



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114806913 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 29

(21) 申请号 202210395975.3

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.15

C12P 7/46 (2006.01)

(71) 申请人 山东大学

A23L 29/00 (2016.01)

地址 266237 山东省青岛市即墨滨海路72号

C12R 1/645 (2006.01)

(72) 发明人 祁庆生 崔志勇 侯进 钟驭涛 邓敬宇

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

专利代理师 宋海海

(51) Int. Cl.

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

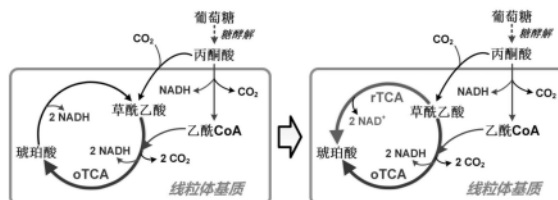
权利要求书2页 说明书14页  
序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株及其构建方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株及其构建方法和应用,属于微生物及发酵工程技术领域。本发明是在酵母细胞中将琥珀酸生物合成途径的相关酶类超表达并定位至线粒体基质,有助于还原TCA途径在真核微生物中的功能表达。所述菌株能够利用普通碳源和氮源,经分批补料发酵培养后,琥珀酸产量达到50.1g/L,转化率达到0.75g/g葡萄糖。作为一种高效生产琥珀酸的优良菌株,在食品、化工及可降解材料等领域具有良好的应用前景。



1. 一种具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株,其特征在于,所述工程菌株其表达延胡索酸还原酶,且所述延胡索酸还原酶过表达并重定位至线粒体基质,同时,该工程菌株过表达琥珀酸合成相关酶和二羧酸转运蛋白。

2. 如权利要求1所述的酵母工程菌株,其特征在于,所述酵母工程菌株其出发菌株包括 *Candida sonorensis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Kluyveromyces thermotolerana*、*Issatchenkia orientalis*、*Candida methanesobosa*、*Candida lambica*、*Candida sorboxylosa*、*Saccharomyces bayanus*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia jadinii*、*Pichia anomala*、*Zygosaccharomyces lentus*、*Candida zemplinina*、*Candida geochares*、*Pichia membranifaciens*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*;进一步的,所述出发菌株优选解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*;更进一步的,所述出发菌株为解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA0,其基因型为 *MatA*, *xpr2-322*, *axp-2*, *leu2-270*, *ura3-302*,  $\Delta$  *Sdh5::loxP*,  $\Delta$  *Ach1::loxP*, *Y1Pyc*, *TbFrd*, *EcFum*, *Y1Mdh1* 和 *Pgl<sup>G75S</sup>*。

3. 如权利要求1所述的酵母工程菌株,其特征在于,所述延胡索酸还原酶为外源酶,其来源包括布氏锥虫 *Trypanosoma brucei*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和希瓦氏菌 *Shewanella frigidimarina*, 优选为布氏锥虫 *Trypanosoma brucei*;更具体的,编码所述布氏锥虫延胡索酸还原酶的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

4. 如权利要求1所述的酵母工程菌株,其特征在于,所述琥珀酸合成相关酶包括苹果酸脱氢酶,所述苹果酸脱氢酶编码基因为苹果酸脱氢酶基因 *Y1Mdh2*, 其基因号为 YALI0E14190p。

5. 如权利要求1所述的酵母工程菌株,其特征在于,所述二羧酸转运蛋白编码基因 *SpMae1* 来自粟酒裂殖酵母,其核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

6. 权利要求1-5任一项所述具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株的构建方法,其特征在于,所述构建方法包括:

以酵母菌株作为出发菌株,过表达线粒体定位的延胡索酸酶和内源的苹果酸脱氢酶,然后过表达二羧酸转运蛋白;

优选的,所述酵母菌株包括 *Candida sonorensis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Kluyveromyces thermotolerana*、*Issatchenkia orientalis*、*Candida methanesobosa*、*Candida lambica*、*Candida sorboxylosa*、*Saccharomyces bayanus*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia jadinii*、*Pichia anomala*、*Zygosaccharomyces lentus*、*Candida zemplinina*、*Candida geochares*、*Pichia membranifaciens*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*;进一步的,所述出发菌株优选解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*。

7. 如权利要求6所述的构建方法,其特征在于,所述构建方法包括:

以解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA0 作为出发菌株,将外源线粒体定位延胡索酸酶 *TbFrd* 编码基因 *mTbFrd* 导入所述出发菌株中,然后依次导入苹果酸脱氢酶编码基因 *Y1Mdh2* 和二羧酸转运蛋白 *SpMae1*, 即得解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA4;

优选的,所述解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA0,其基因型为 *MatA*, *xpr2-322*, *axp-2*, *leu2-270*, *ura3-302*,  $\Delta$  *Sdh5::loxP*,  $\Delta$  *Ach1::loxP*, *Y1Pyc*, *TbFrd*, *EcFum*, *Y1Mdh1* 和 *Pgl<sup>G75S</sup>*;其是以解脂耶氏酵母菌株 PGC91 (*MatA*, *xpr2-322*, *axp-2*, *leu2-270*,

ura3-302,  $\Delta$ Sdh5::loxP,  $\Delta$ Ach1::loxP, Y1Pyc) 通过基因工程技术构建获得, 更具体的, 所述Mbmr-SA0的构建方法包括: 将TbFrd (SEQ ID NO.1)、Y1Mdh1 (序列号YALI0D16753p, Gene ID:2910208) 和EcFum (SEQ ID NO.5) 基因导入解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) PGC91中, 同时将6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (序列号YALI0C19085p, Gene ID:2909945) Pgl第75位甘氨酸突变为丝氨酸即得;

优选的, mTbFrd基因序列是将解脂耶氏酵母线粒体基质蛋白细胞色素c氧化酶5b亚基的线粒体定位序列 (如SEQ ID NO.9所示) 与可溶性延胡索酸还原酶TbFrd (如SEQ ID NO.1所示) 融合获得; 进一步优选的, 线粒体定位肽序列位于融合蛋白的N端;

优选的, 所述苹果酸脱氢酶编码基因为苹果酸脱氢酶基因Y1Mdh2, 其基因号为YALI0E14190p;

优选的, 所述二羧酸转运蛋白编码基因SpMae1来自粟酒裂殖酵母, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

8. 一种琥珀酸的工业化生产方法, 其特征在于, 所述工业化生产方法包括: 对权利要求1-5任一项所述酵母工程菌株进行培养发酵。

9. 如权利要求8所述工业化生产方法, 其特征在于, 所述培养发酵方法包括: 将所述酵母工程菌株置于YPD培养基进行发酵培养;

优选的, 所述发酵培养方法包括: 发酵培养阶段, 温度控制为25-35°C (优选为30°C), 通气量为0.5-5vvm (优选为1.0vvm), 搅拌速度控制为100-800rpm (优选为500rpm);

优选的, 所述发酵培养方法中, 还包括对发酵液中的葡萄糖浓度进行检测, 当葡萄糖浓度低于10g/L时, 进行补糖, 补至50~60g/L; 所述培养方法中, 无需对pH进行调节;

优选的, 所述YPD培养基其包括: 2%胰蛋白胨, 1%酵母提取物, 6%葡萄糖。

10. 权利要求1-5任一项所述酵母工程菌株或权利要求8或9所述工业化生产方法在化工、可降解材料、食品及医药工业领域中的应用。

## 具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株及其构建方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物及发酵工程技术领域,具体涉及一种具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株及其构建方法和应用。

### 背景技术

[0002] 本发明背景技术中公开的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 琥珀酸又称丁二酸(Succinic acid,SA)是一种重要的C4化合物,广泛应用于清洁剂、表面活性剂、食品添加剂、抗菌剂以及制药行业,被美国能源部选为十二种最具商业价值的平台化合物之首。琥珀酸也是生产聚丁二酸丁二醇酯PBS、聚丁二酸己二酸丁二醇酯PBSA等生物可降解塑料的重要原料,现有的琥珀酸产能已无法满足市场供给。琥珀酸的合成主要采用化学工艺路线,但是相比生物发酵法而言化学法生产琥珀酸存在能耗高、污染严重、温室气体排放等缺点。因此,开发绿色、可持续的琥珀酸高效发酵技术具有重要的实际意义。

[0004] 相较于细菌宿主而言,酵母对酸碱和渗透压力具有较强的耐受性,可以进行低pH的琥珀酸发酵,这简化了发酵工艺流程并且降低下游产物处理成本。近年来许多研究人员尝试对包括*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia kudriavzevii*、*Issatchenkia orientalis*和*Yarrowia lipolytica*在内的多种酵母细胞进行代谢途径改造,以实现琥珀酸的发酵生产。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一种非常规酵母,具有安全性高、耐酸能力强、分泌多种代谢产物和能够利用多种碳水化合物等优点,它被视为潜在的琥珀酸生产菌株受到越来越多的关注。解脂耶氏酵母可以通过降低琥珀酸脱氢酶活性,利用氧化TCA途径进行琥珀酸生产。然而,氧化TCA途径合成琥珀酸的理论碳转化率仅为0.65g/g葡萄糖,当前解脂耶氏酵母工程菌株的琥珀酸实际转化率与其他细菌生产菌株如*Escherichia coli*、*Corynebacterium glutamicum*和*Actinobacillus succinogenes*等相比仍然存在很大差距。

[0005] 在已知的琥珀酸生物合成相关代谢途径中,还原TCA支路的理论转化效率更高(约为1.1g/g葡萄糖),能够显著减少温室气体CO<sub>2</sub>的排放,相比其他途径具有明显优势。一些自然环境中分离的细菌,例如瘤胃细菌产琥珀酸放线杆菌和曼海姆产琥珀酸菌等,可以通过自身携带的还原TCA途径进行琥珀酸的高效合成。然而,绝大多数的酵母缺乏将延胡索酸催化为琥珀酸的关键酶,即延胡索酸还原酶,并且外源还原TCA途径的构建和表达较为困难。因此,如何在酵母细胞中构建功能性的还原TCA途径,实现外源琥珀酸高效合成途径与宿主的适配,是提高琥珀酸生产效率的关键。

## 发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株及其构建方法和应用。本发明以严格好氧的解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) 作为出发菌株,将不同种类的延胡索酸还原酶定位至线粒体基质,证明了该酶的亚细胞重定位有助于提高琥珀酸生产能力。以线粒体定位的NADH依赖延胡索酸还原酶过表达解脂耶氏酵母菌株Mbmr-SA1为宿主,将琥珀酸生物合成相关基因进行过表达,最终得到一种高效生产琥珀酸的解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA4,其有望成为一种琥珀酸工业化生产的工程菌进行应用。基于上述研究成果,从而完成本发明。

[0007] 本发明的第一个方面,提供一种具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株,所述工程菌株其表达延胡索酸还原酶,且所述延胡索酸还原酶过表达并重定位至线粒体基质,同时,该工程菌株过表达琥珀酸合成相关酶和二羧酸转运蛋白。上述酵母工程菌株拥有功能的还原性琥珀酸生物合成途径,能够利用含有葡萄糖的培养基高效生产琥珀酸。

[0008] 本发明的第二个方面,提供上述具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株的构建方法,所述构建方法包括:

[0009] 以酵母菌株作为出发菌株,过表达线粒体定位的延胡索酸酶和内源的苹果酸脱氢酶,然后过表达二羧酸转运蛋白。

[0010] 本发明的第三个方面,提供一种琥珀酸的工业化生产方法,所述工业化生产方法包括:对上述酵母工程菌株进行培养发酵。

[0011] 本发明的第四个方面,提供上述酵母工程菌株或上述工业化生产方法在化工、可降解材料、食品及医药工业领域中的应用。

[0012] 上述一个或多个技术方案的有益技术效果:

[0013] 上述技术方案公开了一种新的解脂耶氏酵母工程菌,可用于高产琥珀酸,其作为琥珀酸的工程菌能够带来理想的产量和转化率;所述菌株能够利用普通碳源和氮源,经分批补料发酵培养后,琥珀酸产量达到50.1g/L,转化率达到0.75g/g葡萄糖。同时研究证明,上述工程菌在培养过程中可以进行低pH发酵,该特点有效的减少工业生产中对培养液pH进行调节的步骤,进一步节约成本。

[0014] 上述技术方案在构建工程菌株Mbmr-SA4时采用新的技术方法,即线粒体定位还原TCA途径在琥珀酸高产中的应用,显著提高了琥珀酸产量,因此上述工程菌具有可观的应用价值和前景。

## 附图说明

[0015] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0016] 图1为实施例2和3中所用到的还原TCA合成途径线粒体定位示意图。

[0017] 图2为实施例2中酵母线粒体定位信号的功能验证结果图。

[0018] 其中hrGFP代表以Po1f菌株为宿主过表达了绿色荧光蛋白hrGFP;MLS-mCherry为以 Po1f菌株为宿主过表达了含有23个氨基酸的线粒体定位信号序列的红色荧光蛋白

mCherry。两种菌株分别在荧光显微镜视野下观察细胞内荧光分布情况。

[0019] 图3为实施例2中延胡索酸酶线粒体定位对琥珀酸生产的影响结果图。

[0020] 其中Mbmr-SA0为对照菌株,TbFrd代表了以Mbmr-SA0为宿主过表达细胞质定位的布氏锥虫Trypanosoma brucei来源延胡索酸还原酶;mTbFrd代表了以Mbmr-SA0为宿主过表达线粒体基质定位的布氏锥虫来源延胡索酸还原酶;mScOsm1为以Mbmr-SA0为宿主过表达线粒体基质定位的酿酒酵母Saccharomyces cerevisiae来源延胡索酸还原酶;mSfFrd代表了以Mbmr-SA0为宿主过表达线粒体基质定位的希瓦氏菌Shewanella frigidimarina来源延胡索酸还原酶。

[0021] 图4为实施例3中还原TCA途径相关基因和二羧酸转运蛋白过表达对琥珀酸生产的影响结果图。

[0022] 其中,Y1Mdh1和Y1Mdh2为内源性苹果酸脱氢酶编码基因,CgMdh为谷氨酸棒杆菌Corynebacterium glutamicum来源的苹果酸脱氢酶编码基因,mEcFum为线粒体定位的大肠杆菌Escherichia coli来源的延胡索酸酶编码基因,SpMae1为粟酒裂殖酵母Schizosaccharomyces pombe来源的二羧酸转运蛋白编码基因。

[0023] 图5为实施例3中工程菌Mbmr-SA4摇瓶发酵琥珀酸产量图。

### 具体实施方式

[0024] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0025] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0026] 本发明的一个典型具体实施方式中,提供一种具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株,所述工程菌株其表达延胡索酸还原酶,且所述延胡索酸还原酶过表达并重定位至线粒体基质,同时,该工程菌株过表达琥珀酸合成相关酶和二羧酸转运蛋白。上述酵母工程菌株拥有功能的还原性琥珀酸生物合成途径,能够利用含有葡萄糖的培养基高效生产琥珀酸。

[0027] 其中,所述酵母工程菌株其出发菌株包括但不限于Candida sonorensis、Kluyveromyces marxianus、Kluyveromyces thermotolerana、Issatchenkia orientalis、Candida methanesobosa、Candida lambica、Candida sorboxylosa、Saccharomyces bayanus、Kluyveromyces lactis、Pichia jadinii、Pichia anomala、Zygosaccharomyces lentus、Candida zemplinina、Candida geochares、Pichia membranifaciens、Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris;进一步的,所述出发菌株优选解脂耶氏酵母Yarrowia lipolytica;更进一步的,所述出发菌株为解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)菌株Mbmr-SA0,其基因型为MatA,xpr2-322,axp-2,leu2-270,ura3-302,ΔSdh5::loxP,ΔAch1::loxP,Y1Pyc,TbFrd,EcFum,Y1Mdh1和Pgl<sup>G75S</sup>。

[0028] 所述延胡索酸还原酶为外源酶,其来源包括但不限于布氏锥虫Trypanosoma

brucei、酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*和希瓦氏菌*Shewanella frigidimarina*,优选为布氏锥虫 *Trypanosoma brucei*;更具体的,编码所述延胡索酸还原酶的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

[0029] 所述琥珀酸合成相关酶包括但不限于苹果酸脱氢酶,所述苹果酸脱氢酶编码基因为苹果酸脱氢酶基因Y1Mdh2,其基因序列号为:YALI0E14190p (Gene ID:2911503)。

[0030] 所述二羧酸转运蛋白编码基因SpMae1来自粟酒裂殖酵母,其核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0031] 本发明又一具体实施方式中,提供上述具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株的构建方法,所述构建方法包括:

[0032] 以酵母菌株作为出发菌株,过表达线粒体定位的延胡索酸酶和内源的苹果酸脱氢酶,然后过表达二羧酸转运蛋白。

[0033] 其中,所述酵母菌株包括但不限于*Candida sonorensis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Kluyveromyces thermotolerana*、*Issatchenkia orientalis*、*Candida methanesobosa*、*Candida lambica*、*Candida sorboxylosa*、*Saccharomyces bayanus*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia jadinii*、*Pichia anomala*、*Zygosaccharomyces lentus*、*Candida zemplinina*、*Candida geochares*、*Pichia membranifaciens*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*;进一步的,所述出发菌株优选解脂耶氏酵母*Yarrowia lipolytica*。

[0034] 本发明又一具体实施方式中,所述构建方法包括:

[0035] 以解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA0作为出发菌株,将外源延胡索酸酶 TbFrd编码基因mTbFrd导入所述出发菌株中,然后依次导入苹果酸脱氢酶编码基因Y1Mdh2 和二羧酸转运蛋白基因SpMae1,即得解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA4,其能够实现高产琥珀酸的效果。

[0036] 其中,解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) Mbmr-SA0,其基因型为MatA, xpr2-322, axp-2, leu2-270, ura3-302,  $\Delta$  Sdh5::loxP,  $\Delta$  Ach1::loxP, Y1Pyc, TbFrd, EcFum, Y1Mdh1和Pgl<sup>G75S</sup>;其是以解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) PGC91通过基因工程技术构建获得,所述解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) PGC91见“Cui, Z., Gao, C., Li, J., Hou, J., Lin, C., & Qi, Q. (2017). Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH. *Metabolic engineering*, 42, 126-133.”和“一种利用具有还原 TCA途径的解脂耶氏酵母菌株好氧合成琥珀酸的方法”,更具体的,所述构建方法包括:将 TbFrd (SEQ ID NO.1)、Y1Mdh1 (序列号YALI0D16753p, Gene ID:2910208) 和EcFum (SEQ ID NO.5) 基因导入解脂耶氏酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) PGC91中,同时将6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (序列号YALI0C19085p, Gene ID:2909945) Pgl第75位甘氨酸突变为丝氨酸即得。

[0037] 更具体的,采用非同源依赖的重组 (NHEJ) 转化方式,将含有TbFrd、Y1Mdh1和EcFum基因表达盒的线性化质粒pKi-TbFrd和113-Y1Mdh1-EcFum导入工程菌株*Yarrowia lipolytica* PGC91中,并通过同源重组将6-磷酸葡萄糖酸内酯酶Pgl第75位甘氨酸突变为丝氨酸,得到高产琥珀酸的出发重组菌Mbmr-SA0。

[0038] mTbFrd是将解脂耶氏酵母线粒体基质蛋白细胞色素c氧化酶5b亚基的线粒体定位

序列 (Mitochondrial localization sequence,MLS,SEQ ID NO.9) 与可溶性延胡索酸还原酶TbFrd (T.brucei来源NAD依赖,SEQ ID NO.1) 融合获得,从而使得最终获得的工程菌中,延胡索酸还原酶过表达并重定位至线粒体基质;其中,线粒体定位信号肽 (SEQ ID NO.10) 位于融合蛋白的N端。

[0039] 所述苹果酸脱氢酶编码基因为苹果酸脱氢酶基因Y1Mdh2,其基因序列号为YALI0E14190p (Gene ID:2911503)。

[0040] 所述二羧酸转运蛋白编码基因SpMae1来自粟酒裂殖酵母,其核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0041] 本发明又一具体实施方式中,提供一种琥珀酸的工业化生产方法,所述工业化生产方法包括:对上述酵母工程菌株进行培养发酵。

[0042] 具体的,所述培养发酵方法包括:将上述酵母工程菌株置于YPD培养基进行发酵培养;

[0043] 更具体的,所述发酵培养方法包括:发酵培养阶段,温度控制为25-35℃ (优选为30℃),通气量为0.5-5vvm (优选为1.0vvm),搅拌速度控制为100-800rpm (优选为500rpm);

[0044] 更具体的,所述发酵培养方法中,还包括对发酵液中的葡萄糖浓度进行检测,当葡萄糖浓度低于10g/L时,进行补糖,补至50~60g/L;所述培养方法中,无需对pH进行调节,从而使得培养操作更为便捷并节约成本。

[0045] 其中,所述YPD培养基其包括:2%胰蛋白胨,1%酵母提取物,6%葡萄糖。

[0046] 本发明又一具体实施方式中,提供上述酵母工程菌株或上述工业化生产方法在化工、可降解材料、食品及医药工业领域中的应用。

[0047] 以下通过实施例对本发明做进一步解释说明,但不构成对本发明的限制。应理解这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0048] 实施例1

[0049] 一、材料和方法

[0050] 1、本发明中的基因合成由通用生物(安徽)股份有限公司完成;本发明中的引物合成及测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

[0051] 2、下面实施例中所使用的实验方法包括质粒构建、酶切、感受态细胞的制备、转化等如无特殊说明,均为常规方法。必要时可以通过简单实验确定具体实验条件。

[0052] 3、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。

[0053] 4、本发明所涉及的解脂耶氏酵母菌株Mbm<sub>r</sub>-SA0 (基因型MatA,xpr2-322,axp-2,leu2-270,ura3-302,ΔSdh5::loxP,ΔAch1::loxP,Y1Pyc,TbFrd,EcFum,Y1Mdh1和Pg1<sup>G75S</sup>),其以工程菌株PGC91 (MatA,xpr2-322,axp-2,leu2-270,ura3-302,ΔSdh5::loxP,ΔAch1::loxP,Y1Pyc,见“Cui,Z.,Gao,C.,Li,J.,Hou,J.,Lin,C.,&Qi,Q.(2017).Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH.*Metabolic engineering*,42,126-133.”和“CN107916275A一种利用具有还原TCA途径的解脂耶氏酵母菌株好氧合成琥珀酸的方法”)为基础构建完成。还涉及携带可回收筛选标记的过表达载体pKi-1,pKi-hyg,pKi-ura,113-GPD-TEF和JMP-hyg-GPD,其构建步骤见文献(Cui,Z.,Jiang,X.,Zheng,H.,Qi,Q.,&Hou,J.(2019).Homology-independent genome integration enables rapid



library construction for enzyme expression and pathway optimization in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and bioengineering*, 116 (2), 354-363.). JMP113 质粒和位点特异性重组酶过表达载体 pUB4-CRE 的构建见文献 (Fickers, P., Le Dall, M.T., Gaillardin, C., Thonart, P., & Nicaud, J.M. (2003). New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of microbiological methods*, 55 (3), 727-737.)。

[0054] 5、本发明所涉及的基因,其中来自布氏锥虫 *T. brucei* 的 TbFrd, 希瓦氏菌 *Shewanella frigidimarina* 的 SfFrd, 来自酿酒酵母 *S. cerevisiae* 的 ScOsm1, 来自谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 的 CgMdh, 来自大肠杆菌 *E. coli* 的 fumC, 来自粟酒裂殖酵母 *S. pombe* 的 SpMae 都经密码子优化后并合成 (通用生物, 滁州, 中国)。其中 Y1Mdh1 和 Y1Mdh2 基因克隆于解脂耶氏酵母基因组。

[0055] 6、LB 固体培养基: 10g/L 胰蛋白胨, 5g/L 酵母提取物, 10g/L 氯化钠, 20g/L 琼脂粉。

[0056] LB 液体培养基: 10g/L 胰蛋白胨, 5g/L 酵母提取物, 10g/L 氯化钠。

[0057] YPD 培养基: 10g/L 酵母提取物, 20g/L 蛋白胨, 20g/L 葡萄糖。

[0058] YPD 固体培养基: 10g/L 酵母提取物, 20g/L 蛋白胨, 20g/L 葡萄糖, 2wt% 琼脂粉。

[0059] SD 液体选择培养基: 26.7g/L SD 基本培养基, 添加适当浓度氨基酸缺失混合物, 调 pH 6.0。

[0060] SD 固体培养基: SD 液体选择培养基中添加 2wt% 琼脂粉。

[0061] 二、基因元件的扩增与目标质粒的制备

[0062] (一) 目标基因的制备

[0063] 1、根据 NCBI 上提供的来自 *T. brucei* 的 NADH 依赖延胡索酸还原酶基因 TbFrd (序列号 KT026107.1) 的核苷酸序列, 经过密码子优化后, 委托通用生物 (安徽) 股份有限公司合成优化后的 NADH 依赖延胡索酸还原酶基因 TbFrdY。TbFrdY 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

[0064] 2、根据 NCBI 上提供的来自 *S. cerevisiae* 的 FADH<sub>2</sub> 依赖延胡索酸还原酶基因 ScOsm1 (序列号 YJR051W) 的核苷酸序列经过密码子优化后, 委托通用生物 (安徽) 股份有限公司合成优化后的 FADH<sub>2</sub> 依赖延胡索酸还原酶基因 ScOsm1Y。ScOsm1Y 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

[0065] 3、根据 NCBI 上提供的来自 *Shewanella frigidimarina* 的电子传递依赖延胡索酸还原酶基因 SfFrd (GenBank: L04283.1) 的核苷酸序列经过密码子优化后, 委托通用生物 (安徽) 股份有限公司合成优化后的血红蛋白 SfFrdY。SfFrdY 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

[0066] 4、根据 NCBI 上提供的来自 *C. glutamicum* 的苹果酸脱氢酶编码基因 CgMdh (序列号 Cg12380) 的核苷酸序列经过密码子优化后, 委托通用生物 (安徽) 股份有限公司合成优化后的苹果酸脱氢酶编码基因 CgMdhY 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

[0067] 5、根据 NCBI 上提供的来自 *E. coli* 的延胡索酸酶编码基因 EcFum (序列号 b1611) 的核苷酸序列经过密码子优化后, 委托通用生物 (安徽) 股份有限公司合成优化后的延胡索酸酶编码基因 EcFumY 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示。

[0068] 6、根据 NCBI 上提供的来自 *S. pombe* 的 C4 二羧酸转运蛋白编码基因 SpMae (序列号

SPAPB8E5.03)的核苷酸序列经过密码子优化后,委托通用生物(安徽)股份有限公司合成优化后的C4二羧酸转运蛋白编码基因SpMaeY的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0069] 7、根据NCBI上提供的Yarrowia lipolytica苹果酸脱氢酶基因Y1Mdh1(序列号YALIOD16753p, Gene ID:2910208)和Y1Mdh2(序列号YALIOE14190p)以及6-磷酸葡萄糖酸内酯酶基因Pg1(序列号YALIO19085p, Gene ID:2909945)核苷酸序列,从Yarrowia lipolytica基因组中PCR获得。

[0070] (二)质粒的构建

[0071] 1、质粒pKi-TbFrd的构建

[0072] 根据经密码子优化以后的TbFrdY基因序列(SEQ ID NO.1),以及表达质粒pKi-1序列设计引物:

[0073] TbFrd-F:

[0074] ATAAGAATCATTCAAAGGTTATGGTGGACGGTTCGATCTTC

[0075] TbFrd-R:

[0076] ACATAACTAATTACATGATTTTAGGAGCCAGAGGGCTCGG

[0077] 以密码子优化合成的TbFrdY基因序列为模板,使用TbFrd-F/TbFrd-R引物PCR(聚合酶链式反应)扩增得到携带相应末端同源序列的组装片段。PCR反应条件:97℃预变性5min,94℃变性60s,56℃退火30s,72℃延伸3min,30个循环后72℃延伸10min,4℃保存。

[0078] pKi-1通过Bsp119 I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装克隆试剂盒(New England Biolabs (NEB), England)将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成pKi-TbFrd质粒。

[0079] 2、质粒113-Y1Mdh1-EcFum的构建

[0080] 根据经密码子优化以后的EcFumY基因序列(SEQ ID NO.5),Y1Mdh1基因序列(YALIOD16753p)以及表达质粒113-GPD-TEF序列设计引物:

[0081] Y1Mdh1-F:

[0082] CAGTACTAACCGCAGATTTATGTTCCGAACCCGAGTTAC

[0083] Y1Mdh1-R:

[0084] TAACTAATTACATGAATTTTAAAGGGTTCTGCTTGACAA

[0085] EcFum-F:

[0086] ATTAACACACATCAACAGATGATGAACACCGTGCGATC

[0087] EcFum-R:

[0088] GACAGGCCATGGAGGTACGTTATCGTCCGGCCTTCATAG

[0089] 分别以解脂耶氏酵母W29基因组和密码子优化合成的EcFumY基因序列为模板,使用Y1Mdh1-F/Y1Mdh1-R和EcFum-F/EcFum-R引物PCR扩增得到携带相应末端同源序列的组装片段。

[0090] 113-GPD-TEF通过SmiI和SalI内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成113-Y1Mdh1-EcFum质粒。

[0091] 3、Pg1<sup>G75S</sup>突变片段的构建

[0092] 根据NCBI中的解脂耶氏酵母6-磷酸葡萄糖酸内酯酶编码基因Pg1(YALIO19085p)及其上下游序列,以及质粒JMP113序列设计引物:

- [0093] Pg1-UP-F:  
[0094] AATTTATCTCATTGTCACCTCAAT  
[0095] Pg1-UP-R:  
[0096] TATTTTCGCGTCTCGGCCTCT  
[0097] Pg1-URA3-F:  
[0098] AGGCCGAGACGCGAAATAGATAACAGGGTAATTATCGCTTCG  
[0099] Pg1-URA3-R:  
[0100] TTGCTTGGTGGAGTCTGGGGATGATTACCCTGTTATCCCTACA  
[0101] Pg1-DN-F:  
[0102] CCCAGACTCCACCAAGCAA  
[0103] Pg1<sup>G75S</sup>-R  
[0104] TCAGCGAGCCGACGAAATGCCGATTCCGAA  
[0105] Pg1<sup>G75S</sup>-F  
[0106] GGCATTTCCGGCGTCTCGCTGATCCACGTGC  
[0107] Pg1-DN-R:  
[0108] GTGATTTTGAAGTCTTTTACTTGTG

[0109] 分别以解脂耶氏酵母W29基因组和JMP113质粒为模板,使用上述引物PCR扩增得到携带相应末端重叠序列的融合片段,随后通过重叠延伸PCR扩展得到第75位甘氨酸突变为丝氨酸的Pg1<sup>G75S</sup>片段。

#### [0110] 4、质粒pKi-mTbFrd的构建

[0111] 根据经密码子优化以后的TbFrdY基因序列 (SEQ ID NO.1),细胞色素c氧化酶5b亚基线粒体定位序列 (SEQ ID NO.9) 以及表达质粒pKi-1序列设计引物:

- [0112] UT8-MLS-F:  
[0113] TAAGAATCATTCAAAGGTTATGTTCCGCCCTGAGAAGATC  
[0114] MLS-R:  
[0115] GAATCGAGCAACCTGCTGGG  
[0116] mTbFrd-F:  
[0117] CCAGCAGTTGCTCGATTTCGTGGACGGTCGATCTTCCGC  
[0118] TbFrd-R:  
[0119] ACATAACTAATTACATGATTTTAGGAGCCAGAGGGCTCGG

[0120] 分别以解脂耶氏酵母W29基因组和密码子优化合成的TbFrdY基因序列为模板,使用 UT8-MLS-F/MLS-R和mTbFrd-F/TbFrd-R引物PCR扩增得到携带相应末端重叠序列的融合片段,随后通过重叠延伸PCR扩展得到组装片段。

[0121] pKi-1通过Bsp119 I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成pKi-mTbFrd质粒。

#### [0122] 5、质粒pKi-mSc0sm1的构建

[0123] 根据经密码子优化以后的Sc0sm1Y基因序列 (SEQ ID NO.2),细胞色素c氧化酶5b亚基线粒体定位序列 (MFALRRSLLSAGRIARPQQVARF, SEQ ID NO.9) 以及表达质粒pKi-1序列设计引物:

[0124] UT8-MLS-F:

[0125] TAAGAATCATTCAAAGGTTATGTTTCGCCCTGAGAAGATC

[0126] MLS-R:

[0127] GAATCGAGCAACCTGCTGGG

[0128] mSc0sm1-F:

[0129] CAGCAGGTTGCTCGATTCTTCGCCCTGCGACGATCTCT

[0130] mSc0sm1-R:

[0131] ATAATAATTACATGATTTTAGTACAGCTTGGAATGT

[0132] 分别以解脂耶氏酵母W29基因组和密码子优化合成的Sc0sm1Y基因序列为模板,使用 UT8-MLS-F/MLS-R和mSc0sm1-F/mSc0sm1-R引物PCR扩增得到携带相应末端重叠序列的融合片段,随后通过重叠延伸PCR扩展得到组装片段。

[0133] pKi-1通过Bsp119 I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成pKi-mSc0sm1质粒。

[0134] 6、质粒pKi-mSfFrd的构建

[0135] 根据经密码子优化以后的SfFrdY基因序列(SEQ ID NO.3),细胞色素c氧化酶5b亚基线粒体定位序列(SEQ ID NO.9)以及表达质粒pKi-1序列设计引物:

[0136] UT8-MLS-F:

[0137] TAAGAATCATTCAAAGGTTATGTTTCGCCCTGAGAAGATC

[0138] MLS-R:

[0139] GAATCGAGCAACCTGCTGGG

[0140] mSfFrd-F:

[0141] CCAGCAGGTTGCTCGATTCAAGAAGATGAACCTGGCCGT

[0142] mSfFrd-R:

[0143] CATAACTAATTACATGATTTTAGTTCTTCTTAGAGTACT

[0144] 分别以解脂耶氏酵母W29基因组和密码子优化合成的SfFrdY基因序列为模板,使用 UT8-MLS-F/MLS-R和mSfFrd-F/mSfFrd-R引物PCR扩增得到携带相应末端重叠序列的融合片段,随后通过重叠延伸PCR扩展得到组装片段。

[0145] pKi-1通过Bsp119 I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成pKi-mSfFrd质粒。

[0146] 7、质粒113-GPD-Y1Mdh1的构建

[0147] 根据NCBI中的Y1Mdh1基因序列(YAL10D16753p),以及表达质粒113-GPD-TEF序列设计引物:

[0148] Y1Mdh1-F:

[0149] ATTAACACACATCAACAGATGTTCCGAACCCGAGTTAC

[0150] Y1Mdh1-R:

[0151] GACAGGCCATGGAGGTACGTTAAGGGTTCTGCTTGACAA

[0152] 以解脂耶氏酵母W29基因组为模板,使用Y1Mdh1-F/Y1Mdh1-R引物PCR扩增得到携带相应末端同源序列的组装片段。

[0153] 113-GPD-TEF通过SalI内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装克隆试剂盒(New

England Biolabs (NEB) ,England) 将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成113-GPD-Y1Mdh1质粒。

[0154] 8、质粒113-GPD-Y1Mdh2的构建

[0155] 根据NCBI中的Y1Mdh2基因序列 (YALIOE14190p),以及表达质粒113-GPD-TEF序列设计引物:

[0156] Y1Mdh2-F:

[0157] ATTAACACACATCAACAGATGGTTAAAGCTGTCGTTGC

[0158] Y1Mdh2-R:

[0159] GACAGGCCATGGAGGTACGCTAGTTGGCAGGAGGAGGGT

[0160] 以解脂耶氏酵母W29基因组为模板,使用Y1Mdh2-F/Y1Mdh2-R引物PCR扩增得到携带相应末端同源序列的组装片段。

[0161] 113-GPD-TEF通过SalI内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装克隆试剂盒(New England Biolabs (NEB) ,England) 将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成113-GPD-Y1Mdh2质粒。

[0162] 9、质粒113-GPD-CgMdh的构建

[0163] 根据经密码子优化以后的CgMdh基因序列 (SEQ ID NO.4),以及表达质粒113-GPD-TEF序列设计引物:

[0164] CgMdh-F:

[0165] ATTAACACACATCAACAGATGAACTCTCCCCAGAACGT

[0166] CgMdh-R:

[0167] GACAGGCCATGGAGGTACGTTACAGCAGATCTCGCACGG

[0168] 以解脂耶氏酵母W29基因组为模板,使用CgMdh-F/CgMdh-R引物PCR扩增得到携带相应末端同源序列的组装片段。

[0169] 113-GPD-TEF通过SalI内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装克隆试剂盒(New England Biolabs (NEB) ,England) 将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成113-GPD-CgMdh质粒。

[0170] 10、质粒113-Y1Mdh2-mEcFum的构建

[0171] 根据经密码子优化以后的EcFumY基因序列 (SEQ ID NO.5),细胞色素c氧化酶5b亚基线粒体定位序列 (SEQ ID NO.9) 以及表达质粒113-GPD-Y1Mdh2序列设计引物:

[0172] pTEFin-MLS-F:

[0173] TTTGCAGTACTAACCGCAGTTCGCCCTGAGAAGATCTCT

[0174] MLS-R:

[0175] GAATCGAGCAACCTGCTGGG

[0176] mEcFum-F:

[0177] CCCAGCAGGTTGCTCGATTCATGAACACCGTGCGATCTG

[0178] mEcFum-R:

[0179] CATAACTAATTACATGAATTTATCGTCCGGCCTTCATAG

[0180] 分别以解脂耶氏酵母W29基因组和密码子优化合成的SfFrdY基因序列为模板,使用 UT8-MLS-F/MLS-R和mEcFum-F/mEcFum-R引物PCR扩增得到携带相应末端重叠序列的融

合片段,随后通过重叠延伸PCR扩展得到组装片段。

[0181] 113-GPD-Y1Mdh2通过Smi I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装克隆试剂盒(New England Biolabs (NEB), England)将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成113-Y1Mdh2-mEcFum质粒。

[0182] 11、质粒pKi-hyg-SpMae的构建

[0183] 根据经密码子优化以后的SpMaeY基因序列(SEQ ID NO.6),以及表达质粒pKi-hyg序列设计引物:

[0184] SpMae-F:

[0185] TAAGAATCATTCAAAGGTTATGGGCGAGCTGAAGGAAAT

[0186] SpMae-R:

[0187] ACATAACTAATTACATGATTTTAGGAGCCAGAGGGCTCGG

[0188] 以密码子优化合成的SpMaeY基因序列为模板,使用SpMae-F/SpMae-R引物PCR扩增得到携带相应末端同源序列的组装片段。

[0189] pKi-hyg通过Bsp119 I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成pKi-hyg-SpMae质粒。

[0190] 12、质粒YLEP-hrGFP的构建

[0191] 根据经密码子优化以后的hrGFP基因序列(SEQ ID NO.7),以及游离表达载体YLEP-leu序列设计引物:

[0192] hrGFP-F:

[0193] TAAGAATCATTCAAAGGTTATGGTGAGCAAGCAGATCCT

[0194] hrGFP-R:

[0195] CATAACTAATTACATGATTTTACACCCACTCGTGCAGGC

[0196] 以密码子优化合成的hrGFP基因序列为模板,使用hrGFP-F/hrGFP-R引物PCR扩增得到携带相应末端同源序列的组装片段。

[0197] YLEP-leu通过Bsp119 I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装将上述酶切片段和PCR产物连接,构建完成YLEP-hrGFP质粒。

[0198] 13、质粒YLEP-MLS-mCherry的构建

[0199] 根据经密码子优化以后的mCherry基因序列(SEQ ID NO.8),细胞色素c氧化酶5b亚基线粒体定位序列(SEQ ID NO.9)以及游离表达载体YLEP-leu序列设计引物:

[0200] UT8-MLS-F:

[0201] TAAGAATCATTCAAAGGTTATGTTCCGCTGAGAAGATC

[0202] MLS-R:

[0203] GAATCGAGCAACCTGCTGGG

[0204] mCherry-F:

[0205] ACTGCACACGACCTCGCTGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGA

[0206] mCherry-R:

[0207] CATAACTAATTACATGATTCTACTTGTACAGCTCGTCCA

[0208] 分别以解脂耶氏酵母W29基因组和密码子优化合成的mCherry基因序列为模板,使用UT8-MLS-F/MLS-R和mCherry-F/mCherry-R引物PCR扩增得到携带相应末端重叠序列的

融合片段,随后通过重叠延伸PCR扩展得到组装片段。

[0209] YLEP-leu通过Bsp119 I内切酶消化后,回收纯化。利用Gibson组装将上述酶切片段和 PCR产物连接,构建完成YLEP-MLS-mCherry质粒。

[0210] 实施例2延胡索酸还原酶的线粒体定位及其对琥珀酸合成影响

[0211] 本实施例采用非同源依赖的重组 (NHEJ) 转化方式,将含有TbFrd、Y1Mdh1和EcFum基因表达盒的线性化质粒pKi-TbFrd和113-Y1Mdh1-EcFum导入工程菌株Yarrowia lipolytica PGC91中,并通过同源重组将6-磷酸葡萄糖酸内酯酶Pgl第75位甘氨酸突变为丝氨酸,得到高产琥珀酸的出发重组菌Mbmr-SA0。

[0212] 具体方法如下:(1)Yarrowia lipolytica PGC91于YPG液体培养基(含有2%蛋白胨、1%酵母提取物和2%甘油)中过夜培养后,采用常规酵母醋酸锂感受态制备方法制备感受态细胞。(2)向40 $\mu$ L感受态细胞中分别加入2 $\mu$ L pKi-TbFrd和113-Y1Mdh1-EcFum质粒片段,再加入2 $\mu$ L鲑鱼精DNA,30 $^{\circ}$ C水浴培养15min。(3)向上述体系中加入350 $\mu$ L PEG 4000-Lithium Acetate (0.1M pH 6.0) 及16 $\mu$ L 1MDTT (40mM),30 $^{\circ}$ C水浴静止培养1h。(4)向上述体系中加40 $\mu$ LDMSO(终浓度约40%),39 $^{\circ}$ C热击10min。(5)加600 $\mu$ L Lithium Acetate (0.1 M pH6.0),室温放置15min。(6)取200 $\mu$ L上述混合物涂布SD筛选平板,30 $^{\circ}$ C培养2-3天。(6)随机挑选转化子,摇瓶发酵并对发酵液中的琥珀酸进行检测。

[0213] 琥珀酸的发酵和检测方法,简言之:将上述平板上长出的单菌落接入装有10mL的YPG 液体培养基(2%蛋白胨,1%酵母粉,2%甘油)的50mL三角瓶中,30 $^{\circ}$ C,220rpm转速振荡培养活化。分别取1mL活化的培养液转接到装有50ml发酵培养基(2%蛋白胨,1%酵母粉,6%葡萄糖)的250mL三角瓶中,30 $^{\circ}$ C,120rpm培养96h,发酵过程中不外源添加酸碱剂维持发酵液中性pH值。发酵过程中,每间隔12-24h取样,然后再600nm波长下检测菌液的光吸收值。即取1mL菌液10,000-12,000rpm转速离心2min。弃去上清,用等体积的 H<sub>2</sub>O重悬,稀释至合适倍数后使用分光光度计检测其光吸收值。发酵液中的碳源和有机酸等代谢物采用高压液相色谱仪(HPLC)分析。具体方法为取1mL发酵液室温下12,000rpm离心2min,取上清,然后用孔径为0.22 $\mu$ m的微孔滤膜过滤,用高效液相色谱检测有机酸和葡萄糖浓度。检测条件为:色谱柱为HPX-87H (BioRad Labs,300mm $\times$ 7.8mm),检测器为示差折光检测器RID-10A,柱温为65 $^{\circ}$ C,流动相为5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液,流速为0.6ml/min。(7) 挑选琥珀酸产量和转化率较高的转化子,将pUB4-CRE质粒导入该高产菌株。YPG-hyg培养基中30 $^{\circ}$ C培养1-2d,CRE重组酶组成型表达。利用接种环蘸取菌液在YPG-hyg筛选平板上划线,将长出的单克隆同时转入SD筛选平板和YPG-hyg平板上培养,在YPG-hyg平板上生长而在SD平板上不生长的筛选标记基因已被CRE重组酶删除。将得到的阳性重组子在YPG 培养基中连续传代2-3d,筛选出去除pUB4-CRE质粒的工程菌株。(8) 将Pgl<sup>G75S</sup>突变片段转化上述去除筛选标记的琥珀酸高产菌株,涂布SD筛选平板。挑选阳性转化子,利用引物 F:5' -ACGACTCAACAAGACACAAAG-3' 和 R:5' -ACATGATGGACTCTTCATTG-3' 验证。

[0214] 2、利用在线预测工具MITOPROT (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) 鉴定出解脂耶氏酵母线粒体基质蛋白细胞色素c氧化酶5b亚基的线粒体定位序列(Mitochondrial localization sequence,MLS)。为了验证MLS序列的功能,将含有23个氨基酸的该定位序列(MFALRRSLLSAGRIARPQQVARF)融合至红色荧光蛋白mCherry的N端,转化解脂耶氏酵母野生型菌株Po1f并分析其胞内荧光分布。

[0215] 具体方法如下：(1) *Yarrowia lipolytica* Po1f于YPD液体培养基(含有2%蛋白胨、1%酵母提取物和2%葡萄糖)中过夜培养后,采用常规酵母醋酸锂感受态制备方法制备感受态细胞。(2) 将YLEP-hrGFP和YLEP-MLS-mCherry质粒转化Po1f感受态,涂布SD筛选平板,30℃培养2-3天。(3) 随机挑选转化子,在含有相应SD筛选液体培养基的24孔深孔板中培养24h并检测荧光表达强度。(4) 挑选荧光强度较高的培养物进行荧光显微镜检查。由如图2可知携带线粒体定位信号的mCherry表达状况良好,并且荧光分布比较聚集符合线粒体定位的特征,而作为对照的绿色荧光蛋白hrGFP表达后呈现均匀分布。说明了N端MLS信号序列可以将目的蛋白靶向线粒体基质。

[0216] 3、将线粒体靶向信号MLS添加至三种不同类型的可溶性延胡索酸还原酶TbFrd(*T. brucei*来源NAD依赖)、ScOsm1(酿酒酵母来源FAD依赖)和SfFrd(希瓦氏菌来源电子传递依赖)。采用非同源重组转化(NHEJ)方式,将线性化的pKi-mTbFrd、pKi-mScOsm1和pKi-mSfFrd质粒分别导入Mbm- SA0菌株,对比分析琥珀酸合成与细胞生长情况。如图3所示,TbFrd的线粒体定位能够显著提高解脂耶氏酵母菌株Mbm- SA1的琥珀酸合成能力,琥珀酸产量和产率分别提高至30.4g/L和0.84g/g葡萄糖。mScOsm1过表达菌株的琥珀酸转化率提高至0.75g/g葡萄糖,但是琥珀酸产量相比对照下降18.3%。尽管mSfFrd的过表达能够使得琥珀酸产量提高至22.8g/L,琥珀酸转化率却有所下降。以上实验结果表明,*T. brucei*来源TbFrd能够利用线粒体中氧化TCA循环产生的NADH进行丁二酸合成。

[0217] 实施例3还原TCA途径相关基因的组合过表达

[0218] 为了进一步提高菌株琥珀酸产量,本实施例分别将线性化质粒113-GPD-Y1Mdh1、113-GPD-Y1Mdh2和113-GPD-CgMdh整合至mTbFRD过表达菌株Mbm- SA1中,YPD摇瓶发酵结果如图4所示。结果显示三种苹果酸脱氢酶的单独过表达均对Mbm- SA1的琥珀酸产量有提高作用,其中Y1Mdh2基因过表达Mbm- SA2菌株的琥珀酸产量提高了32.9%,约为40.4 g/L。本发明进一步在工程菌株Mbm- SA2中过表达线粒体定位的延胡索酸酶编码基因 mEcFum获得菌株Mbm- SA3。经筛选挑取转化子进行摇瓶发酵,结果如图4所示,Mbm- SA3菌株的琥珀酸产量和转化率均相较对照有所下降,分别为39.8g/L和0.84g/g葡萄糖。

[0219] 增强终产物的胞外分泌不仅可以减少其过量积累造成的细胞毒性,而且有助于解除代谢途径中的反馈抑制。因此,本发明在Mbm- SA3菌株基础上进一步过表达了二羧酸转运蛋白SpMae1。由图4可知,SpMae1过表达菌株Mbm- SA4的丁二酸产量、产率和OD<sub>600</sub>分别达到最高水平,约为46.7g/L、0.86g/g葡萄糖和11.3。琥珀酸产量和转化率已达到目前报道的最高摇瓶水平,具有工业化应用前景。

[0220] 实施例4 Mbm- SA4菌株的连续补料发酵培养

[0221] 将实施例2中所述基因工程构建的高产琥珀酸的解脂耶氏酵母Mbm- SA4在1L发酵罐中进行连续补料发酵实验,本实施例选用的培养基为YPD培养基(2%胰蛋白胨,1%酵母提取物,6%葡萄糖),初始体积为0.6L。从甘油保种管中取出菌液在YPD固体平板上划线,培养36h。将长起来的单克隆接种到1瓶含有50mL YPD培养基的摇瓶中,30℃,220rpm培养24h,将此种子接种到发酵罐中。发酵罐的设定温度为30℃,通气量为1.0vvm,搅拌速度500rpm,不进行pH调节。每个6小时取样检测发酵罐中葡萄糖浓度,当葡萄糖浓度低于10 g/L时,补糖至60g/L。同时对样品的琥珀酸以及菌体的生物量进行检测。图5显示发酵结果,相比摇瓶发酵,前54h丁二酸生产速率较快,琥珀酸生产力可达0.8g/h/L。在发酵96h时,菌体



$OD_{600}$  为 12.5, 琥珀酸的产量和转化率分别为 50.1g/L 和 0.75g/g 葡萄糖。

[0222] 本发明未尽事宜为公知技术。

[0223] 以上所述仅为本发明的优选实施例, 并不用于限制本发明, 对于本领域的技术人员来说, 本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 山东大学

&lt;120&gt; 具有线粒体定位还原TCA途径的高产琥珀酸酵母工程菌株及其构建方法和应用

&lt;130&gt;

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3420

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

```
atggtggacg gtcgatcttc cgctccatc gtcgccgtcg accccgagcg agccgctcga 60
gagcgagacg ctgccgctcg agccctgctg caggactccc ctctgcacac caccatgcag 120
tacgccacct ccggcctgga gctgaccgtc ctttacgcc tgaaggtcgt cgctccgcc 180
gacaccttcg accgagccaa ggaggtcgcc gacgaggtgc tgcgatgcgc ctggcagctg 240
gccgacaccg tgctgaactc tttcaacccc aactctgagg tctctctggt cggtcgactg 300
cccgtcggcc agaagcacca gatgtccgcc ccctgaagc gagtcatggc ctggtgccag 360
cgagtctaca actcctccgc cggttgtttc gaccctctc cggccccctg ggccaaggct 420
ctgcgagaga ttgccctggg taaagagcga aacaacgcct gcctggaggc cctgaccag 480
gcctgtacc tgcccaactc cttcgtgatt gacttcgagg ccggcaccat ctctcgaaag 540
cacgagcacg cctctctgga cctgggcggt gtctccaagg gttacattgt ggactacgtg 600
atcgacaaca tcaacgccg cggttccag aacgtctct tgcactgggg cggcgactgc 660
cgagcctctg gtatgaacgc ccgaaacacc ccctgggtcg tgggcattac ccgaccccc 720
tccctggaca tgctgcccaa ccccccaag gaggctctct acatctccgt gatctccctg 780
gacaacgagg ccctggccac ctctggtgac tacgagaacc tgatctacac cgccgacgac 840
aagcccctga cctgtaccta cgactggaag ggcaaggagc tgatgaagcc ctctcagtct 900
aacatcgccc aggtctctgt caagtgttac tccgcatgt acgccgacgc cctggccact 960
gcctgtttca ttaagcgaga ccccgcaag gtccgacagc tgctggacgg ttggcgatac 1020
gtccgagaca ccgtccgaga ctaccgagtc tacgtccgag agaacgagcg agtcgccaag 1080
atgttcgaga ttgccaccga ggacgccgag atgcgaaagc gacgaatctc taacaccctg 1140
cccgcccgag tcatcgtggt cggtggtggc ctggccggtc tgtccgctgc tattgaggcc 1200
gccggttggt gcgcccaggt ggttctgatg gagaaggagg ccaagctggg tggtaactct 1260
gccaaaggcca cctccggaat taacggttg ggcaccgag cccaggcca ggcttccatt 1320
gtggacgggt gcaagtactt cgagcgagac acctacaagt ccggtatcgg tggtaacacc 1380
gaccccgcc ttggtcaagac cctgtccatg aagtctgcc agccattgg ctggctgacc 1440
tccctgggtg tccccctgac cgtgetgtcc cagctgggcg gacactccc aaagcgaacc 1500
caccgagccc ccgacaagaa ggacggcacc ccctgccc ttggcttcac cattatgaag 1560
```

accctggagg accacgtccg aggcaacctg tctggccgaa tcaccatcat ggagaactgc 1620  
 tccgtcacct cctgtctgtc cgagaccaag gagegacccg acggcaccaa gcagatccga 1680  
 gtcaccgggtg tggagttcac ccaggccggc tccggtaaaa ccaccatcct ggccgacgcc 1740  
 gtgatcctgg ccaccggagg tttctccaac gacaagaccg ccgactccct gctgcgagag 1800  
 cacgcccctc acctggtcaa cttccccacc accaacggtc cctgggccac cggagacggt 1860  
 gtcaagctgg cccagcgact gggtgcccag ctggtcgaca tggacaaggt ccagctgcac 1920  
 cccaccggtc tgattaacct caaggacccc gccaaccca ccaagttcct gggccccgag 1980  
 gccctgcgag gctctggtgg tgtgtctgtg aacaagcagg gcaagcgatt cgtgaacgag 2040  
 ctggacctgc gatctgtcgt ctccaaggcc atcatggagc agggtgccga gtaccccgtt 2100  
 tccggtggtt ccatgttcgc ctactgtgtc ctgaacgccg ccgcccagaa gctgttcggc 2160  
 gtctcttccc acgagtteta ctggaagaag atgggectgt tegtcaaggc cgacaccatg 2220  
 cgagacctgg ccgccctgat tggttgcccc gtggagtccg tgcagcagac cctggaggag 2280  
 tacgagcgac tgtccatttc ccagcgatct tgccccatta ccgaaagtc cgtgtacccc 2340  
 tgcgtcctgg gcaccaaggg ccctactac gtcgecttcg tcaccacctc cattcactac 2400  
 accatgggtg gttgectgat ttccccctcc gccgagatcc agatgaagaa cacctcctct 2460  
 cgagcccccc tgtcccactc caaccctatc ctgggtctgt tcggtgccgg cgaggtgacc 2520  
 ggcggtgtcc atggtggcaa ccgactgggc ggcaactccc tgctggagtg tgtcgtcttc 2580  
 ggccgaatcg ccggcgaccg agcctctacc atcctgcagc gaaagtctc cgccctgtct 2640  
 ttcaagggtg ggaccaccgt ggtcctgcga gaggtccgag agggcggtgt gtacggcgcc 2700  
 ggttcccagag tgctgcgatt caacctgccg ggcgccctgc agcgatctgg cttttctctg 2760  
 ggccagttca ttgccatccg aggcgactgg gacggtcagc agctgatcgg ttactactct 2820  
 cccatcacc tgcccagcga cctgggtatg atcgacattc tggcccgatc tgacaagggc 2880  
 accctgcgag agtggatttc tgccctggag cccggcgacg ccgctcgagat gaaggcctgt 2940  
 ggcggtctgg tcatcgagcg acgactgtct gacaagcact tegtgttcat gggccacatc 3000  
 atcaacaagc tgtgtctgat cgccggcggt accggcgtcg ccctatgct tcagatcatt 3060  
 aaggccgcct tcatgaagcc cttcattgac accctggagt ctgtgcacct gatctacgcc 3120  
 gccgaggacg tcaccgagct gacctaccga gaggtgctgg aggagcgacg acgagagtcc 3180  
 cgaggcaagt tcaagaagac cttcgtgtg aaccgacccc cccccctgtg gaccgacgga 3240  
 gttggattca ttgaccgagg tattctgacc aaccacgtcc agccccctc tgacaacctg 3300  
 ctggtggcca tttgcggccc ccccgctatg cagcgaatcg tgaaggccac cctgaagacc 3360  
 ctgggctaca acatgaacct ggtgcgaacc gtggacgaga ccgagccctc tggctcctaa 3420  
 <210> 2  
 <211> 1506  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <400> 2  
 atgatccgat ccgtgcgacg agtgttcac taccgtgtcta tcttcgtgct gatcattgtg 60  
 ctgaagcgaa ccctgtctgg caccgaccag acctctatga agcagcccgt ggtggtgatc 120  
 ggctctggcc tggccggcct gaccacctct aaccgactga tctctaagta cagaatcccc 180

gtggtgctgc tggacaaggc tgcctctatc ggccgcaact ctatcaaggc ctcttctggc 240  
 atcaacggcg cccacaccga cactcagcag aacctgaagg tgatggatac ccctgagctg 300  
 ttctgaagg acaccctgca ctctgccaag ggccgaggcg tgccctctct gatggacaag 360  
 ctgaccaagg aatctaagtc tgccatccga tggctgcaga ccgagttcga cctgaagctg 420  
 gacctgctcg cccagctcgg cggacactct gtgccccgaa ctcaccgatc ttccggcaag 480  
 ctgcctcctg gcttcgagat tgtgcaggcc ctgtctaaga agctcaagga catctcttcc 540  
 aaggactcta acctggtgca gatcatgctg aactctgagg tgggtggacat cgagctggac 600  
 aaccagggcc acgtgaccgg cgtggtgtac atggacgaga acggcaaccg aaagatcatg 660  
 aagtctcacc acgtcgtgtt ctgctctggc ggcttcggat actctaagga aatgctgaag 720  
 gaatactctc ccaacctgat tcatctgccc accaccaacg gcaagcagac caccggcgac 780  
 ggccagaaga tcctgtccaa gctgggagcc gagctgatcg acatggacca ggtccaggtg 840  
 caccaccg gcttcatcga ccccaacgac cgagagaaca actggaagtt cctggccgct 900  
 gaggccctgc gaggactcgg cggaatcctg ctgcacccta cactggccg acgattcacc 960  
 aacgagctgt ctaccggaga caccgtgacc atggaaatcc agtctaagtg cccaagaac 1020  
 gacaacagag ccctgctggt gatgtctgac aaggtgtac agaactacac caacaacatc 1080  
 aacttctaca tgtccaagaa cctgatcaag aaggtgtcta tcaacgacct gatccgacag 1140  
 tacgacctgc agaccactgc ctccgagctg gtcaccgagc tgaagtctta ctctgacgtg 1200  
 aacaccaagg acaccttga ccgacctctg atcatcaacg ccttcgacaa ggacatttct 1260  
 accgagtcta ccgtgtacgt cggcgaggctg acccctgtgg tgcacttcac catgggcgga 1320  
 gtgaagatca acgagaagtc tcaggtgatt aagaagaact ccgagtctgt cctgtctaac 1380  
 ggcattctcg ctgctggcga ggtgtctggc ggagtgcac gcgccaaccg actcggagga 1440  
 tcttccctgc ttgagtgcgt ggtgttcggc aagaccgccg ctgacaacat tgccaagctg 1500  
 tactaa 1506

<210> 3

<211> 1791

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atgaagaaga tgaacctggc cgtctgtatc gctaccctga tgggcaccgc cggactcatg 60  
 ggaaccgccg tggccgccga caacctggct gagttccacg tgcagaacca ggaatgcgac 120  
 tcttgtcaca cccctgacgg cgagctgtct aacgactctc tgacctacga gaacaccag 180  
 tgcgtgtctt gccacggcac cctggccgag gtggccgaga ctaccaagca cgagcactac 240  
 aacgccccag cctctcaact ccccggcgag gtcgectgca cctcttgcca ctctgcccc 300  
 gagaagtcta tgggtgactg cgactctgac cactctttcg acttcaacat gcctacgcc 360  
 aagaagtggc tgcgggacga gcccaccatt gccgagctgg ccaaggacaa gtctgagcga 420  
 caggccgctc tggcctctgc tccccacgac accgtggacg tgggtggtgg cggctctggc 480  
 ggagccggct tctctgccgc catctctgcc accgactctg gcgccaaggt gatcctgatc 540  
 gagaaggaac ccgtgatcgg cggcaacgcc aagctggccg ctggcgcat gaacgccgcc 600  
 tggaccgacc agcagaaggc caagaagatt accgactctc ccgagctgat gttcgaggac 660

accatgaagg gcgccagaa catcaacgac cccgctctgg tgaagtgct gtcctctcac 720  
 tctaaggact ctgtggactg gatgaccgcc atgggagccg acctgaccga cgtgggcatg 780  
 atgggaggag cctctgtgaa cagagcccac cgacctaccg gcggagctgg cgtgggagcc 840  
 catgtggtgc aggtcctgta cgacaacgcc gtgaagcgaa acatcgacct gcgaatgaac 900  
 acccgaggca tcgaggtgct gaaggacgac aagggcaccg tgaaggcat cctggtcaag 960  
 ggcatgtaca agggctacta ctgggtgaag gccgacgccg tgatcctggc caccggcggc 1020  
 ttcgccaaga acaacgagcg agtggctaag ctggaccctt cgctgaaggg cttcatctct 1080  
 accaaccagc ctggcgccgt cggcgacgga ctggacgtcg ccgagaacgc tgggagcggc 1140  
 ctgaaggaca tgcagtacat ccaggtctac cccactctgt ctgtcaaggg cggcgtgatg 1200  
 gtgaccgagg ccgtgcgagg caacggcgcc atcctggtga accgagaggg caagcgattc 1260  
 gtgaacgaga tcaactaccg agacaaggcc tccgccgcca ttctggcca gaccggcaag 1320  
 tctgcctacc tgatcttcca cgactctgtg cgaaagtctc tgtctaagat cgacaagtac 1380  
 atcggcctgg gcgtcgcccc taccgtgac tccctggtga agctgggcaa gatggaaggc 1440  
 atcgacggca aggcctgac cgagactgtg gcccgataca actctctggt gtcgtctggc 1500  
 aaggacaccg acttcgagcg acccaacctg cctcgggctc tgaacgaggg caactactac 1560  
 gccattgagg tgacccttgg cgtgcaccac accatgggag gcgtgatgat cgacaccaag 1620  
 gccgaggtca tgaacgctaa gaagcaggtc atccccggcc tgtacggcgc tggcgaggtg 1680  
 accggcggtg tgcacggcgc caaccgactc ggaggaaacg ccatctccga catcatcacc 1740  
 ttcggccgac tggccggcga ggaagccgcc aagtactcta agaagaacta a 1791

<210> 4

<211> 987

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atgaactctc ccagaacgt gtctaccaag aaggtgaccg tcaccggcgc tgccggccag 60  
 atctcttact ctctgctgtg gcgaatcgcc aacggcgagg tgttcggcac cgacactccc 120  
 gtcgagctga agctgctcga gattccccag gctctcggcg gagccgaggg cgtcgccatg 180  
 gaactgctgg actctgcttt ccctctgctg cgaaacatca ccatcaccgc cgacgccaac 240  
 gaggccttcg acggcgccaa cgccgccttc ctgggtggcg ctaagccccg aggcaagggc 300  
 gaagaacgag ccgacctgct ggccaacaac ggcaagatct tcggaccca aggcaaggcc 360  
 atcaacgaca acgccgctga cgacatccga gtgctggtgg tgggcaacc cccaacacc 420  
 aacgctctga tcgcctctgc cgtgctccc gacgtcccc cctctcgatt caacgccatg 480  
 atgcgactgg accacaaccg agccatctct cagctggcca ccaagctcgg acgaggctct 540  
 gccgagttca acaacatcgt ggtgtggggc aaccactctg ccaactcagtt ccccgacatc 600  
 acctacgcca ccgtcggcgg cgagaaggtc accgacctgg tggaccacga ctggtacgtg 660  
 gaagagttca tccccgagt ggccaaccga ggcgccgaga tcatcgaggt gcgaggcaag 720  
 tcctccgccg cttctgccgc ctcttccgcc atcgaccaca tgcgagactg ggtgcaggga 780  
 accgaggcct ggtcctccgc tgetatccc tctaccggcg cctacggcat ccccgagggc 840  
 atcttcgtgg gactgcccac cgtgtctcga aacggcgagt gggagatcgt cgagggactc 900

gagatctctg acttccagcg agcccgaatc gacgctaacg cccaagagct gcaggccgag 960  
cgagaggccg tgcgagatct gctgtaa 987

<210> 5

<211> 1404

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

atgaacaccg tgcgatctga gaaggactct atgggcgcca tcgacgtgcc cgccgacaag 60  
ctgtggggcg ctcagaccca gcgatctctc gagcaattcc gaatctctac cgagaagatg 120  
cccacctctc tgatccacgc tctggccttg accaagcgag ccgccgctaa ggtgaacgag 180  
gacctgggcc tgctgtctga ggaaaaggcc tctgccatcc gacaggccgc cgacgaggtg 240  
ctggctggac agcacgacga cgagttccct ctggccatct ggcagaccgg ctctggcacc 300  
cagtctaaca tgaacatgaa cgaggttctg gccaacggag cctctgagct gctcggcggc 360  
gtgcgaggca tggaacgaaa ggtgcacccc aacgacgacg tgaacaagtc tcagtctctt 420  
aacgacgtgt tccccaccgc catgcacgtg gccgctctgc tggccctgcg aaagcagctg 480  
attccccagc tcaagaccct gactcagacc ctgaacgaga agtctcgagc cttcgccgac 540  
atcgtgaaga tcggacgaac ccacctccag gacgctaccc ctctgactct gggccaagag 600  
atctccggct gggctcgccat gctggaacac aacctgaagc acattgagta ctcgctgccc 660  
cacgtcgccg agctggccct cggcggcacc gccgtcgga ccggcctgaa cactcacccc 720  
gagtacgccc gacgagtggc cgacgagctg gctgtgatca cctgtgctcc cttcgtgacc 780  
gctcctaaca agttcgaggc cctggccacc tgtgacgccc tgggtgcaggc ccacggcgcc 840  
ctgaagggcc tcgccgcttc tctgatgaag atcgccaacg acgtccgatg gctggcctct 900  
ggacccccgat gtggcatcgg cgagatctct atccccgaga acgagcccgg atctttctatc 960  
atgccccgca aggtgaaccc cactcagtgc gaggctctga ccatgctgtg ctgccaggtg 1020  
atgggcaacg acgtggccat caacatgggc ggagcctctg gcaacttcga gctgaacgtg 1080  
ttccgacctg tggatgatcca caactttctg cagtctgtgc gactgctggc cgacggcatg 1140  
gaatctttca acaagcactg tgccgtgggc atcgagccca accgagagcg aatcaaccag 1200  
ctgctgaacg agtctctgat gctggtcacc gctctgaaca cccacatcgg ctacgacaag 1260  
gccgctgaga ttgccaagaa ggcccacaag gaaggactga ccctgaaggc tgccgctctg 1320  
gctctgggat acctgtccga ggccgagttc gactcttggg tgcgaccgga gcagatgggtg 1380  
ggctctatga aggccggacg ataa 1404

<210> 6

<211> 1317

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

atgggcgagc tgaaggaaat cctgaagcag cgataccacg agctgctgga ctggaacgtg 60  
aaggcccctc acgtgcccct gtctcagcga ctgaagcact tcacctggtc ctggttcgcc 120  
tgcacatgga ccaccggcgg agtgggcctg attatcggtt ctttcccctt ccgattctac 180

ggctgaaca ccatcggcaa gatcgtgat atcctgcaga tcttctgtt ctctctgttc 240  
 ggctcttgca tgctgttccg attcatcaag taccctcta ccatcaagga ctcttggaac 300  
 caccacctcg agaagctgtt cattgccacc tgtctgctgt ctatctctac ctcatcgac 360  
 atgctggcca tctacgctta ccccacacc ggtgagtgga tgggtgtggg gatccgaatc 420  
 ctgtactaca tctacgtggc cgtgtctttc atctactgcg tgatggcctt cttcaccatc 480  
 ttcaacaacc acgtgtacac catcgagact gcttctccc cctggattct gcctatcttc 540  
 cctcctatga tctcggcgt gatcgtggc gccgtgaact ctaccagcc tgctcaccag 600  
 ctgaagaaca tggatgattt cggcatcctg ttccaaggcc tcggcttctg ggtgtacctg 660  
 ctgctgttcg ccgtcaacgt gctgcgattc ttaccgtcg gcctggctaa gccccaggac 720  
 cgacctggca tgttcatgtt cgtgggacct ccagccttct ctggactggc cctgatcaac 780  
 attgcccagag gcgccatggg ctctcgacc tacattttcg tgggcgcaa ctcttctgag 840  
 tacctgggct tcgtgtccac ctcatggcc atcttcatct ggggcctcgc cgctgggtgc 900  
 tactgcctgg ctatggtgtc tttcctggcc ggcttcttca ctcgagcccc tctgaagttc 960  
 gcctgtggct ggttcgcttt catcttccc aacgtgggat tcgtgaactg caccattgag 1020  
 atcggaaaga tgatcgactc taaggccttc cagatgttc gccacatcat cggagtgatc 1080  
 ctgtgcatcc agtggatcct gctgatgtac ctgatggtgc gagccttct ggtgaacgac 1140  
 ctgtgctacc ccgcaagga cgaggacgct caccctccac ctaagcctaa caccggcgtg 1200  
 ctgaacccca cctttccacc tgagaaggct cccgcctctc tcgagaaggt tgacaccac 1260  
 gtgacctcta ccggcggatga gtctgacct ccatcttctg agcacgagtc tgtgtaa 1317

<210> 7

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

atggtgagca agcagatcct gaagaacacc ggctgcagg agatcatgag cttcaaggtg 60  
 aacctggagg gcgtggtgaa caaccacgtg ttaccatgg agggctgagg caagggaac 120  
 atcctgttcg gcaaccagct ggtgcagatc cgcgtgacca agggcgcccc cctgcccttc 180  
 gccttcgaca tcctgagccc cgcttccag tacggcaacc gcaccttac caagtacccc 240  
 gaggacatca gcgacttctt catccagagc ttccccgcc gcttcgtgta cgagcgcacc 300  
 ctgcgctacg aggacggcgg cctggtggag atccgcagcg acatcaacct gatcgagggg 360  
 atgttcgtgt accgcgtgga gtacaagggc cgcaacttc ccaacgacgg ccccgatgag 420  
 aagaagacca tcaccggcct gcagcccagc ttcgaggtgg tgtacatgaa cgacggcgtg 480  
 ctggtgggcc aggtgatcct ggtgtaccgc ctgaacagcg gcaagttcta cagctgccac 540  
 atgcgcaccc tgatgaagag caaggcgtg gtgaaggact tccccagta ccaattcacc 600  
 cagcaccgcc tggagaagac ctacgtggag gacggcggct tcgtagagca gcacgagacc 660  
 gccatgccc agctgaccag cctgggcaag ccctgggca gcctgcacga gtgggtgtaa 720

<210> 8

<211> 711

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

```

atggtgagca agggcgagga ggataacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag 60
gtgcacatgg agggctccgt gaacggccac gagttcgaga tcgaggcga gggcgagggc 120
cgccccctacg agggcaccca gaccgccaag ctgaaggatga ccaagggtgg ccccctgccc 180
ttcgcttggg acatcctgtc ccctcagttc atgtacggct ccaaggccta cgtgaagcac 240
cccgcgaca tccccgacta cttgaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc 300
gtgatgaact tcgaggacgg cggcgtggtg accgtgacct aggactctc cctgcaggac 360
ggcgagttca tctacaaggt gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cggccccgta 420
atgcagaaga agacgatggg ctgggaggcc tectccgagc ggatgtacct cgaggacggc 480
gccctgaagg gcgagatcaa gcagaggctg aagctgaagg acggcggcca ctacgacgt 540
gaggtcaaga ccacctaaa ggccaagaag cccgtgcagc tgccccggcg ctacaacgtc 600
aacatcaagt tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa 660
cgcgccgagg gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaagta g 711

```

<210> 9

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

```

atgttcgccc tgagaagatc tctgctttcc gcaggccgaa tcgctcgacc ccagcaggtt 60
gctcgattc 69

```

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Met Phe Ala Leu Arg Arg Ser Leu Leu Ser Ala Gly Arg Ile Ala Arg

1                    5                    10                    15

Pro Gln Gln Val Ala Arg Phe

20



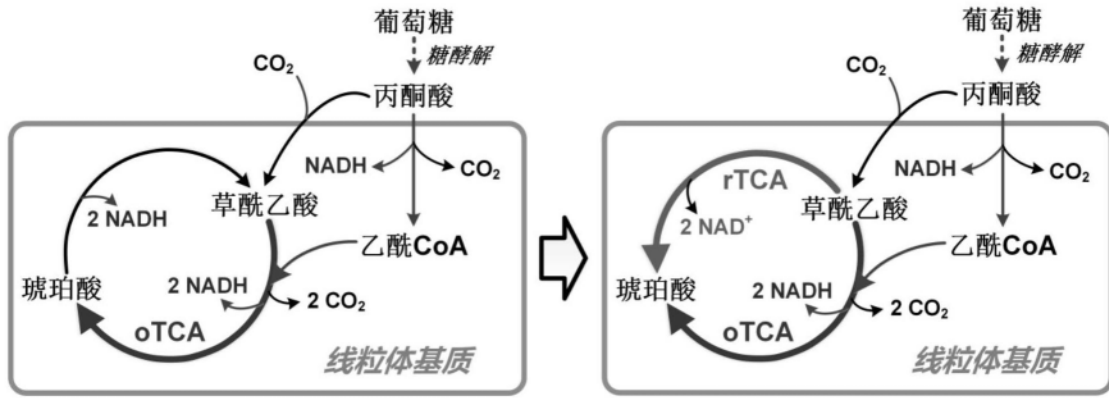


图1

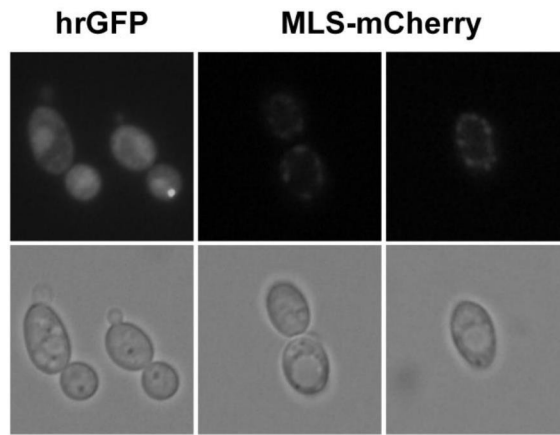


图2

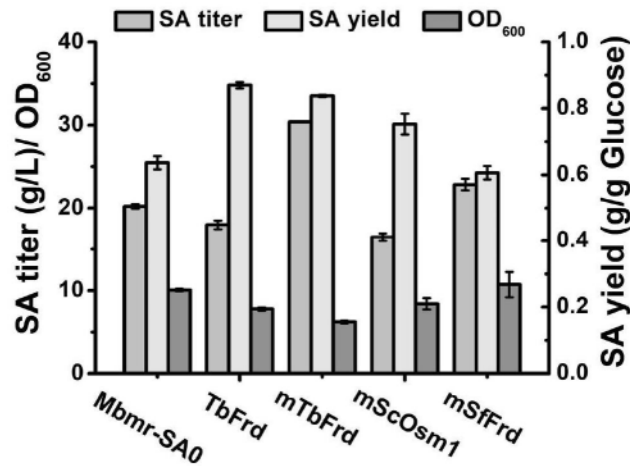


图3

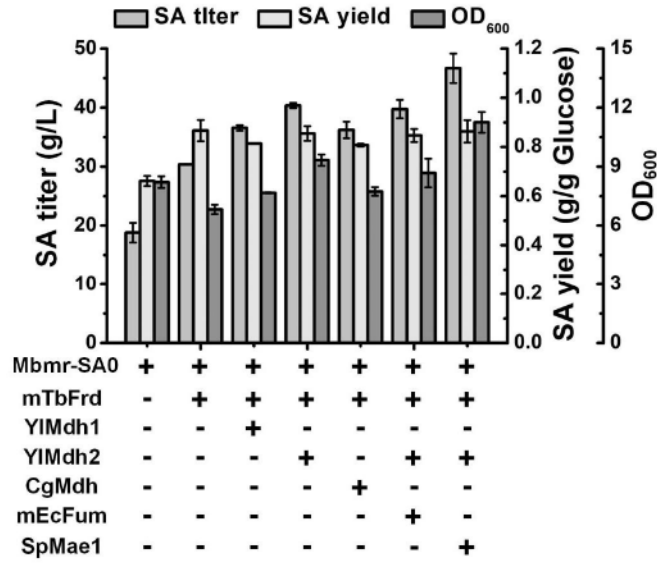


图4

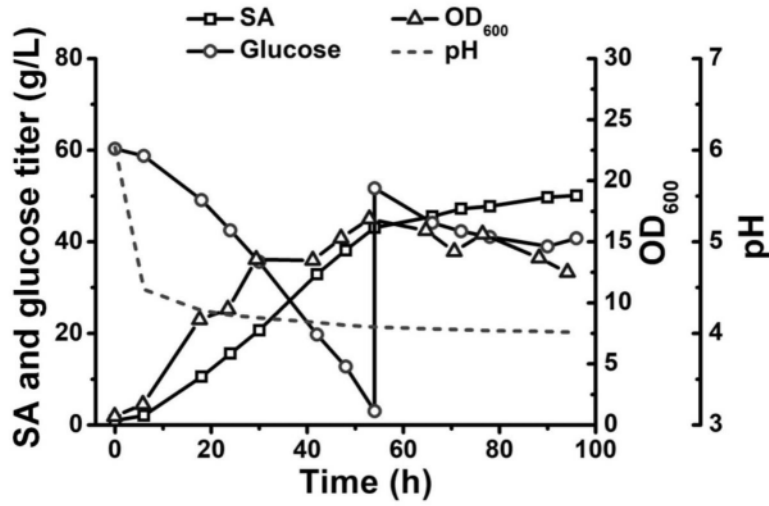


图5