

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/11

C12N 15/63



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03133131.9

[43] 公开日 2004 年 9 月 1 日

[11] 公开号 CN 1524956A

[22] 申请日 1997. 12. 5 [21] 申请号 03133131.9
分案原申请号 97120820.4

[30] 优先权

[32] 1996. 12. 5 [33] JP [31] 325659/1996

[71] 申请人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 荒木政行 杉本雅一 吉原康彦
中松亘

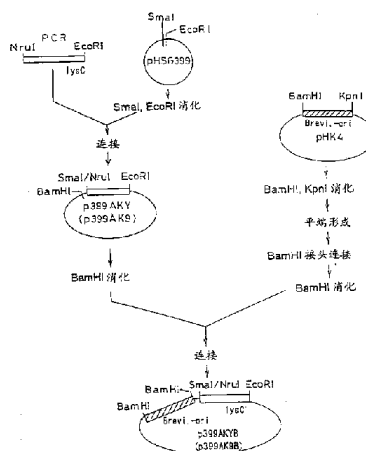
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘冬

权利要求书 1 页 说明书 63 页 附图 14 页

[54] 发明名称 用于产生 L-赖氨酸的方法

[57] 摘要

一种具有天冬氨酸激酶的棒状杆菌(其中 L-苏氨酸和 L-赖氨酸的反馈抑制实质上被脱敏), 其包含编码二氢吡啶二甲酸还原酶的增强 DNA 序列、编码二氢吡啶甲酸还原酶的增强 DNA 序列、编码二氢吡啶甲酸合酶的增强 DNA 序列、编码二氨基庚二酸脱羧酶的增强 DNA 序列、编码天冬氨酸转氨酶的增强 DNA 序列; 一种用于产生 L-赖氨酸的方法, 该方法包括以下步骤: 在适当的培养基中培养棒状杆菌使得在所说的细菌的培养物中产生并积累 L-赖氨酸, 并从培养物收集 L-赖氨酸; 以及一种可用于产生棒状杆菌的重组 DNA。



-
1. 一种编码包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列之蛋白质的 DNA。
 2. 按照权利要求 1 的 DNA, 该 DNA 包含 SEQ ID NO: 30 所示的核苷酸序列中的 879 至 2174 位核苷酸的核苷酸序列。
 3. 载体 pVK7, 该载体在大肠杆菌和乳发酵短杆菌细胞中是可自主复制的, 并且包含一个多克隆位点和 lacZ'。

用于产生L-赖氨酸的方法

5 本申请是申请日为1997年12月5日，申请号为97120820.4，发明名称为“用于产生L-赖氨酸的方法”的发明申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及通过培养微生物产生L-赖氨酸的方法，所述的微生物是通过借助基于基因工程的技术修饰用于发酵生产氨基酸的棒状杆菌等获得的。

10 背景技术

作为饲料添加剂的赖氨酸通常通过利用属于棒状杆菌的L-赖氨酸-产生突变菌株用发酵法产生。现在已知各种L-赖氨酸-产生菌是从属于棒状杆菌的野生型菌株开始经人工突变产生的那些。

就棒状杆菌而言，公开了载体质粒，这种质粒是在细菌细胞中可自主复制的，并具有药物抗性标记基因(参见美国专利4,514,502)，并公开了用于把基因引入细菌细胞的方法(例如日本专利申请公开2207791)。也公开了通过利用以上所述的技术培养L-苏氨酸-或L-异亮氨酸-产生菌的可能性(参见美国专利4,452,890和4,442,208)。培养L-赖氨酸-产生菌的技术是已知的，在其中参与L-赖氨酸生物合成的基因掺入到载体质粒中，以便在细菌细胞中扩增该基因(例如，日本专利申请公开56-160997)。

L-赖氨酸生物合成的已知基因包括，例如，二氢吡啶二甲酸还原酶基因(日本专利申请公开7-75578)和天冬氨酸转氨酶基因(日本专利申请公开6-102028)(其中参与L-赖氨酸生物合成的基因被克隆)，以及磷酸烯醇丙酮酸羧酶基因(日本专利申请公开60-87788)，二氢吡啶二甲酸合酶基因(日本专利出版物6-55149)和二氨基庚二酸脱羧酶基因(日本专利申请公开60-62994)(其中扩增基因影响L-赖氨酸产量)。

就参与L-赖氨酸生物合成的酶而言，在以野生型使用时，经历反馈抑制的酶的情况是已知的。在这种情况下，L-赖氨酸产量通过这样一种方法得到提高，即引入具有脱敏反馈抑制之突变的基因。具体地说，已知这样的基因包括天冬氨酸激酶基因(国际出版物WO 94/25605)。

如上所述,借助 L-赖氨酸生物合成系统的基因扩增或突变基因的引入获得了成功的结果。例如,具有突变天冬氨酸激酶基因(脱敏了由赖氨酸和苏氨酸引起的固有抑制)的棒状杆菌产生大量的 L-赖氨酸(大约 25g/L)。然而,这种细菌与不具有突变天冬氨酸激酶基因的细菌比较生长速度降低。也报道了通过除了
5 引入突变天冬氨酸激酶基因之外进一步引入二氢吡啶二甲酸合酶基因可提高 L-赖氨酸产量(应用的和环境的微生物学, 57(6), 1746-1752(1991))。然而,这种细菌生长速度进一步降低。

就二氢吡啶二甲酸还原酶基因而言,已有人指出,二氢吡啶二甲酸还原酶的活性在引入了该基因的棒状杆菌中增加,然而,没有报道对 L-赖氨酸产量的
10 影响(日本专利申请公开 775578)。

目前,对棒状杆菌,没有出现任何人已成功通过组合 L-赖氨酸生物合成的多种基因明显改善 L-赖氨酸产量而不抑制生长的情况。也没有报道通过增强 L-赖氨酸生物合成基因改善生长的情况。

发明内容

15 本发明的目的是通过使用编码以下酶的各种遗传物质 DNA 序列改善棒状杆菌 L-赖氨酸产量:天冬氨酸激酶(如果必要,在下文中称为“AK”,前提是编码 AK 蛋白质的基因在下文中称为“*lysC*”),二氢吡啶二甲酸还原酶(如果必要,在下文中称为“DDPR”,前提是编码 DDPR 蛋白质的基因在下文中称为“*dapB*”),二氢吡啶二甲酸合酶(如果必要,在下文中简化为“DDPS”,前提是编码 DDPS
20 蛋白质的基因在下文中称为“*dapA*”),二氨基庚二酸脱羧酶(如果必要,在下文中称为“DDC”,前提是编码 DDC 蛋白质的基因在下文中称为“*lysA*”),和天冬氨酸转氨酶(如果必要,在下文中称为“*AAT*”,前提是编码 AAT 蛋白质的基因在下文中称为“*aspC*”),这些酶在棒状杆菌细胞中是 L-赖氨酸生物合成的重要酶。

25 本发明的原理基于这样一种事实:L-赖氨酸产量可以通过增强突变 *lysC*(如果必要,在下文中简称为“突变 *lysC*”)、*dapA*、*dapB*、*lysA* 和 *aspC* 组合得到提高,所述 *lysC* 编码突变 AK(如果必要,在下文中简称为“突变 AK”),其中由赖氨酸和苏氨酸产生的固有抑制被脱敏。

30 即,本发明提供了在棒状杆菌细胞中可自主复制的重组 DNA,该 DNA 包含编码天冬氨酸激酶(其中实质上脱敏了 L-苏氨酸 L-赖氨酸的反馈抑制)的 DNA

序列, 编码二氢吡啶二甲酸还原酶的 DNA 序列, 编码二氢吡啶二甲酸合酶的 DNA 序列, 编码二氨基庚二酸脱羧酶的 DNA 序列和编码天冬氨酸转氨酶的 DNA 序列。

在另一方面, 本发明提供了一种具有天冬氨酸激酶的棒状杆菌(其中 L-苏氨酸和 L-赖氨酸的反馈抑制实质上被脱敏), 该棒状杆菌包含编码二氢吡啶二甲酸还原酶的增强 DNA 序列、编码二氢吡啶甲酸还原酶的增强 DNA 序列、编码二氢吡啶甲酸合酶的增强 DNA 序列、编码二氨基庚二酸脱羧酶的增强 DNA 序列、编码天冬氨酸转氨酶的增强 DNA 序列。

在另一方面, 本发明提供了一种用于产生 L-赖氨酸的方法, 该方法包括以下步骤: 在适当的培养基中培养以上所述的任一棒状杆菌使得在所说的细菌的培养物中产生并积累 L-赖氨酸, 并从培养物收集 L-赖氨酸。

本发明也提供了编码包含 SEQ ID NO: 31 所示氨基酸序列之蛋白质的 DNA 序列。所述 DNA 的实例是包含 SEQ ID NO: 30 所示的 879-2178 位核苷酸的核苷酸序列的 DNA。

本发明还提供了载体 pVK7, 其是在大肠杆菌和乳发酵短杆菌细胞中可自主复制的, 包含一个多克隆位点和 lacZ'。

在本发明中所称的棒状杆菌是在 Bergey's 细菌学手册(第 8 版 p. 599(1974)) 中限定的一组微生物, 其是无孢子-形成能力的需氧革兰氏-阳性-非抗酸棒状杆菌。棒状杆菌包括属于棒杆菌属的细菌, 属于短杆菌属的细菌(迄今为止分类为短杆菌属但现在与棒杆菌属细菌合并在一起)和与属于棒杆菌的细菌密切相关的短杆菌属的细菌。

按照本发明, 棒状杆菌的 L-赖氨酸产量可以得到提高。

附图说明

图 1 说明包含突变 *IysC* 的质粒 p399AK9B 和 p399AKYB 的构建方法。

图 2 说明包含 *dapB* 和 Brevi. -ori 质粒 pDPRB 的构建方法。

图 3 说明包含 *dapA* 和 Brevi. -ori 质粒 pDPSB 的构建方法。

图 4 说明的包含 *IysA* 的质粒 p299LYSA 的构建方法。

图 5 说明包含 *IysA* 和 Brevi. -ori 的质粒 pLYSAB 的构建方法。

图 6 说明包含 *IysC*, *dapB* 和 Brevi. -ori 的质粒 pCRCAB 的构建方法。

图 7 说明包含突变 *IysC* 和 *dapB* 的质粒 pCB 的构建方法。

图 8 说明包含 *dapA* *dapB* 和 Brevi. -ori 的质粒 pAB 的构建方法。

图 9 说明包含突变 *lysC*, *dapA*, *dapB* 和 Brevi.-ori 的质粒 pCAB 的构建方法。

图 10 说明包含突变 *lysC*, *dapA*, *dapB*, *lysA* 和 Brevi.-ori 的质粒 PCABL 的构建方法。

5 图 11 说明棒状杆菌新克隆载体 pVKG 和 pVK7 的构建方法。

图 12 说明包含 *aspC* 的质粒 pOm 的构建方法。

图 13 说明 ATCC 13869 染色体 DNA 片段上的两个 ORF。

图 14 说明 pORF1 的构建方法。

10 1 制备用于本发明的 L-赖氨酸生物合成的基因

用于本发明的 L-赖氨酸生物合成的基因分别通过以下方法获得：从 DNA 供体细菌染色体 DNA 用质粒载体或类似物构建染色体 DNA 文库，选择具有所需基因的菌株，和从所选择的菌株回收已插入了所述基因的重组 DNA。对用于本发明的 L-赖氨酸生物合成的基因的 DNA 供体没有特别的限制，只要 L-赖氨酸生物合成的所需基因表达酶蛋白质(其在棒状杆菌细胞中起作用)。然而，DNA 供体优选地是棒状杆菌。

来源于棒状杆菌的 *lysC*, *dapA*, *dapB* 和 *lysA* 的所有基因具有已知的序列。因此，可以通过按照聚合酶链反应方法(PCR; see White, T. J. 等, Trends Genet., 5, 185(1989))进行扩增来获得它们。

20 用于本发明的 L-赖氨酸生物合成的各种基因可以按照以下列举的方法获得：

(1) 突变 *lysC* 的制备

包含突变 *lysC* 的 DNA 片段可以从突变菌株制备，在所述菌株中由 L-苏氨酸和 L-赖氨酸产生的 AK 活性的协同反馈抑制实质上被脱敏(国际出版物 WO 94/25605)。这样一种突变菌株可以通过例如用诱变剂如紫外光和 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(NTG)对来源于棒状杆菌野生型菌株的一组细胞进行常规突变处理获得。AK 活性可以通过用由 Miyajima, R. 等在生物化学杂志(1968), 63(2), 139-148 中描述的方法测量。最优选的这样的突变菌株由 L-赖氨酸-产生菌 AJ 3445(FERM 1944)代表，其来源于突

30 变处理乳发酵短杆菌 ATCC 13869 野生型菌株(现在其改变的名称是

Corynebacterium alutamicum)。

另外, 突变 *IysC* 也可由包含野生型 *IysC* 的质粒 DNA 体外突变处理获得。另一方面, 突变脱敏 L-赖氨酸和 L-苏氨酸产生的对 AK 活性的协同反馈抑制的信息是十分清楚的(国际出版物 WO 94/25605)。因此, 在该信息的基础上按照
5 定点突变方法也可以制备突变 *IysC*。

可以按照例如 Saito 和 Miura(H. Saito 和 K. Miura, 生物化学生物物理学报, 72, 619(1963))的方法通过制备染色体 DNA 或按照聚合酶链反应方法(PCR; 参见 White, T. J. 等, Trends Genet., 5, 185(1989))扩增 *IysC* 从棒状杆菌分离包含
10 *IysC* 的片段。

以单链 DNA 例证性地说明 DNA 引物, 所说单链 DNA 是具有 SEQ ID NO:1 和 2 所示的核苷酸序列的 23 链节和 21 链节的, 以便扩增例如基于谷氨酸棒杆菌已知序列(参见分子微生物学(1991), 5(5), 1197-1204; Mol. Gen. Genet. (1990), 224, 317-324)的编码 *IysC* 的约 1,643 bp 的区域。可以通过采用 Applied Biosystems 生产的 DNA 合成仪 380B 型和采用 phosphoramidite 法(参见
15 Tetrahedron Letters(1981), 22, 1859)按照常规方法合成 DNA。可以通过用由 Takara Shuzo 生产的 DNA 热循环器 PJ2000 型按照供给者指定的方法和尾端 DNA 聚合酶进行 PCR。

优选的是将经 PCR 扩增的 *IysC* 与在大肠杆菌和/和/或棒状杆菌细胞中可自主复制的载体 DNA 连接制备重组 DNA, 把重组 DNA 引入预先的大肠杆菌细
20 胞中。这一过程使随后的操作容易进行。在大肠杆菌细胞中可自主复制的载体优选地是质粒载体, 其是在宿主的细胞中优选的可自主复制的, 包括例如, pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398 和 RSF1010。

当具有使得质粒可以在棒状杆菌中自主复制的能力的 DNA 片段插入到这些载体中时, 它们可以用作在大肠杆菌和棒状杆菌中可自主复制的穿梭载体。

25 这样穿梭载体包括以下载体。含有各载体的微生物和其在国际保藏单位中的保藏号(在括号)显示如下:

pHC4:	大肠杆菌 AJ12617 (FERM BP-3532)
pAJ655:	大肠杆菌 AJ11882 (FERM BP-136)
	谷氨酸棒杆菌 SR8201 (ATCC39135)
pAJ1844:	大肠杆菌 AJ11883 (FERM BP-137)

	谷氨酸棒杆菌 SR8202 (ATCC39136)
PAJ611:	大肠杆菌 AJ11884 (FERM BP-138)
pAJ3148:	谷氨酸棒杆菌 SR8203 (ATCC39137)
pAJ440:	枯草芽孢杆菌 AJ11901 (FERM BP-140)

这些载体可从其后的保藏的微生物获得。采用溶菌酶和 SDS 裂解在对数的生长期所收集的细胞，接着在 $30,000 \times g$ 下从裂解物分离以获得上清液。将聚乙二醇添加到上清液中，借助氯化铯-溴化乙锭均衡密度梯度离心进行分级分离和纯化。

- 5 可以通过按照以下方法将质粒引入来转化大肠杆菌，所述方法例如 D. M. Morrison (酶学方法, 68, 326 (1979)) 的方法或其中用氯化钙处理受体细胞以增加 DNA 渗透性的方法 (Mandel, M. 和 Higa, A., 分子生物学杂志, 53, 159 (1970))。

- 10 当按照以上所述的方法从 AK 野生菌株分离 *IysC* 时，获得野生型 *IysC*，而从 AK 突变菌株分离 *IysC* 时，获得突变 *IysC*。

- 包含野生型 *IysC* 的 DNA 片段的核苷酸序列的例子在序列表中 SEQ ID NO: 3 中显示。野生型 AK 蛋白质的 α 亚单位的氨基酸序列是从核苷酸序列推定的，其与 DNA 序列一起在序列表 SEQ ID NO: 4 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 5 中显示。野生型 AK 蛋白质的 β 亚单位的氨基酸序列是从 DNA 的核苷酸序列推定的，其与 DNA 序列一起在序列表 SEQ ID NO: 6 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 7 中显示。在各亚单位中，GTG 用作起始密码子，相应的氨基酸由甲硫氨酸代表。然而，这种代表涉及到甲硫氨酸、缬氨酸或甲酰甲硫氨酸。

- 20 对用于本发明的突变 *IysC* 没有特别的限制，只要其编码 AK (其中由 L-苏氨酸和 L-赖氨酸产生的协同反馈抑制被脱敏)。然而，突变 *IysC* 的一个例证性例子包括这样的突变，其中与 279 位 (从 N-末端开始计算) 丙氨酸残基相应的氨基酸残基改变成为非丙氨酸和非野生型 AK 氨基酸序列中的 β 亚单位中的酸性氨基酸的氨基酸残基，与 30 位 (从 N-末端开始计数) 丙氨酸残基相应的氨基酸残基改变成为非丙氨酸和非野生型 AK 氨基酸序列中的 β 亚单位中的酸性氨基酸的氨基酸残基。野生型 AK 的氨基酸序列具体来说包括作为 α 亚单位的在序列表中 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，作为 β 亚单位的在序列表中 SEQ ID NO: 7 所

示的氨基酸序列。

称为非丙氨酸和非酸性氨基酸的那些氨基酸残基优选的包括苏氨酸、精氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸和缬氨酸残基。

对相应于所要替代的氨基酸残基的密码子没有特别的限制，只要它编码所说的氨基酸残基。可以预计，依据细菌物种和细菌菌株的不同，野生型 AK 的氨基酸序列可以稍微不同。具有基于在一个或多个位置上取代，缺失或插入一个或多个氨基酸残基而不影响以上所述活性的突变的 AK 也可以用于本发明中。具有自发突变的编码 AK 的 DNA 可以通过分离这样一种 DNA 获得，该 DNA 在严格条件与例如具有 SEQ ID NO: 3 所示的一部分核苷酸序列的 DNA 杂交。本文所说的“严格条件”意指形成特异性杂交而不形成非特异性杂交的条件。用数值难于清楚表达所述条件。然而，例举性的条件是这样一种条件，在该条件下，具有高同源性的核酸(例如具有不低于 90%同源性的 DNA)相互杂交或者是这样一种条件，其温度是从熔点温度 T_m 到 $(T_m-30)^\circ\text{C}$ ，优选地是从 T_m 到 $(T_m-20)^\circ\text{C}$ ，盐浓度相当于 1x SSC，优选地相当于 0.1x SSC。

基于例如，取代、缺失或插入一个或多个氨基酸残基进行过人工突变的其它 AK 也可以使用，只要对 AK 活性实质上没有影响和对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的协同反馈抑制的脱敏没有影响。可以通过例如定点突变修饰核苷酸序列，产生特定位点的缺失或插入，由此来获得编码具有人工突变的 AK 的 DNA。也可以通过已知诱变处理方法获得具有突变的 *IysC*。诱变处理包括用羟胺或类似物体外处理包含 *IysC* 的 DNA，用诱变如紫外光或诱变剂(其是用于常规人工诱变的，如 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(NTG)或硝酸)处理具有包含 *IysC* 之 DNA 的微生物的。诱变处理后，可以通过选择编码或产生 AK(其具有 AK 活性，其氨基酸序列从经历诱变处理的 DNA 或者经历诱变处理的微生物突变的)的 DNA 或微生物测定引入了突变或者发生了突变的位点。对所引入突变的位点没有特定的限制，只要对 AK 活性实质上没有影响和对反馈抑制的脱敏没有影响。所引入的突变的数目随在蛋白质的立体结构中的氨基酸的位置和种类变化，并且没有特定的限制，只要对 AK 活性实质上没有影响和对反馈抑制的脱敏没有影响。该数目通常是 1 至 20，优选地是 1 至 10。

本领域技术人员易于测定具有以上所述的突变的相应于氨基酸序列中特定丙氨酸的残基的氨基酸残基。

通过将突变 *IysC* 质粒 p399AK9B 引入乳发酵短杆菌野生型菌株 AJ12036 菌株 (FERM BP-734) 获得的 AJ12691 菌株已于 1992 年 4 月 10 日以保藏号 FERM P-12918 保藏在国际贸易和工业部工业科学和技术机构的国立生命科学和人体技术研究所(1-3, Higashi L-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, 日本),
5 基于布达佩斯条约于 1995 年 2 月 10 日转变成国际保藏, 以保藏号 FERM BP-4999 保藏。

(2) *dapB* 的制备

可以借助 PCR 从棒状杆菌的染色体制备包含 *dapB* 的 DNA 片段。对 DNA 供体没有特别的限制, 然而, 由乳发酵短杆菌 ATCC 13869 菌株所例证。

10 对乳发酵短杆菌编码 DDPR 的 DNA 序列是已知的 (生物技术杂志, 175(9), 2743-2749(1993)), 基于该序列可以制备 PCR 的 DNA 引物。这样的 DNA 引物由分别具有序列 SEQ ID NO: 8 和 9 中所示的核苷酸序列的 23-链节 DNA 所具体例证。可以以与以上所述的有关 *IysC* 的那些相同的方式进行 DNA 的合成、PCR 和包含获得的 *dapB* 的质粒的制备。

15 包含 *dapB* 之 DNA 片段的核苷酸序列和由所述核苷酸序列编码的推断的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 10 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 11 中显示。除编码这种氨基酸序列的 DNA 片段之外, 如果对 DDPR 活性实质上没有影响, 本发明可以等同地使用编码实质上与 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列 (即具有基于例如取代、缺失或插入一个或多个氨基酸之突变的氨基酸序列) 的 DNA 片段。可以用与编码具有突变 (只要对 AK 活性实质上没有影响和对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的协同反馈抑制的脱敏没有影响) 的 AK 的 DNA 的那些相同的方式获得具有自发和人工突变的 *dapB*。
20

基于布达佩斯条约, 通过将包含以下实施例中所获得的 *dapB* 的质粒 pCRDAPB 引入到大肠杆菌 JM109 菌株中获得的转化菌株 AJ13107 已从 1995
25 年 5 月 26 日以保藏号 FERM BP-5114 国际保藏在国际贸易和工业部工业科学和技术机构的国立生命科学和人体技术研究所(1-3, Higashi L-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, 日本)。

(3) *dapA* 的制备

可以借助 PCR 从棒状杆菌的染色体制备包含 *dapA* 的 DNA 片段。对 DNA
30 供体没有特别的限制, 然而, 由乳发酵短杆菌 ATCC 13869 菌株所例证。

对乳发酵短杆菌编码 DDPS 的 DNA 序列是已知的(参见核酸研究, 18(21), 6421, (1990); EMBL 保藏号 X53993), 基于该序列可以制备 PCR 的 DNA 引物。这样的 DNA 引物由分别具有序列 SEQ ID NO: 12 和 13 中所示的核苷酸序列的 23-链节 DNA 所具体例证。可以以与以上所述的有关 *LysC* 的那些相同的方式进行 DNA 的合成、PCR 和包含获得的 *dapA* 的质粒的制备。

包含 *dapA* 和从核苷酸序列推断的氨基酸序列之 DNA 片段的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 14 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 15 中显示。除编码这种氨基酸序列的 DNA 片段之外, 如果对 DDPS 活性实质上没有影响, 本发明可以等 10 同地使用编码实质上与 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列(即具有基于例如取代、缺失或插入一个或多个氨基酸之突变的氨基酸序列)的 DNA 片段。可以用与编码具有突变(只要对 AK 活性实质上没有影响和对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的协同反馈抑制的脱敏没有影响)的 AK 的 DNA 的那些相同的方式获得具有自发和人工突变的 *dapA*。

15 基于布达佩斯条约, 通过将包含以下实施例中所获得的 *dapA* 的质粒 pCRDAPA 引入到大肠杆菌 JM109 菌株中获得的转化菌株 AJ13106 已从 1995 年 5 月 26 日以保藏号 FERM BP-5113 国际保藏在国际贸易和工业部工业科学和技术机构的国立生命科学和人体技术研究所(1-3, Higashi L-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, 日本)。

20 (4) *LysA* 的制备

可以借助 PCR 从棒状杆菌的染色体制备包含 *LysA* 的 DNA 片段。对 DNA 供体没有特别的限制, 然而, 由乳发酵短杆菌 ATCC 13869 菌株所例证。

在棒状杆菌中, *LysA* 与 *argS* 一道形成操纵子(精氨酰-tRNA 合酶基因), *LysA* 存在于 *argS* 下游。*LysA* 的表达由存在于 *argS* 上游的启动子调节(参见生物技术杂志, Nov., 7356-7362(1993))。谷氨酸棒杆菌的这些基因的 DNA 序列是已知的(参见分子微生物学, 4(11), 1819-1830(1990); 分子和普通遗传学, 212, 112-119(1988)), 基于该序列可以制备 PCR 的 DNA 引物。这样的 DNA 引物由分别具有序列 SEQ ID NO: 16(相应于在分子微生物学 4(11), 1819-1830(1990) 中描述的核苷酸序列中的 11 至 33 位核苷酸)和 SEQ ID NO: 17(相应于在分子和普通遗传学, 212, 112-119(1988) 中描述的核苷酸序列中的 1370 至 1392 位 30

核苷酸)中所示的核苷酸序列的 23-链节 DNA 所具体例证。可以以与以上所述的有关 *IysC* 的那些相同的方式进行 DNA 的合成、PCR 和包含获得的 *IysA* 的质粒的制备。

在以下描述的实施例中, 包含启动子、*argS* 和 *IysA* 的 DNA 片段用来增强
5 *IysA*。然而, *argS* 对本发明不是必要的。其允许使用在其中 *IysA* 就连接在启动子下游的 DNA 片段。

包含 *argS* 和 *IysA* 以及由核苷酸序列编码的推断的氨基酸序列的 DNA 片段的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 18 中例证。由 *argS* 编码的氨基酸序列的实例在 SEQ ID NO: 19 中显示, 由 *IysA* 编码的氨基酸序列的实例在 SEQ ID NO: 20 中
10 显示。除编码这些氨基酸序列的 DNA 片段之外, 如果对 DDC 活性实质上没有影响, 本发明可以等同地使用编码实质上与 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列(即具有基于例如取代、缺失或插入一个或多个氨基酸之突变的氨基酸序列)的 DNA 片段。可以用与编码具有突变(只要对 AK 活性实质上没有影响和对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的协同反馈抑制的脱敏没有影响)的 AK 的 DNA
15 的那些相同的方式获得具有自发和人工突变的 *IysA*。

(5) *aspC* 的制备

通过采用互补于 AAT-缺失菌株的营养缺陷性质为指示, 可以从微生物(如棒状杆菌和属于埃希氏杆菌属的细菌)染色体制备的基因文库制备包含 *aspC* 的 DNA 片段。对棒状杆菌的 DNA 供体没有特别的限制, 然而, 以乳发酵短杆菌 ATCC
20 13869 菌株例证。对属于埃希氏杆菌属的细菌的 DNA 供体没有特别的限制, 然而, 以大肠杆菌 JM109 菌株例证。

具体地说, 用于棒状杆菌的 *aspC* 制备的方法是已知的(日本专利出版物 6-102028), 可以根据这种方法制备 *aspC*。

对大肠杆菌, 编码 AAT 的 DNA 序列是已知的(Kuramitsu, S. 等, 生物化学
25 杂志, 97(4), 1259-1262(1985)), 基于该序列可以制备 PCR 的 DNA 引物。这样的 DNA 引物由分别具有序列表 SEQ ID NO: 21 和 22 中所示的核苷酸序列的 20-链节 DNA 所具体例证。可以以与以上所述的有关 *IysC* 的那些相同的方式进行 DNA 的合成、PCR 和包含获得的 *aspC* 的质粒的制备。

包含 *aspC* 和以及从核苷酸序列推断的氨基酸序列的 DNA 片段的核苷酸序
30 列在 SEQ ID NO: 23 中说明。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 24 中显示。另

一包含 *aspC* 和以及从核苷酸序列推断的氨基酸序列的 DNA 片段的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 30 中说明。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 31 中显示。除编码这些氨基酸序列的 DNA 片段之外, 如果对 AAT 活性实质上没有影响, 本发明可以等同地使用编码实质上与 SEQ ID NO: 24 或 31 所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列(即具有基于例如取代、缺失或插入一个或多个氨基酸之突变的氨基酸序列)的 DNA 片段。可以用与编码具有突变(只要对 AK 活性实质上没有影响和对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的协同反馈抑制的脱敏没有影响)的 AK 的 DNA 的那些相同的方式获得具有自发和人工突变的 *aspC*。

按照本发明以下所述的实施例 9 的方法已首先获得了来源于乳发酵短杆菌的具有 SEQ ID NO: 30 所示的核苷酸序列的 *aspC*。这样, 本发明提供了编码包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列的蛋白质的 DNA。所述 DNA 的例子包括含有 SEQ ID NO: 30 所示的核苷酸序列中的 879 至 2174 位核苷酸 DNA。

2 本发明的重组 DNA 和棒状杆菌

本发明的棒状杆菌含有天冬氨酸激酶(突变 AK), 在其中由 L-赖氨酸和 L-苏氨酸产生的反馈抑制实质上被脱敏, 其中所说的编码二氢吡啶二甲酸还原酶的 DNA 序列, 编码二氢吡啶二甲酸合酶的 DNA 序列, 编码天冬氨酸转氨酶的 DNA 序列和编码二氨基庚二酸脱羧酶的 DNA 序列被增强。

术语“增强”本文指这一事实: 通过例如, 增加基因的拷贝数, 用强启动子, 使用编码具有高比活性的酶的基因或者组合这些方法, 由所说 DNA 编码的酶的胞内活性得到提高。

含有突变 AK 的棒状杆菌可以是作为突变的结果产生突变天冬氨酸激酶的那些或通过引入突变 *lysC* 转化的那些。

用以引入以上所述的 DNA 棒状杆菌的例子包括, 例如, 下列赖氨酸-产生野生型菌株:

- 25 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870;
- Corynebacterium acetoclutamicum* ATCC 15806;
- 美棒杆菌 ATCC 15991;
- 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032;
- (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020;
- 30 (乳发酵短杆菌) ATCC 13869;

(*Corynebacterium lilium*) ATCC 15990;
(*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067;
Corynebacterium melassecola ATCC 17965;
Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066;
5 *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068;
Brevibacterium roseum ATCC 13825;
Brevibacterium thioaenitalis ATCC 19240;
Microbacterium ammoniophilum ATCC 15354;
Corynebacterium thermoaminoaenes AJ12340 (FERM BP-1539)

10

除了以上所述的细菌菌株外，其他可用的宿主包括，例如，来源于以上所述菌株的具有 L-赖氨酸-产生能力的突变菌株。这样的的人工突变菌株包括如下菌株：(2-氨基乙基)-半胱氨酸(在下文中简称为“AEC”)抗性突变菌株，如乳发酵短杆菌 AJ11082 (NRRL B-1147)，日本专利出版物 56-1914、56-1915、57-15
14157、57-14158、57-30474、58-10075、59-4993、61-35840、62-24074、62-36673、5-11958、7-112437 和 7-112438)；突变菌株，其生长需要氨基酸(如 L-高丝氨酸)的突变菌株(日本专利出版物 48-28078 和 56-6499)；显示出对 AEC 的抗性并需要氨基酸如 L-亮氨酸、L-高丝氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-精氨酸、L-丙氨酸和 L-缬氨酸的突变菌株(美国专利 3, 708, 395 和 3, 825, 472)；显
20 示出对 DL- α -氨基- ϵ -己内酰胺、 α -氨基-月桂内酰胺、天冬氨酸-类似物、磺胺类药、醌型和 N-月桂酰亮氨酸抗性的 L-赖氨酸-产生突变菌株；显示出对 oxyaloacetate 脱羧酶抑制剂或呼吸系统酶抗性的 L-赖氨酸-产生突变菌株(日本专利申请公开 50-53588、50-31093、52-102498、53-9394、53-86089、55-9783、55-9759、56-32995 和 56-39778，以及日本专利出版物 53-43591 和 53-1833)；
25 需要肌醇或醋酸的 L-赖氨酸-产生突变菌株(日本专利申请 55-9784 和 56-8692)；对氟丙酮酸或不低于 34°C 的温度表现出敏感性的 L-赖氨酸-产生突变菌株(日本专利申请公开 55-9783 和 53-86090)；属于短杆菌属或棒杆菌属的表现出对乙二醇抗性并产生 L-赖氨酸的产生突变菌株(美国专利 4, 411, 997)。

在一个特定的实施方案中，为了如上所述在宿主中增强 L-赖氨酸生物合成
30 基因，通过采用质粒载体、转座子或噬菌体载体或类似物将所述基因引入到宿

主中。一旦引入，就预期会有某种程度的增强，即使使用低拷贝型载体。然而，优选地是采用多拷贝型载体。这样载体包括，例如以上所述的质粒载体，pAJ655、pAJ1844、pAJG11、pAJ3148 和 pAJ440。此外，在以下文献中描述了来源于棒状杆菌的转座子：国际出版物 W002/02627 和 W093/18151，欧洲专利出版物 445385，日本专利申请公开 6-46867；Vertes, A. A. 等，分子微生物学，11, 739-746 (1994), ; Bonamy, C., 等，分子微生物学，14, 571-581 (1994); Vertes, A. A. 等，Mel. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994); Jagar, W. 等，FEMS 微生物学通讯，126, 1-6 (1995)，日本专利申请公开 7-107976；日本专利申请公开 7-327680 等。

10 在本发明中，不可缺少的是突变 *lysC* 必需被增强。允许使用在染色体 DNA 上的 *lysC* 的突变的那些或者其中突变 *lysC* 掺入到染色体 DNA 中从那些。另外，突变 *lysC* 可以通过用质粒载体引入。另一方面，为了有效地产生 L-赖氨酸，优选地是增强 *dapA*、*dapB*、*lysA* 和 *aspC*。

通过分别采用不同的载体，可以成功地将 *lysC*、*dapA*、*dapB*、*lysA* 和 *aspC* 各基因引入宿主中。另外，可以用单一载体将二、三、四或五种基因一起引入。当使用不同的载体时，基因可以以任何秩序引入，然而，优选地使用这样一些载体，它们具有在宿主细胞中的稳定参与和隐藏机制，并且能够相互共存。

特别是，用于把 *aspC* 引入棒状杆菌的载体优选地是载体 pVK7。载体 pVK7 是本发明提供的棒状杆菌的克隆载体，其是在大肠杆菌和乳发酵短杆菌的细胞中可自主复制的，包含一个多克隆位点和 *lacZ'*。载体 pVK7 可以按照以下实施例 8 所描述的方法构建。

通过例如向宿主棒状杆菌引入在棒状杆菌细胞中可自主复制的包含突变 *lysC* 和 *dapB*、*dapA*、*lysA* 和 *aspC* 的重组 DNA，获得含有突变 AK 并包含增强的 *dapB*、*dapA*、*lysA* 和 *aspC* 的棒状杆菌。

25 可以通过例如把以上所述的参与 L-赖氨酸生物合成的各基因插入到载体 (如质粒载体，转座子或噬菌体载体) 中获得上述重组 DNA。

在其中质粒用作载体情况下，按照电脉冲方法 (Sugimoto 等，日本专利申请公开 2207791) 可以将重组 DNA 引入宿主。用转座子的基因扩增可以通过引入质粒进行，该质粒把转座子携带至宿主细胞，并诱导转座子转座。

30 在用于本发明的棒状杆菌中，除了以上提到的基因外，参与 L-赖氨酸生物

合成的基因(如编码磷酸烯醇丙酮酸羧酶的 DNA 序列和编码二氨基庚二酸脱氢酶的 DNA 序列)也可以增强。

3 用于产生 L-赖氨酸的方法

通过在合适的培养基中培养棒状杆菌(包含如上所述的 L-赖氨酸生物合成的增强的基因),使得 L-赖氨酸在细菌培养物中产生和积累,并从培养物收集 L-赖氨酸,由此可以有效地产生 L-赖氨酸。

所用的培养基的列举性例子是包含碳源、氮源、无机离子和可有可无的其它有机组分的普通培养基。

作为碳源,可以用食糖,如葡萄糖、果糖、蔗糖、糖蜜和淀粉水解物;和有机酸,如富马酸、柠檬酸和琥珀酸。

作为氮源,可以用无机铵盐,如硫酸铵、氯化铵和磷酸铵;有机氮,如大豆水解物;氨气和氨水。

作为有机微量营养源,以合适的量包含所需物质(如维生素 B1 和 L-高丝氨酸或酵母提取物等)是合乎需要的。此外,如果需要,少量添加磷酸钾、硫酸镁、铁离子、锰离子等。

培养优选地在需氧条件下进行大约 30 至 90 小时。在培养期间培养温度优选地控制在 25°C 到 37°C, pH 优选地控制在 5 至 8。无机或有机,酸性或碱性物质或氨气等可以用于调节 pH。可以用普通的离子交换树脂法、沉淀法和其它已知方法结合起来从培养物收集赖氨酸。

20 具体实施方式

实施例

以下参照实施例更详细地解释本发明。

实施例 1: 从乳发酵短杆菌制备野生型 *lysC* 基因和突变 *lysC* 基因

1 制备野生型和突变 *lysC* 和制备含有它们的质粒

将乳发酵短杆菌 ATCC 13869 菌株和通过突变处理从 ATCC 13869 菌株获得的 L-赖氨酸-产生突变菌株 AJ3445 (FERM P-1944) 用作染色体 DNA 供体。AJ3445 菌株已经历突变,使 *lysC* 改变得实质上脱敏了由赖氨酸和苏氨酸产生的协同抑制(生物化学杂志, 68, 701-710(1970))。

用 PCR 法(聚合酶链反应;参见 White, T. J. 等, Trends Genet., 5, 185 (1989))从染色体 DNA 扩增包含 *lysC* 的 DNA 片段,就用于扩增的 DNA 引物而言,

为了扩增编码 *LysC* 的 1,643 bp 的区, 基于谷氨酸棒杆菌已知的序列(参见分子微生物学(1991), 5(5), 1197-1204; 和 *Mol. Gen. Genet.* (1990), 224, 317-324) 合成 23 链节和 21 链节(具有 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的核苷酸序列)的单链 DNA 序列。经 Applied Biosystems 生产的 DNA 合成仪 380B 型用普通方
5 法和用 phosphoamidite 法(参见 *Tetrahedron Letters* (1981), 22, 1859) 合成 DNA。

通过用 Takara Shuzo 生产的 DNA 热循环仪 PJ2000 型按照供给者指定的方法和用尾端 DNA 聚合酶经 PCR 扩增所说的基因。由琼脂糖凝胶电泳确认 1,643 kb 的扩增的基因片段。之后, 用普通的方法纯化从凝胶上切下的片段, 用限制
10 酶 *NruI* (由 Takara Shuzo 生产) 和 *EcoRI* (由 Takara Shuzo 生产) 消化该片段。

将 pHSG399(参见, S. 等, 基因 (1987), 61 63-74) 用作基因片段的克隆载体。用限制酶 *SmaI* (由 Takara Shuzo 生产) 和 *EcoRI* 消化 pHSG399, 将其与扩增的 *LysC* 片段连接。按照指定的方法用 DNA 连接试剂盒(由 Takara Shuzo 生产)连接 DNA。由此制备质粒, 其中从乳发酵短杆菌染色体扩增的 *LysC* 片段分
15 别与 pHSG399 连接。包含 ATCC 13869(野生型菌株) *LysC* 的质粒命名为 p399AKY, 包含 AJ3463(L-赖氨酸-产生菌) *LysC* 的质粒命名为 p399AK9

将具有使细菌在属于棒杆菌属的细菌中可自主复制能力的 DNA 片段(在下文中称为“*Brevi.-ori*”)分别引入到 p399AKY 和 p399AK9 中, 以制备携带有 *LysC* 的在属于棒杆菌属的细菌中可自主复制的质粒。从包含 *Brevi.-ori* 并且在大
20 肠杆菌和属于棒杆菌属的细菌两种细胞中可自主复制的质粒载体 pHK4 制备 *Brevi.-ori*。pHK4 通过以下方法构建 pHK4: 用 *KpnI* (由 Takara Shuzo 生产) 和 *BamHI* (由 Takara Shuzo 生产) 消化 pHK4, 提取 *Brevi.-ori* 片段, 与 pHSG298(也
已由 *KpnI* 和 *BamHI* 消化)连接(参见日本专利申请公开 5-7491)。pHK4 使宿主具有卡那霉素抗性。含有 pHK4 的大肠杆菌称命名为大肠杆菌 AJ13136, 该菌
25 株已于 1995 年 8 月 1 日以保藏号 FERM BP-5186 保藏在国际贸易和工业部工业科学和技术机构的国立生命科学和人体技术研究所(1-3, Higashi L-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, 日本)。

用限制酶 *KpnI* 和 *BamHI* 消化 pHK4, 使切开的末端平端化。按照指定的方法用平端化试剂盒(由 Takara Shuzo 生产)进行平端的形成。形成平端后, 连
30 接上磷酸化 *BamHI* 接头(由 Takara Shuzo 生产)进行修饰, 使相应于 *Brevi.-ori*

部分的 DNA 片段可以仅经 BamHI 消化从 pHK4 切下。用 BamHI 消化这一质粒，将所产生的 *Brevi.*-ori DNA 片段与 p399AKY 和 p399AK9 (也已分别用 BamHI 消化) 连接，以制备各自含有在属于棒杆菌属的细菌中可自主复制的 *IysC* 基因的质粒。

- 5 包含源于 p399AKY 的野生型 *IysC* 基因的质粒命名为 p399AKYB，包含源于 p399AK9 的突变 *IysC* 基因的质粒命名为 p399AK9B。p399AK9B 和 p399AKYB 的构建方法在图 1 中显示。通过把突变 *IysC* 质粒 p399AK9B 引入乳发酵短杆菌野生型菌株所获得的菌株 AJ12691 (AJ12036 菌株, FERM 734) 已于 1992 年 4 月 10 日以保藏号 FERM P-12918 保藏在国际贸易和工业部工业科学和技术机构的国立生命科学和人体技术研究所 (1-3, Higashi L-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, 日本), 基于布达佩斯条约于 1995 年 2 月 10 日转变成国际保藏, 以保藏号 FERM BP-4999 保藏。

2 测定乳发酵短杆菌野生型 *IysC* 和突变 *IysC* 的核苷酸序列

- 15 从各自的转化体制备包含野生型 *IysC* 的质粒 p399AKY 和包含突变 *IysC* 的质粒 p399AK9, 以测定野生型与突变 *IysC* 的核苷酸序列。核苷酸序列测定按照 Sanger 等 (例如 F. Sanger 等, 美国科学院学报, 74, 5463 (1977)) 的方法进行。

- 20 由 p399AKY 编码的野生型 *IysC* 的核苷酸序列在序列表 SEQ ID NO: 3 中显示。另一方面, 由 p399AK9 编码的突变 *IysC* 的核苷酸序列仅具有一个核苷酸突变, 这样与野生型 *IysC* 比较, 在 SEQ ID NO: 3 中的 1051 位 G 改变成 A。已知谷氨酸棒杆菌的 *IysC* 有两个在同一 DNA 链上的同一读框中编码的亚单位 (α , β) (参见, Kalinowski, J. 等, 分子微生物学 (1991) 5(5), 1197-1204)。从同源性判断, 假定此处测序的基因也具有两个在同一 DNA 链上的同一读框中编码的亚单位 (α , β)。

- 25 从 DNA 的核苷酸序列推断的野生型 AK 蛋白质 α -亚单位的氨基酸序列与 DNA 序列一起在 SEQ ID NO: 4 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 5 中显示。从 DNA 的核苷酸序列推断的野生型 AK 蛋白质 β -亚单位的氨基酸序列与 DNA 序列一起在 SEQ ID NO: 6 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 7 中显示。在每一亚单位中, GTG 用作起始密码子, 相应的氨基酸由甲硫氨酸代表。然而, 30 这种代表指甲硫氨酸、缬氨酸或甲酰甲硫氨酸。

另一方面,在突变 *IysC* 序列上的突变指出现氨基酸残基取代,以便在野生型 AK 蛋白质氨基酸序列中 α -亚单位的 279 位丙氨酸残基改变成为苏氨酸残基, β -亚单位的 30 位丙氨酸残基改变成为苏氨酸残基(SEQ ID NO: 5、7)。

5 实施例 2: 从短杆菌属制备 *dapB*

1 制备 *dapB* 和构建含有 *dapB* 的质粒

乳发酵短杆菌野生型菌株 ATCC 13869 用作染色体 DNA 供体。按照普通方法从 ATCC 13869 菌株制备染色体 DNA。按照 PCR 从染色体 DNA 扩增包含 *dapB* 的 DNA 片段。就用于扩增的 DNA 引物而言,为了扩增编码 DDPR 的 2.0 kb 的区,10 基于乳发酵短杆菌已知的序列(参见细菌学杂志,175(9),2743-2749 (1993))分别合成 23 链节(分别具有序列表中 SEQ ID NO: 8 和 9 所示的核苷酸序列)的 DNA, DNA 合成和 PCR 以与实施例 1 所描述的相同的方式进行。将 pCR-Script(由 Invitrogen 生产)用作扩增 2,001 bp 的基因片段的克隆载体,将其与扩增的 *dapB* 片段连接。由此构建质粒,其中从乳发酵短杆菌染色体扩增的 2,001 bp *dapB* 15 片段与 pCR-Script 连接。具有源于 ATCC13869 的 *dapB* 的如上所述获得的质粒命名为 pCRDAPB。基于布达佩斯条约,通过把 pCRDAPB 引入大肠杆菌 JM109 菌株获得的转化菌株 AJ13107 已从 1995 年 5 月 26 日以保藏号 FERM BP-5114 国际保藏在国际贸易和工业部工业科学和技术机构的国立生命科学和人体技术研究所(1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, 日本)。

20 通过以 EcoRV 和 SphI 消化 pCRDAPB 提取包含 DDPR 结构基因的 1,101 bp 片段。将这一片段与 pHSG399(已由 HincII 和 SghI 消化)以制备质粒。该制备的质粒命名为 p399DPR。

将 *Brevi.*-ori 引入到制备的 p399DPR 中以构建在棒状杆菌中可自主复制的携带 *dapB* 的质粒。用限制酶 KpnI(由 Takara Shuzo 生产)消化 pHK4,使切 25 开的末端平端化。按照指定的方法用平端化试剂盒(由 Takara Shuzo 生产)进行平端的形成。形成平端后,连接上磷酸化 BamHI 接头(由 Takara Shuzo 生产)进行修饰,使相应于 *Brevi.*-ori 部分的 DNA 片段可以仅经 BamHI 消化从 pHK4 切下。用 BamHI 消化这一质粒,将所产生的 *Brevi.*-ori DNA 片段与 p399DPR(也已用 BamHI 消化)连接,以制备含有在棒状杆菌中可自主复制的 *dapB* 基因的质粒。所制备的质粒命名为 pDPRB。pDPRB 的构建方法在图 2 中显示。30

2 测定乳发酵短杆菌 *dapB* 的核苷酸序列

从含有 p399DPR 的 AJ13107 菌株制备质粒 DNA, 以与实施例 1 中描述的相同的方式测定其核苷酸序列。

所测定的核苷酸序列和从该核苷酸序列推断的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 10 中显示, 单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 11 中显示。

实施例 3: 从短杆菌属制备 *dapA*

1 制备 *dapA* 和构建含有 *dapA* 的质粒

乳发酵短杆菌野生型菌株 ATCC 13869 用作染色体 DNA 供体。按照普通方法从 ATCC 13869 菌株制备染色体 DNA。按照 PCR 从染色体 DNA 扩增包含 *dapA* 的 DNA 片段。就用于扩增的 DNA 引物而言, 为了扩增编码 DDPS 的 1.5 kb 的区, 基于谷氨酸棒杆菌已知的序列(核酸研究, 18(21), 6421(1990); EMBL 保藏号 X53993)合成 23 链节的分别具有序列列表中 SEQ ID NO: 12 和 13 所示的核苷酸序列的 DNA, DNA 合成和 PCR 以与实施例 1 所描述的相同的方式进行。将 pCR-1000(由 Invitrogen 生产, 参见生物技术, 9, 657-663(1991))用作扩增 1,411 bp 的基因片段的克隆载体, 将其与扩增的 *dapA* 片段连接。DNA 的连接按照指定的方法用 DNA 连接试剂盒进行。由此构建质粒, 其中从乳发酵短杆菌染色体扩增的 1,411 bp *dapA* 片段与 pCR-1000 连接。具有源于 ATCC13869 的 *dapA* 的如上所述获得的质粒命名为 pCRDAPA。基于布达佩斯条约, 通过把 pCRDAPA 引入大肠杆菌 JM109 菌株获得的转化菌株 AJ13106 已从 1995 年 5 月 26 日以保藏号 FERM BP-5113 国际保藏在国际贸易和工业部工业科学和技术机构的国立生命科学和人体技术研究所(1-3, Higashi L-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, 日本)。

将 Brevi. -ori 引入到制备的 pCRDAPA 中以构建在棒状杆菌中可自主复制的携带 *dapA* 的质粒。用限制酶 KpnI 和 BamHI(由 Takara Shuzo 生产)消化 pHK4, 使切开的末端平端化。按照指定的方法用平端化试剂盒(由 Takara Shuzo 生产)进行平端的形成。形成平端后, 连接上磷酸化 SmaI 接头(由 Takara Shuzo 生产)进行修饰, 使相应于 Brevi. -ori 部分的 DNA 片段可以仅经 SmaI 消化从 pHK4 切下。用 SmaI 消化这一质粒, 将所产生的 Brevi. -ori DNA 片段与 pCRDAPA(也已用 SmaI 消化)连接, 以制备含有在棒状杆菌中可自主复制的 *dapA* 基因的质

粒。所制备的质粒命名为 pDPSB。pDPSB(Km^r)的构建方法在图 3 中显示。

2 测定乳发酵短杆菌 *dapA* 的核苷酸序列

从含有 pCRDAPA 的 AJ13107 菌株制备质粒 DNA，以与实施例 1 中描述的相同的方式测定其核苷酸序列。所测定的核苷酸序列和从该核苷酸序列推断的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 14 中显示，单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 15 中显示。

实施例 4：从短杆菌属制备 *LysA*

1 制备 *LysA* 和构建含有 *LysA* 的质粒

10 乳发酵短杆菌野生型菌株 ATCC 13869 用作染色体 DNA 供体。按照普通方法从 ATCC 13869 菌株制备染色体 DNA。按照 PCR 从染色体 DNA 扩增包含 *argS*、*LysA* 和操纵子的启动子的 DNA 片段。就用于扩增的 DNA 引物而言，为了扩增编码精氨酰-tRNA 合酶和 DDC 的 3.6 kb 的区，基于谷氨酸棒杆菌已知的序列(参见分子微生物学, 4(11), 1819-1830 (1990); 分子和普通遗传学, 212, 112-119 (1988)), 使用 23 链节(分别具有序列表中 SEQ ID NO: 16 和 17 所示的核苷酸序列)的合成 DNA, DNA 合成和 PCR 以与实施例 1 所描述的相同的方式进行。将 pHSG399 用作扩增 3,579 bp 的基因片段的克隆载体, 用限制酶 SmaI (由 Takara Shuzo 生产)消化 pHSG399, 该质粒与包含扩增的 *LysA* 的 DNA 片段连接。具有源于 ATCC13869 的 *LysA* 的如上所述获得的质粒命名为 p399LYSA。

20 通过以 KpnI (由 Takara Shuzo 生产)和 BamHI (由 Takara Shuzo 生产)消化 p399LYSA 提取包含 *LysA* 的 DNA 片段。将这一片段与 pHSG299 (已由 KpnI 和 BamHI 消化)。构建 p399LYSA 的方法在图 4 中显示。

将 Brevi.-ori 引入到制备的 p399LYSA 中以构建在棒状杆菌中可自主复制的携带 *LysA* 的质粒。用限制酶 KpnI 和 BamHI 消化 pHK4, 使切开的末端平端化。按照指定的方法用平端化试剂盒(由 Takara Shuzo 生产)进行平端的形成。形成平端后, 连接上磷酸化 KpnI 接头(由 Takara Shuzo 生产)进行修饰, 使相应于 Brevi.-ori 部分的 DNA 片段可以仅经 KpnI 消化从 pHK4 切下。用 KpnI 消化这一质粒, 将所产生的 Brevi.-ori DNA 片段与 p299LYSA (也已用 KpnI 消化)连接, 以制备含有在棒状杆菌中可自主复制的 *LysA* 基因的质粒。所制备的质粒命名为 pLYSAB。pLYSAB 的构建方法在图 5 中显示。

2 测定乳发酵短杆菌 *LysA* 的核苷酸序列

制备质粒 p299LYSA 的 DNA, 以与实施例 1 中描述的相同的方式测定其核苷酸序列。所测定的核苷酸序列和从该核苷酸序列推断的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 18 中显示, 有关核苷酸序列, 由 *LysA* 编码的氨基酸序列和由 *argS* 编码的氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 19 和 20 中显示。

实施例 5: 从大肠杆菌制备 *aspC* 和构建含有 *aspC* 的质粒

大肠杆菌 JM109 菌株用作染色体 DNA 的供体。按照普通方法从大肠杆菌 JM109 菌株制备染色体 DNA。按照 PCR 从染色体 DNA 扩增包含 *aspC* 的 DNA 片段。就用于扩增 DNA 引物而言, 基于大肠杆菌已知的序列(参见 Kuramitsu, S 等, 生物化学杂志, 94(4), 1259-1262(1985)), 使用 20 链节(分别具有序列列表中 SEQ ID NO: 21 和 22 所示的核苷酸序列)的合成 DNA, DNA 合成和 PCR 以与实施例 1 所描述的相同的方式进行。将 1,331 bp 的扩增片段克隆进 TA 克隆载体 pCR1000。所构建的质粒命名为 pCRASPC。

包含 *aspC* 的扩增 DNA 的核苷酸序列和从该核苷酸序列推断的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 23 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 24 中显示。

比较实施例 1: 构建包含组合的突变 *LysC* 和 *dapA* 的质粒

从包含 *dapA* 的质粒 pCRDAPA 和包含突变 *LysC* 和 Brevi.-ori 的质粒 p399AK9B 构建包含突变 *LysC*、*dapA* 和棒状杆菌复制源的质粒。以 SalI 完全消化 p399AK9B, 然后平端化, 并与 EcoRI 接头连接, 以构建其中 SalI 位点修饰成 EcoRI 位点的质粒。所获得的质粒命名为 p399AK9BSE。通过以 EcoRI 部分消化 p399AK9BSE 作为一个片段切下突变 *LysC* 和 Brevi.-ori。将这一片段与已用 EcoRI 消化的 pCRDAPA 连接。所获得的质粒命名为 pCRCAB。这一质粒在大肠杆菌和棒状杆菌中可自主复制, 其使宿主具有对卡那霉素的抗性, 该质粒包含组合的突变 *LysC* 和 *dapA*。pCRCAB 的构建方法在图 6 中显示。

30 比较实施例 2: 构建包含组合的突变 *LysC* 和 *dapB* 的质粒

从具有突变 *lysC* 的质粒 p399AK9 和具有 *dapB* 的质粒 p399DPR 构建包含突变 *lysC* 和 *dapB* 的质粒。通过以 EcoRV 和 SphI 消化 p399DPR 提取包含 DDPR 结构基因的 1,101 bp 的片段。将这一片段与已用 SalI 消化，然后平端化，并进一步由 SphI 消化的 p399AK9 连接，以构建包含组合的突变 *lysC* 和 *dapB* 的质粒。这一质粒命名为 p399AKDDPR。

其次，将 Brevi.-ori 引入所获得的 p399AKDDPR。以限制酶 KpnI (由 Takara Shuzo 生产) 消化包含 Brevi.-ori 的质粒 pHK4，使切下的边缘平端化。按照指定的方法用平端化试剂盒(由 Takara Shuzo 生产)进行平端的形成。形成平端后，连接上磷酸化 BamHI 接头(由 Takara Shuzo 生产)进行修饰，使相应于 Brevi.-ori 部分的 DNA 片段可以仅经 BamHI 消化从 pHK4 切下。用 BamHI 消化这一质粒，将所产生的 Brevi.-ori DNA 片段与 p399AKDDPR(也已用 BamHI 消化)连接，以构建在棒状杆菌中可自主复制的含有突变 *lysC* 和 *dapB* 的质粒。构建的质粒命名为 pCB。pCB 的构建方法在图 7 中显示。

15 比较实施例 3: 构建包含组合的 *dapA* 和 *dapB* 的质粒

用 KpnI 和 EcoRI 消化包含 *dapA* 的质粒 pCRDAPA，以提取包含 *dapA* 的 DNA 片段，将其与已用 KpnI 和 EcoRI 消化的载体质粒 pHSG399 连接。所获得的质粒命名为 p399DPS。

另一方面，以 SacII 和 EcoRI 消化包含 *dapB* 的质粒 pCRDAPB，以提取包含编码 DDPR 区的 2.0 kb 的 DNA 片段，将其与已用 SacII 和 EcoRI 消化的 p399DPS 连接，以构建包含组合的 *dapA* 和 *dapB* 的质粒。所获得的质粒命名为 p399AB。

其次，将 Brevi.-ori 引入 p399AB。以限制酶 BamHI (由 Takara Shuzo 生产) 消化包含 Brevi.-ori 的质粒 pHK4，使切下的边缘平端化。按照指定的方法用平端化试剂盒(由 Takara Shuzo 生产)进行平端的形成。形成平端后，连接上磷酸化 KpnI 接头(由 Takara Shuzo 生产)进行修饰，使相应于 Brevi.-ori 部分的 DNA 片段可以仅经 KpnI 消化从 pHK4 切下。用 KpnI 消化这一质粒，将所产生的 Brevi.-ori DNA 片段与 p399AB(也已用 KpnI 消化)连接，以构建在棒状杆菌中可自主复制的含有突变 *dapA* 和 *dapB* 的质粒。构建的质粒命名为 pAB。pAB 的构建方法在图 8 中显示。

实施例 6: 构建包含组合的突变 *lysC*、*dapA* 和 *dapB* 的质粒

以 EcoRI 和 SphI 消化 p399DPS, 平端化, 其后提取 *dapA* 基因片段。将这一片段与已用 SalI 消化并平端化的 p399AK9 连接。以构建其中突变 *lysC* 和 *dapA* 共存的质粒 p399CA。

用 EcoRI 消化包含 *dapB* 的质粒 pCRDAPB, 平端化, 接着用 SacI 消化, 以抽提包含 *dapB* 的 2.0 kb 的 DNA 片段。用 SpeI 消化包含 *dapA* 和突变 *lysC* 的质粒 p399CA, 平端化, 之后用 SacI 消化, 并与抽提的 *dapB* 片段连接, 以便获得包含突变 *lysC*、*dapA* 和 *dapB* 的质粒。这一质粒命名为 p399CAB。

其次, 将 Brevi. -ori 引入 p399CAB。以限制酶 BamHI (由 Takara Shuzo 生产) 消化包含 Brevi. -ori 的质粒 pHK4, 使切下的边缘平端化。按照指定的方法用平端化试剂盒 (由 Takara Shuzo 生产) 进行平端的形成。形成平端后, 连接上磷酸化 KpnI 接头 (由 Takara Shuzo 生产) 进行修饰, 使相应于 Brevi. -ori 部分的 DNA 片段可以仅经 KpnI 消化从 pHK4 切下。用 KpnI 消化这一质粒, 将所产生的 Brevi. -ori DNA 片段与 p399CAB (也已用 KpnI 消化) 连接, 以构建在棒状杆菌中可自主复制的含有突变 *lysA*、*dapA* 和 *dapB* 的质粒。构建的质粒命名为 pCAB。pCAB 的构建方法在图 9 中显示。

实施例 7: 构建包含组合的突变 *lysC*、*dapA*、*dapB* 和 *lysA* 的质粒

用 KpnI 和 BamHI 消化包含 *lysA* 的质粒 p299LYSA, 平端化, 然后提取 *lysA* 基因片段。将这一片段与已用 HpaI (由 Takara Shuzo 生产) 消化并平端化的质粒 pCAB 连接, 以构建包含组合的突变 *lysC*、*dapA*、*dapB* 和 *lysA* 的并且在棒状杆菌中可自主复制的质粒。构建的质粒命名为 pCABL。pCABL 的构建方法在图 10 中显示。值得注意的是, 在 pCABL 中 *lysA* 基因片段以包含 *dapB* 基因的 DNA 片段插入到 HpaI 位点中, 然而, HpaI 位点位于 *dapB* 基因 (SEQ ID NO: 10 中 611 至 616 位核苷酸) 启动子上游, *dapB* 基因不被分离。

实施例 8: 构建包含 *aspC* 的质粒

作为用于把 *aspC* 引入棒状杆菌的载体, 使用新构建的棒状杆菌的克隆载

体 pVK7。如以下描述通过将大肠杆菌的载体 pHSG299 (Km^r; Takeshita, S. 等, 基因, 61, 63-74 (1987)) 与乳发酵短杆菌的隐蔽性质粒 pAM330 构建 pVK7。从乳发酵短杆菌 ATCC 13869 菌株制备 pAM330。以形成一个切割位点的限制酶 AvaII (由 Takara Shuzo 生产) 消化 pHSG299, 用 T4 DNA 聚合酶平端化, 5 并与已用 HindIII (由 Takara Shuzo 生产) 消化和用 T4 DNA 聚合酶平端化的 pAM330 连接。根据在 pHSG299 中所插入的 pAM330 的方向, 两个获得的质粒命名为 pVK6 和 pVK7, pVK7 用于下列实验中。pVK7 是在大肠杆菌和乳发酵短杆菌两者中可自主复制的, 并且具有来源于 pHSG299 和 lacZ' 的多克隆位点。pVK6 和 pVK7 的构建方法在图 11 中显示。

10 将 *aspC* 与构建的穿梭载体 pVK7 连接。以限制酶 EcoRI (由 Takara Shuzo 生产) 消化 pCRASPC, 并与已用 EcoRI 消化的 pVK7 连接。用 DNA 连接试剂盒 (由 Takara Shuzo 生产) 进行 DNA 的连接。在其中 *aspC* 片段与 pVK7 连接的哪些中, 其中所述片段以与 pVK7 所具有的 lac 启动子的转录方向相同的方向插入的一个命名为 p0m。p0m 的构建方法在图 12 中显示。

15

实施例 9: 从短杆菌属制备 *aspC*

1 制备源于乳发酵短杆菌的 *aspC*

属于棒杆菌属的天冬氨酸营养缺陷菌株缺乏 *aspC* 活性 (AAT 活性), 是天冬氨酸营养缺陷的 (I. Shio 和 K. Ujikawa, 生物化学杂志, 84, 647 (1978)), 通过 20 引入基因文库 (国际出版物 WO 95/23224) 转化该菌株, 所述文库是经将乳发酵短杆菌野生型 ATCC 13869 菌株的染色体 DNA 的各种片段与在属于棒杆菌属的细菌细胞中起作用的载体连接制备的。收集所获得的转化体, 以蒸馏水洗涤两次。将几千个转化体中的几十个平板接种到最小培养基 (不含有非氮源的培养基 10 (I. Shio 和 K. Ujikawa, 生物化学杂志, 84, 647 (1978))) 琼脂平板上, 以 25 获得恢复天冬氨酸营养缺陷和在平板上显示出极好的生长的转化体。从获得的恢复天冬氨酸营养缺陷的菌株回收质粒 DNA, 所获得的质粒命名为 pAC。当乳发酵短杆菌野生型 ATCC 13869 菌株用 pAC 转化时, 转化体的 *aspC* 活性增加 (第 1 表)。按照已知方法 (参见 Sizer, I.W. 和 Jenkins, W.T., 酶学方法, vol. 5, 677-679 (1962)) 进行活性测定。

30 从这些结果可以证实, 在质粒 DNA 上, ATCC 13869 菌株染色体 DNA 的

大约 2.5 kb 片段包含乳发酵短杆菌的 *aspC*。

表 1

菌株/质粒	<i>aspC</i> 活性(相对值)
ATCC13869	1.0
ATCC13869/pCABL	8.9

2 分析来源于乳发酵短杆菌的 *aspC*

5 根据 Sangar 等的双脱氧方法(美国科学院学报, 74, 5463(1977)) 测定 2.5 kb DNA 片段的核苷酸序列, 测定的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 25 中显示。用 GENETYX-MAC 版本 7.3 个程序(软件 Kaihatsu KK)分析核苷酸序列。ORF(开放读框)研究显示如图 13 中所示的两个以相反方向重叠的 ORF。432 个氨基酸或 426 个氨基酸的 ORF (其在 SEQ ID NO: 25 所示的核苷酸序列中在作为起始密码子的 579 至 881 或 897 至 899 位核苷酸的 ATG 和作为终止密码子的 2175 至 2177 位核苷酸的 TAG 之间以正方向被编码) 命名为 ORF1。393 个氨基酸的 ORF (其在 SEQ ID NO: 25 所示的核苷酸序列中在作为起始密码子的互补于 2163 至 2165 核苷酸的 CAC 的 GTG 和作为终止密码子的 2163 至 2165 位核苷酸的 CAC 之间以反方向被编码) 命名为 ORF2。

15 3 测定编码 *aspC* 的 ORF

经 PCR 从 pAC 扩增不包含全长 ORF2 和编码全长 ORF1 的 DNA 片段, 以证实在两个 ORF 中 ORF 是否编码 AAT 蛋白质。就用于扩增的 DNA 引物而言, 基于 SEQ ID NO: 25 所示的序列分别使用具有 SEQ ID NO: 26 和 27 所示的核苷酸序列的 23-链节合成 DNA。DNA 合成和 PCR 以与实施例 1 中描述的相同的方式进行。将在 SEQ ID NO: 25 中所示的核苷酸序列中的 126 至 2,187 位核苷酸的 2,062 bp 扩增片段克隆进 TA 克隆载体 pCR2.1(由 Invitrogen 产生)。所构建的质粒命名为 pCRORF1。

按相同的方式, 扩增和克隆 SEQ ID NO: 25 中所示的核苷酸序列中的 975 至 2,517 位核苷酸的 1,543 bp 基因片段, 其仅编码全长 ORF2。构建的质粒命名为 pCRORF2。

25 为了将克隆 DNA 片段引入到属于棒杆菌属的细菌细胞中, 将所述 DNA 片段与实施例 8 中所描述的穿梭载体连接。以限制酶 EcoRI(由 Takara Shuzo 生产)消化 pCRORF1, 与已用限制酶 EcoRI 消化的 pVK7 连接。用 DNA 连接试剂盒(由

Takara Shuzo 生产) 进行 DNA 的连接。构建的质粒命名为 pORF1。pORF1 的构建方法在图 14 中显示。

按相同的方式, 从 pCRORF2 和 pVK7 构建 pORF2。

5 以与实施例 9 中相同的方式将制备的 pORF1 和 pORF2 引入乳发酵短杆菌野生型 ATCC 13869 菌株细胞中。测定 ATCC 13869 和质粒-引入菌株 ATCC 13869/pORF1 和 ATCC 13869/pORF2 的 *aspC* 活性。活性测定以与实施例 1 中描述的相同的方式进行。如表 2 所示, 仅 ATCC 13869/pORF1 观察到 *aspC* 活性增加, 表明 *aspC* 由 ORF1 编码。

10 由以上提到的实验测定的乳发酵短杆菌 *aspC* 的核苷酸序列和由该核苷酸序列编码的推断的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 30 中显示。单独的氨基酸序列在 SEQ ID NO: 31 中显示。在 GENE BANK 上的同源性检索显示与来源于其它有机体的已知氨基酸序列(包括 AAT 蛋白质)无同源性。

表 2

菌株/质粒	<i>aspC</i> 活性(相对值)
ATCC13869	1.0
ATCC13869/pORF1	10.1
ATCC13869/pORF2	1.2

15 实施例 10: 将包含 L-赖氨酸生物合成基因的质粒引入到乳发酵短杆菌 L-赖氨酸-产生菌中

将在实施例 7 中构建的 pCABL(Cm^r)引入乳发酵短杆菌 L-赖氨酸-产生菌 AJ11082(NRRL B-11470)中。AJ11082 菌株具有 AEC 抗性。按照电脉冲方法引入质粒(Sugimoto 等, 日本专利申请公开 2-207791), 基于质粒具有的药物抗性标记选择转化体, 当包含氯霉素抗性基因的质粒被引入时, 在包含 5 μg/ml 氯霉素完全培养基上选择转化体, 当包含卡那霉素抗性基因的质粒被引入时, 在包含 25 μg/ml 卡那霉素完全培养基上选择转化体。

20 用具有大肠杆菌 *aspC* 的质粒 pO_m(Km^r)或具有乳发酵短杆菌 *aspC* 的 pORF1(Km^r)转化如上所获得的转化体 AJ11082/pCABL。因为在乳发酵短杆菌细胞中 pCABL 用 pHM1519 为复制起点, 用 Cm 抗性基因为标记, 在乳发酵短杆菌细胞中, pO_m 用 pAM330 为复制起点, 用 Km 抗性基因为标记, 所以

两种质粒都稳定地包含在乳发酵短杆菌细胞中

这样, 获得了菌株 AJ11082/pCABL/p0m 和 AJ11082/pCABL/pORF1, 其中质粒包含参与 L-赖氨酸生物合成的基因和含有 *aspC*。

5 以与以上所述相同的方式, 将 p399AK9B(Cm^r)、pDPSB(Km^r)、pDPRB(Cm^r)、pLYSAB(Cm^r)、p0m、pCRCAB(Km^r)、pAB(Cm^r)、pCB(Cm^r) 和 pCAB(Cm^r) 引入 AJ11082 菌株中, 以获得其中 *lysC*、*dapA*、*dapB*、*lysA* 或 *aspC* 单独被增强或者这些基因的两种或多种同时被增强的转化体。

实施例 11: 测定转化体活性

10 测定转化体 AJ11082/pCABL、AJ11082/pCABL/p0m 和 AJ11082/pCABL/pORF1 的 *aspC* 活性。以与实施例 9 的 3 中描述的相同的方法进行活性测定。如表 3 所示, 观察到在 p0m 载体上的 lac 启动子也在乳发酵短杆菌中起作用, AJ11082/pCABL/p0m 的 *aspC* 活性增加约三倍, 观察到 AJ11082/pCABL/pORF1 的 *aspC* 活性进一步增加约九倍。

15 表 3

菌株/质粒	<i>aspC</i> 活性(相对值)
AJ11082	1.0
AJ11082/p0m	3.2
AJ11082/pORF1	10.1
AJ11082/pCABL	0.9
AJ11082/pCABL/p0m	2.9
AJ11082/pCABL/pORF1	11.5

实施例 12: L-赖氨酸的产生

在 L-赖氨酸-产生培养基中培养实施例 10 中所获得的各种转化体, 以估价 L-赖氨酸产量。L-赖氨酸-产生培养基具有下列组成。

20 [L-赖氨酸-产生培养基]

除了碳酸钙外, 溶解下列组分(在 1 升中), 用 KOH 调节 pH 为 8.0。于 115 °C 灭菌 15 分钟, 将已经以干燥状态在热气流中分别灭菌过的碳酸钙(50 g) 加入其中。

葡萄糖	100 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
生物素	500 μg
硫胺	2000 μg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
烟酰胺	5 mg
蛋白质水解物(Mamenou)	30 ml
碳酸钙	50 g

将各种类型的转化体和亲本菌株接种到具有以上组成的培养基中，以进行在 31.5°C 下的往复振荡培养。在培养 40 或 72 小时和生长 72 小时 (OD₅₆₂) 后产生的 L-赖氨酸的量在表 4 中显示。在表中，*lysC** 代表突变 *lysC*。通过在 10 5 倍稀释后在 562 nm 测量 OD 定量测定生长。

表 4
在 40 或 72 小时培养后积累的 L-赖氨酸

细菌菌株/质粒	引入的基因	产生的 L-赖氨酸量(g/l)		生长 (OD ₅₆₂ /10l)
		40 h 后	72 h 后	
AJ 11082		22.0	29.8	0.450
AJ 11082/p399AK9B	<i>lysC*</i>	16.8	34.5	0.398
AJ 11082/pDPSB	<i>dapA</i>	18.7	33.8	0.410
AJ 11082/pDPRB	<i>dapB</i>	19.9	29.9	0.445
AJ 11082/pLYSAB	<i>lysA</i>	19.8	32.5	0.356
AJ11082/p0m	<i>aspC(E)</i> [注 1]	21.8	30.9	0.457
AJ 11082/p0m	<i>aspC(B)</i> [注 2]	21.5	31.2	0.450
AJ 11082/pCRCAB	<i>lysC*</i> , <i>dapB</i>	19.7	36.5	0.360
AJ 11082/pAB	<i>dapA</i> , <i>dapB</i>	19.0	34.8	0.390
AJ 11082/pCB	<i>lysC*</i> , <i>dapB</i>	23.3	35.0	0.440
AJ 11082/pCAB	<i>lysC*</i> , <i>dapA</i> , <i>dapB</i>	23.0	45.0	0.425
AJ 11082/pCABL	<i>lysC*</i> , <i>dapA</i> , <i>dapB</i> , <i>lysA</i>	26.2	46.5	0.379
AJ 11082/pCABL/p0m	<i>lysC*</i> , <i>dapA</i> , <i>dapB</i> , <i>lysA</i> , <i>aspC (E)</i>	26.7	47.6	0.415
AJ 11082/pCABL/pORF1	<i>lysC*</i> , <i>dapA</i> , <i>dapB</i> , <i>lysA</i> , <i>aspC (B)</i>	27.1	48.8	0.410

注 1: 大肠杆菌的 *aspC*

注 2: 乳发酵短杆菌的 *aspC*

如上所示,当突变 *lysC*, *dapA*, *dapB*, *lysA* 或 *aspC*单独增强时,培养 72 小时后产生的 L-赖氨酸的量大于或等于由亲本菌株产生的量,然而,培养 40 小时后产生的 L-赖氨酸的量低于由亲本菌株产生的量。即,在短的培养时间内, L-赖氨酸-产生速度降低。同样地,当突变 *lysC* 和 *dapA* 或者 *dapA* 和 *dapB* 一起增强时,培养 72 小时后产生的 L-赖氨酸的量大于由亲本菌株产生的量,然而,培养 40 小时后产生的 L-赖氨酸的量小于由亲本菌株产生的量。这样, L-赖氨酸-产生速度降低。

相反,在其中 *dapB*与突变 *lysC*一道增强的菌株,其中三种突变 *lysC*, *dapA* 和 *dapB* 增强的菌株,以及其中四种突变 *lysC*, *dapA*, *dapB* 和 *lysA* 增强的菌株的情况下,在短的和长的培养时间内所积累的 L-赖氨酸的量都得到提高。

在其中五种突变 *lysC*, *dapA*, *dapB*, *lysA* 和 *aspC* 增强的大肠杆菌菌株,以及其中五种突变 *lysC*, *dapA*, *dapB*, *lysA* 和 *aspC* 增强的乳发酵短杆菌菌株的情况下,在任何培养时间内 L-赖氨酸的产量都得到提高。后者提高的程度高于前者。

序 列 表

- (1) 一般信息:
- (i) 申请人: AJINOMOTO 有限公司
 - 5 (ii) 发明名称: 用于产生 L-赖氨酸的方法
 - (iii) 序列数: 31 个
 - (iv) 通讯地址:
 - (A)收信人:
 - (B)街道:
 - 10 (C)城市:
 - (E)国家:
 - (F)ZIP :
 - (v)计算机可读形式:
 - (A)介质类型: 软盘
 - 15 (B)计算机: IBM PC 兼容机
 - (C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS
 - (D)软件: PatentIn Release#, 版本# 1.30
 - (vi)当前申请的数据:
 - (A)申请号:
 - 20 (B)申请日:
 - (C)分类号:
 - (vii)在先申请的数据:
 - (A)申请号: JP 8-325659
 - (B)申请日: 1996 年 12 月 5 日
 - 25 (viii)律师/代理人信息:
 - (A)姓名:
 - (B)登记号:
 - (ix)电信信息:
 - (A)电话:
 - 30 (B)传真:

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基

5 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc="合成的 DNA"

10 (iv)反义: 否

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1 :

TCGAAGTA GCACCTGTCA CTT

23

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

15 (i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

20 (ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc="合成的 DNA"

(iv)反义: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2 :

ACGGAATTCA ATCTTACGGC C

21

25

(2)SEQ ID NO: 3 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1643 个碱基

(B)类型: 核酸

30 (C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

(A)有机体: 乳发酵短杆菌

5 (B)菌株: ATCC 13869

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3 :

	TCGCGAAGTA	GCACCTGTCA	CTTTTGTCTC	AAATATTAAA	TCGAATATCA	ATATACGGTC	60
	TGTTTATTGG	AACGCATCCC	AGTGGCTGAG	ACGCATCCGC	TAAAGCCCCA	GGAACCCTGT	120
	GCAGAAAGAA	AACACTCCTC	TGGCTAGGTA	GACACAGTTT	ATAAAGGTAG	AGTTGAGCGG	180
	GTAACGTGCA	GCACGTAGAT	CGAAAGGTGC	ACAAAGGTGG	CCCTGGTCGT	ACAGAAATAT	240
	GGCGGTTTCT	CGCTTGAGAG	TGCGGAACGC	ATTAGAACG	TCGCTGAACG	GATCGTTGCC	300
	ACCAAGAAGG	CTGGAAATGA	TGTCGTGGTT	GTCTGCTCCG	CAATGGGAGA	CACCACGGAT	360
10	GAACCTCTAG	AACTTGCAGC	GGCAGTGAAT	CCCGTTCCGC	CAGCTCGTGA	AATGGATATG	420
	CTCCTGACTG	CTGGTGAGCG	TATTTCTAAC	GCTCTCGTCG	CCATGGCTAT	TGAGTCCCTT	480
	GGCGCAGAAG	CTCAATCTTT	CACTGGCTCT	CAGGCTGGTG	TGCTCACCAC	CGAGCGCCAC	540
	GGAAACGCAC	GCATTGTTGA	CGTCACACCG	GGTCGTGTGC	GTGAAGCACT	CGATGAGGGC	600
	AAGATCTGCA	TTGTTGCTGG	TTTTCAGGGT	GTTAATAAAG	AAACCCGCGA	TGTCACCACG	660
	TTGGGTCGTG	GTGGTTCTGA	CACCACTGCA	GTTGCGTTGG	CAGCTGCTTT	GAACGCTGAT	720
	GTGTGTGAGA	TTTACTCGGA	CGTTGACGGT	GTGTATACCG	CTGACCCGCG	CATCGTTCCT	780
	AATGCACAGA	AGCTGGAAAA	GCTCAGCTTC	GAAGAAATGC	TGGAACCTGC	TGCTGTTGGC	840
	TCCAAGATTT	TGGTGCTGCG	CAGTGTGAA	TACGCTCGTG	CATTCAATGT	GCCACTTCGC	900
	GTACGCTCGT	CTTATAGTAA	TGATCCCGGC	ACTTTGATTG	CCGGCTCTAT	GGAGGATATT	960
15	CCTGTGGGAA	AAGCAGTCCT	TACCGGTGTC	GCAACCGACA	AGTCCGAAGC	CAAAGTAACC	1020
	GTTCTGGGTA	TTTCCGATAA	GCCAGGCGAG	GCTGCCAAGG	TTTTCCGTGC	GTTGGCTGAT	1080
	GCAGAAATCA	ACATTGACAT	GGTCTGTCAG	AACGTCTCCT	CTGTGGAAGA	CGGCACCACC	1140
	GACATCACGT	TCACCTGCCC	TCGCGCTGAC	GGACGCCGTG	CGATGGAGAT	CTTGAAGAAG	1200
	CTTCAGGTTT	AGGGCAACTG	GACCAATGTG	CTTTACGACG	ACCAGGTCGG	CAAAGTCTCC	1260
	CTCGTGGGTG	CTGGCATGAA	GTCTCACCCA	GGTGTACCG	CAGAGTTCAT	GGAAGCTCTG	1320
	CGCGATGTCA	ACGTGAACAT	CGAATTGATT	TCCACCTCTG	AGATCCGCAT	TTCCGTGCTG	1380
	ATCCGTGAAG	ATGATCTGGA	TGCTGCTGCA	CGTGCAATGC	ATGAGCAGTT	CCAGCTGGGC	1440
	GGCGAAGACG	AAGCCGTCGT	TTATGCAGGC	ACCGGACGCT	AAAGTTTTTA	AGGAGTAGTT	1500
	TTACAATGAC	CACCATCGCA	GTTGTTGGTG	CAACCGGCCA	GGTCGGCCAG	GTTATGCGCA	1560
20	CCCTTTTGGG	AGAGCGCAAT	TTCCAGCTG	ACACTGTTTC	TTTCTTTGCT	TCCCCGCGTT	1620
	CCGCAGGCCG	TAAGATTGAA	TTC				1643

(2)SEQ ID NO:4 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1643 个碱基

(B)类型: 核酸

25 (C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

(A)有机体: 乳发酵短杆菌

30 (B)菌株: ATCC 13869

(ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 217..1482

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4:

```

5 TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC      60
  TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT      120
  GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG      180
  GTAACCTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG      234
                                     Met Ala Leu Val Val Gln
                                     1           5
  AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC      282
  Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val

```

GCT	GAA	CGG	ATC	GTT	GCC	ACC	AAG	AAG	GCT	GGA	AAT	GAT	GTC	GTG	GTT	330
Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Val	
		25					30					35				
GTC	TGC	TCC	GCA	ATG	GGA	GAC	ACC	ACG	GAT	GAA	CTT	CTA	GAA	CTT	GCA	378
Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	
		40				45					50					
GCG	GCA	GTG	AAT	CCC	GTT	CCG	CCA	GCT	CGT	GAA	ATG	GAT	ATG	CTC	CTG	426
Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	
		55			60					65					70	
ACT	GCT	GGT	GAG	CGT	ATT	TCT	AAC	GCT	CTC	GTC	GCC	ATG	GCT	ATT	GAG	474
Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	
			75						80					85		
TCC	CTT	GGC	GCA	GAA	GCT	CAA	TCT	TTC	ACT	GGC	TCT	CAG	GCT	GGT	GTG	522
Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	
			90					95					100			
CTC	ACC	ACC	GAG	CGC	CAC	GGA	AAC	GCA	CGC	ATT	GTT	GAC	GTC	ACA	CCG	570
Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg	Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	
			105				110					115				
GGT	CGT	GTG	CGT	GAA	GCA	CTC	GAT	GAG	GGC	AAG	ATC	TGC	ATT	GTT	GCT	618
Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly	Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	
		120				125					130					
GGT	TTT	CAG	GGT	GTT	AAT	AAA	GAA	ACC	CGC	GAT	GTC	ACC	ACG	TTG	GGT	666
Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg	Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	
		135			140					145				150		
CGT	GGT	GGT	TCT	GAC	ACC	ACT	GCA	GTT	GCG	TTG	GCA	GCT	GCT	TTG	AAC	714
Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	
				155					160					165		
GCT	GAT	GTG	TGT	GAG	ATT	TAC	TCG	GAC	GTT	GAC	GGT	GTG	TAT	ACC	GCT	762
Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	
			170					175					180			
GAC	CCG	CGC	ATC	GTT	CCT	AAT	GCA	CAG	AAG	CTG	GAA	AAG	CTC	AGC	TTC	810
Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	
			185				190						195			
GAA	GAA	ATG	CTG	GAA	CTT	GCT	GCT	GTT	GGC	TCC	AAG	ATT	TTG	GTG	CTG	858
Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	
			200			205					210					
CGC	AGT	GTT	GAA	TAC	GCT	CGT	GCA	TTC	AAT	GTG	CCA	CTT	CGC	GTA	CGC	906
Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn	Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	
				220						225				230		
TCG	TCT	TAT	AGT	AAT	GAT	CCC	GGC	ACT	TTG	ATT	GCC	GGC	TCT	ATG	GAG	954
Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu	Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	
				235				240						245		
GAT	ATT	CCT	GTG	GAA	GAA	GCA	GTC	CTT	ACC	GGT	GTC	GCA	ACC	GAC	AAG	1002
Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	
			250					255					260			
TCC	GAA	GCC	AAA	GTA	ACC	GTT	CTG	GGT	ATT	TCC	GAT	AAG	CCA	GGC	GAG	1050
Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	
			265				270						275			
GCT	GCC	AAG	GTT	TTC	CGT	GCG	TTG	GCT	GAT	GCA	GAA	ATC	AAC	ATT	GAC	1098
Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	
			280			285						290				
ATG	GTT	CTG	CAG	AAC	GTC	TCC	TCT	GTG	GAA	GAC	GGC	ACC	ACC	GAC	ATC	1146
Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	
			295		300					305				310		
ACG	TTC	ACC	TGC	CCT	CGC	GCT	GAC	GGA	CGC	CGT	GCG	ATG	GAG	ATC	TTG	1194
Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	
				315				320						325		

	AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC	1242
	Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp	
	330 335 340	
	CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA	1290
	Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro	
	345 350 355	
	GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC	1338
	Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn	
	360 365 370	
5	ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT	1386
	Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg	
	375 380 385 390	
	GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG	1434
	Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln	
	395 400 405	
	CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA	1482
	Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
	410 415 420	
10	AGTTTTAAAG GAGTAGTTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG	1542
	TCGGCCAGGT TATGCGCACC CTTTTGGAAG AGCGCAATTT CCCAGCTGAC ACTGTTTCGTT	1602
	TCTTTGCTTC CCCGCGTTC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C	1643

(2)SEQ ID NO: 5 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 421 个氨基酸

15

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5:

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

```

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

```

15

(2)SEQ ID NO: 6 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1643 个碱基

20 (B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

25 (A)有机体: 乳发酵短杆菌

(B)菌株: ATCC 13869

(ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 964..1482

30 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 6 :

	TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
	TGTTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120
	GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
	GTAACCTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
	GGCGGTTCCCT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
	ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
	GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
	CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
	GGCGCAGAAG CTCATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC	540
	GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600
5	AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG	660
	TTGGTCTGTG GTGGTCTGA CACCACTGCA GTTGGCTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
	GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CACTCGTTCCT	780
	AATGCACAGA AGCTGGAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTTGC TGCTGTTGGC	840
	TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900
	GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
	CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008
	Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu	
	1 5 10 15	
10	GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCC	1056
	Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala	
	20 25 30	
	AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104
	Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val	
	35 40 45	
	CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152
	Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe	
	50 55 60	
	ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200
	Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys	
15	65 70 75	
	CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248
	Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val	
	80 85 90 95	
	GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1296
	Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val	
	100 105 110	
	ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1344
	Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu	
	115 120 125	
20	TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1392
	Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp	
	130 135 140	
	GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC	1440
	Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly	
	145 150 155	
	GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTTAA	1490
	Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
	160 165 170	
	AGGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTGCGCCAG	1550
	GTTATGCGCA CCCTTTTGGGA AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG ACACTGTTCG TTTCTTTGCT	1610
25	TCCCCGCGTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC	1643

(2)SEQ ID NO: 7 的信息:

(i)序列特征:

30 (A)长度: 172 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7:

```

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

```

(2)SEQ ID NO:8 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基

(B)类型: 核酸

20 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc = "合成的 DNA"

(iv)反义: 否

25 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 8:

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAA

23

(2)SEQ ID NO:9 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基

30 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc = "合成的 DNA"

5 (iv)反义: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9 :

CGGTTTCATCG CCAAGTTTTT CTT

(2)SEQ ID NO:10 的信息:

10 (i)序列特征:

(A)长度: 2001 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

15 (ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

(A)有机体: 乳发酵短杆菌

(B)菌株: ATCC 13869

(ix)特征:

20 (A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 730..1473

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 10 :

	GGATCCCCAA	TCGATACCTG	GAACGACAAC	CTGATCAGGA	TATCCAATGC	CTTGAATATT	60
	GACGTTGAGG	AAGGAATCAC	CAGCCATCTC	AACTGGAAGA	CCTGACGCCT	GCTGAATTGG	120
	ATCAGTGGCC	CAATCGACCC	ACCAACCAGG	TTGGCTATTA	CCGGCGATAT	CAAAAACAAC	180
	TCGCGTGAAC	GTTTCGTGCT	CGGCAACGCG	GATGCCAGCG	ATCGACATAT	CGGAGTCACC	240
25	AACTTGAGCC	TGCTGCTTCT	GATCCATCGA	CGGGGAACCC	AACGGCGGCA	AAGCAGTGGG	300
	GGAAGGGGAG	TTGGTGGACT	CTGAATCAGT	GGGCTCTGAA	GTGGTAGGCG	ACGGGGCAGC	360
	ATCTGAAGGC	GTGCGAGTTG	TGGTGACCGG	GTTAGCGGTT	TCAGTTTCTG	TCACAACTGG	420
	AGCAGGACTA	GCAGAGGTTG	TAGGCGTTGA	GCCGCTTCCA	TCACAAGCAC	TTAAAAGTAA	480
	AGAGGCGGAA	ACCACAAGCG	CCAAGGAACT	ACCTGCGGAA	CGGGCGGTGA	AGGGCAACTT	540
	AAGTCTCATA	TTTCAAACAT	AGTTCCACCT	GTGTGATTAA	TCTCCAGAAC	GGAACAAACT	600
	GATGAACAAT	CGTTAACAAAC	ACAGACAAA	ACGGTFCAGTT	AGGTATGGAT	ATCAGCACCT	660
	TCTGAATGGG	TACGTCTAGA	CTGGTGGGCG	TTTGAAAAAC	TCTTCGCCCC	ACGAAAATGA	720
	AGGAGCATA	ATG GGA ATC	AAG GTT GGC	GTT CTC GGA	GCC AAA GGC	CGT	768
		Met Gly Ile	Lys Val Gly	Val Leu Gly	Ala Lys Gly	Arg	
30		1		5		10	

	GTT GGT CAA ACT TT GTG GCA GCA GTC AAT GAG TCC GAC G GTG GAS	816
	Val Gly Gln Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu	
	15 20 25	
	CTT GTT GCA GAG ATC GGC GTC GAC GAT GAT TTG AGC CTT CTG GTA GAC	864
	Leu Val Ala Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp	
	30 35 40 45	
	AAC GGC GCT GAA GTT GTC GTT GAC TTC ACC ACT CCT AAC GCT GTG ATG	912
	Asn Gly Ala Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met	
	50 55 60	
	GGC AAC CTG GAG TTC TGC ATC AAC AAC GGC ATT TCT GCG GTT GTT GGA	960
	Gly Asn Leu Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly	
	65 70 75	
5	ACC ACG GGC TTC GAT GAT GCT CGT TTG GAG CAG GTT CGC GCC TGG CTT	1008
	Thr Thr Gly Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Ala Trp Leu	
	80 85 90	
	GAA GGA AAA GAC AAT GTC GGT GTT CTG ATC GCA CCT AAC TTT GCT ATC	1056
	Glu Gly Lys Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile	
	95 100 105	
	TCT GCG GTG TTG ACC ATG GTC TTT TCC AAG CAG GCT GCC CGC TTC TTC	1104
	Ser Ala Val Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe	
	110 115 120 125	
	GAA TCA GCT GAA GTT ATT GAG CTG CAC CAC CCC AAC AAG CTG GAT GCA	1152
	Glu Ser Ala Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala	
	130 135 140	
10	CCT TCA GGC ACC GCG ATC CAC ACT GCT CAG GGC ATT GCT GCG GCA CGC	1200
	Pro Ser Gly Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Arg	
	145 150 155	
	AAA GAA GCA GGC ATG GAC GCA CAG CCA GAT GCG ACC GAG CAG GCA CTT	1248
	Lys Glu Ala Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu	
	160 165 170	
	GAG GGT TCC CGT GGC GCA AGC GTA GAT GGA ATC CCA GTT CAC GCA GTC	1296
	Glu Gly Ser Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val	
	175 180 185	
15	CGC ATG TCC GGC ATG GTT GCT CAC GAG CAA GTT ATC TTT GGC ACC CAG	1344
	Arg Met Ser Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln	
	190 195 200 205	
	GGT CAG ACC TTG ACC ATC AAG CAG GAC TCC TAT GAT CGC AAC TCA TTT	1392
	Gly Gln Thr Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe	
	210 215 220	
	GCA CCA GGT GTC TTG GTG GGT GTG CGC AAC ATT GCA CAG CAC CCA GGC	1440
	Ala Pro Gly Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly	
	225 230 235	
	CTA GTC GTA GGA CTT GAG CAT TAC CTA GGC CTG TAAAGGCTCA TTTCAGCAGC	1493
	Leu Val Val Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu	
20	240 245	
	GGGTGGAATT TTTTAAAAGG AGCGTTTTAAA GGCTGTGGCC GAACAAGTTA AATTGAGCGT	1553
	GGAGTTGATA CCGTGCAGTT CTTTTACTCC ACCCGCTGAT GTTGAGTGGT CAACTGATGT	1613
	TGAGGGCGCG GAAGCACTCG TCGAGTTTGC GGGTCGTGCC TGCTACGAAA CTTTTGATAA	1673
	GCCGAACCCT CGAACTGCTT CCAATGCTGC GTATCTGCGC CACATCATGG AAGTGGGGCA	1733
	CACTGCTTTG CTTGAGCATG CCAATGCCAC GATGTATATC CGAGGCATTT CTCGGTCCGC	1793
	GACCCATGAA TTGGTCCGAC ACCGCCATTT TTCCTTCTCT CAACTGTCTC AGCGTTTCGT	1853
	GCACAGCGGA GAATCGGAAG TAGTGGTGCC CACTCTCATC GATGAAGATC CGCAGTTGCG	1913
	TGAACTTTTC ATGCACGCCA TGGATGAGTC TCGGTTTCGCT TTCAATGAGC TGCTTAATGC	1973
	GCTGGAAGAA AAACCTTGCG ATGAACCG	2001

25 (2)SEQ ID NO:11 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 248 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

30 (ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 11:

```

Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg Val Gly Gln
 1          5          10          15
Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu Leu Val Ala
 20          25          30
Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp Asn Gly Ala
 35          40          45
5  Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met Gly Asn Leu
 50          55          60
Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly Thr Thr Gly
 65          70          75          80
Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Ala Trp Leu Glu Gly Lys
 85          90          95
Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile Ser Ala Val
100          105          110
Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe Glu Ser Ala
115          120          125
10 Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala Pro Ser Gly
130          135          140
Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Arg Lys Glu Ala
145          150          155          160
Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu Glu Gly Ser
165          170          175
Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val Arg Met Ser
180          185          190
Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln Gly Gln Thr
195          200          205
15 Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe Ala Pro Gly
210          215          220
Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly Leu Val Val
225          230          235          240
Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu
245

```

(2)SEQ ID NO:12 的信息:

(i)序列特征:

- 20 (A)长度: 23 个碱基
 (B)类型: 核酸
 (C)链型: 单链
 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

- 25 (A)描述: desc = "合成的 DNA"

(iv)反义: 否

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 12:

CTCGACGGAT CGCAAATGGC AAC

23

(2)SEQ ID NO:13 的信息:

- 30 (i)序列特征:

- (A)长度: 23 个碱基
 (B)类型: 核酸
 (C)链型: 单链
 (D)拓扑结构: 线性
- 5 (ii)分子类型: 其它核酸
 (A)描述: desc="合成的 DNA"
 (iv)反义: 是
 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 13 :
 GGATCCTTGA GCACCTTGCG CAG 23

10

(2)SEQ ID NO:14 的信息:

- (i)序列特征:
 (A)长度: 1411 个碱基
 (B)类型: 核酸
 15 (C)链型: 双链
 (D)拓扑结构: 线性
 (ii)分子类型: 基因组 DNA
 (vi)原始来源:
 (A)有机体: 乳发酵短杆菌
 20 (B)菌株: ATCC 13869
 (ix)特征:
 (A)名称/关键词: CDS
 (B)位置: 311..1213
 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 14 :
- | | | |
|----|---|-----|
| 25 | CTCTCGATAT CGAGAGAGAA GCAGCGCCAC GGTTTTTCGG TGATTTTGAG ATTGAACTT | 60 |
| | TGGCAGACGG ATCGCAAATG GCAACAAGCC CGTATGTCAT GGACTTTTAA CGCAAAGCTC | 120 |
| | ACACCCACGA GCTAAAAAT CATATAGTTA AGACAACATT TTTGGCTGTA AAAGACAGCC | 180 |
| | GTAAAAACCT CTTGTCATG TCAATTGTTT TTATCGGAAT GTGGCTTGGG CGATTGTTAT | 240 |
| | GCAAAAGTTG TTAGGTTTTT TGCGGGGTTG TTTAACCCCC AAATGAGGGA AGAAGGTAAC | 300 |
| | CTTGA ACTCT ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC | 349 |

	Met	Ser	Thr	Gly	Leu	Thr	Ala	Lys	Thr	Gly	Val	Glu	His			
	1				5					10						
TTC	GGC	ACC	GTT	GGA	GTA	GCA	ATG	GTT	ACT	CCA	TTC	ACG	TCC	GGA	397	
Phe	Gly	Thr	Val	Gly	Val	Ala	Met	Val	Thr	Pro	Phe	Thr	Glu	Ser	Gly	
	15				20					25						
GAC	ATC	GAT	ATC	GCT	GCT	GGC	CGC	GAA	GTC	GCG	GCT	TAT	TTG	GTT	GAT	445
Asp	Ile	Asp	Ile	Ala	Ala	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Ala	Tyr	Leu	Val	Asp	
	30			35				40					45			
AAG	GGC	TTG	GAT	TCT	TTG	GTT	CTC	GCG	GGC	ACC	ACT	GGT	GAA	TCC	CCA	493
Lys	Gly	Leu	Asp	Ser	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser	Pro	
				50				55					60			
ACG	ACA	ACC	GCC	GCT	GAA	AAA	CTA	GAA	CTG	CTC	AAG	GCC	GTT	CGT	GAG	541
Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Arg	Glu	
			65				70						75			
GAA	GTT	GGG	GAT	CGG	GCG	AAC	GTC	ATC	GCC	GGT	GTC	GGA	ACC	AAC	AAC	589
Glu	Val	Gly	Asp	Arg	Ala	Asn	Val	Ile	Ala	Gly	Val	Gly	Thr	Asn	Asn	
			80				85						90			
ACG	CGG	ACA	TCT	GTG	GAA	CTT	GCG	GAA	GCT	GCT	GCT	TCT	GCT	GGC	GCA	637
Thr	Arg	Thr	Ser	Val	Glu	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	
	95					100						105				
GAC	GGC	CTT	TTA	GTT	GTA	ACT	CCT	TAT	TAC	TCC	AAG	CCG	AGC	CAA	GAG	685
Asp	Gly	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ser	Gln	Glu	
	110				115					120					125	
GGA	TTG	CTG	GCG	CAC	TTC	GGT	GCA	ATT	GCT	GCA	GCA	ACA	GAG	GTT	CCA	733
Gly	Leu	Leu	Ala	His	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Glu	Val	Pro	
			130						135					140		
ATT	TGT	CTC	TAT	GAC	ATT	CCT	GGT	CGG	TCA	GGT	ATT	CCA	ATT	GAG	TCT	781
Ile	Cys	Leu	Tyr	Asp	Ile	Pro	Gly	Arg	Ser	Gly	Ile	Pro	Ile	Glu	Ser	
			145				150						155			
GAT	ACC	ATG	AGA	CGC	CTG	AGT	GAA	TTA	CCT	ACG	ATT	TTG	GCG	GTC	AAG	829
Asp	Thr	Met	Arg	Arg	Leu	Ser	Glu	Leu	Pro	Thr	Ile	Leu	Ala	Val	Lys	
	160						165					170				
GAC	GCC	AAG	GGT	GAC	CTC	GTT	GCA	GCC	ACG	TCA	TTG	ATC	AAA	GAA	ACG	877
Asp	Ala	Lys	Gly	Asp	Leu	Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Thr	
	175				180						185					
GGA	CTT	GCC	TGG	TAT	TCA	GGC	GAT	GAC	CCA	CTA	AAC	CTT	GTT	TGG	CTT	925
Gly	Leu	Ala	Trp	Tyr	Ser	Gly	Asp	Asp	Pro	Leu	Asn	Leu	Val	Trp	Leu	
	190				195				200						205	
GCT	TTG	GGC	GGA	TCA	GGT	TTC	ATT	TCC	GTA	ATT	GGA	CAT	GCA	GCC	CCC	973
Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Phe	Ile	Ser	Val	Ile	Gly	His	Ala	Ala	Pro	
			210						215					220		
ACA	GCA	TTA	CGT	GAG	TTG	TAC	ACA	AGC	TTC	GAG	GAA	GGC	GAC	CTC	GTC	1021
Thr	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Phe	Glu	Glu	Gly	Asp	Leu	Val	
			225					230					235			
CGT	GCG	CGG	GAA	ATC	AAC	GCC	AAA	CTA	TCA	CCG	CTG	GTA	GCT	GCC	CAA	1069
Arg	Ala	Arg	Glu	Ile	Asn	Ala	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Val	Ala	Ala	Gln	
			240				245						250			
GGT	CGC	TTG	GGT	GGA	GTC	AGC	TTG	GCA	AAA	GCT	GCT	CTG	CGT	CTG	CAG	1117
Gly	Arg	Leu	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Arg	Leu	Gln	
	255				260								265			
GGC	ATC	AAC	GTA	GGA	GAT	CCT	CGA	CTT	CCA	ATT	ATG	GCT	CCA	AAT	GAG	1165
Gly	Ile	Asn	Val	Gly	Asp	Pro	Arg	Leu	Pro	Ile	Met	Ala	Pro	Asn	Glu	
	270				275					280					285	
CAG	GAA	CTT	GAG	GCT	CTC	CGA	GAA	GAC	ATG	AAA	AAA	GCT	GGA	GTT	CTA	1213
Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Asp	Met	Lys	Lys	Ala	Gly	Val	Leu	
			290						295					300		

```

TAAATATGAA TGATTCCCGA AATCGCGGCC GGAAGGTTAC CCGCAAGGCG GCCCACCAGA 1273
AGCTGGTCAG GAAAACCATC TGGATACCCC TGTCTTTCAG GCACCAGATG CTTCCTCTAA 1333
CCAGAGCGCT GTAAAAGCTG AGACCGCCGG AAACGACAAT CGGGATGCTG CGCAAGGTGC 1393
TCAAGGATCC CAACATTC 1411

```

5

(2)SEQ ID NO:15 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 301 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

10

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 15:

```

Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr
  1          5          10          15
Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp
          20          25          30
15 Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu
          35          40          45
Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr
          50          55          60
Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly
          65          70          75          80
Asp Arg Ala Asn Val Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr
          85          90          95
Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu
          100          105          110
20 Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu
          115          120          125
Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu
          130          135          140
Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met
          145          150          155          160
Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys
          165          170          175
Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala
          180          185          190
25 Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly
          195          200          205
Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu
          210          215          220
Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg
          225          230          235          240
Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu
          245          250          255
Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln Gly Ile Asn
          260          265          270
30 Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Gln Glu Leu
          275          280          285
Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu
          290          295          300

```

(2)SEQ ID NO:的信息: 16:

(i)序列特征:

5 (A)长度: 23 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

10 (A)描述: desc = "合成的 DNA"

(iv)反义: 否

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 16:

GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGG

23

15 (2)SEQ ID NO:17 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

20 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc = "合成的 DNA"

(iv)反义: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 17:

25 CCAAACCGC CCTCCACGGC GAA

23

(2)SEQ ID NO:18 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 3579 个碱基

30 (B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

5 (A)有机体: 乳发酵短杆菌

(B)菌株: ATCC 13869

(ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 533..2182

10 (ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 2188..3522

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 18 :

```

GTGGAGCCGA CCATTCGCG AGGCTGCACT GCAACGAGGT CGTAGTTTTG GTACATGGCT      60
TCTGGCCAGT TCATGGATTG GCTGCCGAAG AAGCTATAGG CATCGCACCA GGGCCACCGA      120
GTTACCGAAG ATGGTGCCGT GCTTTTCGCC TTGGGCAGGG ACCTTGACAA AGCCCACGCT      180
GATATCGCCA AGTGAGGGAT CAGAATAGTG CATGGGCACG TCGATGCTGC CACATTGAGC      240
GGAGGCAATA TCTACCTGAG GTGGGCATTC TTCCAGCGG ATGTTTTCTT GCGCTGCTGC      300

```


AGTGGGCATT	GATACCAAAA	AGGGGCTAAG	CGCAGTCGAG	GCGGCAAGAA	CTGCTACTAC	360		
CCTTTTTTATT	GTCGAACGGG	GCATTACGGC	TCCAAGGACG	TTTGTTTTCT	GGGTCAGTTA	420		
CCCCAAAAG	CATATACAGA	GACCAATGAT	TTTTTCATTAA	AAAGGCAGGG	ATTTGTTATA	480		
AGTATGGGTC	GTATTCTGTG	CGACGGGTGT	ACCTCGGCTA	GAATTTCTCC	CC ATG	535		
				Met				
				1				
ACA CCA GCT	GAT CTC	GCA ACA	TTG ATT	AAA GAG	ACC GCG	GTA GAG	GTT	583
Thr Pro Ala	Asp Leu	Ala Ala	Thr Leu	Ile Lys	Glu Thr	Ala Val	Glu Val	
	5		10		15			
TTG ACC TCC	CGC GAG	CTC GAT	ACT TCT	GTT CTT	CCG GAG	CAG GTA	GTT	631
Leu Thr Ser	Arg Glu	Leu Asp	Thr Ser	Val Leu	Pro Glu	Gln Val	Val	
	20		25		30			
GTG GAG CGT	CCG CGT	AAC CCA	GAG CAC	GGC GAT	TAC GCC	ACC AAC	ATT	679
Val Glu Arg	Pro Arg	Asn Pro	Glu His	Gly Asp	Tyr Ala	Thr Asn	Ile	
	35		40		45			
GCA TTG CAG	GTG GCT	AAA AAG	GTC GGT	CAG AAC	CCT CGG	GAT TTG	GCT	727
Ala Leu Gln	Val Ala	Lys Lys	Val Gly	Gln Asn	Pro Arg	Asp Leu	Ala	
	50		55		60		65	
ACC TGG CTG	GCA GAG	GCA TTG	GCT GCA	GAT GAC	GCC ATT	GAT TCT	GCT	775
Thr Trp Leu	Ala Glu	Ala Leu	Ala Ala	Asp Asp	Ala Ile	Asp Ser	Ala	
	70		75		80			
GAA ATT GCT	GGC CCA	GGC TTT	TTG AAC	ATT CGC	CTT GCT	GCA GCA	GCA	823
Glu Ile Ala	Gly Pro	Gly Phe	Leu Asn	Ile Arg	Leu Ala	Ala Ala	Ala	
	85		90		95			
CAG GGT GAA	ATT GTG	GCC AAG	ATT CTG	GCA CAG	GGC GAG	ACT TTC	GGA	871
Gln Gly Glu	Ile Val	Ala Lys	Ile Leu	Ala Gln	Gly Glu	Thr Phe	Gly	
	100		105		110			
AAC TCC GAT	CAC CTT	TCC CAC	TTG GAC	GTG AAC	CTC GAG	TTC GTT	TCT	919
Asn Ser Asp	His Leu	Ser His	Leu Asp	Val Asn	Leu Glu	Phe Val	Ser	
	115		120		125			
GCA AAC CCA	ACC GGA	CCT ATT	CAC CTT	GGC GGA	ACC CGC	TGG GCT	GCC	967
Ala Asn Pro	Thr Gly	Pro Ile	His Leu	Gly Gly	Thr Arg	Trp Ala	Ala	
	130		135		140		145	
GTG GGT GAC	TCT TTG	GGT CGT	GTG CTG	GAG GCT	TCC GGC	GCG AAA	GTG	1015
Val Gly Asp	Ser Leu	Gly Arg	Val Leu	Glu Ala	Ser Gly	Ala Lys	Val	
	150		155		160			
ACC CGC GAA	TAC TAC	TTC AAC	GAT CAC	GGT CGC	CAG ATC	GAT CGT	TTC	1063
Thr Arg Glu	Tyr Tyr	Phe Asn	Asp His	Gly Arg	Gln Ile	Asp Arg	Phe	
	165		170		175			
GCT TTG TCC	CTT CTT	GCA GCG	GCG AAG	GGC GAG	CCA ACG	CCA GAA	GAC	1111
Ala Leu Ser	Leu Leu	Ala Ala	Ala Lys	Gly Glu	Pro Thr	Pro Glu	Asp	
	180		185		190			
GGT TAT GGC	GGC GAA	TAC ATT	AAG GAA	ATT GCG	GAG GCA	ATC GTC	GAA	1159
Gly Tyr Gly	Gly Glu	Tyr Ile	Lys Glu	Ile Ala	Glu Ala	Ile Val	Glu	
	195		200		205			
AAG CAT CCT	GAA GCG	TTG GCT	TTG GAG	CCT GCC	GCA ACC	CAG GAG	CTT	1207
Lys His Pro	Glu Ala	Leu Ala	Leu Glu	Pro Ala	Ala Thr	Gln Glu	Leu	
	210		215		220		225	
TTC CGC GCT	GAA GGC	GTG GAG	ATG ATG	TTC GAG	CAC ATC	AAA TCT	TCC	1255
Phe Arg Ala	Glu Gly	Val Glu	Met Met	Phe Glu	His Ile	Lys Ser	Ser	
	230		235		240			
CTG CAT GAG	TTC GGC	ACC GAT	TTC GAT	GTC TAC	TAC CAC	GAG AAC	TCC	1303
Leu His Glu	Phe Gly	Thr Asp	Phe Asp	Val Tyr	Tyr His	Glu Asn	Ser	
	245		250		255			
CTG TTC GAG	TCC GGT	GCG GTG	GAC AAG	GCC GTG	CAG GTG	CTG AAG	GAC	1351
Leu Phe Glu	Ser Gly	Ala Val	Asp Lys	Ala Val	Gln Val	Leu Lys	Asp	
	260		265		270			
AAC GGC AAC	CTG TAC	GAA AAC	GAG GGC	GCT TGG	TGG CTG	CGT TCC	ACC	1399

Asn	Gly	Asn	Leu	Tyr	Glu	Asn	Glu	Gly	Ala	Trp	Trp	Leu	Arg	Ser	Thr		
	275					280					285						
GAA	TTC	GGC	GAT	GAC	AAA	GAC	CGC	GTG	GTG	ATC	AAG	TCT	GAC	GGC	GAC	1447	
Glu	Phe	Gly	Asp	Asp	Lys	Asp	Arg	Val	Val	Ile	Lys	Ser	Asp	Gly	Asp		
	290				295					300					305		
GCA	GCC	TAC	ATC	GCT	GGC	GAT	ATC	GCG	TAC	GTG	GCT	GAT	AAG	TTC	TCC	1495	
Ala	Ala	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala	Tyr	Val	Ala	Asp	Lys	Phe	Ser		
				310					315						320		
CGC	GGA	CAC	AAC	CTA	AAC	ATC	TAC	ATG	TTG	GGT	GCT	GAC	CAC	CAT	GGT	1543	
Arg	Gly	His	Asn	Leu	Asn	Ile	Tyr	Met	Leu	Gly	Ala	Asp	His	His	Gly		
			325					330						335			
TAC	ATC	GCG	CGC	CTG	AAG	GCA	GCG	GCG	GCG	GCA	CTT	GGC	TAC	AAG	CCA	1591	
Tyr	Ile	Ala	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Tyr	Lys	Pro		
		340					345							350			
GAA	GGC	GTT	GAA	GTC	CTG	ATT	GGC	CAG	ATG	GTG	AAC	CTG	CTT	CGC	GAC	1639	
Glu	Gly	Val	Glu	Val	Leu	Ile	Gly	Gln	Met	Val	Asn	Leu	Leu	Arg	Asp		
	355				360						365						
GGC	AAG	GCA	GTG	CGT	ATG	TCC	AAG	CGT	GCA	GGC	ACC	GTG	GTC	ACC	CTA	1687	
Gly	Lys	Ala	Val	Arg	Met	Ser	Lys	Arg	Ala	Gly	Thr	Val	Val	Thr	Leu		
	370				375						380				385		
GAT	GAC	CTC	GTT	GAA	GCA	ATC	GGC	ATC	GAT	GCG	GCG	CGT	TAC	TCC	CTG	1735	
Asp	Asp	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ser	Leu		
				390					395						400		
ATC	CGT	TCC	TCC	GTG	GAT	TCT	TCC	CTG	GAT	ATC	GAT	CTC	GGC	CTG	TGG	1783	
Ile	Arg	Ser	Ser	Val	Asp	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Leu	Trp		
				405					410						415		
GAA	TCC	CAG	TCC	TCC	GAC	AAC	CCT	GTG	TAC	TAC	GTG	CAG	TAC	GGA	CAC	1831	
Glu	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Asn	Pro	Val	Tyr	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly	His		
		420					425							430			
GCT	CGT	CTG	TGC	TCC	ATC	GCG	CGC	AAG	GCA	GAG	ACC	TTG	GGT	GTC	ACC	1879	
Ala	Arg	Leu	Cys	Ser	Ile	Ala	Arg	Lys	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Val	Thr		
	435					440								445			
GAG	GAA	GGC	GCA	GAC	CTA	TCT	CTA	CTG	ACC	CAC	GAC	CGC	GAA	GGC	GAT	1927	
Glu	Glu	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	His	Asp	Arg	Glu	Gly	Asp		
	450				455						460				465		
CTC	ATC	CGC	ACA	CTC	GGA	GAG	TTC	CCA	GCA	GTG	GTG	AAG	GCT	GCC	GCT	1975	
Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Glu	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Ala	Ala		
				470					475						480		
GAC	CTA	CGT	GAA	CCA	CAC	CGC	ATT	GCC	CGC	TAT	GCT	GAG	GAA	TTA	GCT	2023	
Asp	Leu	Arg	Glu	Pro	His	Arg	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ala	Glu	Glu	Leu	Ala		
			485						490						495		
GGA	ACT	TTC	CAC	CGC	TTC	TAC	GAT	TCC	TGC	CAC	ATC	CTT	CCA	AAG	GTT	2071	
Gly	Thr	Phe	His	Arg	Phe	Tyr	Asp	Ser	Cys	His	Ile	Leu	Pro	Lys	Val		
		500					505								510		
GAT	GAG	GAT	ACG	GCA	CCA	ATC	CAC	ACA	GCA	CGT	CTG	GCA	CTT	GCA	GCA	2119	
Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Pro	Ile	His	Thr	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala		
	515				520										525		
GCA	ACC	CGC	CAG	ACC	CTC	GCT	AAC	GCC	CTG	CAC	CTG	GTT	GGC	GTT	TCC	2167	
Ala	Thr	Arg	Gln	Thr	Leu	Ala	Asn	Ala	Leu	His	Leu	Val	Gly	Val	Ser		
	530				535						540				545		
GCA	CCG	GAG	AAG	ATG	TAACA	ATG	GCT	ACA	GTT	GAA	AAT	TTC	AAT	GAA		2214	
Ala	Pro	Glu	Lys	Met		Met	Ala	Thr	Val	Glu	Asn	Phe	Asn	Glu			
				550			1				5						
CTT	CCC	GCA	CAC	GTA	TGG	CCA	CGC	AAT	GCC	GTG	CGC	CAA	GAA	GAC	GGC	2262	
Leu	Pro	Ala	His	Val	Trp	Pro	Arg	Asn	Ala	Val	Arg	Gln	Glu	Asp	Gly		
	10				15					20					25		
GTT	GTC	ACC	GTC	GCT	GGT	GTG	CCT	CTG	CCT	GAC	CTC	GCT	GAA	GAA	TAC	2310	
Val	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Pro	Asp	Leu	Ala	Glu	Glu	Tyr		

GGA	ACC	CCA	CTG	TTC	GTA	GTC	GAC	GAG	GAC	GAT	TTC	CGT	TCC	CGC	TGT	2358
Gly	Thr	Pro	Leu	Phe	Val	Val	Asp	Glu	Asp	Asp	Phe	Arg	Ser	Arg	Cys	
			45					50					55			
CGC	GAC	ATG	GCT	ACC	GCA	TTC	GGT	GGA	CCA	GGC	AAT	GTG	CAC	TAC	GCA	2406
Arg	Asp	Met	Ala	Thr	Ala	Phe	Gly	Gly	Pro	Gly	Asn	Val	His	Tyr	Ala	
		60					65					70				
TCT	AAA	GCG	TTC	CTG	ACC	AAG	ACC	ATT	GCA	CGT	TGG	GTT	GAT	GAA	GAG	2454
Ser	Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala	Arg	Trp	Val	Asp	Glu	Glu	
	75					80					85					
GGG	CTG	GCA	CTG	GAC	ATT	GCA	TCC	ATC	AAC	GAA	CTG	GGC	ATT	GCC	CTG	2502
Gly	Leu	Ala	Leu	Asp	Ile	Ala	Ser	Ile	Asn	Glu	Leu	Gly	Ile	Ala	Leu	
	90				95				100					105		
GCC	GCT	GGT	TTC	CCC	GCC	AGC	CGT	ATC	ACC	GCG	CAC	GGC	AAC	AAC	AAA	2550
Ala	Ala	Gly	Phe	Pro	Ala	Ser	Arg	Ile	Thr	Ala	His	Gly	Asn	Asn	Lys	
				110					115					120		
GGC	GTA	GAG	TTC	CTG	CGC	GCG	TTG	GTT	CAA	AAC	GGT	GTG	GGA	CAC	GTG	2598
Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Arg	Ala	Leu	Val	Gln	Asn	Gly	Val	Gly	His	Val	
			125				130					135				
GTG	CTG	GAC	TCC	GCA	CAG	GAA	CTA	GAA	CTG	TTG	GAT	TAC	GTT	GCC	GCT	2646
Val	Leu	Asp	Ser	Ala	Gln	Glu	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Tyr	Val	Ala	Ala	
			140				145					150				
GGT	GAA	GGC	AAG	ATT	CAG	GAC	GTG	TTG	ATC	CGC	GTA	AAG	CCA	GGC	ATC	2694
Gly	Glu	Gly	Lys	Ile	Gln	Asp	Val	Leu	Ile	Arg	Val	Lys	Pro	Gly	Ile	
	155					160					165					
GAA	GCA	CAC	ACC	CAC	GAG	TTC	ATC	GCC	ACT	AGC	CAC	GAA	GAC	CAG	AAG	2742
Glu	Ala	His	Thr	His	Glu	Phe	Ile	Ala	Thr	Ser	His	Glu	Asp	Gln	Lys	
	170				175					180					185	
TTC	GGA	TTC	TCC	CTG	GCA	TCC	GGT	TCC	GCA	TTC	GAA	GCA	GCA	AAA	GCC	2790
Phe	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Phe	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	
			190						195					200		
GCC	AAC	AAC	GCA	GAA	AAC	CTG	AAC	CTG	GTT	GGC	CTG	CAC	TGC	CAC	GTT	2838
Ala	Asn	Asn	Ala	Glu	Asn	Leu	Asn	Leu	Val	Gly	Leu	His	Cys	His	Val	
			205					210					215			
GGT	TCC	CAG	GTG	TTC	GAC	GCC	GAA	GGC	TTC	AAG	CTG	GCA	GCA	GAA	CGC	2886
Gly	Ser	Gln	Val	Phe	Asp	Ala	Glu	Gly	Phe	Lys	Leu	Ala	Ala	Glu	Arg	
		220					225					230				
GTG	TTG	GGC	CTG	TAC	TCA	CAG	ATC	CAC	AGC	GAA	CTG	GGC	GTT	GCC	CTT	2934
Val	Leu	Gly	Leu	Tyr	Ser	Gln	Ile	His	Ser	Glu	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	
	235					240						245				
CCT	GAA	CTG	GAT	CTC	GGT	GGC	GGA	TAC	GGC	ATT	GCC	TAT	ACC	GCA	GCT	2982
Pro	Glu	Leu	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ile	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	
	250				255					260					265	
GAA	GAA	CCA	CTC	AAC	GTC	GCA	GAA	GTT	GCC	TCC	GAC	CTG	CTC	ACC	GCA	3030
Glu	Glu	Pro	Leu	Asn	Val	Ala	Glu	Val	Ala	Ser	Asp	Leu	Leu	Thr	Ala	
			270						275					280		
GTC	GGA	AAA	ATG	GCA	GCG	GAA	CTA	GGC	ATC	GAC	GCA	CCA	ACC	GTG	CTT	3078
Val	Gly	Lys	Met	Ala	Ala	Glu	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Pro	Thr	Val	Leu	
			285					290						295		
GTT	GAG	CCC	GGC	CGC	GCT	ATC	GCA	GGC	CCC	TCC	ACC	GTG	ACC	ATC	TAC	3126
Val	Glu	Pro	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala	Gly	Pro	Ser	Thr	Val	Thr	Ile	Tyr	
		300					305					310				
GAA	GTC	GGC	ACC	ACC	AAA	GAC	GTC	CAC	GTA	GAC	GAC	GAC	AAA	ACC	CGC	3174
Glu	Val	Gly	Thr	Thr	Lys	Asp	Val	His	Val	Asp	Asp	Asp	Lys	Thr	Arg	
	315					320					325					
CGT	TAC	ATC	GCC	GTG	GAC	GGA	GGC	ATG	TCC	GAC	AAC	ATC	CGC	CCA	GCA	3222
Arg	Tyr	Ile	Ala	Val	Asp	Gly	Gly	Met	Ser	Asp	Asn	Ile	Arg	Pro	Ala	
	330					335				340					345	

	CTC TAC GGC TCC GAA TAC GAC GCC CGC GTA GTA TCC CGC TTC GCC GAA	3270
	Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu	
	350 355 360	
	GGA GAC CCA GTA AGC ACC CGC ATC GTG GGC TCC CAC TGC GAA TCC GGC	3318
	Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly	
	365 370 375	
5	GAT ATC CTG ATC AAC GAT GAA ATC TAC CCA TCT GAC ATC ACC AGC GGC	3366
	Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly	
	380 385 390	
	GAC TTC CTT GCA CTC GCA GCC ACC GGC GCA TAC TGC TAC GCC ATG AGC	3414
	Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser	
	395 400 405	
	TCC CGC TAC AAC GCC TTC ACA CGG CCC GCC GTC GTG TCC GTC CGC GCT	3462
	Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala	
	410 415 420 425	
	GGC AGC TCC CGC CTC ATG CTG CGC CGC GAA ACG CTC GAC GAC ATC CTC	3510
	Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu	
	430 435 440	
10	TCA CTA GAG GCA TAACGCTTTT CGACGCCTGA CCCCGCCCTT CACCTTCGCC	3562
	Ser Leu Glu Ala	
	445	
	GTGGAGGGCG GTTTTGG	3579

(2)SEQ ID NO:19 的信息:

(i)序列特征:

15 (A)长度: 550 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 19:

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

```

      180              185              190
Asp Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val
      195              200              205
Glu Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu
      210              215              220
Leu Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser
225                230              235
Ser Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn
      245              250              255
Ser Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys
      260              265              270
Asp Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser
275                280              285
5 Thr Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly
      290              295              300
Asp Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe
305                310              315
Ser Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His
      325              330              335
Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys
      340              345              350
Pro Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Gly Gln Met Val Asn Leu Leu Arg
      355              360              365
10 Asp Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr
      370              375              380
Leu Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser
385                390              395
Leu Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu
      405              410              415
Trp Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly
      420              425              430
His Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val
      435              440              445
15 Thr Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly
      450              455              460
Asp Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Pro Ala Val Val Lys Ala Ala
465                470              475
Ala Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu
      485              490              495
Ala Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys
      500              505              510
Val Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala
      515              520              525
20 Ala Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val
      530              535              540
Ser Ala Pro Glu Lys Met
      545              550

```

(2)SEQ ID NO:20 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 445 个氨基酸

25 (B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 20 :

```

Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro
 1          5          10          15
Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly Val Val Thr Val Ala Gly Val
 20          25          30
Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val
 35          40          45
Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe
 50          55          60
Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys
 65          70          75          80
Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala
 85          90          95
Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser
 100         105         110
Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala
 115         120         125
Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu
 130         135         140
Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp
 145         150         155         160
Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe
 165         170         175
Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser
 180         185         190
Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu
 195         200         205
Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala
 210         215         220
Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln
 225         230         235         240
Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly
 245         250         255
Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala
 260         265         270
Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu
 275         280         285
Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile
 290         295         300
Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp
 305         310         315         320
Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly
 325         330         335
Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp
 340         345         350
Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg
 355         360         365
Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu
 370         375         380
Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala
 385         390         395         400
Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr
 405         410         415
Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu
 420         425         430
Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu Ser Leu Glu Ala
 435         440         445

```

(2)SEQ ID NO: 21 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc = "合成的 DNA"

(iv)反义: 是

10 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 21 :

AACCTCGTCA TGTTTGAGAA

20

(2)SEQ ID NO:22 的信息:

(i)序列特征:

15 (A)长度: 20 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

20 (A)描述: desc = "合成的 DNA"

(iv)反义: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 22 :

CCGGCCTACA AAATCGTGCA

20

25 (2)SEQ ID NO: 23 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1331 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

30 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

(A)有机体: 大肠杆菌

(B)菌株: JM109

5 (ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 10..1197

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 23 :

```

AACCTCGTC ATG TTT GAG AAC ATT ACC GCC GCT CCT GCC GAC CCG ATT      48
      Met Phe Glu Asn Ile Thr Ala Ala Pro Ala Asp Pro Ile
          1           5           10
10  CTG GGC CTG GCC GAT CTG TTT CGT GCC GAT GAA CGT CCC GGC AAA ATT      96
    Leu Gly Leu Ala Asp Leu Phe Arg Ala Asp Glu Arg Pro Gly Lys Ile
          15           20           25
    AAC CTC GGG ATT GGT GTC TAT AAA GAT GAG ACG GGC AAA ACC CCG GTA      144
    Asn Leu Gly Ile Gly Val Tyr Lys Asp Glu Thr Gly Lys Thr Pro Val
          30           35           40           45
    CTG ACC AGC GTG AAA AAG GCT GAA CAG TAT CTG CTC GAA AAT GAA ACC      192
    Leu Thr Ser Val Lys Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Leu Glu Asn Glu Thr
          50           55           60
    ACC AAA AAT TAC CTC GGC ATT GAC GGC ATC CCT GAA TTT GGT CGC TGC      240
    Thr Lys Asn Tyr Leu Gly Ile Asp Gly Ile Pro Glu Phe Gly Arg Cys
          65           70           75
    ACT CAG GAA CTG CTG TTT GGT AAA GGT AGC GCC CTG ATC AAT GAC AAA      288
    Thr Gln Glu Leu Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ala Leu Ile Asn Asp Lys
          80           85           90
    CGT GCT CGC ACG GCA CAG ACT CCG GGG GGC ACT GGC GCA CTA CGC GTG      336
    Arg Ala Arg Thr Ala Gln Thr Pro Gly Gly Thr Gly Ala Leu Arg Val
          95           100           105
    GCT GCC GAT TTC CTG GCA AAA AAT ACC AGC GTT AAG CGT GTG TGG GTG      384
    Ala Ala Asp Phe Leu Ala Lys Asn Thr Ser Val Lys Arg Val Trp Val
          110           115           120           125
20  AGC AAC CCA AGC TGG CCG AAC CAT AAG AGC GTC TTT AAC TCT GCA GGT      432
    Ser Asn Pro Ser Trp Pro Asn His Lys Ser Val Phe Asn Ser Ala Gly
          130           135           140
    CTG GAA GTT CGT GAA TAC GCT TAT TAT GAT GCG GAA AAT CAC ACT CTT      480
    Leu Glu Val Arg Glu Tyr Ala Tyr Tyr Asp Ala Glu Asn His Thr Leu
          145           150           155
    GAC TTC GAT GCA CTG ATT AAC AGC CTG AAT GAA GCT CAG GCT GGC GAC      528
    Asp Phe Asp Ala Leu Ile Asn Ser Leu Asn Glu Ala Gln Ala Gly Asp
          160           165           170
25  GTA GTG CTG TTC CAT GGC TGC TGC CAT AAC CCA ACC GGT ATC GAC CCT      576
    Val Val Leu Phe His Gly Cys Cys His Asn Pro Thr Gly Ile Asp Pro
          175           180           185
    ACG CTG GAA CAA TGG CAA ACA CTG GCA CAA CTC TCC GTT GAG AAA GGC      624
    Thr Leu Glu Gln Trp Gln Thr Leu Ala Gln Leu Ser Val Glu Lys Gly
          190           195           200           205
    TGG TTA CCG CTG TTT GAC TTC GCT TAC CAG GGT TTT GCC CGT GGT CTG      672
    Trp Leu Pro Leu Phe Asp Phe Ala Tyr Gln Gly Phe Ala Arg Gly Leu
          210           215           220

```

30

	GAA GAA GAT GCT GAA GGA CTG CGC GCT TTC GCG GCT ATG CAT AAA GAG	720
	Glu Glu Asp Ala Glu Gly Leu Arg Ala Phe Ala Ala Met His Lys Glu	
	225 230 235	
	CTG ATT GTT GCC AGT TCC TAC TCT AAA AAC TTT GGC CTG TAC AAC GAG	768
	Leu Ile Val Ala Ser Ser Tyr Ser Lys Asn Phe Gly Leu Tyr Asn Glu	
	240 245 250	
5	CGT GTT GGC GCT TGT ACT CTG GTT GCT GCC GAC AGT GAA ACC GTT GAT	816
	Arg Val Gly Ala Cys Thr Leu Val Ala Ala Asp Ser Glu Thr Val Asp	
	255 260 265	
	CGC GCA TTC AGC CAA ATG AAA GCG GCG ATT CGC GCT AAC TAC TCT AAC	864
	Arg Ala Phe Ser Gln Met Lys Ala Ala Ile Arg Ala Asn Tyr Ser Asn	
	270 275 280 285	
	CCA CCA GCA CAC GGC GCT TCT GTT GTT GCC ACC ATC CTG AGC AAC GAT	912
	Pro Pro Ala His Gly Ala Ser Val Val Ala Thr Ile Leu Ser Asn Asp	
	290 295 300	
10	GCG TTA CGT GCG ATT TGG GAA CAA GAG CTG ACT GAT ATG CGC CAG CGT	960
	Ala Leu Arg Ala Ile Trp Glu Gln Glu Leu Thr Asp Met Arg Gln Arg	
	305 310 315	
	ATT CAG CGT ATG CGT CAG TTG TTC GTC AAT ACG CTG CAG GAA AAA GGC	1008
	Ile Gln Arg Met Arg Gln Leu Phe Val Asn Thr Leu Gln Glu Lys Gly	
	320 325 330	
	GCA AAC CGC GAC TTC AGC TTT ATC ATC AAA CAG AAC GGC ATG TTC TCC	1056
	Ala Asn Arg Asp Phe Ser Phe Ile Ile Lys Gln Asn Gly Met Phe Ser	
	335 340 345	
	TTC AGT GGC CTG ACA AAA GAA CAA GTG CTG CGT CTG CGC GAA GAG TTT	1104
	Phe Ser Gly Leu Thr Lys Glu Gln Val Leu Arg Leu Arg Glu Glu Phe	
	350 355 360 365	
15	GGC GTA TAT GCG GTT GCT TCT GGT CGC GTA AAT GTG GCC GGG ATG ACA	1152
	Gly Val Tyr Ala Val Ala Ser Gly Arg Val Asn Val Ala Gly Met Thr	
	370 375 380	
	CCA GAT AAC ATG GCT CCG CTG TGC GAA GCG ATT GTG GCA GTG CTG	1197
	Pro Asp Asn Met Ala Pro Leu Cys Glu Ala Ile Val Ala Val Leu	
	385 390 395	
	TAAGCATTA AAACAATGAA CGCGCTGAAA AGCGGGCTGA GACTGATGAC AAACGCAACA	1257
	TTGCCTGATG GCTACGCTTA TCAGGCCTAC GCGTCCCCTG CAATATTTTG AATTTGCACG	1317
	ATTTTGTAGG CCGG	1331

20

(2)SEQ ID NO: 24 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 396 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

25

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 24:

Met Phe Glu Asn Ile Thr Ala Ala Pro Ala Asp Pro Ile Leu Gly Leu
 1 5 10 15

```

Ala Asp Leu Phe Arg Ala Asp Glu Arg Pro Gly Lys Ile Asn Leu Gly
      20      25      30
Ile Gly Val Tyr Lys Asp Glu Thr Gly Lys Thr Pro Val Leu Thr Ser
      35      40      45
Val Lys Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Leu Glu Asn Glu Thr Thr Lys Asn
      50      55      60
Tyr Leu Gly Ile Asp Gly Ile Pro Glu Phe Gly Arg Cys Thr Gln Glu
      65      70      75      80
Leu Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ala Leu Ile Asn Asp Lys Arg Ala Arg
      85      90      95
Thr Ala Gln Thr Pro Gly Gly Thr Gly Ala Leu Arg Val Ala Ala Asp
      100      105      110
Phe Leu Ala Lys Asn Thr Ser Val Lys Arg Val Trp Val Ser Asn Pro
      115      120      125
Ser Trp Pro Asn His Lys Ser Val Phe Asn Ser Ala Gly Leu Glu Val
      130      135      140
Arg Glu Tyr Ala Tyr Tyr Asp Ala Glu Asn His Thr Leu Asp Phe Asp
      145      150      155      160
Ala Leu Ile Asn Ser Leu Asn Glu Ala Gln Ala Gly Asp Val Val Leu
      165      170      175
Phe His Gly Cys Cys His Asn Pro Thr Gly Ile Asp Pro Thr Leu Glu
      180      185      190
Gln Trp Gln Thr Leu Ala Gln Leu Ser Val Glu Lys Gly Trp Leu Pro
      195      200      205
Leu Phe Asp Phe Ala Tyr Gln Gly Phe Ala Arg Gly Leu Glu Glu Asp
      210      215      220
Ala Glu Gly Leu Arg Ala Phe Ala Ala Met His Lys Glu Leu Ile Val
      225      230      235      240
Ala Ser Ser Tyr Ser Lys Asn Phe Gly Leu Tyr Asn Glu Arg Val Gly
      245      250      255
Ala Cys Thr Leu Val Ala Ala Asp Ser Glu Thr Val Asp Arg Ala Phe
      260      265      270
Ser Gln Met Lys Ala Ala Ile Arg Ala Asn Tyr Ser Asn Pro Pro Ala
      275      280      285
His Gly Ala Ser Val Val Ala Thr Ile Leu Ser Asn Asp Ala Leu Arg
      290      295      300
Ala Ile Trp Glu Gln Glu Leu Thr Asp Met Arg Gln Arg Ile Gln Arg
      305      310      315      320
Met Arg Gln Leu Phe Val Asn Thr Leu Gln Glu Lys Gly Ala Asn Arg
      325      330      335
Asp Phe Ser Phe Ile Ile Lys Gln Asn Gly Met Phe Ser Phe Ser Gly
      340      345      350
Leu Thr Lys Glu Gln Val Leu Arg Leu Arg Glu Glu Phe Gly Val Tyr
      355      360      365
Ala Val Ala Ser Gly Arg Val Asn Val Ala Gly Met Thr Pro Asp Asn
      370      375      380
Met Ala Pro Leu Cys Glu Ala Ile Val Ala Val Leu
      385      390      395

```

(2)SEQ ID NO: 25 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 2517 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

(A)有机体: 乳发酵短杆菌

(B)菌株: ATCC 13869

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 25 :

GATCAGCTTC	GGGTGTTGAA	GGGGCCGAAT	AAGGAACTCG	CGCAGTTGGG	TCGTAGTTTG	60
TTTAAACGAC	TTGGTGATGT	GTTGGCGTAT	TTCGATGTTG	GTGTCTCCAA	CGGTCCGGTC	120
GAAGCGATCA	ACGGACGGTT	GGAGCATTTG	CGTGGGATFG	CTCTAGGTTT	CCGTAATTTG	180
AACCACTACA	TTCTGCGGTG	CCTTATCCAT	TCAGGGCAGT	TGGTCCATAA	GATCAATGCA	240
CTCTAAAACA	GGAAGAGCCC	CTTTACAAGC	GGCAAGACCA	AACTGGGTGA	CCGAAAATCT	300
TCAGGCCAAT	CAGTTTTTGGT	CATATGGGAT	GGTTTTTAGA	CCTCGAAACC	ATCCCATATG	360
ACCGAAGCCC	GCGAAACTCT	GTGTTCGTTG	GTCGCCTGGT	TCGGTCTCAA	TGCCTTGCCG	420
AAACCACAAC	GCCCCGAAAC	CCAAAATCC	CCAATACATG	AAAAAACCAG	CTTCCCACCG	480
AAGTGAGAAG	CTGGTTTAGT	TTGCGGAGGA	TAGGGGATTT	GAACCCCTGA	GGGATTGCTC	540
CCAACCCGCG	TTCCAGGCCA	GCGACATAGG	CCGCTAGTCG	AATCCTCCAG	CTAGAACGGC	600
TGCAACGCAT	GGCTGCTTTG	TTCTGGGGAT	TAGATTACAC	AAAAGTCGTT	TAGAAACTCA	660
AATCCGCTCG	CAGTTGGCGT	TTTCTGGGGC	GGTTCAGCTA	GAGTTATGCG	AAGGATCCCG	720
TGCGGGCGTTT	ATCTTGTGAA	CTCCCCCAGG	GCAGGAATGC	AGCAAGGGTC	AGCGAGCTCT	780
GACGGGTCCG	CGGGGTCCCC	TAAAACGTC	AGAGTAGTGG	CTTGAGGTCA	CTGCTCTTTT	840
TTTTGTCCCT	TTTTTTGGTC	CGTCTATTTT	GCCACCACAT	GCGGAGGTAC	GCAGTTATGA	900
GTTCAGTTTC	GCTGCAGGAT	TTTGATGCAG	AGCGAATTGG	TCTGTTCCAC	GAGGACATTA	960
AACGCAAGTT	TGATGAGCTC	AAGTCAAAAA	ATCTGAAGCT	GGATCTTACT	CGCGGTAAGC	1020
CTTCGTGCGA	GCAGTTGGAT	TTGCTGATG	AGCTGTTGGC	GTTGCCTGGT	AAGGGCGATT	1080
TCAAGGCTGC	GGATGGTACT	GATGTCCGTA	ACTATGGCGG	GCTGGATGGC	ATTGTTGATA	1140
TTCGTCAGAT	TTGGGCGGAT	TTGCTGGGTG	TTCTGTGGA	GCAGGTGCTG	GCGGGGGATG	1200
CTTCGAGCTT	GAACATCATG	TTTGATGTGA	TCAGCTGGTC	GTACATTTTT	GGTAACAATG	1260
ATTCGGTTCA	GCCTTGGTCG	AAGGAAGAAA	CTGTTAAGTG	GATTTGTCCCT	GTTCCGGGAT	1320
ATGATCGCCA	TTTCTCCATC	ACGGAGCGTT	TCGGCTTGA	GATGATTTCT	GTGCCAATGA	1380
ATGAAGACGG	CCCTGATATG	GATGCTGTTG	AGGAATTGGT	CAAGGATCCG	CAGGTTAAGG	1440
GCATGTGGGT	TGTGCCGGTA	TTTTCTAAC	CGACTGGTTT	CACGGTGTG	CAGGACGTCC	1500
CAAAGCGTCT	GAGCACGATG	GAAACTGCGG	CGCCGGACTT	CCGCGTGGT	TGGGATAACG	1560
CTTACGCCGT	TCATACTCTG	ACCGATGAGT	TCCCTGAGGT	CATCGACATC	GTTGGGCTTG	1620
GTGAGGCGGC	GGGTAACCCG	AACCGTTTCT	GGGCGTTCAC	TTCTACTTCG	AAGATCACTC	1680
TCGCGGGTGC	GGGCGTGTCC	TTCTTCATGA	CTTCTGCGGA	GAACCGTAAG	TGGTACTCCG	1740
GTCATGCGGG	TATCCGTGGC	ATTGGCCCTA	ACAAGGTCAA	TCAGTTGGCT	CATGCGCGTT	1800
ACTTTGGCGA	TGCTGAGGGA	GTGCGCGCGG	TGATGCGTAA	GCATGCTGCG	TCGTTGGCTC	1860
CGAAGTTCAA	CAAGGTTCTG	GAGATCCTGG	ATTCTCGCCT	TGCTGAGTAC	GGTGTGCGCG	1920
AGTGGACTGT	CCCTGCGGGC	GGTACTTCA	TTTCCCTTGA	TGTGGTTCCCT	GGTACGGCAT	1980
CTCGTGTGGC	TGAGTTGGCT	AAGGAAGCCG	GCATTGCGTT	GACGGGTGCG	GGTCTTCTT	2040
ACCCGCTGCG	TCAGGATCCG	GAGAACAAGA	ACCTCCGTTT	GGCGCCTTCT	CTGCCTCCTG	2100
TTGAGGAACT	TGAGGTTGCC	ATGGATGGCG	TGGCTACGTG	TGTTTTGCTG	GCAGCTGCGG	2160
AGCACTACGC	TAGCTAGAGT	GAATACCGCG	GAAACTGCAC	ATTGGATTAA	CCGTTTGCTG	2220
CCGGGTCAAG	CGGAGTTTCA	CCAGGTTGGC	GCGTTTAAAG	TGGCGGGTTA	CACGCTTGAT	2280
GATGAGTCAA	TTGCGTGTTC	TGTCAATTTT	GGGCGCGTCA	ACACGGGCTT	GGTCAACCGAG	2340
ACAGGCGCGG	AAACCGTCCG	TGTGCGAAGT	GAGATTTTGA	GCCTGGCCAG	GGCCGACGTG	2400
TCCGTGCCTG	GGCGCGCCGT	CGGCGCTGCT	GCAACAATGC	TTCTCGACGC	CTCCCTCTCC	2460
TTCAAATCCG	CCACCGATT	CAGTGTCACT	CCCATGCATG	CCCAACCGGG	ACAGATC	2517

(2)SEQ ID NO:26 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc = "合成的 DNA"

(iv)反义: 否

10 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 26 :

GATCAACGGA CGGTTGGAGC ATT 23

(2)SEQ ID NO:27 的信息:

(i)序列特征:

15 (A)长度: 23 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

20 (A)描述: dese = "合成的 DNA"

(iv)反义: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 27 :

GGTATTCACT CTAGCTAGCG TAG 23

25 (2)SEQ ID NO:28 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

30 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc="合成的 DNA"

(iv)反义: 否

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 28 :

5 GAGCTCAAGT CAAAAAATCT GAA 23

(2)SEQ ID NO:29 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个碱基

10 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc="合成的 DNA"

15 (iv)反义: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 29 :

GATCTGTCCC GGTTGGGCAT GCA 23

(2)SEQ ID NO:30 的信息:

20 (i)序列特征:

(A)长度: 2517 个碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 双链

(D)拓扑结构: 线性

25 (ii)分子类型: 基因组 DNA

(vi)原始来源:

(A)有机体: 乳发酵短杆菌

(B)菌株: ATCC 13869

(ix)特征:

30 (A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 879..2174

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 30:

GATCAGCTTC	GGGTGTTGAA	GGGGCCGAAT	AAGGAACTCG	CGCAGTTGGG	TCGTAGTTTG	60										
TTTAAACGAC	TTGGTGATGT	GTTGGCGTAT	TTCGATGTTG	GTGTCTCCAA	CGGTCCGGTC	120										
GAAGCGATCA	ACGGACGGTT	GGAGCATTG	CGTGGGATTG	CTCTAGGTTT	CCGTAATTTG	180										
AACCACTACA	TTCTGCGGTG	CCTTATCCAT	TCAGGGCAGT	TGGTCCATAA	GATCAAATGCA	240										
CTCTAAAACA	GGAAGAGCCC	CTTTACAAGC	GGCAAGACCA	AACTGGGTGA	CCGAAAATCT	300										
TCAGGCCAAT	CAGTTTTGGT	CATATGGGAT	GGTTTTTAGA	CCTCGAAACC	ATCCCATATG	360										
ACCGAAGCCC	GCGAAACTCT	GTGTTTCGTTG	GTGCGCTGGT	TCGGTCTCAA	TGCCCTGCCG	420										
AAACCACAAC	GCCCCGAAAC	CCAAAACCTCC	CCAATACATG	AAAAAACCAG	CTTCCCACCG	480										
AAGTGAGAAG	CTGGTTTAGT	TTGCGGAGGA	TAGGGGATTT	GAACCCCTGA	GGGATTGCTC	540										
CCAACCCGCG	TTCCAGGCGA	GCGACATAGG	CCGCTAGTCG	AATCCTCCAG	CTAGAACGGC	600										
TGCAACGCAT	GGCTGCTTTG	TTCTGGGGAT	TAGATTACAC	AAAAGTCGTT	TAGAAACTCA	660										
AATCCGCTCG	CAGTTGGCGT	TTTCTGGGGC	GGTTCAGCTA	GAGTTATGCG	AAGGATCCCG	720										
TGCGGCGTTT	ATCTTGTGAA	CTCCCCCAGG	GCAGGAATGC	AGCAAGGGTC	AGCGAGCTCT	780										
GACGGGTGCG	CGGGTCCCC	TAAAACGTCT	AGAGTAGTGG	CTTGAGGTCA	CTGCTCTTTT	840										
TTTGTGCCCT	TTTTTTGGTC	CGTCTATTTT	GCCACCAC	ATG	CGG	AGG	TAC	GCA	893							
				Met	Arg	Arg	Tyr	Ala								
				1				5								
GTT	ATG	AGT	TCA	GTT	TCG	CTG	CAG	GAT	TTT	GAT	GCA	GAG	CGA	ATT	GGT	941
Val	Met	Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Gln	Asp	Phe	Asp	Ala	Glu	Arg	Ile	Gly	
				10					15					20		
CTG	TTC	CAC	GAG	GAC	ATT	AAA	CGC	AAG	TTT	GAT	GAG	CTC	AAG	TCA	AAA	989
Leu	Phe	His	Glu	Asp	Ile	Lys	Arg	Lys	Phe	Asp	Glu	Leu	Lys	Ser	Lys	
				25				30					35			
AAT	CTG	AAG	CTG	GAT	CTT	ACT	CGC	GGT	AAG	CCT	TCG	TCG	GAG	CAG	TTG	1037
Asn	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Thr	Arg	Gly	Lys	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	
				40			45					50				
GAT	TTC	GCT	GAT	GAG	CTG	TTG	GCG	TTG	CCT	GGT	AAG	GGC	GAT	TTC	AAG	1085
Asp	Phe	Ala	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Lys	Gly	Asp	Phe	Lys	
		55				60					65					
GCT	GCG	GAT	GGT	ACT	GAT	GTC	CGT	AAC	TAT	GGC	GGG	CTG	GAT	GGC	ATT	1133
Ala	Ala	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Arg	Asn	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile	
		70			75					80				85		
GTT	GAT	ATT	CGT	CAG	ATT	TGG	GCG	GAT	TTG	CTG	GGT	GTT	CCT	GTG	GAG	1181
Val	Asp	Ile	Arg	Gln	Ile	Trp	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Glu	
				90				95					100			
CAG	GTG	CTG	GCG	GGG	GAT	GCT	TCG	AGC	TTG	AAC	ATC	ATG	TTT	GAT	GTG	1229
Gln	Val	Leu	Ala	Gly	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Met	Phe	Asp	Val	
			105				110					115				
ATC	AGC	TGG	TCG	TAC	ATT	TTT	GGT	AAC	AAT	GAT	TCG	GTT	CAG	CCT	TGG	1277
Ile	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Phe	Gly	Asn	Asn	Asp	Ser	Val	Gln	Pro	Trp	
		120				125					130					
TCG	AAG	GAA	GAA	ACT	GTT	AAG	TGG	ATT	TGT	CCT	GTT	CCG	GGA	TAT	GAT	1325
Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Val	Lys	Trp	Ile	Cys	Pro	Val	Pro	Gly	Tyr	Asp	
		135				140					145					
CGC	CAT	TTC	TCC	ATC	ACG	GAG	CGT	TTC	GGC	TTT	GAG	ATG	ATT	TCT	GTG	1373
Arg	His	Phe	Ser	Ile	Thr	Glu	Arg	Phe	Gly	Phe	Glu	Met	Ile	Ser	Val	
		150			155				160				165			
CCA	ATG	AAT	GAA	GAC	GGC	CCT	GAT	ATG	GAT	GCT	GTT	GAG	GAA	TTG	GTC	1421
Pro	Met	Asn	Glu	Asp	Gly	Pro	Asp	Met	Asp	Ala	Val	Glu	Glu	Leu	Val	
				170				175							180	

AAG GAT CCG CAG GTT AAG GGC ATG TGG GTT GTG CCG GTA TTT TCT AAC	1469
Lys Asp Pro Gln Val Lys Gly Met Trp Val Val Pro Val Phe Ser Asn	
185 190 195	
CCG ACT GGT TTC ACG GTG TCG GAG GAC GTC GCA AAG CGT CTG AGC ACG	1517
Pro Thr Gly Phe Thr Val Ser Glu Asp Val Ala Lys Arg Leu Ser Thr	
200 205 210	
ATG GAA ACT GCG GCG CCG GAC TTC CGC GTG GTG TGG GAT AAC GCT TAC	1565
Met Glu Thr Ala Ala Pro Asp Phe Arg Val Val Trp Asp Asn Ala Tyr	
215 220 225	
GCC GTT CAT ACT CTG ACC GAT GAG TTC CCT GAG GTC ATC GAC ATC GTT	1613
Ala Val His Thr Leu Thr Asp Glu Phe Pro Glu Val Ile Asp Ile Val	
230 235 240 245	
GGG CTT GGT GAG GCG GCG GGT AAC CCG AAC CGT TTC TGG GCG TTC ACT	1661
Gly Leu Gly Glu Ala Ala Gly Asn Pro Asn Arg Phe Trp Ala Phe Thr	
250 255 260	
TCT ACT TCG AAG ATC ACT CTC GCG GGT GCG GGC GTG TCC TTC TTC ATG	1709
Ser Thr Ser Lys Ile Thr Leu Ala Gly Ala Gly Val Ser Phe Phe Met	
265 270 275	
ACT TCT GCG GAG AAC CGT AAG TGG TAC TCC GGT CAT GCG GGT ATC CGT	1757
Thr Ser Ala Glu Asn Arg Lys Trp Tyr Ser Gly His Ala Gly Ile Arg	
280 285 290	
GGC ATT GGC CCT AAC AAG GTC AAT CAG TTG GCT CAT GCG CGT TAC TTT	1805
Gly Ile Gly Pro Asn Lys Val Asn Gln Leu Ala His Ala Arg Tyr Phe	
295 300 305	
GGC GAT GCT GAG GGA GTG CGC GCG GTG ATG CGT AAG CAT GCT GCG TCG	1853
Gly Asp Ala Glu Gly Val Arg Ala Val Met Arg Lys His Ala Ala Ser	
310 315 320 325	
TTG GCT CCG AAG TTC AAC AAG GTT CTG GAG ATC CTG GAT TCT CGC CTT	1901
Leu Ala Pro Lys Phe Asn Lys Val Leu Glu Ile Leu Asp Ser Arg Leu	
330 335 340	
GCT GAG TAC GGT GTC GCG CAG TGG ACT GTC CCT GCG GGC GGT TAC TTC	1949
Ala Glu Tyr Gly Val Ala Gln Trp Thr Val Pro Ala Gly Gly Tyr Phe	
345 350 355	
ATT TCC CTT GAT GTG GTT CCT GGT ACG GCA TCT CGT GTG GCT GAG TTG	1997
Ile Ser Leu Asp Val Val Pro Gly Thr Ala Ser Arg Val Ala Glu Leu	
360 365 370	
GCT AAG GAA GCC GGC ATT GCG TTG ACG GGT GCG GGT TCT TCT TAC CCG	2045
Ala Lys Glu Ala Gly Ile Ala Leu Thr Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Pro	
375 380 385	
CTG CGT CAG GAT CCG GAG AAC AAG AAC CTC CGT TTG GCG CCT TCT CTG	2093
Leu Arg Gln Asp Pro Glu Asn Lys Asn Leu Arg Leu Ala Pro Ser Leu	
390 395 400 405	
CCT CCT GTT GAG GAA CTT GAG GTT GCC ATG GAT GGC GTG GCT ACG TGT	2141
Pro Pro Val Glu Glu Leu Glu Val Ala Met Asp Gly Val Ala Thr Cys	
410 415 420	
GTT TTG CTG GCA GCT GCG GAG CAC TAC GCT AGC TAGAGTGAAT ACCGCGGAAA	2194
Val Leu Leu Ala Ala Ala Glu His Tyr Ala Ser	
425 430	
CTGCACATTG GATTAACCGT TTGCTGCCGG GTCAGCCGGA GTTTCACCAG GTTGCGCGT	2254
TTAAAGTGGC GGGTTACACG CTTGATGATG AGTCAATTGC GTGTTCTGTC AATTTCGGGC	2314
GCGTCAACAC GGGCCTGGTC ACCGAGACAG GCGCGGAAAC CGTCGATGTG CGAAGTGAGA	2374
TTTTGAGCCT GGCCAGGGCC GACGTGTCCG TGCCTGGGCG CGCCGTCGGC GCTGCTGCAA	2434
CAATGCTTCT CGACGCCTCC CTCTCCTTCA AATCCGCCAC CGATTCCAGT GTCACTCCCA	2494
TGCATGCCCA ACCGGGACAG ATC	2517

(2)SEQ ID NO:31 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 432 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

5

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO:31 :

```

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

```


		115					120					125			
Ser	Val	Gln	Pro	Trp	Ser	Lys	Glu	Glu	Thr	Val	Lys	Trp	Ile	Cys	Pro
	130					135					140				
Val	Pro	Gly	Tyr	Asp	Arg	His	Phe	Ser	Ile	Thr	Glu	Arg	Phe	Gly	Phe
145					150					155					160
Glu	Met	Ile	Ser	Val	Pro	Met	Asn	Glu	Asp	Gly	Pro	Asp	Met	Asp	Ala
				165						170					175
Val	Glu	Glu	Leu	Val	Lys	Asp	Pro	Gln	Val	Lys	Gly	Met	Trp	Val	Val
			180					185					190		
Pro	Val	Phe	Ser	Asn	Pro	Thr	Gly	Phe	Thr	Val	Ser	Glu	Asp	Val	Ala
	195						200					205			
Lys	Arg	Leu	Ser	Thr	Met	Glu	Thr	Ala	Ala	Pro	Asp	Phe	Arg	Val	Val
	210					215					220				
Trp	Asp	Asn	Ala	Tyr	Ala	Val	His	Thr	Leu	Thr	Asp	Glu	Phe	Pro	Glu
225					230					235					240
Val	Ile	Asp	Ile	Val	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Asn	Arg
				245					250					255	
Phe	Trp	Ala	Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Lys	Ile	Thr	Leu	Ala	Gly	Ala	Gly
			260					265					270		
Val	Ser	Phe	Phe	Met	Thr	Ser	Ala	Glu	Asn	Arg	Lys	Trp	Tyr	Ser	Gly
	275						280					285			
His	Ala	Gly	Ile	Arg	Gly	Ile	Gly	Pro	Asn	Lys	Val	Asn	Gln	Leu	Ala
	290					295					300				
His	Ala	Arg	Tyr	Phe	Gly	Asp	Ala	Glu	Gly	Val	Arg	Ala	Val	Met	Arg
305					310					315					320
Lys	His	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Phe	Asn	Lys	Val	Leu	Glu	Ile
				325					330					335	
Leu	Asp	Ser	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Val	Ala	Gln	Trp	Thr	Val	Pro
			340					345					350		
Ala	Gly	Gly	Tyr	Phe	Ile	Ser	Leu	Asp	Val	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Ser
	355						360					365			
Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Thr	Gly	Ala
	370					375					380				
Gly	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Arg	Gln	Asp	Pro	Glu	Asn	Lys	Asn	Leu	Arg
385					390					395					400
Leu	Ala	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Glu	Val	Ala	Met	Asp
			405						410					415	
Gly	Val	Ala	Thr	Cys	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	His	Tyr	Ala	Ser
			420					425					430		

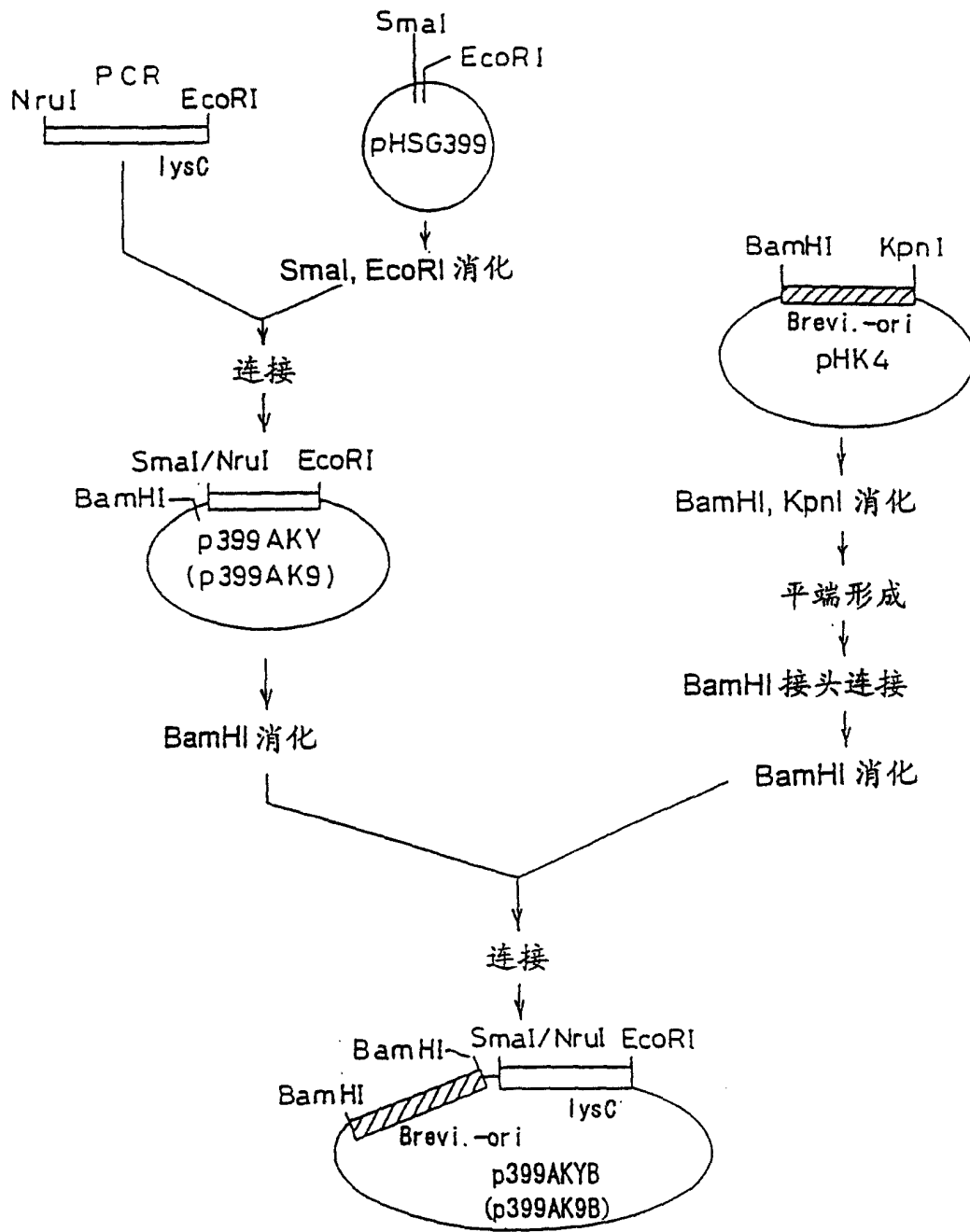


图 1

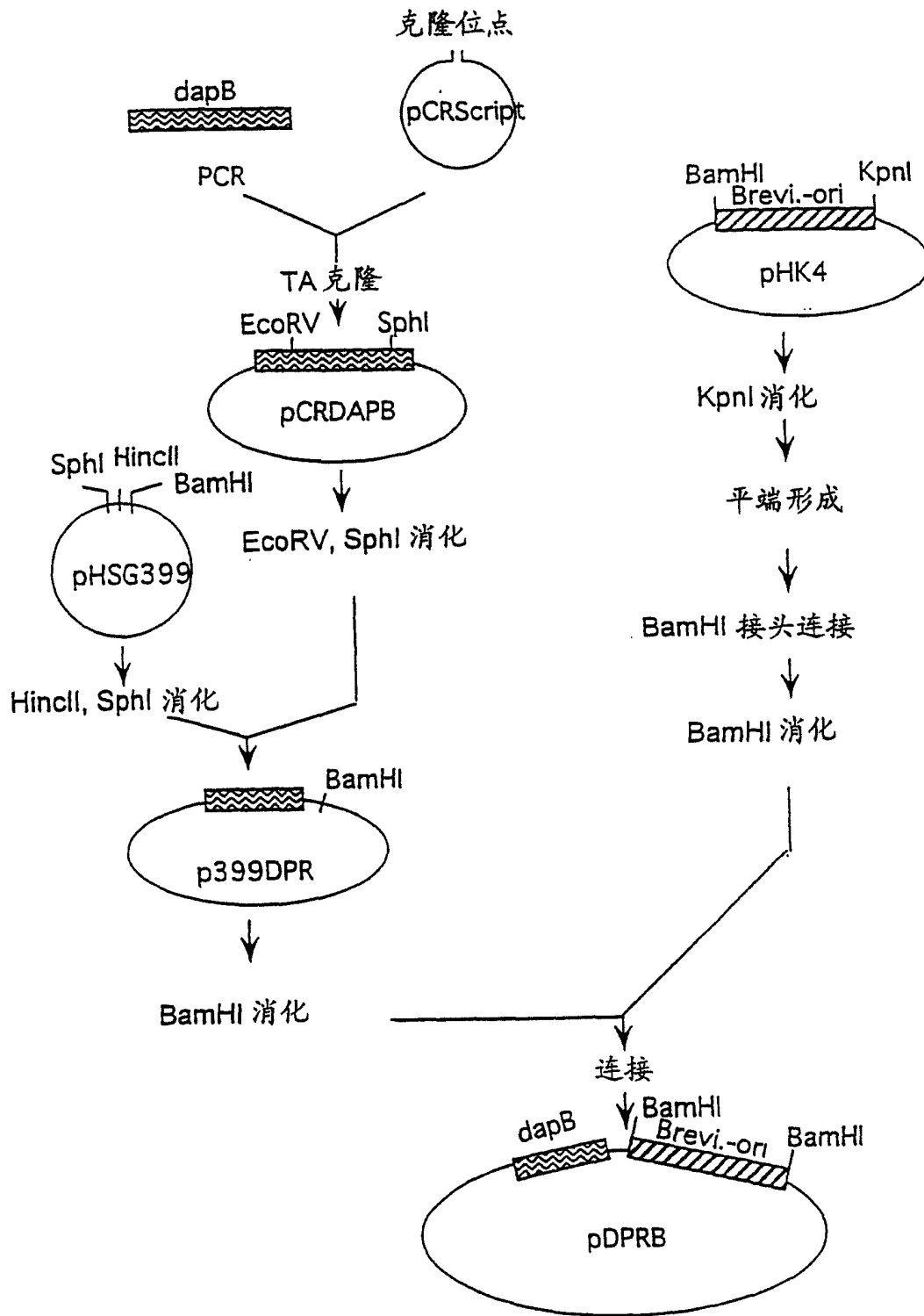


图 2

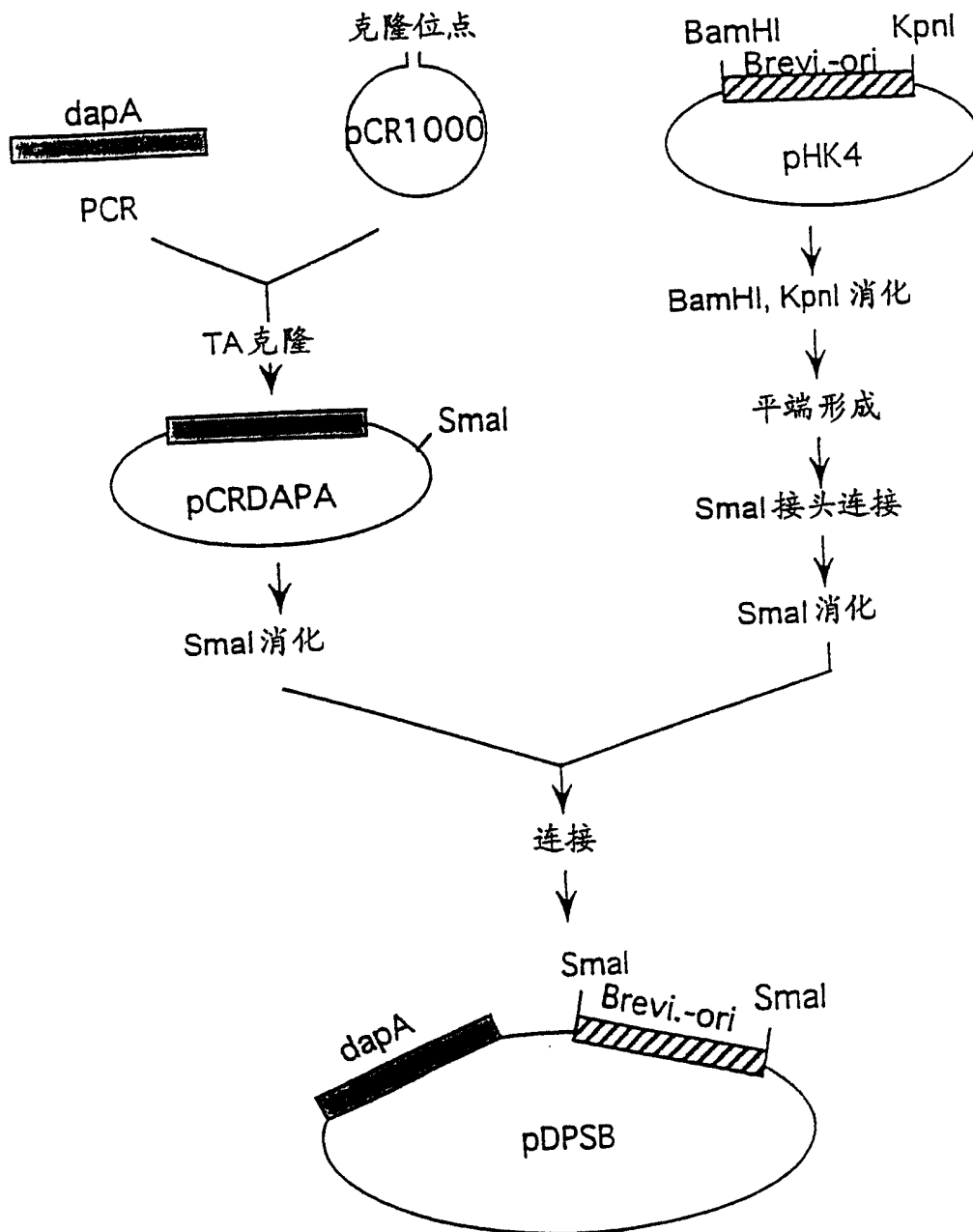


图 3

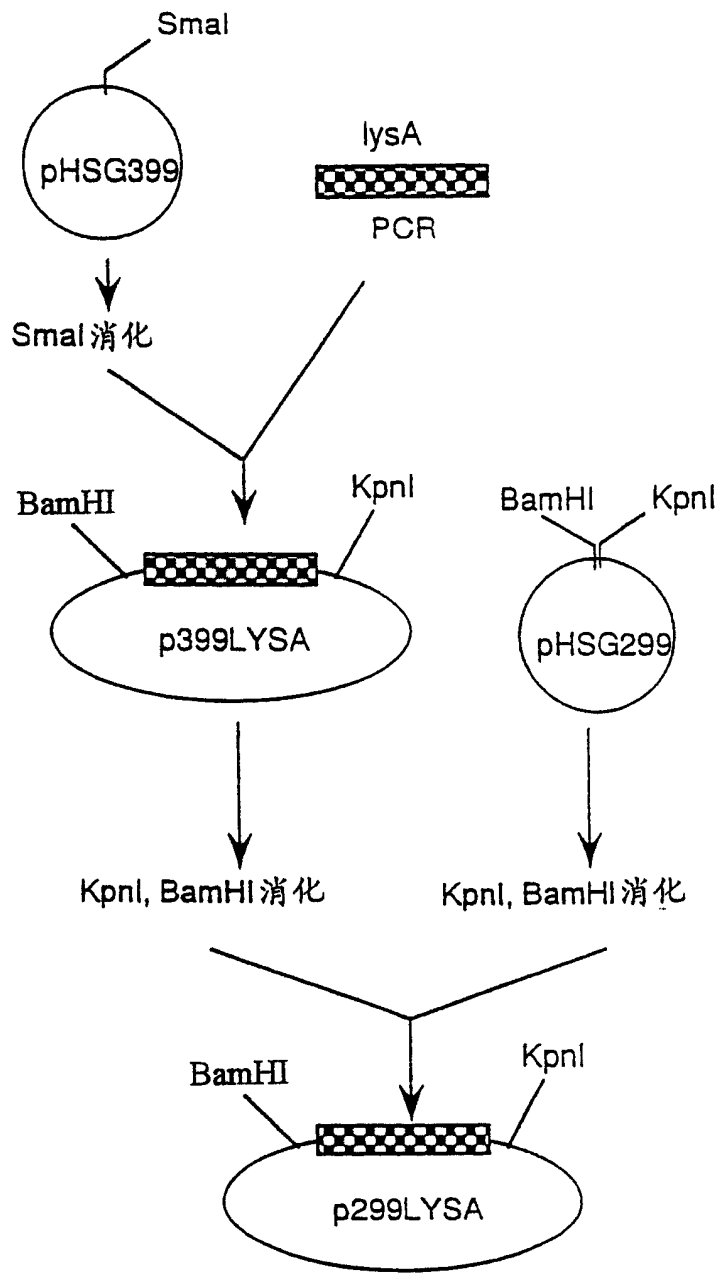


图 4

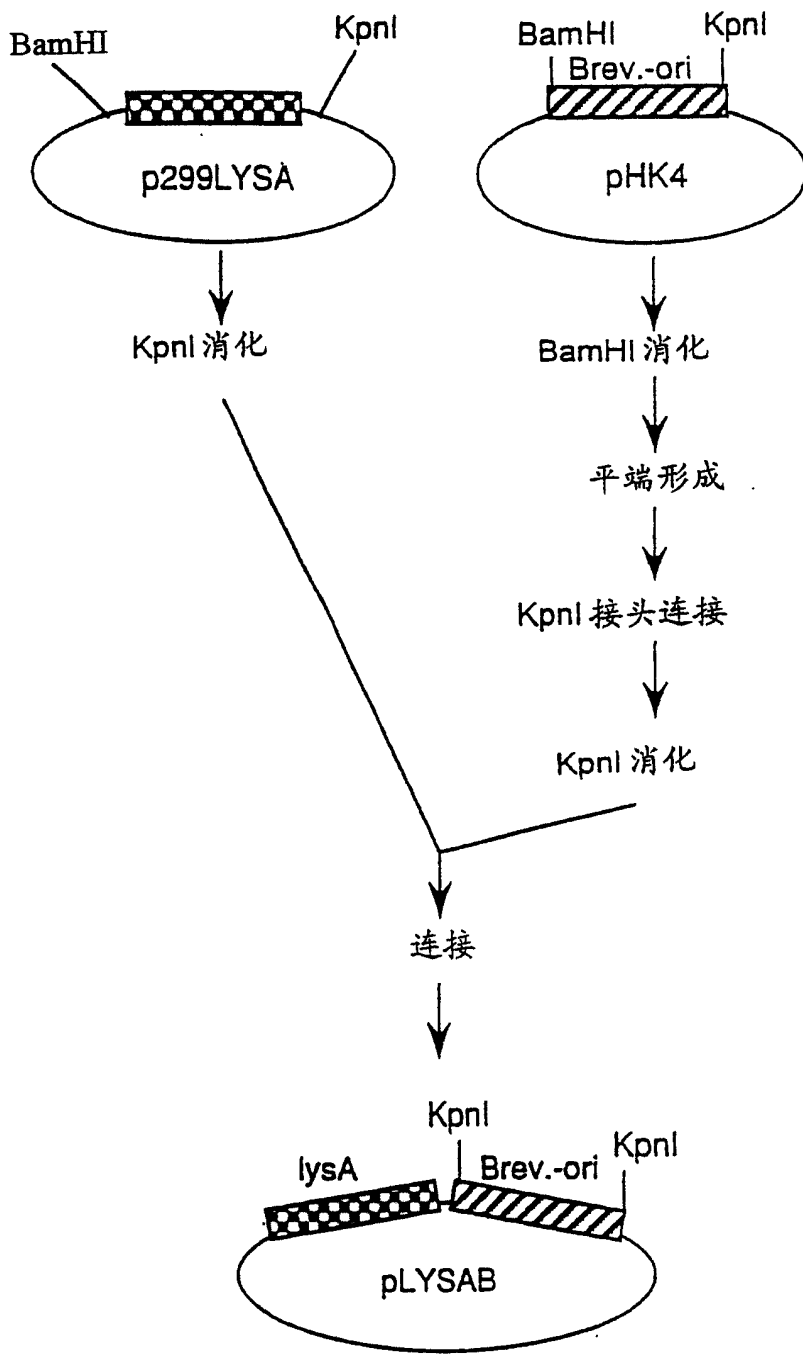


图 5

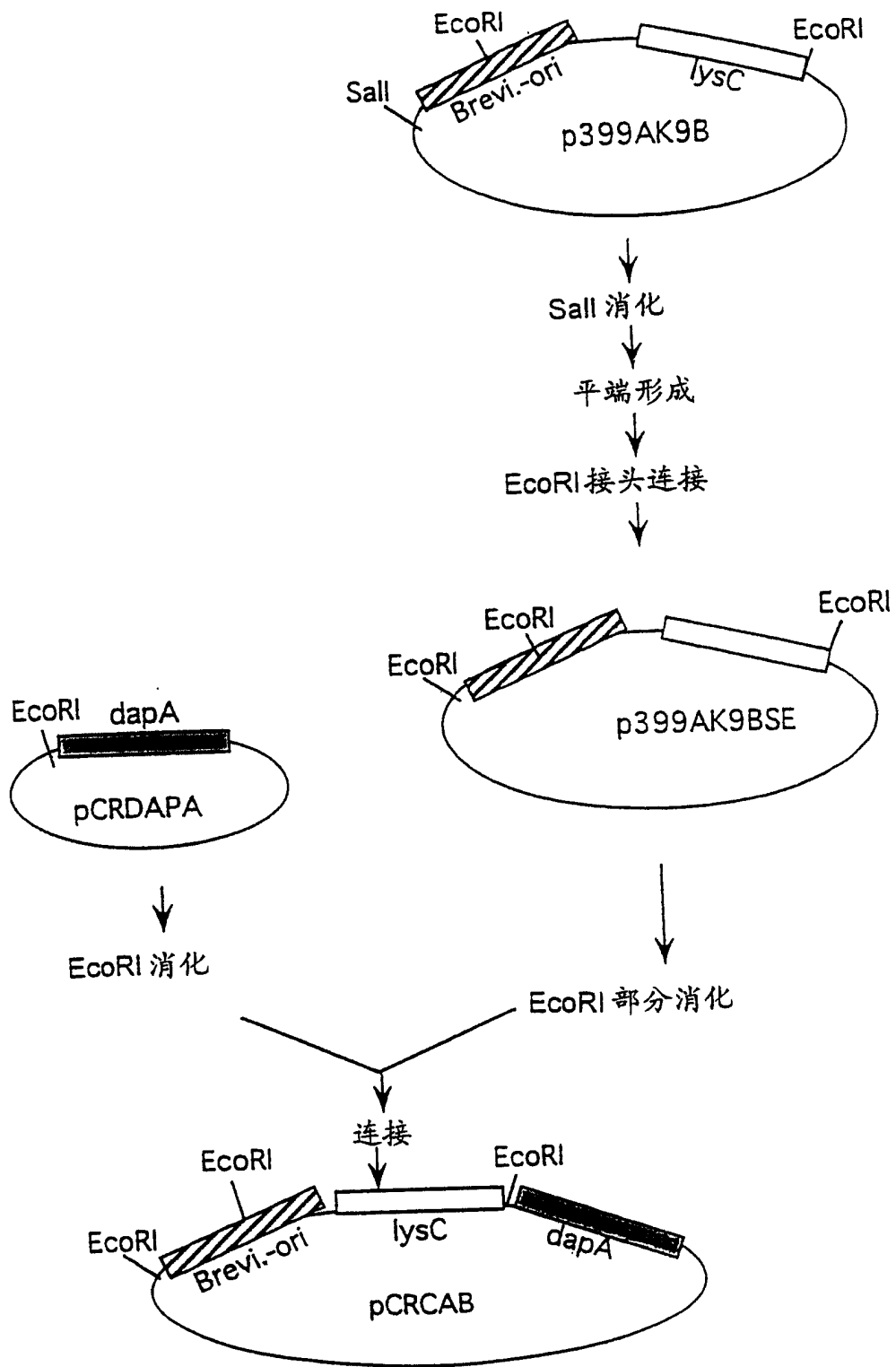


图 6

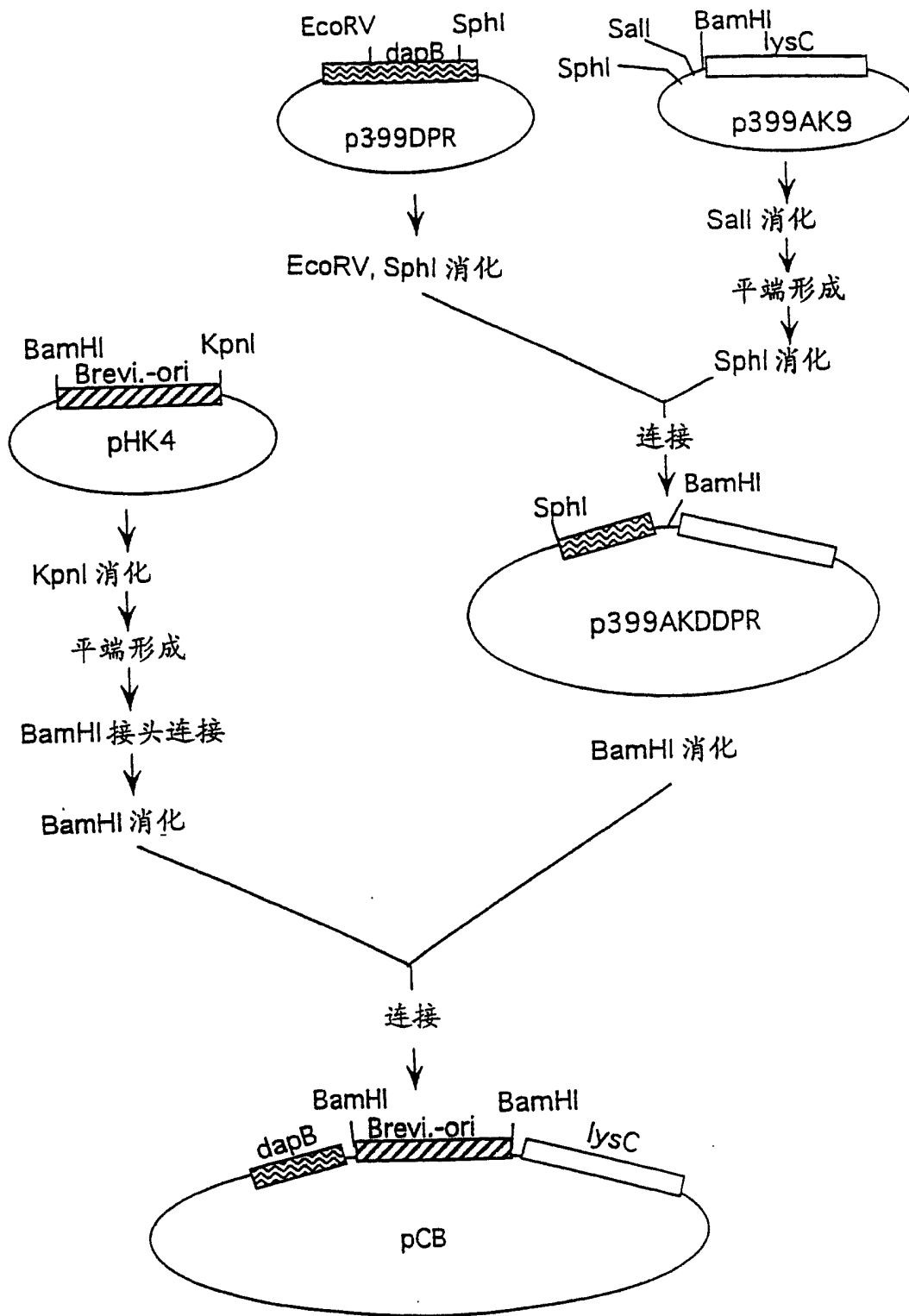


图 7

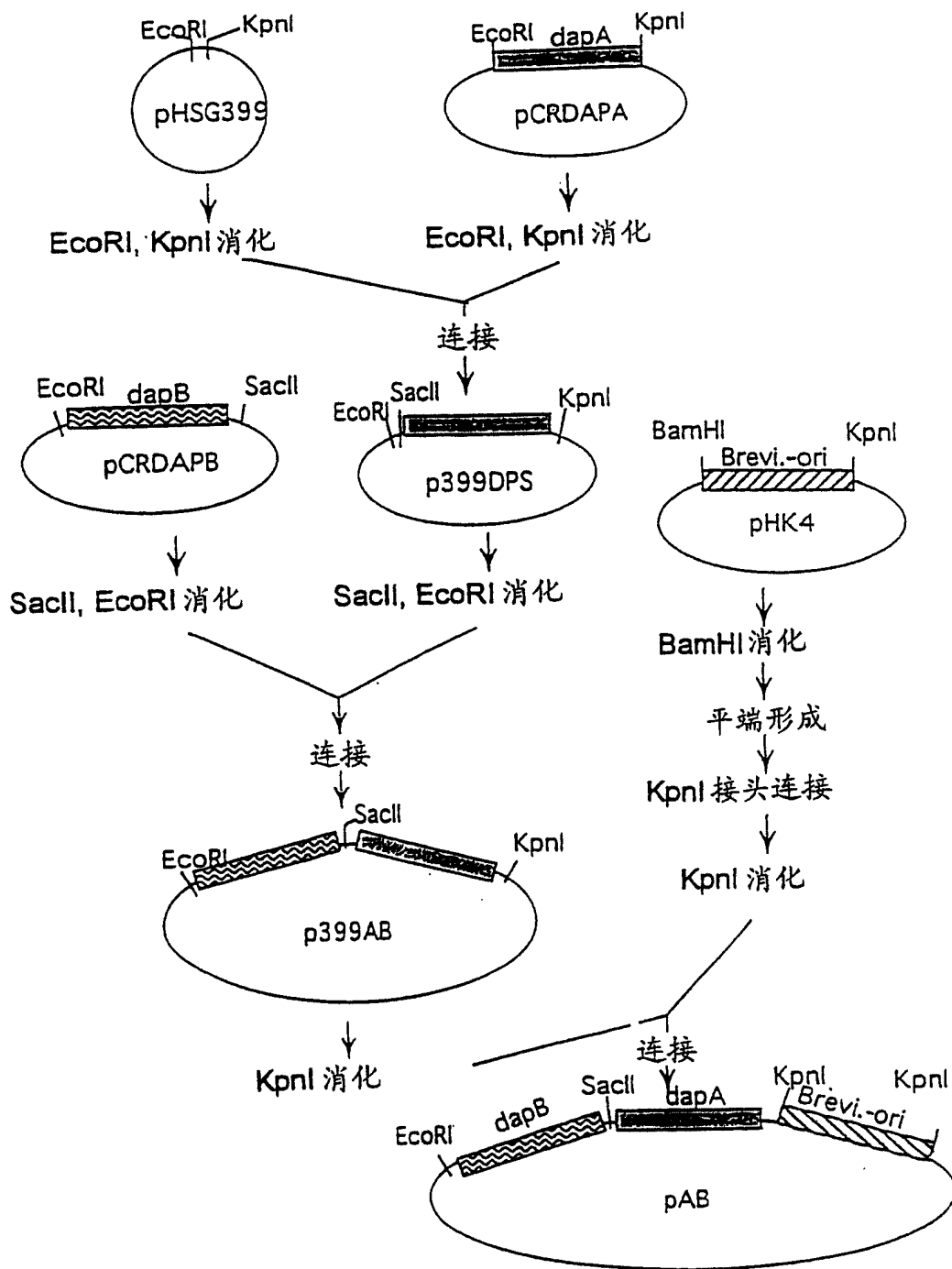


图 8

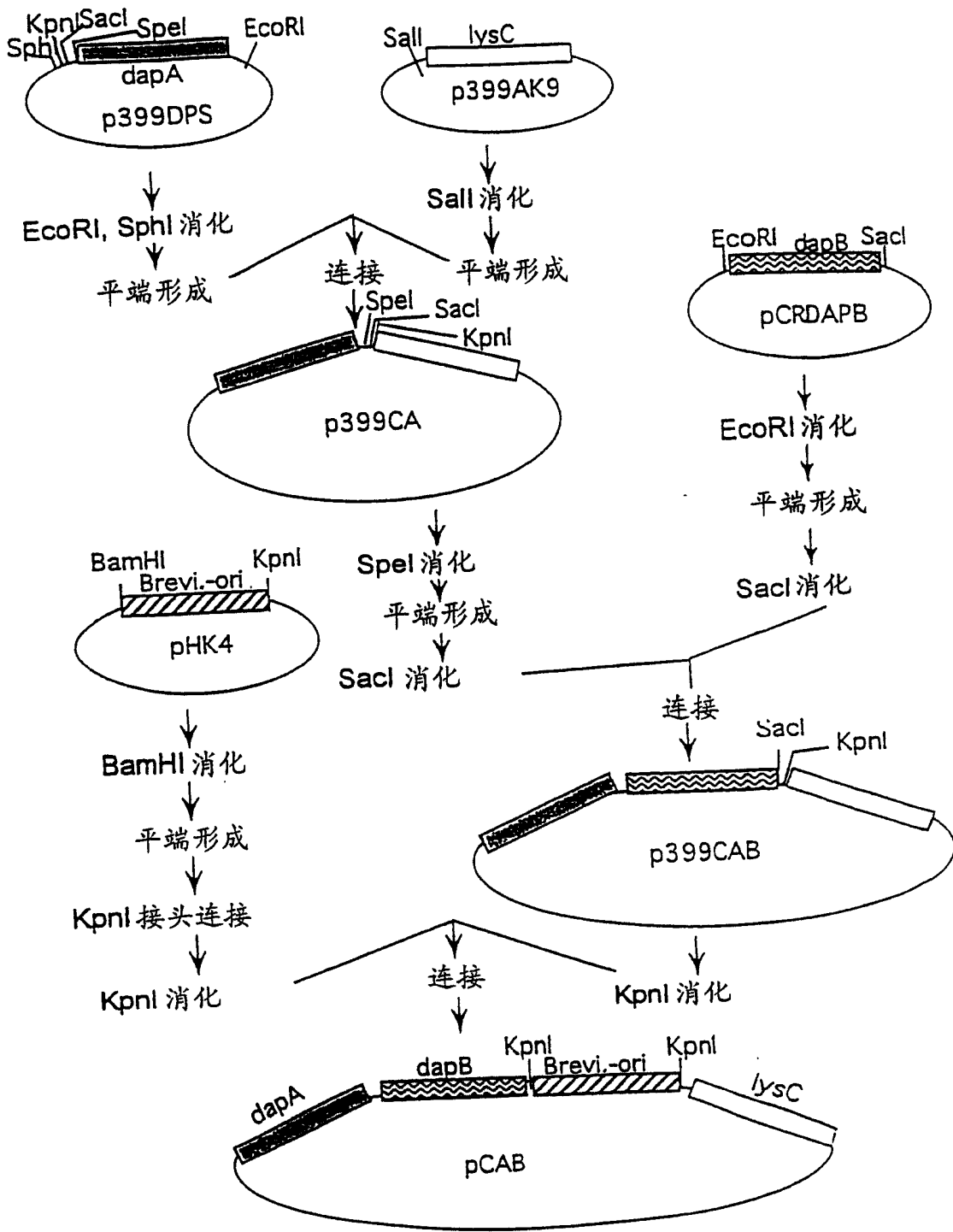


图 9

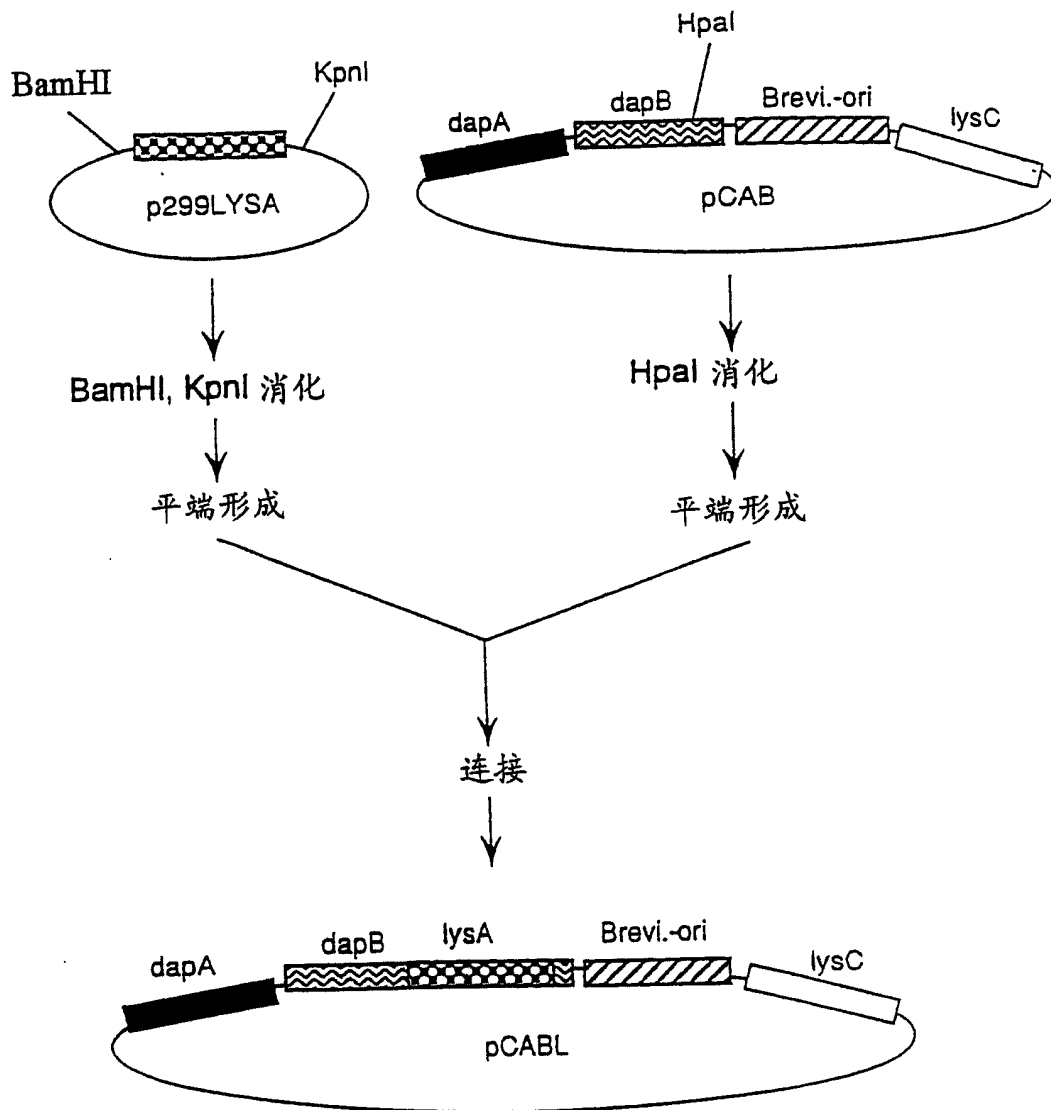


图 10

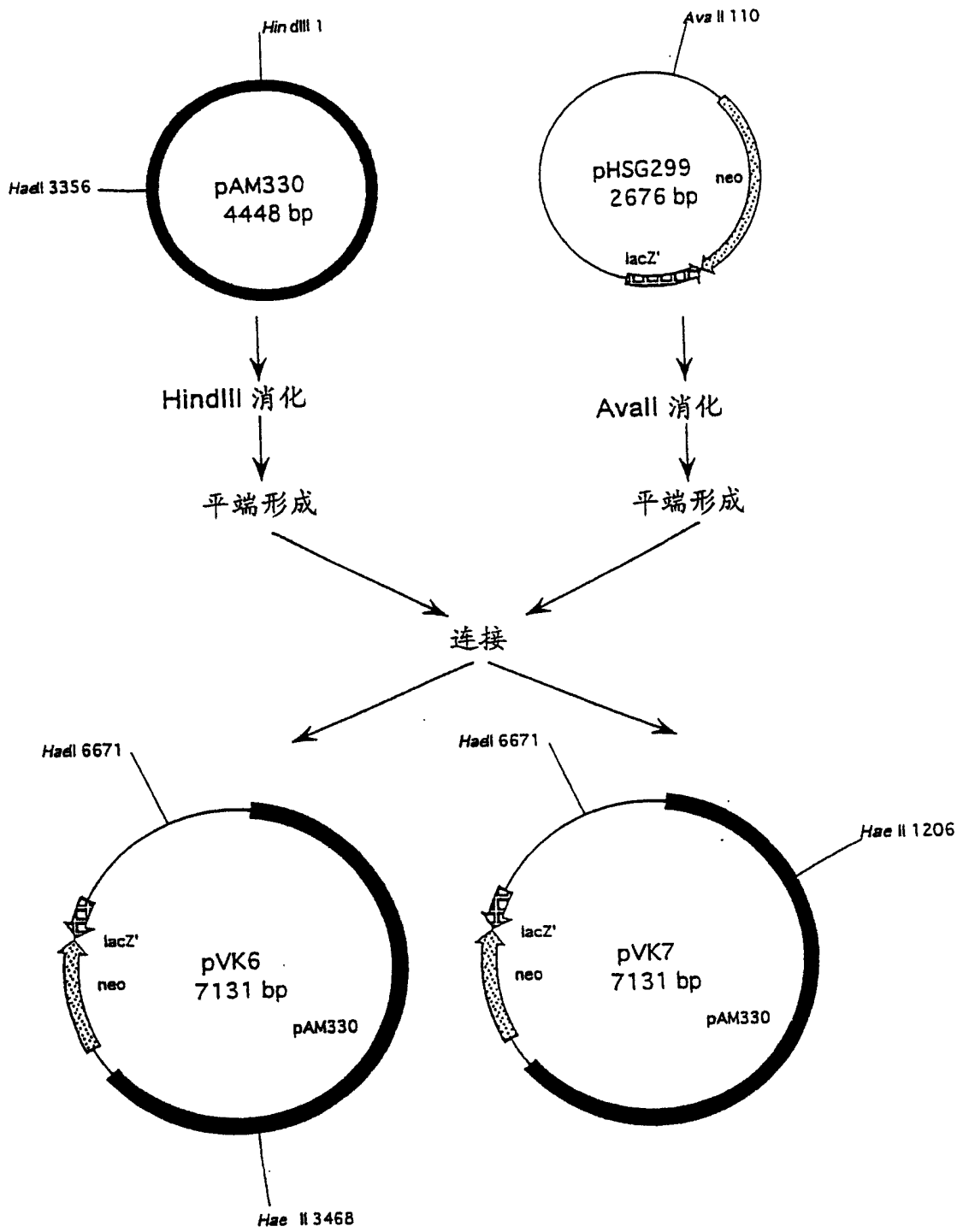


图 11

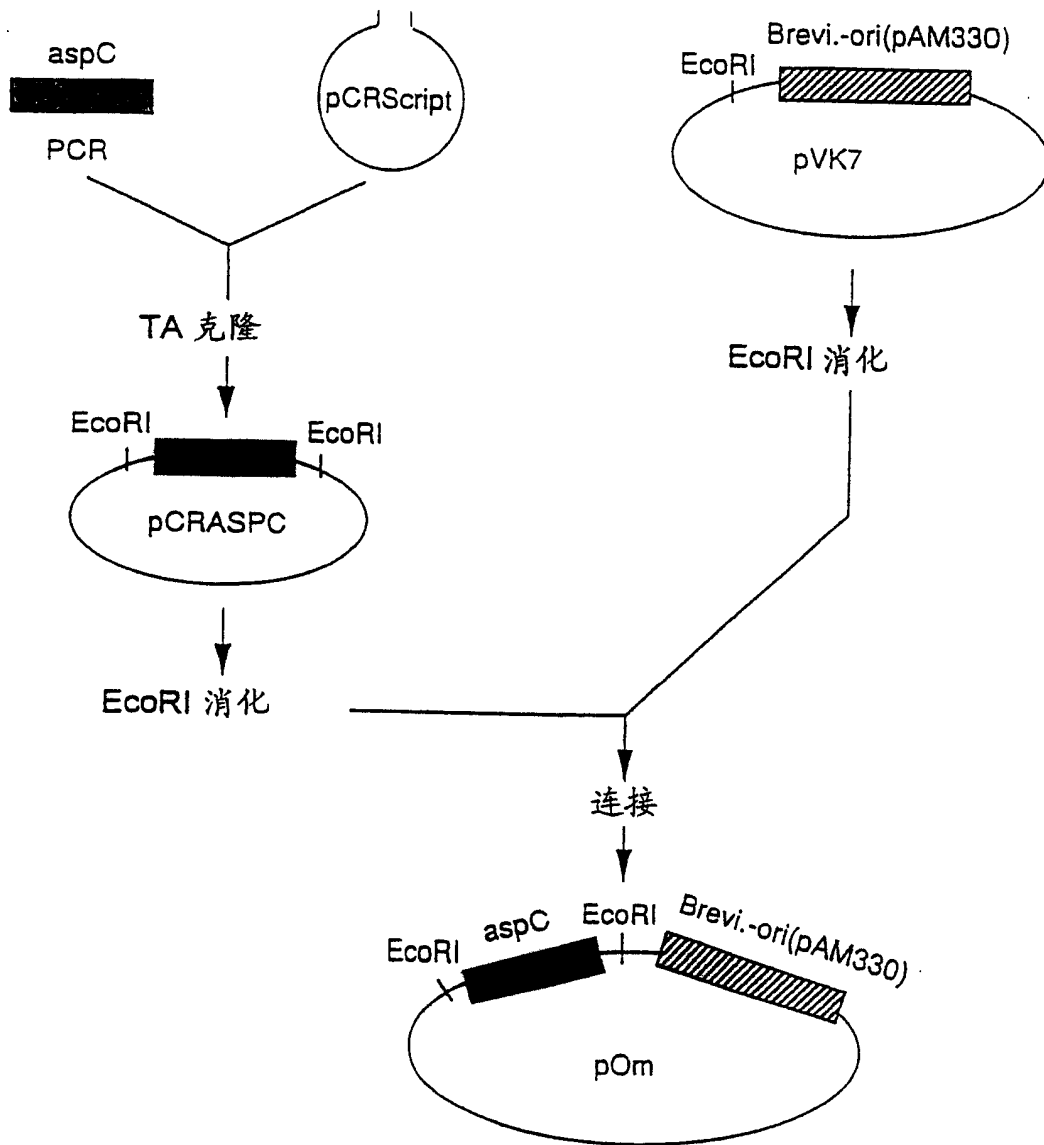


图 12

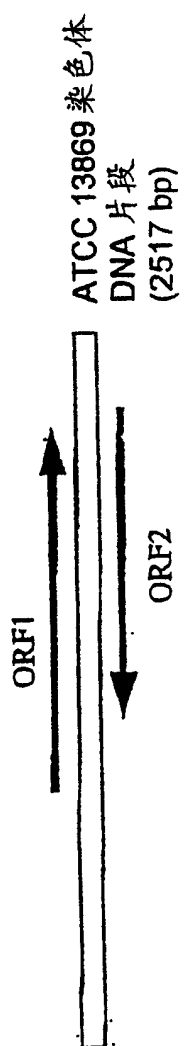


图 13

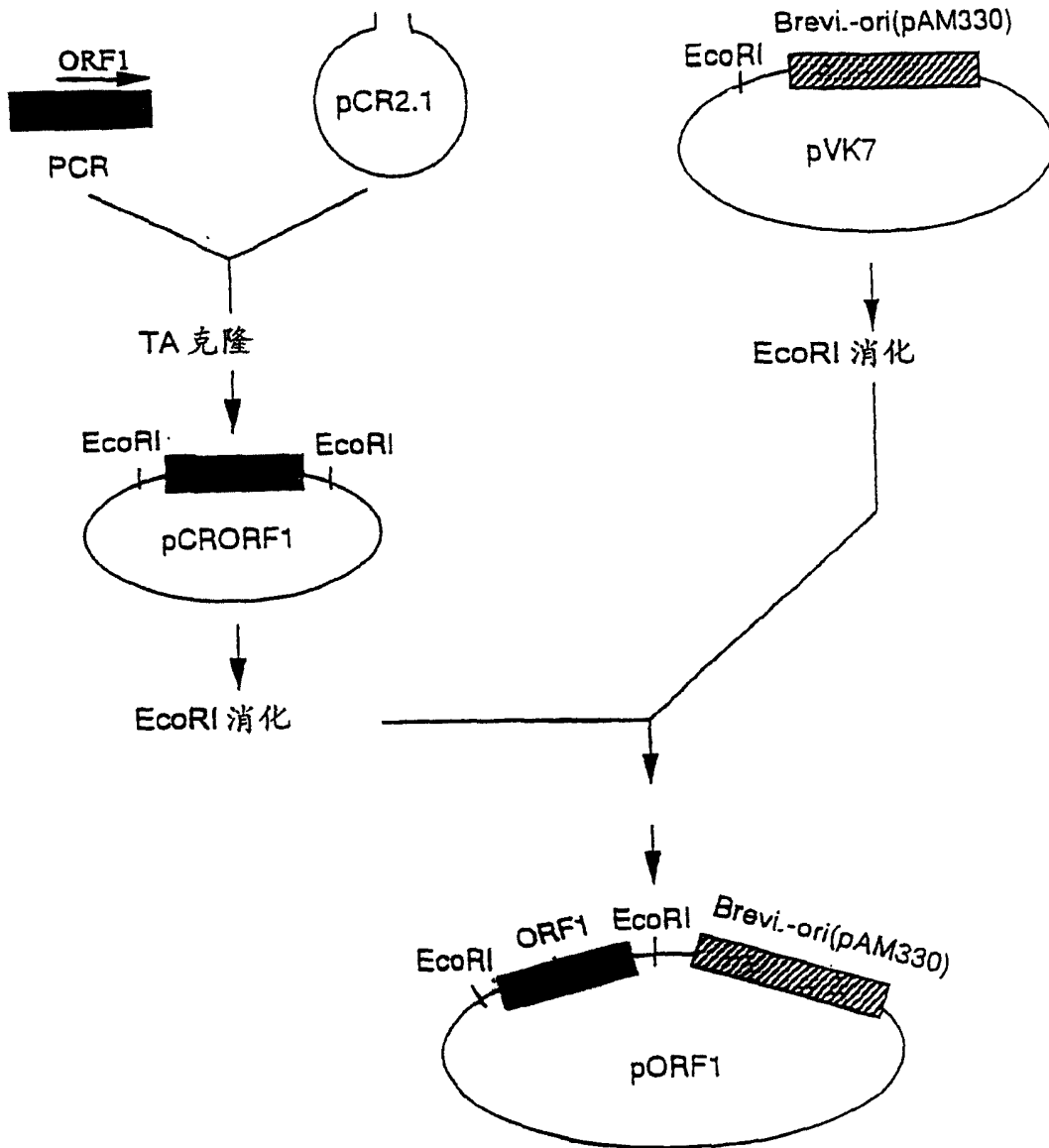


图 14