



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110607313 A

(43)申请公布日 2019.12.24

(21)申请号 201910926308.1

C12N 1/21(2006.01)

(22)申请日 2019.09.27

C12P 13/08(2006.01)

(71)申请人 内蒙古伊品生物科技有限公司

C12R 1/15(2006.01)

地址 024000 内蒙古自治区赤峰市资源型
城市经济转型开发试验区管委会办公
楼

C12R 1/19(2006.01)

(72)发明人 孟刚 马风勇 周晓群 贾慧萍
苏厚波 杨立鹏 高晓航 田斌

(74)专利代理机构 北京知元同创知识产权代理
事务所(普通合伙) 11535

代理人 田芳

(51)Int.Cl.

C12N 15/31(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/74(2006.01)

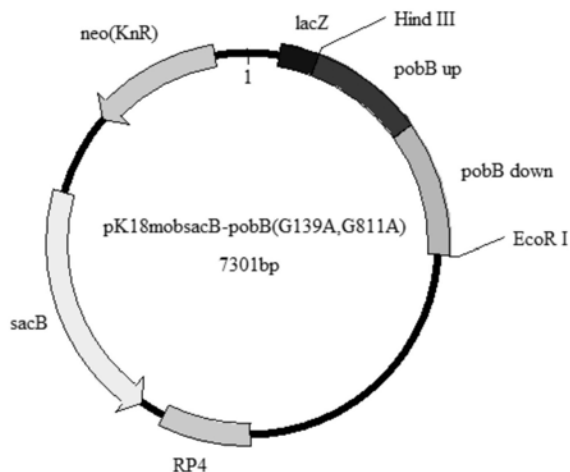
权利要求书1页 说明书6页
序列表7页 附图1页

(54)发明名称

一种高产L-赖氨酸的重组菌株及其构建方
法与应用

(57)摘要

本发明提供一种高产L-赖氨酸的重组菌株
及其构建方法与应用,包括一种改造的pobB基因
编码多核苷酸序列,如SEQ ID NO:2所示的多核
苷酸序列,并且提供该多核苷酸序列编码的重组
蛋白、含有所述多核苷酸序列的重组菌株,所述
重组菌株的构建方法及其在发酵产L-赖氨酸中
的应用。本发明的重组菌株通过对于野生型谷氨
酸棒状杆菌中pobB基因开放阅读框编码区的核
苷酸序列进行点突变,获得pobB基因编码区改
造的重组菌株,相比于野生菌株实现了L-赖氨酸
产量的提高。



1. 一种多核苷酸序列,其特征在于,所述多核苷酸序列包括SEQ ID NO:1所示的野生型pobB基因编码序列第139和811位碱基发生突变形成的多核苷酸序列;

优选,所述突变为SEQ ID NO:1中第139位和第811位碱基均由鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A),所述突变的多核苷酸序列包括如SEQ ID NO:2所示的多核苷酸序列。

2. 重组蛋白,其特征在于,所述重组蛋白由权利要求1所述的多核苷酸序列编码。

3. 根据权利要求2的重组蛋白,所述重组蛋白的氨基酸序列包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

4. 重组载体,包括如权利要求1所述的多核苷酸序列。

5. 根据权利要求4所述的重组载体,所述重组载体是将所述多核苷酸序列导入质粒构建而成。

6. 一种重组菌株,其含有开放阅读框发生点突变的pobB基因编码核苷酸序列;

优选地,所述重组菌株含有如权利要求1所述的多核苷酸序列。

7. 权利要求6所述的重组菌株的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 改造包括SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,使其第139和811位碱基发生突变,得到突变的pobB基因开放阅读框区域多核苷酸序列;

(2) 将所述突变的多核苷酸序列与质粒连接,构建重组载体;

(3) 将所述重组载体导入宿主菌株,得到所述重组菌株。

8. 根据权利要求7所述的构建方法,所述宿主菌株为谷氨酸棒杆菌或大肠杆菌,优选CGMCC No.12856谷氨酸棒杆菌;

优选,所述步骤(1)包括:以谷氨酸棒杆菌ATCC13032为模板,分别以引物P1和P2、P3和P4、P5和P6,进行PCR扩增,获得三条DNA片段;将上述三条DNA片段纯化后,再以上述三条DNA片段为模板,以P1和P6为引物,通过重叠PCR扩增,获得pobB^(G139A,G811A),优选所述引物的序列分别为:P1引物如SEQ ID NO.5所示,P2引物如SEQ ID NO.6所示,P3引物如SEQ ID NO.7所示,P4引物如SEQ ID NO.8所示,P5引物如SEQ ID NO.9所示,P6引物如SEQ ID NO.10所示;

优选,所述步骤(2)包括将分离纯化后的pobB^(G139A,G811A)和质粒,分别用限制性内切酶(例如EcoR I/Hind III)进行双酶切,经DNA连接酶连接,获得重组载体pK18-pobB^(G139A,G811A);

优选,所述步骤(3)包括将所述重组载体电转化至宿主菌株。

9. 如权利要求1-6所述的多核苷酸序列、或重组蛋白、或重组载体、或重组菌株在L-赖氨酸制备中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,是将所述重组菌株发酵制备L-赖氨酸。

一种高产L-赖氨酸的重组菌株及其构建方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和微生物技术领域,具体涉及一种高产L-赖氨酸的重组菌株及其构建方法与应用。

背景技术

[0002] L-赖氨酸是人体和动物生命活动所必需的八大氨基酸之一。L-赖氨酸具有多种生理功能,例如调节代谢平衡,促进人体发育,促进机体对谷类蛋白质和其他氨基酸的吸收,增强免疫功能等,被广泛应用于食品添加剂、动物饲料、药物合成等各个方面。

[0003] L-赖氨酸的生产方法主要包括蛋白水解法和微生物发酵法等。其中微生物发酵法因为生产工艺容易控制,生产能力高等优势已经称为工业上生产L-赖氨酸最常用的方法。微生物发酵法是通过发酵可代谢合成赖氨酸的微生物,利用其微生物代谢作用,实现L-赖氨酸在发酵液中的累积。

[0004] 用于生产L-赖氨酸的微生物包括多个种属,例如棒状杆菌、芽孢杆菌、埃希氏菌等。但是,野生型菌株产L-赖氨酸的能力差,代谢副产物多,难以实现高纯度和高产量L-赖氨酸的制备。因此,通常需要获得高产L-赖氨酸的菌株。目前,获得高产菌株的方法主要包括诱变筛选育种或者基因工程育种。诱变育种是指通过紫外照射或者其他外界条件刺激,诱导菌株发生不特定的基因位点突变,然后通过筛选获得高产菌株,这种方法缺乏方向性,基因突变位点难以控制,对菌株性能的预期性差。基因工程是通过明确的基因改造方式来优化选育菌株,例如通过增加拷贝或者定点突变导入酶活性提高的有益的酶基因,或者通过敲除不理基因使酶活性/表达消失。谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)作为使用最普遍的产L-赖氨酸菌种,二氨基庚二酸(DAP)途径是其主要的L-赖氨酸生物合成途径。DAP途径存在四种不同的变化形式用于合成meso-DAP,包括:脱氢酶途径,琥珀酰化酶途径,乙酰化酶途径和转氨酶途径。谷氨酸棒杆菌同时存在脱氢酶途径和琥珀酰化酶途径。脱氢酶途径只需经过一个酶促反应就可生成meso-DAP(即二氨基庚二酸脱氢酶DDH),进而生成L-赖氨酸。为了提高谷氨酸棒状杆菌生物合成途径中L-赖氨酸的积累,提高其代谢途径中NADPH量或降低L-赖氨酸合成途径中NADPH需求量是非常重要的策略。但是,胞内过量的NADPH会阻碍菌体细胞对糖类的利用,影响菌体生长和L-赖氨酸的积累。因此,构建具有L-赖氨酸的高产菌株仍具有重大意义。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供一种高产L-赖氨酸的重组菌株及其构建方法与应用。具体而言,本发明提供一种改造的pobB基因编码多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码的重组蛋白,含有所述多核苷酸序列的重组菌株,所述重组菌株的构建方法及其在发酵产L-赖氨酸中的应用。本发明的重组菌株通过对于野生型谷氨酸棒状杆菌中pobB基因开放阅读框编码区的核苷酸序列进行点突变,获得pobB基因编码区改造的重组菌株,相比于野生菌株实现了L-赖氨酸产量的提高。

[0006] 本发明采用如下技术方案实现：

[0007] 本发明的第一方面，提供一种多核苷酸序列，所述多核苷酸序列包括SEQ ID NO:1所示的野生型pobB基因编码序列第139和811位碱基发生突变形成的多核苷酸序列。

[0008] 根据本发明，所述突变是指所述位点的碱基/核苷酸发生变化，所述突变方法可以选自诱变、PCR定点突变法、和/或同源重组等方法中的至少一种。

[0009] 根据本发明，所述突变为SEQ ID NO:1中第139位和第811位碱基均由鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A)；具体地，所述突变后的多核苷酸序列包括如SEQ ID NO:2所示的多核苷酸序列。

[0010] 本发明的第二方面，提供如上所述的多核苷酸序列编码的重组蛋白。

[0011] 根据本发明的重组蛋白，其包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0012] 本发明的第三方面，提供包括上述多核苷酸序列或重组蛋白的重组载体。

[0013] 根据本发明的重组载体，是将上述多核苷酸序列导入质粒构建而成；作为一个实施方案，所述质粒为pK18质粒。具体地，可以将所述多核苷酸序列和所述质粒通过内切酶进行酶切，形成互补的粘性末端，将二者连接构建成重组载体。

[0014] 本发明的第四方面，提供一种重组菌株，其含有开放阅读框发生点突变的pobB基因编码核苷酸序列。

[0015] 根据本发明的重组菌株，其含有如第一方面所述的多核苷酸序列。

[0016] 作为本发明的一个实施方案，其含有如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

[0017] 作为本发明的一个实施方案，其含有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0018] 根据本发明的重组菌株，是将上述多核苷酸序列导入宿主菌株中重组形成；所述宿主菌株可以选自本领域已知的产L-赖氨酸的菌株，例如选自谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌中的至少一种。作为本发明的一个实施方案，所述宿主菌株为YP097158（保藏编号：CGMCC No.12856，保藏日期：2016年8月16日）。

[0019] 根据本发明的重组菌株，是以pK18质粒为载体。

[0020] 根据本发明的重组菌株，其可以进一步包括其他改造。

[0021] 本发明的第五方面，还提供一种重组菌株的构建方法，包括如下步骤：

[0022] 改造包括SEQ ID NO:1所示的野生型pobB基因开放阅读框区域的核苷酸序列，使其第139位和第811位碱基发生突变，得到包含突变pobB编码基因的重组菌株。

[0023] 根据本发明的构建方法，所述改造包括诱变、PCR定点突变法、和/或同源重组等方法中的至少一种。

[0024] 根据本发明的构建方法，所述突变为SEQ ID NO:1中第139位和第811位碱基均由鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A)；具体地，所述突变后的多核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0025] 进一步地，所述构建方法包括如下步骤：

[0026] (1) 改造如SEQ ID NO:1所示的野生型pobB基因开放阅读框区域的核苷酸序列，使其第139位和第811位碱基发生突变，得到突变的pobB基因开放阅读框区域多核苷酸序列；

[0027] (2) 将所述突变的多核苷酸序列与质粒连接，构建重组载体；

[0028] (3) 将所述重组载体导入宿主菌株，得到所述包含突变的多核苷酸序列的重组菌株。

[0029] 根据本发明的构建方法，所述步骤(1)包括：点突变的pobB基因编码区构建，即根

据谷氨酸棒杆菌ATCC13032基因组序列,合成三对扩增pobB基因编码区片段的引物,通过PCR定点突变法在野生型pobB基因编码区(SEQ ID NO:1)中引入点突变,得到点突变的pobB基因编码区核苷酸序列(SEQ ID NO:2),记为pobB^(G139A,G811A)。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,所述步骤(1)中,所述引物为:

[0031] P1:5' CCGGAATTCTGCGAGAACTGTTCCGACAC 3' (EcoR I)

[0032] P2:5' CGTTTCCGCTCCACGGTCACCGAACCAATG 3'

[0033] P3:5' CATTGGTTCGGTGACCGTGGAGCGGAAACG 3'

[0034] P4:5' CGTCCGAGCAAGCATCCTGGAACAAGGCAC 3'

[0035] P5:5' GTGCCTTGTTCCAGGATGCTTGCTCGGACG 3'

[0036] P6:5' CCCAAGCTTTCACAGTAGCTTAAACCAAT 3' (Hind III);

[0037] 在本发明的一个实施方案中,所述步骤(1)包括:以谷氨酸棒杆菌ATCC13032为模板,分别以引物P1和P2、P3和P4、P5和P6,进行PCR扩增,获得三条含有pobB基因编码区分离的大小为450bp、700bp和430bp DNA片段。将上述三条DNA片段经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后,再以上述三条DNA片段为模板,以P1和P6为引物,通过重叠PCR扩增(Overlap PCR),获得pobB^(G139A,G811A)。

[0038] 在本发明的一个实施方案中,所述PCR扩增按如下方式进行:94℃变性30s,52℃退火30s,以及72℃延伸30s(30个循环)。

[0039] 在本发明的一个实施方案中,所述重叠PCR扩增按如下方式进行:94℃变性30s秒,52℃退火30s,以及72℃延伸60s(30个循环)。

[0040] 根据本发明的构建方法,所述步骤(2)包括重组载体的构建,即将琼脂糖凝胶电泳分离纯化后的pobB^(G139A,G811A)和pK18质粒,分别用限制性内切酶(例如EcoR I/Hind III)进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后经DNA连接酶连接,获得重组载体pK18-pobB^(G139A,G811A)。

[0041] 根据本发明的构建方法,所述步骤(3)包括重组菌株的构建,将重组载体pK18-pobB^(G139A,G811A)导入谷氨酸棒状杆菌,得到重组菌株。

[0042] 在本发明的一个实施方案中,所述重组载体具有卡那霉素抗性标记。

[0043] 在本发明的一个实施方案中,所述步骤(3)的导入为电转化法;示例性地,所述步骤(3)中,是将重组载体电转化至菌株YP097158。

[0044] 本发明的第六方面,本发明还提供如上所述的构建方法所获得的重组菌株。而且,本发明第五方面所述的构建方法可用于构建如第四方面所述的重组菌株。

[0045] 本发明的第七方面,提供如上所述的多核苷酸序列、重组载体、重组菌株在L-赖氨酸制备中的应用。

[0046] 根据本发明所述的重组菌株在L-赖氨酸制备中的应用,包括采用所述重组菌株进行发酵,制备得到L-赖氨酸。

[0047] 有益效果

[0048] 本发明通过对野生型谷氨酸棒状杆菌中pobB基因编码序列引入点突变,获得重组型菌株,所获得的菌株与未突变的野生型菌株相比,有利于生产高浓度的L-赖氨酸,且菌株稳定性好,作为L-赖氨酸生产菌株能够进一步降低生产成本。

附图说明

[0049] 图1为pK18-pobB^(G139A,G811A)质粒图谱。

具体实施方式

[0050] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步的详细说明。但本领域技术人员了解，本发明的保护范围不仅限于以下实施例。根据本发明公开的内容，本领域技术人员将认识到在不脱离本发明技术方案所给出的技术特征和范围的情况下，对以上所述实施例做出许多变化和修改都属于本发明的保护范围。

[0051] 实施例1构建包含点突变的pobB基因编码区转化载体pK18-pobB (G139A,G811A)

[0052] 根据NCBI公布的谷氨酸棒杆菌ATCC13032基因组序列，合成三对扩增pobB基因编码区片段的引物，通过以等位基因置换在菌株YP097158(保藏编号:CGMCC No.12856,保藏日期:2016年8月16日,保藏单位:中国科学院微生物研究所,北京市朝阳区北辰西路1号院3号,电话:010-64807355。)背景中的pobB基因编码区(SEQ ID No.1)中引入点突变,pobB基因的核苷酸序列第139位G变为A、第811位G变为A(SEQ ID No.2),对应编码蛋白的氨基酸序列由野生型(SEQ ID NO.3)第47位甘氨酸(G)变为丝氨酸(S)、第271位丙氨酸(A)变为苏氨酸(T)(突变后的氨基酸序列为SEQ ID No.4)。引物设计如下(上海invitrogen公司合成):

[0053] P1:5'CCGGAATTCTGCGAGAAGTGTCCGACAC 3'(Ecor I)(SEQ ID NO.5)

[0054] P2:5'CGTTTCCGCTCCACGGTCACCGAACCAATG 3'(SEQ ID NO.6)

[0055] P3:5'CATTGGTTCGGTGACCGTGGAGCGGAAACG 3'(SEQ ID NO.7)

[0056] P4:5'CGTCCGAGCAAGCATCCTGGAACAAGGCAC 3'(SEQ ID NO.8)

[0057] P5:5'GTGCCTTGTTCCAGGATGCTTGCTCGGACG 3'(SEQ ID NO.9)

[0058] P6:5'CCCAAGCTTTCACAGTAGCTTAAACCAAT 3'(Hind III)(SEQ ID NO.10)

[0059] 构建方法:以谷氨酸棒杆菌ATCC13032为模板,分别以引物P1和P2、P3和P4、P5和P6,进行PCR扩增,PCR体系:10×Ex Taq Buffer 5μL,dNTP Mixture(各2.5mM)4μL,MgCl₂(25mM)4μL,引物(10pM)各2μL,Ex Taq(5U/μL)0.25μL,总体积50μL,所述PCR扩增按如下方式进行:94℃预变性5min,(94℃变性30s、52℃退火30s、72℃延伸30s,30个循环),72℃过度延伸10min,获得三条大小分别为450bp、700bp和430bp,含有pobB基因编码区的DNA片段(pobB-Up和pobB-Down)。

[0060] 将上述三条DNA片段经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后,再以上述三条DNA片段为模板,以P1和P6为引物,通过Overlap PCR扩增长约1420bp的片段,PCR体系:10×Ex Taq Buffer 5μL,dNTP Mixture(各2.5mM)4μL,MgCl₂(25mM)4μL,引物(10pM)各2μL,Ex Taq(5U/μL)0.25μL,总体积50μL,所述PCR扩增按如下方式进行:94℃预变性5min,(94℃变性30s、52℃退火30s、72℃延伸90s,30个循环),72℃过度延伸10min,得到突变的DNA片段pobB^(G139A,G811A)。此DNA片段导致YP097158pobB基因编码区的第139位和第811位的鸟嘌呤(G)均突变为腺嘌呤(A),最终导致编码蛋白的第47位甘氨酸(G)突变为丝氨酸(S)、第271位丙氨酸(A)突变为苏氨酸(T)。

[0061] 将琼脂糖凝胶电泳分离纯化后的pobB^(G139A,G811A)和pK18mobsacB质粒(购至Addgene公司)分别用EcoR I/Hind III双酶切,经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后经DNA连接酶连接,获得载体pK18-pobB^(G139A,G811A),该质粒上含有卡那霉素抗性标记。并将载体pK18-

pobB^(G139A,G811A)送测序公司测序鉴定,结果如图1和SEQ ID No.15所示,将含有正确点突变(G-A)的载体pK18-pobB^(G139A,G811A)保存备用。

[0062] 实施例2构建包含点突变的pobB^(G139A,G811A)的工程菌株

[0063] 构建方法:将等位替换载体pK18-pobB^(G139A,G811A)通过电击转化入L-赖氨酸生产菌专利菌株YP097158中(其构建方法可参见W02014121669A1中工程菌株的构建方法;经测序确认该菌株染色体上保留有野生型的pobB基因编码区),对培养产生的单菌落分别通过引物P1和通用引物M13F进行鉴定,能扩增出1600bp左右大小条带的菌株为阳性菌株。将阳性菌株在含15%蔗糖的培养基上培养,对培养产生的单菌落分别在含有卡那霉素和不含卡那霉素的培养基上培养,在不含卡那霉素的培养基上生长,而在含卡那霉素的培养基上不生长的菌株进一步采用引物P7和P8、P9和P10(上海invitrogen公司合成)进行PCR鉴定:

[0064] P7:5'AGGTGTAGCTATCGAGCAAG 3'(SEQ ID NO.11)

[0065] P8:5'AGCGCTACTACCTGCAGTGC 3'(SEQ ID NO.12)

[0066] P9:5'TGCTGCGGGTAGATCGCAAC 3'(SEQ ID NO.13)

[0067] P10:5'GCGCAGGACCAGCAGGAC 3'(SEQ ID NO.14)

[0068] 上述PCR扩增产物通过高温变性、冰浴后进行sscp电泳(以载体pK18-pobB^(G139A,G811A)扩增片段为阳性对照,YP097158扩增片段为阴性对照,水作为空白对照),由于片段结构不同,电泳位置不同,因此片段电泳位置与阴性对照片段位置不一致且与阳性对照片段位置一致的菌株为等位替换成功的菌株。再次以引物P7和P10 PCR扩增阳性菌株目的片段,并连接到PMD19-T载体测序,通过序列比对碱基序列发生突变的序列验证菌株的等位替换成功,并将pobB^(G139A,G811A)点突变的菌株命名为YPL-4-012

[0069] 实施例3 L-赖氨酸发酵实验

[0070] 实施例2构建的菌株YPL-4-012和原始菌株YP097158在BLBIO-5GC-4-H型号的发酵罐(购自上海百仑生物科技有限公司)中以表1所示的培养基和表2所示的控制工艺进行发酵实验。每个菌株重复三次,结果如表3所示。

[0071] 表1发酵培养基配方

[0072]

| 成分 | 配方 |
|-----------|---------|
| 淀粉水解糖 | 30g/L |
| 硫酸铵 | 12g/L |
| 硫酸镁 | 0.87g/L |
| 糖蜜 | 20g/L |
| 酸化玉米浆 | 3mL/L |
| 磷酸 | 0.4mL/L |
| 氯化钾 | 0.53g/L |
| 消泡剂(2%泡敌) | 4mL/L |
| 硫酸亚铁 | 120mg/L |
| 硫酸锰 | 120mg/L |
| 烟酰胺 | 42mg/L |
| 泛酸钙 | 6.3mg/L |
| 维生素B1 | 6.3mg/L |

| | |
|--------|----------|
| 铜、锌盐溶液 | 0.6g/L |
| 生物素 | 0.88mg/L |

[0073] 表2发酵控制工艺

| | | | |
|----------|---|--------|--------|
| 校正DO100% | 温度37°C、风量4L/min、转速1000rpm、罐压0mpa, 5min后标定 | | |
| 接种量 | 15% | 培养温度°C | 37°C |
| pH | pH6.9±0.05 | 溶氧DO | 10-30% |
| 初始条件 | 温度37°C、pH6.9、罐压0Mpa、风量3L/min、转速550rpm | | |
| 全程控制 | 全程控制 1.溶氧<30%时,依次提转速750rpm→800rpm→风量4L/min→850rpm→950rpm; 2.发酵6h提罐压0.01Mpa; 12h提罐压0.02Mpa→0.03Mpa→0.04Mpa→0.05Mpa | | |
| 残糖控制 | F12h前0.1-0.2%; F12h后结合DO要求控制残糖0.1-0.05% | | |
| 氨氮控制 | F12h前0.1-0.15; F12-F32h0.15-0.25; F32h后0.1-0.15 | | |
| 流加物料 | 25%氨水、70%浓糖、50%硫酸、10%泡敌 | | |
| 发酵周期 | 48h左右 | | |

[0075] 表3 L-赖氨酸发酵实验结果

| 菌株 | | L-赖氨酸产量(%) | 转化率(%) |
|---------|-----|------------|--------|
| YP97158 | 第1批 | 18.6 | 63.9 |
| | 第2批 | 18.3 | 63.8 |
| | 第3批 | 18.2 | 63.6 |

[0077]

| | | | |
|-----------|-----|-------|-------|
| | 均值 | 18.37 | 63.77 |
| YPL-4-012 | 第1批 | 19.2 | 64.2 |
| | 第2批 | 19.9 | 64.4 |
| | 第3批 | 20.1 | 64.3 |
| | 均值 | 19.73 | 64.3 |
| 提高倍数 | | 7.4% | 0.83% |

[0078] 结果如表格3所示,在谷氨酸棒杆菌中对pobB基因编码区进行点突变pobB^(G139A,G811A),有助于L-赖氨酸产量的提高。

序列表

<110> 内蒙古伊品生物科技有限公司

<120> 一种高产L-赖氨酸的重组菌株及其构建方法与应用

<130> CPCN19110495

<160> 15

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1188

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

```

atgaaccacg taccagtggc aattattggc gcaggaccag caggactaac cctcgcccac 60
ctcctccacc ttcaaggtgt ggaatcaatc gtctttgaat cccgcacccg caaggacgtc 120
gaagaaaccg tccgagcagg catcctggaa caaggcacc tgaatctgat gcgcgaaacc 180
ggagtcggcg cacgcatgga agcagaagcc gatcacgatg aagcaatcga catctccatc 240
aacaatgagc gcacccgcat tccgctgacc gaactcaccg gccacaaggt tgcgatctac 300
ccgcagcacg aataacctca agatttcatt gccaaagcga tcgaagatgg cggcgaactc 360
cttttcacca ccaactgtga ttccgtagaa aactacgaag gcgacctcgc caaggtgacc 420
tacaccgaag ccgatggttc ctccaccacc atcaccgccg actacgtcat cgcagctgac 480
ggctccaact ccccttaccg caagctgatc accgaagacg gtggcgtgcg cgcccgccat 540
gaataccctt acgcatggtt cggcattttg gtggaagcac caaaaacca aaaggaactc 600
atctacgcaa cccaccctga gggttttgcg ctgatctcca cccgtaccga tgaatccag 660
cgctactacc tgcagtgcaa cctgacgac accccagaca tgtggcccga tgaccgcatt 720
tggaacagc tgcacctgcg tgcggactcc cctggcatca ccgtgtctga agggcgcac 780
tttgacaagg ccgtgctgcg tttctgctcc gcggtcaccg aaccaatgca aaaggacgc 840
ctcttccttg ctggcgatgc tgcacacacc gtgccgcaa ccggagctaa gggcctcaac 900
ttggctgttg ccgatgtctc agtactcgcg ccagcactgg ttcgtgccct gaagaagaag 960
gacaccggct tgctcgatag ctacacctcc ctggcagtcc cccgcatctg gaaagcacag 1020
cacttctcct actggatgag ctccatgctc cacgcagtac ccggcgaaga tcactttgcc 1080
accagcgcc gattcgctga attgcgctcc gtctagaat cccaatccgg ccaacgctac 1140
ctcgagagc agtacgttgg gcgcgaccta ccacgcttcg aggtataa 1188

```

<210> 2

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

```

atgaaccacg taccagtggc aattattggc gcaggaccag caggactaac cctcgcccac 60
ctcctccacc ttcaaggtgt ggaatcaatc gtctttgaat cccgcacccg caaggacgtc 120

```

gaagaaaccg tccgagcaag catcctggaa caaggcacc tgaatctgat gcgcgaaacc 180
 ggagtcggcg cacgcatgga agcagaagcc gatcacgatg aagcaatcga catctccatc 240
 aacaatgagc gcacccgcat tccgctgacc gaactcaccg gccacaaggt tgcgatctac 300
 ccgcagcacg aatacctcaa agatttcatt gccaaagcgca tcgaagatgg cggcgaactc 360
 cttttcacca ccaactgttg ttccgtagaa aactacgaag gcgacctcgc caaggtgacc 420
 tacaccgaag ccgatggttc ctccaccacc atcaccgccg actacgtcat cgcagctgac 480
 ggctccaact ccccttaccg caagctgatc accgaagacg gtggcgtgcg cgcccccat 540
 gaataccctt acgcatggtt cggcattttg gtggaagcac caaaaacca aaaggaactc 600
 atctacgcaa cccaccctga gggctttgcg ctgatctcca cccgtaccga tgaatccag 660
 cgctactacc tgcagtgcaa cctgacgac accccagaca tgtggcccga tgaccgcatt 720
 tgggaacagc tgcacctgcg tgcggactcc cctggcatca cegtgtctga agggcgcac 780
 tttgacaagg ccgtgctgcg tttctgctcc acggtcaccg aaccaatgca aaagggacgc 840
 ctcttccttg ctggcgatgc tgcacacacc gtgccgcaa ccggagctaa gggcctcaac 900
 ttggctgttg ccgatgtctc agtactcgcg ccagcactgg ttcgtgcct gaagaagaag 960
 gacaccggct tgctcgatag ctacacctcc ctggcagtc cccgcacttg gaaagcacag 1020
 cacttctcct actggatgag ctccatgctc cacgcagtac ccggcgaaga tcactttgcc 1080
 acccagcgcg gattcgtga attgcctcc gtctagaat cccaatccgg ccaacgctac 1140
 ctcgcagagc agtacgttg gcgcgacctc ccacgcttc aggtataa 1188

<210> 3

<211> 395

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 3

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

Val Glu Asn Tyr Glu Gly Asp Leu Ala Lys Val Thr Tyr Thr Glu Ala
 130 135 140
 Asp Gly Ser Ser Thr Thr Ile Thr Ala Asp Tyr Val Ile Ala Ala Asp
 145 150 155 160
 Gly Ser Asn Ser Pro Tyr Arg Lys Leu Ile Thr Glu Asp Gly Gly Val
 165 170 175
 Arg Ala Arg His Glu Tyr Pro Tyr Ala Trp Phe Gly Ile Leu Val Glu
 180 185 190
 Ala Pro Lys Thr Gln Lys Glu Leu Ile Tyr Ala Thr His Pro Glu Gly
 195 200 205
 Phe Ala Leu Ile Ser Thr Arg Thr Asp Glu Ile Gln Arg Tyr Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Cys Asn Pro Asp Asp Thr Pro Asp Met Trp Pro Asp Asp Arg Ile
 225 230 235 240
 Trp Glu Gln Leu His Leu Arg Ala Asp Ser Pro Gly Ile Thr Val Ser
 245 250 255
 Glu Gly Arg Ile Phe Asp Lys Ala Val Leu Arg Phe Cys Ser Ala Val
 260 265 270
 Thr Glu Pro Met Gln Lys Gly Arg Leu Phe Leu Ala Gly Asp Ala Ala
 275 280 285
 His Thr Val Pro Pro Thr Gly Ala Lys Gly Leu Asn Leu Ala Val Ala
 290 295 300
 Asp Val Ser Val Leu Ala Pro Ala Leu Val Arg Ala Leu Lys Lys Lys
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Leu Leu Asp Ser Tyr Thr Ser Leu Ala Val Pro Arg Ile
 325 330 335
 Trp Lys Ala Gln His Phe Ser Tyr Trp Met Ser Ser Met Leu His Ala
 340 345 350
 Val Pro Gly Glu Asp His Phe Ala Thr Gln Arg Arg Phe Ala Glu Leu
 355 360 365
 Arg Ser Val Leu Glu Ser Gln Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Glu Gln
 370 375 380
 Tyr Val Gly Arg Asp Leu Pro Arg Phe Glu Val
 385 390 395
 <210> 4
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 4

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Asp Thr Gly Leu Leu Asp Ser Tyr Thr Ser Leu Ala Val Pro Arg Ile | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Trp Lys Ala Gln His Phe Ser Tyr Trp Met Ser Ser Met Leu His Ala | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| Val Pro Gly Glu Asp His Phe Ala Thr Gln Arg Arg Phe Ala Glu Leu | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| Arg Ser Val Leu Glu Ser Gln Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Glu Gln | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| Tyr Val Gly Arg Asp Leu Pro Arg Phe Glu Val | | | |
| 385 | 390 | 395 | |

<210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 5
 ccggaattct gcgagaactg ttccgacac 29
 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 6
 cgtttccgct ccacggtcac cgaaccaatg 30
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 7
 cattggttcg gtgaccgtgg agcggaaacg 30
 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 8
 cgtccgagca agcatcctgg aacaaggcac 30
 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 9
gtgccttggt ccaggatgct tgctcggacg 30
<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
cccaagcttt cacagtagct taaaccaat 29
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
aggtgtagct atcgagcaag 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 12
agcgctacta cctgcagtgc 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 13
tgctgcgggt agatcgcaac 20
<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 14
gcgcaggacc agcaggac 18
<210> 15
<211> 930
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 15
gcaggaccag caggactaac cctcgeccac ctctccacc ttcaaggtgt ggaatcaatc 60
gtctttgaat cccgcaccg caaggacgtc gaagaaaccg tccgagcaag catcctggaa 120

caaggcacc tgaatctgat gcgcgaaacc ggagtcggcg cacgcatgga agcagaagcc 180
gatcacgatg aagcaatcga catctccatc aacaatgagc gcacccgcat tccgctgacc 240
gaactcaccg gccacaaggt tgcgatctac ccgcagcacg aatacctcaa agatttcatt 300
gccaagcgca tcgaagatgg cggcgaactc cttttacca ccaactgttga ttccgtagaa 360
aactacgaag gcgacctcgc caaggtgacc tacaccgaag ccgatggttc ctccaccacc 420
atcaccgccg actacgtcat cgcagctgac ggetccaact ccccttaccg caagctgac 480
accgaagacg gtggcgtgcg cgcccgccat gaataccctt acgcatggtt cggcattttg 540
gtggaagcac caaaaacca aaaggaactc atctacgcaa cccaccctga gggctttgcg 600
ctgatctcca cccgtaccga tgaatccag cgctactacc tgcagtcaa ccctgacgac 660
accccagaca tgtggcccgga tgaccgcatt tgggaacagc tgcacctgcg tgcggactcc 720
cctggcatca ccgtgtctga agggcgcatc tttgacaagg ccgtgctgcg tttctgctcc 780
acggtcaccg aaccaatgca aaagggacgc ctcttcttg ctggcgatgc tgcacacacc 840
gtgccgcaa ccggagctaa gggcctcaac ttggtgttg ccgatgtctc agtactcgcg 900
ccagcaactgg ttcgtgcct gaagaagaag 930

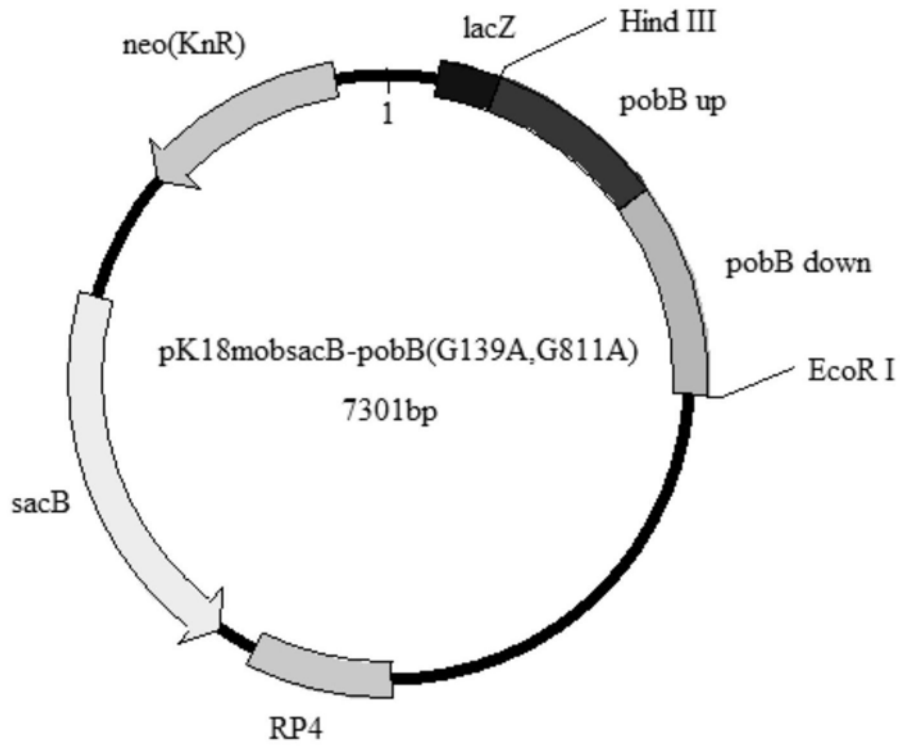


图1