

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 9/78 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02156181.8

[45] 授权公告日 2006年2月8日

[11] 授权公告号 CN 1240833C

[22] 申请日 1997.2.13 [21] 申请号 02156181.8

分案原申请号 97110241.4

[30] 优先权

[32] 1996.2.14 [33] JP [31] 27004/96

[71] 专利权人 三井化学株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 伊藤洁 八卷俊文 有井辉夫

鹤冈三行 中村武史

审查员 郝建欣

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 128 页 附图 2 页

[54] 发明名称

新型脲水合酶

[57] 摘要

本发明提供了来自嗜热假诺卡氏菌的脲水合酶的氨基酸序列和碱基序列，还提供了一种改变该脲水合酶的氨基酸序列和碱基序列而几乎不改变其功能的方法，和具有根据所述方法改变的碱基序列和氨基酸序列的脲水合酶，并提供了具有该脲水合酶基因的重组质粒，含有该重组质粒的转化体，用该转化体生产该酶的方法，以及用该转化体由一种脲水化合物生产相关酰胺化合物的方法。

1. 一种脲水合酶，它含有作为组分的：具有序列表中序列号 2 的氨基酸序列的 β -亚单位，和通过用任何其他氨基酸取代序列号 1 的氨基酸序列中的第 6 位、第 19 位、第 38 位、第 77 位、第 90 位、第 102 位、第 106 位、第 126 位、第 130 位、第 142 位、第 146 位、第 187 位、第 194 位和第 203 位氨基酸中的一个或多个氨基酸而从所述序列衍生出来的 α -亚单位。

新型脞水合酶

本申请是 1997 年 2 月 13 日提交的、发明名称为“新型脞水合酶”的 97110241.4 号专利申请的分案申请。

本发明涉及一种新型氨基酸序列，它含有来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM 3095 (下文称作嗜热假诺卡氏菌) 的脞水合酶的 α -亚单位和 β -亚单位，且本发明涉及一种编码所述酶的 α -亚单位和 β -亚单位的新基因序列。此外，本发明涉及一种含有所述基因的重组质粒及一种用所述重组质粒转化的转化体菌株，且本发明涉及一种用所述转化体菌株生产脞水合酶的方法，本发明还涉及一种方法，它包括用一种经培养所述转化体菌株细胞获得的培养物，用培养细胞或用一种经加工培养细胞获得的产物处理一种脞化合物，从而由所述的脞化合物生产相应的酰胺化合物。

关于通过水合脞化合物的脞基而将它转化成酰氨基，从而由所述的脞化合物生产相应的酰胺化合物的技术，到现在为止已有的公知化学方法是在有酸或碱存在的情况下或在有铜催化剂存在的情况下加热脞化合物。

另一方面，近来已经发现了一各酶，即脞水合酶，它具有一种通过水合脞基而将它转化成酰氨基的脞水合活性，并且已经公开了用所述酶或含有所述酶的微生物细胞处理脞化合物，从而由所述脞化合物生产相应酰胺化合物的方法(见日本专利公开 56-17918, 62-21519, 62-31914, 59-37951, 4-4873 和 6-55148)。已知这些方法更优于常规的化学方法，即由脞化合物转化成相应酰胺化合物的转化率和选择性是前者高于后者。

为了用这类脞水合酶由脞化合物大规模生产酰胺化合物，重要的是相对于用所述酶生产酰胺化合物中的生产成本来说，要降低在所述酶生产中的生产成本。更具体地说，对于这一问题，有必要提高每单位细胞重量和每单位时间生产酰胺化合物(下文称作细胞活性)的生产率。根据得到的情况，已经进行了各种尝试来克隆所述的酶，即脞水合酶，以便使用所述酶的基因通过基因工程方法，来表达大量的所述酶。例如，公知的方法有：使用棒状杆菌属的细胞(见日本未审公开的专利申请 2-119778)，使用假单胞杆菌属的细胞(见日本未审公开的专利申请 3-251184)，使用玫瑰红球菌(

Rhodococcus rhodocrous) 的细胞 (见日本未审公开的专利申请4 - 2 1 1 3 7 9), 使用根瘤菌属的细胞 (见日本未审公开的专利申请6 - 2 5 2 9 6), 或使用克雷伯氏杆菌属的细胞 (见日本未审公开的专利申请6 - 3 0 3 9 7 1)。然而, 对于棒状杆菌属和玫瑰红球菌 (Rhodococcus rhodocrous) 来说, 据报道用任意这些菌转化的大肠杆菌转化体的脲水合酶活性是极弱的 (见T I B T E C H V o l . 1 0, p p . 4 0 2 - 4 0 8, 1 9 9 2)。因此, 通过这类基因工程方法, 不可能总是获得所需的具有高细胞活性的转化体。

我们 (本发明人) 已经首次成功地从嗜热假诺卡氏菌J C M 3 0 9 5 的细胞 (我们发现它具有有一种脲水合酶活性) 中分离出一种脲水合酶基因, 并且明确了它的氨基酸序列和基因序列。我们还成功地形成了能够表达大量所述基因的基因重组细胞。根据这些发现, 我们已经完成了本发明。

具体地说, 本发明的一个目的是提供来源于嗜热假诺卡氏菌脲水合酶的氨基酸序列和基因序列。本发明的其它目的是提供一种具有所述基因的重组质粒, 一种具有所述质粒的转化体, 一种用所述转化体细胞生产所述酶的方法, 以及一种用所述转化体细胞处理脲化合物, 从而由它生产相应酰胺化合物的方法。

图1 表示质粒p P T - B 1 的限制性内切核酸酶的切割图谱。

图2 表示质粒p P T - D B 1 的限制性内切核酸酶的切割图谱。

在这些图中:

A m p 表示一种编码 β - 内酰胺酶的基因,

O R I 表示在一种C o l E 1 系统中复制起始位点,

l a c P O 表示在来源于p U C 1 8 的乳糖操纵子中的启动子和操作基因区,

N H α 表示一种编码来源于嗜热假诺卡氏菌的脲水合酶的 α - 亚单位的基因,

N H β 表示一种编码来源于嗜热假诺卡氏菌脲水合酶的 β - 亚单位的基因, 且 (X b a I / N s p v) 表示钝端化后所得到的X b a I 和N s p V 之间用于自身连接的位点。

现在, 下文将描述本发明。本发明的脲水合酶基因基本上含有序列表中序列号1 和序列号2 的氨基酸序列。然而, 就是在从一种具有相同碱基序列基因的模板中进行转录和翻译的过程中, 可以将一种或多种接近氨基酸序列N - 末

端的氨基酸缺失或者可以将一种或多种氨基酸增加到氨基酸序列的N-末端上,从而得到具有与原始突变体相同酶促活性的突变体,这要取决于将基因导入的宿主类型,构成用于培养宿主的营养培养基的成分和培养基的组成,和用于培养的培养基的温度和pH值,并且还取决于通过基因表达,胞内酶在其生产后的修饰。此外,随着目前重组DNA技术的进展,通过在酶的氨基酸序列中取代,缺失或增加一种或多种氨基酸,已经能够相对容易地修饰一种酶而基本上不改变其活性。而且,近来已作了各种尝试来生产具有增加工业价值的突变体酶,例如,通过在酶的氨基酸序列中取代,缺失或增加一种或多种氨基酸,具有改善的有机溶剂的抗性或具有多种底物特异性。鉴于本领域中这类技术的水平,本文中称作的脲水合酶不仅包括那些具有序列表中序列号1和2的氨基酸序列的酶,而且包括具有通过在所述氨基酸序列中取代,缺失或增加一种或多种氨基酸而修饰的氨基酸序列的任意其它突变体(条件是它们具有所需的脲水合酶活性),并且本发明包括具有任意这类氨基酸序列和这类修饰的氨基酸序列的任何脲水合酶。

具体地说,本发明是指含有 α -亚单位和 β -亚单位的脲水合酶,其中 α -亚单位具有序列表中序列号1的205个氨基酸的氨基酸序列, β -亚单位具有序列表中序列号2的233个氨基酸的氨基酸序列。不用说,本发明包括下述任何脲水合酶,即它们含有(作为组成成份)通过在序列表中序列号1和2的氨基酸序列中部分取代,缺失或增加一种或多种氨基酸而构建的修饰的 α -亚单位和 β -亚单位中的一种或者两者都含有,并且它们具有一种脲水合的活性。

在本发明中,通过序列表中序列号1的205个氨基酸的氨基酸序列来表达的 α -亚单位的编码碱基序列,落入构成本发明脲水合酶的 α -亚基的编码基因范围内。此外,只要任何蛋白质含有通过在序列表中序列号1的氨基酸序列中部分取代,缺失或增加一种或多种氨基酸来构建的任何修饰的 α -亚基,作为组成成份,且它们具有一种脲水合的活性,那么任何编码这种修饰的 α -亚单位的碱基序列都落入本发明的脲水合酶基因的范围。同样,在本发明中,通过序列表中序列号2的233个氨基酸的氨基酸序列来表达 β -亚单位的编码碱基序列落入构成本发明脲水合酶的 β -亚单位的编码基因范围内。此外,还是同样地,只要任何蛋白质含有通过在序列表中序列号2的氨基酸序列中部

分取代, 缺失或增加一种或多种氨基酸而构建的修饰的 β -亚单位作为组成成份, 且它们具有一种水合脞的活性, 那么任何编码这种修饰的 β -亚单位的编码碱基序列都在本发明的脞水合酶基因范围内。

本发明的脞水合酶基因基本上含有序列表中序列号3和4的碱基序列。然而, 随着目前重组DNA技术的进展, 使用任何其它的碱基序列, 已经能够相对容易地取代作为基因翻译中模板的DNA碱基序列, 从而生产一种酶, 且基本上不改变所述酶的氨基酸序列。此外, 通过在作为基因翻译中模板的DNA碱基序列中进行取代, 缺失或添加已经能够将一种酶的氨基酸序列修饰到通过在其中取代, 缺失或添加一种或多种组成的氨基酸而修饰过的酶中, 且基本上不改变酶的酶促活性, 从而生产所需的酶。鉴于本领域中这类技术的水平, 本文称作的脞水合酶基因不仅包括那些具有序列表中序列号3和4的DNA碱基序列的基因, 而且包括具有通过在所述DNA碱基序列中取代, 缺失或添加一种或多种碱基而修饰的DNA碱基序列的任何其它突变体, 条件是对于具有脞水合酶活性的蛋白质来说, 它们能够起到模板作用。具体地说, 本发明涉及编码一种脞水合酶的基因, 其中 α -亚单位含有序列表中序列号3的618个碱基的碱基序列, 而 β -亚单位含有序列表中序列号4的702个碱基的碱基序列。此外, 在本发明中, 只要任何蛋白质含有一种氨基酸序列的 α -亚单位和一种氨基酸序列的 β -亚单位中的一种或两者都含有作为其组成成份, 该蛋白质具有一种脞水合活性, 并且其中氨基酸的 α -亚单位是由在序列表中序列号3的碱基序列中进行部分取代, 缺失或添加来构建的任何修饰的碱基序列所编码的, 而其中氨基酸序列的 β -亚单位是由在序列表中序列号4的碱基序列中进行部分取代, 缺失或添加来构建的任何修饰的碱基所编码的, 那么这类修饰的 α -亚单位和 β -亚单位中的一种或两种的任何编码基因都落入本发明脞水合酶基因的范围。

本发明进一步包括一种重组质粒的构建, 所述的重组质粒具有插入其中的本发明脞水合酶基因, 且本发明还包括用所述重组质粒将任何所需微生物转化成转化体的过程。此外, 本发明还包括所需要酶的生产, 它通过将所得的转化体细胞在普通营养培养基中培养来进行, 本发明还包括酰胺化化合物的生产, 它通过将所述转化体细胞(可生产所所需的酶)在含水培养基中与脞化合物接触而将所述脞化合物转变成相应酰胺化合物。

本发明重组质粒是一种通过将脞水合酶基因插入一种质粒载体而构建的质粒，所述质粒载体中具有一种用来表达所述基因所必需的控制区和一种用于所述基因进行自我复制所必需的区。能将这种质粒导入任何所需的宿主中，从而使它生产酶，即脞水合酶。作为本文中有使用价值的宿主，所提到的是大肠杆菌(如下面的实施例所述)，然而，它不具有限制性。除此之外，任何其它属的微生物，象芽胞杆菌属(诸如枯草芽胞杆菌)，酵母菌，放线菌及其它也是有使用价值的。用于表达的必需的控制区含有一种启动子序列(包括用于控制转录的操纵基因序列)，一种核糖体结合序列(S D序列)和一种转录终止序列。具体地说，该启动子序列包括来源于大肠杆菌的一种色氨酸操纵子的 t r p 启动子和一种乳糖操纵子的 L a c 启动子，来源于λ噬菌体的一种 P L 启动子和一种 P R 启动子，以及来源于枯草芽胞杆菌的一种葡糖醛酸合成酶启动子(g n t)，一种碱性蛋白酶启动子(a p r)，一种中性蛋白酶启动子(n p r)和一种α-淀粉酶启动子(a m y)。除这些之外，本文中有使用价值的还有一种 t a c 启动子和已经将它们本身修饰或设计好的类似物。核糖体结合序列包括(例如)那些来源于大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的序列和作为本发明中嗜热假诺卡氏菌固有的序列。这些序列中的任何一种在本发明中都有使用价值，只要是它能在诸如大肠杆菌和枯草芽胞杆菌这样所需要的宿主中起作用，即没有特殊限制。例如，一种一致性序列含有一系列4个或更多个连续的碱基，这些碱基与16S核糖体RNA的3'-末端区互补，通过DNA合成可以制备上述一致性序列，并可以将它在本文中用作核糖体结合序列。转录终止序列不总是必须的，然而，对它来说，有使用价值的是一种不依赖于任何p-因子的序列，例如，一种脂蛋白终止子或一种t r p 操纵因终止子。对于重组质粒上的控制区序列，需要的是启动子序列，核糖体结合序列，脞水合酶基因和转录终止序列从区的5'-末端上游端开始，按照次序排列。在这类控制区中，可以将α-亚单位基因和β-亚单位基因表达成各自独立的顺反子，或(换句话说)可以使用为两者共有的相同控制区，按照多顺反子的方式，将上述两者一起进行表达。

作为满足上述要求的质粒载体实例，提到的是PBR 322，p U C 1 8，B l u e s c r i p t I I S K (t)，p K K 2 2 3-3和P S C 1 0 1，它们都具有一种可在大肠杆菌中进行自我复制的区；所提到的还有p U B 1 1

0, PTZ4, PC194, P11, $\phi 1$ 和 $\phi 105$, 它们都具有一种可在枯草芽胞杆菌中进行自我复制的区。作为可在两种或多种不同宿主中进行自我复制的质粒载体实例, 提到的是pHV14, TRp7, YEp7 和PBS7。

将编码本发明脲水合酶的基因插入到具有表达所述基因所必需区的质粒载体中, 从而构建本发明所需的重组质粒的方法; 用所述重组质粒转化一种需要的宿主的方法和在所得的转化体细胞中生产本发明所需的脲水合酶的方法, 对于上述三个方法来说, 可以使用分子生物学, 生物工程和基因工程领域中一般公知的任何普通方法和宿主, 诸如“分子克隆, 第二版”(“Molecular Cloning, 2nd Edition”)中所述(T. Maniatis ed al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)。作为用于培养转化体细胞的培养基, 一般使用的是LB培养基和M9培养基。更优选的是, 用在本发明中的这些培养基含有Fe离子和Co离子, 它们的量是0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更多。

为了通过利用按上述方式制备的本发明的脲水合酶或转化体细胞, 而由一种脲化合物生产相应的酰胺化合物, 将一种需要的脲化合物在一种含水介质中与下列物质接触, 这些物质是: 转化体细胞的培养物, 或从转化体细胞培养物中分离的转化体细胞本身, 或通过加工转化体细胞而产生的一种产物, 或从转化体细胞中分离并纯化的一种脲水合酶。用于接触的温度不需特别确定, 但优选在半将水合酶不失活的范围内, 更优选在0 $^{\circ}\text{C}$ 到50 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内。所处理的脲化合物不需特别确定, 条件是它可以是一种底物, 在这种底物上, 本发明的脲水合酶能够起作用。然而, 优选的是它包括(例如)具有2至4个碳原子的脲化合物, 典型的诸如乙脲, 丙脲, 丙烯脲, 甲基丙烯脲, 正丁脲, 异丁脲, 丁烯脲和 α -羟基异丁脲。脲化合物在含水介质中的浓度不需特别确定, 条件是它在不超过所述介质中脲化合物最大溶解度的范围内。然而, 考虑到酶的活性不被脲化合物所灭活, 因此优选脲的浓度可以是5% (按重量计) 或更低, 更优选2% (按重量计) 或更低。

将一系列步骤在下文中进行总结, 在明确来源于嗜热假诺卡氏菌的、序列表中序列号1至4的脲水合酶的氨基酸序列和碱基序列之前, 我们(本发明人)已经使用了这些步骤。已将嗜热假诺卡氏菌JCM3095保藏在日本的微生物保藏中心[Japan Collection of Microorganisms, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) of 2-1, Hirosawa, Wako

-shi, Saitama-Ken, Japan), 保藏号J C M3 0 9 5, 现在任何需要它的人都能得到。

(1) 将菌株细胞进行培养, 分离, 破碎, 并将它们进行硫酸铵分级分离, 阴离子交换层析, 凝胶过滤层析和疏水层析, 由此从其中分离并纯化脲水合酶, 将这种脲水合酶 α -亚单位和 β -亚单位N-末端上7个残基的氨基酸序列进行测序。

(2) 以这样测序的N-末端的氨基酸序列为基础, 制备用于基因扩增的寡核苷酸引物。从细胞中制备一种染色体DNA。通过使用这些引物和染色体DNA作为模板的PCR, 得到扩增的DNA产物。

(3) 用限制性内切核酸酶将染色体DNA进行部分断裂, 从而收集从约1500bp至约4000bp的DNA片段。将每个DNA片段与一种质粒载体连接, 用这种质粒载体转化大肠杆菌转化成一种质粒库。

(4) 通过使用上述(2)中获得的扩增DNA产物作为探针, 进行菌落杂交, 从质粒库选择含有编码脲水合酶的DNA片段的阳性克隆。

(5) 从阳性克隆中提取出质粒DNA, 且将插入片段的整个碱基序列进行测序, 从而确定了脲水合酶的 α -亚单位和 β -亚单位的编码基因碱基序列。将可从这样测序碱基序列推定的 α -亚基和 β -亚基的氨基酸序列与上述(1)中获得的两种亚基的7个残基的N-末端氨基酸序列进行比较, 可以证明上述测序的碱基序列可编码脲水合酶。

(6) 将含有脲水合酶基因的DNA片段从上述(4)中获得的阳性克隆质粒中重新制备, 并将这种DNA片段插入一种具有适合启动子的质粒载体。

(7) 将上述(6)中获得的质粒导入适合的宿主细胞中以便获得转化体细胞。将这些转化体细胞进行培养, 并将它们从培养物中分离。然后将这些细胞在一种含水介质中保持与丙烯脲接触, 因此确定了丙烯酰胺的形成。

现在, 参照下面的实施例来更具体地描述本发明, 然而, 不将这些实施例用来限制本发明的范围。

实施例1

从嗜热假诺卡氏菌J C M3 0 9 5 中纯化脲水合酶:

在50°C时, 将嗜热假诺卡氏菌J C M3 0 9 5 细胞在一种含有0.2%的甲基丙烯酰胺的营养肉汤培养基(pH7.5)中培养3天。通过离心培养

物 ($8000 \times G$, 30 分钟) 而获得 3 g 的湿细胞。将这些湿细胞悬浮在 7 g 的 KPB (0.1 M 磷酸钾缓冲液; pH 7.0) 中, 并使用一种超声细胞破碎器将它们破碎, 从而得到一种含有细胞碎片的液体。将 2.7 g 的硫酸铵加入到这种含有细胞碎片的液体中, 在 $4^{\circ}C$ 时, 将这种液体缓慢地进行搅拌 1 小时, 然后将它离心 ($25000 \times G$, 30 分钟) 以便从其中除去不溶性固体。将 1.2 g 的硫酸铵加入到 90 g 的所得上清液中, 在 $4^{\circ}C$ 时, 将这些上清液缓慢地搅拌 1 小时, 然后将它离心 ($25000 \times G$, 30 分钟) 以便收集沉淀物。将沉淀物溶于 1 ml 的 KPB, 在 $4^{\circ}C$ 时, 用 2 升相同的 KPB 将它进行透析, 时间是 48 小时。使用一种 Tos o 的 DEAE - TOYOPEARL 650 M 柱 (柱的尺寸: $5 \times 6 \phi$ cm) 将所得透析物进行阴离子交换层析, 使用 KPB 作为展开剂, 通过用从 0 M 到 0.5 M 氯化钾进行梯度洗脱, 从其中得到一种具有脲水合酶活性的组分。接下来, 使用 Pharmacia 的 SUPERDEX 200 - 26/60 作为载体, 并使用含有 0.2 M 氯化钾的 KPB 作为展开剂, 将所得的活性组分进行凝胶过滤层析, 从其中回收到具有脲水合酶活性的组分。然后, 使用一种 Tos o 的 TSK Gel Phenyl - 5PW 柱 (用于 HPLC), 将这些活性组分进行疏水层析。在这一过程中, 已用含有 20% 饱和浓度硫酸铵的 KPB 将柱进行饱和, 将活性成分吸附到这种柱中的载体上, 然后用一种含有硫酸铵 (将它的浓度按线性梯度从 20% 的饱和度降至 0% 的饱和度) 的洗脱剂通过梯度洗脱而将上述活性成分进行洗脱, 从而获得一种活性组分。

在这些层析处理中, 将每个组分中的脲水合酶活性按下述方式进行测定。将每个组分用 KPB 进行适当稀释, 向其中加入 1% (按重量计) 的丙烯腈, 并在 $10^{\circ}C$ 时, 将它们进行反应 10 分钟。向这种反应混合物中加入一种 1 M 的磷酸水溶液 (与反应混合物的量相同), 从而终止反应。然后, 通过 HPLC 分析来测定这样形成的丙烯酰胺浓度。在这一过程中, 所用的是 ULTRON 80HG ($50 \times 8 \phi$ mm) 作为 HPLC 柱, 将一种 10 mM 磷酸水溶液展开剂用于这种柱。通过测量 220 nm 处的吸收度来测定所形成丙烯酰胺的量。

在一种还原条件下, 将通过疏水层析获得的活性组分进行 SDS - PAGE, 它表明了 29 K 道尔顿和 32 K 道尔顿的两种主要多肽链和三种 45 K 道

尔顿或更高的次要多肽链的存在。在一种还原条件下,普通脲水合酶的S D S - P A G E 一般得到两种30 +/- 3 K 道尔顿的多肽链。29 K 道尔顿和32 K 道尔顿的两种主要多肽链中的每种都存在于S D S - P A G E 凝胶中,使用一种Sartorius' 并干电印迹仪 (Sartorius' semi-dry Electrobotter), 将上述两种主要多肽链中的每种都吸附到一种B i o R a d ' s P V D E 膜上。仅将已吸附在这种膜上的所需多肽链的部分从P V D E 膜中切下,并使用一种Shimadzu的肽测序仪P S Q - 1 将多肽链的N - 末端氨基酸序列进行测序。结果,发现29 K 道尔顿多肽链的N - 末端氨基酸序列是T H r - G l u - A s n - I l e - L e u - A r g - L y s , 它与序列表中序列号1 氨基酸序列的第2 至第8 氨基酸残基一致,且32 道尔顿多肽链的N - 末端氨基酸序列是M e t - A s n - G l y - V a l - T y r - A s p - V a l , 它与序列表中序列号2 氨基酸序列的第1 至第7 氨基酸残基一致。

实施例2 :

从嗜热假诺卡氏菌J C M 3 0 9 5 中分离脲水合酶。

按照与实施例1 中相同的方式将嗜热假诺卡氏菌J C M 3 0 9 5 细胞进行培养。将培养物进行离心 (8000 XG, 30 分钟) 以便从中收集2 g 的湿细胞。向这些中加入40 ml 含有0.15 M N a C l 的50 mM E D T A • 2 N a (P H 8 . 0) 的水溶液,从而制备一种细胞悬浮液,然后将这种悬浮液在90 °C时煮沸10 分钟。将所得悬浮液冷却至37 °C,向其中加入100 mg 的蛋白溶菌酶并在37 °C时保持1 小时。接下来,向其中加入30 mg , 2000 U/mg 的酶解酶 (zymolyase), 并在37 °C时保持1 小时。接着,向其中加入5 mg , 20 U/mg 的蛋白酶K, 并保持37 °C1 小时。此外,向其中加入2 ml 的10 %S D S 溶液并在65 °C时保持1 小时,然后立即将该体系进行苯酚/氯仿萃取。确切地说,将用T E (含有1 mM E D T A • 2 N a 的10 mM T r i s - H C l 缓冲液; P H 8 . 0) 饱和的4.2 ml 苯酚加入到这种反应混合物中并将它们缓慢地进行搅拌。将该体系进行离心 (3000 r p m, 10 分钟) 以便将它分离成一种水相和一种有机相,并仅收集水相。向这种水相中加入2.1 ml 上述T E 饱和的苯酚和2.1 ml 的氯仿,并将它缓慢地搅拌。然后,再次将它离心 (3000 r p m, 10 分钟)

以便将它分离成一种水相和一种有机相; 并仅收集水相。向这种水相中加入4.2 ml 的氯仿并将它缓慢地搅拌。然后, 仍再次将它离心 (3 0 0 0 r p m, 1 0 分钟) 以便将它分离成一种水相和一种有机相, 并仅收集水相。向这种水相中加入含有1.1 M NaCl 的4 ml TE 和9.2 ml 的乙醇, 然后将它在室温时保存一会儿。将这样沉淀的丝状DNA 通过将它缠绕在一种玻璃棒上来收集。通过按照70%, 80% 和90% 的顺序使用乙醇的水溶液进行处理而去除其中的水分, 然后将它在空气中干燥。接下来, 将这样收集的DNA 再次溶于4.0 ml 的TE 中。向其中加入30 μ g 的RNase A, 并在37 $^{\circ}$ C 时保持1 小时。接着, 使用一种限制性内切核酸酶BamHI 将这种DNA 进行部分断裂。通过苯酚/氯仿萃取, 随即经乙醇沉淀将这样部分断裂的DNA 再次纯化, 并将它溶于TE, 从而得到一种最终浓度, 是1.0 μ g / μ l。

以2.9 K 道尔顿和3.2 K 道尔顿多肽链的N-末端氨基酸序列 (在实施例1 中已将它们测序) 为基础, 制备下面四种PCR 引物。

引物1 : 5' - ACNGARAAYATNYTNMGNA - 3'

引物2 : 5' - TTNCKNARNATRITYTCNGT - 3'

引物3 : 5' - ATGAA YGGNGTNTAYGANGT - 3'

引物4 : 5' - ACNTRTANACNCCRTTCAT - 3'

序列表中序列号5 的引物1, 和序列表中序列号6 的引物2, 分别与DNA 链的互补链相对应, 而该DNA 链又与2.9 K 道尔顿多肽链的N-末端氨基酸序列相反。序列表中序列号7 的引物3, 和序列表中序列号8 的引物4, 分别与相应的DNA 链的互补链对应, 而该DNA 链又与3.2 K 道尔顿多肽链的N-末端氨基酸序列相反。在这些引物中, N 表示A, C, G 或T。

将上文中已部分断裂的3 μ g 染色体DNA (将它用作模板) 进行PCR。确切地说, 对于PCR 反应1, 所用的是一种总计100 μ l 的反应系统, 它含有3 μ g 的DNA, 200 ng 的引物1, 200 ng 的引物4 和5 U 的Taq DNA 聚合酶。反应1 由40 个PCR 循环组成, 其中一个PCR 循环包括在94 $^{\circ}$ C 时热变1 分钟, 在37 $^{\circ}$ C 时退火1 分钟和在72 $^{\circ}$ C 时链扩增1 分钟。对于PCR 反应2, 所用的是一种总计100 μ l 的反应系统, 它含有

3 μg 的DNA, 200 ng 的引物2, 200 ng 的引物3 和5 U的Taq DNA 聚合酶。反应2 由40 个PCR 循环组成, 其中一个PCR 循环与反应1 中的内容相同。在PCR 后, 将反应1 和2 每个反应中获得的5 μl 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计是1.0 %), 从而检测 (如果可能) 来自反应混合物中DNA 扩增的产物, 这种检测表明了仅从PCR 反应2 获得反应混合物中约700 bp 扩增DNA 产物的存在。这证明在嗜热假诺卡氏菌中, 存在一种 32 K 道尔顿的基因和一种29 K 道尔顿的基因, 同时, 它们按照从结合这些基因的5' 末端上游区的顺序彼此互相邻接。

将上文中用BamHI 部分断裂的染色体DNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳 (用一种低熔点琼脂糖, Sigma 的VII 型, 琼脂糖的浓度按重量计是0.6 %), 并将一种含有从约1500 bp 至约4000 bp DNA 片段的琼脂糖块从琼脂糖凝胶中切下。将这种琼脂糖块 (约0.5 g) 精细地粉碎, 将其悬浮在5 ml 的TE 中, 并将其在55 $^{\circ}\text{C}$ 时加热1 小时, 从而将这种琼脂糖块在TE 中完全融化。将所得的琼脂糖熔化物如上所述进行相同的苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀, 由此纯化DNA 片段。按照这种方式, 制备至少10 pmol 量的这样纯化的DNA 片段, 并使用一种Takara Shuzo 的DNA 连接试剂盒, 将上述DNA 片段插入BamHI 位点, 该位点位于一种质粒载体PUC18 (由Takara Shuzo 生产) 中的多克隆位点, 在用于这种连接以前, 用一种限制性内切核酸酶BamHI 将PUC18 质粒载体DNA 进行切割, 然后通过苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀将其纯化, 使用一种碱性磷酸酶 (由Takara Shuzo 生产) 将它的5' 末端进行去磷酸化, 并再次通过苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀将其纯化。将已按这种方式加工并纯化的20 ng pUC 质粒载体DNA 用于连接中。

使用这样连接的DNA 转化大肠杆菌HB101 的感受态细胞 (高感受态, 由Toyobo Co., Ltd. 生产)。将含有这样转化细胞的10 μl 液体加在一种含有50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的LB 琼脂培养皿 (0.5 wt % Bacto 酵母菌提取物, 1 wt % Bacto 胰蛋白胨, 0.5 wt % 氯化钠, 1.5 wt % 琼脂; pH 7.5) 上, 并将它们在37 $^{\circ}\text{C}$ 时培养过夜。这样获得了许多实验皿, 它们每个都含有其中已出现100 至1000 个集落/皿的培养基。

使用已在上文中制备的P C R扩增的D N A产物作为探针, 将含有染色体D N A的质粒文库进行菌落杂交, 随即进行筛选, 从而选择含有所需脲水合酶基因的克隆。

确切地说, 将一种尼龙膜 (Amersham的Hybond -N) 缓慢放在每个质粒文库的平皿上, 在约1分钟后, 将该膜缓慢地剥落。然后将这种剥下的膜浸入一种变性液体 (含有1.5 M N a C l 的0.5 M N a O H水溶液) 中7分钟, 随即将这种膜用一种中和液体 (含有1.5 M N a C l 和 1 m M E D T A · 2 N a 的0.5 M T r i s -H C l 水溶液) 处理3分钟。将这种中和作用重复两次。接下来, 将这种膜用2 × S S C (1 × S S C是一种含有8.76 g 氯化钠和4.41 g 柠檬酸钠的1升水溶液) 洗涤一次, 并将它放在干燥的滤纸上, 在滤纸上将该膜于空气中进行干燥。将紫外线U V以120 m J /c m² 作用于该膜; 通过它将D N A固定在该膜上。在42 °C时, 通过将它们浸入30 ml /膜的一种杂交缓冲液 (5 × S S C进一步含有1 wt % 脱脂牛奶, 0.1 wt % N -月桂酰肌氨酸, 0.02 wt % S D S 和50 wt % 甲酰胺) 中2小时, 从而将这样处理的膜进行预杂交。另一方面, 使用已在上文中制备的P C R扩增的D N A产物作为模板, 并使用一种 Boehringer Mannheim 的D I G -D N A 标记试剂盒, 制备一种荧光标记探针。将100 n g 的荧光标记探针和300 n g 的p U C 1 8 质粒D N A (通过在95 °C时煮沸10分钟而已将它们加热变性后) 转换到10 ml 有预杂交膜的杂交缓冲液。在42 °C时, 将它们在体系中进行杂交24小时以后, 将膜在室温下用含有0.1 wt % S D S 的150 ml 2 × S S C 洗涤两次。接下来, 在68 °C时, 将该膜再次用含有0.1 wt % S D S 的150 ml × S S C 洗涤两次, 时间是5分钟。将该膜用100 ml 的一种缓冲液A (含有0.3 wt % 吐温20和0.15 M N a C l 的0.1 M 马来酸缓冲液, p H 7.5) 进一步洗涤5分钟, 然后在室温时, 将它的一种缓冲液B (含有0.3 wt % 吐温20, 0.15 M N a C l 和1 wt % 脱脂牛奶的0.1 M 马来酸缓冲液; p H 7.5) 中阻遏30分钟。接着, 在室温时将这种膜用300 ml 的缓冲液A 洗涤两次, 时间是15分钟, 然后将它在一种60 ml 缓冲液C (含有0.1 M N a C l 和50 m M 氯化镁的0.1 M T r i s -H C l 水溶液; p H 9.5) 中饱和5分钟。在室温时, 将这种膜浸入30 ml 的一种溶液中

10 分钟, 该溶液通过用缓冲液 C 将一种发光底物 (Boehringer Mannheim 的 AMP PD 100-fold) 进行稀释来制备, 然后将该膜转移到已吸附过量 AMP PD 的干燥滤纸上。根据上文所述的工艺, 用一种聚乙烯薄膜将这样处理的膜进行包封, 然后用 X 射线将它进行摄影。在所得 X 射线照片上, 确定出现荧光信号的位置。这证明了在这种膜上有一种阳性信号存在, 并且在原始实验平皿上证明已制备的膜来自阳性菌落。

将这样确定的阳性菌落从平皿中移植到含有氨苄青霉素的 10ml 液体 LB 培养基上, 在 37°C 时通过以 250 rpm 搅拌将菌落在培养基中培养过夜。按一种普通的方法从这样培养的细胞中提取质粒 DNA, 然后用一种限制性内切核酸酶 BamHI 进行切割, 随后将它进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计是 0.7%), 从而测定插入片段的大小, 结果是该片段的大小约是 3.1 kbp。将这种质粒称作 pPT-B1 (见图 1)。根据引物续展方法, 使用 ABI 的测序试剂盒和自动测序仪 373A 将插入片段的全长碱基序列进行测序。结果证明插入的片段含有开放阅读框架 (一种具有 702 bp 的碱基序列, 且另一种具有 618bp 的碱基序列), 它们从其 5' 末端按顺序相互结合。将这些开放阅读框架称作 ORF 1 和 ORF 2。包括翻译终止密码子在内的构成 ORF 1 最 3' 末端的四种碱基与构成 ORF 2 最 5' 末端的四种碱基重叠, 这恰好与通过 PCR 获得的结果一致。此外, 由 7 个氨基酸残基组成的 N-末端氨基酸序列 (已从 ORF 1 的碱基序列中推定) 与已在实施例中获得 32 K 道尔顿多肽链 N 末端的氨基酸序列完全相同。这种序列区与序列表中序列号 2 氨基酸序列的第 1 位至第 7 位氨基酸残基的序列一致。另一方面, 由 7 个氨基酸残基组成的第 2 位至第 8 位 N-末端氨基酸序列 (已从 ORF 2 的碱基序列中推定) 与在实施例 1 中获得的 29 K 道尔顿多肽链的 7 种氨基酸残基的 N-末端氨基酸序列完全相同。这种序列区与序列表中序列号 1 氨基酸序列的第 2 位至第 8 位氨基酸残基的序列一致。此外, 在 ORF 1 和 ORF 2 的氨基酸序列之间存在高同源性, 并且在不同脞水合酶各自的 β -亚单位和 α -亚单位之间也存在高同源性。从这些中可以证明 ORF 1 是来源于嗜热假诺卡氏菌脞水合酶的 β -亚单位基因, 且 ORF 2 是同样来源于嗜热假诺卡氏菌脞水合酶的 α -亚单位基因。

实施例 3

转化体的构建:

p P T-B 1 上 l a c 启动子的转录方向与 O R F 1 和 O R F 2 的转录方向完全相同。用限制性内切核酸酶 X b a I 和 N s p V 在能够用这些限制性内切核酸酶切割的 p P T-B 1 位点处切割 p P T-B 1, 这些位点存在于 p P T-B 1 脞水合酶基因 5'-末端的上游区中, 且仅能在这些位点处将 p P T-B 1 切割, 然后将切割的 p P T-B 1 进行琼脂糖凝胶电泳(用一种低熔点琼脂糖, S i g m a 的 VII 型, 琼脂糖的浓度是 0.7%), 通过这一过程仅从质粒中切下约 4.6 k b p 的 D N A 片段。将这样切下的琼脂糖片段(约 0.1g)进行精细粉碎, 将其悬浮在 1 m l 的 T E 中, 然后在 55 °C 时, 将其加热 1 小时, 从而将琼脂糖片段完全熔化。将所得的熔化物进行与实施例 2 中相同的苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀, 通过这一过程将 D N A 片段进行纯化。用一种 Takara Shuzo 的 D N A 钝端化试剂盒将这种 D N A 片段进行钝端化, 然后用一种 T a k a r a S h u z o 的 D N A 连接试剂盒将它进行自身连接, 从而构建一种质粒 p P T-D B 1 (图 2)。将这种 p P T-D B 1 导入大肠杆菌 H B 1 0 1 (由 T o y o b o C o., L t d. 生产) 的受觉态细胞, 由此将 H B 1 0 1 转化成一种转化体 M T-1 0 8 2 2。在这种转化体 M T-1 0 8 2 2 中, 将脞水合酶基因通过存在于其中的 p U C 1 8 上的 l a c 启动子进行转录和翻译。在 1996 年 2 月 7 日将这种转化体 M T-1 0 8 2 2 进行保藏, 并在 International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chom, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japan 给予它保藏号 FERM P-15426, 在 1997 年 1 月 10 日将它转为布达佩斯条约下的保藏, 并在所述的保藏单位给予它保藏号 FERM BP-5785。

实施例 4:

用转化体将脞化合物转化成酰胺化合物(1):

将含有 40 μ g / m l 的硫酸铁 7 水合物和 10⁶ / m l 的氯化钴二水合物的 100 m l 液体 L B 培养基放入装有挡板的 500-m l 锥形瓶中, 并在

121 °C时通过将它高压灭菌20分钟而对它进行灭菌处理。自该培养基中加入氯苄青霉素以得到一种最终浓度是100 μg/ml。然后，将一白金圈已在实施例3中制备的MT-10822细胞接种在培养基上，并在37 °C时，通过以130 rpm进行搅拌，将这种细胞在培养基中培养约20小时。将所得培养物进行离心(5000 G ×15分钟)以便仅从其中分离出细胞，并将细胞悬浮在50 ml的生理盐水溶液中。将所得悬浮液再次离心以便从其中分离出湿细胞。将100 mg的湿细胞悬浮在200 ml 50 mM磷酸钾水溶液(pH 7.0)中，向其中加入10 ml的丙烯腈，并在10 °C时进行反应1小时，同时伴随缓慢地搅拌。在反应后，将反应混合物进行与实施例1中相同的HPLC分析，它证明在反应混合物中仅存在丙烯酰胺，且其中不存在丙烯腈和丙烯酸。因此，在本反应中转化率和选择率都是100%。

实施例5：

用转化体将腈化合物转化成酰胺化合物(2)：

将含有40 μg/ml的硫酸铁7水合物和10 μg/ml的氯化钴二水合物的100 ml液体LB培养基放入一种装有挡板的500 ml锥形瓶中，并在121 °C时，通过将它高压灭菌20分钟而对它进行灭菌处理。向该培养基中加入氯苄青霉素，从而得到一种最终浓度，是100 μg/ml。然后，将一白金圈已在实施例3中制备的MT-10822细胞接种在培养基上，并在37 °C时，通过以130 rpm进行搅拌，将该细胞在培养基中培养约20小时。将所得培养物离心(5000 G ×15分钟)以便仅从其中分离出细胞。将细胞悬浮在50 ml的一种生理盐水溶液中。将所得悬浮液再次进行离心以便从其中分离出湿细胞。将100 mg的湿细胞悬浮在200 ml 50 mM磷酸钾水溶液(pH 7.0)中，向其中加入50 ml的甲基丙烯腈，并在10 °C时通过缓慢地搅拌进行反应2小时。在反应后，将反应混合物进行与实施例1中相同的HPLC分析，它证明在反应混合物中仅存在甲基丙烯酰胺且其中不存在甲基丙烯腈和甲基丙烯酸。因此，在本反应中转化率和选择率都是100%。

实施例6：

带有部分取代的氨基酸序列，具有腈水合酶活性的突变体(1)：

这用来证明用Me t 取代已在实施例3 中制备的质粒DNA p P T -D B 1 中 α -亚单位区中的第6 位的L e u 。用质粒DNA p P F -D B 1 作为模板, 使用一种T a k a r a S h u z o 的“L A P C R 体外诱变试剂盒, 按照下述方式将质粒DNA p P T -D B 1 进行位点特异性突变。该”L A P C R 体外诱变试剂盒在下文中称作试剂盒。在用于下述突变的工艺中, 根据试剂盒的原理和制造者为试剂盒写的说明书来操作这种试剂盒。

将1 0 m l 的液体L B 培养基放入3 0 -m l 试管中, 并在1 2 1 °C 时, 通过高压灭菌2 0 分钟将它进行灭菌处理。向这种培养基中加入氨苄青霉素以便获得一种1 0 0 μ g /m l 的最终浓度。将一白金圈已在实施例3 制备的M T -1 0 8 2 2 细胞接种在培养基上, 并在3 7 °C 时, 通过以3 0 0 r p m 搅拌将这种细胞培养约2 0 小时。将1 m l 所得培养物放入一种适合的离心管中, 并以1 5 0 0 0 r p m 将它离心5 分钟, 以便从培养物中分离出细胞。通过碱性S D S 提取而从细胞中提取出质粒DNA p P T 1 -D B 1 。

将1 μ g 的质粒DNA p P T -D B 1 (将它用作模板) 进行两种不同类型的聚合酶链反应 (P C R)。确切地说, 对于P C R 反应1, 所用的是一种总计5 0 μ l 的反应系统, 它含有5 0 p m o l 具有序列表中序列号9 序列的引物和5 0 p m o l 的M1 3 引物M4 (具有序列表中序列号1 0 的序列)

(对于该系统的组成来说, 所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应1 由2 5 个P C R 循环组成, 其中一个循环包括在9 8 °C 时进行加热变性1 5 秒, 在5 5 °C 时进行退火3 0 秒和在7 2 °C 时进行链续展1 2 0 秒。对于P C R 反应2, 所用的是一种总计5 0 μ l 的反应系统, 它含有5 0 p m o l 的MUT 4 引物 (具有序列表中序列号1 1 的序列) 和5 0 p m o l 的M1 3 引物R V (具有序列表中序列号1 2 的序列) (对于该系统的组成来说, 所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应2 由2 5 个P C R 循环组成, 其中一个P C R 循环与反应1 中的内容相同。在P C R 后, 将在反应1 和2 中的每个反应所获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计是1 .0 %), 从而将由反应混合物中DNA 扩增产生的产物进行检测 (如果可能)。这种检测表明在两种P C R 反应中生产出了扩增DNA 产物。使用 Takara Shuzo 的Microcon 100, 从这些P C R 反应混合物中除去过量的引物和 d N T P 。向每种反应混合物中加入T E 以便制备每种都是5 0 μ l 的T E 溶

液。制备总计47.5 μ l 的退火溶液，它含有0.5 μ l 的两种上述TE溶液。对于退火溶液的基本组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书。将这种溶液在98 $^{\circ}$ C时进行加热变性10分钟，然后将它以恒定的冷却速度在超过60分钟的间隔内冷却至37 $^{\circ}$ C，随后将它在37 $^{\circ}$ C时保持15分钟。因此，完成了所需的退火。将0.5 μ l 的TAKRALA Taq加入到这样退火的溶液中，然后将它在72 $^{\circ}$ C时加热3分钟。由此，完成了异源双链DNA的形成，将它进行PCR反应了。确切地说，对于PCR反应3，所用的是一种总计50 μ l 的反应系统，它含有48 μ l 的所述异源双链DNA溶液，50 pmol 的M13引物M4（具有序列表中序列号10的序列）和50 pmol 的M13引物RV（具有序列表中序列号12的序列）。PCR反应3由25个PCR循环组成，其中一个PCR包括在98 $^{\circ}$ C时进行加热变性15秒，在55 $^{\circ}$ C时进行退火30秒和在72 $^{\circ}$ C时进行链延伸120秒。在PCR后，将在PCR反应3中获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（用一种低熔点的琼脂糖Sigma的V型，琼脂糖的浓度按重量计是0.8%），从而将由反应混合物中DNA扩增产生的产物进行检测。这种检测表明了PCR反应3中生产出了约2.0 kbp扩增的DNA产物。从PCR反应混合物中取出的仅是约2.0 kbp的DNA片段。将这种片段（约0.1 g）精细地粉碎，将它悬浮在1 ml 的TE中，并在55 $^{\circ}$ C时将它加热1小时，从而完全融化该片段。将所得熔化物进行与实施例2中相同的苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀，通过这一过程将DNA片段进行纯化。最后，将该片段溶于10 μ l 的TE中。用限制性内切核酸酶EcoRI和HindIII切割这样纯化为2.0 kbp扩增DNA片段，然后将它进行与实施例2中相同的苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀，通过这一过程将DNA片段进行纯化。最后，将该片段溶于10 ml 的TE中。另一方面，将质粒pPT-DB1用限制性内切核酸酶在它们的切割位点处切割，然后将它进行琼脂凝胶电泳（用一种低熔点的琼脂糖，Sigma的V型，琼脂糖的浓度是0.7%），通过这一过程仅将约2.7 kbp的DNA片段从琼脂糖凝胶中切下。将这样切下的琼脂片糖段（约0.1 g）精细地粉碎，将它悬浮在1 ml 的TE中，并将它在55 $^{\circ}$ C时加热1小时，从而在TE中将该片段完全融化。将所得熔化物进行与实施例2中相同的苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀，通过这一过程将DNA片段进行纯化。最后，将该片段溶于10 μ l 的

TE 中。用一种 Takara Shuzo 的 DNA 连接试剂盒，将扩增的 DNA 产物和上述制备的 pPT-DB1 片段进行相互连接，用它转化大肠杆菌 HB101（由 Toyobo 生产）的感受态细胞。这样制备出一种大肠杆菌库。

将含有 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸铁 7 水合物和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氯化钴二水合物的 10 ml 液体 LB 培养基（将这种培养基在下文中称作一种活性表达培养基）放入 30 ml 的试管中，并在 121 $^{\circ}\text{C}$ 时通过将它高压灭菌 20 分钟来对它进行灭菌处理。将氨基青霉素加入这种培养基中，从而得到一种 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最终浓度。然后，将任意选自大肠杆菌库五个克隆中的任何一个用一个白金圈接种在培养基上，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时，通过以 300 rpm 搅拌将它在培养基中培养约 20 小时。将 1 ml 所得培养物放入一种适合的离心管中并离心（以 15000 rpm 进行 15 分钟），以便从培养物中分离出细胞。将细胞悬浮在 200 μl 的磷酸钾缓冲液（pH 7.0）中，向其中加入 1%（按重量计）的丙烯腈并在 10 $^{\circ}\text{C}$ 时进行反应 2 分钟。向反应混合物中加入与反应混合物相同量的 1 M 磷酸水溶液，用它将反应终止。通过与实施例 1 中相同的 HPLC 分析，测定这样生产的丙烯酰胺在反应混合物中的浓度。结果是在 5 个克隆中的四个中检测出形成了丙烯酰胺，它证明四个克隆具有腈水合酶活性。

从 1 ml 四个活性克隆（在本文中保留着未被用于检测其腈水合酶的活性）的每个培养物中，将细胞分离，并将它进行碱性 SDS 提取，从而提取每个克隆的质料 DNA。接下来，通过与实施例 2 中相同的引物延伸，使用同样的 ABI 的测序试剂盒和自动测序仪 373A，将每个克隆腈水合酶结构基因的碱基序列进行测序。结果见表 1，其中已知用 Met 取代了来自表中所示克隆腈水合酶 α -亚单位中的第 6 位的 Leu。

表 1

克隆号	突变位点 (α -亚单 位中)	氨基酸序列中的 改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
1号	α -亚单 位中的第 6位	Leu	Met	CTG	ATG

实施例7：

带有具有脲水合酶活性的部分取代的氨基酸序列的突变体 (2)：

这用来证明在质粒DNA pPT-DB1 中用Thr 取代 α -亚单位区中的第6位的Leu。用质粒DNA pPT-DB1 作为模板将它按照与实施例6 中相同的方式进行位点特异性突变。

在这一过程中，将已在实施例6 中制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1 (用它作为模板) 进行两种不同类型的PCR。确切地说，对于反应1，所用的是一种总计50 μ l 的反应系统，它含有50 pmol 具有序列表中序列号13 序列的引物和50 pmol M13 引物M4 (具有序列表中序列号10 的序列) (对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应1 由25 个PCR 循环组成，其中一个PCR 循环包括在98 $^{\circ}$ C 时进行加热变性15 秒，在55 $^{\circ}$ C 时进行退火30 秒，并在72 $^{\circ}$ C 时进行链续展120 秒。对于反应2，所用的是一种总计50 μ l 的反应系统，它含有50 pmol 的MUT4 引物 (具有序列表中序列号11 的序列) 和50 pmol 的M13 引物RV (具有序列表中序列号12 的序列) (对于该系统的组成来

说, 所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应2 由25 个PCR 循环组成, 其中一个PCR 循环与反应1 中的内容相同。在PCR 后, 将在反应1 和2 中每个反应所获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计是1.0%), 从而检测 (如果可能) 反应混合物中由DNA 扩增产生的产物。这种检测表明在两种PCR 反应中生产出了扩增DNA 产物。使用这些产物, 按照与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

将任意选自大肠杆菌库的五个克隆中任何一个用一个白金圈接种在与实施例6 中所用相同的10 ml 活性表达培养基上, 并在37 $^{\circ}$ C时, 通过以300 r p m 搅拌, 将它在培养基中培养20 小时。将1 ml 所得培养物放入一种适合的离心管, 并按照与实施例6 中相同的方式来测定其脲水合酶的活性。结果是在五个克隆中的四个中检测出了形成的丙烯酰胺, 它证明四个克隆具有脲水合酶活性。

从1 ml 四个活性克隆 (在本文中保留着未被用于检测其脲水合酶的活性) 的每个培养物中, 将细胞分离并将它们进行碱性SDS 提取, 从而提取每个克隆的质粒DNA。接下来, 按照与实施例2 相同的方式, 将每个克隆脲水合酶结构基因的碱基序列进行测序, 结果见表2, 其中已知由Thr 取代了来自如表中所示克隆脲水合酶 α -亚单位中的第6 位的Leu。

表 2

克隆号	突变位点 (α -亚单 位中)	氨基酸序列中的 改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
2 号	α -亚单 位中的第 6位	Leu	Thr	CTG	ATG

实施例8：

带有具有脲水合酶活性的部分取代的氨基酸序列的突变体 (3)：

这用来证明在质粒DNA p P T -DB1 中用Ala 取代 α -亚单位区中的第6位的Leu。用质粒DNA p P T -DB1 作为模板，将它按照与实施例6 中相同的方式进行位点特异性突变。

在这一过程中，将已在实施例6 中制备的1 μ g 质粒DNA p P T -DB1 (用它作为模板) 进行两种不同类型的P C R。确切地说，对于反应1，所用的是一种总计50 μ l 的反应系统，它含有50 p m o l 具有序列表中序列号14 序列的引物和50 p m o l M13 引物M4 (具有序列表中序列号10 的序列) (对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应1 由25 个P C R 循环组成，其中一个P C R 循环包括在98 $^{\circ}$ C 时进行加热变性15 秒，在55 $^{\circ}$ C 时进行退火30 秒并在72 $^{\circ}$ C 时进行链续展120 秒。对于反应2，所用的是一种总计50 μ l 的反应系统，它含有50 p m o l 的MUT4 引物 (具有序列表中序列号11 的序列) 和50 p m o l 的M13 引物RV (具有序列表中序列号12 的序列) (对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应2 由25 个P C R 循环组成，其中一个P C R 循环与反应1 中的内容相同。在P C R 后，将在反应1 和2 中每个反应所获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计是1.0 %)，从而检测 (如果可能) 反应混合物中由DNA 扩增产生的产物。这种检测表明在两种P C R 反应中生产出了扩增DNA 产物。使用这些产物，按照与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

将任意选自大肠杆菌库的五个克隆中任何一个用一个白金圈接种在与实施例6 中所用相同的10 ml 活性表达培养基上，并在37 $^{\circ}$ C 时，通过以300 r p m 搅拌，将它在培养基中培养20 小时。将1 ml 所得培养物放入一种适合的离心管，并按照与实施例6 中相同的方式来测定其脲水合酶的活性。结果是在五个克隆中的四个中检测出了形成的丙烯酰胺，它证明四个克隆具有脲水合酶活性。

从1 ml 四个活性克隆 (在本文中保留着未被用于检测其脲水合酶的活性) 的每个培养物中，将细胞分离并将它们进行碱性S D S 提取，从而提取每个克隆的质粒DNA。接下来，按照与实施例2 相同的方式，将每个克隆脲水合酶

结构基因的碱基序列进行测序, 结果见表3, 其中已知由Ala取代了来自如表中所示克隆脞水合酶 α -亚单位中的第6位的Leu。

表 3

克隆号	突变位点 (α -亚单 位中)	氨基酸序列中的 改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
3号	α -亚单 位中的第 6位	Leu	Ala	CTG	ATG

实施例9 :

带有具有脞水合酶活性的部分取代的氨基酸序列的突变体 (4) :

这用来证明在质粒DNA pPT-DB1 中向Val 取代 α -亚单位区中的第6位的Leu。用质粒DNA pPT-DB1 作为模板, 将它按照与实施例6 中相同的方式进行位点特异性突变。

在这一过程中, 将已在实施例6 中制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1 (用它作为模板) 进行两种不同类型的PCR。确切地说, 对于反应1, 所用的是一种总计50 μ l 的反应系统, 它含有50 pmol 具有序列表中序列号15 序列的引物和50 pmol M13 引物M4 (具有序列表中序列号10 的序列) (对于该系统的组成来说, 所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应1 由25 个PCR 循环组成, 其中一个PCR 循环包括在98 $^{\circ}$ C 时进行加热变性15 秒, 在55 $^{\circ}$ C 时进行退火30 秒并在72 $^{\circ}$ C 时进行链续展

120秒。对于反应2，所用的是一种总计50 μ l的反应系统，它含有50 pmol的MUT4引物（具有序列表中序列号11的序列）和50 pmol的M13引物RV（具有序列表中序列号12的序列）（对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书）。反应2由25个PCR循环组成，其中一个PCR循环与反应1中的内容相同。在PCR后，将在反应1和2中每个反应所获得的5 μ l反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖的浓度按重量计是1.0%），从而检测（如果可能）反应混合物中由DNA扩增产生的产物。这种检测表明在两种PCR反应中生产出了扩增DNA产物。使用这些产物，按照与实施例6中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

将任意选自大肠杆菌库的五个克隆中任何一个用一个白金圈接种在与实施例6中所用相同的10 ml活性表达培养基上，并在37 $^{\circ}$ C时，通过以300 rpm搅拌，将它在培养基中培养20小时。将1 ml所得培养物放入一种适合的离心管，并按照与实施例6中相同的方式来测定其脲水合酶的活性。结果是在五个克隆中的四个中检测出了形成的丙烯酰胺，它证明四个克隆具有脲水合酶活性。

从1 ml四个活性克隆（在本文中保留着未被用于检测其脲水合酶的活性）的每个培养物中，将细胞分离并将它们进行碱性SDS提取，从而提取每个克隆的质粒DNA。接下来，按照与实施例2相同的方式，将每个克隆脲水合酶结构基因的碱基序列进行测序，结果见表4，其中已知由Val取代了来自如表中所示克隆脲水合酶 α -亚单位中的第6位的Leu。

表 4

克隆号	突变位点 (α -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
4号	α -亚单位中的第6位	Leu	Val	CTG	GTG

实施例10：

带有具有脲水合酶活性的部分取代的氨基酸序列的突变体(5)：

这用来证明在质粒DNA pPT-DB1中用Val取代 α -亚单位区中的第19位的Ala。用质粒DNA pPT-DB1作为模板，将它按照与实施例6中相同的方式进行位点特异性突变。

在这一过程中，将已在实施例6中制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的PCR，用它作为模板确切地说，对于反应1，所用的是一种总计50 μ l的反应系统，它含有50 pmol具有序列表中序列号16序列的引物和50 pmol M13引物M4（具有序列表中序列号10的序列）（对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书）。反应1由25个PCR循环组成，其中一个PCR循环包括在98 $^{\circ}$ C时进行加热变性15秒，在55 $^{\circ}$ C时进行退火30秒并在72 $^{\circ}$ C时进行链延伸120秒。对于反应2，所用的是一种总计50 μ l的反应系统，它含有50 pmol的MUT4引物（具有序列表中序列号11的序列）和50 pmol的M13引物RV（具有序列表中序列号12的序列）（对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书）。反应2由25个PCR循环组成，其中一

个P C R循环与反应1 中的内容相同。在P C R后，将在反应1 和2 中每个反应所获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖的浓度按重量计是1 .0 %），从而检测（如果可能）反应混合物中由D N A扩增产生的产物。这种检测表明在两种P C R反应中生产出了扩增D N A产物。使用这些产物，按照与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

将任意选自大肠杆菌库的五个克隆中任何一个用一个白金圈接种在与实施例6 中所用相同的1 0 ml 活性表达培养基上，并在3 7 $^{\circ}$ C时，通过以3 0 0 r p m 搅拌，将这种白金圈接种物在培养基中培养2 0 小时。将1 ml 所得培养物放入一种适合的离心管，并按照与实施例6 中相同的方式来测定其脲水合酶的活性。结果是在五个克隆中的四个中检测出了形成的丙烯酰胺，它证明四个克隆具有脲水合酶活性。

从1 ml 四个活性克隆（在本文中保留着未被用于检测其脲水合酶的活性）的每个培养物中，将细胞分离并将它们进行碱性S D S 提取，从而提取每个克隆的质粒D N A。接下来，按照与实施例2 相同的方式，将每个克隆脲水合酶结构基因的碱基序列进行测序，结果见表5 ，其中已知由V a l 取代了来自如表中所示克隆脲水合酶 α -亚单位中的第1 9 位的A l a 。

表 5

克隆号	突变位点 (α -亚单 位中)	氨基酸序列中的 改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
5号	α -亚单 位中的第 6位	Ala	Val	GCG	GTG

实施例1 1 :

带有具有脲水合酶活性的部分取代的氨基酸序列的突变体 (6):

这用来证明在质粒DNA p P T -DB1 中用L e u 取代 α -亚单位区中的第3 8 位的M e t 。用质粒DNA p P T -DB1 作为模板, 将它按照与实施例6 中相同的方式进行位点专一突变。

在这一过程中, 将已在实施例6 中制备的1 μ g 质粒DNA p P T -DB1 进行两种不同类型的P C R 用它作为模板。确切地说, 对于反应1, 所用的是一种总计5 0 μ l 的反应系统, 它含有5 0 p m o l 具有序列表中序列号1 7 序列的引物和5 0 p m o l M1 3 引物M4 (具有序列表中序列号 1 0 的序列) (对于该系统的组成来说, 所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应1 由2 5 个P C R 循环组成, 其中一个P C R 循环包括在9 8 $^{\circ}$ C时进行加热变性1 5 秒, 在5 5 $^{\circ}$ C时进行退火3 0 秒并在7 2 $^{\circ}$ C时进行链延伸1 2 0 秒。对于反应2, 所用的是一种总计5 0 μ l 的反应系统, 它含有5 0 p m o l 的MUT 4 引物 (具有序列表中序列号1 1 的序列) 和5 0 p m o l 的M1 3 引物R V (具有序列表中序列号1 2 的序列) (对于该系统的组成来说, 所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应2 由2 5 个P C R 循环组成, 其中一个P C R 循环与反应1 中的内容相同。在P C R 后, 将在反应1 和2 中每个反应所获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计是1 .0 %), 从而检测 (如果可能) 反应混合物中由DNA 扩增产生的产物。这种检测表明在两种P C R 反应中生产出了扩增DNA 产物。使用这些产物, 按照与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

将任意选自大肠杆菌库的五个克隆中任何一个用一个白金圈接种在与实施例6 中所用相同的1 0 m l 活性表达培养基上, 并在3 7 $^{\circ}$ C时, 通过以3 0 0 r p m 搅拌, 将它在培养基中培养2 0 小时。将1 m l 所得培养物放入一种适合的离心管, 并按照与实施例6 中相同的方式来测定其脲水合酶的活性。结果是在五个克隆中的四个中检测出了形成的丙烯酰胺, 它证明四个克隆具有脲水合酶活性。

从1 m l 四个活性克隆 (在本文中保留着未被用于检测其脲水合酶的活性) 的每个培养物中, 将细胞分离并将它们进行碱性S D S 提取, 从而提取每个克隆的质粒DNA 。接下来, 按照与实施例2 相同的方式, 将每个克隆脲水合酶

结构基因的碱基序列进行测序，结果见表6，其中已知由L e u 取代了来自如表中所示克隆脞水合酶 α -亚单位中的第38位的M e t。

表 6

克隆号	突变位点 (α -亚单 位中)	氨基酸序列中的 改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
6号	α -亚单 位中的第 38位	Met	Leu	ATG	TTG

实施例12：

带有具有脞水合酶活性的部分取代的氨基酸序列的突变体(7)：

这用来证明在质粒DNA pPT-DB1中用S e r 取代 α -亚单位区中的第77位的T h r。用质粒DNA pPT-DB1作为模板，将它按照与实施例6中相同的方式进行位点特异性突变。

在这一过程中，将已在实施例6中制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的P C R 用它作为模板。确切地说，对于反应1，所用的是一种总计50 μ l 的反应系统，它含有50 p m o l 具有序列表中序列号18序列的引物和50 p m o l M13引物M4 (具有序列表中序列号10的序列) (对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应1由25个P C R 循环组成，其中一个P C R 循环包括在98 $^{\circ}$ C时进行加热变性15秒，在55 $^{\circ}$ C时进行退火30秒并在72 $^{\circ}$ C时进行链续展120

秒。对于反应2，所用的是一种总计50 μ l 的反应系统，它含有50 pmol 的MUT4 引物（具有序列表中序列号11的序列）和50 pmol 的M13 引物RV（具有序列表中序列号12的序列）（对于该系统的组成来说，所参照的是制造者为试剂盒写的说明书）。反应2由25个PCR循环组成，其中一个PCR循环与反应1中的内容相同。在PCR后，将在反应1和2中每个反应所获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖的浓度按重量计是1.0%），从而检测（如果可能）反应混合物中由DNA扩增产生的产物。这种检测表明在两种PCR反应中生产出了扩增DNA产物。使用这些产物，按照与实施例6中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

将任意选自大肠杆菌库的五个克隆中任何一个用一个白金圈接种在与实施例6中所用相同的10 ml 活性表达培养基上，并在37 $^{\circ}$ C时，通过以300 rpm 搅拌，将它在培养基中培养20小时。将1 ml 所得培养物放入一种适合的离心管，并按照与实施例6中相同的方式来测定其脲水合酶的活性。结果是在五个克隆中的四个中检测出了形成的丙烯酰胺，它证明四个克隆具有脲水合酶活性。

从1 ml 四个活性克隆（在本文中保留着未被用于检测其脲水合酶的活性）的每个培养物中，将细胞分离并将它们进行碱性SDS提取，从而提取每个克隆的质粒DNA。接下来，按照与实施例2相同的方式，将每个克隆脲水合酶结构基因的碱基序列进行测序，结果见表7，其中已知由Ser取代了来自如表中所示克隆脲水合酶 α -亚单位中的第77位的Thr。

表 7

克隆号	突变位点 (α -亚单位中)	氨基酸序列中的 改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
7号	α -亚单位中的第77位	Thr	Ser	ACC	TCC

实施例1 3 :

带有具有脲水合酶活性的部分取代的氨基酸序列的突变体 (8) :

这用来证明在质粒DNA pPT-DB1 中用Ala 取代 α -亚单位区中的第90位的Gly。用质粒DNA pPT-DB1 作为模板, 将它按照与实施例6 中相同的方式进行位点专一突变。

在这一过程中, 将已在实施例6 中制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1 进行两种不同类型的PCR 用它作为模板。确切地说, 对于反应1, 所用的是一种总计50 μ l 的反应系统, 它含有50 pmol 具有序列表中序列号19 序列的引物和50 pmol M13 引物M4 (具有序列表中序列号10 的序列) (对于该系统的组成来说, 所参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应1 由25 个PCR 循环组成, 其中一个PCR 循环包括在98 $^{\circ}$ C 时进行加热变性15 秒, 在55 $^{\circ}$ C 时进行退火30 秒并在72 $^{\circ}$ C 时进行链续展 120 秒。对于反应2, 所用的是一种总计50 μ l 的反应系统, 它含有50 pmol 的MUT4 引物 (具有序列表中序列号11 的序列) 和50 pmol 的M13 引物RV (具有序列表中序列号12 的序列) (对于该系统的组成来说, 所

参照的是制造者为试剂盒写的说明书)。反应2由25个PCR循环组成,其中一个PCR循环与反应1中的内容相同。在PCR后,将在反应1和2中每个反应所获得的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳(其中琼脂糖的浓度按重量计是1.0%),从而检测(如果可能)反应混合物中由DNA扩增产生的产物。这种检测表明在两种PCR反应中生产出了扩增DNA产物。使用这些产物,按照与实施例6中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

将任意选自大肠杆菌库的五个克隆中任何一个用一个白金圈接种在与实施例6中所用相同的10 ml 活性表达培养基上,并在37 $^{\circ}$ C时,通过以300 r p m 搅拌,将这种白金圈接种物在培养基中培养20小时。将1 ml 所得培养物放入一种适合的离心管,并按照与实施例6中相同的方式来测定其脲水合酶的活性。结果是在五个克隆中的四个中检测出了形成的丙烯酰胺,它证明四个克隆具有脲水合酶活性。

从1 ml 四个活性克隆(在本文中保留着未被用于检测其脲水合酶的活性)的每个培养物中,将细胞分离并将它们进行碱性SDS提取,从而提取每个克隆的质粒DNA。接下来,按照与实施例2相同的方式,将每个克隆脲水合酶结构基因的碱基序列进行测序,结果见表8,其中已知由Ala取代了来自如表中所示克隆脲水合酶 α -亚单位中的第90位的Gly。

表 8

克隆号	突变位点 (α -亚单位中)	氨基酸序列中的 改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
8号	α -亚单位中的第90位	Gly	Ala	GGC	GCC

实施例14：

具有脞水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(9)：

本实施例是为了阐明用Ala取代质粒DNA pPT-DB1中 α -亚单位区域内的第102位Val。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol 带有序列表中序列号20的序列的引物以及50 pmol M13引物M4(带有序列表中序列号10的序列)(对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol MUT 4引物(带有序列表中序列号11的序列)和50 pmol M13引物RV(带有序列表中序列12的序列)(对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳(其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %)，如果有的话，用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 $^{\circ}$ C温育20小时，以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脞水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脞水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脞水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脞水合酶结构基因的碱

基序列进行排序。结果如表9所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第102位Val被Ala取代了。

表 9

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第9个	在 α -亚单位中 第102位	Val	Ala	GTC	GCC

实施例15：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(10)：

本实施例是为了阐明用Ile取代质粒DNA pPT-DB1中 α -亚单位区域内的第106位Val。以质粒DNA pPT-DE1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号21的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ m 的反应体系，它包括50 pmol s MUT 4引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 pmol s M13引物RV (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。

第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %），如果有的话，用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这种产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 $^{\circ}$ C温度20小时，以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有两烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排列。结果如表10所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第106位Val 被Ile 取代了。

表 10

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第10个	在 α -亚单位中 第106位	Val	Ile	GTC	ATC

实施例16：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(11)：

本实施例是为了阐明用Tyr取代质粒DNA pPT-DB1中 α -亚单位区域内的第126位Phe。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号22的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4（带有序列表中序列号10的序列）（对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s MUT4引物（带有序列表中序列号11的序列）和50 pmol s M13引物RV（带有序列表中序列12的序列）（对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %），如果有的话，用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 $^{\circ}$ C温育20小时，以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表1.1所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第126位Phe被Tyr取代了。

表 1 1

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第11个	在 α -亚单位中 第126位	Phe	Tyr	TTC	TAC

实施例1 7 :

具有脞水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (1 2) :

本实施例是为了阐明用G l u 取代质粒D N A p P T -D B 1 中 α -亚单位区域内的第1 3 0 位G l n 。以质粒D N A p P T -D B 1 作为模板, 并按实施例6 中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6 中已制备的1 μ g 质粒D N A p P T -D B 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为5 0 μ l 的反应体系, 它包括5 0 p m o l s 带有序列表中序列号2 3 的序列的引物以及5 0 p m o l s M 1 3 引物M 4 (带有序列表中序列号1 0 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明) 第一种反应包括2 5 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在9 8 $^{\circ}$ C时1 5 秒钟的热变性, 在5 5 $^{\circ}$ C时3 0 秒钟的退火以及在7 2 $^{\circ}$ C时1 2 0 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为5 0 μ l 的反应体系, 它包括5 0 p m o l s M U T 4 引物 (带有序列表中序列号1 1 的序列) 和5 0 p m o l s M 1 3 引物R V (带有序列表中序列1 2 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括2 5 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1 .0 Wt %), 如果有的话, 用

此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表12所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第130位Gln被Glu取代了。

表 12

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第12个	在 α -亚单位中 第130位	Gln	Glu	CAG	GAG

实施例18：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(13)：

本实施例是为了阐明用Val取代质粒DNA pPT-DB1中 α -亚单位区域内的第142位Leu。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6 中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T -DB 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 pmol s 带有序列表中序列号24 的序列的引物以及50 pmol s M13 引物M4 (带有序列表中序列号10 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15 秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}$ C时30 秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 pmol s MUT4 引物 (带有序列表中序列号11 的序列) 和50 pmol s M13 引物RV (带有序列表中序列12 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话, 用此方法可测定反应混合物中DNA 扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA 产物产生。使用这些产物, 根据实施例6 所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6 中所用的相同的活性表达培养基中, 并在37 $^{\circ}$ C温育20 小时, 以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中, 按实施例6 中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果, 在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成, 这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中, 分离出细胞, 并进行碱性SDS 提取, 由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着, 按实施例2 中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表1.3 所示, 其中可以看出, 表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第142 位Leu 被Val 取代了。

表 1 3

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第13个	在 α -亚单位中 第142位	Leu	Val	CTG	GTG

实施例1 9

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (1 4) :

本实施例是为了阐明用Asp取代质粒DNA_{pPT-DB1}中 α -亚单位区域内的第146位Glu。以质粒DNA_{pPT-DB1}作为模板,并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中,将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA_{pPT-DB1}进行两种不同类型的聚合酶链反应,用它作为模板。具体地,对于第一种聚合酶链反应,使用的是总量为50 μ l 的反应体系,它包括50 pmol s 带有序列表中序列号25的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成,所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环,其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性,在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应,使用的是总量为50 μ l 的反应体系,它包括50 pmol s MUT4引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 pmol s M13引物RV (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成,所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环,其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后,将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话,用

此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml与实施例1与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表14所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第146位Glu被Asp取代了。

表 14

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第14个	在 α -亚单位中 第146位	Glu	Asp	GAG	GAC

实施例20：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(15)：

本实施例是为了阐明用Thr取代质粒DNA pPT-DB1 α -亚单位区域内的第187位Ala。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1 进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号26 的序列的引物以及50 pmol s M13 引物M4 (带有序列表中序列号10 的序列) (对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25 个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15 秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30 秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s MUT4 引物 (带有序列表中序列号11 的序列) 和50 pmol s M13 引物RV (带有序列表中序列12 的序列) (对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25 个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %)，如果有的话，用此方法可测定反应混合物中DNA 扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA 产物产生。使用这些产物，根据实施例6 所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6 中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 $^{\circ}$ C温育20 小时，以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6 中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS 提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2 中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表15 所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第187 位Ala 被Thr 取代了。

表 1 5

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第15个	在 α -亚单位中 第187位	Ala	Thr	GCC	ACC

实施例2 1 :

具有脞水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (1 6) :

本实施例是为了阐明用L e u 取代质粒D N A p P T -D B 1 中 α -亚单位区域内的第1 9 4 位S e r 。以质粒D N A p P T -D B 1 作为模板, 并按实施例6 中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6 中已制备的1 μ g 质粒D N A p P T -D B 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为5 0 μ l 的反应体系, 它包括5 0 p m o l s 带有序列表中序列号2 7 的序列的引物以及5 0 p m o l s M 1 3 引物M 4 (带有序列表中序列号1 0 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括2 5 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在9 8 $^{\circ}$ C时1 5 秒钟的热变性, 在5 5 $^{\circ}$ C时3 0 秒钟的退火以及在7 2 $^{\circ}$ C时1 2 0 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为5 0 μ l 的反应体系, 它包括5 0 p m o l s M U T 4 引物 (带有序列表中序列号1 1 的序列) 和5 0 p m o l s M 1 3 引物R V (带有序列表中序列1 2 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括2 5 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1 .0 Wt %), 如果有的话,

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表16所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第194位Ser被Leu取代了。

表 16

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第16个	在 α -亚单位中 第194位	Ser	Leu	TCG	TTG

实施例22：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(17)：

本实施例是为了阐明Glu取代质粒DNA pPT-DB1中 α -亚单位区域内的第203位Ala。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6中已制备的1 μg 质粒DNA pPT-DB1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μl 的反应体系, 它包括50 pmol s 带有序列表中序列号28的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}\text{C}$ 时15秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}\text{C}$ 时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}\text{C}$ 时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μl 的反应体系, 它包括50 pmol s MUT4引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 pmol s M13引物RV (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μl 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话, 用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物, 根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中, 并在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育20小时, 以300 rpm震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中, 按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果, 在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成, 这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中, 分离出细胞, 并进行碱性SDS提取, 由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着, 按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表17所示, 其中可以看出, 表中所示克隆中的脲水合酶的 α -亚单位中的第203位Ala被Glu取代了。

表 17

克隆号	突变位点 (在 α -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第17个	在 α -亚单位中 第203位	Ala	Glu	GCG	GAG

实施例23：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(18)：

本实施例是为了阐明用Val取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第20位Ala。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号29的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s MUT4引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 pmol s M13引物RV (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %)，如果有的话，

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表18所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第20位Ala被Val取代了。

表 18

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第18个	在 β -亚单位中 第20位	Ala	Val	GCG	GTG

实施例24：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(19)：

本实施例是为了阐明用Asn取代质粒DNA_{pPT-DB1}中 β -亚单位区域内的第21位Asp。以质粒DNA_{pPT-DB1}作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T -DB1 进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号30的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4（带有序列表中序列号10的序列）（对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s MUT4引物（带有序列表中序列号11的序列）和50 pmol s M13引物RV（带有序列表中序列12的序列）（对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %），如果有的话，用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 $^{\circ}$ C温育20小时，以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表19所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第21位Asp被Asn取代了。

表 19

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第19个	在 β -亚单位中 第21位	Asp	Asn	GAC	AAC

实施例25：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(20)：

本实施例是为了阐明用Asp取代质粒DNA_{ppT-DB1}中 β -亚单位区域内的第108位Glu。以质粒DNA_{ppT-DB1}作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA_{ppT-DB1}进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号31的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4（带有序列表中序列号10的序列）（对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s MUT4引物（带有序列表中序列号11的序列）和50 pmol s M13引物RV（带有序列表中序列12的序列）（对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %），如果有的话，

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表20所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第108位Glu被Asp取代了。

表 20

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第20个	在 β -亚单位中 第108位	Glu	Asp	GAG	GAT

实施例26：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(21)：

本实施例是为了阐明用Pro取代质粒DNA_{pPT-DB1}中 β -亚单位区域内的第108位Glu。以质粒DNA_{pPT-DB1}作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6 中已制备的1 μg 质粒DNA p P T -DB1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μl 的反应体系, 它包括50 p m o l s 带有序列表中序列号32 的序列的引物以及50 p m o l s M13 引物M4 (带有序列表中序列号10 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}\text{C}$ 时15 秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}\text{C}$ 时30 秒钟的退火以及在72 $^{\circ}\text{C}$ 时120 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μl 的反应体系, 它包括50 p m o l s MUT4 引物 (带有序列表中序列号11 的序列) 和50 p m o l s M13 引物RV (带有序列表中序列12 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μl 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话, 用此方法可测定反应混合物中DNA 扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA 产物产生。使用这些产物, 根据实施例6 所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6 中所用的相同的活性表达培养基中, 并在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育20 小时, 以300 r p m 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中, 按实施例6 中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果, 在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成, 这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中, 分离出细胞, 并进行碱性SDS 提取, 由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着, 按实施例2 中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表2.1 所示, 其中可以看出, 表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第108 位Glu 被Pro 取代了。

表 2 1

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第21个	在 β -亚单位中 第108位	Glu	Pro	GAG	CCG

实施例2 7 :

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (2 2) :

本实施例是为了阐明用S e r 取代质粒DNA p P T -DB 1 中 β -亚单位区域内的第1 0 8 位G l u 。以质粒DNA p P T -DB 1 作为模板, 并按实施例6 中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6 中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T -DB 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为5 0 μ l 的反应体系, 它包括5 0 p m o l s 带有序列表中序列号3 3 的序列的引物以及5 0 p m o l s M 1 3 引物M 4 (带有序列表中序列号1 0 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括2 5 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在9 8 $^{\circ}$ C时1 5 秒钟的热变性, 在5 5 $^{\circ}$ C时3 0 秒钟的退火以及在7 2 $^{\circ}$ C时1 2 0 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为5 0 μ l 的反应体系, 它包括5 0 p m o l s M U T 4 引物 (带有序列表中序列号1 1 的序列) 和5 0 p m o l s M 1 3 引物R V (带有序列表中序列1 2 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括2 5 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1 .0 Wt %), 如果有的话,

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表2.2所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第108位Glu被Ser取代了。

表 2.2

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第22个	在 β -亚单位中 第108位	Glu	Ser	GAG	TCG

实施例2.8：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(2.3)：

本实施例是为了阐明用Arg取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第108位Glu。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 pmol 带有序列表中序列号34 的序列的引物以及50 pmol M13 引物M4 (带有序列表中序列号10 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15 秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}$ C时30 秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 pmol MUT4 引物 (带有序列表中序列号11 的序列) 和50 pmol M13 引物RV (带有序列表中序列12 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话, 用此方法可测定反应混合物中DNA 扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA 产物产生。使用这些产物, 根据实施例6 所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6 中所用的相同的活性表达培养基中, 并在37 $^{\circ}$ C温育20 小时, 以300 rpm 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中, 按实施例6 中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果, 在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成, 这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中, 分离出细胞, 并进行碱性SDS 提取, 由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着, 按实施例2 中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表2.3 所示, 其中可以看出, 表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第108 位Glu 被Arg 取代了。

表 2 3

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第23个	在 β -亚单位中 第108位	Glu	Arg	GAG	CGG

实施例2 9 :

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (2 4) :

本实施例是为了阐明用Cys取代质粒DNA p P T -DB1 中 β -亚单位区域内的第108位Glu。以质粒DNA p P T -DB1 作为模板, 并按实施例6 中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6 中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T -DB1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 pmol s 带有序列表中序列号35 的序列的引物以及50 pmol s M13 引物M4 (带有序列表中序列号10 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15 秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}$ C时30 秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 pmol s MUT4 引物 (带有序列表中序列号11 的序列) 和50 pmol s M13 引物RV (带有序列表中序列12 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话,

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表2.4所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第108位Glu被Cys取代了。

表 2.4

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第24个	在 β -亚单位中 第108位	Glu	Cys	GAG	TGC

实施例30：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(25)：

本实施例是为了阐明用Leu取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第108位Glu。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T - D B 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 p m o l s 带有序列表中序列号36的序列的引物以及50 p m o l s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 p m o l s M U T 4 引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 p m o l s M13引物R V (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话, 用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物, 根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中, 并在37 $^{\circ}$ C温育20小时, 以300 r p m 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中, 按实施例6中同样的方法测定其脘水合酶活性。结果, 在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成, 这证实了四个克隆具有脘水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脘水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中, 分离出细胞, 并进行碱性S D S 提取, 由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着, 按实施例2中同样的方法将每个克隆的脘水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表25所示, 其中可以看出, 表中所示克隆中的脘水合酶的 β -亚单位中的第108位G l u 被L e u 取代了。

表 2 5

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第25个	在 β -亚单位中 第108位	Glu	Leu	GAG	CTG

实施例3 1 :

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (2 6) :

本实施例是为了阐明用Thr取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第108位Glu。以质粒DNA pPT-DB1作为模板,并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中,将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的聚合酶链反应,用它作为模板。具体地,对于第一种聚合酶链反应,使用的是总量为50 μ l 的反应体系,它包括50 pmol s 带有序列表中序列号37的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成,所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环,其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性,在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应,使用的是总量为50 μ l 的反应体系,它包括50 pmol s MUT4引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 pmol s M13引物RV (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成,所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环,其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后,将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话,

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表26所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第108位Glu被Thr取代了。

表 26

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第26个	在 β -亚单位中 第108位	Glu	Thr	GAG	ACG

实施例3 2 :

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (27) :

本实施例是为了阐明用Asp取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第200位Ala。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T - D B 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 p m o l s 带有序列表中序列号38的序列的引物以及50 p m o l s M13 引物M4（带有序列表中序列号10的序列）（对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 p m o l s M U T 4 引物（带有序列表中序列号11的序列）和50 p m o l s M13 引物R V（带有序列表中序列12的序列）（对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明）。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳（其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %），如果有的话，用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 $^{\circ}$ C温育20小时，以300 r p m 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性S D S 提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表27所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第200位A1 a 被A s p 取代了。

表 27

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第27个	在 β -亚单位中 第200位	Ala	Asp	GCC	GAC

实施例33：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (28)：

本实施例是为了阐明用Ile取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第200位Ala。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA pPT-DB1进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号39的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s MUT4引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 pmol s M13引物RV (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %)，如果有的话，

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表28所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第200位Ala被Ile取代了。

表 28

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第28个	在 β -亚单位中 第200位	Ala	Ile	GCC	ATC

实施例34：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(29)：

本实施例是为了阐明用Val取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第200位Ala。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T - D B 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 p m o l s 带有序列表中序列号40 的序列的引物以及50 p m o l s M13 引物M4 (带有序列表中序列号10 的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15 秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}$ C时30 秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120 秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 p m o l s M U T 4 引物 (带有序列表中序列号11 的序列) 和50 p m o l s M13 引物R V (带有序列表中序列12 的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25 个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话, 用此方法可测定反应混合物中DNA 扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA 产物产生。使用这些产物, 根据实施例6 所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6 中所用的相同的活性表达培养基中, 并在37 $^{\circ}$ C温育20 小时, 以300 r p m 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中, 按实施例6 中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果, 在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成, 这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中, 分离出细胞, 并进行碱性S D S 提取, 由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着, 按实施例2 中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表29 所示, 其中可以看出, 表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第200 位A l a 被V a l 取代了。

表 29

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第29个	在 β -亚单位中 第200位	Ala	Val	GCC	GTC

实施例35：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(30)：

本实施例是为了阐明用Glu取代质粒DNA_{pPT-DB1}中 β -亚单位区域内的第200位Ala。以质粒DNA_{pPT-DB1}作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中，将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA_{pPT-DB1}进行两种不同类型的聚合酶链反应，用它作为模板。具体地，对于第一种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s 带有序列表中序列号41的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性，在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应，使用的是总量为50 μ l 的反应体系，它包括50 pmol s MUT4引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 pmol s M13引物RV (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成，所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环，其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后，将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %)，如果有的话，

用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物，根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中，并在37 °C温育20小时，以300 rpm震荡。将1 ml所得的培养物放在合适的离心管中，按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果，在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成，这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml培养物中，分离出细胞，并进行碱性SDS提取，由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着，按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表30所示，其中可以看出，表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第200位Ala被Glu取代了。

表 30

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第30个	在 β -亚单位中 第200位	Ala	Glu	GCC	GAG

实施例36：

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体(31)：

本实施例是为了阐明用Tyr取代质粒DNA pPT-DB1中 β -亚单位区域内的第212位Ser。以质粒DNA pPT-DB1作为模板，并按实施例6中同样的方法将它进行位点特异性突变。

在此过程中, 将实施例6中已制备的1 μ g 质粒DNA p P T - D B 1 进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 p m o l s 带有序列表中序列号42的序列的引物以及50 p m o l s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 $^{\circ}$ C时15秒钟的热变性, 在55 $^{\circ}$ C时30秒钟的退火以及在72 $^{\circ}$ C时120秒钟的链延伸。对于第二种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 p m o l s M U T 4 引物 (带有序列表中序列号11的序列) 和50 p m o l s M13引物R V (带有序列表中序列12的序列) (对于此体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第二种反应包括25个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环与第一种反应中的相同。聚合酶链反应后, 将第一和第二种反应分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖浓度为1.0 Wt %), 如果有的话, 用此方法可测定反应混合物中DNA扩增所得的产物。这一测定表明了两种聚合酶链反应中有扩增的DNA产物产生。使用这些产物, 根据实施例6所述的同样方法制备大肠杆菌库。

用一个白金圈将从大肠杆菌库中任意选择的五个克隆中的任意一个接种在10 ml 与实施例6中所用的相同的活性表达培养基中, 并在37 $^{\circ}$ C温育20小时, 以300 r p m 震荡。将1 ml 所得的培养物放在合适的离心管中, 按实施例6中同样的方法测定其脲水合酶活性。结果, 在五个克隆中有四个发现有丙烯酰胺形成, 这证实了四个克隆具有脲水合酶活性。

从保留着未被用于测定其脲水合酶活性的有活性的四个克隆的各1 ml 培养物中, 分离出细胞, 并进行碱性S D S 提取, 由此提取到每个克隆的质粒DNA。接着, 按实施例2中同样的方法将每个克隆的脲水合酶结构基因的碱基序列进行排序。结果如表3.1所示, 其中可以看出, 表中所示克隆中的脲水合酶的 β -亚单位中的第212位S e r 被T y r 取代了。

表 3 1

克隆号	突变位点 (在 β -亚单位 中)	氨基酸序列中的改变		碱基序列中的改变	
		取代前	取代后	取代前	取代后
第31个	在 β -亚单位中 第212位	Ser	Tyr	TCC	TAC

实施例3 7 :

具有脲水合酶活性带有部分取代的氨基酸序列的突变体 (3 2) :

本实施例是为了阐明带有多种取代的氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶活性, 这种氨基酸序列包括来源于第5个克隆 (其 α -亚单位中的第19位Ala被Val取代) 和第11个克隆 (其 α -亚单位中的第126位Phe被Tyr取代) 的两个突变位点。

将10 ml 液体LB培养基放在一个30 ml 的试管中, 并用高压灭菌器在121 °C灭菌20分钟。在这种培养基中加入氯苄青霉素得到最终浓度为100 μ g/ml。用一个白金圈将在实施例16已制备的第11个克隆接种在培养基上, 在37 °C温育约20小时, 并以300 rpm震荡。将1 ml 所获得的培养基放在合适的离心管中, 以15000 rpm离心5分钟以便从培养物中分离出细胞。用碱性SDS提取从细胞中提取出第11个克隆的质粒DNA。

将1 μ g 第11个克隆的质粒DNA进行两种不同类型的聚合酶链反应, 用它作为模板。具体地, 对于第一种聚合酶链反应, 使用的是总量为50 μ l 的反应体系, 它包括50 pmol s 带有序列表中序列号16的序列的引物以及50 pmol s M13引物M4 (带有序列表中序列号10的序列) (对于这一体系的组成, 所参照的是制造商对试剂盒的说明)。第一种反应包括25个聚合酶链反应循环, 其中一个聚合酶链反应循环包括在98 °C时15秒钟

热变性、在 55 °C 退火 30 秒，并在 72 °C 链扩增 120 秒。在第二种聚合酶链式反应中，使用总共 50 μ l 的一种反应系统，该系统包括 50pmols 的 MUT4 引物(具有序列表中序列号为 11 的序列)和 50pmols 一种 M13 引物 RV(具有序列表中序列号为 12 的序列)(对该系统的组成来说，把生产商对试剂盒的说明书作参考)。第二种反应是由 25 个聚合酶链式反应的循环，其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后，把在第一种和第二种反应中分别得到的 5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳(其中琼脂糖的浓度按重量计为 1.0%)，由此测定该反应混合物中从 DNA 的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的 DNA 产物的产生。用这些产物以与实施例 6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的非限定性地选自大肠杆菌库中的五种克隆中的任何一种接种到 10ml 的与实施例 6 中所用的相同活性表达培养基上，并在 37 °C 将其在 300rpm 的搅拌下温育大约 20 小时。把 1ml 所得到的培养物放入一只适当的离心试管中，并以与实施例 6 相同的方式测定该脲水合酶的活性。结果，在五种克隆中的四种测得有丙烯酰胺的形成，这证实了四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中而不用于测定脲水合酶活性的四种活性克隆的培养的各 1ml 中分离细胞，并经过碱性 SDS 提取从而由此提取各克隆的质粒 DNA。接着，用与实施例 2 的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基团的碱基序列。结果显示在表 32 中，其中已知在所制备的质粒 DNA 的氨基酸序列中，用 Val 取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第 19 位的 Ala，并用 Tyr 取代了相同的野生型脲水合酶 α -亚单位中的第 126 位的 Phe。

表 32

克隆号	突变位(在 α -亚单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO. 32	在 α -亚单位中的第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	在 α -亚单位中的第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

实施例3 8 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (3 3)

这是用来证实含有包括克隆No. 1 的突变位 (其中用Me t 取代了 α -亚单位中第6 位的L e u) 和克隆No. 3 2 的突变位 (其中用V a l 取代了 α -亚单位中的第1 9 位A l a 和用T y r 取代了 α -亚单位中第1 2 6 位的P h e) 的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

把1 0 ml 的L B 液体培养基装入一只3 0 ml 的试管中, 并将其在1 2 1 ° C 高压灭菌2 0 分钟。向该培养基中加入氨基青霉素到最终浓度为1 0 0 μ g /ml 。把一铂环已在实施例3 7 中制得的克隆No. 3 2 接种在该培养基上, 并在3 7 ° C 3 0 0 r p m 搅拌温育2 0 个小时。把1 ml 所得到的培养物放入一只适当的离心试管中, 以1 5 , 0 0 0 r p m 离心分离5 分钟, 从该培养基中分离出细胞。用碱性S D S 提取法从该细胞中提取出克隆No. 3 2 的质粒D N A 。

用1 μ g 的克隆No. 3 2 的质粒D N A 作模板, 将其进行两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中, 精确地说, 使用总共5 0 μ l 的一种反应系统, 该系统包括5 0 p m o l s 具有序列表中序列号为9 的序列的引物和5 0 p m o l s 一种M1 3 引物M4 (具有序列表中序列号为1 0 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由2 5 个聚合酶链式反应的循环, 其中一个聚合酶链式反应循环包括在9 8 ° C 热变性1 5 秒、在5 5 ° C 退火3 0 秒, 并在7 2 ° C 链扩增1 2 0 秒。在第二种聚合酶链式反应中, 使用总共5 0 μ l 的一种反应系统, 该系统包括5 0 p m o l s 的MUT 4 引物 (具有序列表中序列号为1 1 的序列) 和5 0 p m o l s 一种M1 3 引物R V (具有序列表中序列号为1 2 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作参考)。第二种反应是由2 5 个聚合酶链式反应的循环, 其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后, 把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计为1 .0 %), 由此测定该反应混合物中从D N A 的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的D N A 产物的产生。用这些产物以与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到10 ml 的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上,并在37 °C 300 r p m 搅拌下温育大约20 个小时。把1 ml 所得到的培养物装入一只适当的离心试管中,并用与实施例6 中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果,在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成,这证实这四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 ml 中分离细胞,并经过碱性SDS 提取,从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着,用与实施例2 的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表3 3 中,其中已知在所制备的质粒DNA 的氨基酸序列中,用Me t 取代了野生型脲水合脲 α -亚单位中第6 位的Le u,用Va l 取代了相同的野生型脲水合酶 α -亚单位中的第19 位的Al a 和用Ty r 取代了相同的野生型脲水合酶 α -亚单位中的第126 位的P h e。

表3 3

克隆号	突变位 (在 α -亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.33	在 α -亚单 位中的第 6 位	Le u	Me t	GTG	ATG
	在 α -亚单 位中的第 19 位	Al a	Va l	GCG	GTG
	在 α -亚单 位中的第 126 位	P h e	Ty r	TTC	TAC

实施例39：

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (34)

这是用来证实含有包括克隆No. 2的突变位(其中用Thr取代了 α -亚单位中第6位的Leu)和克隆No. 32的突变位(其中用Val取代了 α -亚单位中的第19位的Ala和用Tyr取代了 α -亚单位中第126位的Phe)的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

用1 μ g的已在实施例38中制得的克隆No. 32的质粒DNA作模板, 将其进行两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中, 确切地说, 使用总共50 μ l的一种反应系统, 该系统包括50 pmol具有序列表中序列号为13的序列的引物和50 pmol一种M13引物M4(具有序列表中序列号为10的序列)(对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由25个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环包括在98 $^{\circ}$ C热变性15秒、在55 $^{\circ}$ C退火30秒并在72 $^{\circ}$ C链扩增120秒。在第二种聚合酶链式反应中, 使用总共50 μ l的一种反应系统, 该系统包括50 pmol的MUT4引物(具有序列表中序列号为11的序列)和50 pmol一种M13引物RV(具有序列表中序列号为12的序列)(对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第二种反应是由25个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后, 把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μ l反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳(其中琼脂糖的浓度按重量计为1.0%), 由此测定该反应混合物中从DNA的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的DNA产物的产生。用这些产物以与实施例6中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到10 ml的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上, 并在37 $^{\circ}$ C 300 rpm搅拌下温育大约20个小时。把1 ml所得到的培养物装入一只适当的离心试管中, 并用与实施例6中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果, 在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成, 这证实这四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 ml 中，分离细胞并经过碱性SDS提取，从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着，用与实施例2的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表3 4中，其中已知在所制备的质粒DNA的氨基酸序列中，用Thr取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第6位的Leu，用Val取代了相同的野生脲水合酶 α -亚单位中的第19位的Ala和用Tyr取代了相同的野生型脲水合酶 α -亚单位中的第126位的Phe。

表3 4

克隆号	突变位 (在 α -亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.3 4	在 α -亚单 位中的第 6位	Leu	Thr	CTG	ACG
	在 α -亚单 位中的第 19位	Ala	Val	GCG	GTG
	在 α -亚单 位中的第 126位	Phe	Tyr	TTC	TAC

实施例40：

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (35)

这是用来证实含有包括克隆No. 3的突变位(其中用Ala取代了 α -亚单位中第6位的Leu)和克隆No. 32的突变位(其中用Val取代了相同的野生型脲水合酶 α -亚单位中的第19位的Ala和用Tyr取代了 α -亚单位中第126位的Phe)的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

用1 μ g的已在实施例38中制得的克隆No. 32的质粒DNA作模板将其经过两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中,确切地说,使用总共50 μ l的一种反应系统,该系统包括50 pmol具有序列列表中序列号为14的序列的引物和50 pmol一种M13引物M4(具有序列列表中序列号为10的序列)(对该系统的组成来说,把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由25个聚合酶链式反应的循环组成,其中一个聚合酶链式反应循环包括在98 $^{\circ}$ C热变性15秒、在55 $^{\circ}$ C退火30秒并在72 $^{\circ}$ C链扩增120秒。在第二种聚合酶链式反应中,使用总共50 μ l的一种反应系统,该系统包括50 pmol的MUT4引物(具有序列列表中序列号为11的序列)和50 pmol一种M13引物RV(具有序列列表中序列号为12的序列)(对该系统的组成来说,把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第二种反应是由25个聚合酶链式反应的循环组成,其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后,把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μ l反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳(其中琼脂糖的浓度按重量计为1.0%),由此测定该反应混合物中从DNA的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的DNA产物的产生。用这些产物以与实施例6中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到10 ml的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上,并在37 $^{\circ}$ C 300 rpm搅拌下温育大约20个小时。把1 ml所得到的培养物装入一只适当的离心试管中,并用与实施例6中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果,在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成,这证实这四种克隆有脲水合酶的活

性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 ml 中分离细胞, 并经过碱性SDS 钠提取从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着, 用与实施例2 的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表3 5 中, 其中已知在所制备的质粒DNA 的氨基酸序列中, 用Ala 取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第6 位的Leu, 用Val 取代了相同的野生脲水合酶 α -亚单位中的第19 位的Ala 和用Tyr 取代了相同的野生型脲水合酶 α -亚单位中的第126 位的Phe。

表3 5

克隆号	突变位 (在 α -亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.35	在 α -亚单 位中的第 6 位	Leu	Ala	CTG	GCG
	在 α -亚单 位中的第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	在 α -亚单 位中的第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

实施例4 1 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (3 6)

这是用来证实含有包括克隆No. 2 0 的突变位 (其中用As p 取代了 β -亚单位中第1 0 8 位的Gl u) 和克隆No. 3 1 的突变位 (其中用Ty r 取代了相同的野生型脲水合酶 β -亚单位中的第2 1 2 位的S e r) 的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

把1 0 ml 的LB 液体培养基装入一只3 0 ml 的试管中, 并将其在1 2 1 ° C 高压灭菌2 0 分钟。向该培养基中加入氨苄青霉素到最终浓度为1 0 0 μ g /ml 。把一铂环已在实施例3 6 中制得的克隆No. 3 1 接种在该培养基上, 并在3 7 ° C 3 0 0 r p m 搅拌下温育2 0 个小时。把1 ml 所得到的培养物放入一只适当的离心试管中, 以1 5 , 0 0 0 r p m 离心分离5 分钟, 从该培养基中分离出细胞。用碱性S D S 提取法从该细胞中提取出克隆No. 3 1 的质粒D N A 。

用1 μ m 的克隆No. 3 1 的质粒D N A 作模板, 将其经过两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中, 确切地说, 使用总共5 0 μ l 的一种反应系统, 该系统包括5 0 p m o l s 具有序列表中序列号为3 1 的序列的引物和5 0 p m o l s 一种M1 3 引物M4 (具有序列表中序列号为1 0 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由2 5 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环包括在9 8 ° C 热变性1 5 秒、在5 5 ° C 退火3 0 秒并在7 2 ° C 链扩增1 2 0 秒。在第二种聚合酶链式反应中, 使用总共5 0 μ l 的一种反应系统, 该系统包括5 0 p m o l s 的MUT 4 引物 (具有序列表中序列号为1 1 的序列) 和5 0 p m o l s 一种M1 3 引物R V (具有序列表中序列号为1 2 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第二种反应是由2 5 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后, 把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计为1 .0 %), 由此测定该反应混合物中从D N A 的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的D N A 产物的产生。用这些产物以与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到 10 ml 的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上,并在37°C 300 r p m 搅拌下温育大约20个小时。把1 ml 所得到的培养物装入一只适当的离心试管中,并用与实施例6中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果,在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成,这证实这四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 ml 中分离细胞,并经过碱性SDS提取从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着,用与实施例2的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表36中,其中已知在所制备的质粒DNA的氨基酸序列中,用Asp取代了野生型脲水合酶 β -亚单位中第108位的Glu,用Tyr取代了相同的野生型脲水合酶 β -亚单位中的第212位的Ser。

表36

克隆号	突变位 (在 β -亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.36	在 β -亚单 位中的第 108位	G l u	A s p	G A G	G A T
	在 β -亚单 位中的第 212位	S e r	T y r	T C C	T A C

实施例4 2 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (3 7)

这是用来证实含有包括克隆No. 2 3 的突变位 (其中用A r g 取代了 β -亚单位中第1 0 8 位的G l u) 和克隆No. 3 1 的突变位 (其中用T y r 取代了 β -亚单位中的第2 1 2 位的S e r) 的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

用1 μ g 的已在实施例4 1 中制得的克隆No. 3 1 的质粒DNA 作模板将其经过两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中, 确切地说, 使用总共5 0 μ l 的一种反应系统, 该系统包括5 0 p m o l s 具有序列表中序列号为3 4 的序列的引物和5 0 p m o l s 一种M1 3 引物M4 (具有序列表中序列号为1 0 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由2 5 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环包括在9 8 ° C 热变性1 5 秒、在5 5 ° C 退火3 0 秒并在7 2 ° C 链扩增1 2 0 秒。在第二种聚合酶链式反应中, 使用总共5 0 μ l 的一种反应系统, 该系统包括5 0 p m o l s 的MUT 4 引物 (具有序列表中序列号为1 1 的序列) 和5 0 p m o l s 一种M1 3 引物R V (具有序列表中序列号为1 2 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第二种反应是由2 5 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后, 把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计为1 .0 %), 由此测定该反应混合物中从DNA 的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的DNA 产物的产生。用这些产物以与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到1 0 m l 的与在实施例6 中所用的相同活性表达培养基上, 并3 7 ° C 3 0 0 r p m 搅拌下温育大约2 0 个小时, 把1 m l 所得到的培养物装入一只适当的离心试管中, 并用与实施例6 中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果, 在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成, 这证实这四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 m l

中分离细胞，并经过碱性SDS提取从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着，用与实施例2的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表37中，其中已知的所制备的质粒DNA的氨基酸序列中，用Arg取代了野生型脲水合酶 β -亚单位中第108位的Glu，用Tyr取代了相同的野生型脲水合酶 β -亚单位中的第212位的Ser。

表37

克隆号	突变位 (在 β -亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.37	在 β -亚单 位中的第 108位	Glu	Arg	GAG	CGG
	在 β -亚单 位中的第 212位	Ser	Tyr	TCC	TAC

实施例43：

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体(38)

这是用来证实含有包括克隆No.27的突变位(其中用Asp取代了 β -亚单位中第200位的Ala)和克隆No.31的突变位(其中用Tyr取代了 β -亚单位中的第212位的Ser)的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

用1 μ g的已在实施例41中制得的克隆No.31的质粒DNA作模板将其经过两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中，确切

地说, 使用总共50 μ l 的一种反应系统, 该系统包括50 pmol s 具有序列表中序列号为38 的序列的引物和50 pmol s 一种M13 引物M4 (具有序列表中序列号为10 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由25 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环包括在98 °C 热变性15 秒、在55 °C 退火30 秒并在72 °C 链扩增120 秒。在第二种聚合酶链式反应中, 使用总共50 μ l 的一种反应系统, 该系统包括50 pmol s 的MUT4 引物 (具有序列表中序列号为11 的序列) 和50 pmol s 一种M13 引物RV (具有序列表中序列号为12 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第二种反应是由25 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后, 把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计为1.0 %), 由此测定该反应混合物中从DNA 的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的DNA 产物的产生。用这些产物以与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到10 ml 的与在实施例6 中所用的相同活性表达培养基上, 并37 °C 300 rpm 搅拌下温育大约20 个小时, 把1 ml 所得到的培养物装入一只适当的离心试管中, 并用与实施例6 中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果, 在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成, 这证实这四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 ml 中分离细胞, 并经过碱性SDS 提取从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着, 用与实施例2 的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表38 中, 其中已知的所制备的质粒DNA 的氨基酸序列中, 用Asp 取代了野生型脲水合酶 β -亚单位中第200 位的Ala, 用Tyr 取代了相同的野生型脲水合酶 β -亚单位中的第212 位的Ser。

表3 8

克隆号	突变位 (在 β -亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.3 8	在 β -亚单 位中的第 2 0 0 位	A l a	A s p	G C C	G A C
	在 β -亚单 位中的第 2 1 2 位	S e r	T y r	T C C	T A C

实施例4 4 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (3 9)

这是用来证实含有包括克隆No. 3 0 的突变位 (其中用G l u取代了 β -亚单位中第2 0 0 位的A l a) 和克隆No. 3 1 的突变位 (其中用T y r取代了 β -亚单位中的第2 1 2 位的S e r) 的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

用1 μ g 的已在实施例4 1 中制得的克隆No. 3 1 的质粒DNA作模板将其经过两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中, 确切地说, 使用总共5 0 μ l 的一种反应系统, 该系统包括5 0 p m o l s 具有序列表中序列号为4 1 的序列的引物和5 0 p m o l s 一种M1 3 引物M4 (具有序列表中序列号为1 0 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由2 5 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环包括在9 8 ° C 热变性1 5 秒、在5 5 ° C 退火3 0 秒并在7 2 ° C 链扩增1 2 0 秒。在第二种聚合酶链式反应中, 使用总共

50 μ l 的一种反应系统, 该系统包括50 pmol s 的MUT 4 引物 (具有序列表中序列号为11 的序列) 和50 pmol s 一种M13 引物RV (具有序列表中序列号为12 的序列) (对该系统的组成来说, 把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第二种反应是由25 个聚合酶链式反应的循环组成, 其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后, 把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μ l 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳 (其中琼脂糖的浓度按重量计为1.0 %), 由此测定该反应混合物中从DNA 的扩增所得到的产物。这种测定能证实两种聚合酶链式反应中扩增的DNA 产物的产生。用这些产物以与实施例6 中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到10 ml 的与在实施例6 中所用的相同活性表达培养基上, 并37 °C 300 rpm 搅拌下温育大约20 个小时, 把1 ml 所得到的培养物装入一只适当的离心试管中, 并用与实施例6 中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果, 在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成, 这证实这四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 ml 中分离细胞, 并经过碱性SDS 提取从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着, 用与实施例2 的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表39 中, 其中已知的所制备的质粒DNA 的氨基酸序列中, 用Glu 取代了野生型脲水合酶 β -亚单位中第200 位的Ala, 用Tyr 取代了相同的野生型脲水合酶 β -亚单位中的第212 位的Ser。

表3 9

克隆号	突变位 (在β-亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.39	在β-亚单 位中的第 200位	A l a	G l u	G C C	G A G
	在β-亚单 位中的第 212位	S e r	T y r	T C C	T A C

实施例4 5 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (4 0)

这是用来证实含有包括克隆No.23 的突变位 (其中用A r g 取代了β-亚单位中第108位的G l u) 和克隆No.39 的突变位 (其中用G l u 取代了β-亚单位中的第200位的A l a 和用T y r 取代了相同的野生型脲水合酶β-亚单位中的第212位的S e r) 的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

把10 ml 的L B 液体培养基装入一只30 ml 的试管中, 并将其在121 ° C 高压灭菌20 分钟。向该培养基中加入氨苄青霉素到最终浓度为100 μ g /ml 。把一铂环已在实施例4 4 中制得的克隆No.39 接种在该培养基上, 并在37 ° C 300 r p m 搅拌下温育20 个小时。把1 ml 所得到的培养物放入一只适当的离心试管中, 以15, 000 r p m 离心分离5 分钟, 从该培养基中分离出细胞。用碱性S D S 提取法从该细胞中提取出克隆No.39 的质粒D N A。

用1 μg 的克隆No. 39的质粒DNA作模板将其经过两种不同类型的聚合酶链式反应。在第一种聚合酶链式反应中,确切地说,使用总共50 μl 的一种反应系统,该系统包括50 pmol的具有序列表中序列号为34的序列的引物和50 pmol一种M13引物M4(具有序列表中序列号为10的序列)(对该系统的组成来说,把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第一种反应是由25个聚合酶链式反应的循环组成,其中一个聚合酶链式反应循环包括在98 $^{\circ}\text{C}$ 热变性15秒、在55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30秒并在72 $^{\circ}\text{C}$ 链扩增120秒。在第二种聚合酶链式反应中,使用总共50 μl 的一种反应系统,该系统包括50 pmol的MUT4引物(具有序列表中序列号为11的序列)和50 pmol一种M13引物RV(具有序列表中序列号为12的序列)(对该系统的组成来说,把生产商对试剂盒的说明书作为参考)。第二种反应是由25个聚合酶链式反应的循环组成,其中一个聚合酶链式反应循环与在第一种反应中的循环相同。在聚合酶链式反应之后,把在第一种和第二种反应中分别得到的5 μm 反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳(其中琼脂糖的浓度按重量计为1.0%),由此测定该反应混合物中从DNA的扩增所得到的产物。这种测定能证实在两种聚合酶链式反应中扩增的DNA产物的产生。用这些产物以与实施例6中相同的方式制备一种大肠杆菌库。

把一铂环的从大肠杆菌库中非限定性选择的五种克隆的任何一种接种到10 ml的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上,并37 $^{\circ}\text{C}$ 300 rpm搅拌下温育大约20个小时,把1 ml所得到的培养物装入一只适当的离心试管中,并用与实施例6中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果,在五种克隆中的四种测得丙烯酰胺的形成,这证实这四种克隆有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的四种克隆的培养物各1 ml中分离细胞,并经过碱性SDS提取从而由此提取各克隆的质粒DNA。接着,用与实施例2的相同方式测定各克隆的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表40中,其中已知的所制备的质粒DNA的氨基酸序列中,用Arg取代了野生型脲水合酶 β -亚单位中第108位的Glu,用Glu取代了野生脲水合酶 β -亚单位中第200位的Ala和用Tyr取代了相同的野生脲水合酶 β -亚单位中的第212位的Ser。

表4 0

克隆号	突变位 (在 β -亚 单位中)	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.4 0	在 β -亚单 位中的第 1 0 8 位	G l u	A r g	G A G	C G G
	在 β -亚单 位中的第 2 0 0 位	A l a	G l u	G C C	G A G
	在 β -亚单 位中的第 2 1 2 位	S e r	T y r	T C C	T A C

实施例4 6 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (4 1)

这是用来证实含有包括克隆No.3 4 的突变位和克隆No.3 6 的突变位的多重取代氨基酸序列的突变体具有脲水合酶的活性。

把1 0 ml 的LB液体培养基装入一只3 0 ml 的试管中, 并将其在1 2 1 ° C 高压灭菌2 0 分钟。向该培养基中加入氨苄青霉素到最终浓度为1 0 0 μ m/ml 。其中制备了两种该类型的相同培养基。把一铂环已在实施例3 9 中制得的克隆No.3 4 和一铂环已在实施例4 1 中制得的克隆No.3 6 接种在这些培养基上, 并在3 7 ° C 3 0 0 r p m 搅拌下温育2 0 个小时。把1 ml 所得到的培养物分别放入适当的离心试管中, 以1 5 , 0 0 0 r p m

离心分离5分钟从该培养基中分离出细胞。用碱性SDS提取法从该细胞中提取出克隆No.34的质粒DNA和克隆No.36的质粒DNA。

用限制性核酸内切酶EcoRI和NotI在其切割位切割克隆No.36的质粒DNA,然后经过琼脂糖凝胶电泳(用一种低熔点的琼脂糖, Sigma VII型,琼脂糖浓度为1.0%),通过这种方法把大约770bp的DNA片段切出琼脂糖凝胶。以相同的方式,用限制性核酸内切酶EcoRI和NotI在其切割位切割克隆No.34的质粒DNA,然后经过琼脂糖凝胶电泳(用一种低熔点的琼脂糖, Sigma VII型,琼脂糖浓度为0.7%),通过这种方法把大约3.8Kbp的DNA片段切出琼脂糖凝胶。把这样切割的琼脂糖片断(分别大约0.1g)都粉碎成细粉,然后分别悬浮于1ml的TE,并在55°C加热1小时,由此把该片断完全解链。把所得到的解链蛋白分别进行与实施例2中相同的苯/氯仿提取和乙醇沉淀,由此纯化该片段。最后,将其分别溶于10μl的TE中。

用Takara Shuzo DAN连接试剂盒把从克隆No.36中得到的大约770bp的DNA片段和从克隆No.34中得到的大约3.8Kbp的DNA片段连接在一起构建成一种质粒pPT-DB41。把该质粒DNA pPT-DB41导入大肠杆菌HB101(由Toyobo生产)的感受态细胞中。这样得到一种大肠杆菌克隆No.41。

把一铂环的大肠杆菌克隆No.41接种到10ml的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上,并在37°C 300rpm搅拌下温育大约20个小时。把1ml所得到的培养物装入一只适当的离心试管中,并用与实施例6中相同的方式测定脘水合酶的活性。结果,测得有丙烯酰胺的形成,这证实该克隆No.41有脘水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脘水合酶活性的培养物1ml中分离细胞,并经过碱性SDS提取从而由此提取该克隆的质粒DNA。接着,用与实施例2的相同方式测定克隆No.41的脘水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表41中,其中已知在所制备的质粒DNA的氨基酸序列中,用Thr取代了野生型脘水合酶α-亚单位中第6位的Leu,用Val取代了野生型脘水合酶α-亚单位中第19位的Ala,用Tyr取代了野生型脘水合酶α-亚单位中第126位的Phe,用Asp取代了野生型脘水合酶β-亚单位中

第108位的Glu和用Tyr取代了相同的野生型脲水合酶 β -亚单位中的第212位的Ser。

表4 1

克隆号	突变位	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.41	在 α -亚单位中的第6位	Leu	Thr	CTG	ACG
	在 α -亚单位中的第19位	Ala	Val	GCG	GTG
	在 α -亚单位中的第126位	Phe	Tyr	TTC	TAC
	在 β -亚单位中的第108位	Glu	Asp	GAG	GAT
	在 β -亚单位中的第212位	Ser	Tyr	TCC	TAC

实施例4 7 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (4 2)

这是用来证实含有包括克隆No .3 4 的突变位和克隆No .3 7 的突变位的多重取代氨基酸序列的突变体具有脲水合酶的活性。

把1 0 ml 的LB 液体培养基装入一只3 0 ml 的试管中, 并将其在1 2 1 ° C 高压灭菌2 0 分钟。向该培养基中加入氯苄青霉素到最终浓度为1 0 0 μm/ml 。其中制备了两种该类型的相同培养基。把一铂环已在实施例4 2 中制得的克隆No .3 7 接种在这些培养基上, 并在3 7 ° C 3 0 0 r p m 搅拌下温育2 0 个小时。把1 ml 所得到的培养物分别放入适当的离心试管中, 以1 5 , 0 0 0 r p m 离心分离5 分钟从该培养基中分离出细胞。用碱性S D S 提取法从该细胞中提取出克隆No .3 7 的质粒DNA 。

用限制性核酸内切酶E c o R I 和N o t I 在其切割位切割克隆No .3 7 的质粒DNA , 然后经过琼脂糖凝胶电泳 (用一种低熔点的琼脂糖, S i g m a V I I 型, 琼脂糖浓度为1 .0 %) , 通过这种方法把大约7 7 0 b p 的DNA 片段切出琼脂糖凝胶。用相同的方式, 用限制性核酸内切酶E c o R I 和N o t I 在其切割位切割已在实施例4 6 中所制备的克隆No .3 4 的质粒DNA , 然后经过琼脂糖凝胶电泳 (用一种低熔点的琼脂糖, S i g m a V I I 型, 琼脂糖浓度为0 .7 %) , 通过这种方法把大约3 .8 K b p 的DNA 片段切出琼脂糖凝胶。把这样切割的琼脂糖片段 (分别大约0 .1 g) 都粉碎成细粉, 然后分别悬浮于1 ml 的T E , 并在5 5 ° C 加热1 小时, 由此把该片断完全解链。把所得到的解链蛋白分别进行与实施例2 中相同的苯/氯仿提取和乙醇沉淀, 由此纯化该片段。最后, 将其分别溶于1 0 μl 的T E 中。

用T a k a r a S h u z o DNA 连接试剂盒把从克隆No .3 7 中得到的大约7 7 0 b p 的DNA 片段和从克隆No .3 4 中得到的大约3 .8 K b p 的DNA 片段连接在一起构建成一种质粒p P T -D B 4 2 。把该质粒DNA p P T -D B 4 2 导入大肠杆菌H B 1 0 1 (由T o y o b o 生产) 的感受态细胞中。这样得到一种大肠杆菌克隆No .4 2 。

把一铂环的大肠杆菌克隆No. 42 接种到10 ml 的与在实施例6 中所用的相同活性表达培养基上, 并在37 °C 300 rpm 搅拌下温育大约20 个小时。把1 ml 所得到的培养物装入一只适当的离心试管中, 并用与实施例6 中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果, 测得有丙烯酰胺的形成, 这证实该克隆No. 42 有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的培养物1 ml 中分离细胞, 并经过碱性SDS 提取从而由此提取该克隆的质粒DNA。接着, 用与实施例2 的相同方式测定克隆No. 42 的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表4 2 中, 其中已知在所制备的质粒DNA 的氨基酸序列中, 用Thr 取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第6 位的Leu, 用Val 取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第19 位的Ala, 用Tyr 取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第126 位的Phe, 同时, 用Arg 取代了野生型脲水合酶 β -亚单位中第108 位的Glu 和用Tyr 取代了相同的野生脲水合酶 β -亚单位中的第212 位的Ser。

表4 2

克隆号	突变位	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.4 2	在 α -亚单位中的第6位	L e u	T h r	C T G	A C G
	在 α -亚单位中的第19位	A l a	V a l	G C G	G T G
	在 α -亚单位中的第126位	P h e	T y r	T T C	T A C
	在 β -亚单位中的第108位	G l u	A r g	G A G	C G G
	在 β -亚单位中的第212位	S e r	T y r	T C C	T A C

实施例4 8 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (4 3)

这是用来证实含有包括克隆No. 34的突变位和克隆No. 39的突变位的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

把10 ml的LB液体培养基装入一只30 ml的试管中，并将其在121 °C高压灭菌20分钟。向该培养基中加入氨基青霉素到最终浓度为100 μg/ml。把一铂环已在实施例44中制得的克隆No. 39接种在这些培养基上，并在37 °C 300 rpm搅拌下温育20个小时。把1 ml所得到的培养物分别放入适当的离心试管中，以15,000 rpm离心分离5分钟从该培养基中分离出细胞。用碱性SDS提取法从该细胞中提取出克隆No. 39的质粒DNA。

用限制性核酸内切酶EcoRI和NotI在其切割位切割克隆No. 39的质粒DNA，然后经过琼脂糖凝胶电泳（用一种低熔点的琼脂糖，Sigma VII型，琼脂糖浓度为1.0%），通过这种方法把大约770 bp的DNA片段切出琼脂糖凝胶。用相同的方式，用限制性核酸内切酶EcoRI和NotI在其切割位切割已在实施例46中所制备的克隆No. 34的质粒DNA，然后经过琼脂糖凝胶电泳（用一种低熔点的琼脂糖，Sigma VII型，琼脂糖浓度为0.7%），通过这种方法把大约3.8 Kbp的DNA片段切出琼脂糖凝胶。把这样切割的琼脂糖片段（分别大约0.1 g）都粉碎成细粉，然后分别悬浮于1 ml的TE，并在55 °C加热1小时，由此把该片断完全解链。把所得到的解链蛋白分别进行与实施例2中相同的苯/氯仿提取和乙醇沉淀，由此纯化该片段。最后，将其分别溶于10 μl的TE中。

用Takara Shuzo DNA连接试剂盒把从克隆No. 39中得到的大约770 bp的DNA片段和从克隆No. 34中得到的大约3.8 Kbp的DNA片段连接在一起构建成一种质粒pPT-DB43。把该质粒DNA pPT-DB43导入大肠杆菌HB101（由Toyobo生产）的感受态细胞中。这样得到一种大肠杆菌克隆No. 43。

把一铂环的大肠杆菌克隆No. 43接种到10 ml的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上，并在37 °C 300 rpm搅拌下温育大约20个小时。把1 ml所得到的培养物装入一只适当的离心试管中，并用与实施例6中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果，测得有丙烯酰胺的形成，这

证实该克隆No.43有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的培养物1 ml 中分离细胞，并经过碱性SDS提取从而由此提取该克隆的质粒DNA。接着，用与实施例2的相同方式测定克隆No.43的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表43中，其中已知在所制备的质粒DNA的氨基酸序列中，用Thr取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第6位的Leu，用Val取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第19位的Ala，用Tyr取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第126位的Phe，同时，用Glu取代了野生脲水合酶 β -亚单位中的第200位的Ala和用Tyr取代了相同的野生脲水合酶 β -亚单位中的第212位的Ser。

表4 3

克隆号	突变位	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.43	在 α -亚单位中的第6位	L e u	T h r	C T G	A C G
	在 α -亚单位中的第19位	A l a	V a l	G C G	G T G
	在 α -亚单位中的第126位	P h e	T y r	T T C	T A C
	在 β -亚单位中的第200位	A l a	G l u	G C C	G A G
	在 β -亚单位中的第212位	S e r	T y r	T C C	T A C

实施例4 9 :

具有脲水合酶活性的含有多重取代的氨基酸序列的突变体 (4 4)

这是用来证实含有包括克隆No. 34的突变位和克隆No. 40的突变位的多重取代氨基酸序列的突变体仍具有脲水合酶的活性。

把10 ml的LB液体培养基装入一只30 ml的试管中，并将其在121 °C高压灭菌20分钟。向该培养基中加入氯苄青霉素到最终浓度为100 µg/ml。把一铂环已在实施例45中制得的克隆No. 40接种在这些培养基上，并在37 °C 300 rpm搅拌下温育20个小时。把1 ml所得到的培养物分别放入适当的离心试管中，以15,000 rpm离心分离5分钟从该培养基中分离出细胞。用碱性SDS提取法从该细胞中提取出克隆No. 40的质粒DNA。

用限制性核酸内切酶EcoRI和NotI在其切割位切割克隆No. 40的质粒DNA，然后经过琼脂糖凝胶电泳（用一种低熔点的琼脂糖，Sigma VII型，琼脂糖浓度为1.0%），通过这种方法把大约770 bp的DNA片段切出琼脂糖凝胶。用相同的方式，用限制性核酸内切酶EcoRI和NotI在其切割位切割已在实施例46中所制备的克隆No. 34的质粒DNA，然后经过琼脂糖凝胶电泳（用一种低熔点的琼脂糖，Sigma VII型，琼脂糖浓度为0.7%），通过这种方法把大约3.8 Kbp的DNA片段切出琼脂糖凝胶。把这样切割的琼脂糖片段（分别大约0.1 g）都粉碎成细粉，然后分别悬浮于1 ml的TE，并在55 °C加热1小时，由此把该片断完全解链。把所得到的解链蛋白分别进行与实施例2中相同的苯/氯仿提取和乙醇沉淀，由此纯化该片段。最后，将其分别溶于10 µl的TE中。

用Takara Shuzo DNA连接试剂盒把从克隆No. 40中得到的大约770 bp的DNA片段和从克隆No. 34中得到的大约3.8 Kbp的DNA片段连接在一起构建成一种质粒pPT-DB44。把该质粒DNA pPT-DB44导入大肠杆菌HB101（由Toyobo生产）的感受态细胞中。这样得到一种大肠杆菌克隆No. 44。

把一铂环的大肠杆菌克隆No. 44接种到10 ml的与在实施例6中所用的相同活性表达培养基上，并在37 °C 300 rpm搅拌下温育大约20个小时。把1 ml所得到的培养物装入一只适当的离心试管中，并用与实施例6中相同的方式测定脲水合酶的活性。结果，测得有丙烯酰胺的形成，这

证实该克隆No.44有脲水合酶的活性。

从已保留在其中没有用于测定脲水合酶活性的培养物1 ml 中分离细胞, 并经过碱性SDS提取从而由此提取该克隆的质粒DNA。接着, 用与实施例2的相同方式测定克隆No.44的脲水合酶的结构基因的碱基序列。结果显示在表44中, 其中已知在所制备的质粒DNA的氨基酸序列中, 用Thr取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第6位的Leu, 用Val取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第19位的Ala, 用Tyr取代了野生型脲水合酶 α -亚单位中第126位的Phe, 同时, 用Arg取代了野生型脲水合酶 β -亚单位中第108位的Glu, 用Glu取代了野生脲水合酶 β -亚单位中的第200位的Ala和用Tyr取代了相同的野生脲水合酶 β -亚单位中的第212位的Ser。

表4 4

克隆号	突变位	在氨基酸序列中的改变		在碱基序列中的改变	
		野生型	突变型	野生型	突变型
NO.44	在 α -亚单位中的第6位	L e u	T h r	C T G	A C G
	在 α -亚单位中的第19位	A l a	V a l	G C G	G T G
	在 α -亚单位中的第126位	P h e	T y r	T T C	T A C
	在 β -亚单位中的第108位	G l u	A r g	G A G	C G G
	在 β -亚单位中的第200位	A l a	G l u	G C C	G A G
	在 β -亚单位中的第212位	S e r	T y r	T C C	T A C

本发明的优点

按照本发明，它提供了来自嗜热假诺卡氏菌的脲水合酶的氨基酸序列和碱基序列，还提供了一种改变该脲水合酶的氨基酸序列和碱基序列而几乎不改变其功能的方法，和具有根据所述方法改变的碱基序列和氨基酸序列的脲水合酶，并提供了具有该脲水合酶基因的重组质粒，含有该重组质粒的转化体，用该转化体生产该酶的方法，以及用该转化体由一种脲化合物生产相关酰胺化合物的方法。

序列表

(1) 序列号 No: 1

序列长度: 205

序列类型: 氨基酸

拓扑结构: 线性

分子类型: 蛋白质

起始来源:

微生物名称: 嗜热假诺卡氏菌

菌株名: JCM3095

中间体来源:

克隆名: pPT-DB1

序列特征:

鉴定方法: E

其他信息: 脲水合酶 α 亚单位

序列描述:

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

(2) 序列号 No: 2

序列长度: 233

序列类型: 氨基酸

拓扑结构: 线性

分子类型: 蛋白质

起始来源:

微生物名称: 嗜热假诺卡氏菌

菌株名: JCM3095

中间体来源:

克隆名: pPT-DB1

序列特征:

鉴定方法: E

其他信息: 脲水合酶 β 亚单位

序列描述:

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile

5

10

15

Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val
 20 25 30
 Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu
 35 40 45
 Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu
 50 55 60
 Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly
 65 70 75 80
 Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys
 100 105 110
 Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro
 115 120 125
 Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val
 130 135 140
 Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg
 145 150 155 160
 Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr
 165 170 175
 Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His
 180 185 190
 Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly
 195 200 205
 Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu
 210 215 220
 Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala
 225 230 233

(3) 序列号 No: 3

序列长度: 618

序列类型: 核酸

股数: 双股

拓扑结构: 线性

分子类型: 基因组DNA

起始来源:

微生物名称: 嗜热假诺卡氏菌

菌株名: JCM3095

中间体来源:

克隆名: pPt-DB1

序列特征:

鉴定方法: E

其他信息: 脲水合酶 α 亚单位

序列描述:

```

ATGACCGAGA ACATCCTGCG CAAGTCGGAC GAGGAGATCC AGAAGGAGAT CACGGCCGGG      60
GTCAAGGCC   TGGAGTCGAT GCTCATCGAA CAGGGCATCC TCACCACGTC GATGATCGAC      120
CGGATGGCCG AGATCTACGA GAAACGAGGTC GGCCCGCACC TCGGCGCGAA GGTCTGCTG      180
AAGGCCTGGA CCGACCCGGA GTTCAAGAAG CGTCTGCTCG CCGACGGCAC CGAGGCCTGC      240
AAGGAGCTCG GCATCGGCGG CCTGCAGGGC GAGGACATGA TGTGGGTGGA GAACACCGAC      300
GAGGTCCACC ACGTCGTCGT GTGCACGCTC TGCTCCTGCT ACCCGTGGCC GGTGCTGGGG      360
CTGCCGCCGA ACTGGTTCAA GGAGCCGCAG TACCGCTCCC GCGTGGTGGC TGAGCCCCGG      420
CAGCTGCTCA AGGAGGAGTT CGGCTTCGAG GTCCCGCCGA GCAAGGAGAT CAAGGTCTGG      480
GACTCCAGCT CCGAGATGCG CTTCGTCGTC CTCCCGCAGC GCCCCGCGGG CACCGACGGG      540
TGGAGCGAGG AGGAGCTCGC CACCCTCGTC ACCCGCGAGT CGATGATCGG CGTCGAACCG      600
GCCAAGGCCG TCGCGTGA                                     618

```

(4) 序列号 No: 4

序列长度: 702

序列类型: 核酸

股数: 双股

拓扑结构: 线性

分子类型: 基因组DNA

起始来源:

微生物名称: 嗜热假诺卡氏菌

菌株名: CM3095

中间体来源:

克隆名: pPt-DB1

序列特征:

鉴定方法: E

其他信息: 脲水合酶 β 亚单位

序列描述:

```

ATGAACGGCG TGTACGACGT CGGCGGCACC GATGGGCTGG GCCCGATCAA CCGGCCCGCG      60
GACGAACCGG TCTTCCGGCG CGAGTGGGAG AAGGTCCCGT TCGCGATGTT CCCGGCGACG      120
TTCCGGGCGG GCTTCATGGG CCTGGACGAG TTCCGGTTCG GCATCGAGCA GATGAACCCG      180
GCCGAGTACC TCGAGTGGCC GTACTACTGG CACTGGATCC GCACCTACAT CCACCACGGC      240
GTCCGCACCG GCAAGATCGA TCTCGAGGAG CTGGAGCGCC GCACGCAGTA CTACCGGGAG      300
AACCCCGACG CCCCCTGCC CGAGCACGAG CAGAAGCCGG AGTTGATCGA GTTCGTCAAC      360
CAGGCCGTCT ACGGCGGGCT GCCCGCAAGC CGGGAGGTCG ACCGACCGCC CAAGTTCAAG      420
GAGGGCGACG TGGTGCBBTT CTCCACCGCG AGCCCGAAGG GCCACGCCCG GCGCGCGCGG      480
TACGTGCGCG GCAAGACCGG GACGGTGGTC AAGCACCACG GCGCGTACAT CTACCCGGAC      540
ACCGCCGGCA ACGGCCTGGG CGAGTGCCCC GAGCACCTCT ACACCGTCCG CTTCACGGCC      600
CAGGAGCTGT GGGGGCCGGA AGGGGACCCG AACTCCAGCG TCTACTACGA CTGCTGGGAG      660
CCCTACATCG AGCTCGTCGA CACGAAGGCG GCCGCGGCAT GA      702

```

(5) 序列号 No: 5

序列长度: 20

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸: 合成DNA

序列特征: N是A, C, G或T.

序列描述:

ACNGARAAYA TNYTNMGNA A 20

(6) 序列号 No: 6:

序列长度: 20

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸: 合成DNA

序列特征: N是A, C, G或T.

序列描述:

TTNCKNARNA TRTTYTCNGT

(7) 序列号 No: 7

序列长度: 20

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列特征: N是A, C, G或T.

序列描述:

ATGAA YGGNG TNTAYGANGT 20

(8) 序列号 No: 8:

序列长度: 20

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列特征: N是A, C, G或T.

序列描述:

ACNTCRTANA CNC CRTTCAT 20

(9) 序列号 No: 9:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

AACATCATGC GCAAGTCG 18

(10) 序列号 No: 10:

序列长度: 17

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CAGGAAACAG CTATGAC 17

(11) 序列号 No: 11:

序列长度: 20

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

GGCCAGTGCC TAGCTTACAT 20

(1 2) 序列号 No : 1 2 :

序列长度: 1 7

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

G T T T T C C C A G T C A C G A C

1 7

(1 3) 序列号 No : 1 3 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

A A C A T C A C G C G C A A G T C G

1 8

(1 4) 序列号 No : 1 4 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

A A C A T C G C G C G C A A G T C G

(1 5) 序列号 No : 1 5 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

- 序列描述:
A A C A T C G T G C G C A A G T C G 1 8
- (1 6) 序列号 No : 1 6 :
序列长度: 1 8
序列类型: 核酸
股数: 单股
拓扑结构: 线性
分子类型: 其他核酸; 合成DNA
序列描述:
A T C A C G G T G C G G G T C A A G 1 8
- (1 7) 序列号 No : 1 7 :
序列长度: 1 8
序列类型: 核酸
股数: 单股
拓扑结构: 线性
分子类型: 其他核酸; 合成DNA
序列描述:
A C G T C G T T G A T C G A C C G G 1 8
- (1 8) 序列号 No : 1 8 :
序列长度: 1 8
序列类型: 核酸
股数: 单股
拓扑结构: 线性
分子类型: 其他核酸; 合成DNA
序列描述:
G A C G G C T C C G A G G C C T G C 1 8
- (1 9) 序列号 No : 1 9 :
序列长度: 1 8
序列类型: 核酸
股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCAGGCCG AGGACATG 1 8

(2 0) 序列号 No : 2 0 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

GACGAGGCC ACCACGTC 1 8

(2 1) 序列号 No : 2 1 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CACGTCATCG TGTGCACG

(2 2) 序列号 No : 2 2 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

AACTGGTACA AGGAGCCG 1 8

(2 3) 序列号 No : 2 3 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

GAGCCGGAGT ACCGCTCC 1 8

(24) 序列号 No: 24:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CGGCAGGTGC TCAAGGAG 1 8

(25) 序列号 No: 25:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

AAGGAGGACT TCGGCTTC 1 8

(26) 序列号 No: 26:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

GAGCTCACCA CCCTCGTC 1 8

(27) 序列号 No: 27:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CGCGAGTTGA TGATCGGC 18

(28) 序列号 No: 28:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

GCGAAGGAGG TCGCGTGA 18

(29) 序列号 No: 29:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CGGCCCGTGG ACGAACCG 18

(30) 序列号 No: 30:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CCCGCGAACG AACCGGTC 18

(3 1) 序列号 No: 3 1:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCCCGATC ACGAGCAG 18

(3 2) 序列号 No: 3 2:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCCCCCGC ACGAGCAG 18

(3 3) 序列号 No: 3 3:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCCCTCGC ACGAGCAG 18

(3 4) 序列号 No: 3 4:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCCCGGC ACGAGCAG 18

(35) 序列号 No: 35:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCCCTGCC ACGAGCAG 18

(36) 序列号 No: 36:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCCCTGC ACGAGCAG 18

(37) 序列号 No: 37:

序列长度: 18

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CTGCCACGC ACGAGCAG 18

(38) 序列号 No: 38:

序列长度: 18

- 序列类型: 核酸
 股数: 单股
 拓扑结构: 线性
 分子类型: 其他核酸; 合成DNA
 序列描述:
 TTCACGGACC AGGAGCTG 18
- (39) 序列号 No: 39:
- 序列长度: 18
 序列类型: 核酸
 股数: 单股
 拓扑结构: 线性
 分子类型: 其他核酸; 合成DNA
 序列描述:
 TTCACGATCC AGGAGCTG 18
- (40) 序列号 No: 40:
- 序列长度: 18
 序列类型: 核酸
 股数: 单股
 拓扑结构: 线性
 分子类型: 其他核酸; 合成DNA
 序列描述:
 TTCACGGTCC AGGAGCTG 18
- (41) 序列号 No: 41:
- 序列长度: 18
 序列类型: 核酸
 股数: 单股
 拓扑结构: 线性
 分子类型: 其他核酸; 合成DNA
 序列描述:
 TTCACGGAGC AGGAGCTG 18

(4 2) 序列号 No : 4 2 :

序列长度: 1 8

序列类型: 核酸

股数: 单股

拓扑结构: 线性

分子类型: 其他核酸; 合成DNA

序列描述:

CCGAACTACA GCGTCTAC

1 8

序列表

<110> Haruyoshi, Ikeda

<120> 新型脲水合酶

<130> CPCH0263389D

<140> 021561818

<141> 1997-02-13

<150> JP 27004/96

<151> 1996-02-14

<160> 42

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> 嗜热假诺卡氏菌(*Pseudonocardia thermophila*)

<400> 1

Met Thr Glu Asn Ile Leu Arg Lys Ser Asp Glu Glu Ile Gln Lys Glu
 1 5 10 15

Ile Thr Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Leu Ile Glu Gln Gly
 20 25 30

Ile Leu Thr Thr Ser Met Ile Asp Arg Met Ala Glu Ile Tyr Glu Asn
 35 40 45

Glu Val Gly Pro His Leu Gly Ala Lys Val Val Val Lys Ala Trp Thr
 50 55 60

Asp Pro Glu Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Cys
 65 70 75 80

Lys Glu Leu Gly Ile Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Met Trp Val
85 90 95

Glu Asn Thr Asp Glu Val His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser
100 105 110

Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Phe Lys Glu
115 120 125

Pro Gln Tyr Arg Ser Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Gln Leu Leu Lys
130 135 140

Glu Glu Phe Gly Phe Glu Val Pro Pro Ser Lys Glu Ile Lys Val Trp
145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Glu Met Arg Phe Val Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala
165 170 175

Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Ala Thr Leu Val Thr Arg
180 185 190

Glu Ser Met Ile Gly Val Glu Pro Ala Lys Ala Val Ala
195 200 205

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> 嗜热假诺卡氏菌(*Pseudonocardia thermophila*)

<400> 2

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile
1 5 10 15

Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val
 20 25 30

Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu
 35 40 45

Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu
 50 55 60

Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly
 65 70 75 80

Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys
 100 105 110

Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro
 115 120 125

Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val
 130 135 140

Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg
 145 150 155 160

Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr
 165 170 175

Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His
 180 185 190

Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly
 195 200 205

Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu
 210 215 220

Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala
 225 230

<210> 3

<211> 618

<212> DNA

<213> 嗜热假诺卡氏菌(*Pseudonocardia thermophila*)

<400> 3

atgaccgaga acatcctcgc caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcgg 60

gtcaaggccc tggagtcgat gctcatcgaa cagggcatcc tcaccacgic gatgatcgac 120

cggatggccg agatctacga gaacgaggtc ggcccgcacc tcggcgcgaa ggtcgtcgtg 180

aaggcctgga ccgaccgga gtcaagaag cgtctgctcg ccgacggcac cgaggcctgc 240

aaggagctcg gcatcggcgg cctgcagggc gaggacatga tgggggtgga gaacaccgac 300

gaggtccacc acgtcgtcgt gtgcacgctc tgctcctgct acccgtggcc ggtgctgggg 360

ctgccgccga actggttcaa ggagccgcag taccgctccc gcgtggtgcg tgagccccgg 420

cagctgctca aggaggagt cggcttcgag gtcccgccga gcaaggagat caaggtctgg 480

gactccagct ccgagatgcg ctctgtctc ctcccgcagc gccccgagg caccgacggg 540

tggagcgagg aggagctcgc caccctcgtc acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600

gcgaaggcgg tcgcgtga 618

<210> 4

<211> 702

<212> DNA

<213> 嗜热假诺卡氏菌(*Pseudonocardia thermophila*)

<400> 4

atgaacggcg tgtacgacgt cggcggcacc gatgggctgg gcccgatcaa cggccccgcg 60
gacgaaccgg tcttccgcgc cgagtgggag aaggctcgt tcgcatgtt cccggcgacg 120
ttcggggcgc gcttcatggg cctggacgag ttccggttcg gcatcgagca gatgaaccg 180
gccgagtacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240
gtccgcaccg gcaagatcga tctcaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccgggag 300
aaccggcagc ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttgatcga gttcgtcaac 360
caggccgtct acggcgggct gcccgcaagc cgggaggtcg accgaccgcc caagttcaag 420
gagggcgacg tggcgcggtt ctccaccgcg agcccgaagg gccacgcccg gcgcgcgcgg 480
tacgtgcgcg gcaagaccgg gacggtggtc aagcaccacg gcgcgtacat ctaccgggac 540
accggcgca acggcctggg cgagtgcccc gagcacctct acaccgtccg cttcacggcc 600
caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg tctactacga ctgctgggag 660
ccctacatcg agctcgtcga cacgaaggcg gccgcggcat ga 702

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> N=A,C,G or G

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)
<223> N=A,C,G or G

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> N=A,C,G or G

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> N=A,C,G or G

<400> 5
acngaraaya tnytnmgnaa

20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> N=A,C,G or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> N=A,C,G or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> N=A,C,G or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> N=A,C,G or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> N=A,C,G or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> N=A,C,G or T

<400> 6

ttnccknarna trtitytngt

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> N=A,C,G or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)
<223> N=A,C,G or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> N=A,C,G or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> N=A,C,G or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> N=A,C,G or T

<400> 7
atgaayggng tntaygangt

20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> N=A,C,G or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> N=A,C,G or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> N=A,C,G or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> N=A,C,G or T

<400> 8

acntcrtana cncrrttcat

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 9

aacatcatgc gcaagtcg

18

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 10

caggaaacag ctatgac

17

<210> 11

<211> 20

<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 11
ggccagtgcc tagcttacat

20

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 12
gttttcccag tcacgac

17

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 13
aacatcgcgc gcaagtcg

18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 14
aacatcacgc gcaagtcg

18

<210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

 <220>
 <223> yes

 <400> 15
 aacatcgtgc gcaagtcg 18

<210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

 <220>
 <223> yes

 <400> 16
 atcacggtgc ggtcaag 18

<210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

 <220>
 <223> yes

 <400> 17
 acgtcgtga tcgaccgg 18

<210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

 <220>

<223> yes

<400> 18

ctgcaggccg aggacatg

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 19

gacgaggccc accacgtc

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 20

cacgtcatcg tgtgcacg

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 21

aactggtaca aggagccg

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 22
gagccggagt accgctcc

18

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 23
cggcaggtgc tcaaggag

18

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 24
aaggaggact tcggcttc

18

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 25
gagctcacca ccctcgtc

18

<210> 26
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
 <223> yes

<400> 26
 cgcgagttga tgatcggc

18

<210> 27
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
 <223> yes

<400> 27
 gcgaaggagg tcgctga

18

<210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
 <223> yes

<400> 28
 cggcccgtgg acgaaccg

18

<210> 29
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 29

cccgcgaacg aaccggtc

18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 30

ctgcccgatc acgagcag

18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 31

ctgccccgc acgagcag

18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 32

ctgccctcgc acgagcag

18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 33
ctgccccggc acgagcag 18

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 34
ctgccctgcc acgagcag 18

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 35
ctgcccctgc acgagcag 18

<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> yes

<400> 36
ctgcccacgc acgagcag 18

<210> 37
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
 <223> yes

<400> 37
 ttcacggacc aggagctg

18

<210> 38
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
 <223> yes

<400> 38
 ttcacgatcc aggagctg

18

<210> 39
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>
 <223> yes

<400> 39
 ttcacgtcc aggagctg

18

<210> 40
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 40

ttcacggagc aggagctg

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 41

ccgaactaca gcgtctac

18

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213>人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> yes

<400> 42

acgtcgttga tcgaccgg

18

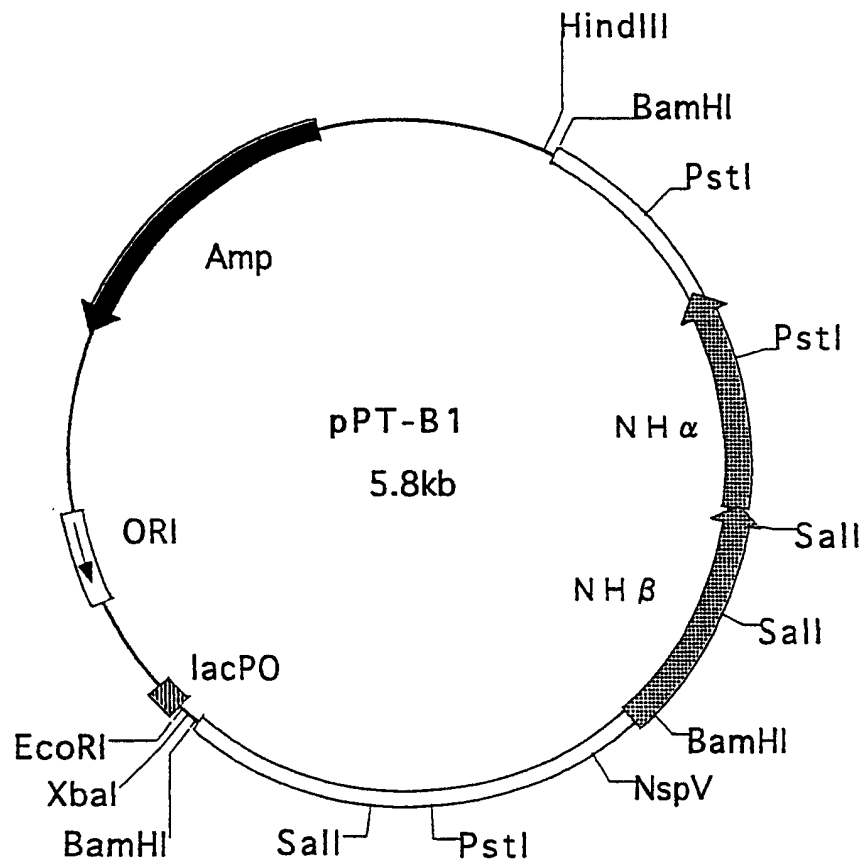


图 1

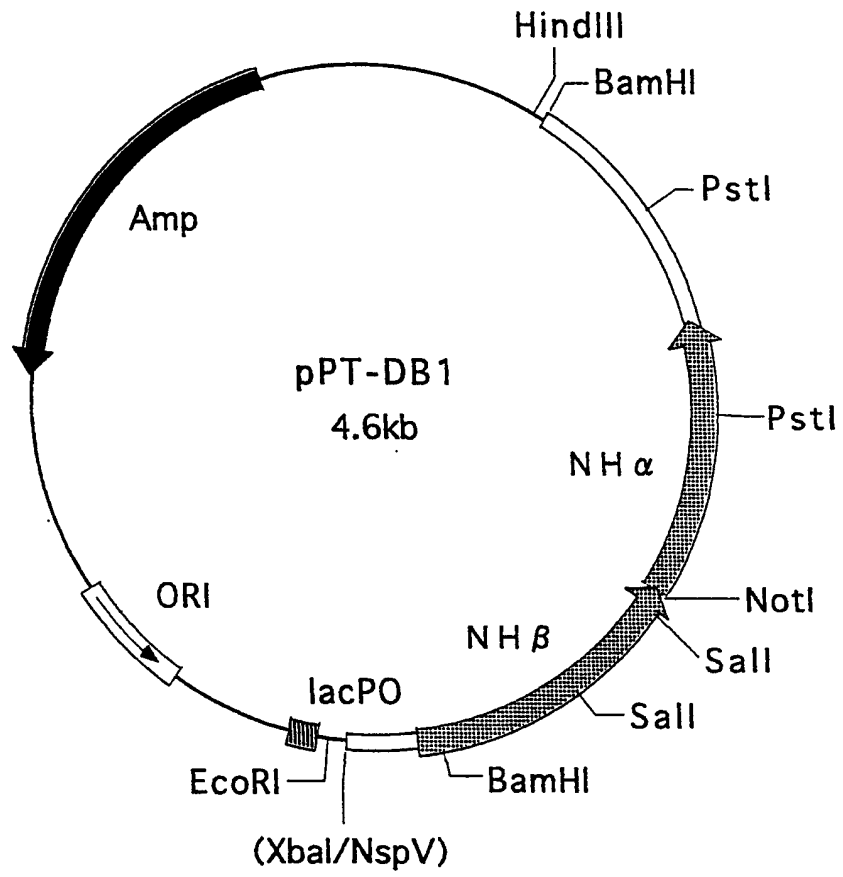


图 2