



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106676125 A

(43) 申请公布日 2017. 05. 17

(21) 申请号 201510753590. X

(22) 申请日 2015. 11. 05

(71) 申请人 中国科学院天津工业生物技术研究所

地址 300308 天津市东丽区空港经济区西七道 32 号

(72) 发明人 张大伟 付刚 岳洁 郑平

(51) Int. Cl.

C12N 15/75(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C12N 15/113(2010. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页

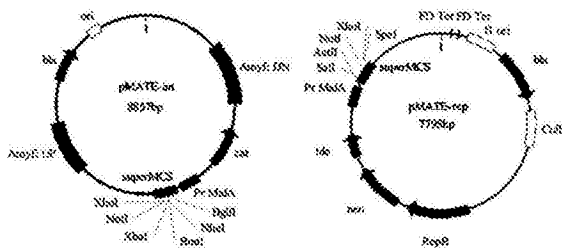
序列表16页 附图7页

(54) 发明名称

一种包含麦芽糖启动子的载体以及麦芽糖启动子突变体

(57) 摘要

本发明公开了一种包含麦芽糖启动子的载体以及麦芽糖启动子突变体。本发明构建了一种在原核宿主中可表达的新型载体,以及包含枯草芽孢杆菌中麦芽糖操纵子的可诱导启动子的核酸序列及其突变体序列,其中所述载体和核酸序列可分别适用于转化宿主细胞以表达编码多肽的异源核酸序列。



1. 一种在原核宿主细胞中可表达的载体,其中包含可操作的连接于转录单元的枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子的麦芽糖可诱导启动子,所述转录单元包括编码多肽的异源核酸序列。

2. 根据权利要求1的载体,其中所述启动子是Ma1A启动子。

3. 根据权利要求1-2任一项的载体,其中所述Ma1A 启动子包括选自SEQ ID NO: 1的序列、其互补序列或其变体。

4. 前述权利要求任一项的载体,其中所述载体是在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中可复制的穿梭载体。

5. 前述权利要求任一项的载体,其中所述载体包括质粒pUC18的复制起始点和/或pBS72复制子或rep基因以及质粒pUB110的复制起始点。

6. 前述权利要求任一项的载体,其中所述异源核酸序列编码多肽或其片段。

7. 枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子的麦芽糖可诱导启动子区的分离且纯化的核酸序列及其互补序列或其变体。

8. 权利要求7的分离且纯化的核酸序列,其中所述序列包括SEQ ID NO: 2的任意项,其互补序列或其变体。

9. 以权利要求1-6任一项的载体或以权利要求7或8任意项的核酸序列转化的原核宿主细胞。

10. 根据权利要求9的原核宿主细胞,其中所述的原核宿主细胞包括野生型细胞以及缺失了6-磷酸麦芽糖水解酶基因Ma1A或其同源基因、6-磷酸麦芽糖水解酶基因或其同源基因及其3'端后方的茎环结构序列、 α -葡萄糖苷酶基因Ma1L或其同源基因、麦芽糖磷酸化酶基因yvdK或其同源基因的单一基因缺失菌株或组合基因缺失菌株;同时包括麦芽糖转录激活因子基因Ma1R或其同源基因、麦芽糖磷酸化转运蛋白基因Ma1P或其同源基因的单一基因增强表达或组合增强表达的菌株。

11. 根据权利要求9或10的原核宿主细胞,其中所述原核宿主细胞是革兰氏阳性的。

12. 根据权利要求10或11任意项的原核宿主细胞,其中所述宿主细胞属于硬壁菌门(Firmicutes)。

13. 用于在原核宿主细胞中产生多肽的方法,包括以下步骤:构建权利要求1-6任一项的载体;以所述载体转化原核宿主细胞;通过转化后的宿主细胞在适当的培养基及培养条件下生长并表达所述多肽。

14. 根据权利要求13的方法,其中所述宿主细胞首先在存在没有诱导物的情况下生长,然后在存在诱导物的情况下生长。

一种包含麦芽糖启动子的载体以及麦芽糖启动子突变体

技术领域

[0001] 本发明涉及在原核宿主细胞中可表达的载体,其包含麦芽糖可诱导的启动子,该启动子用于编码例如多肽、重组蛋白的核酸的异源表达。具体的,本发明涉及用于在宿主中进行异源表达的新的载体,其包含可操作地连接于转录单元的麦芽糖操纵子的启动子区域,所述转录单元包含对于所述宿主而言为异源的核酸序列,而所述核酸序列的表达受到所述麦芽糖操纵子的启动子区域的控制。此外,本发明涉及利用这些载体用于异源编码表达例如多肽、重组蛋白的核酸的用途。

背景技术

[0002] 多肽及重组蛋白的异源表达生产在蛋白质工程中具有重要的意义,其中利用原核生物进行多肽及重组蛋白的大规模生产具有蛋白表达量高、发酵密度大、发酵成本低廉等优势。

[0003] 目前在原核细胞中建立的表达载体以及表达系统很多,其中利用诱导物进行诱导表达因其表达强度高、表达时间可控等优势而被用于建立相应的诱导表达系统,例如革兰氏阴性菌大肠杆菌中的T7、阿拉伯糖(Arabinose)诱导表达系统,革兰氏阳性菌芽孢杆菌中的木糖诱导表达系统等。

[0004] 这些系统中通过将可诱导的启动子序列连接于目标蛋白核酸序列,构建含有目标蛋白核酸序列的诱导型表达载体,并通过将此诱导型表达载体转化宿主菌进行不同条件下的培养,在未添加诱导物的培养条件下,阻遏子与启动子结合并阻止目的基因的转录,或者另一种情况下激活子由于缺乏诱导物无法结合于启动子上激活目的基因的转录;在添加适当诱导物的培养条件下,阻遏子被诱导物失活从而转录被起始,或者另一种情况下诱导物与激活子结合后激活启动子,从而目的基因转录被起始。

[0005] 目前典型的诱导物可以是原核宿主细胞代谢所需的底物,例如不同种类的糖。然而某些诱导物如半乳糖类似物IPTG、四环素等具有细胞毒性,某些诱导物如乳糖、阿拉伯糖、木糖等价格较为昂贵,限制了相应诱导表达系统在大规模多肽及重组蛋白工业生产中的应用。

发明内容

[0006] 本发明通过提供一种新型的在原核宿主中的表达载体,所述的新载体包含可操作的连接于转录单元的麦芽糖操纵子的启动子区或其互补序列或突变体序列,所述转录单元包含对于所述宿主而言为异源的核酸序列,而所述核酸序列的表达受到所述麦芽糖操纵子的启动子区的控制。

[0007] 本发明还提供了多种用于所述新型表达载体进行异源表达的宿主细胞,所述的宿主细胞经过分子遗传学改造,包括缺失了6-磷酸麦芽糖水解酶基因Ma1A、6-磷酸麦芽糖水解酶基因及其3'端后方的茎环结构序列、 α -葡萄糖苷酶基因Ma1L、麦芽糖磷酸化酶基因yvdK的单一基因缺失菌株或组合基因缺失菌株;同时包括麦芽糖转录激活因子基因Ma1R、

麦芽糖磷酸化转运蛋白基因MalP单一基因增强表达或组合增强表达的菌株。

[0008] 本发明还通过新的表达载体提供了核酸序列在原核宿主中的异源表达用途,即将需进行表达的分离纯化的核酸序列连接至所述的新的表达载体中,其包含麦芽糖操纵子的启动子区域,将构建的携带分离纯化的核酸序列的表达载体转化至原核宿主细胞,通过改变培养条件在宿主细胞中生产多肽及重组蛋白的方法。

附图说明

[0009] 图1:是来源于枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的麦芽糖操纵子的MalA启动子区域的核酸序列及结构,其中转录起始位点以星号表示,推定的-35区域和-10区域以方框表示,推定的cre序列以虚线表示,核糖体结合序列以下划线表示,MalA基因起点以箭头表示。

[0010] 图2:是用于检测麦芽糖启动子转录强度的载体pDG的质粒图谱。

[0011] 图3:是本发明的表达载体pMATE-rep和pMATE-int的质粒图谱。

[0012] 图4:是包含携带不同麦芽糖启动子突变体质粒pDG的枯草芽孢杆菌1A751的绿色荧光蛋白荧光信号强度(RFU)作图。

[0013] 图5:是包含携带不同麦芽糖启动子突变体质粒pDG的枯草芽孢杆菌1A751遗传改造菌株的绿色荧光蛋白荧光信号强度(RFU)作图。

[0014] 图6:是质粒pDG的构建流程图。

[0015] 图7:是质粒pMATE-rep和pMATE-int的构建流程图。

[0016] 图8:是携带有表达绿色荧光蛋白基因GFP基因的pMATE-int质粒的枯草芽孢杆菌1A751的SDS-PAGE图。

[0017] 图9:是携带有表达绿色荧光蛋白基因GFP基因的pMATE-rep质粒的枯草芽孢杆菌1A751的SDS-PAGE图。

具体实施方式

[0018] 如果没有其它说明,则使用的是如下的材料和方法:

[0019] 细菌菌株和生长条件:

[0020] 大肠杆菌DH5 α 和枯草芽孢杆菌1A751(BGSC, USA)用作主要宿主,用于克隆和表达。大肠杆菌于37 $^{\circ}$ C生长于LB液体培养基(Luria S.E.等人, *Virology* 12, 1960, 348-390)和LB琼脂平板,其中补充了100 μ g/ml氨苄青霉素。枯草芽孢杆菌于37 $^{\circ}$ C生长于LB液体培养基和SR发酵培养基。液体培养基和琼脂平板分别补充了20 μ g/ml卡那霉素或5 μ g/ml氯霉素。为了诱导麦芽糖启动子,加入无菌过滤的或高压灭菌的D-麦芽糖至1%(w/v)的最终浓度。

[0021] 材料:

[0022] 所有的化学品都获自Sigma-Aldrich或Merck。合成的DNA寡核苷酸购自金唯智Genewiz。限制性酶和DNA修饰酶购自New England Biolabs。来自Fermentas的高保真DNA聚合酶在来自Eppendorf的热循环仪上进行PCR。

[0023] DNA的制备和转化:

[0024] 使用Tiangen或Omega的DNA制备试剂盒,根据生产商的说明书,从大肠杆菌和枯草芽孢杆菌或从琼脂糖凝胶分离DNA。在所有实施例中均使用标准的分子技术。使用如Chung C.T.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, 21722-2175描述的质粒DNA转化大肠杆菌。根

据改进的“Paris方法”(Harwood C.R. Molecular Biological Methods for Bacillus, 1990, John Wiley & Sons Ltd., England), 使用质粒DNA或DNA片段转化枯草芽孢杆菌。

[0025] 绿色荧光蛋白荧光强度RFU的测定:

[0026] 将培养至OD600约为0.6-0.8的待测菌株于4℃, 4000rpm离心10分钟收集菌体, 用预冷的PBS溶液洗涤菌体2次, 转移150μL至96孔黑色底透酶标板(Corning, USA)中, 放置于微孔板SpectraMax M2酶标仪(Molecular Devices, USA)于室温条件下483nm/525nm激发并检测荧光发射光强度RFU, 于600nm测定菌体浓度, 荧光强度计算按照RFU/OD600计算。

[0027] 定点突变或随机突变:

[0028] 使用Stratagene的Qucikchange II质粒DNA突变试剂盒, 根据生产商的说明书, 对质粒DNA进行定点突变或基于简并引物的随机突变。突变引物的上/下游引物为反向互补序列, 在突变位点5'端设计不少于8个与模板DNA匹配的核苷酸, 在突变位点3'端设计不少于12个与模板DNA匹配的核苷酸。突变PCR的程序与常规PCR相似但略有改动, 反应循环数依据突变位点的多少进行调节, 突变位点≤3个, 循环数为12; 4≤突变位点≤6个, 循环数为16; 突变位点≥6个, 循环数为20。扩增后的PCR产物经DpnI限制性内切酶酶切后转化大肠杆菌, 得到的转化子经测序验证后提取质粒DNA留存。

[0029] 枯草芽孢杆菌基因无痕敲除:

[0030] 根据改进的“基于AraR的枯草芽孢杆菌基因敲除方法”(Liu S, Endo K, et al. Microbiology. 2008; 154(Pt 9): 2562-2570.)进行基因无痕敲除。首先利用同源重组原理将携带同源臂的受阿拉伯糖启动子调控的壮观霉素抗性基因片段“P_{ara}-spc”通过转化方法转入枯草芽孢杆菌1A751菌株中, 替换基因组上的AraR基因, 构建原始的基因敲除原始菌, 其带有壮观霉素抗性。需要敲除基因X时, 分别克隆X基因的上游1Kb片段(命名为UP)、下游1Kb片段(命名为DN)、待敲除基因X片段(命名为G)以及带有AraR基因和氯霉素抗性基因cat的筛选片段(命名为CR), 利用overlap-PCR方法将上述4个片段以“UP-DN-CR-G”的顺序融合为一个片段, 并通过转化方法转入枯草芽孢杆菌1A751中进行同源重组, 以氯霉素抗性筛选转化子。将得到的转化子在壮观霉素抗性LB平板上验证, 选取在氯霉素上生长、而在壮观霉素上不生长的转化子作为阳性转化子。将阳性转化子在无抗性的LB培养基中以37℃, 200rpm培养16小时, 取10uL菌液涂布于壮观霉素抗性平板上进行筛选, 将得到的转化子通过菌落PCR进行验证, 确定基因是否敲除。将菌落PCR验证正确的菌株作为敲除X基因的菌株进行保存。

[0031] 所用到的寡核苷酸:

[0032] 表1

[0033]

寡核苷酸名称	序列	用途
pDG-vector.for	CACATGGCATGGATGAACTATACAAATAGA GAAGTCTCGTTCCGACAGTTGG	从 pDL 质粒扩增载体骨架
pDG-vector.rev	GTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATAATTA TTCCCCCTAGCTAATTTTCGT	从 pDL 质粒扩增载体骨架

[0034]

gfp-insert.for	ACGAAAATTAGCTAGGGGGAATAATTATGA GTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC	从 pSG1729 质粒扩增 gfp 基因
gfp-insert.rev	CCAACTGTCGGAACGAGACTTCTCTATTTG TATAGTTCATCCATGCCATGTG	从 pSG1729 质粒扩增 gfp 基因
Pglv.for	CGCGGATCCCTTTTGTCCTGCCTTTTCT	从枯草芽孢杆菌基因组中扩增 MalA 启动子
Pglv.rev	CGGGGTACCATGACGACCTCCTTGATAAAT TTTACAATTCCATTTA	从枯草芽孢杆菌基因组中扩增 MalA 启动子
pDG-vali-s	GGATTTGAGCGTAGCGAAAAATCC	菌落 PCR 验证引物
pDG-vali-a	CGGGCATGGCACTCTTGAAAAAG	菌落 PCR 验证引物
pMATE-int-vector.for	GAGAAGTCTCGTCCGACAGTTGG	从 pDL 扩增 pMATE-int 整合型 质粒骨架
pMATE-int-vector.rev	AATTATCCCCCTAGCTAATTTTCGTTTAAT TATAAATTAAGTTAAAA	从 pDL 扩增 pMATE-int 整合型 质粒骨架
superMCS-insert.for	ATTAGCTAGGGGGAATAATTATGGCTGGTG ACCACGTCGT	从 pSE420 扩增 superlinker 序列
superMCS-insert.rev	CTGTCGGAACGAGACTTCTCTCATCCGCC AAAACAG	从 pSE420 扩增 superlinker 序列
pMATE-rep-vector.for	CATATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGC	从 pMA5 扩增 pMATE-rep 整合 型质粒骨架
pMATE-rep-vector.rev	GTGTGCTCTGCGAGGCTG	从 pMA5 扩增 pMATE-rep 整合 型质粒骨架
PmalA-insert.for	CGCGGATCCCTTTTGTCCTGCCTTTTCT	扩增 MalA 启动子突变体
PmalA-insert.rev	CGGGGTACCATGACGACCTCCTTGATAAAT TTTACAATTCCATTTA	扩增 MalA 启动子突变体

[0035] 实施例1缺失启动子序列并携带绿色荧光蛋白GFP的pDG载体的构建。

[0036] 以枯草芽孢杆菌中常用的整合型质粒pDL(BGSC,USA)为骨架,利用CPEC PCR cloning方法(Nature Protocols,6,242-251,2011,doi:10.1038/nprot.2010.181)将pDL质粒上的bgaB基因替换为GFP基因,具体方法为在pDL质粒的bgaB基因上下游分别设计引物pDG-vector.for/pDG-vector.rev反向PCR扩增pDL质粒,同时设计引物gfp-insert.for/gfp-insert.rev从pSG1729质粒(BGSC,USA)上PCR扩增gfp基因,其中gfp-insert.for/gfp-insert.rev引物的5'末端分别带有pDL质粒目的插入位点两侧20bp的同源序列。将扩增得

到的gfp插入片段和pDL载体片段切胶回收后,按照摩尔比1:1的比例添加到PCR体系中进行PCR反应,所得的PCR产物直接转化大肠杆菌,利用氨苄青霉素抗性筛选阳性转化子,提取质粒后送金唯智公司进行测序鉴定,测序正确的质粒命名为pDG,图谱结果见图2,图6为pDG质粒的构建流程。

[0037] 实施例2来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子的Ma1A启动子的分离与鉴定。

[0038] (一)来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子的Ma1A启动子的分离。

[0039] 采用Tiangen的细菌染色体提取试剂盒(Beijing,China)分离提取枯草芽孢杆菌1A751的染色体DNA。使用引物Pglv.for/Pglv.rev从枯草芽孢杆菌1A751的染色体DNA中通过PCR扩增获得yfiA与Ma1A基因间约340bp的DNA片段。将此片段通过BanHI/KpnI位点克隆于所述的pDG质粒绿色荧光蛋白GFP基因的上游,获得了携带有来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子的pDG质粒,命名为pDG-G1。

[0040] (二)麦芽糖操纵子Ma1A启动子的结构鉴定。

[0041] 根据测序所得的Ma1A启动子序列SEQ ID NO:1,利用在线原核生物启动子预测分析软件BPROM(V.Solovyev,A Salamov,2011,Nova Science Publishers,p.61-78)对Ma1A启动子进行分析,分别标注出启动子序列中-35区、-10区、核糖体结合位点RBS以及cre元件,结果显示于图1。

[0042] (三)麦芽糖操纵子Ma1A启动子中转录激活因子Ma1R结合位点序列的鉴定。

[0043] 来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子的转录起始有赖于诱导物麦芽糖和转录激活因子Ma1R的同时存在,转录激活因子Ma1R结合启动子DNA序列后激活启动子的转录活性,若启动子缺失了与转录激活因子Ma1R的结合序列,则启动子转录活性无法激活。为了定位枯草芽孢杆菌麦芽糖操纵子Ma1A启动子中转录激活因子的结合位点序列,根据实验2中Ma1A启动子序列结构的分析结果,在pDG-G1质粒的基础上,从启动子序列起始处至-35区序列之前,以18bp为单位分别缺失此区域间的启动子序列,构建启动子缺失突变体,转化枯草芽孢杆菌1A751并通过检测培养后菌体的荧光强度,判断缺失DNA序列对Ma1A启动子转录激活能力的影响,若缺失后菌体无荧光信号,则说明此片段包含转录激活因子的结合位点,从而确定转录激活因子Ma1R在Ma1A启动子上的结合位点序列。最终获得的转录激活因子Ma1R在Ma1A启动子的结合位点序列见SEQ ID NO:2。

[0044] 实施例3整合型表达载体pMATE-int的构建。

[0045] 构建了含有来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子或其突变体的,能够整合在枯草芽孢杆菌基因组amyE基因位点的整合型表达载体并命名为pMATE-int。构建方法为:以pDL质粒(BGSC,USA)为基础,以KpnI和BamHI切割来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子或其突变体DNA片段并连入pDL质粒。使用寡核苷酸pMATE-int-vector.for/pMATE-int-vector.rev和superMCS-insert.for/superMCS-insert.rev分别扩增质粒骨架和插入片段,以实施例1中的CPEC PCR cloning方法将质粒上的bgaB基因替换为来源于pSE420质粒的多克隆位点superMCS片段,构建出整合型表达载体pMATE-int,质粒图谱见图3,质粒构建过程见图6,所使用的寡核苷酸如表1所示。

[0046] 实施例4复制型表达载体pMATE-rep的构建。

[0047] 构建了含有来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子或其突变体的,能够在枯草芽孢杆菌和大肠杆菌中复制的穿梭表达载体并命名为pMATE-rep。构建方法为:以带

有pUB110复制子的pMA5质粒为骨架,利用寡核苷酸pMATE-rep-vector.for/pMATE-rep-vector.rev和Pma1A-insert.for/Pma1A-insert.rev分别扩增质粒骨架和来源于枯草芽孢杆菌麦芽糖操纵子Ma1A启动子或其突变体的插入片段,以实施例1中的CPEC PCR cloning方法将Ma1A启动子插入pMA5载体中。同时按照实施例3中的方法,将来源于pSE420质粒的多克隆位点superMCS片段插入Ma1A启动子或其突变体后,构建出复制型表达载体pMATE-rep,质粒图谱见图3,质粒构建过程见图6,所使用的寡核苷酸如表1所示。

[0048] 实施例5来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子的突变体筛选。

[0049] 以实施例1中的pDG载体为基础,通过定点突变或随机突变构建来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子的突变体文库,转化枯草芽孢杆菌后通过检测启动子诱导表达的绿色荧光蛋白基因gfp来评价Ma1A启动子突变体转录活性的高低。具体方法为,利用定点突变技术(Stratagene, USA)设计定点突变引物或简并引物,针对Ma1A启动子的-35区、-15区、-10区、RBS区、cre区、转录激活因子结合位点(operator)区域进行定点突变或简并引物随机突变PCR,构建带有不同质粒文库,所用到的寡核苷酸如表2所示。

[0050] 将获得的定点突变质粒以PstI限制性内切酶酶切线性化后转化枯草芽孢杆菌1A751,利用带有氯霉素抗性的LB固体培养基平板进行筛选,所获得的转化子经过PCR验证正确后保存。经划线培养活化后挑取单克隆接种于含有0.5mL培养基的96孔深孔板中进行过夜发酵。次日,吸取5 μ L过夜培养物分别接种于不含/含有1%(w/w)麦芽糖诱导物的新鲜LB培养基中进行发酵,而后以携带未突变的Ma1A启动子的GFP表达菌株作为对照,进行荧光强度的测定,测定结果见图4A。

[0051] 将获得的简并引物随机突变质粒文库转化大肠杆菌DH5 α 并涂布于抗性平板,培养后利用细胞刮子将平板上的菌落刮下并重悬于新鲜LB培养基中进行培养,而后提取带有不同Ma1A启动子突变体的pDG混合质粒,PstI限制性内切酶酶切线性化后转化枯草芽孢杆菌1A751,利用带有氯霉素抗性的LB固体培养基平板进行筛选,得到单拷贝整合于枯草芽孢杆菌基因组上的受不同Ma1A启动子突变体诱导的GFP表达菌株。将此GFP表达菌株经含有1%(w/w)麦芽糖诱导物的LB培养活化后,取1mL新鲜菌液于4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心2分钟收集菌体,以磷酸盐缓冲溶液PBS重悬洗涤菌体3次,用等体积PBS缓冲液重悬后稀释50倍,利用流式细胞仪(Beckman, USA)进行FACS单细胞绿色荧光分选,选取RFU荧光值最高的1%细胞进行收集。将收集到的细胞重复上述FACS分选过程2次以获得稳定的受不同Ma1A启动子突变体诱导的GFP表达菌株。将此单细胞菌株接种于含有150 μ L新鲜LB培养基的96孔板(Corning, USA)中过夜培养,次日,吸取5 μ L过夜培养物分别接种于不含/含有1%(w/w)麦芽糖诱导物的新鲜LB培养基中进行发酵,而后以携带未突变的Ma1A启动子的GFP表达菌株作为对照,进行荧光强度的测定。根据测定结果选取荧光强度明显增高的15株菌株,提取基因组扩增Ma1A启动子片段序列进行测序,以获得突变序列的位点信息,将此15个Ma1A启动子命名为^{mut01}Pma1A-^{mut015}Pma1A。荧光强度测定结果见图4B, Ma1A启动子突变体的序列见SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:17。

[0052] 表2

[0053]

寡核苷酸名称	序列	用途
MUT-Lib-01.for	CAGACATAAGGCAAATGADWAHTTTYCRYHTW TGGGAAAAAACACTAAAGTTGATC	对 MalA 启动子 operator 区域进行突变
MUT-Lib-01.rev	GATCAACTTTAGTGTTTTTTCCCAWADARYGRRAA ADTWHTCATTTCCTTATGTCTG	对 MalA 启动子 operator 区域进行突变
MUT-Lib-02.for	CAGACATAAGGCAAATGAGAAATTTYCNNNNN NGDDAAAAAACACTAAAGTTGATC	对 MalA 启动子 operator 区域进行突变
MUT-Lib-02.rev	GATCAACTTTAGTGTTTTTTHHCNNNNNNNGRRAA ATTTCTCATTTCCTTATGTCTG	对 MalA 启动子 operator 区域进行突变
MUT-1.for	CATGAGATAGCTCGTCCTGTCAAACGTTTGGCGC	对 MalA 启动子-35 区域进行突变
MUT-1.rev	CCCATAGAGCGGGAAATTTCCCATTTGCCTTA	对 MalA 启动子-35 区域进行突变
MUT-2.for	CTCATGGTATAATTGGAATTGTAAAATTTATC	对 MalA 启动子-10 区域进行突变
MUT-2.rev	AGTGTTTTTTCCCAAAAAGCGGGAAATTTCTCA	对 MalA 启动子-10 区域进行突变
MUT-3.for	CGAGCTATCTTRTGGTATAATTGGAATTGT	对 MalA 启动子-35,-10 区域进行突变
MUT-3.rev	ACAATTCCAATTATACCAYAAGATAGCTCG	对 MalA 启动子-35,-10 区域进行突变
MUT-4.for	GCGCCAAACGTTGACAGGGACGAGCTATCTCATG	对 MalA 启动子-35 区域进行突变
MUT-4.rev	CATGAGATAGCTCGTCCCTGTCAAACGTTTGGCGC	对 MalA 启动子-35 区域进行突变

[0054]

MUT-5.for	GTAAAATTTATCAAAGGAGGTCGTCATGGTACCT	对 MalA 启动子 RBS 区域进行突变
MUT-5.rev	AGGTACCATGACGACCTCCTTTGATAAATTTTAC	对 MalA 启动子 RBS 区域进行突变
MUT-6.for	GCTATCTCATGWTATAATTGGAATTG	对 MalA 启动子-10 区域进行突变
MUT-6.rev	CAATTCCAATTATAWCATGAGATAGC	对 MalA 启动子-10 区域进行突变
MUT-7.for	CTCATGGTATAATWWWHWYGTA AAAATTTATCAA GG	对 MalA 启动子-10 区域进行突变
MUT-7.rev	CCTTGATAAATTTTACRWDWWWATTATACCATG AG	对 MalA 启动子-10 区域进行突变
MUT-8.for	GGTATAAATGGAATTATAAAATTTATCAAGGAG	对 MalA 启动子-10,RBS 区域进行突变
MUT-8.rev	CTCCTTGATAAATTTTATAATTCCATTTATACC	对 MalA 启动子-10,RBS 区域进行突变
MUT-9.for	GGTATAAATGGAATTGRAAAAATTTATCAAGGAG	对 MalA 启动子-10,RBS 区域进行突变
MUT-9.rev	CTCCTTGATAAATTTTYCAATTCCATTTATACC	对 MalA 启动子-10,RBS 区域进行突变

[0055] 实施例6来源于枯草芽孢杆菌的麦芽糖操纵子Ma1A启动子的转录强度优化。

[0056] 根据文献(Yamamoto,H.,et al.Journal of bacteriology 183(17):5110-5121.2001)报道,通过突变枯草芽孢杆菌麦芽糖操纵子的Ma1A启动子cre元件的第六位和第七位核苷酸(即枯草芽孢杆菌Ma1A启动子序列的315和316位)的“CG”为“AT”,可以部分解除在葡萄糖存在下对麦芽糖Ma1A启动子转录活性的抑制效应。此外,根据实施例5中针对Ma1A启动子的-35区、-15区、-10区、RBS区域的点突变实验结果,具有-10区A303T突变的启动子在保持严谨性的同时提高了转录强度,因此利用点突变技术,将上述C315A、G316T和A303T突变引入pDG质粒,构建出pDG2基础突变质粒。根据流式细胞仪FACS 筛选结果,其中有15株携带有枯草芽孢杆菌麦芽糖操纵子Ma1A启动子突变子pDG质粒的菌株具有明显增高的荧光强度,测序后获得了其麦芽糖操纵子Ma1A启动子突变位点信息(序列见SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:17)。结果表明,突变位点主要发生在启动子的209、210、212、216、217、219-225位、227和228位,特别的,当突变为G209T、A210T、A212T、C216T、C217T、G219M、C220K、C222T和A224T位点后突变子的转录强度明显增强。在pDG2质粒的基础上对上述突变位点进

行组合突变与荧光强度筛选,获得了具有更高转录强度的Ma1A启动子突变体,序列见SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:32。

[0057] 实施例7枯草芽孢杆菌表达宿主菌株的遗传改造与构建。

[0058] 利用前文所述的基因组无痕敲除法分别对枯草芽孢杆菌1A751基因组DNA中的Ma1A基因、Ma1A基因及其3'端一段类似于终止子的茎环结构(Ma1A-term)、Yvdk-Ma1L基因进行敲除,构建枯草芽孢杆菌基因敲除突变体MATE02-MATE06,其目的是增强菌体对麦芽糖诱导物的敏感性,延长麦芽糖诱导时间并减少麦芽糖诱导物用量。同时,以实施例3构建的整合性表达载体pMATE-int为基础,在多克隆位点后面处分别插入受枯草芽孢杆菌Ma1A启动子调控的Ma1R基因及Ma1R-Ma1P基因,并通过转化导入已构建的枯草芽孢表达1A751宿主菌中,利用带有氯霉素抗性的LB固体培养基平板进行筛选,所获得的转化子经过PCR验证正确后保存,获得遗传改造菌株MATE07-MATE018。同步的,以复制型表达载体pMA5为基础,在多克隆位点后面处分别插入受组成型HpaII启动子调控的Ma1R基因及Ma1R-Ma1P基因,构建pMA5R和pMA5RP并通过转化导入已构建的枯草芽孢表达宿主菌1A751中,利用带有卡那霉素抗性的LB固体培养基平板进行筛选,所获得的转化子经过PCR验证正确后保存,获得遗传改造菌株MATE019-MATE024。而后将实施例1中构建的携带GFP基因的pDG质粒整合至上述遗传改造菌株中,通过测量荧光强度评价不同基因的遗传改造对Ma1A启动子的转录效率影响。构建得到的芽孢杆菌遗传改造菌株如表3所示,所使用的寡核苷酸如表4所示,不同菌株的荧光强度对比图如图5所示。

[0059] 实施例8利用所述新型表达载体及表达宿主进行绿色荧光蛋白的发酵表达。

[0060] 以实施例5获得的15个枯草芽孢杆菌Ma1A启动子突变体为基础,按照实施例3的方法,构建带有以上突变启动子和绿色荧光蛋白GFP基因的pMATE-int整合型质粒,通过转化导入枯草芽孢杆菌1A751,利用带有氯霉素抗性的LB固体培养基平板进行筛选,得到单拷贝整合于枯草芽孢杆菌基因组的受不同Ma1A启动子突变体诱导的GFP表达菌株,所获得的转化子经过PCR验证正确后进行摇瓶发酵进行比较。菌株经划线培养活化后挑取单克隆接种于含有5mL LB液体培养基中培养12h后,以1%的接种量接种到25mL不含麦芽糖诱导物的发酵培养基中进行发酵,在OD600达到0.8时在发酵培养基中加入1%(w/w)麦芽糖诱导物进行诱导表达。SDS-PAGE结果如图8所示。在此基础上选取4株表达效果较好的菌株按照实施例4的方法构建带有突变启动子和绿色荧光蛋白GFP基因的pMATE-rep复制型质粒,通过转化导入枯草芽孢杆菌1A751,利用带有卡那霉素抗性的LB固体培养基平板进行筛选,所获得的转化子经过PCR验证正确后进行摇瓶发酵比较,发酵过程如上文所述。整个发酵过程以携带野生型Ma1A启动子的GFP表达菌株作为对照,每间隔24h取样进行SDS-PAGE测定,SDS-PAGE如图9所示,所使用的寡核苷酸如表4所示。

[0061] 表3

[0062]

菌株	基因型	来源
<i>B. subtilis</i>		
MATE01	1A751	BGSC
MATE02	1A751 Δ malA	本实验
MATE03	1A751 Δ (malA-term)	本实验
MATE04	1A751 Δ (malL-yvdk)	本实验
MATE05	1A751 Δ (malA-malL-yvdk)	本实验
MATE06	1A751 Δ (malA-term-malL-yvdk)	本实验
MATE07	1A751 with integration of pDG01 (amyE::malR);cat	本实验
MATE08	1A751 Δ malA, with integration of pDG01 (amyE::malR);cat	本实验
MATE09	1A751 Δ (malA-term), with integration of pDG01 (amyE::malR);cat	本实验
MATE010	1A751 Δ (malL-yvdk), with integration of pDG01 (amyE::malR);cat	本实验
MATE011	1A751 Δ (malA-malL-yvdk), with integration of pDG01 (amyE::malR);cat	本实验
MATE012	1A751 Δ (malA-term-malL-yvdk), with integration of pDG01 (amyE::malR);cat	本实验
MATE013	1A751 with integration of pDG02(amyE::malR-malP);cat	本实验
MATE014	1A751 Δ malA, with integration of pDG02 (amyE::MalR-malP);cat	本实验
MATE015	1A751 Δ (malA-term), with integration of pDG02 (amyE::MalR-malP);cat	本实验
MATE016	1A751 Δ (malL-yvdk), with integration of pDG02 (amyE::MalR-malP);cat	本实验
MATE017	1A751 Δ (malA-malL-yvdk), with integration of pDG02 (amyE::MalR-malP);cat	本实验

[0063]

MATE018	1A751 Δ (malA-term-malL-yvdk) with integration of pDG02 (amyE::MalR-malP);	本实验
MATE019	1A751 harboring pMA5R (P_{HpalI} -malR)	本实验
MATE020	1A751 Δ malA, harboring pMA5R (P_{HpalI} -malR)	本实验
MATE021	1A751 Δ (malA-term), harboring pMA5R (P_{HpalI} -malR)	本实验
MATE022	1A751 Δ (malL-yvdk), harboring pMA5R (P_{HpalI} -malR)	本实验
MATE023	1A751 Δ (malA-malL-yvdk), harboring pMA5R (P_{HpalI} -malR)	本实验
MATE024	1A751 Δ (malA-term-malL-yvdk), harboring pMA5R (P_{HpalI} -malR)	本实验
GFP00	1A751 harboring pMATER00(P_{malA} - gfp)	本实验
GFP01	1A751 harboring pMATER01($^{mut01}P_{malA}$ - gfp)	本实验
GFP02	1A751 harboring pMATER02($^{mut02}P_{malA}$ - gfp)	本实验
GFP03	1A751 harboring pMATER013($^{mut013}P_{malA}$ - gfp)	本实验
GFP04	1A751 harboring pMATER014($^{mut014}P_{malA}$ - gfp)	本实验
质粒	描述	来源
pMA5	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector, Apr, Kanr, P_{HpalI}	BGSC
pMA5R	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector, Apr, Kanr, P_{HpalI} -malR	本实验
pMA5RP	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector, Apr, Kanr, P_{HpalI} -malR-malP	本实验
pMATE00	pMA5 derivative, P_{HpalI} replaced by P_{malA}	本实验
pMATER00	pMATE00 with GFP ligated downstream of P_{malA}	本实验
pMATER01	pMATE00 with GFP ligated downstream of $^{mut01}P_{malA}$	本实验
pMATER02	pMATE00 with GFP ligated downstream of $^{mut02}P_{malA}$	本实验
3 pMATER01	pMATE00 with GFP ligated downstream of $^{mut013}P_{malA}$	本实验
4 pMATER01	pMATE00 with GFP ligated downstream of $^{mut014}P_{malA}$	本实验
pDL	Integration vector, Ap ^r , Cm ^r , bgaB	本实验
pDG	Integration vector, pDL derivative, bgaB replaced by gfp	本实验
pDG-G1	Integration vector, pDG derivative, P_{malA} inserted	本实验
pDG01	pDG-G1 derivative, P_{malA} -malR	本实验
pDG02	pDG-G1 derivative, P_{malA} -malR-malP	本实验

[0064] 表4

[0065]

寡核苷酸名称	序列	用途
MalA_UP.for	GTGTCCTGAGGAAAGTATTTTGAAACTTTT ATGTACC	扩增 MalA 基因上游同源臂
MalA_UP.rev	GTTTTGTGTTTTCATATGACGACCTCCTTGAT AACGTTTACAA	扩增 MalA 基因上游同源臂
MalA_DN.for	TCAAGGAGGTCGTCATATGAAACAACAAAA CGGCTTTACGC	扩增 MalA 基因下游同源臂
MalA_DN.rev	GCTTTAGTTGAAGATTAAGGCCATGCCACCAG TCT	扩增 MalA 基因下游同源臂
MalA_CR.for	TGGCATGGCCTTAATCTTCAACTAAAGCACCC ATTAGTTCAACA	扩增反向删选及抗性片段
MalA_CR.rev	GAAAATGGGGGAATTCATTATTCATTCAGT TTTCGTGCGGACT	扩增反向删选及抗性片段
MalA_G.for	CGAAAACCTGAATGAATAAATGAAATCCCCCA TTTTCGAATCTGIAAT	扩增待敲除 MalA 基因
MalA_Grev	AAATAAAGATGGCTCCGATGATGTTGGT	扩增待敲除 MalA 基因

[0066]

MalAT_UP.rev	TTCGAGCTGCATATGACGACCTCCTTGATAAC GTTTAC	扩增待敲除 MalA-Ter 基因
MalAT_DN.for	GAGGTTCGTCATATGCAGCTCGAAGAACTGATC AAT	扩增待敲除 MalA-Ter 基因
MalA_vali.for	GGCCCTGGAAATATCCAAGAGC	MalA 基因敲除验证引物
MalA_vali.rev	GGCAAGATCAACGATATACGATGC	MalA 基因敲除验证引物
YvdK-MalL_UP.for	GTATGGCGATCTATGATACCATG	扩增 YvdK-MalL 基因上游 同源臂
YvdK-MalL_UP.re v	CGGGAGGAAATGAAGCGGTCATTTTTGATTTA GAC	扩增 YvdK-MalL 基因上游 同源臂
YvdK-MalL_DN.fo r	AATGACCGCTTCATTTCCCTCCCGAATGTAAGT	扩增 YvdK-MalL 基因下游 同源臂
YvdK-MalL_DN.re v	AAAACCTGAATGAATAATACAAGCGCTTTGGGC	扩增 YvdK-MalL 基因下游 同源臂
YvdK-MalL_CR.fo r	TGGGCATTAGTATATGATCTTCAACTAAAGCA CCCATTAG	扩增反向删选及抗性片段
YvdK-MalL_CR.re v	CCCAAAGCGCTTGTATTATTCATTTCAGTTTTCG TGCG	扩增反向删选及抗性片段
YvdK-MalL_G.for	GGTGCTTTAGTTGAAGATCATATACTAATGCC ATCACAG	扩增待敲除 YvdK-MalL 基 因
YvdK-MalL_G.rev	ATGATAAATCAGCGGTTAITTTGAGATTG	扩增待敲除 YvdK-MalL 基 因
YvdK-MalL_vali.fo r	ATCGGTATGGCTGCGTCAATGGG	YvdK-MalL 基因敲除验证 引物
YvdK-MalL_vali.re v	AGGCGACAGTCACCAAGGCACAT	YvdK-MalL 基因敲除验证 引物
Bs-malR.for	GGTATGGGATCCATGCAGCTCGAAGAACTGAT C	从枯草芽孢杆菌扩增 MalR 基因
Bs-malR.rev	TTACGCGCTAGCCTACTCATTGTCATTTTTTC TGCCTC	从枯草芽孢杆菌扩增 MalR 基因
Bs-malRP.for	GGTCGCGGATCCATGCAGCTCGAAGAACTGA TC	从枯草芽孢杆菌扩增 MalR-MalP 基因
Bs-malRP.rev	TTACGAGCTAGCTTATTGATTCAATTTTTTTC CACACGCTC	从枯草芽孢杆菌扩增 MalR-MalP 基因
PMA5-PG-vali-a	AACCATCACCCATAATCAAGTTTT	菌落 PCR 验证引物
PMA5-PG-vali-s	ATTTTATTCTTGCTGAGTCTGGC	菌落 PCR 验证引物

SEQUENCE LISTING

- <110> 中国科学院天津工业生物技术研究所
- <120> 一种包含麦芽糖启动子的载体以及麦芽糖启动子突变
- <130> 2015
- <160> 32
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 335
- <212> DNA
- <213> Bacillus subtilis
- <400> 1
- cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
- aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
- gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
- ccaaatctct cagacataag gcaaatgaga aatttccgcg tctatgggaa aaaacactaa 240
- agttgatcaa atgacctaac tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
- aatggaattg taaacggtat caaggaggtc gtcac 335
- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Bacillus subtilis
- <400> 2
- gagaaatttc ccgctctatg ggaaaaa 27

<210>	3	
<211>	335	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	3	
	cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
	aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
	gtatattcac ttaaaattca cagttggtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
	ccaaatctct cagacataag gcaaatgatt aatttttcac tttttgggaa aaaacactaa	240
	agttgatcaa atgacctaa gtcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
	aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtc	335
<210>	4	
<211>	335	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	4	
	cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
	aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
	gtatattcac ttaaaattca cagttggtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
	ccaaatctct cagacataag gcaaatgatt attttttctg tctttgggaa aaaacactaa	240
	agttgatcaa atgacctaa gtcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
	aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtc	335

<210>	5	
<211>	335	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	5	
	cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
	aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
	gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
	ccaaatctct cagacataag gcaaatgatt attttttcga tctttgggaa aaaacactaa	240
	agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
	aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtc	335
<210>	6	
<211>	335	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	6	
	cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
	aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
	gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
	ccaaatctct cagacataag gcaaatgaga aatttttcca attctgggaa aaaacactaa	240
	agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
	aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtc	335

<210> 7
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 7
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagttgggtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgaat attttttctg tttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcatt 335

<210> 8
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 8
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagttgggtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgaga aatttttctt tcttggggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcatt 335

<210> 9

<211>	335	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	9	
	cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
	aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
	gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
	ccaaatctct cagacataag gcaaatgatt atttttctgt tctttgggaa aaaacactaa	240
	agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
	aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcac	335

<210>	10	
<211>	335	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	10	
	cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
	aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
	gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
	ccaaatctct cagacataag gcaaatgagt atttttctat tttttgggaa aaaacactaa	240
	agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
	aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcac	335

<210>	11	
<211>	335	

<212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 11
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgagt atttttccgt tctttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatgggata 300
 aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcatt 335

<210> 12
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 12
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgatt atttttccat tttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaaac gtgttacggg acgagctatc tcatgggata 300
 aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcatt 335

<210> 13
 <211> 335
 <212> DNA

<213> Bacillus subtilis

 <400> 13
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa gtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgaat actttctcgt ttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaac tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 aatggaattg taaacggtat caaggaggtc gtcac 335

<210> 14

<211> 335

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 14
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa gtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgata attttttcat ttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaac tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 aatggaattg taaacggtat caaggaggtc gtcac 335

<210> 15

<211> 335

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 15
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgaga aatTTTTcCG tgagcggtaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaG tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcAT 335

<210> 16
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 16
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgaga aatTTTTcCG attaggtgaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaG tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcAT 335

<210> 17
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 17
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgaga acttttcat ttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaac tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 aatggaattg taaacgttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 18
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 18
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgatt aattttcac ttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaac tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 19
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 19

cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
ccaaatctct cagacataag gcaaatgatt atttttcgt tctttgggaa aaaacactaa	240
agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gteat	335

<210> 20
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 20	
cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
gtatattcac ttaaaattca cagtttgtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
ccaaatctct cagacataag gcaaatgatt atttttcga tctttgggaa aaaacactaa	240
agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gteat	335

<210> 21
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 21	
cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60

aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
ccaaatctct cagacataag gcaaatgaga aatTTTTcca attctgggaa aaaacactaa 240
agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 22
<211> 335
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 22
cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
ccaaatctct cagacataag gcaaatgaat atTTTTctgt tttttgggaa aaaacactaa 240
agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 23
<211> 335
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 23
cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60

aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaa ggtaaaaaa	180
ccaaatctct cagacataag gcaaatgaga aatTTTTctt tcttgggaa aaaacactaa	240
agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtc	335

- <210> 24
- <211> 335
- <212> DNA
- <213> *Bacillus subtilis*

<400> 24	
cttttgcctc ctgcctttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaa ggtaaaaaa	180
ccaaatctct cagacataag gcaaatgatt atTTTTctt tcttgggaa aaaacactaa	240
agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtc	335

- <210> 25
- <211> 335
- <212> DNA
- <213> *Bacillus subtilis*

<400> 25	
cttttgcctc ctgcctttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat	60
aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120

gtatattcac ttaaaattca cagttggatga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgagt attttttcat tttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 26
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

<400> 26
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgatcc gaatcgtaaa aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagttggatga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaattctct cagacataag gcaaatgagt atttttccgt tttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300
 attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 27
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

<400> 27
 cttttgtccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgatcc gaatcgtaaa aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120

gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaactctct cagacataag gcaaattgatt atttttccat tttttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatgggtata 300
 attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 28

<211> 335

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 28

cttttgcacc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180
 ccaaactctct cagacataag gcaaattgatt actttctcgt tattttgggaa aaaacactaa 240
 agttgatcaa atgacctaaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatgggtata 300
 attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 29

<211> 335

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 29

cttttgcacc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60
 aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120
 gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180

ccaaatctct cagacataag gcaaatgata attttttcat tttttgggaa aaaacactaa 240

agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300

attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 30

<211> 335

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 30

cttttgcccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60

aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120

gtatattcac ttaaaattca cagttgggtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180

ccaaatctct cagacataag gcaaatgaga aatttttccg tgagcggtaa aaaacactaa 240

agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata 300

attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtcac 335

<210> 31

<211> 335

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 31

cttttgcccc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aaatgattat 60

aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc 120

gtatattcac ttaaaattca cagttgggtga gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa 180

ccaaatctct cagacataag gcaaatgaga aathttttcgg attaggtgaa aaaacactaa	240
agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtc	335
<210> 32	
<211> 335	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 32	
cttttgcctc ctgccttttc taaattcacg cacaattgga tgttttatat aatgattat	60
aaataattcg gcatgtatcc gaatcgtaca aaagaacctt tcataagaa ttggaagggc	120
gtatattcac ttaaaattca cagttgggta gactttaaga ttacaaaaaa ggtaaaaaaa	180
ccaaatctct cagacataag gcaaatgaga acthttttcat tatttgggaa aaaacactaa	240
agttgatcaa atgacctaag tgcgccaac gtgttacggg acgagctatc tcatggtata	300
attggaattg taaaatttat caaggaggtc gtc	335

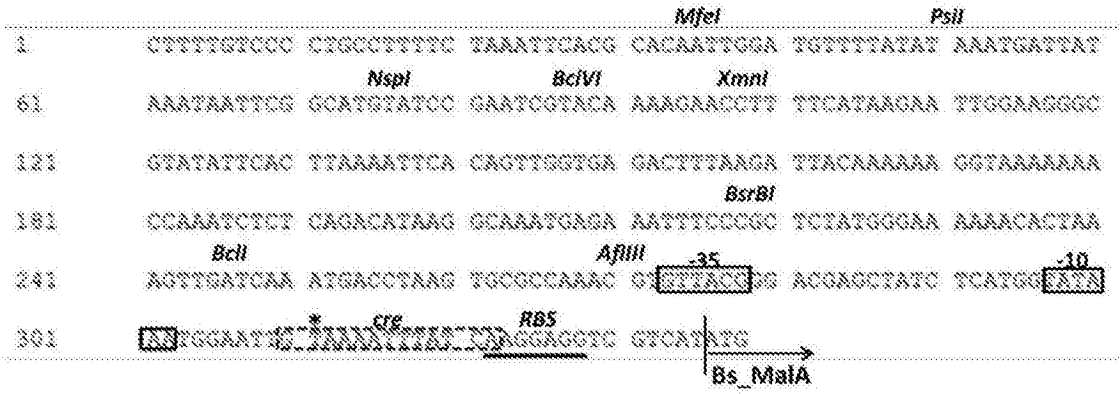


图1

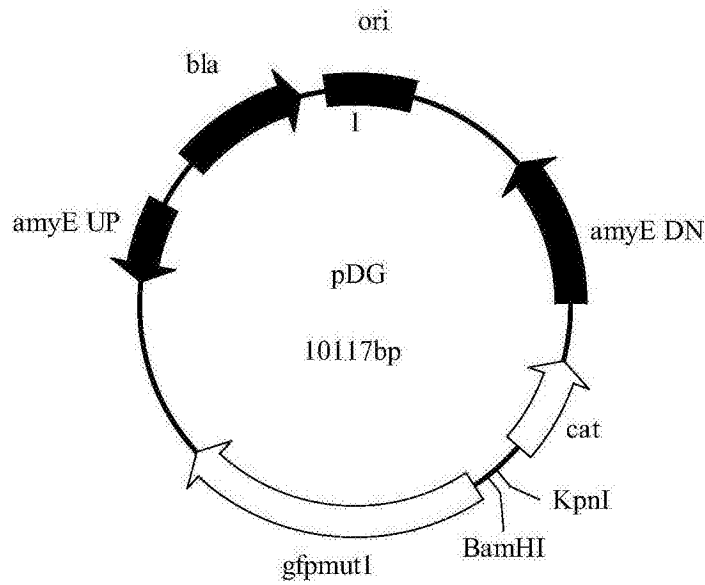


图2

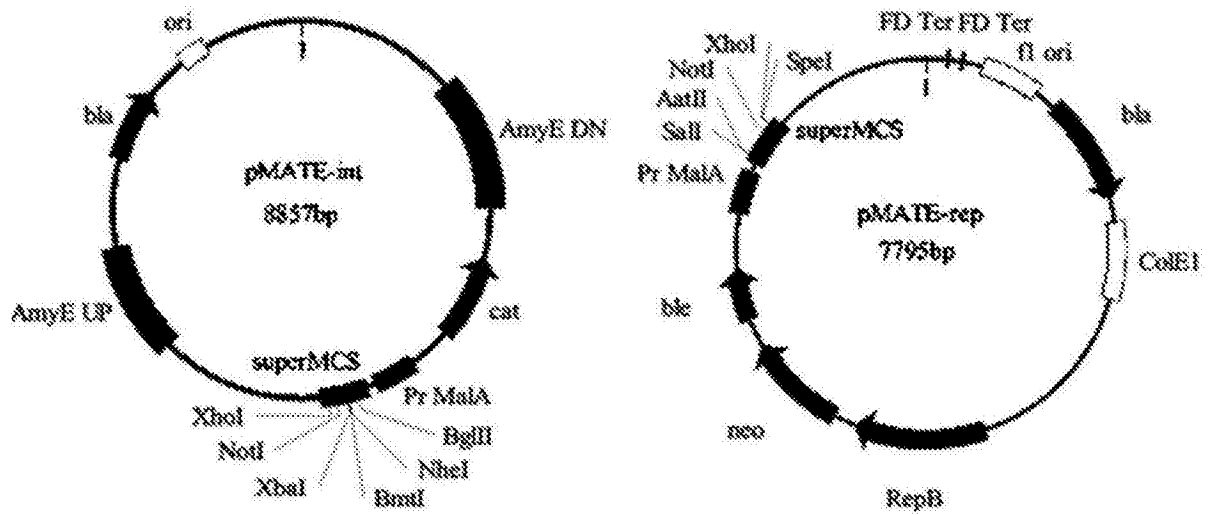


图3

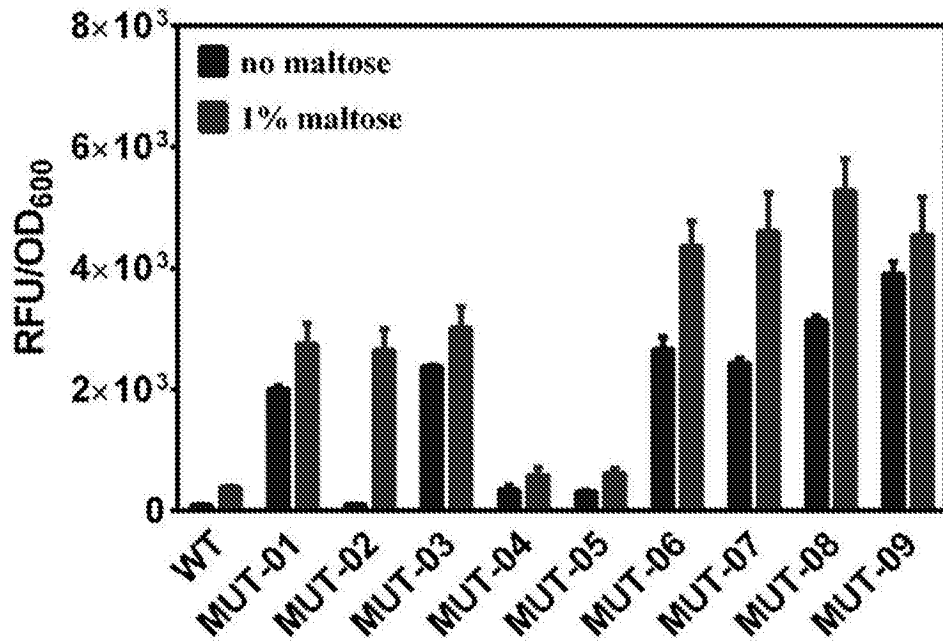


图4A

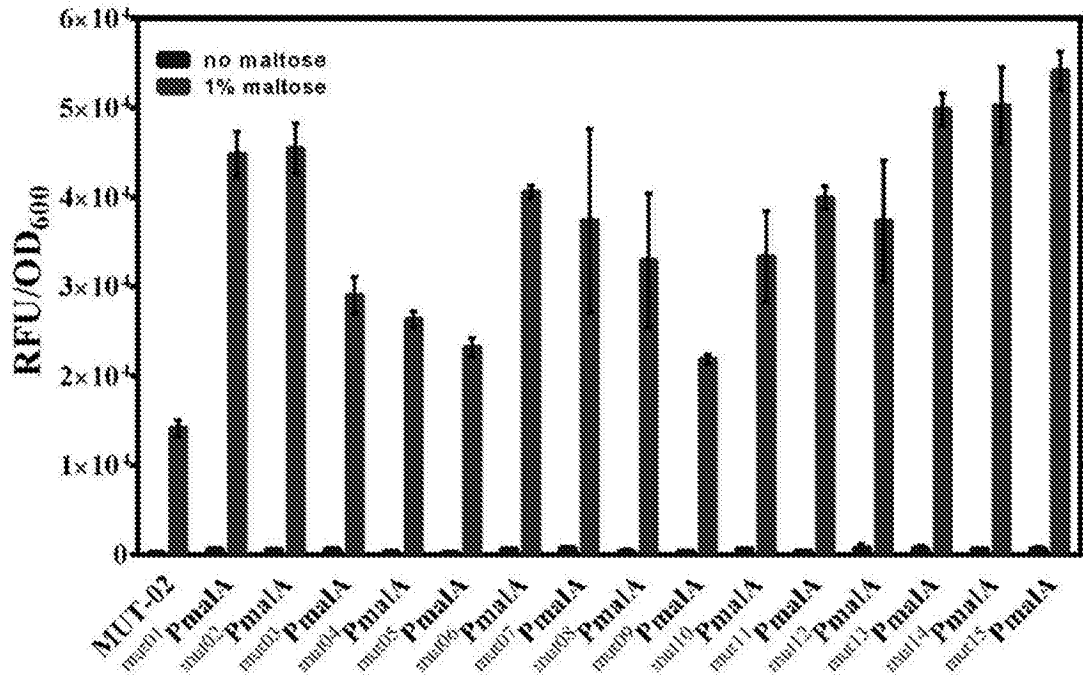


图4B

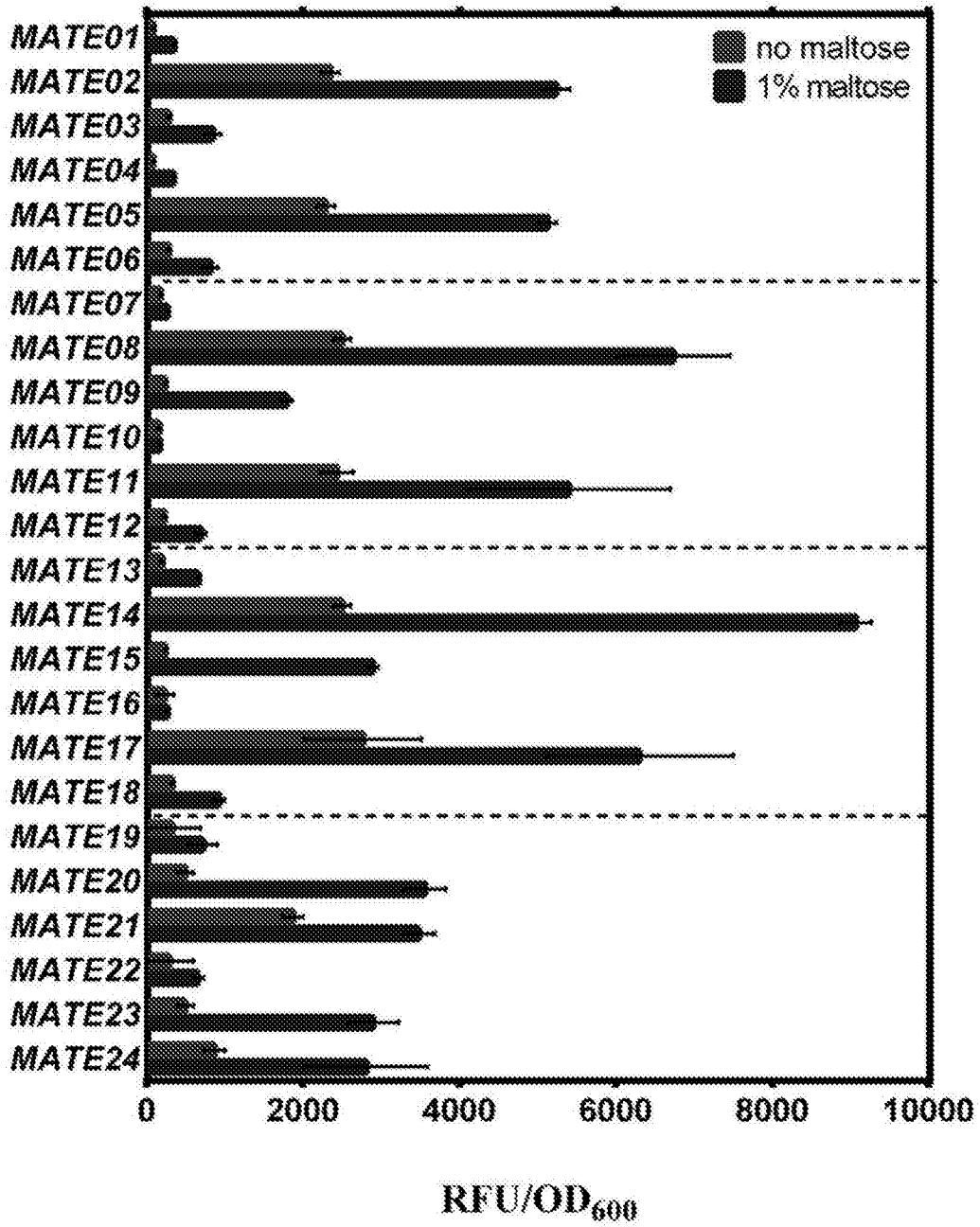


图5

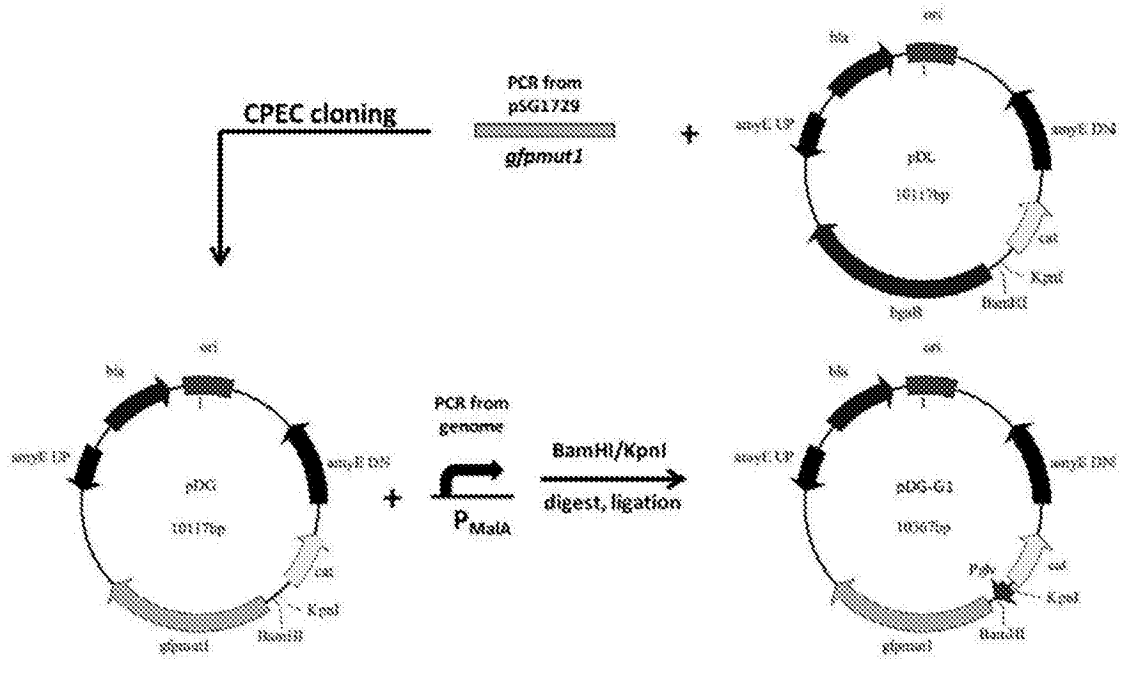


图6

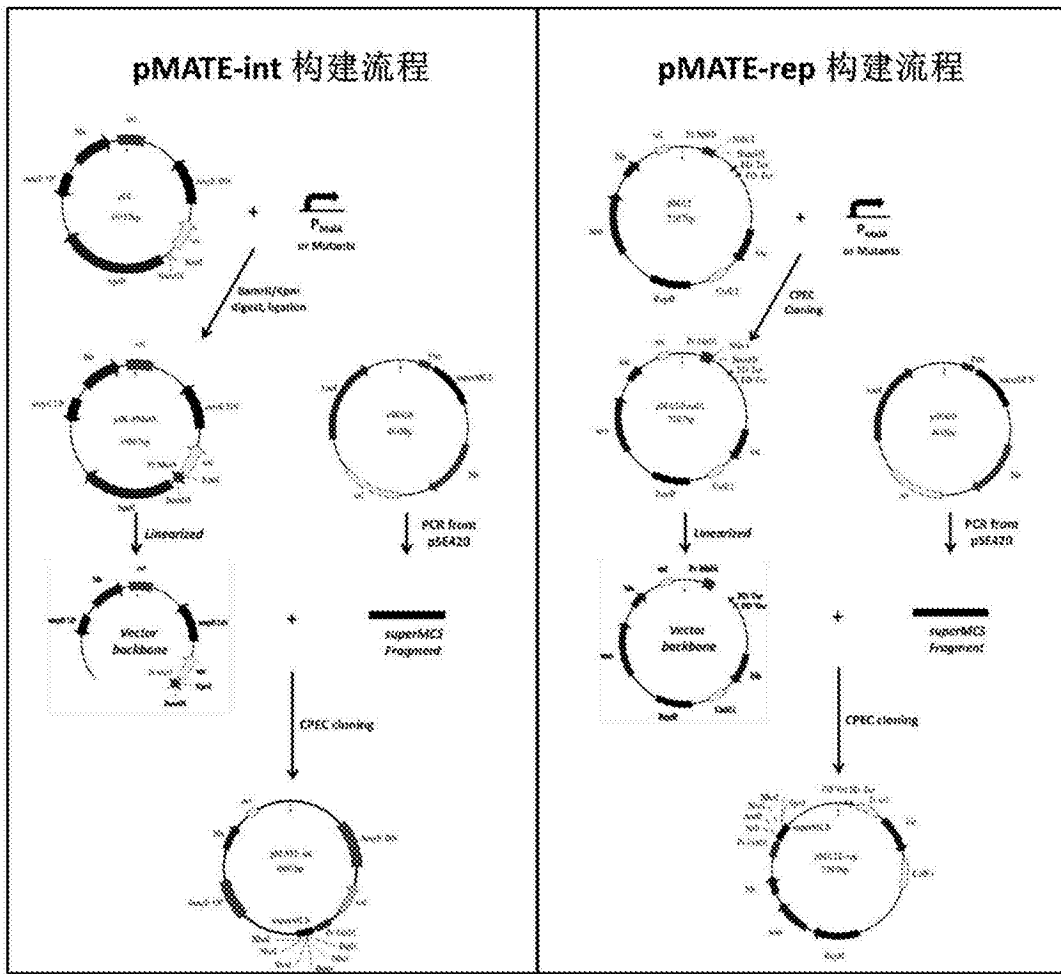


图7

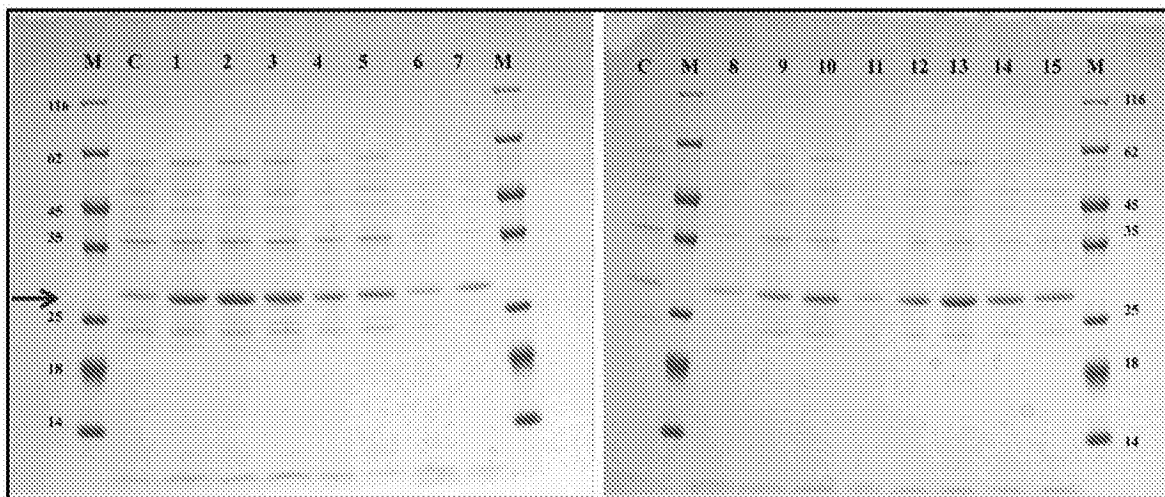


图8

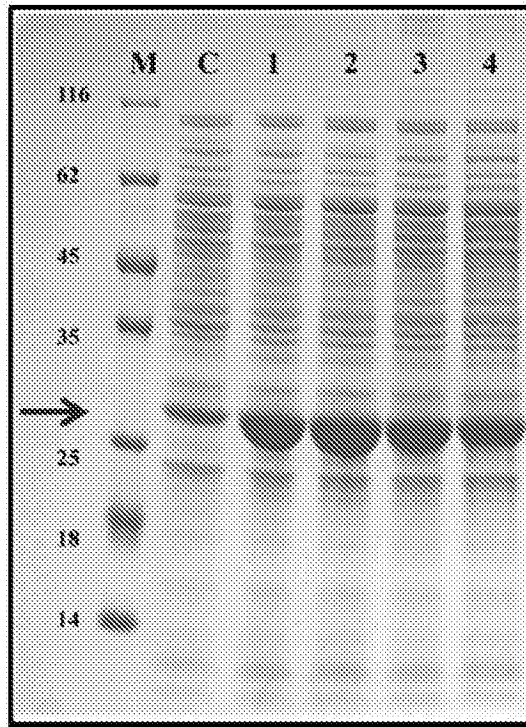


图9