcctgect	960
tgcgccacce agaatgaact ggatgttgac gccgcgcate agcttatcgc taatggcgtt	1020
aaagccgtcg ccgaaggggc aaatatgccg accaccatcg aagcgactga actgttccag	1080
caggcaggcg tactatattgc accgggtaaa gcggctaata ctggtggcgt cgctacatcg	1140
ggcctggaaa tggcacaaaa cgetgcgcgc ctgggctgga aagccgagaa agttgacgca	1200
cgtttgcate acatcatgct ggatatecac catgcctgtg ttgagcatgg tggatgaaggt	1260
gagcaaacca actacgtgca gggcgcgaac attgcccgtt ttgtgaaggt tgccgatgcg	1320
atgctggcgc aggtgtgat ttaa	1344

<210> 3

<211> 454

<212> DNA

<213> 锚定蛋白 CotG 启动子序列

<400> 3

[0003]

agtgtcccta gctecgagaa aaaatccaga gacaatttgt ttctcateaa ggaagggtct	60
ttatactccg catttaagtg aatctctcgc gcgccgcgga atgttttcgg ctgataaaag	120
gaaatatggt atgaacttctt tttgaagtct ctgatatgtg atccccgata agegatatca	180
atateccagcc ttttttgatt taecttcate acagctggca ccggatcate gtcccatata	240
tcctttttta attcacgcaa gtctttttgga tgaacaaaca gctgataaag cggtaaattg	300
gattgattct teatecataa tectctttac aaatttttagg cttttatttt tataagatct	360
cagcggaaaca cttatacact ttttaaaacc gcgcgtaacta tgagggtagt aaggatcttc	420
atcettaaca tattttttaa aggaggattt caaa	454

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 核苷酸序列

<400> 4

ggaggtgggg gtcca	15
------------------	----

<210> 5

<211> 4503

<212> DNA

<213> pEB03 质粒的核苷酸序列

<400> 5

aagatattgc gggaaatgca gtggctgaat cttctccatt agaacatagg gagagaattt	60
tgttagcagt tegtagttat cttggagaga atattgaatg gactaatgaa aatgtaaatt	120
taactataaa ctatttaa ataacagattaa aaaaattata aaaaaattga aaaaatgggtg	180
gaaacacitt tttcaatttt tttgttttat tatttaatat ttgggaaata ttcattctaa	240
ttggctegag gtegacggta tegataaget tgatategaa ttctgcage ccgggggatc	300
cactagttct agageggccg ccaccgggt ggagctctag cactttgcca etcatttttt	360

[0004]

gcgtagcaa aacataaag ggtatgggat ataatcccat caagccggta tattcagaac	420
aggaacagca acaagaaca caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtatg cacttataga	480
acatgcattt atgccgagaa aacttattgg ttggaatggg ctatgtgtta gctaacttgt	540
tagcgagtig gttggacttg aattgggatt aatcccaaga aagtaccaac tcaacaacac	600
ataaagccct gtaggttccg accaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagtga	660
agaaatgaaa ttcagagaag cctttgagaa ttttataaca agtaagtatg tacttggtgt	720
tttagtagtt ttaactgttt accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc	780
tgattagacc aagtcctttg atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca	840
cgccctgacc aaagtttgtg aacgacatca ttcaaagaaa aaaacactga gttgttttta	900
taatcttgta tatttagata ttaaacgata tttaaatata catcaagata tatatttggg	960
tgagcgattc cttaaacgaa attgagatta aggagtcgat tttttatgta taaaaacaat	1020
catgcaaate attcaaatca tttggaaaat cacgatttag acaatttttc taaaaccggc	1080
tactetaata gccggttaag tggtaatttt tttaccacce ctcaaccaga attaagtttt	1140
gatgctatga caatcgttgg gaatttgaac aaaactaacg ctaaaagct atctgatttt	1200
atgagtacag agccacaaat aaggctttgg gatataattac aaacaaagtt taaagctaaa	1260
gcacttcaag aaaaggttta tatcgaatat gacaaagtaa aagcagatag ttgggataga	1320
cgtaatatgc gtgttgaatt taatccaaat aaactcacac atgaagaaat gctttggtta	1380
aaacaaaata ttatcgacta catggaagat gacggtttta cgaggttaga tttagctttt	1440
gattttgaag atgatttgag tgattactac gcaatgactg ataaagcagt taagaaaact	1500
attttttatg gtcgtaatgg taagccagaa acaaaatatt ttggtgttcg tgacagtgat	1560
agatttatta gaatttataa taaaaaaca gaacgtaaag ataacgccga tgttgaagtt	1620
atgtctgaac atttatggcg tgtagaaatt gaattgaaaa gagatatggt tgattactgg	1680
aatgattgct ttgatgattt acacattttg aaaccggatt ggacaacacc agaaaaagta	1740
aaagaacaag caatggttta tttgttactg aatgaagaag gcacgtgggg aaaacttgaa	1800
agacatgcta aatataaata caagcaattg attaaagaaa tatctccaat tgatttaacg	1860
gaattaatga aatcgacttt aaaagagaat gaaaagcaat tgcaaaaaca gattgatttt	1920
tggcaacgtg aatttagatt ttggaagtaa aataagtttt attttataaa aaitgctgat	1980
tcagtataat taatatttac ggggtgacat aacgtatgaa aatcagagga ttattctctc	2040
taaatataaa gattfaaat ttaggaggaa atttatatag acttttaata ttatcaaat	2100

[0005]

agaaaattgg gatagaaaag aatattttga acactatntt aaccagcaaa ctacgtatag	2160
cattactaaa gaaattgata ttactttggt taaagatatg ataaaaaaga aaggatatga	2220
aatttatcct tctttgattt atgcaattat ggaagttgta aataaaaata aagtgtttag	2280
aacaggaatt aatagtgaga ataaattagg ttattgggat aagttaaate ctttgtatac	2340
agtttttaat aagcaaaactg aaaaattttac taacattttg acitgaatctg ataacaactt	2400
cacttctttt tataataaatt ataaaaatga cttgcttgaa tataaagata aagaagaat	2460
gtttcctaaa aaaccgatac ctgaaaacac cataccgatt tcaatgattc cttggattga	2520
ttttagttca ttttaattta acattggtaa caatagcaac tttttattgc ctattattac	2580
gataggtaaa ttttatagtg agaataataa aatttatata ccagttgctt tgcagcttca	2640
tcattctgta tgtgatggtt accatgcttc attattttatg aatgaatttc aagatataat	2700
tcataaggta gatgattgga tttagttttt agattttgga agtgaattta atttataca	2760
cgcaagtgat cataaaattt atgaacgtat agcaaccaca tttttggttg cataggtttt	2820
gattttgaat taggtcttga actatgagtg gctagagctt gcatgcggat ctgcgcttgc	2880
tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc	2940
agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc	3000
tcgtgcctc tctgtttccg acctgcege ttaccggata cctgtccgcc tttctcectt	3060
cggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg	3120
ttegtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgcttat	3180
ccgtaacta tegtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag	3240
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgetacagag ttcttgaagt	3300
ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcctt ctgctgaagc	3360
cagttacott cggaaaaaga gttggtagct cttgatecgg caaacaace accgctggt	3420
gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag	3480
atcctttgat cttttctac gggctctgac ctcagtgggc ccgaatggcg attttcgtt	3540
gtgaatacat gttataataa ctataactaa taacgtaacg tgactggcaa gagatatttt	3600
taaaacaatg aataggttta cacttacttt agttttatgg aatgaaaga tcatatcata	3660
tataatctag aataaaatta actaaaataa ttattateta gataaaaaat ttagaagcca	3720
atgaaatcta taaataaact aaattaagtt tatttaatta acaactatgg atataaata	3780
ggfactaatc aaaatagtga ggaggatata tttgaataca tacgaacaaa ttaataaagt	3840

[0006]

gaaaaaata cttcggaac atttaaaaa taaccttatt ggtacttaca tgtttgatc	3900
aggagttgag agtggactaa aaccaaatag tgatcttgac ttttagtcg tcgtatctga	3960
accattgaca gatcaaagta aagaaatact tatacaaaaa attagaccta tttcaaaaa	4020
aataggagat aaaagcaact tacgatatat tgaattaaca attattatc agcaagaaat	4080
ggtaccgtgg aatcatcctc ccaaacaaga atttatttat ggagaatggt tacaagagct	4140
ttatgaacaa ggatacattc ctccagaagga attaaattca gatttaacca taatgcttta	4200
ccaagcaaaa cgaaaaaata aaagaatata cggaaattat gacttagagg aattactacc	4260
tgatattcca ttttctgatg tgagaagagc cattatggat tcgtcagagg aattaataga	4320
taattatcag atgatgaaac caactctata ttaactttat gccgtatgat ttactatgg	4380
acaegggtaa atcataccaa agatattgcg ggaaatgcag tggctgatct ctccattagac	4440
ataggagaga ttttgttage agtcgtagtt atctgagaga atatgatgac tatgaaatgt	4500
aaa	4503

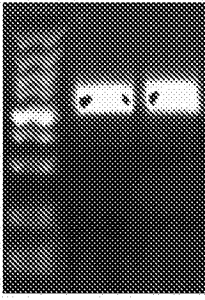


图1

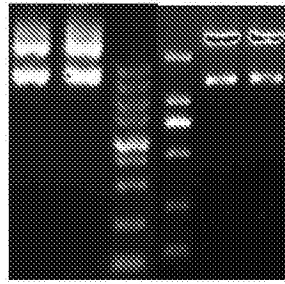


图2

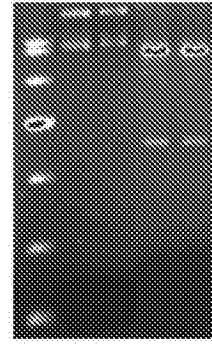


图3