



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107922954 B

(45) 授权公告日 2022.01.11

(21) 申请号 201680040171.4	CN 103555721 A,2014.02.05
(22) 申请日 2016.06.27	CN 103224964 A,2013.07.31
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107922954 A	CN 104245921 A,2014.12.24 RU 2535973 C2,2014.12.20 EP 3318637 A1,2018.05.09
(43) 申请公布日 2018.04.17	WO 2017007159 A1,2017.01.12
(30) 优先权数据 10-2015-0095528 2015.07.03 KR	US 2018195097 A1,2018.07.12 KR 20170005350 A,2017.01.12 RU 2683551 C1,2019.03.28
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2018.01.02	Yota Tsuge等.“Deletion of cgR_1596 and cgR_2070, Encoding NlpC/P60 Proteins, Causes a Defect in Cell Separation in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R”.《JOURNAL OF BACTERIOLOGY》.2008,第190卷(第24期),
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2016/006833 2016.06.27	苏瑞蕊.“棒状杆菌细胞壁中的主要成分的合成过程”.《国际检验医学杂志》.2013,第34卷(第7期),
(87) PCT国际申请的公布数据 W02017/007159 KO 2017.01.12	NCBI.“cell wall-associated hydrolase [<i>Corynebacterium glutamicum</i>]”.《Genbank Database》.2013,
(83) 生物保藏信息 KCCM11627P 2014.12.05	NCBI.“cell wall-associated hydrolase [<i>Corynebacterium glutamicum</i>]”.《Genbank Database》.2013,
(73) 专利权人 CJ第一制糖株式会社 地址 韩国首尔	NCBI.“cell wall-associated hydrolase [<i>Corynebacterium glutamicum</i>]”.《Genbank Database》.2013,
(72) 发明人 P·李 金亨俊 崔香 柳松基 李相穆	NCBI.“N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [<i>Corynebacterium glutamicum</i>]”.《Genbank Database》.2013,
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245 代理人 张全信 董志勇	审查员 杨兴艳
(51) Int.Cl. C12N 15/77 (2006.01) C12P 13/08 (2006.01)	权利要求书1页 说明书14页 序列表12页
(56) 对比文件 CN 102741393 A,2012.10.17 CN 1974760 A,2007.06.06 CN 101765659 A,2010.06.30	

CN 107922954 B

(54) 发明名称
具有L-赖氨酸生产力的微生物和使用其生产L-赖氨酸的方法

(57) 摘要
本发明涉及具有L-赖氨酸生产力的微生物

和使用其生产L-赖氨酸的方法。更具体地,本发明涉及:棒状杆菌属某种微生物,其被突变使得与细胞壁水解相关的蛋白质的活性与其内源活性相比失活;和通过使用其生产L-赖氨酸的方法。

1. 具有增加的L-赖氨酸生产力的谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*), 其被修饰使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比失活, 其中所述参与细胞壁水解的蛋白质是细胞壁相关的水解酶, 并且其中所述参与细胞壁水解的蛋白质是选自氨基酸序列为SEQ ID NO: 1至4的蛋白质中的任一种。

2. 用于制备L-赖氨酸的方法, 其包括:

(i) 在培养基中培养所述谷氨酸棒状杆菌, 其中所述谷氨酸棒状杆菌具有增加的L-赖氨酸生产力, 其被修饰使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比失活, 其中所述参与细胞壁水解的蛋白质是细胞壁相关的水解酶, 其中所述参与细胞壁水解的蛋白质是选自氨基酸序列为SEQ ID NO: 1至4的蛋白质中的任一种; 和

(ii) 从所述培养基或所述谷氨酸棒状杆菌回收L-赖氨酸。

具有L-赖氨酸生产力的微生物和使用其生产L-赖氨酸的方法

技术领域

[0001] 本公开内容涉及生产L-赖氨酸的微生物和使用其生产L-赖氨酸的方法。

背景技术

[0002] L-氨基酸——具体而言L-赖氨酸——在动物饲料、人用治疗剂或化妆品行业中使用,主要使用棒状杆菌属的菌株或埃希氏杆菌属的菌株通过发酵生产。因此,各种研究正在研发以高产率生产L-赖氨酸的菌株和其发酵技术。但是,对于控制细胞裂解——其可能在发酵的后期造成降低的生产力——的研究仍然是不足的。

[0003] 同时,细胞壁水解酶已知为降解细菌细胞壁并且在具有肽聚糖的所有微生物中存在的酶(Rice KC&Bayles KW.Microbiol Mol Biol Rev.2008.72:85-109)。虽然对于这类细胞壁水解酶的研究已经在各种细菌中进行,但是它们的精确控制机制是仍然未知的。

[0004] 在微生物的培育期间发生的细胞裂解机制的模型最近已经在肺炎球菌属中提出(Mellroth P et al.J Biol Chem.2012.287:11018-29)。具体而言,当细胞暴露于各种类型的应激时,存在于细胞的外壁上的细胞壁水解酶的活性增加,从而开始细胞壁分解。当细胞通过这类细胞壁水解酶的连续作用而溶解时,存在于细胞质中的细胞壁水解酶暴露于细胞外。已经报道,当一系列过程连续发生使得细胞壁水解酶的量超过细胞外的阈值时,周围细胞被溶解。但是,在发酵培养过程期间生成的细胞裂解与氨基酸生产之间的关联是仍然未知的。

[0005] 公开内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明人已经进行了努力以持续地寻找能够增加棒状杆菌属的微生物——其是代表性的产L-赖氨酸的菌株——中的L-赖氨酸生产力的有效特性。结果,本发明人已经确认当编码参与细胞壁水解的蛋白质的基因有缺陷时L-赖氨酸生产力增加,并且当编码具有类似功能的蛋白质的另外基因有缺陷时赖氨酸生产力的增加受到影响,从而完成本公开内容。

[0008] 技术方案

[0009] 本公开内容的目标是提供生产L-赖氨酸的棒状杆菌属的微生物。

[0010] 本公开内容的另一个目标是提供使用生产L-赖氨酸的棒状杆菌属的微生物制备L-赖氨酸的方法。

[0011] 有益效果

[0012] 根据本公开内容的微生物是棒状杆菌属的微生物,其被修饰使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比降低或失活。即,根据本公开内容的微生物是导致发酵后期中生产力增加的新菌株,并且因而被用作生产L-赖氨酸的棒状杆菌属的微生物的新型范例,从而提供了能够以高产率生产L-赖氨酸的微生物。因此,制备的L-赖氨酸不仅可以应用于动物饲料或者动物饲料添加剂,而且也可以应用于各种产品比如人食物、食物添加剂、药物等。

[0013] 最佳模式

[0014] 为了实现上述目标,本公开内容的方面提供了生产L-赖氨酸的棒状杆菌属的微生物,其被修饰使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比失活。

[0015] 如本文所使用,术语“参与细胞壁水解的蛋白质”指的是能够水解棒状杆菌属的微生物中的细胞壁的相关蛋白质。参与细胞壁水解的蛋白质可以是细胞壁相关的水解酶或者N-乙酰胞壁酰(acetylmuramoyl)-L-丙氨酸酰胺酶,但是不限于此。

[0016] 如上面所描述的,只要蛋白质具有能够水解微生物中的细胞壁的相关蛋白质的活性,蛋白质和基因序列可以从已知数据库获得。此外,NCBI的基因库(Genbank)等可以被用作已知数据库的实例,但是这些不限于此。

[0017] 细胞壁相关的水解酶可以是衍生自棒状杆菌属的微生物——具体地衍生自谷氨酸棒状杆菌——的NCg11480基因编码的蛋白质、NCg12107基因编码的蛋白质或NCg12108基因编码的蛋白质,但是不限于此。作为具体实例,细胞壁相关的水解酶可以具有SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸,但是可以非限制性地包括具有上述活性的蛋白质序列。另外,任何核苷酸序列可以非限制性地包括在其中,只要其是编码具有细胞壁相关的水解酶活性的蛋白质的核苷酸序列。作为具体实例,其可以由SEQ ID NO:5、6或7的核苷酸序列编码的蛋白质,但是不限于此。

[0018] N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶可以是衍生自棒状杆菌属的微生物——具体地衍生自谷氨酸棒状杆菌——的NCg12986基因编码的蛋白质。具体地,N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶可以具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,但是可以非限制性地包括具有上述活性的蛋白质的任何氨基酸序列。此外,可以非限制性地包括任何核苷酸序列,只要该核苷酸序列编码具有N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶的活性的蛋白质。例如,其可以由SEQ ID NO:8的核苷酸序列编码的蛋白质,但是不限于此。

[0019] 除了由SEQ ID NO表示的氨基酸序列之外,上面描述的蛋白质中的每一种还可以非限制性地包括与上面列举的氨基酸序列具有80%或更高、优选地90%或更高、更优选地95%或更高、并且甚至更优选地97%或更高的同源性的任何氨基酸序列,只要该氨基酸序列编码具有与蛋白质的每种基本上相同或相应的作用的蛋白质。另外地,显而易见的是具有上面描述的同源性的任何修饰的蛋白质可以属于本公开内容的范围,但是蛋白质可以具有在其中含有部分缺失、修饰、置换或添加的氨基酸序列。

[0020] 另外地,除了由SEQ ID NO描述的核苷酸序列之外,编码本公开内容的蛋白质中的每种的基因还可以非限制性地包括编码蛋白质的与上面列举的核苷酸序列中的每种具有80%或更高、优选地90%或更高、更优选地95%或更高、甚至更优选地98%或更高、并且最优选地99%或更高的同源性的任何基因序列,只要该基因序列编码具有与蛋白质的每种基本上相同或相应的作用的蛋白质。另外地,显而易见的是具有上述同源性的任何核苷酸序列可以属于本公开内容的范围,但是序列可以在其中具有部分缺失、修饰、置换或添加。

[0021] 如本文所使用,“同源性”指的是编码蛋白质的基因的核苷酸序列或氨基酸序列的相似性。当同源性足够高时,相应基因的产物可以是相同的或者具有相似活性。即,其指的是两个多核苷酸或核苷酸部分之间的同一性的百分比。一个部分与另一个部分的序列对应性可以由本领域中已知的技术测定。例如,可以通过使用容易获得的且能够比对序列信息的计算机程序直接地比对两个多核苷酸分子或两个多肽分子的序列信息来测定同源性。计

计算机程序可以是BLAST (NCBI)、CLC Main Workbench (CLC bio)、MegAlign™ (DNASTAR Inc) 等。此外,可以通过在同源区中形成稳定双链的条件下杂交多核苷酸,并且然后通过单链特异性核酸酶消化杂交链以测定消化片段的大小来测定同源性。

[0022] 如本文所使用的,术语“内源活性”指的是微生物修饰前的状态下或其天然状态下的蛋白质活性。

[0023] 如本文所使用的,术语“酶的活性被修饰为与其内源活性相比失活”指的是如此活性:与野生型菌株或者修饰前的菌株相比编码酶的基因根本不表达,或者指的是即使当基因表达时活性降低或消除。

[0024] “与其内源活性相比活性失活”指的是当与在其自然状态或修饰前的状态下具备的活性相比时,活性降低或消除。降低是指如下情况的概念:由于编码酶的基因的修饰,与微生物原始具备的活性相比酶的活性降低;总体酶表达水平低于微生物的自然类型菌株或者修饰前的菌株的总体酶表达水平;或者其组合。

[0025] “活性消除”指的是如下情况:与自然类型菌株或者修饰前的菌株相比,编码酶的基因根本不表达,和/或基因表达但是不展现活性。

[0026] 修饰以使酶活性失活的方法可以通过应用本领域中熟知的各种方法实现。方法的实例可以包括将染色体上编码酶的基因替换为突变的基因,使得酶活性可以降低的方法,其包括酶活性被去除时的情况;在染色体上编码酶的基因的表达调控序列上引入修饰的方法;将编码酶的基因的表达调控序列替换为具有弱活性或无活性的序列的方法;使染色体上编码酶的部分或全部基因缺失的方法;引入反义寡核苷酸(例如反义RNA)的方法,该反义寡核苷酸经由互补结合至染色体上的基因的转录物抑制从mRNA翻译为酶;通过在编码酶的基因的SD序列的前端上人工地添加Shine-Dalgarno (SD) 序列和其互补序列形成二级结构使得核糖体的附着不可能的方法;逆转录工程学(RTE)——其添加启动子从而在相应序列的开放阅读框(ORF)的3'末端上相反地转录——的方法等,并且还包括其组合,但是不限于此。

[0027] 具体地,使编码酶的部分或全部基因缺失的方法可以通过将多核苷酸——其经由将染色体插入微生物的载体编码染色体内的内源靶蛋白——替换为核酸序列的部分缺失的多核苷酸或标记物来执行。例如,可以使用经由同源重组基因缺失的方法。

[0028] 如本文所使用的,术语“部分”虽然可以根据多核苷酸的种类变化,但是其可以具体地指1个核苷酸至300个核苷酸、更具体地1个核苷酸至100个核苷酸、并且甚至更具体地1个核苷酸至50个核苷酸,但是不限于此。

[0029] 如本文所使用,术语“同源重组”指的是在具有相互同源性的基因链的基因座处经由交换发生的遗传重组。

[0030] 根据本公开内容的示例性实施方式,蛋白质通过同源重组失活。

[0031] 具体地,修饰表达调控序列的方法可以通过经由表达调控序列的核苷酸序列的缺失、插入、非保守性或保守性置换,或其组合在表达调控序列上引入修饰来实施;或者可以通过将序列替换为较弱启动子来实施。表达调控序列包括启动子、操纵基因序列、编码核糖体结合位点的序列、和用于调控转录和翻译的终止的序列。

[0032] 另外,修饰染色体上的基因序列的方法可以通过经由基因序列的缺失、插入、非保守性或保守性置换,或其组合在序列中引入修饰从而进一步降低酶活性来实施;或者通过

将序列替换为改进以具有另外较弱活性的基因序列或者替换为改进以不具有活性的基因序列来实施。

[0033] 如本文所使用,术语“生产L-赖氨酸的微生物”指的是能够通过发酵生产L-赖氨酸的微生物菌株。例如,其包括通过经由本公开内容的操作来修饰序列使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比失活而能够增加L-赖氨酸生产力的菌株;和通过调控在发酵期间发生的用于生产赖氨酸的细胞裂解而能够增加L-赖氨酸生产力的菌株,但是不限于此。

[0034] 在本公开内容中,生产L-赖氨酸的微生物可以包括棒状杆菌属的所有微生物——其能够被修饰使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比失活。例如,可以使用谷氨酸棒状杆菌、产氨棒状杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*)、嗜热产氨棒状杆菌 (*Corynebacterium thermoaminogenes*)、黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*)、或发酵短杆菌 (*Brevibacterium fermentum*),但是微生物不限于此。例如,谷氨酸棒状杆菌可以被用于棒状杆菌属的微生物。修饰的棒状杆菌属的微生物的特征在于L-赖氨酸生产力与不被修饰的微生物相比增强,使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比失活。

[0035] 本公开内容的另一个方面提供了用于制备L-赖氨酸的方法,其包括:(i) 培养棒状杆菌属的微生物,其被修饰使得参与细胞壁水解的蛋白质的活性与其内源活性相比失活;和(ii) 从培养基或微生物回收L-赖氨酸。

[0036] L-赖氨酸生产力增加的棒状杆菌属的微生物如上面所描述。

[0037] 如本文所使用,术语“培养”指的是在人工控制的环境条件下培养微生物。在本公开内容中,使用棒状杆菌属的微生物培养L-赖氨酸的方法可以使用本领域中广泛公开的方法进行。具体地,培养的实例包括分批工艺和以连续方式的补料分批或重复补料分批工艺,但是不限于此。

[0038] 用于培养的培养基应当以适合方式满足具体菌株的需要(例如,Manual of Methods for General Bacteriology.American Society for Bacteriology.Washington D.C.,USA,1981)。可以在本公开内容中使用的碳源可以包括糖类和碳水化合物比如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉和纤维素;油脂比如豆油、葵花油、蓖麻油和椰子油;脂肪酸比如棕榈酸、硬脂酸和亚油酸;醇类比如甘油和乙醇;和有机酸比如葡糖酸、乙酸和丙酮酸,但是这些不限于此。这些物质可以单独地或在混合物中使用。可以在本公开内容中使用的氮源可以包括蛋白胨、酵母提取物、肉膏、麦芽汁、玉米浆、脱脂豆饼和尿素,或无机化合物比如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵,但是这些不限于此。这些氮源也可以单独或在混合物中使用。可以在本公开内容中使用的磷源可以包括磷酸二氢钾或磷酸氢二钾,或相应的含钠盐,但是这些不限于此。此外,培养基可以包含金属盐,比如硫酸镁或硫酸铁,其对于生长是需要的。最后,除了上面描述的物质外,可以使用必需生长因子比如氨基酸和维生素。另外地,可以在培养基中使用适合的前体。这些物质可以在培养期间以分批或连续方式添加至培养基。例如在文献(“Biochemical Engineering”by James M.Lee,Prentice-Hall International Editions,pp 138-176)中公开了这样的多种培养方法。

[0039] 碱性化合物比如氢氧化钠、氢氧化钾或氨,或酸性化合物比如磷酸或硫酸可以以适合方式添加至培养基以调节培养基的pH。此外,消泡剂比如脂肪酸聚乙二醇酯可以被用于抑制泡沫的形成。为了维持培养基处于需氧状态,氧或含氧气体(例如空气)可以被注入

培养基。培养基的温度可以通常为20℃至45℃,优选地25℃至40℃,但是可以根据条件而改变。培养可以持续直到产生最大量的期望的L-氨基酸,并且其通常可以在10小时至160小时内实现。L-赖氨酸可以被释放入培养基或者包含在细胞中。

[0040] 用于生产L-赖氨酸的本公开内容的方法可以包括从微生物或培养基回收赖氨酸的步骤。在本领域中已知的方法,比如离心、过滤、阴离子交换色谱、结晶、HPLC等可以被用于从微生物或培养基回收L-赖氨酸的方法,但是方法不限于此。

[0041] 回收步骤可以包括纯化过程。

[0042] 发明的模式

[0043] 在下文,将伴随示例性实施方式详细地描述本公开内容。但是,本文公开的示例性实施方式仅仅出于说明性目的并且不应当被解释为限制本公开内容的范围。

[0044] 实施例1:使用转座子制备随机突变体文库

[0045] 为了获得增加赖氨酸生产力的基因,通过下述方法制备载体文库。使用菌株KCCM11016P(该微生物已经被命名为KFCC10881并且利用根据布达佩斯条约的国际保藏机构重新保藏,并且然后被指定KCCM11016P的保藏登录号;韩国专利号10-0159812)作为亲本菌株转化使用EZ-Tn5™<R6K γ ori/KAN-2>Tnp Transposome™试剂盒(Epicentre)获得的质粒,并且然后涂布在含有卡那霉素(25mg/L)的复合培养板上以获得20,000个菌落。

[0046] <复合培养板(pH 7.0)>

[0047] 10g葡萄糖、10g蛋白胨、5g牛肉膏、5g酵母提取物、18.5g脑心浸液、2.5g NaCl、2g尿素、91g山梨醇、20g琼脂(基于1L蒸馏水)

[0048] 实施例2:使用转座子筛选随机突变体文库

[0049] 将在实施例1中获得的大约20,000个菌落中的每个接种入选择培养基(300 μ L),并且在32℃、1000rpm下在96深孔板中培养大约24小时。茚三酮方法被用于分析在培养基中产生的L-赖氨酸的量(Moore, S., Stein, W.H., Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 1948, 176, 367-388)。在培养完成时,将培养物上清液(10 μ L)和茚三酮反应溶液(190 μ L)在65℃下反应30分钟。随后,使用分光光度计在570nm的波长下测量吸光度,并且大约60种菌落被选择为修饰菌株,其与对照KCCM11016P相比显示了高吸光度。其它菌落与对照KCCM11016P菌株相比显示了类似的或降低的吸光度。

[0050] 60种选择的菌株以与上面相同的方式培养,并且重复进行茚三酮反应。结果,选择与菌株KCCM11016P相比具有提高的L-赖氨酸生产力的前10种菌株。

[0051] <选择培养基(pH 8.0)>

[0052] 10g葡萄糖、5.5g硫酸铵、1.2g MgSO₄ 7H₂O、0.8g KH₂PO₄、16.4g K₂HPO₄、100 μ g生物素、1000 μ g HCl硫胺素、2000 μ g泛酸钙、2000 μ g烟酰胺(基于1L蒸馏水)

[0053] 实施例3:分析选择的随机突变体菌株的L-赖氨酸生产力

[0054] 为了最终选择具有增加的L-赖氨酸生产力的菌株,对于在实施例2中选择的10种菌株使用下面的培养基在烧瓶中实施再现性试验。将10种菌株和对照接种在含有下面的种子培养基(25mL)的三角挡板烧瓶(250mL)中,并且在振荡的同时在30℃和200rpm下培养20小时。种子培养基和生产培养基具有下列组成。在完成培养之后,使用HPLC分析培养液中的L-赖氨酸浓度,并且突变体菌株中每种L-赖氨酸浓度在下面的表1中示出。

[0055] <种子培养基 (pH 7.0)>

[0056] 20g葡萄糖、10g蛋白胨、5g酵母提取物、1.5g尿素、4g KH_2PO_4 、8g K_2HPO_4 、0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100 μg 生物素、1000 μg HCl硫胺素、2000 μg 泛酸钙、2000 μg 烟酰胺 (基于1L蒸馏水)

[0057] <生产培养基 (pH 7.0)>

[0058] 100g葡萄糖、40g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.5g大豆蛋白、5g玉米浆固体、3g尿素、1g KH_2PO_4 、0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100 μg 生物素、1000 μg HCl硫胺素、2000 μg 泛酸钙、3000 μg 烟酰胺、30g CaCO_3 (基于1L蒸馏水)

[0059] [表1]10种选择的突变体菌株的L-赖氨酸浓度

[0060]	菌株	L-赖氨酸(g/L)			
		批次 1	批次 2	批次 3	平均
	对照	42.5	42.8	42.7	42.7
	KCCM11016P	42.5	42.8	42.7	42.7
	1	48.8	48.9	48.5	48.7
	2	43.0	43.1	43.4	43.2
	3	42.7	43.1	42.9	42.9
	4	44.9	45.1	45.3	45.1
[0061]	5	44.3	44.1	44.0	44.1
	6	42.4	42.9	42.8	42.7
	7	43.8	43.2	43.7	43.6
	8	47.2	46.9	47.1	47.1
	9	44.1	44.4	44.2	44.2
	10	43.1	43.7	43.2	43.3

[0062] 在上面的10种选择的突变体中,KCCM11016P/mt-1和KCCM11016P/mt-8最终被选择为具有显著提高的L-赖氨酸生产力的菌株。

[0063] 实施例4:确认在最终选择的菌株中涉及L-赖氨酸生产力的基因和选择另外的候选基因

[0064] 在该实施例中,由在实施例3中最终选择的菌株尝试基因的鉴定,由于转座子的随机插入这些基因是有缺陷的。KCCM11016P/mt-1和KCCM11016P/mt-8的基因组DNA被提取并且然后被消化。随后,生成物被连接,转化入大肠杆菌DH5a,并且然后平板接种在含有卡那霉素(25mg/L)的LB固体培养基上。在选择20种转化的菌落之后,获得含有未知基因的部分的质粒,并且使用SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的序列在EZ-Tn5TM<R6K γ ori/KAN-2>Tnp TransposomeTM试剂盒中分析核苷酸序列(表2)。结果,确认了NCg12108和NCg12986基因中的每种在突变体菌株中失活。

[0065] [表2]

[0066]	序列	SEQ ID NO
--------	----	-----------

试剂盒引物	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	9
试剂盒引物	CTACCCTGTGGAACACCTACATCT	10

[0067] 在实施例3中选择的突变体菌株中被鉴定为缺陷的NCg12108和NCg12986基因内源性存在于棒状杆菌属中,并且因而被鉴定为参与细胞壁水解的蛋白质。

[0068] 基于使用转座子在随机突变体菌株中选择参与细胞壁水解的2种蛋白质的结果,认为参与细胞壁水解的基因的缺陷在增加L-赖氨酸生产力中将是有用的。因此,在国家生物技术信息中心(NCBI)中进行参与细胞壁水解的基因——非NCg12108和NCg12986基因——的搜索。

[0069] 作为搜索的结果,内源地存在于棒状杆菌属中的NCg11480和NCg12107基因被另外地选择为参与细胞壁水解的蛋白质。因此,为了确认NCg11480和NCg12107基因的缺失是否影响L-赖氨酸生产力,这些基因被选择为另外的缺失候选基因。

[0070] 实施例5:生产用于NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986基因失活的重组质粒

[0071] 在该实施例中,为了确认NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986基因的失活是否将影响L-赖氨酸生产,生产在棒状杆菌属中产L-赖氨酸菌株的染色体上用于缺失在实施例4中选择的NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986基因的重组质粒。

[0072] 基于在美国国立卫生研究院基因库(NIH基因库)中报道的核苷酸序列,获得NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986的SEQ ID NO:1、2、3和4的氨基酸序列,以及编码其的SEQ ID NO:5、6、7和8的核苷酸序列。为了生产基因片段,其中NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986的每种的开放阅读框内部缺失,基于上述SEQ ID NO:5、6、7和8生产NCg11480的SEQ ID NO:11至14、NCg12107的15至18、NCg12108的19至22和NCg12986的23至26的引物。其序列在下面的表3中示出。

[0073] [表3]

引物	序列	SEQ ID NO
NCg11480 引物	CCGGGGATCCTCTAGAACCTTGAAA CTTCCAATC	11
NCg11480 引物	CTCCTGACGAACTATTTCAAATCCCC TATCAACCTC	12

[0074]

[0075]	NCgl1480 引物	CACCGAGGTAAATTGCCATGCAAGC GCAATCAACGC	13
	NCgl1480 引物	GCAGGTCGACTCTAGAAACCACACA TTATCGATC	14
	NCgl2107 引物	CCGGGGATCCTCTAGAGCACAGGGC ACCCCTGTTG	15
	NCgl2107 引物	CTCCTGACGAACTATTTCAAATCCCC TATCAACCTC	16
	NCgl2107 引物	GAGGTTGATAGGGGATTTGAAATAG TTCGTCAGGAG	17
	NCgl2107 引物	GCAGGTCGACTCTAGAAACCACACA TTATCGATC	18
	NCgl2108 引物	CCGGGGATCCTCTAGAGAACCCTTA GTAGTTGGG	19
	NCgl2108 引物	GTAATCCAAGGAGTGCTCACCCACT GATGAAACTCC	20
	NCgl2108 引物	GGAGTTTCATCAGTGGGTGAGCACT CCTTGGATTAC	21
	NCgl2108 引物	GCAGGTCGACTCTAGACGAGCCTCA ATATCAATC	22
	NCgl2986 引物	CCGGGGATCCTCTAGATTAGGAGAA ACCATGAGC	23
	NCgl2986 引物	ATCAGTCAGAAGTCCAGGACTGCA GTAAGAATACC	24
	NCgl2986 引物	GGTATTCTTACTGCAGTCCTGGCAG TTCTGACTGAT	25
NCgl2986 引物	GCAGGTCGACTCTAGAGTTGAGGCG TTTGATAC	26	

[0076] 使用谷氨酸棒状杆菌ATCC13032的基因组DNA作为模板,连同SEQ ID NO:11和12、13和14、15和16、17和18、19和20、21和22、23和24、以及25和26的核苷酸序列对作为引物进行PCR(Sambrook et al.,Molecular Cloning,a Laboratory Manual(1989),Cold Spring Harbor Laboratories)。在下述条件下进行PCR:30个循环,每个由在95℃下变性30秒、在50℃下退火30秒和在72℃下延伸1分钟组成。

[0077] 结果,获得两对含有NCg11480基因的上游和下游区域的319bp和410bp(分别地NCg11480-A和NCg11480-B)的DNA片段;两对含有NCg12107基因的上游和下游区域的324bp和300bp(分别地NCg12107-A和NCg12107-B)的DNA片段;两对含有NCg12108基因的上游和下

游区域的381bp和377bp(分别地NCg12108-A和NCg12108-B)的DNA片段;和两对含有NCg12986基因的上游和下游区域的356bp和374bp(分别地NCg12986-A和NCg12986-B)的DNA片段。将通过PCR扩增的DNA片段使用Infusion Cloning试剂盒(Invitrogen)缀合至pDZ质粒(韩国专利号10-0924065),转化入大肠杆菌DH5 α ,并且然后平板接种在含有卡那霉素(25mg/L)的LB固体培养基上。在选择转化有质粒——期望基因通过PCR插入其中——的菌落之后,使用本领域中常规知晓的质粒提取方法获得质粒。如此获得的质粒分别被命名为pDZ- Δ NCg11480、pDZ- Δ NCg12107、pDZ- Δ NCg12108和pDZ- Δ NCg12986。在pDZ- Δ NCg11480中,NCg11480基因的1672bp基因片段缺失;在pDZ- Δ NCg12107中,NCg12107基因的1026bp基因片段缺失;在pDZ- Δ NCg12108中,NCg12108基因的576bp基因片段缺失;并且在pDZ- Δ NCg12986中,基因NCg12986的1092bp基因片段缺失。

[0078] 实施例6:生产和评估衍生自产赖氨酸菌株KCCM11016P的细胞壁水解相关的蛋白基因失活的菌株

[0079] 基于KCCM11016P,制备棒状杆菌属的代表性的产L-赖氨酸菌株——选自上面的细胞壁水解相关的蛋白基因失活的菌株,并且尝试其赖氨酸生产力的评估。

[0080] 将在实施例5中产生的4种重组质粒(pDZ- Δ NCg11480、pDZ- Δ NCg12107、pDZ- Δ NCg12108和pDZ- Δ NCg12986)中的每种通过电脉冲方法转化入谷氨酸棒状杆菌KCCM11016P,并且通过PCR方法制备其中靶基因通过同源重组失活的菌株。制备的失活菌株分别被命名为KCCM11016P:: Δ NCg11480、KCCM11016P:: Δ NCg12107、KCCM11016P:: Δ NCg12108和KCCM11016P:: Δ NCg12986。

[0081] 将4种菌株中的每种和对照菌株接种入含有25mL下述种子培养基的三角挡板烧瓶(25mL),并且在振荡的同时在30 $^{\circ}$ C和200rpm下培养20小时。随后将种子培养物(1mL)接种在含有24mL下述生产培养基的三角挡板烧瓶(1mL)中,并且在振荡的同时在37 $^{\circ}$ C和200rpm下培养96小时。种子培养基和生产培养基中每种组成如下。

[0082] <种子培养基(pH 7.0)>

[0083] 20g葡萄糖、10g(NH₄)₂SO₄、10g蛋白胨、5g酵母提取物、1.5g尿素、4g KH₂PO₄、8g K₂HPO₄、0.5g MgSO₄·H₂O、100 μ g生物素、1000 μ g HCl硫胺素、2000 μ g泛酸钙、2000 μ g烟酰胺(基于1L蒸馏水)

[0084] <生产培养基(pH 7.0)>

[0085] 100g葡萄糖、40g(NH₄)₂SO₄、2.5g大豆蛋白、5g玉米浆固体、3g尿素、1g KH₂PO₄、0.5g MgSO₄·H₂O、100 μ g生物素、1000 μ g HCl硫胺素、2000 μ g泛酸钙、3000 μ g烟酰胺、30g CaCO₃(基于1L蒸馏水)

[0086] 在培养完成之后,使用HPLC分析L-赖氨酸浓度,并且浓度在下面的表4中示出。表4中的结果是三组重复实验的结果,并且生产力基于平均值评估。

[0087] [表4]

		赖氨酸(g/L)			
		批次 1	批次 2	批次 3	平均
[0088]	KCCM11016P	42.7	42.6	43.0	42.8
	KCCM11016P- Δ NCg11480	44.3	44.1	44.0	44.1
	KCCM11016P- Δ NCg12107	45.1	44.9	45.2	45.1
	KCCM11016P- Δ NCg12108	48.1	48.3	48.0	48.1
	KCCM11016P- Δ NCg12986	49.3	49.1	49.2	49.2

[0089] 结果,如在上面的表4中所示出的,与亲本菌株KCCM11016P的赖氨酸生产力相比,菌株——其中NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986基因中的每种失活——的赖氨酸生产力分别增加至3.2%、5.4%、13%和15%。

[0090] 这些结果表明可以通过使参与细胞壁水解——其可以造成棒状杆菌属的微生物的细胞融合——的蛋白质失活来提高L-赖氨酸生产力。

[0091] 因此,如下进行实验以确定类似作用是否可以在如下情况中展现:其中参与细胞壁水解的蛋白质在多种棒状杆菌属的微生物中失活。

[0092] 实施例7:生产和评估衍生自产L-赖氨酸菌株KCCM10770P的细胞壁水解相关的蛋白质失活的菌株

[0093] 为了检查在具有增强的赖氨酸生物合成途径的产L-赖氨酸菌株谷氨酸棒状杆菌KCCM10770P(韩国专利号10-0924065)中细胞壁水解相关的蛋白质失活的作用是否类似于实施例6的实验结果,以与实施例6中描述的相同方式制备菌株——其中参与细胞壁水解的4种蛋白质中的每种失活。制备的菌株被命名为KCCM10770P:: Δ NCg11480、KCCM10770P:: Δ NCg12107、KCCM10770P:: Δ NCg12108和KCCM10770P:: Δ NCg12986。比较它们之间的L-赖氨酸生产力。

[0094] 为了比较上述菌株的赖氨酸生产力,以与在实施例6中相同的方式培养这些菌株和对照菌株。在培养完成之后,使用HPLC分析的L-赖氨酸浓度在下面的表5中示出。表5中的结果是三组重复实验的结果,并且基于平均值评估生产力。

[0095] [表5]

		赖氨酸(g/L)			
		批次 1	批次 2	批次 3	平均
[0096]	KCCM10770P	46.0	46.3	46.1	46.1
	KCCM10770P- Δ NCg11480	47.3	47.1	47.0	47.1
	KCCM10770P- Δ NCg12107	48.0	48.2	48.1	48.1
	KCCM10770P- Δ NCg12108	51.7	51.9	51.6	51.7
	KCCM10770P- Δ NCg12986	53.1	52.9	52.1	52.7

[0097] 结果,如在上面的表5中示出的,与亲本菌株KCCM10770P的赖氨酸生产力相比,菌株——其中NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986基因中的每种失活——的赖氨酸生

产力分别增加至2.2%、4.3%、12.1%和14.2%。

[0098] 因此,发现了在谷氨酸棒状杆菌KCCM10770P(韩国专利号10-0924065)中,通过与在实施例6中相同的方式使参与细胞壁水解的蛋白质失活也提高了L-赖氨酸生产力。

[0099] 实施例8:生产和评估衍生自产L-赖氨酸菌株KCCM11347P的细胞壁水解相关的蛋白质失活的菌株

[0100] 为了检查通过人工修饰制备的产L-赖氨酸菌株谷氨酸棒状杆菌KCCM11347P(该微生物已经被命名为KFCC10750并且利用根据布达佩斯条约的国际保藏机构重新保藏,并且然后被指定KCCM11347P的保藏登录号;韩国专利号10-0073610)中细胞壁水解相关的蛋白质失活的作用,以与在实施例6中描述的相同方式制备菌株——其中参与细胞壁水解的4种蛋白质中的每种失活。制备的菌株被命名为KCCM11347P:: Δ NCg11480、KCCM11347P: Δ NCg12107、KCCM11347P:: Δ NCg12108和KCCM11347P: Δ NCg12986。比较它们之间的L-赖氨酸生产力。

[0101] 为了比较上述菌株的赖氨酸生产力,以与在实施例6中相同的方式培养这些菌株和对照菌株。在培养完成之后,使用HPLC分析L-赖氨酸浓度,并且在下面的表6中示出。表6中的结果是三组重复实验的结果,并且基于平均值评估生产力。

[0102] [表6]

	赖氨酸(g/L)			
	批次 1	批次 2	批次 3	平均
KCCM11347P	38.2	38.6	38.3	38.4
[0103] KCCM11347P- Δ NCg11480	39.0	39.4	39.1	39.2
KCCM11347P- Δ NCg12107	39.1	39.5	39.3	39.3
KCCM11347P- Δ NCg12108	39.8	40.2	39.9	42.9
KCCM11347P- Δ NCg12986	39.9	40.3	40.1	43.9

[0104] 结果,如在上面的表6中示出的,与亲本菌株KCCM11347P的赖氨酸生产力相比,菌株——其中NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986基因中的每种失活——的赖氨酸生产力分别增加至2%、2.4%、11.7%和14.4%。

[0105] 因此,发现了在谷氨酸棒状杆菌KCCM11347P(韩国专利号10-0073610)中,通过与在实施例6和7中相同的方式使参与细胞壁水解的蛋白质失活也提高了L-赖氨酸生产力。

[0106] 实施例9:生产和评估衍生自产L-赖氨酸菌株CJ3P的细胞壁水解相关的蛋白质失活的菌株

[0107] 为了检查谷氨酸棒状杆菌CJ3P(Binder et al.Genome Biology 2012,13:R40)——其通过在野生型谷氨酸棒状杆菌中引入3种修饰[pyc(P458S)、hom(V59A)和lysC(T311I)]而生产L-赖氨酸——中细胞壁水解相关的蛋白质失活的作用是否类似于实施例6、7和8的实验结果,以与在实施例6中描述的相同方式制备菌株——其中参与细胞壁水解的4种蛋白质中的每种失活。制备的菌株被命名为CJ3P:: Δ NCg11480、CJ3P:: Δ NCg12107、CJ3P:: Δ NCg12108和CJ3P:: Δ NCg12986。比较它们之间的L-赖氨酸生产力。

[0108] 为了比较上述菌株的赖氨酸生产力,以与在实施例6中相同的方式培养这些菌株

和对照菌株。在培养完成之后,使用HPLC分析的L-赖氨酸浓度在下面的表7中示出。表7中的结果是三组重复实验的结果,并且基于平均值评估生产力。

[0109] [表7]

		赖氨酸(g/L)			平均
		批次 1	批次 2	批次 3	
	CJ3P	7.8	8.0	7.9	7.9
[0110]	CJ3P- Δ NCg11480	8.3	8.0	8.1	8.1
	CJ3P- Δ NCg12107	8.0	7.9	8.1	8.0
	CJ3P- Δ NCg12108	8.8	8.9	9.0	8.9
	CJ3P- Δ NCg12986	9.1	9.2	9.2	9.2

[0111] 结果,如在上面的表7中示出的,与亲本菌株CJ3P的赖氨酸生产力相比,菌株——其中NCg11480、NCg12107、NCg12108和NCg12986基因中的每种失活——的赖氨酸生产力分别增加至3%、1.3%、12.7%和16%。

[0112] 因此,发现了在谷氨酸棒状杆菌CJ3P中,通过与在实施例6、7和8中相同的方式使参与细胞壁水解的蛋白质失活也提高了L-赖氨酸生产力。

[0113] 实施例10:生产和评估衍生自产L-赖氨酸菌株KCCM11016P的细胞壁水解相关的蛋白质同时失活的菌株

[0114] 在从上述实施例确认了当在产L-赖氨酸菌株棒状杆菌属中使参与细胞壁水解的蛋白质中的每种失活时,L-赖氨酸生产力增加,当2种相关蛋白质同时失活时,尝试鉴定L-赖氨酸生产力是否也将增加。

[0115] 因此,实施下列实验以确认参与产L-赖氨酸菌株棒状杆菌属中细胞壁水解的蛋白质同时失活的作用。以与在实施例6中相同的方式制备菌株,其中参与细胞壁水解的两种类型的蛋白基因(NCg12108和NCg12986)同时失活,当蛋白质中的每种是有缺陷的时,它们在增强L-赖氨酸生产力中是高效的。制备的菌株被命名为KCCM11016P:: Δ NCg12108/ Δ NCg12986。比较L-赖氨酸生产力。

[0116] 为了比较上述菌株的赖氨酸生产力,以与在实施例6中相同的方式培养该菌株和对照菌株。在培养完成之后,使用HPLC分析的L-赖氨酸浓度在下面的表8中示出。表8中的结果是三组重复实验的结果,并且基于平均值评估生产力。

[0117] [表8]

		赖氨酸(g/L)			平均
		批次 1	批次 2	批次 3	
[0118]	KCCM11016P	43.4	43.1	43.2	43.2
	KCCM11016P- Δ NCg12108/ Δ NCg12986	52.6	52.4	52.7	52.6

[0119] 结果,如在表8中示出的,与亲本菌株KCCM11016P的赖氨酸生产力相比,菌株——其中NCg12108和NCg12986基因同时失活——的赖氨酸生产力增加至21.6%。

[0120] 该结果表明甚至当参与棒状杆菌属微生物中细胞壁水解的不仅一种蛋白质而且

两种或更多种蛋白质同时失活时,L-赖氨酸生产力可以提高。

[0121] 就此而言,上述菌株KCCM11016P- Δ NCg12986被命名为CA01-2292。CA01-2292利用根据布达佩斯条约的国际保藏机构韩国微生物培养中心(KCCM)保藏,并且然后指定KCCM11627P的保藏登录号。

[0122] 基于这些结果,确认了产L-赖氨酸菌株通过调节发酵期间的细胞裂解具有增强L-赖氨酸生产力的作用,其中参与细胞壁水解的蛋白质与它们的内源活性相比失活。另外,也确认了当参与细胞壁水解的不仅一种而且两种或更多种蛋白质同时失活时,L-赖氨酸生产力可以提高,从而提供了生产L-赖氨酸的新型菌株。

[0123] 虽然已经参照具体的说明性实施方式描述了本公开内容,但是本公开内容所属领域的技术人员将理解本公开内容可以以其它具体形式体现而不背离本公开内容的技术精神或基本特征。因此,上面描述的实施方式被在所有方面被视为是说明性的并且不是限制性的。而且,本公开内容的范围由所附权利要求书而不是详细描述限定,并且应当理解,源自这些含义和本公开内容的范围的所有修改或变化和其等价物包含在所附权利要求书的范围内。

[0124] 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

[0125] 国际表格

[0126] 原始保藏接收证明

[0127] 由该页下部确定的国际保藏机构根据第7.1条发出

[0128] 至:CJ第一制糖株式会社

[0129] CJ第一制糖中心

[0130] 330,DONGHO-RO,JUNG-GU,首尔,

[0131] 100-400,大韩国民

[0132]	I. 微生物鉴定	
	由保藏人提供的标识参考： 谷氨酸棒状杆菌 CA01-2292	由国际保藏机构提供的登录号： KCCM11627P
	II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
	如上 I 标识的微生物带有： <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用，用叉号标记)	
	III. 收到和接收	
	该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物，其于 2014 年 12 月 5 日收到。	
V. 国际保藏机构		
名称：韩国微生物保藏中心 地址：45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 120-861 大韩民国	具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名（盖章）： 日期：2014 年 12 月 5 日	

[0133] 证明上述翻译与原文内容没有相互违背

[0134] 2015年7月3日

[0135] 专利代理人Son Min印

[0001] <110> CJ第一制糖株式会社
 [0002] <120> 具有L-赖氨酸生产力的微生物和使用其生产L-赖氨酸的方法
 [0003] <130> OPA16081
 [0004] <150> KR 10-2015-0095528
 [0005] <151> 2015-07-03
 [0006] <160> 26
 [0007] <170> KopatentIn 2.0
 [0008] <210> 1
 [0009] <211> 604
 [0010] <212> PRT
 [0011] <213> 棒状杆菌属
 [0012] <220>
 [0013] <221> 肽
 [0014] <222> (1) .. (604)
 [0015] <223> NCg11480
 [0016] <400> 1
 [0017] Met Thr Arg Ala Leu Ile Ala Leu Ala Val Ser Gly Ala Leu Leu Ser
 [0018] 1 5 10 15
 [0019] Ser Met Thr Pro Ala Val Ala Gln Pro Gln Asn Pro Asp Asp Ala Ala
 [0020] 20 25 30
 [0021] Ile Ala Gln Ala Glu Glu Asn Val Ser Ala Gly Asp Gly Glu Val Ala
 [0022] 35 40 45
 [0023] Arg Leu Ala Gly Ser Leu Ser Ser Thr Asp Ala Glu Ile Asn Arg Val
 [0024] 50 55 60
 [0025] Glu Leu Glu Met Gly Ala Leu Arg Glu Glu Val Asn Lys Ser Leu Val
 [0026] 65 70 75 80
 [0027] Asp Leu His Asp Ala Gln Ala Ile Ala Glu Gln Ala Arg Gln Asp Ala
 [0028] 85 90 95
 [0029] Leu Ala Ala Lys Lys Asp Leu Asp Asp Ser Gln Ala Gln Ile Glu Ala
 [0030] 100 105 110
 [0031] Ala Gln Glu Arg Leu Asp Glu Ile Ser Arg Ala Ala Tyr Arg Gln Asn
 [0032] 115 120 125
 [0033] Gly Thr Ser Lys Gly Leu Ser Gly Ile Ser Gly Asn Gly Asn Ser Glu
 [0034] 130 135 140
 [0035] Asp Ala Leu Asp Arg Gln Thr Tyr Leu Arg Thr Ser Ala Glu Lys Gln
 [0036] 145 150 155 160
 [0037] Gln Ala Ala Val Glu Glu Leu Asp Arg Leu Arg Thr Glu Asn Ala Asn
 [0038] 165 170 175
 [0039] Lys Glu Ser Val Leu Arg Gln Ala Arg Ile Val Ala Glu Gln Arg Glu
 [0040] 180 185 190
 [0041] Ala Glu Ala Val Glu Lys Gln Val Gln Thr Glu Ala Ala Ile Ala Ala

[0042]	195	200	205
[0043]	Asn Ser Glu Gln Leu Asn Val Leu Thr Asn Asn Arg Ser Thr Leu Val		
[0044]	210	215	220
[0045]	Ala Gln Arg Asp Gly Ala Glu Arg Asn Leu Ala Ile Ala Arg Ala Gln		
[0046]	225	230	235
[0047]	Ala Asp Asn Leu Gln Gly Gln Arg Ala Glu Tyr Glu Glu Phe Gln Gln		
[0048]		245	250
[0049]	Ala Glu Gln Ala Arg Ile Gln Ala Glu Ala Glu Ala Gln Ala Ala Ala		255
[0050]		260	265
[0051]	Glu Glu Lys Arg Arg Ala Asp Glu Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Glu		
[0052]		275	280
[0053]	Ala Gln Glu Ala Ala Gln Gln Ala Gln Ala Ala Glu Glu Ala Gln Ala		
[0054]		290	295
[0055]	Ala Gln Ala Ala Glu Thr Ala Gln Ala Gln Ala Ala Gln Ala Ala Glu		
[0056]	305	310	315
[0057]	Thr Gln Ala Ala Gln Ala Ala Gln Ala Gln Ala Glu Ala Asn Asp Arg		
[0058]		325	330
[0059]	Ala Ala Ala Gln Gln Arg Ala Ala Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Gln		335
[0060]		340	345
[0061]	Ala Gln Arg Glu Ala Asp Ala Gln Ala Ala Asn Asp Ala Gln Ala Gln		
[0062]		355	360
[0063]	Ala Leu Arg Glu Gln Ala Leu Thr Ala Ala Ser Ile Ala Ala Ala Ala		
[0064]		370	375
[0065]	Leu Ile Ala Ala Ser Gln Ser Ser His Ala Thr Thr Gln Asn Pro Tyr		
[0066]	385	390	395
[0067]	Pro Thr Asp Glu Asp Ala Asp Pro Thr Asp Ile Ala Asp Ile Gln Gly		
[0068]		405	410
[0069]	Pro Thr Gln Pro Gly Thr Gly Glu Ser Gly Asp Ser Gln Ser Asn Ser		
[0070]		420	425
[0071]	Ser Asp Asn Asp Ser Thr Gly Asn Asp Ser Thr Gly Ser Asp Ser Ser		
[0072]		435	440
[0073]	Asp Ser Asp Ser Ser Gly Asn Asp Ser Ser Glu Val Ile Ser Gly Asp		
[0074]		450	455
[0075]	Arg Ser Ala Gln Ile Glu Thr Val Ile Ala Arg Ala Met Ser Gln Leu		
[0076]	465	470	475
[0077]	Gly Val Gln Tyr Ala Trp Gly Gly Gly Asn Ala Asn Gly Pro Thr Leu		
[0078]		485	490
[0079]	Gly Ile Arg Asp Gly Gly Val Ala Asp Ser Tyr Gly Asp Tyr Asn Lys		
[0080]		500	505
[0081]	Val Gly Phe Asp Cys Ser Gly Leu Thr Leu Tyr Ala Phe Ala Gly Val		
[0082]		515	520
[0083]	Gly Ile Ser Leu Pro His Tyr Thr Gly Tyr Gln Tyr Gln His Gly Thr		525

[0084]	530	535	540
[0085]	Lys Val Ser Pro Ser Glu Met Gln Arg Gly Asp Leu Ile Phe Tyr Gly		
[0086]	545	550	555 560
[0087]	Pro Gly Ala Ser Gln His Val Ala Ile Tyr Leu Gly Asp Gly Gln Met		
[0088]		565	570 575
[0089]	Ile Glu Ala Pro Asn Ser Gly Ser Val Val Lys Ile Ser Pro Val Arg		
[0090]		580	585 590
[0091]	Trp Ser Gly Met Thr Glu Ser Val Val Arg Leu Ile		
[0092]		595	600
[0093]	<210> 2		
[0094]	<211> 349		
[0095]	<212> PRT		
[0096]	<213> 棒状杆菌属		
[0097]	<220>		
[0098]	<221> 肽		
[0099]	<222> (1) .. (349)		
[0100]	<223> NCg12107		
[0101]	<400> 2		
[0102]	Met Asn Glu Val Asp Arg Gly Phe Leu Lys Met Phe Gly Arg Arg Trp		
[0103]	1	5	10 15
[0104]	Val Ser Val Val Ala Ser Cys Val Ile Ala Ser Thr Leu Ile Leu Val		
[0105]		20	25 30
[0106]	Pro Ser His Ser Gly Ala Glu Glu Val Asp Gln Leu Ile Ala Asp Ile		
[0107]		35	40 45
[0108]	Glu His Val Ser Gln Glu Thr Ser Ala Gln Asn Glu Glu Val Lys Gln		
[0109]		50	55 60
[0110]	Leu Glu Ile Asp Ile Glu Ala Arg Glu Val Thr Ile Lys Glu Val Gln		
[0111]	65	70	75 80
[0112]	Glu Gln Ser Val Ser Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Gln Ala Ser Glu Asn		
[0113]		85	90 95
[0114]	Val Glu Ala Tyr Arg Ser Glu Ile Asn Arg Ile Ala Gln Ala Lys Tyr		
[0115]		100	105 110
[0116]	Arg Gly Thr Val Thr Asp Pro Leu Ser Ile Ala Val Ser Ala Glu Asp		
[0117]		115	120 125
[0118]	Pro Gln Asn Val Ile Asp Arg Met Ser Tyr Leu Ser Thr Leu Thr Lys		
[0119]		130	135 140
[0120]	Ser Thr Ser Asp Val Val Glu Ser Leu Asn Ala Glu Thr Glu Lys Ser		
[0121]	145	150	155 160
[0122]	Ala Glu Ala Val Tyr Gln Ala Asn Arg Thr Lys Ala Glu Ala Glu Phe		
[0123]		165	170 175
[0124]	Gln Leu Gly Gln Leu Lys Val Arg Gln Ala Glu Leu Glu Ser Glu Lys		
[0125]		180	185 190

[0126]	Glu Ala Leu Asp Gly Arg Lys Ser Glu Ile Arg Asp Arg Val Asp Ala
[0127]	195 200 205
[0128]	Leu Thr Pro Gln Glu Arg Glu Met Trp Val Ala Lys Asn Gly Pro Leu
[0129]	210 215 220
[0130]	Asp Ile Asp Leu Thr Asp Leu Leu Gly Leu Ser Ala Ala Thr Ser Gly
[0131]	225 230 235 240
[0132]	Ala Val Asp Ala Ala Leu Ser Lys Leu Gly Ser Pro Tyr Gly Trp Gly
[0133]	245 250 255
[0134]	Gly Ile Gly Pro Asn Glu Phe Asp Cys Ser Gly Leu Ile Tyr Trp Ala
[0135]	260 265 270
[0136]	Tyr Gln Gln Met Gly Lys Thr Leu Pro Arg Thr Ser Gln Ala Gln Met
[0137]	275 280 285
[0138]	Ala Gly Gly Thr Pro Val Ser Arg Asp Glu Leu Gln Pro Gly Asp Val
[0139]	290 295 300
[0140]	Ile Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Thr His Val Gly Leu Tyr Ile Gly Asp
[0141]	305 310 315 320
[0142]	Gly Lys Ile Val His Ala Ser Asp Tyr Gly Ile Pro Val Gln Val Val
[0143]	325 330 335
[0144]	Ser Val Asp Ser Ala Pro Phe Tyr Gly Ala Arg Arg Tyr
[0145]	340 345
[0146]	<210> 3
[0147]	<211> 209
[0148]	<212> PRT
[0149]	<213> 棒状杆菌属
[0150]	<220>
[0151]	<221> 肽
[0152]	<222> (1) .. (209)
[0153]	<223> NCg12108
[0154]	<400> 3
[0155]	Met Gly Lys His Arg Arg Asn Asn Ser Asn Ala Thr Arg Lys Ala Val
[0156]	1 5 10 15
[0157]	Ala Ala Ser Ala Val Ala Leu Gly Ala Thr Ala Ala Ile Ala Ser Pro
[0158]	20 25 30
[0159]	Ala Gln Ala Ala Glu Val Val Val Pro Gly Thr Gly Ile Ser Val Asp
[0160]	35 40 45
[0161]	Ile Ala Gly Ile Glu Thr Thr Pro Gly Leu Asn Asn Val Pro Gly Ile
[0162]	50 55 60
[0163]	Asp Gln Trp Ile Pro Ser Leu Ser Ser Gln Ala Ala Pro Thr Ala Tyr
[0164]	65 70 75 80
[0165]	Ala Ala Val Ile Asp Ala Pro Ala Ala Gln Ala Ala Pro Ala Ala Ser
[0166]	85 90 95
[0167]	Thr Gly Gln Ala Ile Val Asp Ala Ala Arg Thr Lys Ile Gly Ser Pro

[0168]	100	105	110
[0169]	Tyr Gly Trp Gly Ala Thr Gly Pro Asn Ala Phe Asp Cys Ser Gly Leu		
[0170]	115	120	125
[0171]	Thr Ser Trp Ala Tyr Ser Gln Val Gly Lys Ser Ile Pro Arg Thr Ser		
[0172]	130	135	140
[0173]	Gln Ala Gln Ala Ala Gln Gly Thr Pro Val Ala Tyr Ser Asp Leu Gln		
[0174]	145	150	155
[0175]	Ala Gly Asp Ile Val Ala Phe Tyr Ser Gly Ala Thr His Val Gly Ile		
[0176]	165	170	175
[0177]	Tyr Ser Gly His Gly Thr Val Ile His Ala Leu Asn Ser Ser Thr Pro		
[0178]	180	185	190
[0179]	Leu Ser Glu His Ser Leu Asp Tyr Met Pro Phe His Ser Ala Val Arg		
[0180]	195	200	205
[0181]	Phe		
[0182]	<210> 4		
[0183]	<211> 414		
[0184]	<212> PRT		
[0185]	<213> 棒状杆菌属		
[0186]	<220>		
[0187]	<221> 肽		
[0188]	<222> (1) .. (414)		
[0189]	<223> NCg12986		
[0190]	<400> 4		
[0191]	Met Asp Glu Leu Tyr Pro Leu Ile Ile Leu Asn Met Asn Asp Gly Arg		
[0192]	1	5	10
[0193]	Ser Arg Val Ser Lys Val Leu Arg Val Gly Asp Arg Ser Pro Arg Val		
[0194]	20	25	30
[0195]	Ala Glu Val Arg Thr Thr Leu Ala Arg Leu Gly Val Ile Glu Gly Tyr		
[0196]	35	40	45
[0197]	Ser Arg Glu Met Ser Ala Lys Thr Glu Ser Gln Lys Phe His Glu Glu		
[0198]	50	55	60
[0199]	Glu Thr Leu Phe Asp Glu Glu Leu Ser Leu Ser Ile Lys Ser Phe Gln		
[0200]	65	70	75
[0201]	Gln Ala Arg Gly Val Val Pro Ser Gly Leu Ile Asp Asp Pro Thr Leu		
[0202]	85	90	95
[0203]	Arg Ala Ile Arg Glu Ala Ser Tyr Thr Leu Gly Thr Arg Val Leu Ala		
[0204]	100	105	110
[0205]	Tyr Gln Pro Gly Asn Gln Leu Val Gly Asp Asp Val Val Glu Ile Gln		
[0206]	115	120	125
[0207]	Ser His Leu Gln Glu Leu Gly Phe Tyr Ala Asp Arg Val Asp Gly His		
[0208]	130	135	140
[0209]	Phe Gly Glu Leu Thr His Lys Ala Val Met Asn Tyr Gln Leu Asn Tyr		

[0210]	145	150	155	160
[0211]	Gly Met Gln Val Asp Gly Ile Cys Gly Pro Asp Thr Ile Arg Ala Leu			
[0212]		165	170	175
[0213]	Ser Arg Leu Gly Leu Arg Ile Lys Gly Gly Ser Ala Gln Ala Ile Arg			
[0214]		180	185	190
[0215]	Glu Arg Glu Arg Met Arg Asn Ala Gly Pro Arg Leu Ala Gly Lys Arg			
[0216]		195	200	205
[0217]	Val Val Ile Asp Pro Ala Leu Gly Gly Ser Asn Lys Gly Gln Ile Val			
[0218]		210	215	220
[0219]	Lys Gly Pro Tyr Gly Glu Ile Ser Glu Glu Glu Ile Leu Trp Asp Leu			
[0220]		225	230	235
[0221]	Ala Thr Arg Leu Glu Gly Arg Met Ile Ala Thr Gly Met Glu Thr Ile			
[0222]		245	250	255
[0223]	Leu Ser Arg Pro His Met Asp Asp Pro Ser Ser Arg Asp Arg Ala Ser			
[0224]		260	265	270
[0225]	Ile Ala Asn Ala Phe Gly Ala Asp Leu Met Leu Ser Leu His Cys Asp			
[0226]		275	280	285
[0227]	Ser Tyr Pro Asn Glu Lys Ala Asn Gly Val Ala Ser Phe Tyr Phe Gly			
[0228]		290	295	300
[0229]	Ser Glu Asn Gly Thr Asn Ser Leu Thr Gly Glu Thr Leu Ser Ala Tyr			
[0230]		305	310	315
[0231]	Ile Gln Lys Glu Ile Val Ala Arg Thr Pro Leu Asn Asn Cys Gly Ser			
[0232]		325	330	335
[0233]	His Ala Arg Thr Trp Asp Leu Leu Arg Leu Thr Arg Met Pro Met Val			
[0234]		340	345	350
[0235]	Glu Val Val Thr Gly Tyr Leu Thr Asn Pro Asp Asp Leu Ala Val Leu			
[0236]		355	360	365
[0237]	Thr Asp Pro Gln Met Arg Asp His Ile Ala Glu Ala Ile Val Val Ala			
[0238]		370	375	380
[0239]	Val Lys Arg Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Glu Ala Gln Pro Lys Thr Gly			
[0240]		385	390	395
[0241]	Thr Phe Lys Phe Ser Glu Leu Leu Gln Ser Glu Gln Ala Gly			
[0242]		405	410	
[0243]	<210> 5			
[0244]	<211> 1815			
[0245]	<212> DNA			
[0246]	<213> 棒状杆菌属			
[0247]	<220>			
[0248]	<221> 基因			
[0249]	<222> (1) .. (1815)			
[0250]	<223> NCg11480			
[0251]	<400> 5			

[0252]	ttgaccaggg cgttgattgc gcttgcagta agcggagctt tgcttagttc catgactccg	60
[0253]	gcggtggcgc agccacagaa tccggatgac gcagccattg cacaggcaga ggaaaatggt	120
[0254]	tcggcgggcg atggggaagt cgcccgcctg gcaggatctt tgtccagcac tgacgcggaa	180
[0255]	attaaccgcg tcgagctgga aatgggtgct ctgcgtgaag aagtgaacaa gtccctcgtg	240
[0256]	gatttgcattg atgcgcaggc aatcgccgag caggcccgcc aagatgact tgcagccaag	300
[0257]	aaggatctcg atgattctca agcgcagatc gaagcagccc aagagcgcct tgatgagatt	360
[0258]	tcacgtgcag cgtatcgcca aaacggaacc tccaagggc tttcaggcat ctcgggcaat	420
[0259]	ggaaattctg aagatgcgct agatcgtcag acttacctgc gaaccagtgc ggaaaagcag	480
[0260]	caggcagctg ttgaagagct tgatcgctc cgtacggaaa acgccaacaa ggaatcgggtg	540
[0261]	ttgcgccagg cccgcctcgt tgctgagcag cgtgaggcgg aagccgtcga aaagcaagtc	600
[0262]	cagaccgagg ctgcaattgc cgcaaacagc gagcagctca atgtcttgac taacaatcgc	660
[0263]	agtacctgg ttgcccagcg tgatgggct gagcgcaact tggccatcgc tcgtgcgcag	720
[0264]	gcgataatc tgcaaggtca gcgtgctgag tacgaggaat tccagcaggc agagcaggct	780
[0265]	cgcatccagg cggaagcggg agctcaggct gctgcggagg agaagcgtcg tgccgatgag	840
[0266]	gctgctgcac aggcagccgc tgaagctcaa gaagctgcc agcaagctca ggcggcggag	900
[0267]	gaagcccaag ccgcgcaagc agctgagaca gcacaagccc aagccgcgca agctgcggaa	960
[0268]	accaagctg cacaagccgc gcaagctcag gcagaagcga atgatcgtgc cgccgcgcaa	1020
[0269]	cagcgtgctg cagaggctca agcagcagcg gaacaggcgc aacgtgaggc tgacgctcag	1080
[0270]	gcggccaacg atgcccaagc tcaggcactg cgtgaacagg cgctcaccgc agcctccatc	1140
[0271]	gctgcggctg ctctaattgc ggcgagccag tccagccatg ccaactactca aaatccttac	1200
[0272]	ccaactgatg aagacgcgga tccgaccgat attgcggaca tccaaggccc aacgcagcca	1260
[0273]	ggtacgggtg agtctggaga ttcccagagc aactccagcg acaacgattc cacaggcaac	1320
[0274]	gattccacag gctctgactc ttcagattca gattcctcgc gcaacgattc ttcagaggtt	1380
[0275]	atctccggcg atcgttccgc tcagattgag actgtgattg cgcgcgccat gagccagttg	1440
[0276]	ggtgtgcagt acgcatgggg tggcggtaac gctaattgcc caactctggg tatccgtgac	1500
[0277]	ggtggcgtgg cggactctta cggcgattac aacaaggttg gcttcgactg ctctggactg	1560
[0278]	accttgatg cgtttgcggg tgtgggaatt tcacttctc actacacggg ctaccagtac	1620
[0279]	cagcacggca ccaagtgct gccttctgag atgcaacgtg gcgatctgat cttctatggt	1680
[0280]	ccgggagcgt ctacgacgt ggcaatttac ctcggtgatg gtcagatgat tgaggctccg	1740
[0281]	aattcgggtt ctgtcgtgaa gatttctcct gttcgtgga gcggaatgac cgagagcgtg	1800
[0282]	gtacgcctca tttag	1815
[0283]	<210>	6
[0284]	<211>	1050
[0285]	<212>	DNA
[0286]	<213>	棒状杆菌属
[0287]	<220>	
[0288]	<221>	基因
[0289]	<222>	(1) .. (1050)
[0290]	<223>	NCg12107
[0291]	<400>	6
[0292]	ttgaatgagg ttgatagggg atttttgaag atgtttggtc gccgttgggt gagcgttgtg	60
[0293]	gcgtcatgtg ttatcgcaag cacgctgatt ctgggtgcctt cgcattccgg tgccgaggaa	120

[0294]	gtcgatcaac tgattgctga tatcgagcat gtctctcagg aaacgtctgc ccagaatgag	180
[0295]	gaagtcaaac agcttgagat tgatattgag gctcgtgagg tcacgatcaa ggaagtccag	240
[0296]	gagcagtcgg taagctaccg tgaggcggt gatcaagcat cggagaatgt cgaagcttat	300
[0297]	cgttcggaga tcaatcggat cgctcaggcg aagtatcgtg gcacagtcac ggatcctttg	360
[0298]	agcattgcgg tgtctgcaga agatccacaa aacgtgattg atcggatgag ctacctttca	420
[0299]	acgttgacta agtccactag tgatgtggtt gaatccctca acgcggagac tgagaagtcc	480
[0300]	gcagaagctg tgtatcaagc aaacctact aaggcggaag cggagttcca gttggggcag	540
[0301]	ctgaaggtac gccaggcga gcttgaatct gaaaaggaag cattggatgg tcgaaaatcg	600
[0302]	gagatccgag accgggtgga tgccctgacg ccacaggagc gggaaatgtg ggttgctaag	660
[0303]	aatggtccat tggacattga tctgactgat ttgcttggtc tttccgctgc gacttcgggt	720
[0304]	gcggtggatg ctgccttgc taagttggga agcccttatg gttggggtgg cattggccca	780
[0305]	aatgagtttg attgctcagg tttgatctat tgggcgtatc agcagatggg taagactttg	840
[0306]	ccacgtacgt ctcaagctca gatggctggc ggaacgccg tgagcagaga tgagctgcag	900
[0307]	cctggcgatg tcattggata ttaccaggt gctactcacg tgggactgta tattggggac	960
[0308]	gaaagattg tgcacgctc agactacgga atccctgtgc aggtggtatc tgttgattca	1020
[0309]	gcaccgtttt atggtgcgcg tcgctaactaa	1050
[0310]	<210> 7	
[0311]	<211> 630	
[0312]	<212> DNA	
[0313]	<213> 棒状杆菌属	
[0314]	<220>	
[0315]	<221> 基因	
[0316]	<222> (1) .. (630)	
[0317]	<223> NCg12108	
[0318]	<400> 7	
[0319]	gtggtaagc accgtcga caattcaaac gcaactcga aggctgtagc agcatctgca	60
[0320]	gttgcgcttg gagcaaccgc agctatgcc tccccagcac aggcagctga ggttgttggt	120
[0321]	cctggcaccg gaatcagcgt tgacatcgtt ggcacgaga ccaactccagg tcttaacaac	180
[0322]	gttccaggaa tcgatcagtg gateccttcc cttagcagcc aggcagctcc tactgcttac	240
[0323]	gcagccgtca ttgatgcacc tgcagcacag gctgcacctg cagcaagcac cggtcaggca	300
[0324]	atcgttgatg cagcgcgac caagattggt tccccatac gttggggtgc taccggtcct	360
[0325]	aacgctttcg actgctccgg cttacctca tgggcataca gccaggttgg caagtccatc	420
[0326]	ccacgtacct cccagctca ggctgcacag ggcacccctg ttgcttactc tgaccttcag	480
[0327]	gctggcgaca tcgttgcgtt ctactccggc gctaccacg ttggtatcta ctccggccac	540
[0328]	ggcaccgtta tccacgact gaacagcagc acccctctgt ctgagcactc cttggattac	600
[0329]	atgccattcc actctgcagt tcgtttctaa	630
[0330]	<210> 8	
[0331]	<211> 1245	
[0332]	<212> DNA	
[0333]	<213> 棒状杆菌属	
[0334]	<220>	
[0335]	<221> 基因	

- [0336] <222> (1) .. (1245)
- [0337] <223> NCg12986
- [0338] <400> 8
- [0339] gtggatgaac tatatccatt gataatittg aacatgaatg atggaaggag cagggtgtct 60
- [0340] aaagtcctga gagttggcga tcgcagcccg cgcgtggcag aagtgcgcac tacgctcgct 120
- [0341] cgctcgggtg tgattgaagg ctattccagg gagatgtctg caaagacaga atcccagaag 180
- [0342] ttccacgaag aagagacgct tttegcagaa gaactcagcc tcagcatcaa gtcatccag 240
- [0343] caagctcgag gagtcgttcc ctccgggctt attgacgacc ccaccctgcg cgcaatccgc 300
- [0344] gaagcctcct acaccctggg aaccgcgctg ctggcctacc agcccggcaa ccagcttgtt 360
- [0345] ggtgacgacg ttgtagaaat ccaatcccat ctccaagagc tcggcttcta cgccgaccgt 420
- [0346] gtggatggac attttggcga gctcacacac aaagctgtga tgaactacca actcaactac 480
- [0347] ggcatgcagg tagacggcat ctgtggcct gacaccatcc gtgcgctgtc ccgacttgg 540
- [0348] ctgcgcatca aggggtgctc tgctcaagct atccgtgaac gcgaacgcat gcgcaatgca 600
- [0349] ggcccacgtc ttgctggcaa gcgtgtggtc attgatcctg cgcttggggg ctccaacaag 660
- [0350] ggtcagatcg tgaagggccc ctacggtag atctctgagg aagaaatcct ctgggatttg 720
- [0351] gccaccgcc tggaaggctg catgatcgca acaggcatgg aaaccattct gtgcgccccg 780
- [0352] cacatggatg atcccagcag ccgtgatcgc gcgtgatcgc cgaatgcttt cggcgctgac 840
- [0353] ctcatgctga gcctgcactg cgattcctac ccgaatgaaa aagctaacgg cgtggccagc 900
- [0354] ttctacttcg gttcggaaaa cggcaccaac tccttgaccg gtgaaacgct ctccgcgtac 960
- [0355] atccaaaaag agatcgttgc ccgcaccca ctgaacaact gtggcagcca tgcccgtacc 1020
- [0356] tgggatctgc tgcgcctcac gcgcatgccc atgggtggaag ttgtcaccgg ttacctcacc 1080
- [0357] aaccccgatg acctggcagt tctgactgat ccacaaatgc gtgatcacat tgccgaagcc 1140
- [0358] atcgttgtcg ccgtcaagcg cctgtacctc cttgatgagg aagcacagcc caagaccgga 1200
- [0359] acctcaagt tctctgagct gttgcaatca gagcaggctg gctaa 1245
- [0360] <210> 9
- [0361] <211> 25
- [0362] <212> DNA
- [0363] <213> 人工序列
- [0364] <220>
- [0365] <223> 试剂盒引物
- [0366] <400> 9
- [0367] acctacaaca aagctctcat caacc 25
- [0368] <210> 10
- [0369] <211> 24
- [0370] <212> DNA
- [0371] <213> 人工序列
- [0372] <220>
- [0373] <223> 试剂盒引物
- [0374] <400> 10
- [0375] ctaccctgtg gaacacctac atct 24
- [0376] <210> 11
- [0377] <211> 34

- [0378] <212> DNA
[0379] <213> 人工序列
[0380] <220>
[0381] <223> NCg11480引物
[0382] <400> 11
[0383] ccggggatcc tctagaacct tgaaacttcc actc 34
[0384] <210> 12
[0385] <211> 36
[0386] <212> DNA
[0387] <213> 人工序列
[0388] <220>
[0389] <223> NCg11480引物
[0390] <400> 12
[0391] ctctgacga actatttcaa atcccctatc aacctc 36
[0392] <210> 13
[0393] <211> 36
[0394] <212> DNA
[0395] <213> 人工序列
[0396] <220>
[0397] <223> NCg11480引物
[0398] <400> 13
[0399] caccgaggta aattgcatg caagcgcaat caacgc 36
[0400] <210> 14
[0401] <211> 34
[0402] <212> DNA
[0403] <213> 人工序列
[0404] <220>
[0405] <223> NCg11480引物
[0406] <400> 14
[0407] gcaggtcgac tctagaaacc acacattatc gatc 34
[0408] <210> 15
[0409] <211> 35
[0410] <212> DNA
[0411] <213> 人工序列
[0412] <220>
[0413] <223> NCg12107引物
[0414] <400> 15
[0415] ccggggatcc tctagagcac agggcaccctc tgttg 35
[0416] <210> 16
[0417] <211> 36
[0418] <212> DNA
[0419] <213> 人工序列

- [0420] <220>
[0421] <223> NCg12107引物
[0422] <400> 16
[0423] ctctgacga actatttcaa atcccctatc aacctc 36
[0424] <210> 17
[0425] <211> 36
[0426] <212> DNA
[0427] <213> 人工序列
[0428] <220>
[0429] <223> NCg12107引物
[0430] <400> 17
[0431] gaggttgata ggggatttga aatagttcgt caggag 36
[0432] <210> 18
[0433] <211> 34
[0434] <212> DNA
[0435] <213> 人工序列
[0436] <220>
[0437] <223> NCg12107引物
[0438] <400> 18
[0439] gcaggtcgac tctagaaacc acacattatc gatc 34
[0440] <210> 19
[0441] <211> 34
[0442] <212> DNA
[0443] <213> 人工序列
[0444] <220>
[0445] <223> NCg12108引物
[0446] <400> 19
[0447] ccgggatcc tctagagaac ccttagtagt tggg 34
[0448] <210> 20
[0449] <211> 36
[0450] <212> DNA
[0451] <213> 人工序列
[0452] <220>
[0453] <223> NCg12108引物
[0454] <400> 20
[0455] gtaatccaag gaggctcac cactgatga aactcc 36
[0456] <210> 21
[0457] <211> 36
[0458] <212> DNA
[0459] <213> 人工序列
[0460] <220>
[0461] <223> NCg12108引物

- [0462] <400> 21
[0463] ggagtttcat cagtgggtga gcactccttg gattac 36
[0464] <210> 22
[0465] <211> 34
[0466] <212> DNA
[0467] <213> 人工序列
[0468] <220>
[0469] <223> NCg12108引物
[0470] <400> 22
[0471] gcaggtcgac tctagacgag cctcaatata aatc 34
[0472] <210> 23
[0473] <211> 34
[0474] <212> DNA
[0475] <213> 人工序列
[0476] <220>
[0477] <223> NCg12986引物
[0478] <400> 23
[0479] ccgggatcc tctagattag gagaaacct gagc 34
[0480] <210> 24
[0481] <211> 36
[0482] <212> DNA
[0483] <213> 人工序列
[0484] <220>
[0485] <223> NCg12986引物
[0486] <400> 24
[0487] atcagtcaga actgccagga ctgcagtaag aatacc 36
[0488] <210> 25
[0489] <211> 36
[0490] <212> DNA
[0491] <213> 人工序列
[0492] <220>
[0493] <223> NCg12986引物
[0494] <400> 25
[0495] ggtattctta ctgcagtcct ggcagttctg actgat 36
[0496] <210> 26
[0497] <211> 34
[0498] <212> DNA
[0499] <213> 人工序列
[0500] <220>
[0501] <223> NCg12986引物
[0502] <400> 26
[0503] gcaggtcgac tctagagttg aggcgtttgg atac 34