



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116262915 A

(43) 申请公布日 2023.06.16

(21) 申请号 202111530562.3

C12N 1/21 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.14

C12N 15/77 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

(71) 申请人 廊坊梅花生物技术开发有限公司

地址 065001 河北省廊坊市开发区华祥路
66号

(72) 发明人 吴涛 张晓云 栾明月 李鑫磊

薛婷莉 胡丹 赵津津 李岩

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

专利代理师 黄爽

(51) Int. Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表5页

(54) 发明名称

3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及其应用。本发明通过对leuD基因修饰,将3-异丙基苹果酸脱水酶小亚基的第84位氨基酸由丙氨酸(A)突变为其他氨基酸,如亮氨酸(L)、缬氨酸(V)或异亮氨酸(I),实现了对3-异丙基苹果酸脱水酶的突变,使得微生物产副产物亮氨酸的能力下降,产缬氨酸的能力与未修饰的菌株相比增强,最终提高了缬氨酸的产量。本发明还提供一种利用微生物生产缬氨酸的方法以及能够高效生产缬氨酸的基因工程菌,该工程菌可用于发酵生产缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等支链氨基酸或其衍生物。

1.3-异丙基苹果酸脱水酶突变体,其特征在于,所述突变体包含3-异丙基苹果酸脱水酶第84位氨基酸由A到除A之外的其他氨基酸的突变,优选由A到L、V或I的突变;

其中,3-异丙基苹果酸脱水酶在NCBI上的参考序列编号为WP_003862260.1。

2. 编码权利要求1所述突变体的核酸分子。

3. 含有权利要求2所述核酸分子的生物材料,所述生物材料为重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、病毒载体或工程菌。

4. 权利要求2所述核酸分子或权利要求3所述生物材料的以下任一应用:

- (1) 用于支链氨基酸的发酵生产;
- (2) 用于提高缬氨酸,同时降低亮氨酸的发酵产量;
- (3) 用于构建产支链氨基酸的基因工程菌。

5. 产支链氨基酸的基因工程菌的构建方法,其特征在于,利用基因工程手段,在具有支链氨基酸生产能力的细菌基因组中引入突变,使其编码的3-异丙基苹果酸脱水酶包含A84L、A84V或A84I突变位点;其中,3-异丙基苹果酸脱水酶在NCBI上的参考序列编号为WP_003862260.1。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述细菌为棒杆菌属(*Corynebacterium*)或短杆菌属(*Breviibacterium*)菌种。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述细菌为谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinense*)或黄色短杆菌(*Breviibacterium flavum*)。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述细菌为谷氨酸棒杆菌MHZ-1012-2。

9. 根据权利要求5-8任一项所述方法构建得到的基因工程菌。

10. 权利要求9所述基因工程菌的以下任一应用:

- 1) 用于支链氨基酸的发酵生产;
- 2) 用于提高缬氨酸,同时降低亮氨酸的发酵产量。

3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和微生物发酵技术领域,具体地说,涉及一种3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及其应用。

背景技术

[0002] L-缬氨酸(L-valine),化学名称为L- α -氨基异戊酸,分子式为 $C_5H_{11}NO_2$,相对分子质量为117.15。L-缬氨酸呈白色结晶或结晶性粉末,无臭,味苦,在水中溶解度:25℃为88.5g/L,50℃为96.2g/L,不溶于冷乙醇、乙醚、丙酮。L-缬氨酸等电点为5.96,熔点315℃。

[0003] L-缬氨酸是人体八种必需氨基酸之一,又是三种支链氨基酸(包括缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)之一,因其特殊的结构和功能,在人类生命代谢中具有特别重要的地位。L-缬氨酸可以广泛应用于医药工业、食品工业和饲料工业等。医药工业中,L-缬氨酸可作氨基酸输液、综合氨基酸制剂的主要成分,可治疗肝功能衰竭、中枢神经系统功能紊乱。食品工业中,L-缬氨酸可用作食品添加剂、营养增补液及风味剂等。L-缬氨酸也可用作氨基酸功能饮料与运动员饮料,有形成肌肉、强化肝功能、减轻肌肉疲劳等作用。饲料工业中,对动物的乳腺组织分泌乳汁有重要的促进作用。

[0004] 目前L-缬氨酸的生产方法有三种:提取法、化学合成法、微生物发酵法。提取法和化学合成法由于原料来源受限制、生产成本低、污染环境,难以实现工业化生产。微生物发酵法生产L-缬氨酸具有原料成本低、反应条件温和、容易实现大规模生产等优点,是目前生产L-缬氨酸最主要的方法。但目前L-缬氨酸的菌种的发酵性能仍较差,且副产物亮氨酸较高,导致转化率仍较低,不能满足大规模工业化生产的需求。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及其应用。

[0006] 本发明的另一目的是提供产支链氨基酸的基因工程菌及其构建方法与应用。

[0007] 发明人意外地发现,经过修饰谷氨酸棒杆菌的3-异丙基苹果酸脱水酶,使得微生物能够高效地生成缬氨酸,并且降低了副产物亮氨酸的含量,从而成功构建出能够高效生产缬氨酸的新微生物,从而完成本发明。

[0008] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种3-异丙基苹果酸脱水酶突变体,所述突变体包含3-异丙基苹果酸脱水酶第84位氨基酸由A到除A之外的其他氨基酸的突变,优选由A到L、V或I的突变。

[0009] 本发明中,3-异丙基苹果酸脱水酶在NCBI上的参考序列编号为WP_003862260.1。

[0010] 3-异丙基苹果酸脱水酶是亮氨酸合成末端途径第二个酶,催化 α -异丙基苹果酸异构化生成 β -异丙基苹果酸。3-异丙基苹果酸脱水酶由大小2个亚基组成,大亚基由leuC基因编码,小亚基由leuD基因编码,催化 α -异丙基苹果酸异构化生成 β -异丙基苹果酸。本发明通过对leuD基因修饰,将3-异丙基苹果酸脱水酶小亚基的第84位氨基酸由丙氨酸(A)突变为亮氨酸(L)、缬氨酸(V)或异亮氨酸(I),实现了对3-异丙基苹果酸脱水酶的突变,使得微生

物产副产物亮氨酸的能力下降,产缬氨酸的能力与未修饰的菌株相比增强,最终提高了缬氨酸的产量。

[0011] 第二方面,本发明提供编码所述3-异丙基苹果酸脱水酶突变体的核酸分子。

[0012] 第三方面,本发明提供含有所述核酸分子的生物材料,所述生物材料包括但不限于重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、病毒载体或工程菌。

[0013] 第四方面,本发明提供所述核酸分子或含有所述核酸分子的生物材料的以下任一应用:

[0014] (1) 用于支链氨基酸的发酵生产;

[0015] (2) 用于提高缬氨酸,同时降低亮氨酸的发酵产量;

[0016] (3) 用于构建产支链氨基酸的基因工程菌。

[0017] 第五方面,本发明提供产支链氨基酸的基因工程菌的构建方法,利用基因工程手段,在具有支链氨基酸生产能力的细菌基因组中引入突变,使其编码的3-异丙基苹果酸脱水酶包含A84L、A84V或A84I突变位点。

[0018] 所述细菌可以是棒杆菌属 (*Corynebacterium*) 或短杆菌属 (*Brevibacterium*) 等菌种。

[0019] 优选地,所述细菌为谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) 或黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 等,更优选谷氨酸棒杆菌MHZ-1012-2 (参见CN106520655A,菌株MHZ-1012-2于2016年11月30日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),保藏中心地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.13406)。

[0020] 菌株MHZ-1012-2中leuD基因及其编码的3-异丙基苹果酸脱水酶小亚基的核苷酸序列和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1和5所示。

[0021] 第六方面,本发明提供按照所述方法构建得到的基因工程菌。

[0022] 第七方面,本发明提供所述基因工程菌的以下任一应用:

[0023] 1) 用于支链氨基酸的发酵生产;

[0024] 2) 用于提高缬氨酸,同时降低亮氨酸的发酵产量。

[0025] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0026] 本发明首次发现当3-异丙基苹果酸脱水酶第84位氨基酸由丙氨酸(A)突变为亮氨酸(L)、缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)后,缬氨酸产量均有提升,亮氨酸产量显著下降,尤其以第84位氨基酸由丙氨酸(A)突变为缬氨酸(V)效果最好。

[0027] 上述突变位点可应用于谷氨酸棒杆菌,但不限于谷氨酸棒杆菌,如北京棒杆菌或黄色短杆菌等,用于产缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等支链氨基酸或其衍生物。

[0028] 本发明构建的3-异丙基苹果酸脱水酶突变菌株2-LeuD^{A84L}、2-LeuD^{A84V}、2-LeuD^{A84I}的L-缬氨酸产量和转化率较出发菌株(谷氨酸棒杆菌MHZ-1012-2)显著提高,且L-亮氨酸产量大幅下降,同时仍能够保持较好的生长性能。其中,以突变菌株2-LeuD^{A84V}表现最为突出,缬氨酸产量为7.9g/L,比出发菌株产量提高1.8g/L,提高了29.5%;副产物亮氨酸产量为0.5g/L,较出发菌株亮氨酸产量下降75.0%。

具体实施方式

[0029] 本发明提供一种棒杆菌,其细胞内由leuD基因编码的3-异丙基苹果酸脱水酶小亚基的第84位氨基酸由丙氨酸(A)突变为亮氨酸(L)、缬氨酸(V)或异亮氨酸(I),其对应的碱基由GCA分别突变为CTA、GTA或ATA。改造后的棒杆菌可用于产缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等支链氨基酸或其衍生物。

[0030] 本发明中,所述棒杆菌可以是谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinense*)或黄色短杆菌(*Breviibacterium flavum*)等。

[0031] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW, Molecular Cloning:a Laboratory Manual,2001),或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0032] 以下实施例中涉及的引物信息如表1所示。

[0033] 表1引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')
leuD ^{A84L} -UP-1F	ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCCGAAGCACTCGGACTGGAC
leuD ^{A84L} -UP-1R	GCGGAAGCCGTAGTCCATGAGTAGCCAGACGGCGTGCTCGCGGGA
leuD ^{A84L} -DN-2F	TCCCGCGAGCACGCCGTCTGGTACTCATGGACTACGGCTTCCGC
[0034] leuD ^{A84L} -DN-2R	CGTAATCATGTCATAGCTGTTTCTTAAGCGTTAGTGCGTGGCTT
leuD ^{A84L} -pk18-3F	GTCCAGTCCGAGTGCTTCGGGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGT
leuD ^{A84L} -pk18-3R	AAGCCACGCACTAACGCTTAAGGAAACAGCTATGACATGATTACG
leuD ^{A84V} -UP-1R	GCGGAAGCCGTAGTCCATGAGTACCCAGACGGCGTGCTCGCGGGA
leuD ^{A84V} -DN-2F	TCCCGCGAGCACGCCGTCTGGGTACTCATGGACTACGGCTTCCGC
[0035] leuD ^{A84I} -UP-1R	GCGGAAGCCGTAGTCCATGAGTATCCAGACGGCGTGCTCGCGGGA
leuD ^{A84I} -DN-2F	TCCCGCGAGCACGCCGTCTGGATACTCATGGACTACGGCTTCCGC

[0036] 实施例1 3-异丙基苹果酸脱水酶突变菌株2-LeuD^{A84L}、2-LeuD^{A84V}、2-LeuD^{A84I}的构建

[0037] 以谷氨酸棒杆菌MHZ-1012-2为出发菌株,将MHZ-1012-2中leuD基因突变为编码SEQ ID NO:2、3、4所示的3-异丙基苹果酸脱水酶突变体的基因(编码的突变体的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6、7、8所示),依次构建3-异丙基苹果酸脱水酶突变菌株2-LeuD^{A84L}、2-LeuD^{A84V}、2-LeuD^{A84I}。具体构建方法如下:

[0038] 1、质粒pK18mobsacB-leuD^{A84L}的构建

[0039] 利用Phusion超保真聚合酶(New England BioLabs),以出发菌株MHZ-1012-2的基因组为模板,以leuD^{A84L}-UP-1F/leuD^{A84L}-UP-1R为引物,制备重组片段UP-1,以leuD^{A84L}-DN-2F/leuD^{A84L}-DN-2R为引物,制备重组片段DN-1;以质粒pk18-mob-sacB为模板,以leuD^{A84L}-pk18-3F/leuD^{A84L}-pk18-3R为引物获得片段pk18-1,经琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根)纯化,随后按照吉普森组装试剂盒配置体系进行反应,反应体系如表2所示。

[0040] 表2吉普森组装反应体系

[0041]	组分	UP-1	DN-1	pk18-1	CE Buffer	CE Exnase	无菌水
	体积/ μL	1	1	2	4	2	10

[0042] 将配制的反应体系于37℃反应30min,吸取10 μL 转化Trans1T1感受态细胞(TransGen Biotech),挑取单克隆,通过菌落PCR鉴定插入的片段正确,进一步酶切鉴定得到片段插入pK18mobsacB的阳性克隆,最后将质粒送至金唯智生物科技有限公司进行测序,将测序正确的质粒命名为pK18mobsacB-leuD^{A84L}。

[0043] 2、质粒pK18mobsacB-leuD^{A84V}、pK18mobsacB-leuD^{A84I}的构建

[0044] 按上述1相同的方法,将引物leuD^{A84L}-UP-1R分别替换为leuD^{A84V}-UP-1R、leuD^{A84I}-UP-1R,将引物leuD^{A84L}-DN-2F分别替换为leuD^{A84V}-DN-2F、leuD^{A84I}-DN-2F,所构建的质粒分别命名为pK18mobsacB-leuD^{A84V}、pK18mobsacB-leuD^{A84I}。

[0045] 3、3-异丙基苹果酸脱水酶突变菌株2-LeuD^{A84L}、2-LeuD^{A84V}、2-LeuD^{A84I}的构建

[0046] 将上述1、2所述方法构建获得的重组质粒pK18mobsacB-leuD^{A84L}、pK18mobsacB-leuD^{A84V}、pK18mobsacB-leuD^{A84I}分别转入出发菌株MHZ-1012-2中,在含有15mg/L的卡那霉素的选择培养基上选择交换重组子。培养的温度为30℃,倒置培养。将筛选获得的转化子过夜培养于液体脑心浸液培养基中,培养温度为30℃,回转摇床220rpm振荡培养。培养过程中,转化子发生第二次重组,通过基因交换将载体序列从基因组中除去。将培养物做连续梯度稀释(10⁻²连续稀释至10⁻⁴),稀释液涂布在含有10%蔗糖的固体脑心浸液培养基上,33℃静置培养48h。对在此培养基上长出的转化子进行鉴定。通过PCR扩增目的序列,核苷酸测序分析,获得目的突变菌株,分别命名为2-LeuD^{A84L}、2-LeuD^{A84V}、2-LeuD^{A84I}。

[0047] 实施例2 3-异丙基苹果酸脱水酶突变菌株发酵生产L-缬氨酸

[0048] 对实施例1构建的突变菌株进行发酵验证,具体方法如下:

[0049] 1、培养基

[0050] 种子培养基:豆粕抽提物15g/L,葡萄糖20g/L,硫酸铵7g/L,硫酸镁0.5g/L,磷酸二氢钾1g/L,磷酸氢二钾1g/L,尿素2g/L,余量为水,pH 7.2。

[0051] 发酵培养基:豆粕抽提物15g/L,葡萄糖60g/L,硫酸铵20g/L,硫酸镁0.5g/L,磷酸二氢钾1g/L,磷酸氢二钾1g/L,尿素2g/L,碳酸钙40g/L, V_{B3} 15mg/L, V_H 50 $\mu\text{g/L}$, $V_{B1} \cdot \text{HCl}$ 100 $\mu\text{g/L}$,余量为水,pH 7.2。

[0052] 2、摇瓶发酵生产L-缬氨酸

[0053] (1) 种子培养:挑取斜面种子1环接至装有50mL种子培养基的500mL三角瓶中,30℃、220r/min振荡培养10-12h;

[0054] (2) 发酵培养:将5mL种子液接种至装有50mL发酵培养基的500mL三角瓶中,30℃、220r/min振荡培养48h;

[0055] (3) 取1mL发酵液离心(12000rpm,2min),收集上清液,用HPLC检测醇液中的L-缬氨酸、L-亮氨酸。同时采用分光光度法检测发酵液在562nm下的OD值,结果如表3所示。

[0056] 表3菌株生长和发酵产物含量检测结果

	菌种名称			
	MHZ-1012-2	2-LeuD ^{A84L}	2-LeuD ^{A84V}	2-LeuD ^{A84I}
[0057] 缬氨酸浓度 g/L	6.1	7.3*	7.9*	7.6*
亮氨酸浓度 g/L	2.0	0.8*	0.5*	0.6*
缬氨酸转化率%	10.1	12.1*	13.2*	12.6*
OD ₅₆₂	56.8	55.8	57.1	56.6

[0058] 注:*表示与出发菌株相比具有显著差异,P<0.05。

[0059] 实验结果显示,出发菌株MHZ-1012-2的L-缬氨酸产量仅为6.1g/L,3-异丙基苹果酸脱水酶突变菌株2-LeuD^{A84L}、2-LeuD^{A84V}、2-LeuD^{A84I}的L-缬氨酸产量和转化率较出发菌株显著提高,且L-亮氨酸产量大幅下降,同时仍能够保持较好的生长性能。其中,以 α -异丙基苹果酸合酶突变菌株2-LeuD^{A84V}表现最为突出,缬氨酸产量为7.9g/L,比出发菌株产量提高1.8g/L,提高了29.5%;副产物亮氨酸产量为0.5g/L,较出发菌株亮氨酸产量下降75.0%。

[0060] 由此可见,本发明提供的3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及3-异丙基苹果酸脱水酶突变菌株对目标产物缬氨酸的产量提升具有显著的促进作用,对副产物亮氨酸产量有显著的降低作用。该3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及其重组微生物为产缬氨酸、异亮氨酸及其为前体的衍生物的生产菌株的构建提供借鉴。

[0061] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 廊坊梅花生物技术开发有限公司

<120> 3-异丙基苹果酸脱水酶突变体及其应用

<130> KHP211124099.9

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 594

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
atggaaaaat ttaccaccca caccggcggtt ggcgttccac tgcagcgatc caacgtggac 60
accgaccaga tcatccccgc cgtctacctc aagcgcgtca cccgcacagg cttcgaagac 120
ggactgtttt ccaactggcg ccaaaacgac cccaactttg tctcaacac cgacacctac 180
aagaacggct ccgttctcgt agcaggccct gactttggca cggctctctc ccgcgagcac 240
gccgtctggg cactcatgga ctacggcttc cgcgctgtct tctctcactg attcgccgac 300
atcttccgcg gcaactccgg aaaagctggc atgctcgccg gcatcatgga acagtccgac 360
atcgaacttc tgtggaagct catggaacaa accccgggcc tcgaactgac cgtgaacctg 420
gaaaagcaga tcgtcactgc aggcgacgta gtgatcagct tcgaagttga cccttacatt 480
cgctggcggt tgatggaagg cctcgacgac gctggcctga ccctgcgcaa gctcgatgaa 540
attgaagact acgaggctaa gcgccctgcg ttaagccac gcactaacgc ttaa 594
```

<210> 2

<211> 594

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```
atggaaaaat ttaccaccca caccggcggtt ggcgttccac tgcagcgatc caacgtggac 60
accgaccaga tcatccccgc cgtctacctc aagcgcgtca cccgcacagg cttcgaagac 120
ggactgtttt ccaactggcg ccaaaacgac cccaactttg tctcaacac cgacacctac 180
aagaacggct ccgttctcgt agcaggccct gactttggca cggctctctc ccgcgagcac 240
gccgtctggc tactcatgga ctacggcttc cgcgctgtct tctctcactg attcgccgac 300
atcttccgcg gcaactccgg aaaagctggc atgctcgccg gcatcatgga acagtccgac 360
atcgaacttc tgtggaagct catggaacaa accccgggcc tcgaactgac cgtgaacctg 420
gaaaagcaga tcgtcactgc aggcgacgta gtgatcagct tcgaagttga cccttacatt 480
cgctggcggt tgatggaagg cctcgacgac gctggcctga ccctgcgcaa gctcgatgaa 540
attgaagact acgaggctaa gcgccctgcg ttaagccac gcactaacgc ttaa 594
```

<210> 3

<211> 594

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

```
atggaaaaat ttaccacca caccggcggtt ggcgttccac tgcagcgatc caacgtggac 60
accgaccaga tcatccccgc cgtctacctc aagcgcgtca cccgcacagg cttcgaagac 120
ggactgtttt ccaactggcg ccaaaacgac cccaactttg tctcaacac cgacacctac 180
aagaacggct ccgttctcgt agcaggccct gactttggca ccggctctc ccgcgagcac 240
gccgtctggg tactcatgga ctacggctt cgcgctgtct tctcctcacg attcgccgac 300
atcttccgcg gcaactccgg aaaagctggc atgctcgccg gcatcatgga acagtccgac 360
atcgaacttc tgtggaagct catggaacaa accccgggcc tcgaactgac cgtgaacctg 420
gaaaagcaga tcgtcactgc aggcgacgta gtgatcagct tcgaagttga cccttacatt 480
cgctggcggt tgatggaagg cctcgacgac gctggcctga cctcgcgcaa gctcgatgaa 540
attgaagact acgaggctaa ggcacctgcg ttaagccac gcactaacgc ttaa 594
```

<210> 4

<211> 594

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

```
atggaaaaat ttaccacca caccggcggtt ggcgttccac tgcagcgatc caacgtggac 60
accgaccaga tcatccccgc cgtctacctc aagcgcgtca cccgcacagg cttcgaagac 120
ggactgtttt ccaactggcg ccaaaacgac cccaactttg tctcaacac cgacacctac 180
aagaacggct ccgttctcgt agcaggccct gactttggca ccggctctc ccgcgagcac 240
gccgtctgga tactcatgga ctacggctt cgcgctgtct tctcctcacg attcgccgac 300
atcttccgcg gcaactccgg aaaagctggc atgctcgccg gcatcatgga acagtccgac 360
atcgaacttc tgtggaagct catggaacaa accccgggcc tcgaactgac cgtgaacctg 420
gaaaagcaga tcgtcactgc aggcgacgta gtgatcagct tcgaagttga cccttacatt 480
cgctggcggt tgatggaagg cctcgacgac gctggcctga cctcgcgcaa gctcgatgaa 540
attgaagact acgaggctaa ggcacctgcg ttaagccac gcactaacgc ttaa 594
```

<210> 5

<211> 197

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

```
Met Glu Lys Phe Thr Thr His Thr Gly Val Gly Val Pro Leu Gln Arg
1           5           10           15
Ser Asn Val Asp Thr Asp Gln Ile Ile Pro Ala Val Tyr Leu Lys Arg
           20           25           30
Val Thr Arg Thr Gly Phe Glu Asp Gly Leu Phe Ser Asn Trp Arg Gln
           35           40           45
```

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

<210> 6

<211> 197

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

Met Glu Lys Phe Thr Thr His Thr Gly Val Gly Val Pro Leu Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Asp Thr Asp Gln Ile Ile Pro Ala Val Tyr Leu Lys Arg
 20 25 30
 Val Thr Arg Thr Gly Phe Glu Asp Gly Leu Phe Ser Asn Trp Arg Gln
 35 40 45
 Asn Asp Pro Asn Phe Val Leu Asn Thr Asp Thr Tyr Lys Asn Gly Ser
 50 55 60
 Val Leu Val Ala Gly Pro Asp Phe Gly Thr Gly Ser Ser Arg Glu His
 65 70 75 80
 Ala Val Trp Leu Leu Met Asp Tyr Gly Phe Arg Ala Val Phe Ser Ser
 85 90 95
 Arg Phe Ala Asp Ile Phe Arg Gly Asn Ser Gly Lys Ala Gly Met Leu
 100 105 110

Ala Gly Ile Met Glu Gln Ser Asp Ile Glu Leu Leu Trp Lys Leu Met
 115 120 125

Glu Gln Thr Pro Gly Leu Glu Leu Thr Val Asn Leu Glu Lys Gln Ile
 130 135 140

Val Thr Ala Gly Asp Val Val Ile Ser Phe Glu Val Asp Pro Tyr Ile
 145 150 155 160

Arg Trp Arg Leu Met Glu Gly Leu Asp Asp Ala Gly Leu Thr Leu Arg
 165 170 175

Lys Leu Asp Glu Ile Glu Asp Tyr Glu Ala Lys Arg Pro Ala Phe Lys
 180 185 190

Pro Arg Thr Asn Ala
 195

<210> 7

<211> 197

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

Met Glu Lys Phe Thr Thr His Thr Gly Val Gly Val Pro Leu Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Asn Val Asp Thr Asp Gln Ile Ile Pro Ala Val Tyr Leu Lys Arg
 20 25 30

Val Thr Arg Thr Gly Phe Glu Asp Gly Leu Phe Ser Asn Trp Arg Gln
 35 40 45

Asn Asp Pro Asn Phe Val Leu Asn Thr Asp Thr Tyr Lys Asn Gly Ser
 50 55 60

Val Leu Val Ala Gly Pro Asp Phe Gly Thr Gly Ser Ser Arg Glu His
 65 70 75 80

Ala Val Trp Val Leu Met Asp Tyr Gly Phe Arg Ala Val Phe Ser Ser
 85 90 95

Arg Phe Ala Asp Ile Phe Arg Gly Asn Ser Gly Lys Ala Gly Met Leu
 100 105 110

Ala Gly Ile Met Glu Gln Ser Asp Ile Glu Leu Leu Trp Lys Leu Met
 115 120 125

Glu Gln Thr Pro Gly Leu Glu Leu Thr Val Asn Leu Glu Lys Gln Ile
 130 135 140

Val Thr Ala Gly Asp Val Val Ile Ser Phe Glu Val Asp Pro Tyr Ile
 145 150 155 160

Arg Trp Arg Leu Met Glu Gly Leu Asp Asp Ala Gly Leu Thr Leu Arg
 165 170 175

Lys Leu Asp Glu Ile Glu Asp Tyr Glu Ala Lys Arg Pro Ala Phe Lys
 180 185 190
 Pro Arg Thr Asn Ala
 195
 <210> 8
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 8
 Met Glu Lys Phe Thr Thr His Thr Gly Val Gly Val Pro Leu Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Asp Thr Asp Gln Ile Ile Pro Ala Val Tyr Leu Lys Arg
 20 25 30
 Val Thr Arg Thr Gly Phe Glu Asp Gly Leu Phe Ser Asn Trp Arg Gln
 35 40 45
 Asn Asp Pro Asn Phe Val Leu Asn Thr Asp Thr Tyr Lys Asn Gly Ser
 50 55 60
 Val Leu Val Ala Gly Pro Asp Phe Gly Thr Gly Ser Ser Arg Glu His
 65 70 75 80
 Ala Val Trp Ile Leu Met Asp Tyr Gly Phe Arg Ala Val Phe Ser Ser
 85 90 95
 Arg Phe Ala Asp Ile Phe Arg Gly Asn Ser Gly Lys Ala Gly Met Leu
 100 105 110
 Ala Gly Ile Met Glu Gln Ser Asp Ile Glu Leu Leu Trp Lys Leu Met
 115 120 125
 Glu Gln Thr Pro Gly Leu Glu Leu Thr Val Asn Leu Glu Lys Gln Ile
 130 135 140
 Val Thr Ala Gly Asp Val Val Ile Ser Phe Glu Val Asp Pro Tyr Ile
 145 150 155 160
 Arg Trp Arg Leu Met Glu Gly Leu Asp Asp Ala Gly Leu Thr Leu Arg
 165 170 175
 Lys Leu Asp Glu Ile Glu Asp Tyr Glu Ala Lys Arg Pro Ala Phe Lys
 180 185 190
 Pro Arg Thr Asn Ala
 195