



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106188093 B

(45)授权公告日 2018.06.12

(21)申请号 201510233240.0

A61P 31/10(2006.01)

(22)申请日 2015.05.08

A61P 31/02(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 陈曦

申请公布号 CN 106188093 A

(43)申请公布日 2016.12.07

(73)专利权人 上海医药工业研究院

地址 200040 上海市静安区北京西路1320号

专利权人 中国医药工业研究总院

(72)发明人 胡海峰 黄鹤 高苹 赵琪

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

代理人 朱水平 沈利

(51)Int.Cl.

C07D 498/18(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

C12P 17/18(2006.01)

序列表14页 附图5页

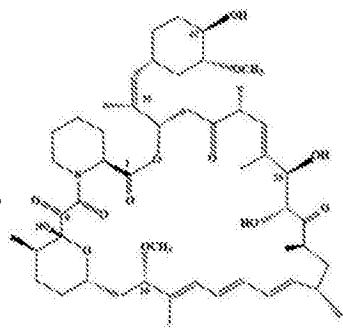
(54)发明名称

一种雷帕霉素结构类似物及其制备方法

(57)摘要

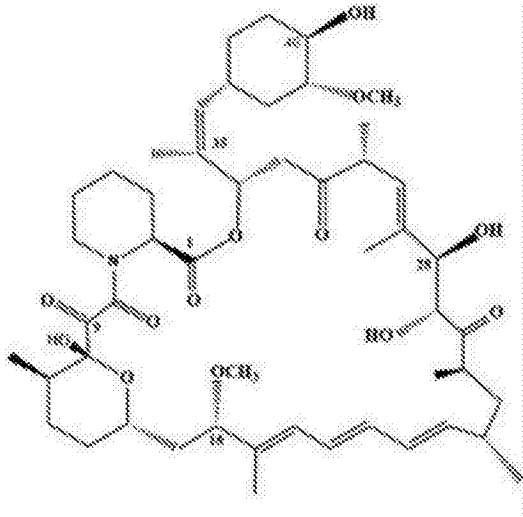
本发明提供了一种雷帕霉素结构类似物及其制备方法。所述雷帕霉素结构类似物如式1所示。所述制备方法包括：发酵培养含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌，从发酵液中获得；所述聚酮合酶rapA突变基因如序列表SEQ ID No.1所示。本发明提供的雷帕霉素结构类似物制备方法与现有的化学合成法相比操作更简单，成本更低，对环境污染较小，且通过该制备方法所制得的雷帕霉素结构类似物具有很好的抗真菌

效果。



式1。

1. 结构如式1所示35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素:



式 1。

2. 一种如权利要求1所述35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素的制备方法,其特征在于,其包括下述步骤:发酵培养含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌N902-109,从发酵液中获得;所述聚酮合酶rapA突变基因如序列SEQ ID No.1所示。

3. 如权利要求2所述制备方法,其特征在于,所述含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌N902-109的制备方法包括下述步骤:

(1) 将含有所述聚酮合酶rapA突变基因突变位点的基因片段连接到载体上,制得含有所述聚酮合酶rapA突变基因片段的重组载体;所述含有聚酮合酶rapA突变基因突变位点的基因片段的序列为SEQ ID No.1所示序列中的第5736位~第10693位;

(2) 将步骤(1)所述重组载体转化到供体菌,得转化供体菌;

(3) 将步骤(2)所述转化供体菌与所述游动放线菌N902-109的菌丝接合,挑选接合子;

(4) 将含有归巢内切酶基因表达载体的供体菌与步骤(3)所述接合子混合,挑选具有步骤(1)所述突变位点的双交换接合子。

4. 如权利要求3所述制备方法,其特征在于,步骤(2)所述供体菌为大肠杆菌;和/或,步骤(4)所述归巢内切酶为I-SceI;和/或,步骤(4)所述供体菌为大肠杆菌。

5. 如权利要求2所述制备方法,其特征在于,所述发酵包括下述步骤:将含有如权利要求2所述含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌N902-109的种子液接到发酵培养基中,28℃220转/分恒温培养9天。

6. 如权利要求2所述制备方法,其特征在于,所述从发酵液中获得所述35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素包括下述步骤:用丙酮从所述发酵液中提取得到所述35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素,上大孔树脂后洗脱、浓缩后得浓缩洗脱产物,乙酸乙酯萃取得所述35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素粗提物。

7. 如权利要求6所述制备方法,其特征在于,所述萃取的次数为2次;和/或,所述萃取剂与所述浓缩洗脱产物的体积比为1:1;和/或,所述浓缩为35℃减压浓缩。

8. 如权利要求6所述制备方法,其特征在于,其还包括下述步骤:溶解所述35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素粗提物,上样于硅胶,洗脱得纯化后的35,36-二脱氢-27-O-去甲

基雷帕霉素。

9. 如权利要求8所述制备方法,其特征在于,所述硅胶为300-400目硅胶;和/或,溶解所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素粗提物的溶剂为体积比为1:1的二氯甲烷和环己烷;和/或,洗脱溶剂为体积比为10:1~20:1的环己烷和丙酮。

10. 如权利要求1所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素在制备抗真菌组合物中的应用。

一种雷帕霉素结构类似物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及组合生物合成领域,具体涉及一种雷帕霉素结构类似物及其制备方法。

背景技术

[0002] 雷帕霉素是一种31元环的含氮三烯大环内酯类化合物,是临床上应用的重要免疫抑制剂和抗肿瘤药物研发的中间体。temsirolimus, everolimus和zotarolimus都是半合成的雷帕霉素结构类似物,已分别于2004, 2005, 2007年被FDA批准作为抗肿瘤药物和心血管支架涂层药物上市销售。

[0003] 在天然产物中,除一部分化合物自身可以成药,大部分是作为先导化合物通过基团修饰,改造其成药性质,成为半合成药物应用于临床。对于大部分结构复杂的天然化合物进行化学合成或者基团结构修饰,面临着立体异构和选择性等诸多技术难点。而改造合成化合物的微生物宿主基因组,利用其自身生物合成的能力生产结构修饰的类似物,从某种程度上突破了化学合成的技术瓶颈。使之以低成本,环境友好方式实现化学合成技术无法实现的复杂结构化合物的生物合成成为可能。

[0004] 雷帕霉素的结构类似物合成研究方式主要也以突变合成,前体指导的生物合成及化学成为主。

[0005] 突变合成(mutasynthesis):L-proline和结构类似物能够代替雷帕霉素合成所需的天然前体L-pipecolate掺入聚酮链,产生prolylrapamycin等新结构化合物。含硫的L-pipecolate的类似物也可以作为前体被非核糖体肽合成酶rapP利用从而产生雷帕霉素衍生物

[0006] 前体指导的生物合成(Precursor directed biosynthesis):雷帕霉素的聚酮合酶A的加载模块具有较高的底物宽泛性,可以将不同的DHCHC的类似物加入到分子中产生雷帕霉素的结构类似物。雷帕霉素loading molecular的42位碳原子是一个有价值的修饰位点,迄今为止FDA批准上市的雷帕霉素的结构类似物无一例外均是该位点的不同修饰产物。

[0007] 化学合成:雷帕霉素与mTOR结合部位也是进行修饰的靶点。通过化学合成方法在雷帕霉素三烯位置的修饰得到的化合物WYE-592与ILS-920,由于破坏了和mTOR的结合结构,因此这两种化合物的免疫抑制功能明显降低,而与FKBP52的结合能力增强,表现出显著的神经保护(neuroprotective activities)的活性。

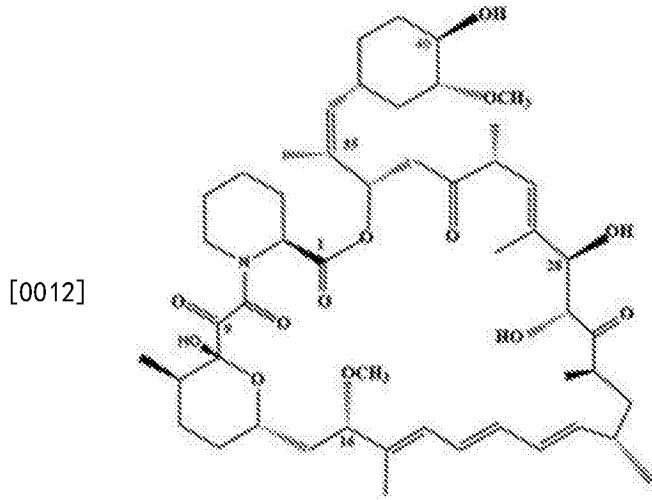
[0008] 而通过敲除吸水链霉菌的雷帕霉素合成的后修饰酶,也得到了一系列不完全甲基化的化合物。

[0009] 目前对雷帕霉素结构类似物进行化学合成或者基团结构修饰都面临着立体异构和选择性等诸多技术难点的问题,因此亟需一种工艺简单,低成本,环境友好的合成方法来合成雷帕霉素的结构类似物。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是为了克服对雷帕霉素类似物进行化学合成或者基团结构修饰面临着立体异构和选择性等诸多技术难点的问题,提供了一种利用能够生产雷帕霉素的微生物游动放线菌 (*Actinoplanes* sp.N902-109) 自身生物合成能力来生产雷帕霉素结构类似物的方法,并通过该方法制备得到了一种雷帕霉素结构类似物。本发明提供的制备方法与现有的化学合成法相比操作更简单,成本更低,对环境污染较小,且通过该制备方法所制得的雷帕霉素结构类似物具有很好的抗真菌效果。

[0011] 本发明技术方案之一:结构如式1所示35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素:



式 1。

[0013] 本发明技术方案之二:一种前述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素的制备方法,其包括下述步骤:发酵培养含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌N902-109,从发酵液中获得;所述聚酮合酶rapA突变基因如序列表SEQ ID No.1所示。

[0014] 本发明中,所述聚酮合酶rapA突变基因可以来自任何来源,包括从体内分离获取和合成得到。所述聚酮合酶rapA突变基因的制备方法为本领域常规方法,较佳地为PCR分别扩增所述突变基因的突变位点的上游和下游的片段后用核酸酶切割再连接即得。所述核酸酶为本领域常规核酸酶,较佳地为限制性内切核酸酶,如Nhe I。所述连接酶为本领域常规连接酶,更佳地为T4 DNA连接酶。所述含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌的制备方法可以为本领域常规的操作,较佳地可以包括下述步骤:(1)将含有所述聚酮合酶rapA突变基因突变位点的基因片段连接到载体上,制得含有所述聚酮合酶rapA突变基因片段的重组载体;所述含有聚酮合酶rapA突变基因突变位点的基因片段的序列为SEQ ID No.1序列中的第5736位~第10693位;(2)将步骤(1)所述重组载体转化到供体菌,得转化供体菌;(3)将步骤(2)所述转化供体菌与所述游动放线菌N902-109的菌丝接合,挑选接合子;(4)将含有归巢内切酶基因表达载体的供体菌与步骤(3)所述接合子混合,挑选具有步骤(1)所述突变位点的双交换接合子。

[0015] 步骤(1)所述载体可以为本领域常规载体,包括各类原核载体与真核载体,较佳地为原核载体,更佳地为pLYZL102载体。所述重组载体可以通过本领域常规方法制得,较佳地可以将含有所述聚酮合酶rapA突变基因突变位点的基因片段连接到本领域各类常规载体上得到。

[0016] 步骤(2)中,所述供体菌可以为本领域常规供体菌,较佳地为大肠杆菌,更佳地为大肠杆菌ET12567(pUZ8002)菌株。所述转化可以为本领域常规转化方法,较佳地为电转化法。

[0017] 步骤(3)中,所述接合后较佳地还可以用接合转移培养基培养,所述接合转移培养基可以为本领域常规的培养基,较佳地包括下述组分:0.5%豆饼粉,0.5%甘露醇,0.5%可溶性淀粉,0.2%胰蛋白胨,0.1%酵母提取物,0.1%NaCl,0.2%(NH₄)₂SO₄,0.1%K₂HPO₃,0.2%CaCO₃,0.2%MgCl₂,2%琼脂粉,0.0001%ZnSO₄,0.0001%FeSO₄,0.0001%MnSO₄和补至100%的水,所述百分比为各组分质量占所述接合转移培养基体积的质量体积百分比。

[0018] 步骤(4)中,所述归巢内切酶可以为本领域常规的酶,较佳地为I-SceI。所述供体菌可以为本领域常规菌种,较佳地为大肠杆菌,更佳地为大肠杆菌ET12567(pUZ8002)菌株。所述挑选双交换接合子可以为本领域的常规方法,较佳地为利用抗生素压力进行挑选。更佳地为利用安普霉素压力来挑选,如将含有安普霉素启动子驱动的I-SceI基因的表达载体的大肠杆菌与步骤(3)所述接合子混合,培养传2代后挑选安普霉素抗性丢失的双交换接合子。

[0019] 本发明中,所述发酵包括下述步骤:将含有前述含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌N902-109的种子培养基接到发酵培养基中,28℃220转/分恒温培养9天。所述含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌N902-109的种子培养基的接种量可以为本领域常规的接种量,较佳地为5-15%,所述百分比为占所述发酵培养基体积的体积百分比。所述含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌N902-109的种子培养基可以通过本领域常规方法制得,较佳地可以通过下述步骤制得:(1)接种所述含有聚酮合酶rapA突变基因的游动放线菌至游动放线菌发酵斜面培养基,涂布均匀,28℃恒温培养7-9天;(2)刮取斜面菌丝体接入一级种子培养基中,28℃,220转恒温培养4-5天;(3)取步骤(2)所述一级种子培养基接种到二级种子培养基中,28℃220转/分恒温培养3-4天即得。所述游动放线菌发酵斜面培养基为本领域常规,较佳地包括下述组分:葡萄糖2%、可溶性淀粉4%、酵母提取物0.1-0.2%、酶水解干酪素0.5%、CaCO₃0.1%和琼脂1.6%和补至100%的水,所述百分比为各组分质量占所述游动放线菌发酵斜面培养基总体积的质量体积百分比。所述游动放线菌发酵斜面培养基的制备方法可以为本领域常规方法,较佳地包括下述步骤:将所述原料组分混合、调pH至7.0~7.2,灭菌。所述灭菌可以为本领域常规灭菌方法,较佳地为115℃~121℃灭菌15min~20min,更佳地为115℃灭菌15min。所述一级种子培养基可以为本领域常规培养基,较佳地包括下述组分:可溶性淀粉3%、葡萄糖2%、干酵母0.5%、玉米浆干粉0.5%、花生粕0.5%、CaCO₃0.2%和补至100%的水,所述百分比为所述各组分的质量占所述一级种子培养基总体积的质量体积百分比。所述一级种子培养基的制备方法可以为本领域常规方法,较佳地包括下述步骤:将所述各组分混合、调pH至7.0,灭菌。所述灭菌可以为本领域常规灭菌方法,较佳地为115℃~121℃灭菌15min~20min,更佳地为115℃灭菌15min。所述二级种子培养基可以为本领域常规培养基,较佳地包括下述组分:可溶性淀粉3%、葡萄糖4%、玉米浆干粉0.8%、棉子蛋白粉0.8%、CaCO₃0.3%、泡敌0.2%、MgSO₄·7H₂O 0.00025%、CoCl₂·6H₂O 0.0001%、VB₁0.02%、VB₁₂0.00002%、叶酸0.0025%和补至100%的水,所述百分比为所述各组分的质量占所述二级种子培养基总体积的质量体积百分比。所述二级种子培养基的制备方法可以为本领域常规方法,较佳地包括下述步骤:将所述各组分混合、调pH

至6.9,灭菌。所述灭菌为本领域常规灭菌方法,较佳地为115℃~121℃灭菌15min~20min,更佳地为115℃灭菌15min。步骤(3)中,所述一级种子培养基的接种量可以为常规的接种量,较佳地为5-10%,所述百分比为占所述二级种子培养基体积的体积百分比。所述发酵培养基可以为本领域常规的培养基,较佳地为步骤(3)所述二级种子培养基。

[0020] 本发明中,所述从发酵液中获得所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素包括下述步骤:用丙酮从所述发酵液中提取得到所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素,上大孔树脂后洗脱、减压浓缩后得浓缩洗脱产物,萃取得所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素粗提物。所述减压浓缩可以为本领域常规的操作,所述减压浓缩的温度较佳地为35℃。所述萃取可以为本领域常规的操作,所述萃取使用的萃取剂可以为本领域常规萃取剂,较佳地为乙酸乙酯。所述萃取的次数可以为常规的次数,较佳地为2次。所述萃取剂与所述浓缩洗脱产物的体积比可以为常规的比例,较佳地为1:1。

[0021] 本发明较佳地还可以包括下述步骤:所述萃取后加入5%的无水硫酸钠脱水,35℃减压浓缩。35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素粗提物。

[0022] 本发明较佳地还可以包括用硅胶分离纯化所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素粗提物,其包括下述步骤:溶解所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素粗提物,上样于硅胶,洗脱得纯化后的35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素。所述硅胶可以为本领域常规硅胶,较佳地为300-400目硅胶。所述溶解所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素粗提物的溶剂可以为本领域常规的溶剂,较佳地为体积比为1:1的二氯甲烷和环己烷。所述洗脱使用的溶剂可以为本领域常规的溶剂,较佳地为体积比为10:1~20:1的环己烷和丙酮。

[0023] 本发明技术方案之三:如前所述35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素在制备抗真菌组合物中的应用。

[0024] 本发明中,所述抗真菌药物组合物可以为本领域常规所指的试剂,较佳地为可以抑制黑曲霉所引起的黑霉的组合物或可以治疗白色念珠菌所引起的疾病的组合物,所述可以治疗白色念珠菌所引起的疾病的组合物较佳地为可以治疗由白色念珠菌引起的皮肤念珠菌病、粘膜念珠菌病、内脏念珠菌病、念珠菌疹和免疫缺陷疾病的组合物。

[0025] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0026] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0027] 本发明的积极进步效果在于:本发明提供了一种组合生物合成方法合成雷帕霉素结构类似物的途径,该方法工艺简单,以低成本,环境友好的方式实现了化学合成技术无法实现的复杂结构化合物的生物合成,并且所合成的雷帕霉素结构类似物具有很好的抗真菌效果。

附图说明

[0028] 图1:游动放线菌rapA基因功能域排列和突变位点设计示意图。

[0029] 图2:游动放线菌N902-109单交换重组克隆PCR示意图。SC1和SC2分别代表两个单交换克隆;AC:游动放线菌N902-109。

[0030] 图3为:游动放线菌N902-109双交换重组克隆PCR及PCR产物酶切图。A1-A7:双交换菌株;AC:游动放线菌N902-109。

- [0031] 图4:雷帕霉素及其结构类似物发酵液HPLC分离图谱。
- [0032] 图5:雷帕霉素和及其结构类似物的紫外吸收峰图。
- [0033] 图6:游动放线菌rapA基因ER功能域点突变质粒pLYERIA示意图。
- [0034] 图7:质粒pLYERIA的构建流程示意图。
- [0035] 图8:质粒pSETSI的构建流程示意图。

具体实施方式

[0036] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0037] 本发明所用到的试剂和主要仪器:

[0038] 限制性内切酶购自Thermo Scientific.连接酶ligation solution I、T4 DNA polymerase、限制性内切酶pshAI、10mM dNTP购自TaKaRa公司。pACK4aPCR片段克隆载体购自苏州盘古基因有限公司。高保真DNA聚合酶Neo KOD-plus购自Toyobo公司。安普霉素购自DUCHEFA公司。萘啶酮酸,壮观霉素购自于生工生物工程公司。质粒抽提和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自Axygen公司。Easytaq购自全式金生物公司。PCR仪为Biometra Tprofessional TRI0,离心机为Eppendorf 5424和5415R,HPLC色谱仪为Agilent Technologies 1200series型高效液相色谱仪,质谱仪为Waters公司Waters Q-TOF Micromass质谱仪,核磁共振仪为Inova-400核磁共振仪,色谱柱:Waters NaVa-PaK C8柱,规格:(3.9mm×150mm,5μm);HF254高效硅胶板购自烟台江友硅胶开发有限公司。其他试剂均为国产分析纯,购自国药集团。引物合成委托南京金斯瑞生物技术有限公司,基因测序服务由上海杰李生物科技公司提供。

[0039] 本发明所用到的游动放线菌N902-109见下述专利文献:美国专利(US5674732),所用到的白色念珠菌(*Candida albicans*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和青霉菌(*Penicillium Sp.*)均购自美国ATCC,黑曲霉(*Aspergillus niger*)购自CGMCC,白色念珠菌的保藏号为ATCC11651,酿酒酵母的保藏号为ATCC204508,青霉菌的保藏号为ATCC32029,黑曲霉的保藏号为CGMCC3.3928。所用到的大肠杆菌ET12567(pUZ8002)菌株见下述文献:Macneil DJ,Gewain KM,Ruby CL,Dezeny G,Gibbons PH,Macneil T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for Avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*.1992,111(1):61-68;所用到的质粒来源如下:pSET152见下述参考文献:Bierman M,Logan R,Obrien K,Seno ET,Rao RN,Schoner BE: Plasmid Cloning Vectors for the Conjugal Transfer of DNA from *Escherichia.coli* to *Streptomyces Spp.* *Gene* 1992,116(1):43-49;pSETspc由pSET152改造得到,见图8;pSETSI由pSET152改造得到,见图8;pLYZL102见下述参考文献:Shen Y, Huang H,Zhu L,Luo M,Chen D. Type II thioesterase gene (ECO-orf27) from *Amycolatopsis orientalis* influences production of the polyketide antibiotic, ECO-0501 (LW01). *Biotechnology Letters*.2012,34(11):2087-2091.;pLYERIA由pLYZL102改造得到,见图7;pLU101见下述参考文献:Lu Z,Xie P,Qin Z:Promotion of markerless deletion of the actinorhodin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces*

coelicolor(dagger).Acta Biochimica Et Biophysica Sinica 2010,42(10):717-721; pIJ773和pIJ778见下述参考文献:Gust B,Challis GL,Fowler K,Kieser T,Chater KF: PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003,100(4):1541-1546;pACK4aBS购自盘古基因(苏州)科技有限公司。

[0040] 实施例1

[0041] 游动放线菌聚酮合酶rapA的功能域结构分析。

[0042] 利用<http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>进行聚酮合酶rapA功能域的预测,结果如表1所示:

[0043] 表1

[0044]

蛋白质	推测的功能(蛋白质结构域及其氨基酸在序列中的位置)						
Act_rapA		加载模块	模块 1	模块 2	模块 3	模块 4	
	CL	1-629					
	KS		1217-1635	3150-3556	4705-5125	6269-6689	
	AT		1701-2003	3649-3914	5211-5485	6775-7049	
	ER	630-930	2486-2782				
	DH		2068-2232	3958-4111	5550-5714	7114-7276	
	KR	940-1060	2792-2960	4352-4520	5958-6110	7522-7694	
	ACP	1128-1195	3058-3025	4615-4682	6179-6246	7791-7858	

[0045] rapA基因包含了一个加载模块和四个链延伸模块,每个模块的排布示意图如图1所示。Act_rapA指游动放线菌rapA基因,CL为羧酸连接酶,AT为酰基转移酶功能域,KS为酮基合成酶功能域,DH为脱氢酶功能域,ER为烯酰还原酶功能域,KR为酮基还原酶功能域,ACP为酰基载体蛋白功能域。

[0046] 实施例2

[0047] 游动放线菌rapA ER功能域点突变同源双交换菌株的获得。

[0048] 游动放线菌rapA ER功能域点突变的示意图见图1。通过两对引物ERIAUs-ERIAUas与ERIADAs-ERIADAas分别扩增游动放线菌rapA基因ER功能域突变位点上游和下游的两个片段,再通过引入的突变位点中包含的限制性内切酶NheI将两个片段连接起来。

[0049] A) 游动放线菌N902-109基因组的提取:

[0050] 取少量游动放线菌N902-109菌丝体接种于含5mL YEME培养基的试管中,于30℃振荡培养约72小时。3500rpm离心收集菌丝体,用TES(10mM Tris-HCl pH7.5,EDTA 1mM,NaCl 50mM)洗两次。向收集的菌丝体中加入1mL TES(含溶菌酶终浓度5mg/mL),涡旋至均一,37℃水浴60分钟,加入蛋白酶K(终浓度达到0.1mg/mL),0.1mL 10% SDS,混匀后迅速放入55℃水浴60分钟,待溶液澄清。置于冰上冷却,加入0.25mL 5M KAc,冰上冷却15分钟。加入0.5mL

酚:氯仿(Tris饱和酚pH7.5:氯仿:异戊醇为体积比25:24:1),轻柔颠倒混匀,于4℃ 12000rpm离心10分钟。用剪口的1mL枪头将水相吸出转移至新离心管,加等量氯仿抽提,12000rpm,4℃离心10分钟,用剪口的1mL枪头将水相吸出转移至新的离心管,加入0.1体积的3M NaAc,两倍体积的无水乙醇,混匀,出现絮状DNA。将其勾出至于新离心管中,加入0.5mL 70%的乙醇洗涤,用枪吸净液体,稍干后加入300 μ l TE溶解,加入RNA酶(终浓度为50 μ g/mL),37℃水浴30分钟。

[0051] B) 烯酰还原酶功能域定点突变质粒pLYERIA的构建:

[0052] 以游动放线菌N902-109基因组为模板,以引物ERIADAAs (HindIII) 和ERIADAs (NheI),ERIAUAs (XbaI) 和ERIAUAAs (NheI),分别进行高可性度扩增得到长度为2846bp,2142bp的ER功能域下同源臂和上同源臂片段。反应体系(50 μ l)包括:5 μ l 10 \times KOD NEO plus缓冲液,3 μ l 25mM MgCl₂,1.5 μ l 2.5mmol/L dNTP溶液,2.5 μ l DMSO,30pmol P1,30pmol P2,1U KOD NEO plus DNA聚合酶,50ng基因组DNA,加双蒸水至50 μ l。PCR反应程序为:95℃5min,30个循环(94℃30s,56℃30s,72℃120s),72℃10min。PCR产物纯化后,分别取2 μ l与0.5 μ l pACK4aBS载体混合,37℃放置15min,转化大肠杆菌DH5a获得pACK4a-ERIADA,pACK4a-ERIAUA质粒。以NheI,HindIII酶切pACK4a-ERIADA得到ERIADA片段,以NheI,XbaI酶切pACK4a-ERIAUA得到ERIAUA片段,以HindIII,XbaI酶切pLYZL102得到载体片段,三者片段连接得到pLYERIA质粒,流程图见图7,pLYERIA质粒图谱见图6。

[0053] C) 游动放线菌N902-109与大肠杆菌接合转移:

[0054] i) 游动放线菌rapA基因ER功能域同源单交换菌株的获得

[0055] 制备游动放线菌菌丝体悬液:取3 μ l游动放线菌甘油保藏液涂布I-Isp2固体培养基。30℃培养120小时左右。用无菌刮棒刮取表面菌体,用15-20mL无菌水分两次洗下并通过玻璃珠在旋涡振荡器上震荡6-8次,每次10秒钟,将悬液通过置有棉花塞的无菌注射器针筒,滤出液经过7000转/分离心10min,弃去上清,用适量0.4-1.0mL无菌水重悬得到菌丝体悬液。

[0056] 从LB平板(50 μ g/mL卡那霉素,50 μ g/mL安普霉素,25 μ g/mL氯霉素)上挑取ET12567(pUZ8002)单菌落,接种含有同上抗生素的3mL LB液体培养基,培养过夜。次日以0.5%(v/v)接种量接入含有同上浓度的三种抗生素的10mL LB三角瓶中,37℃培养至OD 0.4-0.6,4500rpm 5min,4℃离心收集菌体,弃上清,用同体积无菌10%甘油洗涤两次,重悬在约500 μ L 10%甘油中并分装成50 μ l每管即为ET12567/pUZ8002电转化感受态待用。将100ng pLYERIA质粒加入到ET12567/pUZ8002细胞中,电压2.5kv,电阻200欧姆,电击转化,加入1.0mL无菌冷LB重悬并37℃培养1hr,涂LB平板(50 μ g/mL卡那霉素,50 μ g/mL安普霉素,25 μ g/mL氯霉素),筛选ET12567(pUZ8002)的pLYERIA转化子。将含有pLYERIA质粒的大肠杆菌ET12567(pUZ8002),于接合转移前一天接种单菌落到3mL LB试管中,加入50 μ g/mL卡那霉素,50 μ g/mL安普霉素,25 μ g/mL氯霉素培养过夜,次日以1%(v/v)接种量接入含有同浓度的三种抗生素的10mL LB三角瓶中,37℃培养至OD 0.4-0.6,4500rpm,5min,4℃离心收集菌体,弃上清,用同体积无菌LB洗涤两次,重悬在约200 μ L LB中待用。

[0057] 将大肠杆菌菌液与制备好的游动放线菌N902-109菌丝悬液100 μ l充分混合,涂布2块含有终浓度20mM MgCl₂的M-Isp4平板上,30℃培养24小时后,每板均匀平铺混合了0.7mL无菌水、15 μ l 50mg/ml溶解于0.1N的NaOH中的萘啶酮酸和15 μ l 50mg/ml安普霉素的溶液。

30℃继续培养6天,至单克隆长出。挑选单克隆用引物apr-V-R和ERIAVAS进行PCR检验,得游动放线菌rapA基因ER功能域同源单交换菌株N902ERSC。

[0058] ii) 游动放线菌rapA基因ER功能域同源双交换菌株的获得

[0059] a) 基于限制性内切酶I-SceI的基因点突变

[0060] I-SceI表达质粒pSETSI的构建流程见图8,具体流程如下:pSET152用pshAI酶切,用Fast AP酶去磷酸基团。pIJ778用XbaI切出1.3kb壮观霉素抗性基因片段,用T4 DNA聚合酶补平末端。与pSET152pshAI载体连接获得pSETspc质粒。paacs, paacas引物以pIJ773为模板,使用KOD NEO plus进行高可信度PCR扩增,获得的片段以BamHI, NdeI酶切即为安普霉素启动子插入片段, pLU101用NdeI, EcoRI切下I-SceI插入片段。安普霉素启动子片段和I-SceI片段与BamHI, EcoRI酶切的pSETspc载体相连,获得pSETSI。

[0061] b) 制备大肠杆菌ET12567 (pUZ8002) 的感受态细胞,转化pSETSI质粒,感受态细胞的制备与质粒转化的方法同前述。

[0062] c) 在单交换菌株N902ERSC胞内表达I-SceI酶筛选双交换菌株

[0063] 将含有pSETSI质粒的大肠杆菌ET12567 (pUZ8002), 于接合转移前一天接种单菌落到3mL LB试管中,加入50μg/mL卡那霉素,50μg/mL安普霉素,25μg/mL氯霉素37℃培养过夜,次日以1% (v/v) 接种量接入含有同浓度的三种抗生素的10mL LB三角瓶中,37℃培养至OD 0.4-0.6,4500rpm,5min,4℃离心收集菌体,弃上清,用同体积无菌LB洗涤两次,重悬在约200μL LB中待用。

[0064] 将大肠杆菌菌液与制备好的游动放线菌N902-109菌丝悬液100u1充分混合,涂布2块含有终浓度20mM MgCl₂的M-Isp4平板上,30℃培养24小时后,每板均匀平铺混合了0.7ml无菌水、15μl 50mg/ml溶解于0.1N的NaOH中的萘啶酮酸和15μl 50mg/ml壮观霉素的溶液。30℃继续培养6天,至单克隆长出,得到正确整合的同源双交换菌株N902ERSCI克隆。挑选克隆在液体培养基M-Isp2中培养N902ERSCI并连续传代2次,稀释培养物,涂布M-Isp2平板至长出单克隆。将单克隆分别划线无安普霉素M-Isp2和含有30μg/ml安普霉素M-Isp2平板,挑出对安普霉素敏感的克隆,以ERIAvs、ERIAvas PCR扩增安普霉素敏感克隆,回收PCR产物,并进行NheI酶切反应,挑选出游动放线菌rapA基因ER功能域突变菌株N902ERIA。

[0065] pLYERIA通过接合转移转化游动放线菌N902-109得到了两个单克隆。抽提基因组,用引物apr-V-R和ERIAvas进行PCR验证,见图2。PCR结果说明,pLYERIA质粒在游动放线菌rapA基因的正确ER功能域位置插入基因组,单交换菌株N902ERSC基因型正确。

[0066] pSETSI通过接合转移转化单交换菌株N902ERSC获得整合有I-SceI基因的菌株N902ERSCI。通过不加琼脂的液体M-Isp 2两次培养传代,诱导双交换环出,挑选双交换突变株。对挑到的七株安普霉素抗性丢失的双交换菌株,以基因组为模板,以ERIAvs和ERIAvas作为引物进行PCR扩增验证。PCR片段以NheI酶切,结果如图3所示。野生型游动放线菌的ER功能域位点不存在NheI位点,而设计的突变位点引入了NheI位点。突变ER功能域的NheI特征酶切图谱为2.9kb和1.9kb。根据图3,可以说明:A3为双交换菌株恢复野生型,其余六株均为ER功能域突变的双交换菌株。测序结果明确显示即游动放线菌rapA基因ER功能域的活性位点氨基酸A-G-G突变成为氨基酸A-S-P。

[0067] 表2所用到的和构建的质粒

[0068]	质粒	基因型与特征
	pSET152	<i>acc(3)IV, integrase^{ΦC31}</i>
	pLYZL102	<i>acc(3)IV, bla, oriT</i>
	pLYERIA	<i>acc(3)IV, bla, oriT</i>
[0069]	pLU101	<i>bla, tsr, ptipAI</i> <i>SceI</i>
	pSETspc	<i>aadA, integrase^{ΦC31}</i>
	pIJ778	<i>aadA, bla, oriT</i>
[0070]	表3所用到的引物名称及序列	
	引物	序列 (5' -3')
	paacs	AGGATCCAGCTCACGGTAACTGA
	paacas	ACATATGACATTGCACTCCACCG
	sceIF	ACATATGCACCAGAAGAACCA
	sceIR	GTCTAGATCACTTCAGGAAGGTCT
[0071]	ERIADAas	AAAGCTTCAGGATCAAAGGCAGGGGCA
	ERIADA _s	AGCTAGCCCTGTGGGTATGGCGGCGACTCAG
	ERIAUAas	AGCTAGCAGCGGCATGAATCAACAC
	ERIAUA _s	ATCTAGATGAGTTGCTGGCGTTGACC
	ERIAVas	CGGGTTGTCAGGTCGGCT
	ERIAV _s	GTGGGCGAGGCAGTCTTC
	Apr-v-R	GTTGATGGCAAAGGTTCCCTATG
[0072]	表4使用到的和构建的菌株	
	菌株	基因型与特征
	N902	<i>Actinoplanes</i> sp. N902-109
[0073]	N902ERSC	单交换菌株, <i>Ac_rapA::acc(3)IV</i> ,
	N902ERSCI	单交换菌株加整合载体 <i>Ac_rapA::acc(3)IV</i> , <i>aadA^{int}, paacISceI^{int}</i>

	N902ERIA	双交换菌株加整合载体
[0074]		<i>Ac_rapA::ERdomain*</i> , <i>aadA^{int}</i> , <i>paacISceI^{int}</i>
	ET12567	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdS</i> , <i>hsdR</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>
	(pUZ8002)	<i>tra</i> , <i>neo</i> , <i>RP4</i>

[0075] 所用到的培养基成分如下:

[0076] LB: 胰蛋白胨10g, 酵母提取物5g, NaCl 10g, 加水至1L, 灭菌。

[0077] YEME: 蔗糖170g, 酵母提取物3g, 细菌蛋白胨 (Bactopeptone) 5g, 麦芽糖提取物3g, 葡萄糖10g, 调pH至7.0, 加水至1L, 灭菌后加入MgCl₂至终浓度5mM。

[0078] YM培养基: 0.3% 酵母膏 (w/v), 0.5% 胰蛋白胨 (w/v), 0.5% 麦芽糖 (w/v), 补水至100%, 调pH至9.0。

[0079] M-Isp2: 麦芽糖提取物10g, 葡萄糖4g, 酵母粉4g, 琼脂20g, 加水至1L, pH7.0, 灭菌。

[0080] M-Isp4: 豆饼粉5g, 甘露醇5g, 可溶性淀粉5g, 胰蛋白胨2g, 酵母提取物1g, NaCl 1g, (NH₄)₂SO₄2g, K₂HPO₃1g, CaCO₃2g, 琼脂粉20g, 无机盐微量元素溶液1ml, 加水至1L, pH7.0, 灭菌。无机盐微量元素溶液: ZnSO₄1g, FeSO₄1g, MnSO₄1g, 加水至1L。

[0081] 游动放线菌发酵斜面培养基: 葡萄糖20g、可溶性淀粉40g、酵母提取物5g、酶水解干酪素5g、CaCO₃1g和琼脂16g, 加水至1L, pH7.0-7.2。

[0082] 一级种子培养基: 可溶性淀粉30g、葡萄糖20g、干酵母5g、玉米浆干粉5g、花生粕5g和CaCO₃2g, 加水至1L, pH7.0。

[0083] 二级种子培养基: 可溶性淀粉30g、葡萄糖40g、玉米浆干粉8g、棉子蛋白粉8g、CaCO₃3g、泡敌2g、MgSO₄·7H₂O 0.0025g、CoCl₂·6H₂O 0.001g、VB₁0.2g、VB₁₂0.0002g和叶酸0.025g, 加水至1L, pH6.9。

[0084] 实施例3

[0085] 雷帕霉素结构类似物的发酵制备与鉴定

[0086] A) 游动放线菌N902-109ERIA的发酵

[0087] 将甘油管保藏的游动放线菌N902-109ERIA菌液滴接入游动放线菌发酵斜面培养基的斜面, 用接种棒涂布均匀, 28℃恒温培养7-9天。用接种铲刮取斜面菌丝体接入30ml一级种子培养基中, 28℃, 220转恒温培养4-5天后按接种量10%接到二级种子培养基, 所述百分比为占所述二级种子培养基体积的体积百分比, 28℃220转/分恒温培养3-4天, 再按接种量7.5%-10%接到装有二级种子培养基的发酵瓶中, 所述百分比为占所述发酵瓶中二级种子培养基体积的体积百分比, 摇床转速220转/分28℃恒温培养9天。

[0088] B) 35, 36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素的提取

[0089] 发酵液中按照比例加入2.5%硅藻土助滤剂搅拌5分钟, 所述百分比为所述硅藻土质量占所述发酵液体积的质量体积百分比, 真空抽滤; 收集滤饼, 在滤饼中加入等体积的60% (v/v) 丙酮搅拌, 浸泡2h; 抽滤, 收集滤液。再使用60% (v/v) 丙酮同样提取一次, 合并两次滤液。

[0090] 丙酮提取液中加入两倍体积的水稀释丙酮浓度, 混合均匀后上X-5 (4cm×40cm) 大孔树脂柱; 上样完毕后, 依次用水、30% (v/v) 丙酮、40% (v/v) 丙酮、50% (v/v) 丙酮、60%

(v/v) 丙酮各2L梯度洗脱, TLC分析, 合并含有目标产物的洗脱液, 35℃减压浓缩, 获得去除丙酮的乳浊液, 所述百分比为丙酮体积占丙酮水溶液总体积的体积百分比。

[0091] 向乳浊液中加入等体积的乙酸乙酯搅拌萃取2次, 合并两次乙酸乙酯的萃取液, 加入5%的无水硫酸钠脱水, 所述百分比为所述无水硫酸钠质量占水体积的体积百分比, 35℃减压浓缩至浆状物, 获得含有目标产物的粗提物。

[0092] 分离纯化: 称取300-400目硅胶适量, 加入环己烷湿法装柱(3cm×32cm)。向样品中加入1.5mL二氯甲烷和1.5mL环己烷溶解粗提物后, 上样于硅胶柱。洗脱溶剂为环己烷和丙酮, 比例分别为20:1、18:1、15:1、12:1、10:1, 每个比例各250ml, 至梯度10:1时等度洗脱, 收集洗脱液, 用薄层色谱TLC法检测收集液, 将含有目标产物的较纯收集液合并, 35℃减压浓缩至浆状物。将浓缩物用二氯甲烷溶解, 用HPLC半制备, 收集高纯度的目标产物, 浓缩、真空干燥。取部分样品用二氯甲烷溶解, 进行正相HPLC分析。

[0093] 分析方法

[0094] TLC分析:

[0095] 用毛细管吸取待测样品, 于HF254高效硅胶板上点样, 后于展开剂中展开, 当展开剂前沿跑至距离硅胶板上端0.5cm处时, 取出硅胶板, 冷风吹干。将风干后的硅胶板放入含有纯碘的密闭容器中片刻, 直至斑点显色。展开剂系统: 环己烷: 丙酮=1:1。

[0096] 表5 35, 36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素的物化性质及薄层层析迁移率

性质	具体数据
外观	白色结晶粉末
溶解性	溶于丙酮、乙酸乙酯、乙腈; 微溶于乙醚; 不溶于环己烷
分子量	897
分子式	$C_{49}H_{71}NO_{13}$
TLC 分析 Rf	环己烷: 丙酮 (1:1) =0.35

[0097] HPLC正相分析:

[0099] 仪器: Waters 515型高效液相色谱仪, 包括带PDA的s996型紫外检测器; 色谱柱: Welch Ultimate XB-CN柱(4.6mm×250mm, 5μm); 进样量: 20μl; 检测检测波长: 278nm; 流动相: 环己烷: 异丙醇=95:5; 流速: 1ml/min; 柱温: 室温。

[0100] 游动放线菌N902-109的发酵液中检测到雷帕霉素和去甲基雷帕霉素, 游动放线菌N902-109ERIA菌株则合成少量的雷帕霉素, 而出现了一个新未知产物的峰, 结果如图4所示。该化合物被命名为SIPI-Rapxin。该新化合物的紫外吸收光谱与雷帕霉素十分接近, 如图5所示, 推测其应该是雷帕霉素的结构类似物。

[0101] 质谱与NMR数据测定:

[0102] 分离纯化获得新的雷帕霉素结构类似物SIPI-Rapxin的样品测定MS和NMR图谱数据。

[0103] 结果显示,检测到SIPI-Rapxin(化合物3)与27-去甲基雷帕霉素(化合物1)的紫外光谱基本一致,表明两个化合物结构类似。根据化合物3的ESI-MS图谱,MS图谱中出现920 ($M+Na^+$)峰,因此推断其分子量为897,比雷帕霉素分子量913少16,推测可能缺少一个 $-CH_2-$ 亚甲基基团和2个氢质子,化合物3可能的分子式为 $C_{49}H_{73}NO_{13}$ 。

[0104] 分析化合物3的 1H NMR和 ^{13}C NMR图谱,结果见表6发现其仅有两个甲氧基 3H 峰(3.13和3.17ppm)和两个甲氧基的碳原子峰(55.8和56.4ppm),而27-0-去甲基雷帕霉素分子结构中含有二个甲氧基(分别连接于16,39位碳原子上,化学位移分别为:55.9、56.8ppm)。化合物3与27-0-去甲基雷帕霉素的甲氧基完全一致。因此,推测化合物2可能为27-0-去甲基雷帕霉素类似物。进一步分析发现化合物3比化合物1多一个双键,存在于35和36位碳原子,与工程菌构建一致。因此,3化合物结构为35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素。

[0105] 表6 27-0-去甲基雷帕霉素(化合物1)和SIPI-Rapxin(化合物3)的 ^{13}C -NMR数据对比

[0106]

C 原子编号	C 编号 C 结构	1			3		
		主要 C 化学位移 ppm	微小 C 化学位移 ppm	氢原子化学位移 ppt	主要 C 化学位移 ppm	微小 C 化学位移 ppm	氢原子化学位移 ppt
1	C=O	169.5	169.7	-	168.837	169.156	-
2	CH	51.4	56.7	5.23	51.407	-	5.23
3	CH ₂	27	-	2.32,1.72	27.174	27.046	1.62,2.30
4	CH ₂	20.7	-	1.77,1.47	20.6	-	1.46,1.73
5	CH ₂	25.2	24.5	1.69,1.45	25.145	24.412	1.47,1.70

[0107]

6	CH ₂	44.3	41.1	3.51,3.38	44.303	43.262	2.70,3.51
8	C=O	166.6	166.0	-	166.734	165.906	-
9	C=O	194.4	195.8	-	194.101	196.500	-
10	O-C-OH	98.7	98.9	-	98.664	98.940	-
11	CH	34.3	-	2.08	34.246	-	2.10
12	CH ₂	27.1	27.9	1.62	26.802	26.919	1.46,1.72
13	CH ₂	31.6	31.8	1.72,1.30	31.241	31.241	2.0,1.33
14	CH-C	67.3	68.0	3.99	67.517	68.058	3.95
15	CH ₂	39.7	39.4	1.92,1.73	40.936	40.713	1.25,1.32
16	CH-O-CH ₃	83.8	83.8	3.63	83.892	-	3.62
17	C=C	137.2	137.2	-	136.862	136.692	-
18	CH=C	128.4	128.6	6.01	128.589	128.727	6.05
19	CH=C	126.9	126.5	6.37	126.784	126.540	6.34
20	CH=C	133	133.1	6.25	133.134	133.235	6.22
21	CH=C	130.3	130.1	6.11	130.214	129.970	6.12
22	CH=C	139.3	139.9	5.49	139.283	139.750	5.51
23	CH	34.8	35.2	2.31	34.958	34.958	2.30
24	CH ₂	38.4	-	1.50,1.25	39.641(40.936)	39.142	1.88
25	CH	40.7	40.6	2.70	40.713	-	2.82
26	C=O	215.1	215.17	-	215.318	216.051	-
27	CH-O-CH ₃	75.7	75.6	4.34	75.991	75.874	4.28
28	CH-OH	78	78.4	4.19	78.115	78.391	4.18
29	C=C	135.8	136.6	-	135.927	136.000	-

[0108]

30	CH=C	125.7	126.3	5.43	125.765	-	5.41
31	CH	46.2	46.0	3.43	46.161	46.161	3.38
32	C=O	208.2	207.9	-	207.481	207.067	-
33	CH ₂	40.8	46.0	3.34	44.080	43.262	2.70,3.40
34	CH-O-CO	75.6	75.7	5.12	75.694	75.566	5.50
35	CH	33.7	32.7	1.86	131.541 C=	131.212	-
36	CH ₂	38.9	38.4	1.29,1.10	132.805 CH=	-	5.28
37	CH	33.2	33.0	1.37	34.703	34.703	2.28
38	CH ₂	34.4	34.2	2.05,0.65	34.597	34.597	0.97,2.10
39	CH-O-CH	84.5	84.5	2.92	84.126	-	3.00
40	CH-OH	74	74.1	3.37	73.442	73.442	3.38
41	CH ₂	31.3	31.3	1.97,1.32	29.661	-	1.68,1.26
42	CH ₂	30.8	30.5	1.67,0.96	30.264	30.260	1.10,1.50
43	11-CH ₃	16.1	-	0.95	16.034	16.459	0.95
44	17-CH ₃	10.4	10.6	1.67	10.299	10.607	1.66
45	23-CH ₃	21.2	21.4	1.03	21.2	21.300	1.20
46	25-CH ₃	13.7	14.1	0.99	13.655	13.145	0.94
47	29-CH ₃	13.9	13.4	1.80	13.655	14.218	1.76
48	31-CH ₃	16	15.9	1.08	16.034	15.853	1.11
49	35-CH ₃	15.6	-	0.89	12.455	12.636	1.63
50	16- ¹³ C-CH ₃	55.9	55.8	3.12	55.846	55.697	3.13
52	39- ¹³ C-CH ₃	56.8	57.0	3.40	56.441	56.441	3.37

[0109] 注:1为文献报导的27-去甲基雷帕霉素NMR数据;3为SIPI-Rapxin的NMR数据数据。

[0110] 效果实施例1

[0111] 35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素的抗真菌活性测定

[0112] (1) 200u1的YM液体酵母培养物(30℃培养20h)加入100ml温热的YM培养基,0.8%

琼脂,倒板,每板约15-20ml。

[0113] (2) 霉菌YM液体培养物(30℃培养36hr) 630u1加入100ml温热的YM培养基,0.8%琼脂,倒板,每板约15-20ml。

[0114] (3) 将雷帕霉素溶于甲醇,梯度稀释至20、10、5、2.5和1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,将35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素溶于甲醇,稀释至20与10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将以上各个浓度的样品各取100u1加在直径1cm的滤纸圆片上,室温放置10分钟将甲醇挥发,将滤纸片轻盖贴合在平板的四个象限中,室温放置30分钟使药品扩散在培养基中。接着放30℃培养2-3天直至抑菌圈产生。

[0115] (4) 测量抑菌圈的直径:以药品浓度的对数和抑菌圈直径作图,将一定浓度的35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素产生的抑菌圈直径根据标准曲线计算获得同直径抑菌圈的雷帕霉素的浓度,将35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素浓度/雷帕霉素浓度的比值作为相对抑菌活性的表征,结果见表7。

[0116] 表7雷帕霉素和35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素的相对抗真菌活性

[0117]

菌株名称	相对抗真菌活性	
	雷帕霉素	35,36-二脱氢-27-O-去甲基雷帕霉素
白色念珠菌	1.0	0.23
酿酒酵母	1.0	0.55
黑曲霉	1.0	0.40
青霉菌	1.0	0.43

[0118] 根据表7的结果,35,36-二脱氢-27-0-去甲基雷帕霉素对白色念珠菌、酿酒酵母、黑曲霉和青霉菌的抑制效果明显强于雷帕霉素。

[0119] 应理解,在阅读了本发明的上述内容之后,本领域技术人员可以对本发明的相关条件作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

<110> 上海医药工业研究院, 中国医药工业研究总院

<120> 一种雷帕霉素结构类似物及其制备方法

<130> 9

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23817

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> *Actinoplanes sp.* 聚酮合酶 rapA 突变基因

<400> 1

atgtcacgcg eggaattgat acggcgcgtc cacgaattgc ttgcggtgaa tgccgggcga 60
 cgcgcgacaa aggtggccta cgcggtatcc eggeggtccg tgaecgacgc cgagctgctt 120
 ctccggaccg ggcggctcgc cggtcactcg gccgggctcg gcgtcgagcg cggcgaccgg 180
 gtggcgatcc tgctgggcaa ccgcgtcgag acgatggaga gctacctggc catcgcccgc 240
 gccggcgcga tcgccgtgcc gctcaacacc gaggectccg acgcccagat cgagcactgc 300
 [0001] ctgtccgaca gggcgccgtt ggccgtcctg accggtgaag cccatctega cctggtaacc 360
 cgggtggccc ccgccgcggc tgccgtcccg gccggcgaca tegacgagct ggccggcacc 420
 gaaccggtea ccccggcccg cgacgacctg aggetcgacg agccggcctg gatgetctac 480
 acctccgga ccaaggcacc ccccagggc gtcgtgcca cccaggcag cgggctgtgg 540
 tcggccgca actgcgacgt gccgcctgg cagctgaccg aggacgacgt cctgctctgg 600
 ccggcgccgc tgttccacag cctcggccac cacctgtgcc tgctggccgt caccgcgctc 660
 ggccgcgacc cgccgatcct cggcaccttc gtggccggcg aggtccctga ccagttgcgc 720
 gaacacaact gcaccgtcct cgtcggcgtc cccaccatgc accgetacct ggtggccgcg 780
 gccggtgccg gggagccccg taccgccgcg ctcaagatgg gcctggctgc cggcgcggtc 840
 gcacccccgg cgtctatcca gggcttcgag gacgtcttcg gggtgccgct gctcgacacg 900
 tacggctgea ccgagaccac cggctcgtc acggtgaact ggctcgacgg tccccgggtc 960
 cccgctcgtt ggggcttcc cgtaccggg gtggcgctgc ggttcgtga cccggtcacc 1020
 ggtgccgacg taccagcgg tgccgaaggt gaactctggg cggcacacc gagcgtcatg 1080
 agcggctaacc accggcagcc cgacgccacc agcggagtgc tcaccgacgg ctggtaccgc 1140
 accggtgacc tggccccgca gacgcgctcg ggacacgtea ccatcaccgg ccggaatcaag 1200

	gagctcatca tccgcggcgg ggagaacatc ccccccgcg agatcgaac ggtggcctc	1260
	gacgtacccg gggtaagga cgcggccgcg gggggcgcg ggcacccgt cctcggcgag	1320
	alcccggcgc lgtacgctgt lgccgagccc ggtggcgtgg acgcgagge ggtgctcgac	1380
	cggtgccgag accggtgtc gtacttcaag gtcccgagg agatctacca ggtcgccgc	1440
	atccccgga cggcctcggg aaaggctgca cggaaaccgc tcaccagga gccggccgaa	1500
	ctgctcgccg gggcccgagg caccgagtcg ctgcaccgc tcgagtgac gccatcgac	1560
	ctgcccgcg tcagcctgc cgagcggccg caggacccg cccgggtgcg caccaccag	1620
	cacgcgggtc acgtcaegac cggcgacctg ccggacccc ggcaagcagc ccggtgggac	1680
	gccacccgg ccgaaccga cgtcgtgctc gtcgacctc acgacaccga ccccggcgac	1740
	gccgtcctcg cgacgtggc cggcctgggc gaccgctca tcgctgcg cgaggccaag	1800
	gcgtacgtcg cgcggtcgc cgacgcgcc agccgctgc tcaccgtgc cccgaccgt	1860
	gccctgggtc lgcgccatcc gaccagcga accctgcgc acctcgccc ggtcgcgat	1920
	gacacggcgc ggcgcgccct gcaaccggc gaggtgcgc tcgccgtacg cgcagccgga	1980
	ctgaacttcc gcgacgtgt catcgcgtg ggcacctacc ccggcgagg cgtgatgggc	2040
[0002]	ggcgaggcgc cggcgtgt gctcgagtc ggcgccgcg tcaccgggt gaaccgccgc	2100
	gaccgggtgt tcggcctgt caccgcggc ttggggcca tcgccatcac cgaccaccg	2160
	acgtcggcgc tgatccccg cgaactgtc ttccgaccg cggcctcct gccatcgtc	2220
	ttgccaccg cctactaccg cctggtggac ctccggcgc tcggcgcgg cgaatccgtg	2280
	ctcatccag cgggcgcggg cggcgtcggc atggcccca ccagatcgc ccagcacc	2340
	ggcgcgccga tcttcgccac ggcaagtgc gcaaacatc acatcctcg taeggcggg	2400
	ctgcccgag accagatcgc cgactccgt accaccgct tcagaactg gttccgcgc	2460
	ggcctagac tcgtgtgaa ctgcctcagc ggggagttc tcgacgctc ggtcagcctg	2520
	ctgcccagc gcggccgctt cctcgagatg ggcaagacc acatccggga cgcggaccac	2580
	gtcgtcgcg accggcccgc gccaccctac caggcgttc acctgctgga cgcgggccg	2640
	gaccggtgc gcgagatcat cgcgagctg ctgacctgt tcgccgggg ggtgctcgg	2700
	ccgtgccgc tcgcgcctg ggacatcct caggcgcgg acgcgttcag ctggatgagc	2760
	cgccccgc acatcggca gatggtgctg accgtcccgc acgggctcga cgcgacgc	2820
	acggtgctga tcaccggca ctccggattc cgcgccgcg gcgtggccc gcatctggtg	2880
	tccatcacg gggttcgca tctggtgctg gacaccgac agccggtcga cgagaegctc	2940

	gtcgcgagc igaccgccct eggegeggeg gtcaccccc ctgcgcagca tccgttgacg	3000
	gcagtggctc acaccggcgg ccccgccctc gctgactcg accagcagac ccgcagcctc	3060
	gacctgcgag cattedtgge ettcagcgag gacgccccgg ccaccgtcga agccctcacc	3120
	cgccgccgcc gagccgacgg ctccccggcc acggcgatcg cctggggcct gcccgagggc	3180
	gaaccggcgg cgatccgcgg cgagctgate ggccgtgcgc tggcggcgcc cgaccggcgg	3240
	tacgtggctc cccggatcaa caccgccggc ctgcgcgcc ttgcagccgc cggggagctg	3300
	ccgccgtac tgcggaacct ggcagcccg cgcaccaac ccgggacgag caccggtgaa	3360
	eggaccgga ccggcctgct cgatctggtg cggcgcagca tcategacat cctcgggccc	3420
	gccgccggcg agegcttcgc tccgggccgg acgttccggg agaccggcat cgactcgctg	3480
	accgccgtgg agctgcgcaa cagcttgca caggccaccg ggctgccct gccggccacg	3540
	ctggtcttcg actaccggc cccggccgtg ctggtcgcgc ggctggaaga gctgaccggc	3600
	ggcgcgccc gtactcggc accggtgicc gccacggctg gtcaggacga accgctggcg	3660
	atcgtgggta tggcttgccg gttgccgggt ggggtgtcgt cgcggagga cctgtggcgg	3720
	ctggtggagt cgggcaegga tgcgatctcg gtttcccg ttgatcgtgg ctgggatgta	3780
[0003]	gacgggtgt tcgatccgga tcccgacgag gtggcaaga cgtattcgt gcagggtggt	3840
	ttctggaca cggcggcgga gttcgacgag gcgtcttcg ggateagtc ccgtgaggcc	3900
	ctggcgatgg atccgcagca gcggctggtg ctggaggctt cgtgggaagc cttcgagcgg	3960
	gccggtatcg aaccggctc ggtaccggc agcgacaccg gcgtgttcac gggggccttc	4020
	gccggagget atgcggccga cctcgaagge ttcggtgcga cggccggtgc gacaagtgtg	4080
	ttgtcggggc ggggtgctga ctcttcggg ttcgagggtc cggcgatgac ggtggacacg	4140
	gcgtgtcgt cgtcgttggg gctttgcat caggccgggt acgcgttgcg gcagggtgaa	4200
	tgtcactgg clcllglcgg lggltcacc gllalggcaa gcccgcagag tlllglggag	4260
	ttctccggc agegggggct ggtcgggac ggtcgtagta aggcgtttgc cgatgctgcc	4320
	gatggtacgg gctgggctga ggggtcgggt gtctgctcg tcgagcggt gtcggatgcg	4380
	caggctcaag ggcatcaggt ccttgcggtg gtacggagct ccgccgtgaa ccaggacggt	4440
	gcctgaacg ggctgtccgc gccgaacggg ccgtcgcagc agcgggtgat ccggcaggcg	4500
	ctggccaatg cggltctgac lccggcggac gtcgatgttg lggaagccca lgggacgggt	4560
	acgacgctgg gtgatccgat cgaggegcag gcggttatcg ccaegtacgg gcaggatcgc	4620
	tcagccctg tgttctggg ctggttgaag tcgaacatcg ggcatactca ggctgccct	4680

	ggtgtggctg gtgtgatcaa gatggtgatg gcggttgcggc acggggtggt gccgcggtcg	4740
	cttcatgttg acgtgcegte ggcicatgtt gaetggtegg ctggtgctgt tgatgtggte	4800
	acgtcgaatc aaccgtggcc gtctgtggat cggccggggc gtgctgggtg gtcggcgttc	4860
	ggggtcagtg gcaccaacgc gcaigtgatt ctggagagtg egccttccga gccggcggat	4920
	cagattgccg ggccggtgcc cgtggtggcg gacgtcgtgc cgctggtgct gtctgtctgc	4980
	actgtgccgg cgttgacgga gcttgaggcg cgggtgcgcg cctatgtgtc ggcggcagag	5040
	gatgacaggg ctgttgcctc gacgltggcg tctctctggg cgggtgtcga gcaccgggt	5100
	gtattgateg gcgaggacac cgtcaacggg tctgcgttga gcgatcccg cattgttttc	5160
	gtgttccccg gccaggctg gcagtggctc ggcattggcg ttgcgttgcg cgactcgtcg	5220
	gtcgtcttcc cctcccggtt ggcgagtggt gctgccgcgc ccagcgagtt cgtcagatgg	5280
	gatctgtttg ctgccctcga cgaccggct gtggttgatc gggttgatgt ggtccagccg	5340
	gtgtgctggg cggtcattgt gtctgtgcc gggctctgga aagccctgg tgtaaccccc	5400
	gacgccgtt cgggcaactc ccaaggtgag atcggcctg cgggtgtcgc ggggtcactg	5460
	tcgttgcgcg acggcgcaag ggtagtggcg ttgcgcagcc agctgatcgc ccagggcctg	5520
[0004]	gccggacgtg gtgccatggc ctgattgctg ctgccgctg atgagatcac cctggttgag	5580
	ggltcgttga tccggcgctt caalggcccg gttccacagg tgattgcggg cacgccggat	5640
	gcggtcgagg cgggtcttgc cgcgcaggat gccagggtgc ggcgtatcgc ggtggattat	5700
	gcctcgcaca ccccgaggt tgaggcgatt cgtgatgagt tgetggcgtt gaccgctgat	5760
	gttgactcgc gggcccctgc cgtgccgtgg ttgtcaactg ttgacggcac gtgggtggat	5820
	ggcccgcctga gcgttgacta ctggttccgc aacctgcgtg agcaagtcgg ttttgcctaa	5880
	gcggtggacg tgctgcgcg caccgggccc gcggcggtgg gcgaggcagt cttcatcgag	5940
	gtgtcggcaa gcccctgatt gatgcagtcc atggttgacg cggtcacggt gccgacgtt	6000
	cggcgtgatg atggatcggc cactcggctg gtgacctcgc ttgctgaggc gttcgtgcag	6060
	ggtgtcgcgg ttgattgggc ggcagtgcct ggagctggcg ctgagcgggt gctcagacctg	6120
	ccgacgtatc cgttccagcg gcagcgttcc tggcgctcgc ccgatcggc gagcggggac	6180
	gtagcgggtc tgggtttgga cgcggtgcag caccgcttgc tgggtgcggt ggtggcgtt	6240
	ccgggtcccg acagtgtcgt gttgaccggc cgggtatcgc ttggcagcga cagttgctg	6300
	gccgatcaag cgggtcgggg caccgtgtt atgccgggca ccgggtttgt tgagctggt	6360
	gtgcgggccc ctgacaggt cggctgcggt gttgttgacg agctggtgat tgaggcgcg	6420

	ttgcgcttgc cgggtggccgg tggggtgcag ttgtcgggtgc cgggtggggga ggccgacgag	6480
	ggtgggcgta ggcaggtgac ggtccactcg cgtacggatg cggctgacac ctggaccecg	6540
	cacgtgaccg gcaccgtcag cgttgcacgt gccccggcaa ccacgccgga cctggccgcc	6600
	tggeccactg gccaggcgca gccggtcgac ctctccggt tctacgacga gctcgtgag	6660
	gtgggctacg agtacggacc cgccttcag gggtgcggg ctgcctggcg cggccgggac	6720
	acggtgtacg cggaggtggc gctcggcag gccctgggtc aggaacgggg ccggttcgcc	6780
	glacaccccg ctctgttga gcccgctcg cataccggtc tctcaccgg gccggacaac	6840
	cggcaaggcg tccggttgc gttctcttg aacaacgtca gcatccacgc gagcggccca	6900
	gctcggctcc ggtcaccat gaccggcga ggcttggcc tcgccgacga gttcggacat	6960
	cccgtggccg agatcggcgc gctggtgacc cggccgatga ccgacgatgc cgtcaccgac	7020
	ctgctgcgcg tcacctggac cgagatccg gccgtggcgt cggccaccgg ggccgaggtg	7080
	ttcacggcgc ttcgctcga gcccgctgc gactgcccg ccgagaccg ggcgctgacc	7140
	gtccgtacc tggcggcgat ccagtcattg ctggatcggg atgacggcac cttgtcacc	7200
	aatgttgaca ccgggctcac cggcgcggct gtgtcgggtc tctacggtc ggcgcagtcg	7260
[0005]	gagcaccgca gccggttctg gctggtggag agcagcagc cactgaccac cgaacagctc	7320
	gcggcgatgg ccgggttga cgaaccggc gtcgcgtga tggccggcg catcgaggtg	7380
	ccacggctga cccggcgaa ccagccgctc accatcccg cggagaggtc ctggtgctc	7440
	gaacagcccc gcagcggcac cctgcaggac ctccgctgc tcccagcga caecggcgac	7500
	cggcccctgc gccccggcga ggtacccctg gaggtccgcg ccgccgact gaactccgg	7560
	gacgtcgttg tggcgtcgg catggtcacc gacacggcg tggccggtg ggaagccgc	7620
	ggagtctgctc tcgagaccg gcccgcgctc accgcttcg ccgtgggaga ccacgtctc	7680
	ggactgctgg gcggcgggtt cgggtcgata gcgatcccg acagccgca gctcgcggc	7740
	atacccgagg gatgctgtt caccacggcc gccctcgtgc cgggtggtt cgcgactgc	7800
	tactacggcg tggttgatct ggcctgctc ggtcgggtg agtccgtgtt gattcatgcc	7860
	gctgctagcc ctgtgggtat ggcggcact cagcttctc ggcatctgg tgcggagtc	7920
	tttgcgacgg cgagtccgg gaaacagcat gttcttcgta ggttgggtt ggacgattct	7980
	cgggttctc attcgcgtac cacggagttt cgggagaagt tcggtggtc tgttgatgtg	8040
	gtgtigaact cccttagcgg tggattctt gacgcctctg tggatgtgtt gctcagcgt	8100
	ggccggtttg tggagatgg taagaccgac atccggccg gctcgggac gccgggtgc	8160

	tcctaccggg cgttcgactt gctggaggcc ggtccggaac gtttgcggga gatcctggct	8220
	gaactgttga cgttggttga gcggggcgtg ctgcaaccgt tgccggfacg cgcgtgggac	8280
	atccggcagg cgcgcgagge gttcagctgg atgagccggg ctccgcatgt cggcaagatt	8340
	gttctcaccg ttcccgctcg tcttgatggg gaaggcacgg tgttgattac tgggtgttcg	8400
	gggtgtctgg ccggcatgtt ggcggcgcat ctggtgcgtg agtacgacge ccggcaacctg	8460
	ttgctggtet cgcgtagtgc accggatgag gttttgctgg ctgagctggg tgagcggggc	8520
	gaggtgggtg tgtgtgacgt ttccgaccgt accgctgag agagcgtgct ttccggccgt	8580
	acgttgaccg cggtcaccca cacggcgggc gccttgacg accgcttgt cgaggcgcag	8640
	acgcccacac ggategactc ggtgttccgc cccaaggttg accgctctg gcacctgac	8700
	gaattgacc cgaacatgga cctcggcggc ttcatcatgt actcgtggc cgcgggcatc	8760
	atgggcagcg cggggcaggg caactacg cgggccaacg ccttcgtgga cgcgttggcc	8820
	gtacagcgtc agcatgaagg ttgcccggc ttggcgtcg cctgggtct gtgggcggac	8880
	gcaagcggcc tgaccgccc gctcaccgac gccgaccacg accgcatccg acgcccggg	8940
	cagcgcacca tctcccgga gcaaggatg cgctgttcg accgctgct ggcaccaagg	9000
[0006]	gagccgttcc tgggtgacgc ggcctcgtat ccggtgcgtg agggcgagat cccgccgtg	9060
	ctcgggtcgc tgcaccgccc ggtggtgcgg cgggcccgtc cggccggcgg tgagtcgtc	9120
	cagcattggc tggttcgctt gacgccggcc gagcgggaag cggcctgct gaaggccgtt	9180
	tccgaaagcg ccgcaaccgt gctgggacac gccgaccgccc ggtccatccc gccgagcgca	9240
	gtcttccg cactggggat ggactcgtg acccgggtc aactccgca caacctggcc	9300
	aaaaccaccg gcctgcgctt accggccaag atggcgttc actatcccac ccccaccgccc	9360
	ctggcgtccc ggetcgacga actgctcacc ggcgagacc cggccccggc ggtcaaatcg	9420
	gaggcaccca cgtcgacagc cacggacgag ccgctcgcga ttgtcggtat ggcattgctc	9480
	ttgccgggtg gsgtgcctc gccggaggag ttgtggcggg tgggtgtggtc gsgtgggtg	9540
	gcgatttctg attttccggt ggatcgtg cgggatgtct cgggtttg cgggtggcttc	9600
	ctggcgggtg cggctgattt cgatcggcgc ttcttcggga tcagtcgcg tgaggctttg	9660
	gcgatggatc cgcagcagcg gttgttttg gagacgtct gggaggcgtt ggagcgggc	9720
	gggatccggc ctgattcgtt gcgtggtagt gacaccggtg tttcatggg tgcctacccc	9780
	ggtgggtacg gsgtcggggc cgaacttggg gttttgggt cgaaccggg tgcgggtggt	9840
	gtcttgcgtg gtcgggtctc ttaactcttc gsgtttgagg gtccggcgt gacggtggac	9900

	acggcgtggt cgtcgtcgtt ggtggcgtg catcaggccg gttatgcgtt gcggcagggt	9960
	gagtgttcca tcgcccttggf tgggtggtgtg acggtgatgg cgacgccgca gacgttcgtg	10020
	gagttcgttc ggcagggtgg cettgccgcc gatggcgta gtaaggcttt cgcggacagt	10080
	gcggacggtg cgggallcte cgagggtggt ggtagcctgg tcttcgagcg gctgtcggat	10140
	gcccaggcca agaaccatca gatccttget gtgttacggg gttcggctgt caaccaggac	10200
	ggcgttcca acggtttgac ggcaccgaac ggcccgtgc agcaacgggt gatccgccag	10260
	gccctcgcga acgccctget caaccccga gacgtcgac tegtggagge gcacggcacc	10320
	ggcaccaccc tgggtgaccc gattgaagcc caagcgtgc tggccaccta tgggcagggc	10380
	cgggcggtgc cgttgttget ggggtcggtg aagccaacg tggccacac ccaggccgca	10440
	gcaggcgtcg ccggtgtcat caagatggtg ctggtctge agcacggcgt tgttcgcaa	10500
	acctgcatg ttgacgagcc gtccgacat gttgactggt ccgctgggtc gtttgagttg	10560
	gcgacgtcga accggtcgtt gccttcgttc gatcgtccgt ggcgcgcggg tgtgtcgtc	10620
	ttcggcatac gcggcacgaa cgtcacgtc atcctcgaag ccgccctgc ccctgcccct	10680
	gcctttgate ctgattcgac ctccggcgcc acaggccttg ctggagcage agcgtgcgcc	10740
[0007]	ctggccatct cgcccgcctc ggaatcagct ctagccgacc tgacaacccg gctgcgcgcc	10800
	tacctgaccg ccaacccega caccgacctg cacaccaccg ccaccacct gccaccaca	10860
	cgctcatcat tegaccaccg cgcctcctg ctccggcgtg acaccatcac cggcaccgce	10920
	gccgtggate cgcgtgtggt gttcgtgttc tccggccaag gctcacaacg cgcgggcatg	10980
	ggcgcggagt tggccgcggc gttcccctgc ttcgccgaca tccatcaacg tgtgtggggc	11040
	ctgctcaatg ttgacgagga cctcaacgtt gacgacacgg gttatgcca gccggcgttg	11100
	ttcgcctgc aggtggcgtt gttcgggtg ctggagtcgt ggggtgtgcg cccggatgcg	11160
	ttgatcggcc attcgategg tgagcttgcc gctgcctatg ttgtgtgtgt ttggtcgtt	11220
	gaggatgcct gcacgttggf gtcggcgcgg gcgcggttga tgcaggcgtt gccgtcgggc	11280
	ggtgtgatgg tggcggtgce ggtgtcggag gacgaggtc gcacgttct gcgtgatggt	11340
	gtggagateg ccgcggtcaa cgcccgtca tccgtggtgc tctccggtga cgaggacgcc	11400
	gtgttgcaag cggtcgcggg gttcccacgg tggacccgac tgtcgaccag ccacgccttc	11460
	cactcggcac geatgaacce gatgctcgag gattccgtg ccgctgccga gcagctgact	11520
	taccaccagc cgtcggtcga gatggctgct ggcgagcagg ttgttacgcc ggagtactgg	11580
	gtgcgtcagg tccgtgatgc ggtgcggttt ggtgagcagg tccggcgta cgaggacgcg	11640

	gttttcgtgg agatcgggcc gggcccgaac ctgcccgggt tgattgatgg cgttgcgatg	11700
	ctcaacggcg agaacgagac acacgccgca ctgaccggcc tgtcacaact gttcgtccga	11760
	ggcatcatgc ctgactggtc ggcgggtgctg ggtgtgagca cggggcgggt gctggacctg	11820
	ccgacgtacc cgttcacga cgagcgglac tggctgcgcg gcgccgaccg ggtggaagga	11880
	caccgcctgc tggggttgcc ggtgcggctg gctcgtccg atgaggtggt gttcaccgcc	11940
	aagattttcc gggacagcga ccagtgttg cgggatctgg ctgtcctgcc cgcggcggca	12000
	ttcgtcgaga tcgcggtgtc ggcggcggat gaggtcggct gcggccaggt cgaagagttg	12060
	gtcgtcgagt ccctgcgcg gcttcccag gacgccctg tcgaggtgca gacctggatc	12120
	gggggaccgg aggacggggg caggcggcgg ctacccgtct acgggcggta caaggagacc	12180
	gagccgtgga tcccgttgc caacggcatt ctgacatccg gccacgacc gagtcccagc	12240
	cacgcggacc cagcttggcc gccggtggga gcagtgccg tggacgcgga tgtgccggcg	12300
	tggcggcgcg gcagtgagct gttcgccgaa gtgcacctg acggggagct ggacgcggcc	12360
	aggttcgcga tgcaccggc cttgctggat gccgctgtcg acgtcgcggg tgacggcgtg	12420
	gcggtgttt ggctggcct gactttgcat gcttcgaaag caaccgagct tcgtgttca	12480
[0008]	ctcacggacc acggtgtcgt cgcctcgat ccagcgggct tgcccgtgct gtcggcgggt	12540
	gccctcctcc ggcgaccct tccgctcgg gaacctcact ccagcgcct gctcacggtg	12600
	tcgtggaccg agattccggc gctgtctct tccacgagtg acgtggctga ggtgttcacg	12660
	gcactgcctg atgacagcac cgacgtattg acccagacc gcgcgttgac cagtcgaagt	12720
	ttgacggcca ttcagtcag gcttgatcgt gacgacggca cctcctcat ccggaccggc	12780
	atgggactgg ccggtgcggc ggtgtcggg ttggtgcggt cggcacagtc ggagcatccc	12840
	ggccggttcg tgctgtgga aagcgacgat gacgtcgatg gtccggcact ggactgcct	12900
	gcctcgcccg gatcgtccgt ctggccggga tcgccggtt cgtggcctc gcttgatgag	12960
	ccgcggctgc gtatgaccgg cggccgtatc gaggtgcccc ggtgaccgg ggtgagctcc	13020
	gaaccggctg gtgaggtgt gtgggaccgg gaaggcacgg tggtcacac ccgtggtctg	13080
	ggtgtcttgg ccgggactct ggctcgccat ctggtgaacg agagggtat gcgccactg	13140
	ctgctgctct cgcgtggtgc gccgatgag gcctgctca ccgagctggg tgaccggcg	13200
	gaggtgctg tttgcgact ttcgatcgc gccctctcg agcgggtgct ggccgggcgc	13260
	cggttgaccg cagttgtca taccgccggt gtcattgacg accgcgtgat cgagtcgat	13320
	atacccgaac gtattgacg ggtgcttcgg gcgaaggttg acggtgcttg gcactgcac	13380

	gagttgacc	gtgagcaaga	gctggccgct	tttgtggtgt	attcgtcggc	ggctgggggtg	13440
	ctgggcagtg	ctgggcaggg	caactatgcg	gccgcgaacg	catttgtgga	tgcgttggct	13500
	gagcggcgcc	gggctgaggg	tttgccgggg	ctggctgtgg	cgtgggggtt	gtgggaggac	13560
	agcagtgggc	tgacagctca	gctgctcgac	gccgaccgeg	aacgtatggc	gcgttagcggg	13620
	ttcacctcca	tcaccgccga	acacggcatg	cgcttgttgg	acatggccct	gcgtcacctg	13680
	gaaccggcgg	tggttgcggc	gccgacgact	gggtaggeg	acggcgaagt	cccggcgctg	13740
	ctgcgttctt	tgcaccgtac	gggaagccgg	aggaaggcat	cgaccggcgc	ggggcagtg	13800
	ctcgtcggcc	tttcgccggt	ggagcgggaa	cgggcgctgt	tgaccgctgt	gcgggacaac	13860
	gccgcagtcg	tcctgggaca	ccacggagct	cgggccatcc	cggcgaacgc	cgccttcgca	13920
	gatctcggga	tggactcgct	gaccgcgctc	gaactgcgca	acagtctgge	gaagaccacc	13980
	gggctcgggc	tgccggcgac	gttgggtgtc	gactaccgca	ccccggcggc	cctcgcggcc	14040
	cggtcgcagc	agctgctggt	cggccgtgcc	gccgctcccg	cccgtcagac	agcttcagcg	14100
	gtgggccagg	acgagccgct	ggcgatcgtg	ggtatggctt	gccggttgcc	gggtgggggtg	14160
	tcgtcgcggg	aagacctgtg	gcggctggtc	gagtcgggca	cggacgcgat	ttccggttcc	14220
[0009]	ccgacigacc	glggctggga	cgctcgagaac	ctgttcgata	cggatccgga	tgcggcgggt	14280
	aagacatatt	gcgtgcaggg	tggtttcctg	gacacggcgg	cggagtttga	tgccgggttc	14340
	ttcgggatea	gtccgcgtga	ggccttggcg	atggatccgc	agcagcggct	ggtgctggaa	14400
	gcctcgtggg	aggcgttcga	gcgggccggc	atcgaccccg	gttcgatgcg	cggcagcgac	14460
	accggcgtgt	tcacggcgcc	ctaccccgcc	gggtacggcg	tcggcgctga	gttcggcgcc	14520
	ttgggtgcga	cggcgggagc	gggcagcgtg	ctctcgggac	gggtgtccta	cttcttcggc	14580
	ctcgaaggtc	cggcgatgac	ggtggacaac	gcgtgttcgt	cgtcgttggg	ggcgttgcac	14640
	caggccgggt	acgcgctgcg	gcagggcgac	tgctcgtg	ccctcgtcgg	cggggtcacc	14700
	gtgatgtcta	cgccgcacat	tttcgtggaa	ttctcgcgtc	aacgcgggct	ctcggttggac	14760
	ggcggtgca	aggcgttcgg	ggacggcgcc	gaocggcaagg	gctgggcccga	gggtgtcggc	14820
	gtgctgctcg	tcgagcggct	gtcggacgcg	cgccgtaacg	ggcaccgggt	cctcgcggtg	14880
	gtcaagggtt	cggctgtca	ccaggacggt	gcacccaacg	ggttgacggc	gccgaacggg	14940
	ccgtcgcagc	agcgggtgat	cgaggctcgc	ctcggcagcg	cgggcctcag	cgcggcggat	15000
	gtcgcagctg	tggaagccca	tggcacgggt	acgacgctgg	gtgatccgat	cgaggcgcag	15060
	gcggtcctcg	ccacgtacgg	tcaaggctcg	tcgacgcctg	tgttctggg	ctcgtcgaag	15120

	tcgaacatcg ggcacactca ggctgccgct ggtgtggctg gtgtgatcaa gatggtgatg	15180
	gcgettcaac acggggtegt tccacagact ttgcataatg acgtgccgtc gcgtcatggt	15240
	gactggtcgg ctgggtcggt tgactggtc acgtcgaatc aaccgtggcc gtcgtcgggt	15300
	cggecggggc gtgctggtgt gtcggcgttc ggggtcagtg gcaccaacgc gcacgtgatt	15360
	ttggagagtg cgcgggacga gccggctcgc gaggttgccg gtcggcgccg ggtggtcgcg	15420
	gatgtggtgc cgctggtgct gctctctcgc actgtgccgg ctttgggtga gcttgaggct	15480
	cggttgccgc cctatgtggc ggcggccgag gatgacaggc ctgttctcgc gacgttgccg	15540
	tggtctcggg cgggtttcga gcacagggt gtgctgatcg gtgaagacac catcaccggg	15600
	gtggtcgcgg tcgatccgcg ggtggtgttc gtgttcccgg gccaggcctg gcagtggctg	15660
	ggcatgggtg tccagetaec cgactcctcgc gtggtgttcg cctcaccgat ggccgagtgt	15720
	gctgccgctg tgagcgagtt cgttgactgg gacctgtttg ccgctctaga cgaccggcg	15780
	gtggtggatc gggttgatgt agtccagccg gtgtgctggg ccgtcatggt gtcgctgcc	15840
	gctgtctggc aggccctgg tgtaaccccc gacgccctcgc tcgggcactc ccagggcgag	15900
	atcgccgctg cgggtggtggc gggttcctg tetctcgcgc accgcccagc ggtggtggcg	15960
[0010]	cagcgcagcc agctgatcgc acaaggcctg gccggtcacg gcgccatgge ctccatgcc	16020
	ctgcctgcgc acgagatcac cctggctcgc ggtgcctgga tcgcggcct caacggccc	16080
	gcatecacgg tgatccggg cacgccgaa gcggtcagc cggctgctgc cgctcaggat	16140
	gcccgggtgc ggcggatcgc ggtggattat gcctcgcata ccccgcaggt tgaggcgatt	16200
	cgtgatgagt tgctggcgtt gaccgctgat gttgactcgc aggeccctgc tgtgccgtg	16260
	ttgtcaactg ttgacggcgc gtgggtggat ggcccgtga gtgtggacta ctggttccgt	16320
	aatctgcgcg agcaggtcgg ttttgcgcag gcggtgcaga cgctgggtga tgcggtgttc	16380
	gttgagggtg cggcgagtc ggtgttgatg cagtcgatgg ttgatgcggt cacggtgccg	16440
	acgttgccgc gtgatgatgg cagtcggccc cggctggtga ctctcctggc tgaggcgttc	16500
	gtgcagggcg tcgacgttga ttgggcggcg gtgctggggg cgggcgctga gcgggcgctg	16560
	gacctgccga cgtatccctt cgaccgtcag cgtattggg ttgtcctga ccgggtgagc	16620
	ggggatgtgt cgggtcctgg tctgggcacg gtggagcacc cgttctggtg tgcggtggtg	16680
	gcgttgccgg gctcggacgg gttggtgttg accggctcgg tgctgttggc gacgcacggt	16740
	tggttgcgcg atcatcggtt gcggggcagt gtgtgatgc cgggtaccgg gtttgtttag	16800
	ctggtggtgc gggcccctga cgaggtcggc tgtgatgtc tcgacgagtt ggtgagcga	16860

	gcgctctga tcgtcccgcc tgcctggtgga gtccagctgt ccctggcggg tggcgaagcg	16920
	gatgagggcg ggcgcggca agtcaccttg ttctcccggg cggatgacgc cgacgagtgg	16980
	gttcggcatg ttacggcgac catcagtgcc tccggggccg cgcttgcgac gccgctgctc	17040
	gccgaatggc cgcctgcccg ggccgagtcg gtggacgtga ccgcttcta cgaacggctc	17100
	gcggctgcgg gacacagta tggcccggcc ttccaagggt tgcaggtcgc ctggcgtgcg	17160
	ggggacaccg tctacgcaga ggtcgcgctc gccgaggagc aggagcgcga ggcggcacgg	17220
	tacgcagtgc accccgcgct gctcgacgcc gcactgcacg ccgggatggg gagcggatcc	17280
	caggccgacg gcaactgtgg gttgcccgtc acttggaaac acgttcgtgt gcagggcacc	17340
	gggcgaagc ggctccgggt ggccaccacg cgggggagcc tgcagcttgc cgacgagcag	17400
	gggegaccgg tggccggcat cgctcgcctc gtgaccgcc ggatcgccga tgacaatcaa	17460
	ctgttgaccg tgacatggac ggaagtcacg gccggggcac ccgtcaacga tgcctgaggtg	17520
	ttcacggctc tccccggcaa cagcgcgat gtgctggcgg agatccgtac gttgacggaa	17580
	cggttttccg aagcgatcca ggcctggctc gtacgggacg acgggacgct gatcgtccgg	17640
	accggcacag ggttgcaccg cgcggcaata tggggctgg tgcggctggc gcagtcggag	17700
[0011]	tatccgggac ggttcgtgct cgtggagagc gacgaacaaa ccctgcgga cctgaccgcg	17760
	ctggtctcgc tggacgaacc acagctgctg atcaacgac gccgcacga ggtgcccggg	17820
	ctgacgcggg tgacggccga accgctcag cagactgcct gggatccgga tggcaccgctc	17880
	ctgatcaccg gtgatcaggc tggcctggtt gccctcctc tggtagctgg gcgtgggatg	17940
	cgtaacctgc tgcctgctcc gaccggtgcc ccggacgaga ccctggctga cgagctgacg	18000
	aagctgggcg cgaaggttga ggtcgcggcg tgtgacctga cggatcgggc tgcgctggcc	18060
	gaggtgctgg cggatgcacc ggcgttgacg gtctcatcc aacggccgg cgctcccagc	18120
	ggggacacga catcgtgat cgcagctcc tggcatctgc acgagttgac acgtgatcgc	18180
	ggtctggcgg cgttcctcct gactcgtcg gttgacgggt tgatgggcgc tgcctggcgg	18240
	agcagctacg cttttgtgga cgcctctgcc gtacaccgga gggatgaagg tctgccgggt	18300
	ctttcccttg cctggggcga gatctcggc gaagacgcga tgcgtgcggt cgacagtgcg	18360
	actcggcaga gcctgcccgtt ggtggtcgtt ggtgcggctc cgtccgctcg tgggggtgag	18420
	attccggcgc tgcctgcggtc gttgcgcgc ccgctcgtac ggcgcacggg gccggccgcc	18480
	ggtgactcgc cactggccgc cctgcccggc gcggaacggg agaaaagcgt ggtgaggggtg	18540
	gtctgcgca gcctgcggc ggtgctgggc catgccgaca cccgcgcggt accggccacg	18600

	gcggcggttca aggatctggg cctggactcg ctcaccgcgg tggatctgcg caacagccte	18660
	ggcaaggcca ccgggctgca gctgccggcc acgctggtgt tcgattacce aactccgacc	18720
	gcgttggcgg cgcggctggc cgagctgctc accggtgaga gcgcgacgcc cgtacggaaa	18780
	tcagcggtgt ccgcgtcgtt ggatgagccc ctccgctcgt tgggcatggc ttgccggttg	18840
	ccgggtggag tcgcategcc ggaggacctg tggcggctgg tggagtcggg cacggatgcg	18900
	atttccgagt ttccggcgga tcggggctgg gatgiggacg gttgttctga tccggatccg	18960
	gatgcggcgg gcaagacgta ttgcgtcag gccggttccc tggatgcggc tgggtgagttc	19020
	gatgccgggt tcttcgggat cagtcgcgtt gaggcgtga tgatggatec gcagcagcgg	19080
	gtgttgctgg aggcctcgtg ggaggcgttc gaacgcgcgg gcctcagacc gacttcagtg	19140
	cgtggcagcg acaccggcgt gttcatcggt gcgttcccgg tcggttacgg cgttggagtc	19200
	gaccacgagg gctataccgc gactgcgggt gtgggcagcg tgetgtcagg ccggttctcg	19260
	tacttcttcg ggctcgaagg ccagccatg acaatggata cggcgtgttc gtcgtcgttg	19320
	gtggcgttgc atctggcggc gcaggcgttg cgtaatggtg agtgttcgtt ggcgttggcc	19380
	ggtggtgta cggatgatgc gacgccggag gtgttcaccg agttcgcggc ccagcgcgga	19440
[0012]	ctggcagcgg acggccgggt caagccgttc gctgatgcgg ccgatggagc cggcttctcc	19500
	gaggcgcggc gcttctggtt ggtggaacgg ctttccgacg cgcgtcgtaa cgggcaccag	19560
	gtgetggcgg ttattcgttg atccgctgtc aatcaggacg gtgcategaa cggcttgaca	19620
	gcaccgaacg ggccgtcga gcagcgcgtc atccggcagg cgttggccaa cgcgggctg	19680
	agttccgctg atgtcgatgt gctggaggcc cacggtacgg gtacgacgct gggatgatccg	19740
	atcagggcgc aggcggtcct ggccacgat gggcaggatc gttcggcgc gttgttgatg	19800
	gggtcgttga agtcgaacat cgggcacact caggcggctt cgggtgtggc tgggtgatc	19860
	aagatggtga tggcgttgcg gcatggggtg gtccgcagc cgttccatgt tgacgagttg	19920
	tcgcgacatg ttgactggtc ggccggctgc gttgatgtgg tcacgtcga lcaacctgg	19980
	ccgtcgtcgg atcggccgcg cctgcccggg gtgtcagcct tcggggtcag cggcacgaac	20040
	gttcaactga tcttgagag tgcgccggtt gactcgggtg ctgaggtcgc tgggtcggcg	20100
	ccggtggttg cggatgtggt gccgttgggt ctgtcggcga ggtcggcgc ggcgttgagt	20160
	gttcttgagg cgcgggtgcg cgcgtatgta gcggcggcgg agaatgaaag gctgttct	20220
	gcgacgttgg cgtcgtctcg cgcggtgttc gacacaggc ctgtctgat cggtgacgac	20280
	agcgttgttg gggcggcggc ggtcagcccg cgtgtggtgt tcgtattccc cggccagggc	20340

	tgccaatggc tcggcatggg cgtccagcta cgcgactcgt cgggtgtatt cgcctcccgc	20400
	atggccgaat gtgctgccgc cttgagcgag ttcgttgact gggacctgtt tgccgccctc	20460
	gacgaccocgg ctgtagtga tcgggttgat gtggtccagc cgggtgtctg ggccgtcatg	20520
	gtgtcgctgg ccgcggtgtg gcaggccgct ggtgtcggcc ccgacgccgt cgtcgggcac	20580
	tcccagggcg agatcgctgc tgcggtggtc gcggggtcgc tgtcgttgcg tgatggcct	20640
	cgggtggtgg cgcagcgtag tcagttaatt gcgcgtggcc tggccggtca cgggtgcgatg	20700
	gcctcgattg cgctaccggc tgatgagatc acgctggttg agggctcgtg ggtcgcggcg	20760
	ctcaacggtc cggttccac ggtgatcgcg ggcacgccgg atgcggtiga ggccgtgctt	20820
	gccgccagg acgcgcgggt gcggcggatc gcggtggatt atgcctcgca taccocgag	20880
	gttgaggcga ttcgtgatga gttgctggcg ttgaccgcfg atgttgactc gcaagctct	20940
	gctgtgccgt ggttgcaac tgttgacgce gcgtgggtgg atggcccgtc gactgtggac	21000
	tactggttcc gtaacctgcg cgagcaggtc ggttttgcgc aggcggtgca gacgctgggt	21060
	gatgcggtgt tcggtgaggt gtcggccagt ccggtgttga tgcagtcgat ggttgatgcg	21120
	gtcacggtgg cgacgttggc gcgtgatgat ggatcggcca ctcggctggt gagctcgtg	21180
[0013]	gctgaggcgt tcgtgcaggc cgtcgatggt gattggacgg cggctcctggg ggccggcggc	21240
	gtgcgggtgc tggatctgcc gacgtatccg ttccagcggc agcatttctg ggcgctgcc	21300
	gatcaaacgg ctggtgatgt gtcgggtcgc gtttggacg cggctcggca tccgttctg	21360
	ggtgcggtgg tggcgttccc ggttccgac gggttggtgt tgacgggtcg ggtgtcgtt	21420
	gcgacgcatg cctggttggc ggatcatgcg gtgcggggca gtgtgttgat gccgggtacc	21480
	gggtttgtgg agctggtggt gcgggccgct gacgaggtcg gctgtgatgt cgtcgacgag	21540
	ctggtgateg aggcgccgtt gcggttgcgc aeggcgggtg gggctcagct gtcctgtcg	21600
	gtcggggagg ccgacgaggc tgggcgtagg caggtgacgg tccactcgcg tacggtgcg	21660
	gctgaaacet ggaccggca cgtgaccgcc acggtcagca acgccgaagc gagcggccct	21720
	ccgccggacc tgcggcagtg gccgccggcg aacggcactc cgggtggactc ctcagcttc	21780
	tacgacgcgc tcggtggcta cgagtacggg ccggcgttcc aggggctcgc ggctgcctgg	21840
	aaggtggggg agacgatcta ccccaggtc gctctggtg aggagcagcg ggccgaagcg	21900
	gcgcggttcg ggggtcaccg ggcgttctg gatgctgctc tgcacgcgat catgctgggt	21960
	tccgctgagg gtgacggctc ggtgcagttg ccgttctcgt ggagcgggtg gcgggttcat	22020
	gctgctgggg ccgctcgtt gcgggtcgtg gtggatcggg ggagtctgcg gctggcggac	22080

	gagtcgggc ggccgggtgc cactgttgat gcgttgggta cgcggccgat ggctgaccac	22140
	gtggccgatg atctgctcgc ggtgtcgtgg accgagattg cggctgggcc ggtcggtgac	22200
	gacgtcgagg tgttcacggc gcttcccggg gacggtgacc tgctggcgga gtcgcgtggg	22260
	ttgacagggc gggctcttgc ggcgatccag gcgtggctgg gtcgtgacga cgggacattg	22320
	gtcatccgta cgggcaccgg gctggcgagt gcggcgggtg cgggctgggt gcgctcggcg	22380
	cagtcggagc atcccggccc gttcgtgctg gtgaaagcg atgatgtggt gaccgccggg	22440
	cagctgtcga gcgtggccgg gttggacgag ccgcggttgc ggatcgtgga cggccgggtg	22500
	gagggtcccc ggctgaccgg ggtggttccc gagccggctc aggcgcccgg gtgggategc	22560
	gacggcacgg tgttgatcac cggtggttcc ggggtgctgg ccggcattgt ggcggggcat	22620
	gtggtggccg aacgggggtg gcggcgggtg ctgctgctgt ctgaaaccgc gccggatgag	22680
	gtgctggteg ctgactgac tgacctgggt gccgaggtcg acgtggcgag gtgcgacctg	22740
	tcggatcggg ctgcgctggc cgaagtgttg gcgggtgttc cgggttgac tgcggtgatt	22800
	catacggcgg gtgtgctgga cgacgggtgc atcgagtcgt tgaccccga gcgctggac	22860
	ggggtgttcc ggccgaaggt tgacgggtct tgccatctgc atgagttgac tcgtgatcgt	22920
[0014]	gatctggcgg cgttcgtggt gtattcgtcg gctgctggag tgctgggtag tgcggggcag	22980
	ggcaactatg cggcagctaa tgccttctg gacgctctgg ccgtacagcg aagcctgag	23040
	gggttgccgg ggttggcgtt ggcctggggg ttgtggcgg acgcgagcgg gctgaccgcg	23100
	acgatgaccg acgccgatcg cgaccggatc cggcgcggtg gccctgcgtgc catcaccgcc	23160
	gagtacggca tgcggctggt cgacacggcg atgcaccgcg aggagccgat gttgatcgcg	23220
	gcggcgatcg ggacgccacg cgacgggcag gtcccgcgcc tgcctgcctc gttgcatcgc	23280
	ccggtggccc ggcgctccgc tgcctctgc gactcgtcgg cgcagtggct ggccacctg	23340
	gcaccggagg aacgcgacgc cgcctgctg caactgggtg gtgacagcgc cgcggtcgtg	23400
	ctgggccatg gcgatgggag tgccatcccg gtgaccgga ctccaagga cctgggagtg	23460
	gactcgtgta ctgccgtgga ggtccgcaac cggctggcag cggccaccgg actgcggctg	23520
	ccggccacga tgggtgtoga ctaccgacg ccggcgtgc tgccggctca cctcgggtg	23580
	ctgttcgccc caccggaacc cgaaccacac gacatccagg agcgggagct gcgccgcgcg	23640
	ctcgcgcga tctcgggtgc caagtccgc gagcccgcg tgctggacac gctgctccgg	23700
	ctggccgcgg gggagacaaa gcccgacacc ggcggggatt ccggcgacga cgaagcctc	23760
	gtcgcagaga tggacgccga tgctctgate aagcacgtgc tggaggcagg acgatga	23817

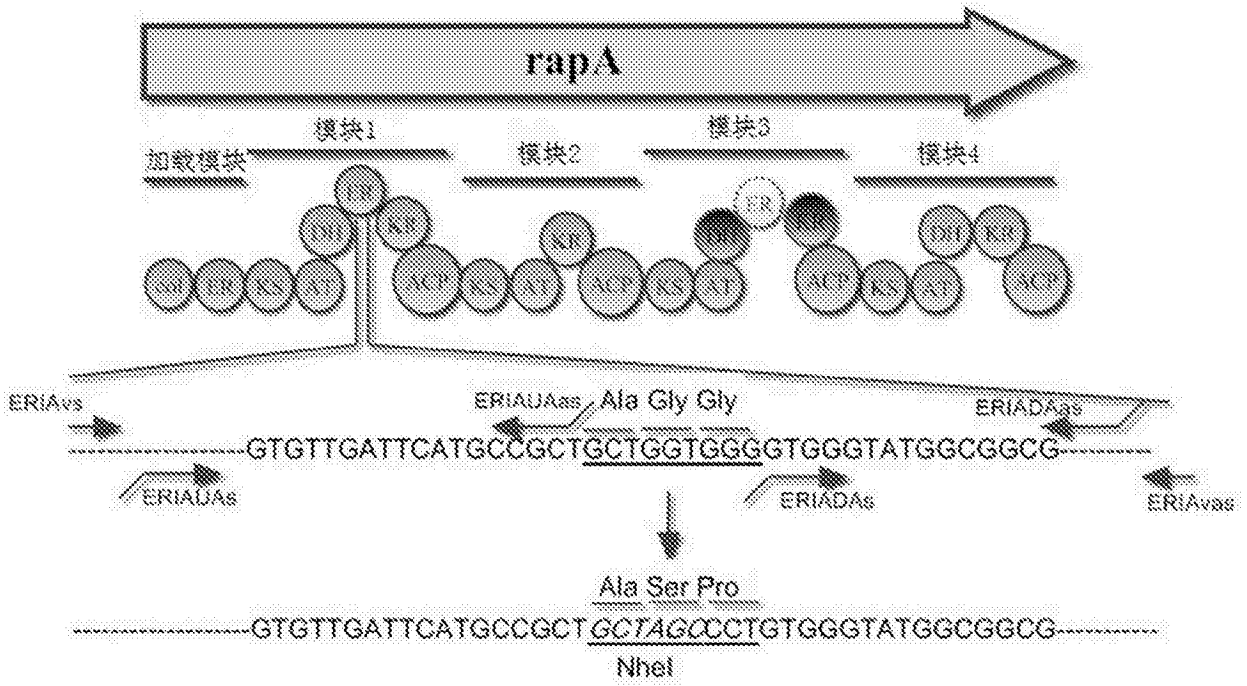


图1



图2

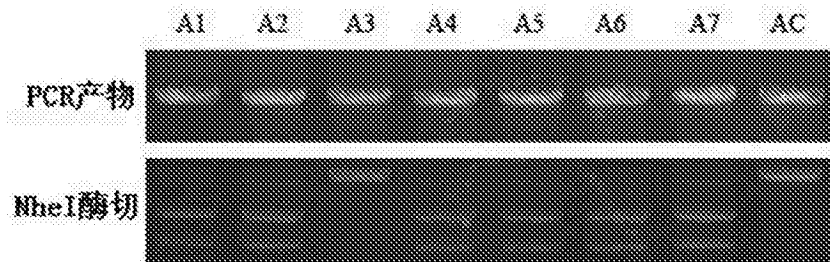


图3

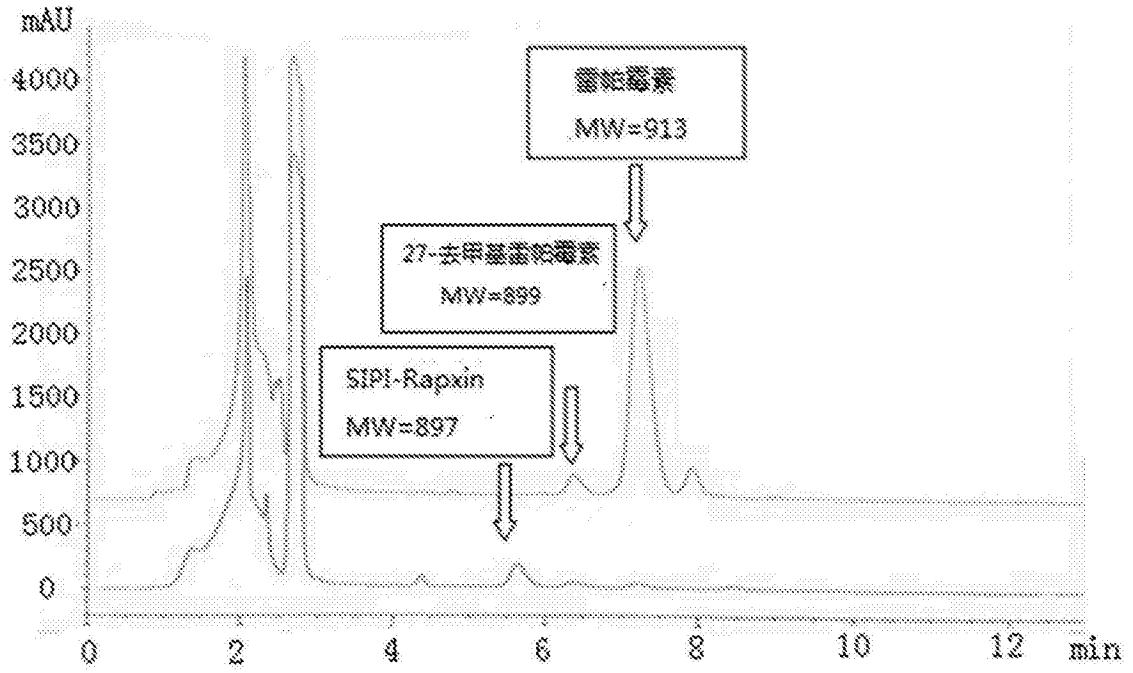


图4

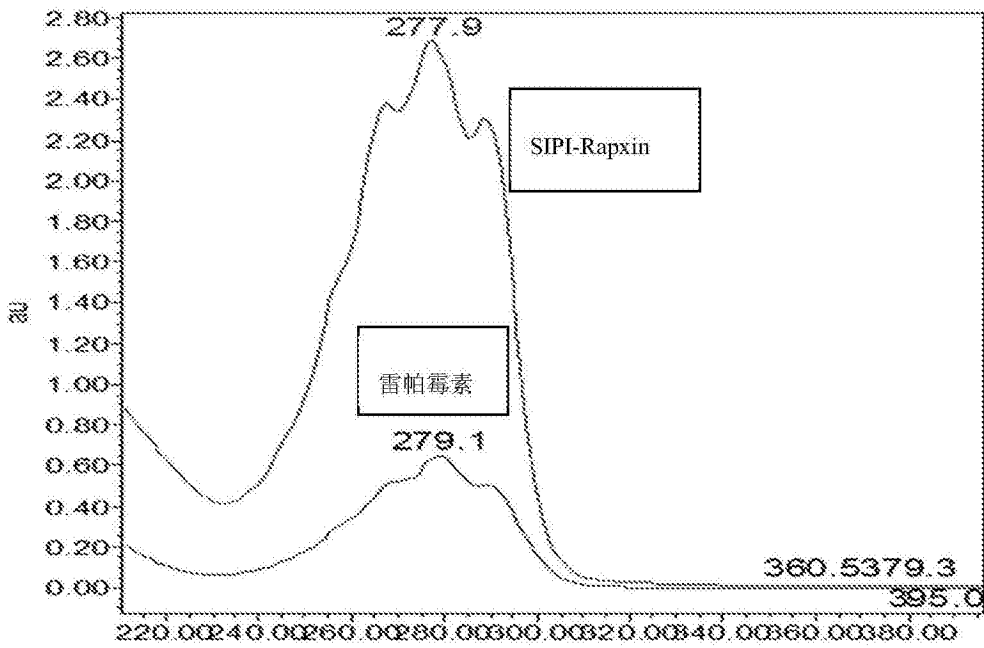


图5

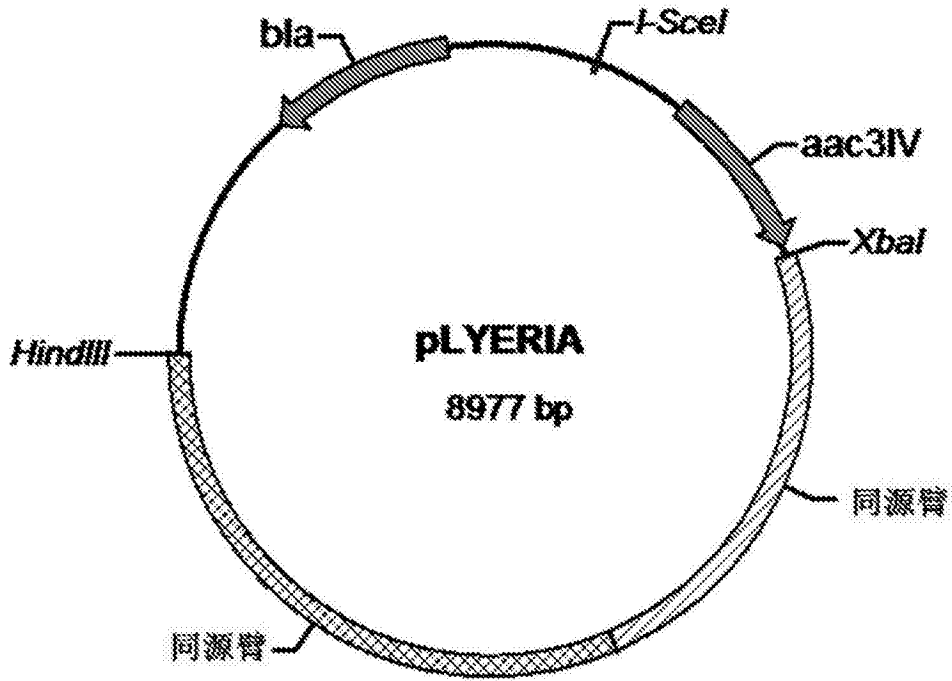


图6

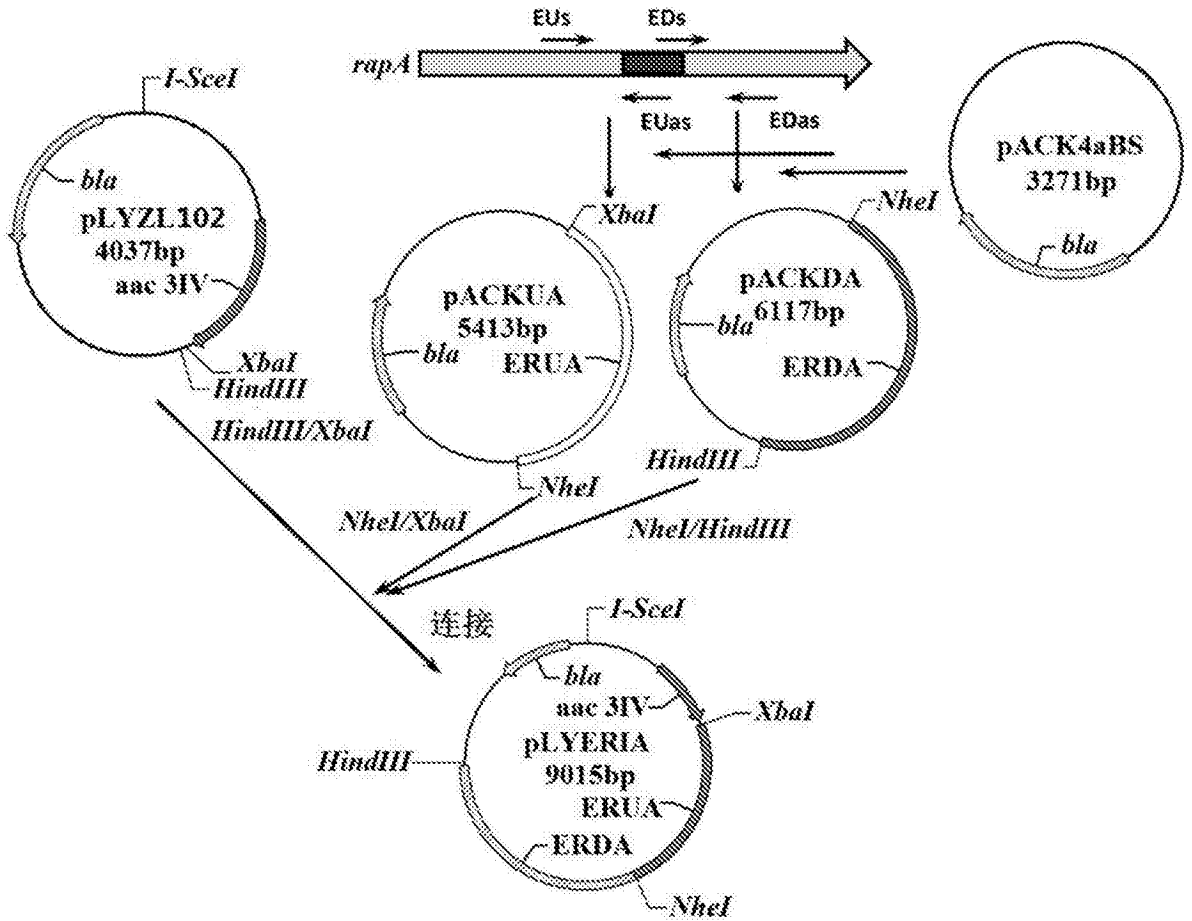


图7

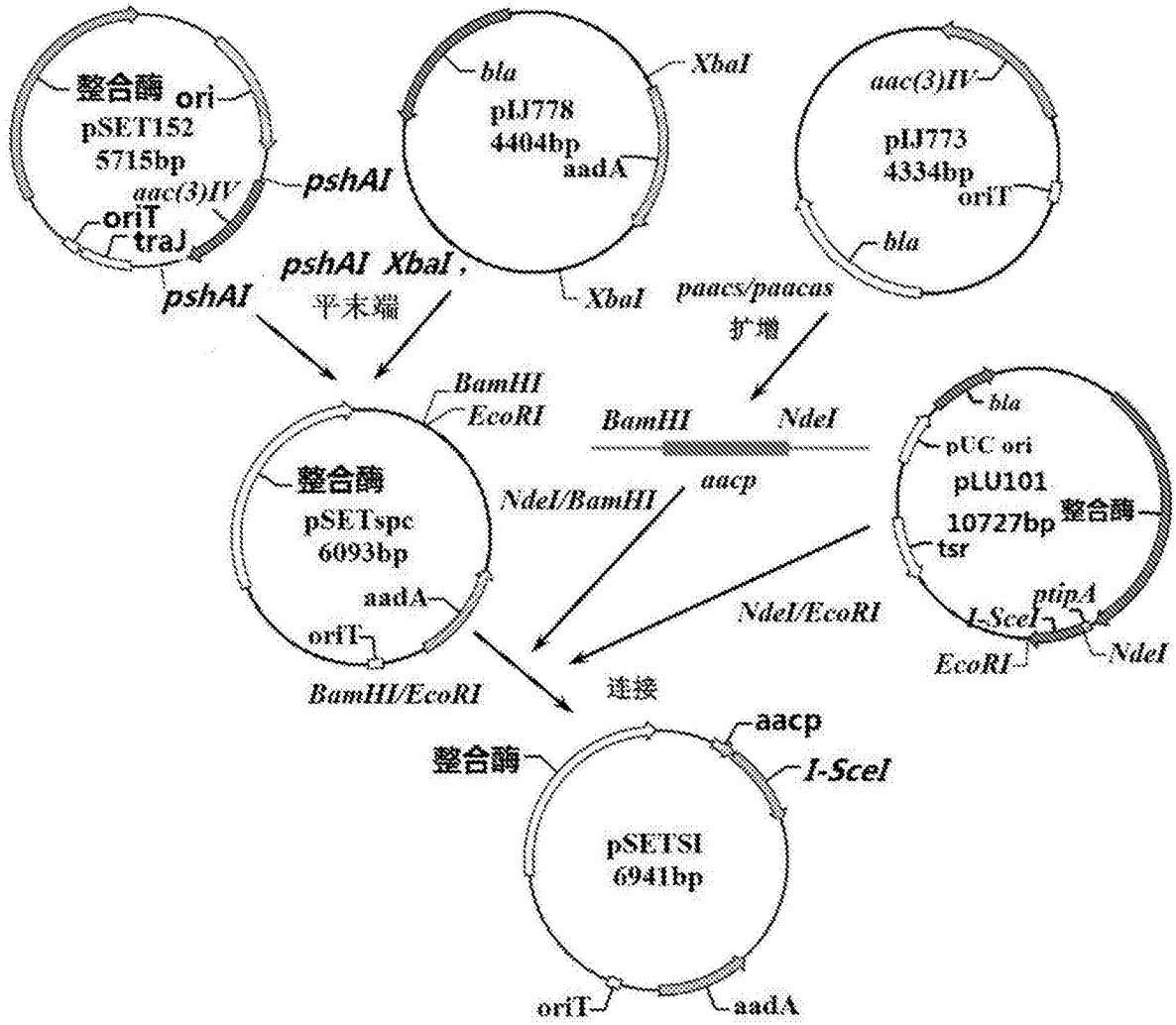


图8