



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111154748 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 202010081774.7

(22)申请日 2020.02.06

(71)申请人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72)发明人 王小元 柳亚迪 张炎潮 胡晓清

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 仇钰莹

(51) Int. Cl.

C12N 9/88(2006.01)

C12N 15/60(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12P 13/06(2006.01)

C12R 1/15(2006.01)

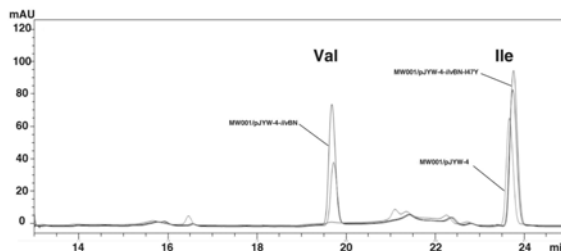
权利要求书1页 说明书4页  
序列表7页 附图1页

(54)发明名称

一种提高L-异亮氨酸合成纯度的乙酰羟酸合酶突变体

(57)摘要

本发明公开了一种提高L-异亮氨酸合成纯度的乙酰羟酸合酶突变体,属酶代谢工程领域。本发明通过将SEQ ID NO.1所示的乙酰羟酸合酶第47位氨基酸进行定点突变,改变了蛋白质分子与底物的结合效率,提高了L-异亮氨酸的合成量,降低了L-缬氨酸的合成量。本发明改造的谷氨酸棒状杆菌工程菌将L-异亮氨酸合成能力提高12.4%的同时,将L-缬氨酸的合成能力降低了62.0%,显著增加了L-异亮氨酸的纯度和产量,为其在食品、医药、化妆品和饲料中的应用提供了重要的价值。



1. 一种乙酰羟酸合酶的突变体,其特征在于,为(a)或(b):
  - (a) 氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的蛋白质;
  - (b) 在(a)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有乙酰羟酸合酶活性的由(a)衍生的蛋白质。
2. 编码权利要求1所述乙酰羟酸合酶突变体的基因。
3. 根据权利要求2所述的基因,其特征在于,核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。
4. 携带权利要求2或3所述基因的载体、细胞或转化体。
5. 一种基因工程菌,其特征在于,以谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)为宿主,表达权利要求1所述的乙酰羟酸合酶的突变体。
6. 根据权利要求5所述的基因工程菌,其特征在于,所述谷氨酸棒状杆菌为谷氨酸棒状杆菌WM001。
7. 一种提高谷氨酸棒状杆菌L-异亮氨酸合成、降低L-缬氨酸合成的方法,其特征在于,将乙酰羟酸合酶的第47位氨基酸由异亮氨酸突变为酪氨酸。
8. 权利要求5或6所述的基因工程菌在生产L-异亮氨酸或其衍生产品中的应用。
9. 一种发酵生产L-异亮氨酸的方法,其特征在于,将权利要求5或6所述的基因工程菌接种至发酵培养基中,在28~30℃发酵至少48h。
10. 权利要求1所述的乙酰羟酸合酶的突变体,权利要求2或3所述的基因,或权利要求5或6所述的基因工程菌在制备含L-异亮氨酸或其衍生物的食品、医药、化妆品和饲料中的应用。

## 一种提高L-异亮氨酸合成纯度的乙酰羟酸合酶突变体

### 技术领域

[0001] 本发明提供了一种提高L-异亮氨酸合成纯度的乙酰羟酸合酶突变体,属酶代谢工程领域。

### 背景技术

[0002] L-异亮氨酸是人体必需氨基酸,广泛应用于食品、医药、化妆品和饲料等行业。微生物发酵法是目前合成L-异亮氨酸的主要方法,谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是微生物发酵法合成L-异亮氨酸的重要菌株。

[0003] 乙酰羟酸合酶 (Acetohydroxyacid synthase, AHAS) 是支链氨基酸 (L-缬氨酸、L-亮氨酸、和L-异亮氨酸) 生物合成途径中关键的酶,它既可以催化两分子的丙酮酸缩合形成2-乙酰乳酸,又可以催化一分子的丙酮酸和一分子的2-酮丁酸缩合形成2-乙酰-2-羟基丁酸。2-乙酰乳酸是L-缬氨酸和L-亮氨酸合成过程中的重要前体,而2-乙酰-2-羟基丁酸是L-异亮氨酸合成过程中的重要前体。在发酵生产L-异亮氨酸的过程中,L-缬氨酸作为副产物大量存在,对于L-异亮氨酸的分离、纯化造成了困难。

### 发明内容

[0004] 针对现有技术中L-异亮氨酸合成量低、副产物L-缬氨酸合成量高的问题,本发明通过对乙酰羟酸合酶进行点突变,提供了一种提高L-异亮氨酸合成,降低副产物L-缬氨酸合成的乙酰羟酸合酶的突变体。

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种提高L-异亮氨酸合成,降低L-缬氨酸合成的乙酰羟酸合酶的突变体,所述乙酰羟酸合酶的突变体是将SEQ ID NO.1所示的乙酰羟酸合酶第47位的异亮氨酸突变为酪氨酸。

[0006] 在本发明的一种实施方式中,所述乙酰羟酸合酶突变体的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0007] 在本发明的一种实施方式中,所述乙酰羟酸合酶突变体的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0008] 本发明的第二个目的是提供一种提高L-异亮氨酸合成,降低L-缬氨酸合成的谷氨酸棒状杆菌工程菌;所述工程菌是以谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) WM001为宿主,将乙酰羟酸合酶突变体的重组表达质粒转化到宿主中。

[0009] 在一种实施方式中,所述乙酰羟酸合酶突变体的重组表达质粒是pJYW4。

[0010] 在一种实施方式中,所述谷氨酸棒状杆菌WM001 (*Corynebacterium glutamicum* WM001),已于2016年6月1日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2016303,保藏地址为中国武汉武汉大学,并公开于公开号为CN105950517B的专利文件中。

[0011] 在一种实施方式中,所述谷氨酸棒状杆菌工程菌的构建方法包括如下步骤:将乙酰羟酸合酶突变体重组表达质粒电转*C. glutamicum* WM001感受态细胞,在1mL的LBHIS培养基中培养1h,取50 $\mu$ l菌液涂布于含有卡那霉素的固体LBB平板,30 $^{\circ}$ C培养48h。

[0012] 本发明的第三个目的是提供一种提高谷氨酸棒杆菌L-异亮氨酸合成,降低L-缬氨酸合成的方法,所述方法是将谷氨酸棒状杆菌乙酰羟酸合酶的第47位的异亮氨酸突变为酪氨酸。

[0013] 本发明的第四个目的是提供所述谷氨酸棒杆菌在发酵生产L-异亮氨酸中的应用。

[0014] 在一种实施方式中,所述应用以表达所述乙酰羟酸合酶突变体的谷氨酸棒杆菌为发酵微生物,在28~30℃发酵至少48h。

[0015] 在一种实施方式中,所述谷氨酸棒杆菌经过活化;所述活化是将谷氨酸棒杆菌在LBB固体培养基中划线培养,于28~30℃培养36~48h,获得单菌落,再将单菌落转接至种子培养基中,于28~30℃培养10~12h,获得种子液。

[0016] 在一种实施方式中,所述发酵是将所述种子液转接至发酵培养基中,使发酵培养基中的初始OD $\geq$ 1,于30℃、200rpm发酵96h。

[0017] 本发明还要求保护所述乙酰羟酸合酶突变体及其基因在提高L-异亮氨酸合成、降低L-缬氨酸合成中的应用。

[0018] 本发明还要求保护所述乙酰羟酸合酶突变体及其基因在制备含L-异亮氨酸或其衍生物的食品、医药、化妆品和饲料中的应用。

[0019] 本发明的有益效果:本发明对来源于谷氨酸棒状杆菌的乙酰羟酸合酶进行定点突变,将乙酰羟酸合酶特异性合成L-异亮氨酸的能力提高了12.4%,同时将其合成L-缬氨酸的能力降低了62.0%,为L-异亮氨酸的大量、高纯度合成及其在食品、医药、化妆品和饲料中的应用提供了重要的理论基础。

## 附图说明

[0020] 图1为重组菌株过表达点突变的乙酰羟酸合酶HPLC图。

## 具体实施方式

[0021] 下面通过实施例对本发明进一步详细描述。

[0022] 培养基:

[0023] LB培养基:蛋白胨10g/L、酵母粉5g/L、氯化钠10g/L

[0024] LBB培养基:蛋白胨10g/L、酵母粉5g/L、氯化钠10g/L、脑心浸液18.5g/L

[0025] LBHIS培养基:蛋白胨5g/L、酵母粉2.5g/L、氯化钠5g/L、脑心浸液18.5g/L、山梨醇91g/L

[0026] 种子培养基:葡萄糖30g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.4g/L、玉米浆30g/L,pH 7。

[0027] 发酵培养基:葡萄糖100g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 35g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.4g/L、玉米浆15g/L,pH 7。

[0028] 表1引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')	序列表序号
P1	CGCGGATCCAGAAGGAGGTATAGTAGTGAAT	SEQ ID NO.4
[0029]	GTGGCAGCTTCTCAACA	
P2	GGAATTCTTAGATCTTGCCGGAG	SEQ ID NO.5
P3	ACATCGTGTTCGGTACCCTGGTGGTGCGGT	SEQ ID NO.6
P4	ACCGCACCACCAGGTAACCGAACACGATGT	SEQ ID NO.7

[0030] 实施例1:乙酰羟酸合酶表达菌株的构建

[0031] 根据NCBI中谷氨酸棒状杆菌的乙酰羟酸合酶基因序列设计上下游引物P1、P2(如表1所示),以*C. glutamicum* WM001的基因组为模板,用上下游引物扩增乙酰羟酸合酶的编码基因*ilvBN*,将目的基因*ilvBN*连接到表达质粒pJYW4(构建方法公开于Construction of a novel expression system for use in *Corynebacterium glutamicum*),化转*E. coli* JM109感受态细胞,在1mL的LB培养基中培养1h,取50 $\mu$ l菌液涂布于含有卡那霉素的固体LB平板,37 $^{\circ}$ C培养10h,挑取阳性菌落,37 $^{\circ}$ C摇床过夜培养后,提取质粒,酶切验证正确后,转化子由天霖公司测序,从而获得构建重组表达质粒pJYW4-*ilvBN*。

[0032] 取500ng重组表达质粒pJYW4-*ilvBN*电转*C. glutamicum* WM001感受态细胞后,在1mL的LBHIS培养基中培养1h,取50 $\mu$ l菌液涂布于含有卡那霉素的固体LBB平板,30 $^{\circ}$ C培养48h,挑取阳性菌落划格子到固体LBB平板,30 $^{\circ}$ C培养16h,挑取格子中的菌株转接到5mL液体LBB试管,30 $^{\circ}$ C培养16h后提取质粒,酶切验证正确后,从而获得可以高效表达乙酰羟酸合酶的谷氨酸棒状杆菌WM001/pJYW4-*ilvBN*。

[0033] 实施例2:乙酰羟酸合酶突变株的获得

[0034] 利用定点突变,设计上下游引物P3、P4(如表1所示),以已构建的质粒pJYW4-*ilvBN*为模板,进行PCR,将乙酰羟酸合酶的第47位的异亮氨酸突变为酪氨酸。PCR条件为95 $^{\circ}$ C 5min,34个循环(95 $^{\circ}$ C 5min、55 $^{\circ}$ C 30min、68 $^{\circ}$ C 10min),72 $^{\circ}$ C 10min,4 $^{\circ}$ C保温。PCR扩增体系:模板0.5 $\mu$ l,上下游引物各0.5 $\mu$ l,5 $\times$ PS Buffer5 $\mu$ l,dNTP mix 2 $\mu$ l,primeSTAR 0.25 $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 16.25 $\mu$ l。取5 $\mu$ l进行核酸电泳验证,剩余加1 $\mu$ l DpnI去除模板,37 $^{\circ}$ C 1h,进行化转。转化子由天霖公司进行测序,转化子命名为pJYW4-*ilvBN*-I47Y。通过实施例1中电转方法,电转到谷氨酸棒状杆菌WM001,从而获得可以高效表达乙酰羟酸合酶突变体的谷氨酸棒状杆菌WM001 pJYW4-*ilvBN*-I47Y。

[0035] 实施例3:乙酰羟酸合酶突变体催化谷氨酸棒状杆菌合成L-异亮氨酸

[0036] 将实施例1、实施例2中测序正确的菌株,和WM001/pJYW4对照菌株,划线固体LBB平板进行菌种活化,30 $^{\circ}$ C培养48h,将活化菌株三个绿豆粒大小的量,转接50mL种子培养基,30 $^{\circ}$ C 200rpm培养12h,按照初始OD<sub>562nm</sub>为1转接50mL发酵培养基,30 $^{\circ}$ C 200rpm发酵96h。取1mL发酵液,12000rpm离心2min取上清,用三氯乙酸稀释20倍,4 $^{\circ}$ C沉淀4h,12000rpm离心20min,过0.45 $\mu$ m水相针式过滤器,所得反应液采用高效液相色谱法进行检测,使用Hypersil ODS-2 25 $\times$ 4.6mm 5 $\mu$ m色谱柱,色谱柱条件:柱温:40 $^{\circ}$ C;流动相A相:3.01g/L无水乙酸盐,5mL四氢呋喃,200 $\mu$ l三乙胺,pH 7.2;流动相B相:3.01g/L无水乙酸盐200mL,pH 7.2,400mL色谱纯甲醇,400mL色谱纯乙腈;进样量:5 $\mu$ l;检测器:DAD;流速0.8ml/min。检测重组菌株WM001/pJYW4合成L-异亮氨酸4.95g/L,合成L-缬氨酸只有0.05g/L。过表达基因

ilvBN后,重组菌株WM001/pJYW4-ilvBN合成L-异亮氨酸7.15g/L,主要副产物为L-缬氨酸2.79g/L。当过表达ilvBN-I47Y突变体时,C.glutamicum WM001/pJYW4-ilvBN-I47Y合成L-异亮氨酸8.04g/L,同时副产物L-缬氨酸降低为1.06g/L。突变菌株WM001/pJYW4-ilvBN-I47Y相较于WM001/pJYW4-ilvBN,L-异亮氨酸的合成提高了12.4%,同时L-缬氨酸的合成降低了62.0%。针对性的提高了乙酰羟酸合酶合成L-异亮氨酸的能力,降低了其合成L-缬氨酸的能力。

[0037] 对比例1:

[0038] 具体实施方式同实施例2,区别在于,将引物P3、P4序列替换为P5、P6;

[0039] P5:CAACTTGGTTACCCCACTCGCTGATGCAAACCTTG (SEQ ID NO.8);

[0040] P6:CAAGTTTGCATCAGCGAGTGGGGTAACCAAGTTG (SEQ ID NO.9);

[0041] (即将第108位的异亮氨酸突变为亮氨酸),构建的重组工程菌按照实施例3的方法发酵,测定L-异亮氨酸和L-缬氨酸的产量分别为7.31g/L和2.75g/L,没有明显影响L-异亮氨酸和L-缬氨酸的合成。

[0042] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 江南大学

&lt;120&gt; 一种提高L-异亮氨酸合成纯度的乙酰羟酸合酶突变体

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 626

&lt;212&gt; PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

&lt;400&gt; 1

```

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

```

Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu His Thr Gly Ile Pro  
 245 250 255  
 Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu  
 260 265 270  
 Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly  
 275 280 285  
 Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp  
 290 295 300  
 Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile  
 305 310 315 320  
 Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val  
 325 330 335  
 Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu  
 340 345 350  
 Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Ser Glu Asp Ile Ser Glu Trp  
 355 360 365  
 Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp  
 370 375 380  
 Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln  
 405 410 415  
 His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr  
 420 425 430  
 Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala  
 435 440 445  
 Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile  
 450 455 460  
 Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala  
 465 470 475 480  
 Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn  
 485 490 495  
 Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr  
 500 505 510  
 Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val  
 515 520 525  
 Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala



530 535 540  
 Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg  
 545 550 555 560  
 Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro  
 565 570 575  
 Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly  
 580 585 590  
 Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala  
 595 600 605  
 Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr  
 610 615 620  
 Glu Ala  
 625  
 <210> 2  
 <211> 626  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <400> 2  
 Val Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile  
 20 25 30  
 Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Tyr Pro  
 35 40 45  
 Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys  
 50 55 60  
 Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr  
 85 90 95  
 Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn  
 100 105 110  
 Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Ser  
 115 120 125  
 Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr  
 130 135 140  
 Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asn Pro Asn Asp Ile  
 145 150 155 160  
 Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro

	165	170	175
Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu			
	180	185	190
Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val			
	195	200	205
Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly			
	210	215	220
Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala			
225	230	235	240
Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu His Thr Gly Ile Pro			
	245	250	255
Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu			
	260	265	270
Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly			
	275	280	285
Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp			
	290	295	300
Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile			
305	310	315	320
Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val			
	325	330	335
Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu			
	340	345	350
Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Ser Glu Asp Ile Ser Glu Trp			
	355	360	365
Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp			
	370	375	380
Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu			
385	390	395	400
Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln			
	405	410	415
His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr			
	420	425	430
Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala			
	435	440	445
Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile			
	450	455	460
Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala			
465	470	475	480

Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn  
485 490 495  
Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr  
500 505 510  
Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val  
515 520 525  
Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala  
530 535 540  
Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg  
545 550 555 560  
Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro  
565 570 575  
Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly  
580 585 590  
Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala  
595 600 605  
Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr  
610 615 620

Glu Ala

625

<210> 3

<211> 1881

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggatgatcc 60  
gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120  
gccgacatcg tgttcggtta ccctgggtgt gcggtgctac cgggtgatga cccgctctat 180  
tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctagtgc gccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240  
accggctacg cgcaggttac tggacgcggt ggcgtctgca ttgcaacctc tggcccaggc 300  
gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaacttgg actccgttcc catggttgcc 360  
atcaccggcc aggtcggaag tagcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420  
cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg taccacacc caacgacatt 480  
ccacaggcat tggctgagge attccacctc gcgattactg gtcgccctgg tctgtttcta 540  
gtggatatcc ccaaggatgt tcagaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600  
gacctgccag gctaccgcc agtttcaaca ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660  
aaactgatcg gtgagtctaa gaagcctgtc ctttacgttg gcggcggcgt tatcaaggct 720  
gatgcccacg aagagcttcg tgcgttcgct gagcacaccg gcattccagt tgtcaccaca 780  
ttgatggcgc tgggaacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840

catggcactg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagcg acctgctgat tgctatcggc 900  
 tcccgcctttg atgaccgcgt caccgggtgac gttgacactt tcgcacctga tgccaagatc 960  
 attcacgccg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020  
 gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctcgaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080  
 gagtctgagg acatctccga gtgggttgac tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140  
 cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaacctg 1200  
 tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260  
 gcagctcagt tcgttgactt cgaaaagcca cgcacctggc tcaactccgg tggactgggc 1320  
 accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380  
 gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc cagatgacca accaggaact caccaccgcc 1440  
 gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggatgtggt 1500  
 cgccaatggc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560  
 ggcgagtaca tgcccgaact tgttaccett tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620  
 gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680  
 ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740  
 ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gccattctt tgatggtgat 1800  
 gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860  
 gttgaatcga ccgaggcata a 1881

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

cgccgatcca gaaggaggta tagtagtgaa tgtggcagct tctcaaca 48

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

ggaattctta gatcttggcc ggag 24

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

acatcgtgtt cggttaccct ggtggtgcgg t 31

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

accgcaccac cagggtaacc gaacacgatg t 31

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

caacttggtt accccactcg ctgatgcaaa cttg 34

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

caagtttgca tcagcgagtg gggtaaccaa gttg 34

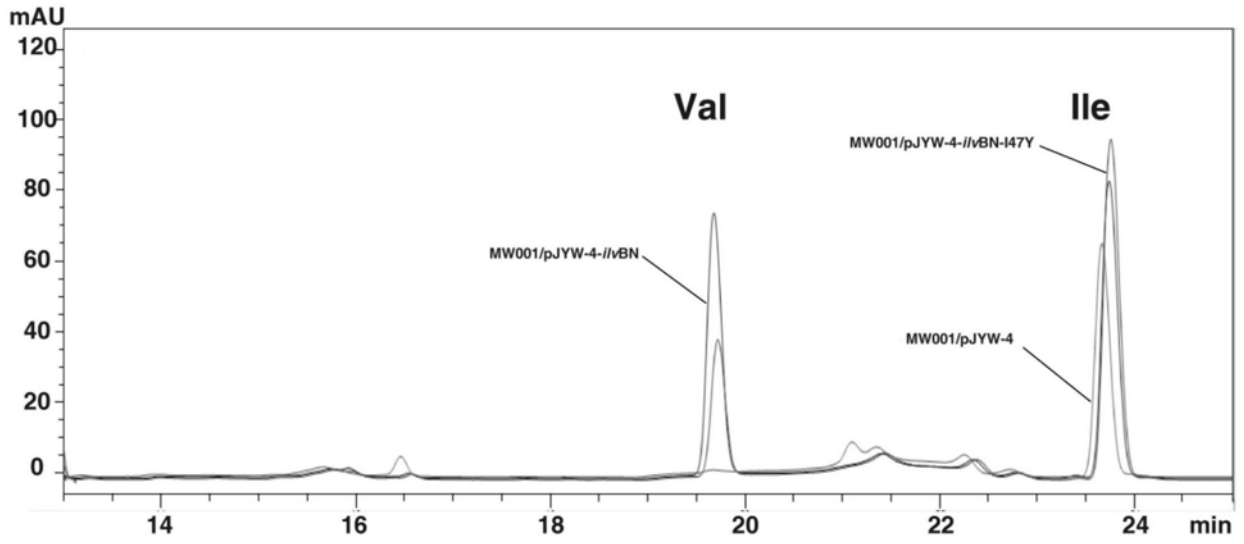


图1