



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105969675 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(21)申请号 201610308960.3

(22)申请日 2016.05.10

(71)申请人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路  
381号

(72)发明人 潘力 杨海燕 王斌

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有  
限公司 44245

代理人 罗观祥

(51) Int. Cl.

C12N 1/15(2006.01)

C12N 15/80(2006.01)

C12N 15/65(2006.01)

C12N 9/34(2006.01)

C12R 1/685(2006.01)

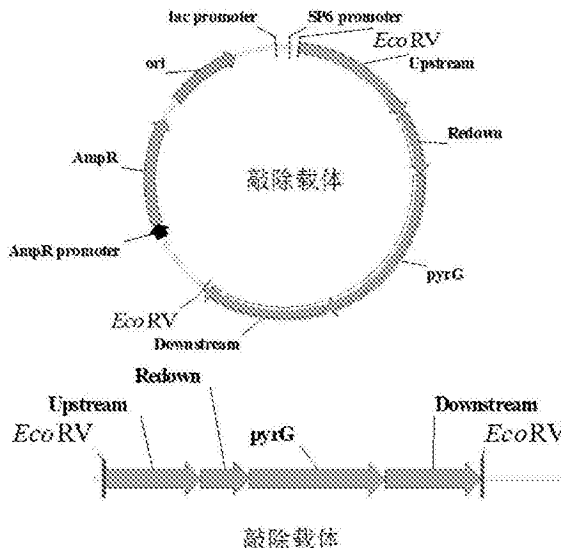
权利要求书2页 说明书12页  
序列表15页 附图5页

(54)发明名称

一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌及其构建与应用

(57)摘要

本发明公开了一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌及其构建与应用,属于生物技术领域。本发明的重组菌是通过失活 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因后得到的。本发明的实验证明,本发明通过对一株高产糖化酶的黑曲霉pyrG缺陷型Aspergillus niger SH-2:  $\Delta$  pyrG进行基因工程改造,失活基因agdB、agdA和agdE后,得到低转苷酶活性的新菌株,利用该菌株发酵生产的糖化酶与原始菌株相比,糖化酶酶活增加33%, $\alpha$ -葡萄糖转苷酶酶活降低43%以上,简化了从发酵液中去除转苷酶的分离纯化工艺,降低了生产成本,具有一定的创新性,有较强的开发意义。



1. 一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌,其特征在于:是对高产糖化酶的黑曲霉进行基因工程改造获得的重组菌;所述基因工程改造为失活所述高产糖化酶的黑曲霉中agdB、agdA、agdE、agdG、agdF、agdC和agdD中的至少一种;

所述基因agdB的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;所述基因agdA的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示;所述基因agdE的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;所述基因agdG的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;所述基因agdF的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示;所述基因agdC的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示;所述基因agdD的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示;

所述的高产糖化酶的黑曲霉为无孢黑曲霉(*Aspergillus niger*)SH-2经过敲除pyrG基因获得的pyrG缺陷型菌株,命名为黑曲霉SH-2:  $\Delta$ pyrG。

2. 根据权利要求1所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌,其特征在于:是对高产糖化酶的黑曲霉进行基因工程改造获得的重组菌;所述基因工程改造为失活所述高产糖化酶的黑曲霉中agdB,或失活所述高产糖化酶的黑曲霉中agdB、agdA和agdE,或失活agdB、agdA、agdE、agdG、agdF、agdC和agdD。

3. 根据权利要求1所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌,其特征在于:所述失活高产糖化酶的黑曲霉中的与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因为使该基因不能表达产物或者表达产物没有功能。

4. 权利要求1~3任一项所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌的构建方法,其特征在于:包括如下步骤:

失活高产糖化酶的黑曲霉中的所述与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因,得到的重组菌。

5. 根据权利要求4所述的构建方法,其特征在于:所述失活高产糖化酶的黑曲霉中的所述与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因具体通过同源重组实现。

6. 根据权利要求5所述的构建方法,其特征在于:

所述的同源重组包括如下步骤:

1) 构建敲除载体,该敲除载体的敲除表达框自上游至下游依次为Upstream-Redown-Selective marker-Downstream,其中Upsteam为待敲除基因5'侧翼区;Selective marker为筛选标记基因;Downstream为待敲除基因3'侧翼区;Redown为Downstream的5'端至少300bp的重复片段;所述待敲除基因5'侧翼区选自该待敲除基因5'侧翼区至少500bp的DNA片段;所述待敲除基因3'侧翼区选自该待敲除基因3'端至少500bp的DNA片段;

2) 将所述载体导入出发菌中,即得到同源重组菌;

3) 利用所述敲除载体的重复片段产生的基因交换现象,在含有5-氟乳清酸的平板上涂布同源重组菌,筛选得到不含有筛选标记基因的改造菌株,回收筛选标记基因,即得到所述重组菌。

7. 权利要求1~3任一项所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌在生产糖化酶中的应用。

8. 一种生产糖化酶的方法,其特征在于包括如下步骤:在淀粉发酵培养基中发酵培养权利要求1~3任一项所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌,离心收集发酵液,干燥后得到糖化酶粗酶制剂。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述淀粉发酵培养基中的玉米淀粉浓度为

5%~10%;

所述淀粉发酵培养基中的玉米浆浓度为1%~5%;

所述淀粉发酵培养基中的豆粕粉浓度为1%~3%。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其特征在于:所述的发酵培养的条件为在30℃,200~250rpm条件下培养6~8天。

## 一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌及其构建与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌及其构建与应用。

### 背景技术

[0002] 糖化酶,系统名为1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖葡萄糖水解酶(EC 3.2.1.3),又名葡糖淀粉酶,是一种外切型糖苷酶,能够催化淀粉或有关寡糖和多糖分子的非还原端释放出D-葡萄糖。在商业上,糖化酶常用于转化已由 $\alpha$ -淀粉酶部分水解为葡萄糖的玉米淀粉,是淀粉加工业的主要酶制剂。近年来,国内生产的糖化酶的活力和产量均取得了很大的进展,但是存在糖化酶中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶活性较高的问题。

[0003] 黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2是工业上常用的高产糖化酶菌株,其显著特点是不产孢子,进行无性繁殖,可以进行高密度液体发酵,高效地生产工业用糖化酶。而且,工业生产菌株无孢黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2已于2014年完成基因组测序、组装和注释,对其基因组和遗传学信息有了进一步了解。通过敲除pyrG基因得到的黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2的pyrG缺陷型*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG,可将pyrG基因作为筛选标记,简化了黑曲霉基因工程改造的筛选步骤,提高了黑曲霉基因工程改造菌的应用价值。

[0004] 工业上常常利用黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2深层液体发酵生产糖化酶,但是利用该菌株发酵生产的糖化酶中含有较高活性的 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶,该酶不仅具有水解活性,还具有转糖苷能力,生成的异麦芽糖或潘糖等非发酵性糖严重影响了糖化酶的质量。转苷酶产生的这些产物不能被糖化酶分解,同时,异麦芽糖的存在还阻碍了葡萄糖的结晶,严重影响了葡萄糖生产中最终产物的纯度和产率。而且工业上使用的去除糖化酶中的转苷酶的方法的效果均不理想,不仅增加了糖化酶发酵生产工艺的工序,还增加了糖化酶生产的成本,降低了工业生产效率。

[0005] 专利CN104962594A公开了一种黑曲霉,其特征是失活对糖化有害的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶agdB基因,将其生产的蛋白用于葡萄糖转化时,能显著提高DX值。但是该专利中没有记载将 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因agdB、agdA和agdE缺失后能有效提高糖化酶的活性。

### 发明内容

[0006] 为了克服现有技术中高产糖化酶的黑曲霉工业菌种发酵生产的糖化酶中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶活性较高的缺点与不足,本发明的目的在于提供一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌。本发明通过基因敲除技术改造该黑曲霉菌种,从源头上减少或不产 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶,避免了糖化酶纯化中去除 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶的工序,节省生产成本,提高生产效率。

[0007] 本发明的另一目的在于提供所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌的构建方法。

[0008] 本发明的再一目的在于提供所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌的应用。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现：

[0010] 一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌，是对高产糖化酶的黑曲霉进行基因工程改造获得的重组菌；所述基因工程改造为失活所述高产糖化酶的黑曲霉中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A(agdA)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E(agdE)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因G(agdG)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因F(agdF)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因C(agdC)和 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因D(agdD)中的至少一种；优选为至少2种；更优选为至少3种；最优选为3种。

[0011] 所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌，是对高产糖化酶的黑曲霉进行基因工程改造获得的重组菌；所述基因工程改造为失活所述高产糖化酶的黑曲霉中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)，或失活所述高产糖化酶的黑曲霉中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A(agdA)和 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E(agdE)，或失活 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A(agdA)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E(agdE)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因G(agdG)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因F(agdF)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因C(agdC)和 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因D(agdD)。优选地，所述基因工程改造为失活所述高产糖化酶的黑曲霉中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A(agdA)和 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E(agdE)，或失活 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A(agdA)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E(agdE)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因G(agdG)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因F(agdF)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因C(agdC)和 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因D(agdD)。更优选地，所述基因工程改造为失活所述高产糖化酶的黑曲霉中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A(agdA)和 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E(agdE)。

[0012] 所述基因agdB的核苷酸序列如序列表中的序列SEQ ID NO:1所示；所述基因agdA的核苷酸序列如序列表中的序列SEQ ID NO:2所示；所述基因agdE的核苷酸序列如序列表中的序列SEQ ID NO:3所示；所述基因agdG的核苷酸序列如序列表中的序列SEQ ID NO:4所示；所述基因agdF的核苷酸序列如序列表中的序列SEQ ID NO:5所示；所述基因agdC的核苷酸序列如序列表中的序列SEQ ID NO:6所示；所述基因agdD的核苷酸序列如序列表中的序列SEQ ID NO:7所示。

[0013] 所述的高产糖化酶的黑曲霉为无孢黑曲霉(*Aspergillus niger*)SH-2经过敲除pyrG基因获得的pyrG缺陷型菌株，命名为黑曲霉SH-2:  $\Delta$  pyrG，该菌株在文献“黑曲霉来源脯氨酰蛋白酶在无孢黑曲霉SH-2中表达的研究. 华南理工大学[D]. 2014”中被公开。具体步骤参照文献“黑曲霉来源脯氨酰蛋白酶在无孢黑曲霉SH-2中表达的研究. 华南理工大学[D]. 2014”。

[0014] 所述的无孢黑曲霉(*Aspergillus niger*)SH-2在文献“黑曲霉来源脯氨酰蛋白酶在无孢黑曲霉SH-2中表达的研究. 华南理工大学[D]. 2014”中被公开。

[0015] 上述重组菌中，所述失活高产糖化酶的黑曲霉中的与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因为删除各种所述基因的全部或者部分重要编码框，即敲除各种所述基因的全部或者部分重要编码框；以及其他一些方式，使该基因不能表达产物或者表达产物没有

功能。

[0016] 本发明所提供的黑曲霉改造菌株敲除了与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因,通过测定该改造菌株相较于野生型的转苷酶和糖化酶的相对酶活实现对该敲除菌株的评价。

[0017] 一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌的构建方法,包括如下步骤:失活高产糖化酶的黑曲霉中的所述与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因,得到的重组菌。

[0018] 所述失活高产糖化酶的黑曲霉中的所述与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因具体通过同源重组实现。

[0019] 所述与 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达相关的一个或多个基因为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B(agdB)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A(agdA)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E(agdE)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因G(agdG)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因F(agdF)、 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因C(agdC)和 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因D(agdD)中的至少一种。

[0020] 上述构建方法,所述的同源重组包括如下步骤:

[0021] 1)构建敲除载体,该敲除载体(如图1所示)的敲除表达框自上游至下游依次为Upstream-Redown-Selective marker-Downstream,其中Upsteam为待敲除基因5'侧翼区;Selective marker为筛选标记基因;Downstream为待敲除基因3'侧翼区;Redown为Downstream的5'端至少300bp的重复片段;所述待敲除基因5'侧翼区选自该待敲除基因5'侧翼区至少500bp的DNA片段;所述待敲除基因3'侧翼区选自该待敲除基因3'端至少500bp的DNA片段,该3'侧翼区可包含该待敲除基因的部分编码区。

[0022] 2)将所述载体导入出发菌中,即得到同源重组菌;

[0023] 3)利用所述敲除载体的重复片段产生的基因交换现象,在含有5-氟乳清酸的平板上涂布同源重组菌,筛选得到不含有筛选标记基因的改造菌株,回收筛选标记基因,即得到所述重组菌。

[0024] 在上述方法的步骤2)的出发菌为无孢黑曲霉(*Aspergillus niger*)SH-2经过敲除pyrG基因获得的pyrG缺陷型菌株,命名为黑曲霉SH-2:  $\Delta$  pyrG。

[0025] 上述构建方法中,所述的同源重组中,步骤1)的所述待敲除基因为基因agdB,步骤2)的出发菌为为无孢黑曲霉(*Aspergillus niger*)SH-2经过敲除pyrG基因获得的pyrG缺陷型菌株,命名为黑曲霉SH-2:  $\Delta$  pyrG;步骤2)得到同源重组菌为同源重组菌A(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  1(敲除基因agdB)),步骤3)得到重组菌为重组菌B(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB);具体如下:

[0026] 1)构建基因agdB敲除载体;

[0027] 2)将上述载体作为目标质粒通过PEG-原生质体转化法转入所述的高产糖化酶的黑曲霉的pyrG缺陷型黑曲霉SH-2:  $\Delta$  pyrG中,利用筛选标记pyrG筛选出同源重组菌A(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  1(敲除基因agdB));

[0028] 3)利用设计的500bp左右的重复片段及其5-氟乳清酸筛选平板,回收筛选标记基因pyrG,得到重组菌B(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB)。

[0029] 上述构建方法中,所述的同源重组中,步骤1)的所述待敲除基因为基因agdA,步骤2)的出发菌为所述的重组菌B(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB);步骤2)得到同源

重组菌为同源重组菌C(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta 2$ (敲除基因agdB和agdA));步骤3)得到重组菌为重组菌D(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA);具体如下:

[0030] 1)构建基因agdB敲除载体;

[0031] 2)将上述载体作为目标质粒通过PEG-原生质体转化法转入重组菌B(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB)中,利用筛选标记pyrG筛选出同源重组菌C(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta 2$ (敲除基因agdB和agdA));

[0032] 3)利用设计的500bp左右的重复片段及其5-氟乳清酸筛选平板,回收筛选标记基因pyrG,得到重组菌D(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA)。

[0033] 上述构建方法中,所述的同源重组中,步骤1)的所述待敲除基因为基因agdE,步骤2)的出发菌为所述的重组菌D(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA),步骤2)得到同源重组菌为同源重组菌E(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta 3$ (敲除基因agdB、agdA和agdE)),步骤3)得到重组菌为重组菌F(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE);具体如下:

[0034] 1)构建基因agdE敲除载体;

[0035] 2)将上述载体作为目标质粒通过PEG-原生质体转化法转入重组菌D(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA)中,利用筛选标记pyrG筛选出同源重组菌E(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta 3$ (敲除基因agdB、agdA和agdE));

[0036] 3)利用设计的500bp左右的重复片段及其5-氟乳清酸筛选平板,回收筛选标记基因pyrG,得到重组菌F(*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE)。

[0037] 依次类推,这里就不一一赘述。

[0038] 为了实现上述没有表述的agdB、agdA、agdE、agdG、agdF、agdC和agdD中的至少一种的基因敲除重组菌的构建方法也是本发明的保护的范畴。

[0039] 所述的低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌在生产糖化酶中的应用。

[0040] 一种生产糖化酶的方法,包括如下步骤:在淀粉发酵培养基中发酵培养上述的重组菌,离心收集发酵液,干燥后得到糖化酶粗酶制剂。

[0041] 上述方法中,所述淀粉发酵培养基中的玉米淀粉浓度为5%~10%。

[0042] 上述方法中,所述淀粉发酵培养基中的玉米浆浓度为1%~5%。

[0043] 上述方法中,所述淀粉发酵培养基中的豆粕粉浓度为1%~3%。

[0044] 所述淀粉发酵培养基的成分包括5%~10%玉米淀粉、1%~5%玉米浆、1%~3%豆粕粉。

[0045] 所述的发酵培养的条件优选为在30℃,200~250rpm条件下培养6~8天。

[0046] 本发明相对于现有技术,具有如下的优点及效果:

[0047] 本发明的实验证明,本发明通过对一株高产糖化酶的黑曲霉pyrG缺陷型*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG进行基因工程改造,失活基因agdB、agdA和agdE后,得到低转苷酶活性的新菌株,利用该菌株发酵生产的糖化酶与原始菌株相比,糖化酶酶活增加33%, $\alpha$ -葡萄糖转苷酶酶活降低43%以上,简化了从发酵液中去除转苷酶的分离纯化工艺,降低了生产成本,具有一定的创新性,有较强的开发意义。

## 附图说明

[0048] 图1是构建的黑曲霉 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶基因敲除载体的结构示意图。

[0049] 图2是PCR和相对荧光定量PCR验证基因agdB敲除结果图;其中,M为DL1000DNA Marker;1为野生型Aspergillus niger SH-2;2为agdB敲除株Aspergillus niger SH-2:  $\Delta$  1(敲除基因agdB)。

[0050] 图3是PCR和相对荧光定量PCR验证基因agdA敲除结果图;其中,M为DL1000DNA Marker;1为野生型Aspergillus niger SH-2;2为agdA敲除株Aspergillus niger SH-2:  $\Delta$  2(敲除基因agdB和agdA)。

[0051] 图4是PCR和相对荧光定量PCR验证基因agdE敲除结果图;其中,M为DL1000DNA Marker;1为野生型Aspergillus niger SH-2;2为agdE敲除株Aspergillus niger SH-2:  $\Delta$  3(敲除基因agdB、agdA和agdE)。

[0052] 图5是PCR和相对荧光定量PCR验证基因agdG敲除结果图;其中,M为DL1000DNA Marker;1为野生型Aspergillus niger SH-2;2为agdG敲除株Aspergillus niger SH-2:  $\Delta$  4(敲除基因agdB、agdA、agdE和agdG)。

[0053] 图6是野生型Aspergillus niger SH-2和基因agdB敲除株Aspergillus niger SH-2:  $\Delta$  1(敲除基因agdB)摇瓶发酵液中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶酶活随发酵时间变化情况。

[0054] 图7是各个黑曲霉基因敲除株摇瓶发酵液中糖化酶的相对酶活测定结果图;其中,以野生型摇瓶发酵液中的糖化酶酶活作为100%。

[0055] 图8是各个黑曲霉基因敲除株摇瓶发酵液中 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶的相对酶活测定结果图;其中,以野生型摇瓶发酵液中的 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶酶活作为100%。

### 具体实施方式

[0056] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0057] 本文所述的术语“agdB”的全称为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因B;“agdA”的全称为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因A;“agdE”的全称为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因E;“agdG”的全称为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因G;“agdF”的全称为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因F;“agdC”的全称为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因C;“agdD”的全称为 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶表达基因D。

[0058] 本文所用的术语“敲除基因”是指通过将该基因的编码框全部或部分删除,达到失活该基因的目的。

[0059] 本文所用的术语“失活基因”是指通过删除全部或者部分编码框,以及其他一些方式,使该基因不能表达产物或者产物没有功能。

[0060] 本文所用的术语“侧翼区”是指目的基因编码框敲除部分5'端的上游序列或者3'端的下游序列。

[0061] 本发明的重组菌是在高产糖化酶的黑曲霉的基础上通过基因工程改造而获得的。基因工程操作的起始菌株可以是野生型黑曲霉,也可以是已经经过某些基因工程改造的重组黑曲霉。本领域技术人员可以理解,本发明的重组菌中还可以包含其他基因突变,以便获得某些性状。本领域技术人员可以根据现有技术的教导容易地引入此类突变。

[0062] 下面实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0063] 下面实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。



[0064] 下面实施例中所用酶制剂均购自Takara公司,质粒提取所用试剂盒购自广州捷倍斯生物科技有限公司,回收DNA片段所用试剂盒购自美国omega公司,相应的操作步骤按照产品说明书进行;所有培养基如无特殊说明均用去离子水配制。

[0065] 实施例1构建黑曲霉 $\alpha$ -葡萄糖转苷酶基因敲除载体

[0066] 以黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2基因组为模板,分别用引物Upstream-F与Upstream-R、Redown-F和Redown-R、Downstream-F和Downstream-R进行扩增,得到1000bp左右的Upstream片段(待敲除基因的上游同源臂)、500bp左右的Redown片段(待敲除基因的下游同源臂的部分重复序列)和1000bp左右的Downstream片段(待敲除基因的下游同源臂);以构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)基因组为模板,用引物对pyrG-F和pyrG-R扩增出1398bp的pyrG片段(如序列表中的序列SEQ ID NO:8所示),胶回收后以Upstream片段、Redown片段和pyrG片段为模板,以Upstream-F和pyrG-R为引物,进行PCR得到Upstream-Redown-pyrG融合PCR产物;再以胶回收得到的Upstream-Redown-pyrG片段和Downstream片段为模板,以Upstream-F和Downstream-R为引物进行PCR得到Upstream-Redown-pyrG-Downstream融合PCR产物。再将整个片段加A纯化后连接T-vector pMD™20(购自Takara公司),得到pMD20-Upstream-Redown-pyrG-Downstream质粒,构建好的质粒图谱见图1。该质粒在Upstream片段上游和Downstream片段下游5'端加上了EcoR V或者Bgl II等限制性酶切位点,以便线性化后用于原生质体转化。

[0067] 实施例2同源重组敲除目的基因的转化和筛选

[0068] 1、原生质体的制备:在CD液体培养基(葡萄糖2%;NaNO<sub>3</sub> 0.3%;KCl 0.2%;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.001%;琼脂糖0.05%;pH5.5;灭菌后加入1×尿嘧啶核苷)中培养黑曲霉菌丝,当菌体量足够时转移至YPD液体培养基(蛋白胨2%;酵母粉1%;葡萄糖2%;灭菌后加入1×尿嘧啶核苷)。用双层滤纸从培养液中过滤菌丝球并用0.8M NaCl洗涤,菌丝体滤干后转移至含有0.8M NaCl、1%纤维素酶(w/v)、0.2%溶壁酶(w/v)、1%蜗牛酶(w/v)和0.5%溶菌酶(w/v)的酶解液中。30℃,100rpm酶解1.5~3h。然后将含有原生质体的酶解液置于冰上,四层擦镜纸过滤后用5mL NaCl冲洗四次。滤液900×g,4℃离心10min后,弃上清;用20mL STC(10mM Tris-HCl;1.2M山梨醇;50mM CaCl<sub>2</sub>;pH7.5)重悬后,900×g,4℃离心10min,再用20mL STC重悬第二次,900×g,4℃离心10min后将得到的原生质体重悬于适量的STC溶液中。

[0069] 2、原生质体的转化:将10μg质粒即EcoR V等限制性内切酶线性化DNA片段加入到100μL原生质体悬浮液和60μL PEG溶液(10mM Tris-HCl;60%(w/v)PEG 4000;10mM CaCl<sub>2</sub>;pH7.5)中,混匀后冰上放置30min,再加入1.5mL PEG溶液,混匀,室温放置25min后加入到3mL STC和6mL软琼脂蔗糖高渗培养基(蔗糖40%;NaNO<sub>3</sub> 0.3%;KCl 0.2%;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.001%;琼脂糖0.5%;pH5.5)中,混合后铺平板(其中下层培养基中含2%琼脂),待平板凝固后放入30℃培养箱中培养。同时准备阳性对照和阴性对照组,其中阳性对照不加质粒,但加入1×尿嘧啶核苷;而阴性对照既不加质粒也不加入尿嘧啶核苷。平板在30℃培养箱中培养4~6天后在上层培养基长出的转化子即为阳性转化子。

[0070] 实施例3*Aspergillus niger* SH-2:Δ1和*Aspergillus niger* SH-2:ΔpyrGΔagdB菌株的构建及其功能鉴定(敲除基因agdB)

[0071] 一、*Aspergillus niger* SH-2:Δ1和*Aspergillus niger* SH-2:ΔpyrGΔagdB菌

## 株的构建

[0072] 1、构建敲除载体

[0073] (1) agdB基因敲除载体构建相关引物序列如下：

[0074]

引物名称	序列(5'→3')
Upstream(agdB)-F add EcoR V	gatatcTGCGCCTCAGTACTTGGGAG
Upstream(agdB)-R	<u>ccctgtcaatggcaa</u> ATCCCAGCTGGGTGGTCCCAGC
Redown(agdB)-F	<u>ccaccagctgggat</u> TTGCCATTGACAGGGTTAGTG
Redown(agdB)-R	<u>tctcgaggaagtgc</u> GCTCGCCGGTCTGGCTTTG
pyrG(agdB)-F	<u>gccagaccggcgagc</u> GCAACTTCCTCGAGAACGCGC
pyrG(agdB)-R	<u>cactaacctgtcaatggcaa</u> CCCTTTTAGTCAATACCG
Downstream(agdB)-F	<u>cggtattgactaaaagg</u> TTGCCATTGACAGGGTTAGTG
Downstream(agdB)-R add EcoR V	gatatcTACTTCAGCTTAAAGTTCACCG

[0075] 引物Upstream(agdB)-F和引物Downstream(agdB)-R斜体加粗部分为EcoR V酶切位点,其他引物序列下划线部分为重叠序列便于进行融合PCR。

[0076] (2)用上述基因agdB敲除所用引物扩增出目的片段后,按照实施例1所述载体构建方法构建基因agdB敲除载体。

[0077] 2、同源重组敲除目的基因agdB的转化和筛选

[0078] 将上述敲除载体通过PEG-原生质体转化方法转入无孢黑曲霉(*Aspergillus niger*)SH-2经过敲除pyrG基因获得的pyrG缺陷型菌株(命名为黑曲霉SH-2: Δ pyrG)中(具体方法如前所述),利用成功整合筛选标记基因pyrG的菌株能在不含尿嘧啶核苷的蔗糖高渗培养基上生长的特性筛选同源重组突变株。通过在基因agdB编码框敲除部分设计引物,分别进行PCR和相对荧光定量PCR验证是否成功敲除基因agdB,如图2所示,该图说明基因agdB已成功敲除,即得到成功敲除基因agdB的同源重组菌,命名为*Aspergillus niger* SH-2: Δ 1。

[0079] 3、筛选标记pyrG的回收利用

[0080] 通过设计500bp左右的同向重复片段,利用生物体自身存在的自交换机制,通过在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的CD固体培养基(葡萄糖2%,硝酸钠0.3%,KCl 0.2%,MgSO<sub>4</sub> 0.05%,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%,FeSO<sub>4</sub> 0.001%,Agar 1.5%,pH 5.5)中培养,利用5-氟乳清酸能抑制含有pyrG基因的菌株的生长,筛选出不含pyrG筛选标记的菌株,将该菌株用作下一步敲除的宿主菌。所以能在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的CD固体培养基上生长而在CD固体培养基上无法生长的菌株则为筛选得到的不含pyrG基因的目标菌株,得到成功敲除基因agdB的重组菌,命名为*Aspergillus niger* SH-2: Δ pyrG Δ agdB。

[0081] 二、*Aspergillus niger* SH-2: Δ 1菌株功能的鉴定

[0082] 1、摇瓶发酵

[0083] 挑选在CD固体培养基上验证正确且正常生长的单克隆,低速研磨后转接CD液体培养基,培养到足够菌体量后转接至装有100mL淀粉摇瓶发酵培养基(豆粕粉2%(w/v);玉米浆3%(w/v);玉米淀粉5%(w/v);pH5.5)的500mL三角瓶中,同时取野生型的黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2作为对照,30℃,250rpm培养,从第二天开始每隔24h取样,离心后

取发酵上清液测定转苷酶的活性,实验重复3次,实验结果见图6,由图可知,agdB敲除株发酵液中转苷酶酶活与野生型一样随着发酵时间的增长而增加,但由图可以看出agdB敲除株发酵液中转苷酶酶活始终低于野生株,且随着时间的增长,两者发酵液中转苷酶酶活差异越大,到第7天以后转苷酶酶活已经降到野生株的50%左右。取第6天的发酵上清液分别进行转苷酶和糖化酶酶活测定。

[0084] 2、糖化酶和转苷酶酶活测定

[0085] 糖化酶活力单位定义为:1mL酶液在40℃、pH4.6的条件下,1h分解可溶性淀粉产生1mg葡萄糖的酶量定义为1个酶活力单位。

[0086] 转苷酶活力单位定义:在37℃pH6.8条件下,每分钟水解对硝基苯基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷生成1 $\mu$ mol D-葡萄糖所需酶量定义为一个酶活力单位。

[0087] 利用DNS法(孙淑琴and邵冬梅(1997)比色法快速测定糖化酶活力新方法.河北省科学院学报,36-40)测定糖化酶酶活,相对酶活测定结果见表1和图7,由图可知,agdB敲除株糖化酶酶活为野生型的1.15倍左右;pNPG法(Toshitaka Minetoki et al.(1995) Nucleotide Sequence and Expression of  $\alpha$ -Glucosidase-encoding Gene(agdA)from *Aspergillus oryzae*.Biosci.Biotech.Biochem.,59(8),1516-1521)(方法略有改动)测定转苷酶酶活,转苷酶相对酶活见表1和图8,由图可知,agdB敲除株转苷酶酶活为野生型的64%左右,说明敲除基因agdB后,转苷酶酶活降低36%。

[0088] 上述重组菌*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB,与*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  1菌株的功能一致。

[0089] 实施例4*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  2和*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA菌株的构建及其功能鉴定(敲除基因agdB和agdA)

[0090] 一、*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  2和*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA菌株的构建

[0091] 1、构建敲除载体

[0092] (1)agdA基因敲除载体构建相关引物序列如下:

[0093]

引物名称	序列(5' $\rightarrow$ 3')
Upstream(agdA)-F add EcoR V	gatataCAGAGTCTGAGGCTCGCTGACGAT
Upstream(agdA)-R	<u>gccgccccagtggcc</u> GGCTCGCTTAAGGAGGCTCGAG
Redown(agdA)-F	<u>ctccttaagcgagcc</u> GGCCACTGGGGCGGCGACAAC
Redown(agdA)-R	<u>tctcgaggaagtgc</u> TCGTACCACACTTCGCCATGTCC
pyrG(agdA)-F	<u>cgaagtgtggtacga</u> GCAACTTCCTCGAGAACGCGCC
pyrG(agdA)-R	<u>gccgccccagtggcc</u> CCCTTTTAGTCAATACCGTTACACAT
Downstream(agdA)-F	<u>tattgactaaaagg</u> GGCCACTGGGGCGGCGACAAC
Downstream(agdA)-R add EcoR V	gatataCTACCATTCCAATACCCAGTTTTCC

[0094] 引物Upstream(agdA)-F和引物Downstream(agdA)-R斜体加粗部分为EcoR V酶切位点,其他引物序列下划线部分为重叠序列便于进行融合PCR。

[0095] (2)用上述基因agdA敲除所用引物扩增出目的片段后,按照实施例1所述载体构建方法构建基因agdA敲除载体。

[0096] 2、同源重组敲除目的基因agdA的转化和筛选

[0097] 将上述敲除载体通过PEG-原生质体转化方法转入黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB中(具体方法如前所述),利用成功整合筛选标记基因pyrG的菌株能在不含尿嘧啶核苷的蔗糖高渗培养基上生长的特性筛选同源重组突变株。通过在基因agdA编码框敲除部分设计引物,分别进行PCR和相对荧光定量PCR验证是否成功敲除基因agdA,如图3所示,该图说明基因agdA已成功敲除,即得到成功敲除基因agdA的同源重组菌,命名为*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  2。

[0098] 3、筛选标记pyrG的回收利用

[0099] 通过设计500bp左右的同向重复片段,利用生物体自身存在的自交换机制,通过在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的CD固体培养基(葡萄糖2%,硝酸钠0.3%,KCl 0.2%,MgSO<sub>4</sub> 0.05%,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%,FeSO<sub>4</sub> 0.001%,Agar 1.5%,pH 5.5)中培养,利用5-氟乳清酸能抑制含有pyrG基因的菌株的生长,筛选出不含pyrG筛选标记的菌株,将该菌株用作下一步敲除的宿主菌。所以能在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的CD固体培养基上生长而在CD固体培养基上无法生长的菌株则为筛选得到的不含pyrG基因的目标菌株,得到成功敲除基因agdA的重组菌,命名为*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA。

[0100] 二、*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  2菌株功能的鉴定

[0101] 1、摇瓶发酵

[0102] 挑选在CD固体培养基上验证正确且正常生长的单克隆,低速研磨后转接CD液体培养基,培养到足够菌体量后转接至装有100mL淀粉摇瓶发酵培养基(豆粕粉2%(w/v);玉米浆3%(w/v);玉米淀粉5%(w/v);pH5.5)的500mL三角瓶中,同时取野生型的黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2作为对照,30°C,250rpm培养6天,离心后取发酵上清液分别测定转苷酶和糖化酶的活性,实验重复3次。

[0103] 2、糖化酶和转苷酶酶活测定

[0104] 利用DNS法测定糖化酶酶活,相对酶活测定结果见表1和图7,由图可知,agdA敲除株糖化酶酶活为野生型的1.07倍;pNPG法测定转苷酶酶活,转苷酶相对酶活见表1和图8,由图可知,agdA敲除株转苷酶酶活为野生型的63%,说明在敲除基因agdB的基础上再将基因agdA进行敲除后,转苷酶酶活降低37%。

[0105] 上述重组菌*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA,与*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  2菌株的功能一致。

[0106] 实施例5*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  3和*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE菌株的构建及其功能鉴定(敲除基因agdB、agdA和agdE)

[0107] 一、*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  3和*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE菌株的构建

[0108] 1、构建敲除载体

[0109] (1)agdE基因敲除载体构建相关引物序列如下:

[0110]

引物名称	序列(5' → 3')
Upstream(agdE)-F add EcoR V	gatatcGGCCGGGGGAGCAGAGCTTCA
Upstream(agdE)-R	atagggatggaagcgGATGGGAGAGCTCAGTAGTCAATC

Redown(agdE)-F	<u>ctgagctctcccatc</u> CGCTTCCATCCCTATGGTTCTGAA
Redown(agdE)-R	tctcgaggaagt <u>tgc</u> CCGTATGCCGCTTCCGGCTCC
pyrG(agdE)-F	<u>gaaagcggcatacgg</u> GCAACTTCCTCGAGAACGCGCC
pyrG(agdE)-R	<u>atagggatggaagcg</u> CCCTTTAGTCAATACCGTTACACAT
Downstream(agdE)-F	<u>tattgactaaaagg</u> CGCTTCCATCCCTATGGTTCTGAA
Downstream(agdE)-R add EcoR V	gatatcCTAAA <u>ACTCAATCCGCCATGTCTTTC</u>

[0111] 引物Upstream(agdE)-F和引物Downstream(agdE)-R斜体加粗部分为EcoR V酶切位点,其他引物序列下划线部分为重叠序列便于进行融合PCR。

[0112] (2)用上述基因agdE敲除所用引物扩增出目的片段后,按照实施例1所述载体构建方法构建基因agdE敲除载体。

[0113] 2、同源重组敲除目的基因agdE的转化和筛选

[0114] 将上述敲除载体通过PEG-原生质体转化方法转入黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA中(具体方法如前所述),利用成功整合筛选标记基因pyrG的菌株能在不含尿嘧啶核苷的蔗糖高渗培养基上生长的特性筛选同源重组突变株。通过在基因agdE编码框敲除部分设计引物,分别进行PCR和荧光定量PCR验证是否成功敲除基因agdE,如图4所示,该图说明基因agdE已成功敲除,即得到成功敲除基因agdE的同源重组菌,命名为*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  3。

[0115] 3、筛选标记pyrG的回收利用

[0116] 通过设计500bp左右的同向重复片段,利用生物体自身存在的自交换机制,通过在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的CD固体培养基(葡萄糖2%,硝酸钠0.3%,KCl 0.2%,MgSO<sub>4</sub> 0.05%,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%,FeSO<sub>4</sub> 0.001%,Agar 1.5%,pH 5.5)中培养,利用5-氟乳清酸能抑制含有pyrG基因的菌株的生长,筛选出不含pyrG筛选标记的菌株,将该菌株用作下一步敲除的宿主菌。所以能在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的CD固体培养基上生长而在CD固体培养基上无法生长的菌株则为筛选得到的不含pyrG基因的目标菌株,得到成功敲除基因agdE的重组菌,命名为*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE。

[0117] 二、*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  3菌株功能的鉴定

[0118] 1、摇瓶发酵

[0119] 挑选在CD固体培养基上验证正确且正常生长的单克隆,低速研磨后转接CD液体培养基,培养到足够菌体量后转接至装有100mL淀粉摇瓶发酵培养基(豆粕粉2%(w/v);玉米浆3%(w/v);玉米淀粉5%(w/v);pH5.5)的500mL三角瓶中,同时取野生型的黑曲霉*Aspergillus niger* SH-2作为对照,30℃,250rpm培养6天,离心后取发酵上清液分别测定转苷酶和糖化酶的活性,实验重复3次。

[0120] 2、糖化酶和转苷酶酶活

[0121] 利用DNS法测定糖化酶酶活,相对酶活测定结果见表1和图7,由图可知,agdE敲除株糖化酶酶活为野生型的1.33倍;pNPG法测定转苷酶酶活,转苷酶比酶活见表1和图8,由图可知,agdE敲除株转苷酶酶活为野生型的57%,说明在敲除基因agdB和基因agdA基础上继续敲除基因agdE,转苷酶酶活降低43%。

[0122] 上述重组菌*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE,与*Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  3菌株的功能一致。

[0123] 实施例6 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$ 4和 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE  $\Delta$  agdG菌株的构建及其功能鉴定(敲除基因agdB、agdA、agdE和agdG)

[0124] agdG基因敲除载体构建相关引物序列如下:

[0125]

引物名称	序列(5' → 3')
Upstream(agdG)-F add EcoR V	gatatcCGGATATAGACTGACTTCGAGAAATT
Upstream(agdG)-R	<u>gtgtcttcgttggtg</u> CTTGGGCGAGAGTTTTGAAATCCTGT
Redown(agdG)-F	<u>aaactctcgcccaag</u> CACCAACGAAGACTCGCGCC
Redown(agdG)-R	<u>ctgcggcgcggttctc</u> gaggaagttgcAGACGGCACCCAATTCACCCCAG
pyrG(agdG)-F	GCAACTTCCTCGAGAACGCGCC
pyrG(agdG)-R	CCCTTTTAGTCAATACCGTTACACAT
Downstream(agdG)-F	<u>atgtgtaacggtattgactaaaagg</u> gCACCAACGAAGACTCGCGCC
Downstream(agdG)-R add EcoR V	gatatcTCACGCATACAGCACCGTTCCATT

[0126] 引物Upstream(agdG)-F和引物Downstream(agdG)-R斜体加粗部分为EcoR V酶切位点,其他引物序列下划线部分为重叠序列便于进行融合PCR。

[0127] 按照实施例1所述方法构建基因agdG的敲除载体,同源重组菌 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$ 4和重组菌 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE  $\Delta$  agdG的构建步骤见实施例3~5,其中同源重组菌 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$ 4构建的宿主菌为黑曲霉 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE,敲除结果由图5所示,该图说明基因agdG已成功敲除,即得到成功敲除基因agdG的同源重组菌,命名为 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$ 4;其发酵培养方式及转苷酶和糖化酶酶活测定方法见实施例3~5。

[0128] 利用DNS法测定糖化酶酶活,相对酶活测定结果见表1和图7,由图可知,agdG敲除株糖化酶酶活为野生型的1.22倍;pNPG法测定转苷酶酶活,转苷酶比酶活见表1和图8,由图可知,agdG敲除株转苷酶酶活为野生型的58%,说明在敲除基因agdB、agdA和agdE基础上继续敲除基因agdG,转苷酶酶活降低42%。

[0129] 上述重组菌 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$  pyrG  $\Delta$  agdB  $\Delta$  agdA  $\Delta$  agdE  $\Delta$  agdG,与 *Aspergillus niger* SH-2:  $\Delta$ 4菌株的功能一致。

[0130] 表1 *Aspergillus niger* SH-2, SH-2:  $\Delta$ 1, SH-2:  $\Delta$ 2, SH-2:  $\Delta$ 3和SH-2:  $\Delta$ 4摇瓶发酵对比实验结果

[0131]

菌株	SH-2	SH-2: $\Delta$ 1	SH-2: $\Delta$ 2	SH-2: $\Delta$ 3	SH-2: $\Delta$ 4
糖化酶酶活U/mL	19775	22823	21208	26314	24218
转苷酶酶活U/mL	0.0469	0.0298	0.0297	0.0265	0.0273

[0132] 由上述结果可知,转苷酶基因agdB、agdA、agdE和agdG敲除后,转苷酶酶活均有下降,其中SH-2:  $\Delta$ 3与SH-2:  $\Delta$ 1的差别在于敲除了基因agdA和agdE,结果显示SH-2:  $\Delta$ 1转苷酶酶活较野生型降低36%左右,糖化酶酶活较野生型升高了15%左右;而SH-2:  $\Delta$ 3转苷酶酶活较野生型降低43%左右,糖化酶酶活较野生型提高了33%左右;SH-2:  $\Delta$ 3相较于SH-2:  $\Delta$ 1与SH-2:  $\Delta$ 2,转苷酶酶活有所降低,糖化酶酶活有所增加。综合实验结果可知,SH-2:  $\Delta$ 3敲除菌株相较于其他敲除菌株的效果最好,不仅降低了转苷酶酶活,还提高了糖化酶的生产产量,有利于扩大该高产糖化酶黑曲霉的工业生产应用。

[0133] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

<110> 华南理工大学  
 <120> 一种低转苷酶背景的糖化酶高产菌基因敲除重组菌及其构建与应用  
 <130> 1  
 <160> 40  
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 2960  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> agdB 的核苷酸序列  
 <400> 1

```

atgaagtcac ggcttgctgt aatceggggt gatcccagag ccaacatcat aatgttgggg      60
tctttgcttt tactettacc ctttgtgggc gctgctgtea ttggaccag ggcaaacagt      120
cagagttgce cagggataaa ggcgtccaac gtccaaaagc aggctaggtc actgactgcg      180
gatctgaetc tagctggtac gccttgtaat agctatggca aggatttga agacctcaag      240
ctgcttggtg aatatcagac tggtagtggt tggcttggtg gaatcaagag ttectgacta      300
aatgcttgct cagatgaacg gttacatggt atgatctacg atgcegaega ggaagtctat      360
caagttectg aatcagtect tectcgcgtg gtagtgacg aggactetga ggacagtgtt      420
ttggaatttg actatgtgga agaaccgttt tcatteacca tctccaaggg agatgaggtc      480
ctgtttgact ctteggcacc accactagtt ttccagtcgc aatatgtgaa ccttcgcacc      540
tggttgcccg atgatcccta tgtgtatggt ctccgagagc attctgacce tatgcgcttg      600
ccaacataca attacacgcg gaccctttgg aaccgcgacg cgtatggcac tccaaacaac      660
accaacttgt acggtagtca tctgtctac tatgateacc gtggaaagtc cggaacttat      720
ggagtcttcc tgctgaactc taatggtatg gacatcaaga tcaacaaaac gacagatgga      780
aagcagtaet tgaatacaa tcttctcggc ggtgttetgg acttctactt cttctacgga      840
gaagatccta agcaagcgag catggaatac tcaaagattg tcgggtctcc ggcaatgcag      900
agttactgga cttteggcgt atgececcca ccccctaate ccataacagt ccgagttgta      960
tgctgactet tcagttccat caatgcegtt atggataecg cgatgtgtat gaacttgccg     1020
agggtggteta caactacagc caggcaaaga ttctcttgga gacgatgtgg acagatatcg     1080
actacatgga caagagaagg gtgtttacce ttgatcctca gaggttcccg ctcgaaaaga     1140
tgcgggagtt ggtaacctac ctgcacaate atgatcagca ttacattgtc atggttgacc     1200
cggctgtgag cgtaagcagt gactgacttg acgattcccc atccttgcaa ctttcagcta     1260
atggatactt tetagataac acggcatata tcaccggcgt gagagacgat gttttccttc     1320
acaatcagaa cggtagccta tacgagggta agtatataca catctcatat ctctcaaacac     1380
gagctaaaact atgcaggtgc tgtttggcct ggtgtcaetg ttttcccaga ctggttcaat     1440
gagggtactc aggattactg gactgcgcaa tttcaacagt tctttgatcc caagtccgga     1500
gtcgatattg acgcccgtgt gattgacatg aacgaagcct ccaatttctg ccttatect     1560
tgtctggacc cagcggcata cgcgatctcc gccgacctcc caccggcagc accacctggt     1620
cggccaagca gcccgatccc actgcccgga ttccccggg actttcagcc ttcgtctaa      1680
  
```



cgatctgta	aaagagegca	aggagataaa	gggaagaagg	ttgggttgcc	caatcgcaac	1740
ctcaactgacc	cgccctacac	cattcggaat	gcccaggtg	tccttagtat	gagcaactate	1800
gagacggate	tcattcatgc	gggtgaagg	tatgccgagt	atgatactca	caatctctat	1860
ggaacaagta	agtetttcaa	atatitgcat	agatgatttg	ccattgacag	ggttagtgat	1920
gagctetget	tcccgcacgg	ctatgcagge	ccgcccgecc	gatgtgagge	ctttggctat	1980
cactcgcagt	acgtttgcag	gegctggage	acacgtagga	cactggtaag	ttgaccgata	2040
gccttcgeta	gcacategct	gattcgtaca	ggctgggcga	caactttage	gattgggttc	2100
actaccggat	ctccatcgg	cagatcetet	ccctcgcgtc	catgttccag	attccaatgg	2160
tcggggctga	cggtgtgigg	tttggtagca	acacgacgga	ggaattgtgt	gcccgatggg	2220
cgtaacttgg	tgctttctat	acgttctacc	gcaatcataa	cgagctgggc	gacatatcgc	2280
aagagticta	ccgctggcct	acggttgccg	agtcccgcgg	taaggccatt	gacatccggt	2340
acaagctect	cgattatata	tacactgctc	ttcaccggca	aagccagacc	ggcgagccat	2400
tcctgcagcc	tcaattctac	ctgtaccctg	aggattcgaa	cacttttgcg	aacgaccggc	2460
agttcttcta	tggtgacgcc	cttcttctca	gccccgtgtt	gaatgagggg	tccacctcag	2520
tcgacgeata	cttcccggac	gacatcttct	acgatttgga	caacggggca	gtggtgcgtg	2580
ggcacggaga	aaacatacag	ctcagcaaca	tcaacatac	ccacatecct	ctgcacatcc	2640
gcggtgaaa	tatcatacct	gtcaggacat	ccagcggcat	gacaaccact	gaggttcgta	2700
agcagggett	cgagctgate	atcgcgccag	acttggatga	caccgcatcg	ggcagctctat	2760
atthgatga	tggagactcg	ttgaaccctg	catctgtgac	agagctcgag	ttcacgtaca	2820
gcaaagggga	gttgcaegt	aagggtacat	tcggacagaa	ggccgtcccc	aaggtggaga	2880
aatgtacctt	gctggggaag	tcagcacgga	cgttcaagg	ctttgcactc	gatgcgcgg	2940
tgaactttaa	gctgaagtag					2960

[0002]

- <210> 2  
 <211> 3124  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> agdA 的核苷酸序列  
 <400> 2

atggtgaagt	tgacgcatct	cettgccaga	gcattggett	tcctctggc	ttatggagcg	60
agccagteac	tcttatccac	caetgcccct	tcgcagecgc	agtttaccat	tcctgcttcc	120
gcagatgtcg	gtgcgcagct	gattgccaac	atcgatgata	ctcagcctgc	cgacgcgcag	180
teggtttgtc	cgggctacaa	ggtttcaaaa	gtgcageaca	atcaccgtgg	attcaactgcc	240
agtcttcagc	tcgcgggcag	gccatgtaac	gtatacggca	cagatgttga	gtccttgaca	300
ctgtctgtgg	agtaccagga	ttcggatcga	ctgaatatct	agattctccc	cactcatggt	360
gactccacaa	acgcttcttg	gtactttctt	teggaaaacc	tggtccccag	acccaagget	420
tcctcaatg	catctgtatc	ccagagcgc	ctttttgtgt	catggtaaaa	tgaccgctcg	480
ttcaatttca	aggtgatccg	aaaggctaca	ggcgacgcgc	ttttcagtac	agaaggcaact	540
gtgctcgtat	atgagaatca	gttcacatgaa	tttgtgaccg	cgtcccctga	agaatataac	600
ttgtatggcc	ttggggagca	tatcacgcaa	ttccgcctcc	agagaaatgc	taacttgacc	660
atatatcctt	cggatgatgg	aacacctatt	gaccagtgag	tactgatata	cggccgtat	720
cttctgggtc	tactcttgaa	acttactcgt	cctagaaaacc	tctacggcca	acatcccttc	780
tatctggata	caagatatta	caaaggagat	aggcagaatg	ggtcttatat	tcctgtcaaa	840
agcagcgagg	ctgatgcctc	gcaagattat	atctccctct	ctcatggcgt	gtttctgagg	900
aactctcatg	gacttgagat	actctcctcg	tctcaaaaat	tgatctggcg	gaccttaggt	960

ggaggaatcg	atctcacctt	ctactcagge	cccgecccg	ccgatgttac	caggcaatat	1020
cttaccagea	ctgtgggatt	accggccatg	cagcaataca	acaactcttg	attccacca	1080
tgctgittgg	gctacaacaa	ctggctggat	ctggcggacg	ttgttgcgaa	ctttgagaag	1140
tttgagatcc	cgttggaata	tatctggtgc	gtattgtact	ggtttatggt	atctcaaaac	1200
agtctaacag	gcacttagga	ccgatattga	ctacatgcac	ggatatcgca	actttgacaa	1260
cgatcaacat	cgtttttcct	acagtgagg	cgatgaattt	ctcagcaagc	tacatgagag	1320
tggacgctac	tatgtacce	ttgttgatgc	ggcgtcttac	attcetaatc	ccgaaaatgc	1380
ctctgatgcg	taagtgtcta	gtgacaaatt	atattactgc	ctgtatgcta	attagcgata	1440
cagatacget	acgtatgaca	gaggagctgc	ggacgacgct	ttcctcaaga	atcccgatgg	1500
tagcctctat	attggagccg	tttggccagg	atatacagtc	ttcccggatt	ggcatcatcc	1560
caaggcagtt	gactttctgg	ctaacgaget	tgttatctgg	tcaagaaag	tggcgttcga	1620
tggtgtgtgg	tacgacatgt	ctgaagtctc	atccttctgt	gtcgggagct	gtggcacagg	1680
taacctgact	ctgaaccggg	cacacccttc	gtttcttctc	cccggtgagc	ctggtgatat	1740
catatatgat	taccagagg	ctttcaatat	caccaacgct	acagaggcgg	cgtcagcttc	1800
ggcgggaget	tccagteagg	ctgcagcaac	cgcgaccacc	acgtcgactt	cggtatcata	1860
tctgaggaca	acgcccacgc	ctgggtctcg	caatgttgag	caccaccctt	atgtgatcaa	1920
ccatgaccaa	gaaggccatg	atctcagtgt	ccatgcggtg	tcgccaatg	caacgcgatg	1980
tgatggtgtt	gaggagtatg	atgtgcacgg	tctctacgga	catcaaggat	tgaacgctac	2040
ctaccaaggt	ctgcttgagg	tctggtctca	taagcggcgg	ccatttatta	ttggccgctc	2100
aaccttccgt	ggctctggca	aatgggcagg	ccactggggc	ggcgacaact	attccaaatg	2160
gtggtccatg	tactactcca	tctcgcaage	cctctccttc	tcactttctg	gcattccgat	2220
gtttggtgcg	gacacctgtg	ggtttaacgg	aaactccgat	gaggagctct	gcAACCGATG	2280
gatgcaactg	tccgcattct	tcccattcta	ccgaaaccac	aatgagctct	ccacaatecc	2340
acaggagcct	tatcggtggg	cttctgttat	tgaagcaacc	aagtccgcca	tgagaattcg	2400
gtacgccatc	ctaccttact	tttatacgtt	gtttgacctg	gccacacca	eggctccac	2460
tgtaatgccc	gcactttcct	gggaattccc	taatgaccca	acattggetg	cggttgagac	2520
teaattcatg	gttgggcccg	ccatcatggt	ggtcccggta	ttggagcctc	tggtcaatac	2580
ggtcaagggc	gtattcccag	gagttggaca	tggcgaagtg	tggtacgatt	ggtacacca	2640
ggetgcagtt	gatgcgaage	ceggggctca	cacgaccatt	tcggcaccat	tgggccacat	2700
cccagtttat	gtacgaggtg	gaaacatctt	gccgatgcaa	gagccggcat	tgaccactcg	2760
tgaagcccgg	caaaccctgt	gggctttgct	agetgcacta	ggaagcaatg	gaaccgctc	2820
ggggcagctc	tatctegatg	atggagagag	catctacccc	aatgccacce	tccatgtgga	2880
cttcacggca	tcgcggtcaa	gcctgctgct	gtcggctcaa	ggaagatgga	aagagaggaa	2940
cccgttget	aatgtgaegg	tgetcggagt	gaacaaggag	ccctctgegg	tgaacctgaa	3000
tggacaggcc	gtatttcccg	ggtctgtcac	gtacaattct	acgtcccagg	ttctctttgt	3060
tggggggctg	caanaactga	cgaagggcgg	cgcattggcg	gaaaactggg	tattggaatg	3120
gtag						3124
<210>	3					
<211>	3010					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	agdE 的核苷酸序列					
<400>	3					
atggccggaa	ctcggccaat	gtccaaccgt	tggaccctac	tgctgtcttt	ggtgatecta	60

ctcggatgcc	ttgtcatecc	eggaggtaag	ccatccaat	cacaetceta	ctggtgagge	120
tctccttgac	atctaacaat	gacgcatagt	caccgtgaaa	cacgagaact	tcaagacatg	180
ttctcaateg	ggctttetgta	agcggaacag	agcatttegcc	gacgatgctg	ccgcccaagg	240
ttcctectgg	gcctccccat	acgaactega	ctcctctec	atccagttca	aggatggcca	300
attgcacgga	accatttetea	agtccgtctc	ccccaacgag	aaagteaage	tgcctctcgt	360
tgtctcttctc	ctcgagtcgc	gcgccgccc	agttgttgte	gatgaggaaa	agcgcatagaa	420
cggtgacatc	cagcttcgac	acgatagcaa	agcagcgaag	gaacgetaca	atgaggcaga	480
gaaatgggtg	ttggttggtg	gcctggagtt	gagcaaaacc	gcgaccttga	gacctgaaac	540
cgagtctggc	tttaccagag	tcttgtacgg	tccggacaac	cagttcgagg	ctgtcatccg	600
ccacgcccc	ttfagegcgc	acttcaagag	ggatggccaa	acccaegtte	aattgaacaa	660
caagggttac	cttaacatgg	agcattggcg	ccctaaggta	gaggtcgaag	gcgagggcga	720
gcagcaaac	caggaagatg	aaagcacttg	gtgggatgag	agctttggtg	gaaacacgga	780
caccaagccc	aggggtcccg	agagtgtggg	attggatate	accttccctg	getaaagca	840
tgtttttgga	attcctgagc	atgetgactc	tctctctta	aaggaaactc	ggtaaactag	900
tgcgcagtg	acattttcca	tctgcagaa	ctgacagcgt	cccagaggtg	gtgaagggaa	960
tcacgaagag	ccctaccgca	tgtacaatgc	ggatgtattt	gagtaggagc	tgagcagttc	1020
catgaccttg	tatggtgcta	ttccattcat	gcaggcacat	cgcaaggact	ccaccgtcgg	1080
tgtctctctg	ctgaatgetg	cagagacctg	ggtggacatt	gtcaagteta	cctcatctcc	1140
taacctctt	gctctcggcg	tgggcgcac	cactgacacc	cagagtcatt	ggttttcgga	1200
gtccggccag	ctcgacgtgt	tcgttttct	tggtcttacc	ccacaggaaa	tcagcaagac	1260
ctatggtgaa	ctcaccgget	acactcagtt	gcctcaacat	tttgcattg	cttatcacca	1320
gtgccgctgg	aactacatca	ctgatgagga	tgtcaaggag	gtcgategca	actttgacaa	1380
gtaccagatc	ccctacgatg	tcactctggt	ggacatcgaa	tataccgatg	acagaaagta	1440
tttcaactgg	gatccaactca	gtttccccga	tccgatcagc	atggaggagc	agctcagatg	1500
gtcggagcgc	aaactcgtcg	ttatcattga	ccgcacatc	aagaaccagg	acaagtacag	1560
catcgtccaa	gaaatgaaga	gcaaaagact	ggccactaag	aacaaggagc	gtgagateta	1620
cgacgggtgg	tgtttgctg	gctcttctca	ctggatcgat	accttcaacc	ccgccccat	1680
caaatggtgg	gtcagcttat	teaagtttga	caagttcaag	gggacgctgt	ccaatgtctt	1740
catttggaac	gacatgaacg	agccctcgg	tttcaacggt	cccgaacca	cgatgcccc	1800
ggataacctt	catcatggca	actgggagca	ccgtgacatc	cataacgttc	atggaatcac	1860
ctgggtcaat	gccacctacg	atgcccttct	agagcgcgaag	aagggcgaga	tcctcggccc	1920
tttcaattctg	acacggteat	attatgctgg	tgtcaacgg	atgtctgcta	tgtggacggg	1980
tgataaccag	gctacttggg	aacacttggc	cgcttccatc	ccatggttc	tgaacaaccg	2040
cattgcgggc	ttccccttg	ccggtgctga	cggtggcggt	ttcttccaga	accctagcaa	2100
ggagctcttg	accagatggt	accaagctgg	tatttggtae	cccttcttcc	gggcccacgc	2160
gcatattgac	acgcgcccga	gagagccgta	tctgattgce	gagccacacc	ggtctatcat	2220
ctcccagget	atccgctga	ggtatcaget	tctccccgcc	tggtacactg	ccttccacga	2280
agcttccgtg	aacggaatgc	cgatcgtgag	gcgcagtagc	taegctcacc	cttgggatga	2340
ggctggett	gccattgacg	accagcttta	tctcgctcc	accggtcttc	ttgctaagcc	2400
tgttctctcc	gaggaggcca	ccacggccga	catttaacct	gctgacgacg	aaaagtaeta	2460
tgaactctt	gactacaccg	tctaccagg	agccggaaag	cggcatacgg	tgcctgctcc	2520
tatggagact	gtgccattge	tgatgcagg	tggccatgta	atccccgca	aggaccgtcc	2580
tcgccgcagt	agcgccttga	tgagatggga	tccgtacact	cttgttggg	tcttggataa	2640
gaacggtaaa	gccgatgget	ctctctacgt	ggatgacggt	gagacgttcg	actatgagcg	2700
tggagcttat	atccaccgce	gtttccgctt	ccaggagtct	gccctggtct	cggaggatgt	2760
tggcaccaaag	ggtcctaaga	cggccgagta	cttgaagacc	atggccaacg	ttcgtgttga	2820

[0004]

	gcgggtggtg gtagttgatc ctectaagga atggcagggt aagaccagtg tgactgtcat	2880
	tgaggatgga gcttcggcgg cttecgacage ctctatgcag taccacagcc ageccgatgg	2940
	caaggccgca tatgcggtgg tgaagaacce caatgtcggc attggaaaga catggcggat	3000
	tgagttttag	3010
	<210> 4	
	<211> 2356	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> agdG 的核苷酸序列	
	<400> 4	
	atgccgtcaa cttatttggg ageccitggcg acgctggcgg tttttccctg ettggggcag	60
	gcccggtaaa cctggcccct gggcagtgga ctggagctgt cctaccaagc aagccaacat	120
	cagatctcca tccaccaaga caaccagacc atctttctca ceatecccg ccagcccttc	180
	ctcagtgeca gcgccggaaa ggaccagttt gtcgaggata gcggcaactt caacatcacc	240
	aacgtgaacc aggcaagatg cegaggccag aacatcacc agctggcggg tatecctcgt	300
	agcgacagtg tgaagaacca ggtagctgtt cgcggttatc ttctggattg eggtagggag	360
	gacattgcat atggcatgaa cttttgggtc ccaagaagat tctcggatcg cgttgccctt	420
	gaagcctctg ttgacteaga agcaaatgce agcgtgcccg tgcaccgtct ctatctcacc	480
	ttcgcgtcgc acgcgctgga ggaattttac ggtctcggcg cgcaggcgtc cttecgcttc	540
	atgaagaacc gatccattcc catcttctcc cgcgagcagg gtgtcggacg tggtagccag	600
[0005]	ccatacacgg ctatcgagga ctcgcagggc ttcttcagcg gcggtgatca gtacactact	660
	tatacggcca tccctcagta cgtcagctcc gacggtcggg tcttctatct cgatgagaat	720
	gacacggcct atgccgtctt cgacttcagc cgetcggatg ctgtcaeggt gcgctacgat	780
	agtctctcag tgcattggca tctgatgcag getgatacca tgcctggacc taccaccatg	840
	ctcaccagat acaactggtg catgcccacc cttccggaat gggtaggaca eggcgcactg	900
	ctgggcaacc agggaggaca agagaaggte aaccggattg tgaagcaggg ttttagcac	960
	gactgtccgg tcgcccgtgt gtggttgcaa gactgggtgag tggeccactt cctacctgag	1020
	ttcactatca ctaatggacc aaaggtcggg cacgcactct cagtcagccc cctatggcaa	1080
	catgaacatc tcacgtttgt ggtggaactg ggagtcagac acttegtctgt atcccacatg	1140
	ggctgagttt gtgcagacgc tgcgcgaaca gcacggcgtt cgcaccctcg cctatgtgaa	1200
	ccccttctg gccaacgtca gcagcaagtc agatggctac cgcgtaatc ttttccttga	1260
	agccagccag caccgetaca tgggtgcagaa caccaccact aactctacgg caateatete	1320
	cagcggcaag ggcategatg ccgcatcctt ggacctcacc aacgaagaca ctcgcgcctg	1380
	gttcgcgac gtccttgca cgcagggtgt gacgcgcaac atctccggtt geatgtggga	1440
	ctttggcga tacaacccca tcaactccga tactctcgtg gccaacatct ccaccagcgc	1500
	cttcttttac cacaaaccagt atccgcggga ttgggcggcc taccagcgtt ccgtggccgc	1560
	cgagatgect cttttccatg agatggctac ctccaccgc tetgcctcca tgggcgcaa	1620
	ccggcacatg aacctattct gggctcggca ccaagctact ctctggacc gcaatgacgg	1680
	catcaagtgc gtggtgacaa tccaaggcca aatgggcatc tccggtatg cccacagtca	1740
	cagcgacatt ggcggtaca cgaccgtctt cgagcctccc accaccagta actctctggt	1800
	agccatecca cgatcggtgt agctgttagg tcgctgggggt gaattgggtg ccgtctcgag	1860
	cgccgtgttc cggctgcacg agggcaacct gccccagctg aacgcccagt tetacagcaa	1920
	ctccaccag tatgctact ttgcctacaa cgcccggctg ttcgcagtc tgggtcccta	1980
	ccgtcgcgc atcctcaaca cggagagcca gcggcgtgga tggccgttgc tgcggatgcc	2040

ggfgetgtac	catceggagg	atetcegece	cgcacagatc	agctacgaga	gettettect	2100
gggacgggat	ctgtacgtgg	caccgggtgct	cgatgagggc	cacaagtcgg	tggagggtga	2160
cttccctggg	cacagtgcc	accgcacgta	taccatgtg	tggacgggcc	agacctaccg	2220
tgttgacag	acggccaagg	tgtggggcc	ctttggaaag	ccgctgtgt	tctagtgtga	2280
tggagcctcg	agtcgggagc	tggatgtgtt	cttggacttt	gtaaggaagg	aaaatggaac	2340
ggfgetgtat	gcgtga					2356
<210>	5					
<211>	2544					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	agdF 的核苷酸序列					
<400>	5					
atgcctcaaa	aagaattcgt	ccccaaagact	tatcaggagt	cttcaactgg	ggetcaaage	60
tctctctctg	tacatcttgg	ctcaagtccc	gaagagcgat	ccttegactt	ctctttgaa	120
ccaattcgtg	agaacctatt	cagagttaac	ttctcttctc	aagateacc	tctccctcca	180
tacccagtg	tgaccaagcc	ggcaacaagt	ctcgatggcg	tccatgtctc	cgcaacagge	240
ggctcgaacc	aaaagacaat	cgaagtggc	gatgtaacag	cgctcgttga	gtggagtaac	300
acgcggctcg	tctcaactatc	gtggaagggc	acagagaagc	ccttatatcg	cgatctgctt	360
cttctctctc	atgtctcaga	ctctactggg	attgcacaact	acaccgagca	tgaccgggat	420
tgtcttcaag	ttggacttgg	cgagaagaga	gctcccatgg	acctcaaggg	acgccatttc	480
cagctctcag	ccacagacag	cttctggttac	gatgtttaca	acaccgacct	tctatacaag	540
cacattctctc	tgtctgattaa	ggcatcgcct	gatgggtggcg	tggccatctt	ctccacgaca	600
catggcagag	gaacctggct	cgctcggctcg	gaggtcgatg	gtctctgggg	ccacttcaaa	660
gtctaccgtc	aagactatgg	tggactggag	caatacctca	tctctggcaa	gacgtcaag	720
gatgtttgctc	gctctctatgc	agagcttctc	ggctcttccga	tctctctccc	cagatgggca	780
tatggataca	tctcagggcg	atacaagtac	accatgcttg	acgaaccgcc	tgtctcagag	840
gcattgatgg	agttctcaga	caagctggaa	gagcaaggca	ttccctctc	cgcaacacca	900
atgagctcgg	gatactcaat	cgcgagagacc	gagcctaaag	tccgcaacgt	cttccatgg	960
aacaaatacc	gattccccaa	ccccgaagag	tggattgcc	agtaccatgg	teggggaate	1020
cgctctctct	ccaacattaa	ggcgttctct	ctcgcctc	acctgactt	ccagaagctc	1080
atcgatggga	acggattctt	caaggatcct	gagagcagca	agcccggtca	catgcgactg	1140
tggagtctctg	gagggcgaac	aggaggcgat	ggatgccaca	tctacttttc	atctctgttt	1200
gcgttcaagt	gggtgtatga	tggcgtgcag	agcctgaagc	gcggcggaat	tgaccctatg	1260
tggacgaca	acaacgaata	cacaactccc	gatgatgact	ggaagtggc	attggacgag	1320
ccaaccgtct	ccgacgccgt	caagaagggc	gtcgagaact	ctgtcggaca	atggggctgc	1380
gccatgcaca	ccgaactcat	gggcaaagcc	tcccatgacg	ctcttctcaa	catcgagccc	1440
aaccacagac	cattcgtctt	gactctcagt	gccactgcag	gtacaatgcg	ctacgtctgc	1500
agcactgga	gcggagacaa	cgttactage	tgggagggca	tgaagggagc	gaatgctctg	1560
tccctcagcg	caggtatctc	tcttctacag	tgtctcggctc	acgatctcgg	aggattcagag	1620
ggacctcagc	ctctctctga	gctctctctc	agatggatte	aactgggtat	teactctctt	1680
cgttttgcc	tcaactgctt	caagacgtct	cctgggaaca	gtctcgtcgg	agaagttatc	1740
gagcctgga	tgtaccccca	gatcaccctc	ctcgttccggg	atacaatcaa	gctctgttac	1800
gagatctctc	cttatctctc	ctctctcgtt	ctggaaagcc	atctgaccgc	atccccgc	1860
cagcctggg	taggatgggg	ctaccgaatct	gacccggagg	tatggaccaa	ggccttgaag	1920

[0006]

tccggcgatg	agcagttctg	gttcgggtgac	accatcatgg	tccggcggtgt	ctacgagcca	1980
ggigtgagcg	ttgccaagtt	ataccttccc	cgtaagggega	atgaccagtt	cgacttcggg	2040
tacgtgaaca	tgaacgagcc	ttataactac	ctcgcctccg	gacaatgggt	ggaagtgecc	2100
tccgaatgga	ggaagagcat	tccccttctg	gccagaatcg	gcggtgctat	ccccgtcgga	2160
aaaccgcgtc	ataccagggt	acctggcgat	gatacccceg	cttctgtggc	tgtgaaagaa	2220
gtcgaatgatt	accgtggagt	cgaaatcttc	ccgcctcttg	gcagttctca	tggccagggt	2280
ttcagtaeta	cttggtttga	agacgatggg	atttccgttg	aggetcgcac	ctcggagtac	2340
actgtcaact	atagctccac	ggaggagaag	gtcattgttg	gattttctcg	tgatgagaag	2400
tcfggatcgc	tccctgcttg	gacagacctt	gatataatcc	ttcataatgg	tgatgagaga	2460
cgcgttgtgt	cggatattgg	aaagactgtg	gagtataagg	gtaagggtcc	ccggggacgg	2520
gtggtttata	ccttgaagaa	ctag				2544

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1885

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; agdC 的核苷酸序列

&lt;400&gt; 6

[0007]

atggccaaat	ccgcctccca	gattcaccgc	gcctgggtgga	aggaatgctc	cgctatcag	60
atctggcctg	cttcgtacaa	ggattccaac	gatgatggta	tccgtgacat	tecaggcatt	120
atctcgaagc	tggattatat	caagaatata	ggcgtggata	ttgtttgggt	gtgtccttcc	180
tataagtcgc	ctcagggtga	tatgggctat	gacattgcgc	attaactatag	cattgcggat	240
gagtaccgca	cggtcgcgga	tgtcgaaaag	ctcatccagg	ggtgccacga	gcggggatg	300
aagcttctta	tggaccttgt	ggtcaaccac	actagtgate	agaatgagtg	gttcaaacag	360
tcgcgcagct	caaaggacaa	taagtatcgc	aactgggtatg	tttgaagcc	ggccaggat	420
gatgagcagg	gtaaccggca	cccgccctaac	aactgggtgt	cgcattttca	gggtgagttt	480
cttgccttga	tttgaagtca	tteatttttt	tggagtaage	ttctgacct	tggctgtagg	540
tagtgcctgg	gaatgggacg	agcacacggg	tgaatactac	cttcacctct	acgcgacaga	600
acagcccgc	ctcaactggg	agcatccgcc	cgctccgtaag	gcagttcacg	atatcatgcg	660
ttcttggtca	gacaaaggcg	oggatggatt	ccgcatggat	gtcatcaatt	tcacagcaa	720
agaccaacgg	ttcccggatg	ctctgtgtaa	ggaccctega	accccttggc	agtggggaga	780
caagtactac	gccaatggac	cgagattaca	tgaatatctc	caagacctgg	ggaagattct	840
gaaggagtac	gatgccttea	gtgttggtga	gatgcccttc	gtcagagaca	ccgaggaggt	900
gctccgcgct	gtgcgetacg	atcggaacga	gatcaacatg	attttcaact	tcgagcatgt	960
ggacattgac	cacggaacaf	acgacaant	cgagcctgga	agetggaagc	tcaactgactt	1020
gaaggcttct	ttcgagacgt	ggcagaagtt	catgtacaac	aatgatgggt	ggaatgctct	1080
ttactgggag	aaccacgac	agccgcggtc	gattgatcgc	tatgcacaag	caaaggagga	1140
gttccgcaca	gaagcaggtg	aaatgctggc	gacggttctt	gcgctgcagt	ctggtacgcc	1200
gttcgtgtac	cagggtcagg	aaattggaat	gagaaatgtt	cccgttgaat	gggacatgaa	1260
cgagtacaag	gatattgact	gtctcaacca	ctggcatcgg	taggcatatg	tccccaccgc	1320
tctagatagg	tcgcttacta	actgcgctt	tagccttctc	aagcacaggc	ccgatgatat	1380
cgaagcccag	aagagcgcgc	gtcaggaata	ccaaaagaaa	tcccagagaca	acggccgcac	1440
accggtgcag	tggctcaagt	caccaaaccg	tgggttcacc	gtcccacacg	caaagccttg	1500
gatgtccgct	agcccggaet	atgtgcgctt	caatgetgaa	gcgcaggctca	atgaccggaa	1560
ctcgaatctac	cactactggg	ctgctgtcct	tggattgcgc	aagaaatacc	tcgacatctt	1620

tgctatggg gactacgaet tggtcgataa ggatagtcag gagatcttcg cgtatgctcg	1680
tcaatatgag aacaagaagg cgctggttct cactaactgg actgagaaga cattggagtg	1740
ggatgctact accaacggcg tgaagggcgt caaggatgtg ctattgaact cgtatgaaag	1800
tgctgaagca gcgaaggggc ggttctcggg acagaagtgg tctctacgcc cgtatgaagc	1860
agttgttctt ttggtggagg cttga	1885
<210> 7	
<211> 1982	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> agdD 的核苷酸序列	
<400> 7	
atgtgtaaca agtccaatta cteatccccg aaatgggtgga aagaatcggg tgtgtatcaa	60
gtgtatectg caagcttcaa ctgcggtaaa tctacgacaa ataccaatgg atggggatgat	120
gtgactggta ttattgagaa ggttccttat ttggagagct tgggtgtaga tattgtatgg	180
cttagtccaa gtgagtgaaa atctgtaatt tgtgttatag tcgcagacgt ctagagaaca	240
atgcctgaca tctcttccc tagtetatac gtccccacaa gtcgacatgg getacgatat	300
cgcgattat gaatctatcg atecgcggta tggcaectta gcagacgttg acctttgat	360
aaaaacgtt aaggaccatg acatgaaact catgatggac ctggtggta atcatacatc	420
tgatcaacac tcttggtttg tegagtcage taactccaaa gattctccaa aacgtgattg	480
gtatatctgg aggccggcca agggattcga cgaggccggg aatccagttc ctccaaacaa	540
ttgggeacag atcctggggc atacactcag cgcttggact tggcatgcgg agactcagga	600
gttctatttg actttgcaca cgtcagcgea agcagagctc aactgggaga atccagacgt	660
tgtcaccgct gtttatgatg tgagtttcgc tggtcaccaa gggacccttc atcctcgtaa	720
cccgcgactc cgagaegtet gaatgagtgg tgttaactgat caaccatcaa tcttggtttt	780
aggttatgga gttttggctg cgctcgtggga tctgtggttt tcgcatggac gtcattaact	840
tcatttccaa ggaccagtct tteccagaec ccccgatcat cgateccagcc tccaaatacc	900
agcccggcga gcagttctat acaaatgggc cacgattcca cgagtttatg cacggaatct	960
acgataatgt tttatccaag tacgacacca tcaactgttg ggaaccccc tacgtcaactg	1020
atatgaagga gatcatcaag acgggtgggt ccaocggcaaa agagcttaac atggcattca	1080
actttgatca catggaaatt gaagatatca aaaccaaagg ggagtccaaa tggagcttgc	1140
gcgactggaa gttgaccgag ttgaaaggca ttttgtccgg ctggcagaaa cgaatgagag	1200
agtgggaegg ctggaacgac atcttcttgg aatgtcacga tcaggcgcgg teggtctccc	1260
ggtacaccaa cgattcggat gagttcagag accggggagc caaattacta gcccttcttg	1320
agacgacget cgggtgggacc attttcttt atcagggtca ggagatcggc atgcgcaact	1380
ttctgttga gtgggatecc gacaccgagt acaaggacat tgagtcggtc aacttctgga	1440
agaaatccaa agagctccac cctgttgget ctgaaggcct ggcccaggct cggacgctct	1500
tgcagaaaaa ggccagggac caeccccga ccccgatgca atggagtgtc gaccacatg	1560
cgggcttcac agtccctgat gcgacacct ggatgagggt gaatgatgac tatgggacag	1620
ttaatgtgga ggcacagatg tctttccgt gggaaatgaa aggtgaacta tcagtgtggc	1680
agtactggca gcaggcattg caacgcgcaa agctacataa ggtgctttt gtttatggcg	1740
actttgagga cctggaactac cacaacgaat tggctcttgc gtattcagag actagtgcgg	1800
atgaaagga gacctggett gttgcgatga actggacaac ggatgcagtc gaatggacgg	1860
ttcttcagg catccaegtc acaegctggg tctctcagac getccagact gcccgcotta	1920
tggcgggcca gtcgaccgtc acgctccgag ccttgggaagg tgtcgttggg tgtttagatt	1980

[0008]

ag	1982
<210> 8	
<211> 1398	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> pyrG 的核苷酸序列	
<400> 8	
gcaacttctc cgagaacggc ccgcagacaa tgcctctctat cctgggtggca ggcgtcaagt	60
accagagaggc agcagcgggc ttaggagcgg cctggggtgt tctccgcacc ctctacatgc	120
tgggctatat ttatagegac aagccgaacg gcaccggcag gtacaatggt tcgctgtact	180
tgcttgegca agcgggtctt tggggattga ggcatttgg tgttgcaaag gatttgatgt	240
aaatgtagtc gacatcttag cacagagggg agagttgata aaatgtggtc tgtttgaatg	300
atagtcgggt tcgtgacctt tattegtgat agtggagata ggtctgcgcc tatcttatcg	360
ggccggagca aaaattccac cgcagcgggg tgagttttcg ttatacagcc atcccacttc	420
cagcttcaaa ttgctagttt aatccagccc aattcaatca ttggagaacc gccatcatgt	480
cttcgaagtc ccacctcccc taegcaattc gcgcaacca ccatcccaac cctttaacat	540
ctaaactctt ctccatcgcc gaggagaaga aaaccaacgt caccgtctcc gcagacgtta	600
ctacttcgca cgagctctct gatcttgcct accgtacate ctgcaaccaat gccctccag	660
gataacaaat agctgatgca tagtgagtac aggcctaggc ccttatatcg cagttctgaa	720
aaccacatc gacatctctc ccgatctcac ccgctcgacc ctttctctgc tccaatccct	780
[0009] cgcgacaaag cacaacttec tcatctttga ggaccgcaag ttcctcgaca tcggaacac	840
cgtgcaaaag cagtaccacg gtggcgctct ccgcatctcc gaatgggca acatcatcaa	900
ctgcgccate ctgccgggca aagggatcgt cgaggccctc gcacagacaa ccaagtctcc	960
tgactttaaa gacgcgaatc aacgaggtct cctgattctt gccgagatga cgagtaaggg	1020
atctcttgcg acaggggagt acacggcacg ctccggttgag tacgcgcgga agtataaggg	1080
gtttgtgatg ggattcgtga gtacaagggc gttgagtgag gtgctgccc aacagaaaga	1140
ggagagcgag gattttgtcg tctttacgac tgggggtgaat ctgtcggata agggggataa	1200
gctggggcag cagtatcaga cacctgggct ggcgggttgg cgaggtgcgg actttatcat	1260
tgccggtagg ggcattctata aggcggacga tccagtcgag gcggttcaga ggtaccggga	1320
ggaaggtcgg aaagcttacg agaaaagagt tggactttga gtgtgagtgg aaatgtgtaa	1380
cggtattgac taaaaggg	1398
<210> 9	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Upstream(agdB)-F add EcoR V	
<400> 9	
gatattctgag cctcagtaet tgggag	26
<210> 10	
<211> 37	
<212> DNA	



	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Upstream(agdB)-R	
	<400> 10	
	ccctgtcaat ggcaaatccc agctgggtgg tcccage	37
	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Redown(agdB)-F	
	<400> 11	
	ccaccagct gggatttgc attgacaggg ttagtg	36
	<210> 12	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Redown(agdB)-R	
	<400> 12	
[0010]	tctegaggaa gttgcgetcg ccggtetggc ttg	34
	<210> 13	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> pyrG(agdB)-F	
	<400> 13	
	gccagaccgg cgagcgcaac ttctcgaga acgcgc	36
	<210> 14	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> pyrG(agdB)-R	
	<400> 14	
	cactaacct gtcaatggca acccttttag tcaataccg	39
	<210> 15	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<223>	Downstream(agdB)-F	
	<400>	15	
		cggattgac taaaagggtt gccattgaca gggttagtg	39
	<210>	16	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Downstream(agdB)-R add EcoR V	
	<400>	16	
		gatatactac ttcagcttaa agttcaceg	29
	<210>	17	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Upstream(agdA)-F add EcoR V	
	<400>	17	
		gatatacaga gtctgaggct cgetgacgat	30
[0011]	<210>	18	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Upstream(agdA)-R	
	<400>	18	
		gccgccccag tggccggctc gcttaaggag gctcgag	37
	<210>	19	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Redown(agdA)-F	
	<400>	19	
		ctccttaagc gagccggcca ctggggcgge gacaac	36
	<210>	20	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		

	<223> Redown(agdA)-R	
	<400> 20	
	tctcgaggaa gttgctcgta ccacactteg ceatgtcc	38
	<210> 21	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> pyrG(agdA)-F	
	<400> 21	
	cgaagtgtgg tacgagcaac ttctctgaga acgcgcc	37
	<210> 22	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> pyrG(agdA)-R	
	<400> 22	
	gccgccccag tggccccctt ttagtcaata ccgttacaca t	41
[0012]	<210> 23	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Downstream(agdA)-F	
	<400> 23	
	tattgactaa aagggggcca ctggggcggc gacaac	36
	<210> 24	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Downstream(agdA)-R add EcoR V	
	<400> 24	
	gatatcctac cattccaata cccagtttc c	31
	<210> 25	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Upstream(agdB)-F add EcoR V	

	<400> 25	
	gatatcggcc gggggagcag agcttca	27
	<210> 26	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Upstream(agdE)-R	
	<400> 26	
	atagggatgg aagcggatgg gagagctcag tagtcaatc	39
	<210> 27	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Redown(agdE)-F	
	<400> 27	
	ctgagctctc ccatccgett ccatccctat gtttctgaa	39
	<210> 28	
[0013]	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Redown(agdE)-R	
	<400> 28	
	tctcgaggaa gttgcccgta tgccgetttc eggctcc	37
	<210> 29	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> pyrG(agdE)-F	
	<400> 29	
	gaaagcggca tacgggcaac ttctcgaga acgcgcc	37
	<210> 30	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> pyrG(agdE)-R	
	<400> 30	

	atagggatgg aagcgcctt ttagtcaata ccgttacaca t	41
	<210> 31	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Downstream(agdE)-F	
	<400> 31	
	tattgactaa aagggcgett ccatecctat ggttctgaa	39
	<210> 32	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Downstream(agdE)-R add EcoR V	
	<400> 32	
	gatatectaa aactcaatcc gccatgtctt tc	32
	<210> 33	
	<211> 32	
	<212> DNA	
[0014]	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Upstream(agdG)-F add EcoR V	
	<400> 33	
	gatatccgga tatagactga cttegagaaa tt	32
	<210> 34	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Upstream(agdG)-R	
	<400> 34	
	gtgtcttctgt tgggtcttgg gcgagagttt tgaaatcctg t	41
	<210> 35	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Redown(agdG)-F	
	<400> 35	
	aaactctcgc ccaagcacea acgaagacac tcgcgcc	37

[0015]

<210> 36	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Redown(agdG)-R	
<400> 36	
ctgcggcgcg ttctcgagga agttgcagac ggcaaccaat tcaccccag	49
<210> 37	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> pyrG(agdG)-F	
<400> 37	
gcaacttctc cgagaacgcg cc	22
<210> 38	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> pyrG(agdG)-R	
<400> 38	
cccttttagt caataccggt acacat	26
<210> 39	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Downstream(agdG)-F	
<400> 39	
atgtgtaacg gtattgacta aaagggcacc aacgaagaca etcgccc	48
<210> 40	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Downstream(agdG)-R add EcoR V	
<400> 40	
gatatctcac gcatacagea ccgttecatt	30

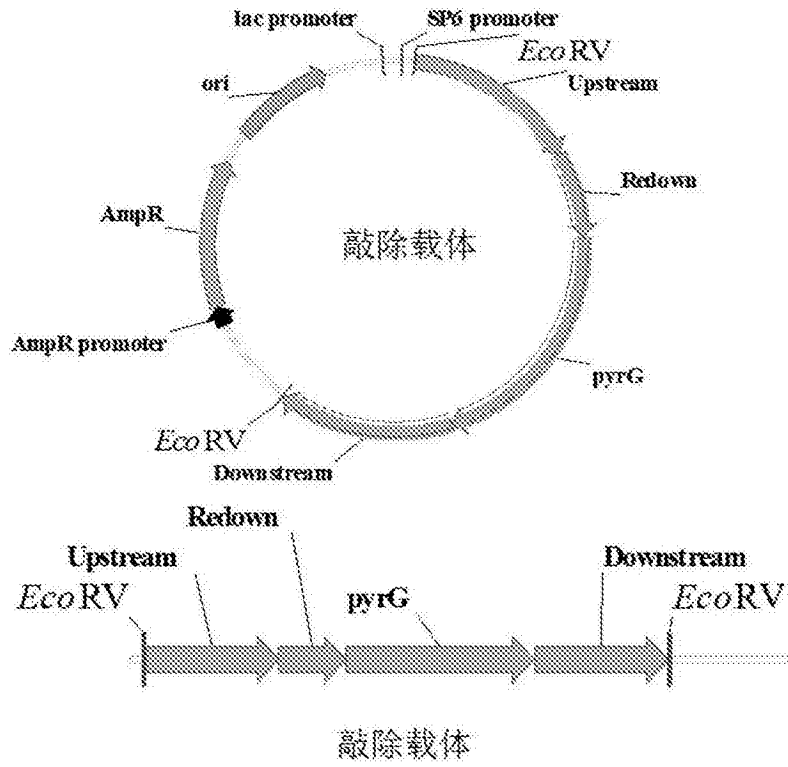


图1

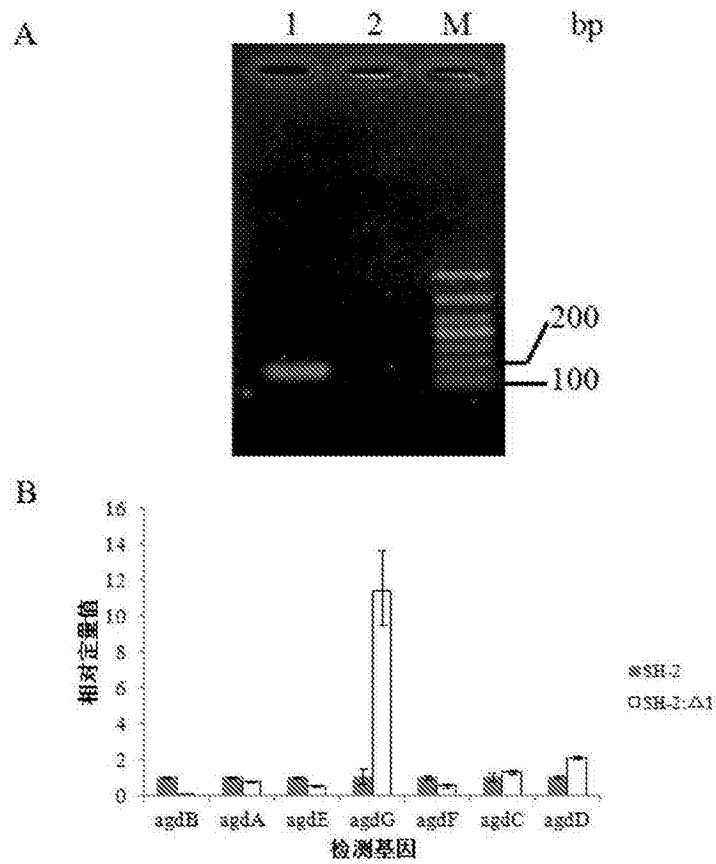


图2

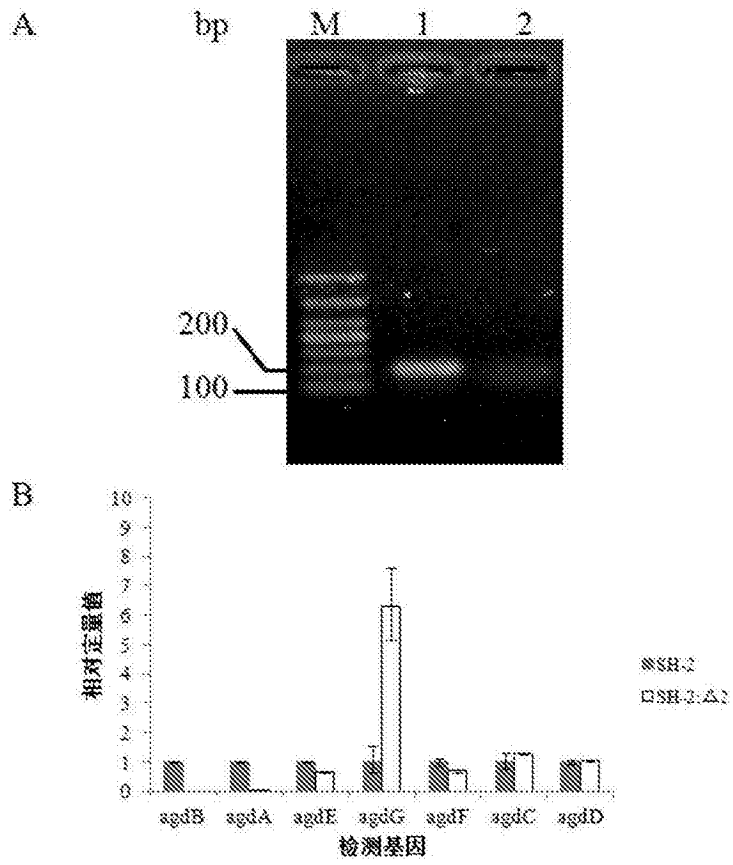


图3



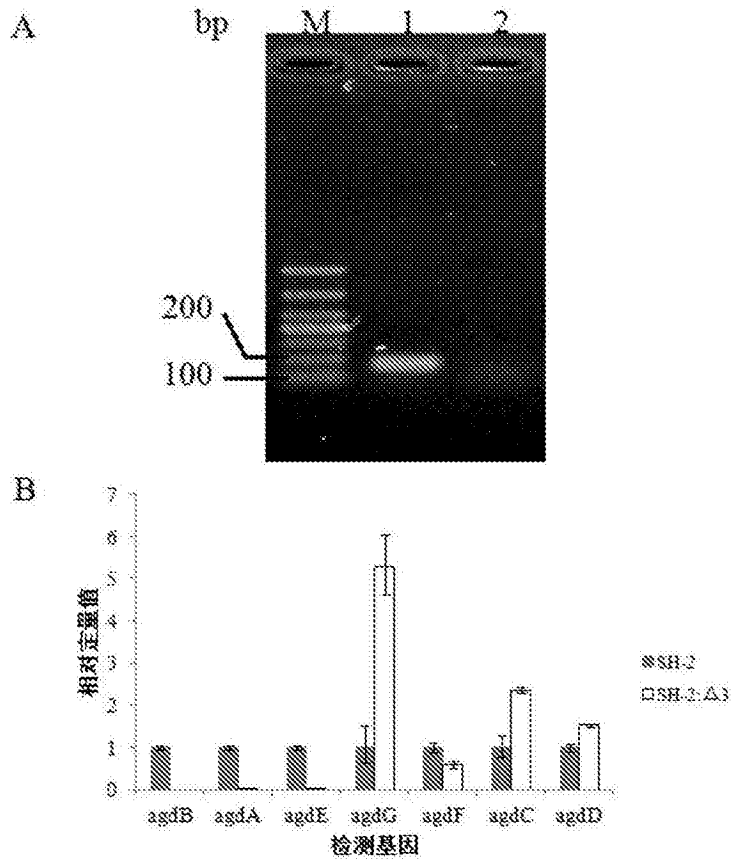


图4

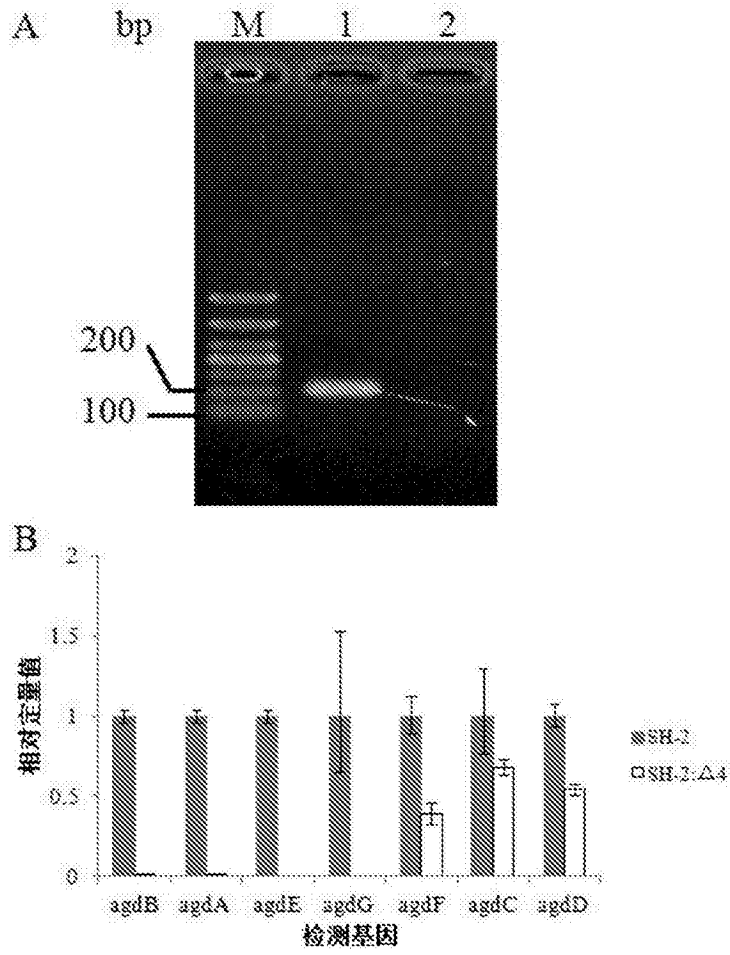


图5

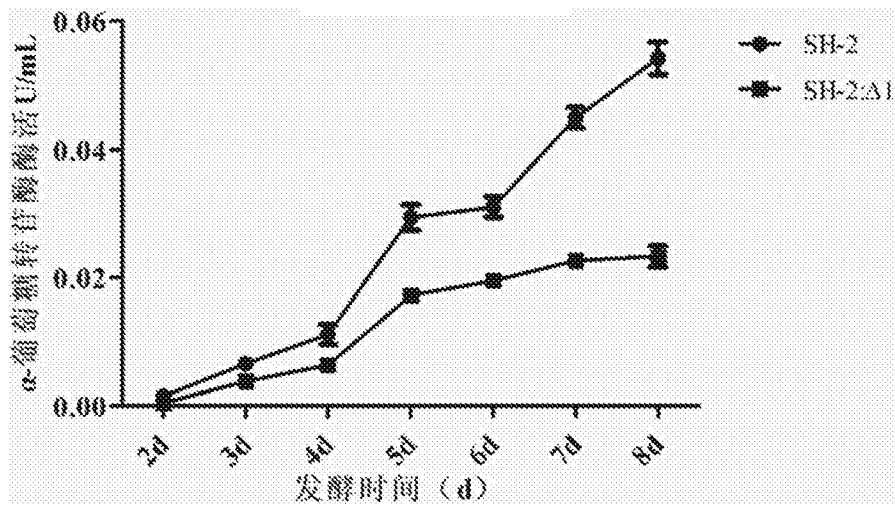


图6

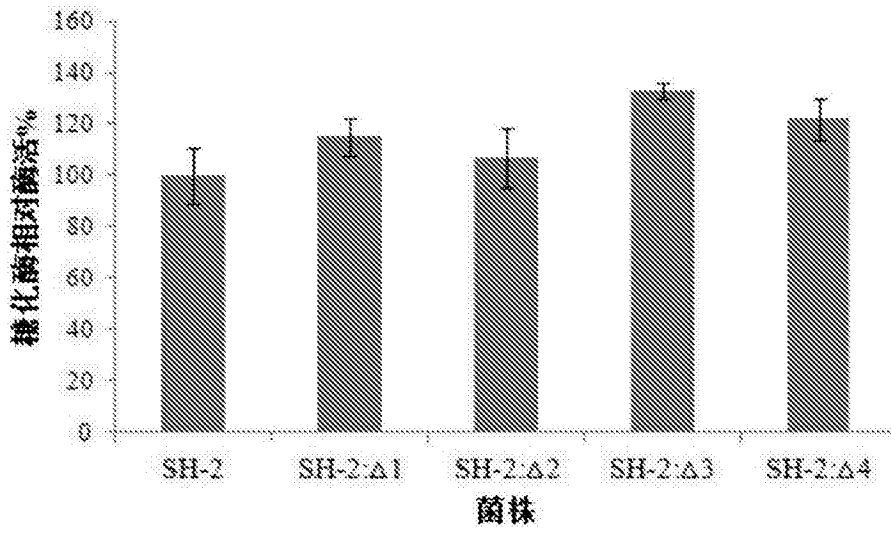


图7

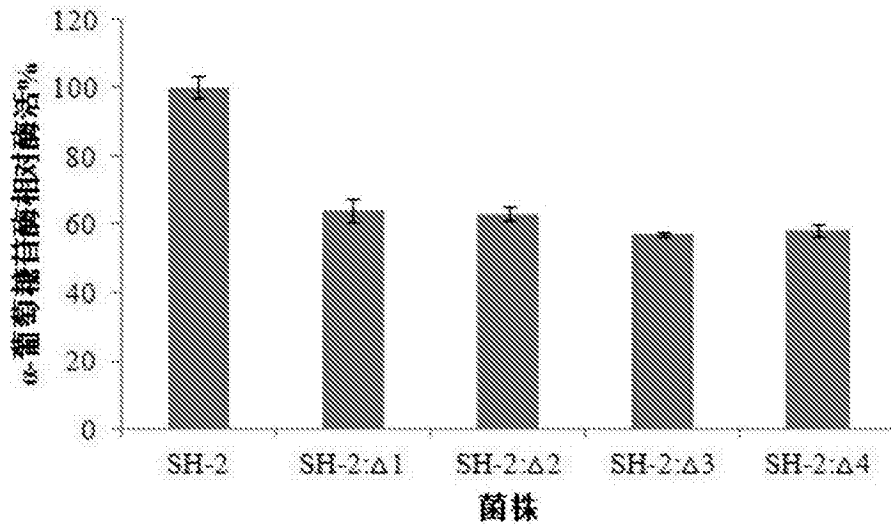


图8