



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110846288 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201911182175.8 *C12P 21/02* (2006.01)

(22) 申请日 2019.11.27 *C12R 1/19* (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110846288 A 审查员 吴丹阳

(43) 申请公布日 2020.02.28

(73) 专利权人 浙江华睿生物技术有限公司
地址 313000 浙江省湖州市红丰路1366号6
幢5层西侧502室

(72) 发明人 范文超 高书良 王金刚 袁圣伦

(74) 专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280
代理人 贾师英

(51) Int. Cl.
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表7页

(54) 发明名称
一种谷胱甘肽双功能酶突变体及其应用

(57) 摘要
本发明公开了一种谷胱甘肽双功能酶突变体,其氨基酸序列为SEQ ID NO:3,与野生型谷胱甘肽双功能酶相比,显著提高了催化谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸反应合成L-谷胱甘肽的酶活力,具有工业化应用前景。

1. 一种谷胱甘肽双功能酶突变体,其氨基酸序列为SEQ ID NO:3。
2. 编码如权利要求1所述谷胱甘肽双功能酶突变体的基因。
3. 如权利要求2所述的基因,其特征在于,核苷酸序列为SEQ ID NO:4。
4. 包含如权利要求3所述基因的质粒。
5. 转化了如权利要求4所述质粒的微生物。
6. 如权利要求5所述的微生物,其特征在于,是所述微生物选自大肠杆菌、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌。
7. 如权利要求6所述的微生物,其特征在于,是所述微生物是大肠杆菌BL21 (DE3)。
8. 如权利要求1所述谷胱甘肽双功能酶突变体或者如权利要求6所述微生物在生产L-谷胱甘肽中的用途。
9. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,以谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸为底物、用权利要求1所述谷胱甘肽双功能酶突变体或者如权利要求6所述微生物催化合成L-谷胱甘肽。
10. 如权利要求9所述的用途,其特征在于,反应体系中添加有ATP和氯化镁。

一种谷胱甘肽双功能酶突变体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于酶催化技术领域,具体地说,涉及一种谷胱甘肽双功能酶突变体、及其用于酶法合成L-谷胱甘肽的用途。

背景技术

[0002] L-谷胱甘肽,是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸缩合形成的三肽化合物,是生物体中含量最多的非蛋白类巯基化合物。在生物体内,具有重要的生理功能,包括抵抗氧化损伤、对外源物质的解毒、参与细胞信号转导调节淋巴细胞功能,增强机体免疫力。因此,L-谷胱甘肽在医药、食品和化妆品行业有广泛的应用。目前,国内外生产L-谷胱甘肽的方法主要有化学合成法、发酵法和酶法。

[0003] 已经开发了一系列用于生产L-谷胱甘肽的酶,但这些酶的催化活力有限,导致L-谷胱甘肽的产量较低,原料转化率低,工业放大生产成本较高。因此,如何提高合成L-谷胱甘肽的酶活力、或者开发用于规模化生产L-谷胱甘肽的工业用酶一直是广大科研人员的努力目标。

发明内容

[0004] 我们通过对无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)来源的谷胱甘肽双功能酶gshF基因(WP_000582678.1)进行定向进化,获得了一种催化活力显著提高的谷胱甘肽双功能酶突变体,其可以高效地催化底物谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸进行缩合反应来合成L-谷胱甘肽,转化率明显提高,具有工业开发和应用前景。

[0005] 具体而言,本发明包括如下技术方案。

[0006] 一种谷胱甘肽双功能酶突变体,氨基酸序列为SEQ ID NO:3,其为野生型谷胱甘肽双功能酶gshF即序列SEQ ID NO:1第48位的S替换为N、第206位的K替换为E、第358位的I替换为S、第540位的K替换为Q、第588位的R替换为H的突变体,氨基酸序列为:

[0007] MIIDRLLQRSHSLPILQATFGLERESLRHQPTQRVAQTPHPKTLGNRNYHPYIQTDYSEPQLELITPIAKDSQEAIRFLKAISDVAGRSINHDEYLWPLSMPPKVVREEDIQIAQLEDAFEYDYRKYLEKTYGKLIQSISGIHYNLGLGQELLTSLFELSQADNAIDFQNLQLYMKLSQNFLRYRWLLTYLYGASPVAEEDFLDQELNPNVRSRNSHLGYVNHKDIRISYTSKDYVNDLENVAVKSGQLIAEKEFYSPVRLRGSKACRNYLEKGITYLEFRFTDLNPFSPIGITQETVDTVHLFLLALLWIDSSSHIDQDIKEANRLNDLIALSHPLEKLPNQAPVSDLDVAMQSVSQHFNLSPYYQDLLESVKRQIQSPELTVAGQLLEMIIEGLSLETFGQRQGIYHDYAWEAPYALKGYETMELSTQLLLFDVIQKGVNFEVLEQDQFLKLWHNSHIEYVKNGNMTSKDNYIVPLAMANKVVTKKILDEKHFPTPGDEFDTRKEALNYFSQIQDKPIVVKPKSTNFGLGISIFQTSANLASYEKAIDIAFTEDSAILVEEYIEGTEYRFFVLEGDCIAVLLHVAANVVGDIHTISQLVKLKNQNPRLRGYDHRSPLEVIELGEVEQLMLEQQGYTVNSIPPEGTKIELRRNSNISTGGDSIDVTNTMDPTYKQLAAEMAEMAWVCGVDLIIPNATQAYSKDKNATCIELNFNPLMYMHTYCQEGPGQSI TPRILAKLFPPEL (SEQ ID NO:3)。

[0008] 一种编码上述谷胱甘肽双功能酶突变体的基因。

[0009] 优选地,编码上述谷胱甘肽双功能酶突变体SEQ ID NO:3的基因可以是下述核苷酸序列:

[0010] ATGATTATCGATCGTCTGCTGCAGCGCAGTACAGCCATCTCCCAATCCTCCAAGCCACCTTCGGTCTGGAGCGCGAGAGTCTGCGTATTCACCAGCCGACCCAGCGCGTTGCGCAAACCCACATCCGAAAACGCTGGGCAACCGTAACTACCACCCGTACATCCAAACGGACTACAGTGAGCCACAGCTCGAGCTGATCAGCCGATCGCGAAAGATGCCAAGAAGCGATCCGCTTTCTGAAAGCGATTAGCGACGTGGCCGGCCGAGCATCAACCACGATGAATATCTGTGGCCACTGAGCATGCCACAAAAGTGC GCGAAGAGGACATCCAGATTGCGCAGCTCGAAGATGCGTTCGAGTACGACTACCGCAAGTATCTGGAGAAGACCTACGGCAAAGTATCCAGAGCATCAGCGGCATCCACTACAATCTGGGTCTGGCCAAGAGCTGCTGACGAGCCTCTTCAACTCAGCCAAGCGGATAACGCGATCGACTTCCAGAACCAGCTGTACATGAAGCTGAGCCAGAATTTCTGCGCTACCGCTGGCTGCTCACCTATCTGTACGGTGCAGGCCAGTGGCGGAAGAGGACTTTCTGGACCAGGAGCTGAACAATCCAGTTCGCAGCCTCCGCAACAGCCATCTGGGCTATGTGAACCACAAAGACATCCGCATTAGCTACACCAGTCTGAAAGACTATGTGAACGACCTCGAAAACGCCGTGAAAAGTGGCCAGCTGATCGCCGAGAAGGAATTCTACAGCCCAGTTCGTCTGCGCGCAGCAAGGCGTGTGCAACTATCTGGAAAAGGGCATCACGTACCTCGAATTCGCGACCTTCGATCTGAACCCATTAGCCCAATCGGCATCACCCAAGAGACGGTTGACACCGTTCATCTGTTTCTCCTCGCGTCTGTGGATCGATAGCAGTAGCCACATCGACCAAGATATTAAGGAGGCCAACCGTCTGAACGATCTGATTGCGCTGAGTACCCGCTGGAAAACTCCCAAATCAAGCCCCAGTTAGCGATCTGGTTGATGCCATGCAGAGCGTGAGCCAGCATTCAATCTGAGCCCCTACTACCAAGATCTGCTGGAAAGCGTGAAGCGCCAGATTCAAAGCCCAGAACTGACGGTTGCCGGTTCAGCTGCTGGAGATGATCGAAGGTCTGAGCCTCGAGACCTTCGGTCA GCGTCAAGGCCAGATCTACCATGATTATGCGTGGGAGGCCCCATACGCGCTCAAGGGCTATGAAACCATGGAAGTGAAGCCAGCTGCTCCTCTTCGACGTGATCCAGAAGGGCGTAACTTCGAGGTGCTCGACGAGCAAGATCAATTC TGAAGCTGTGGCACAACAGCCATATCGAGTACGTGAAGAATGGCAACATGACCAGCAAGGACAATTATATCGTGCCGCTGGCGATGGCCAACAAAGTGGTGACGAAGAAGATTCTGGACGAAAAGCACTTCCCAGCGCGTTTCGGCGATGAGTTTACGGACCGCAAAGAGGGCGTGAATTACTTCAGCCAGATCCAAGATAAGCCGATCGTGGTGAAGCCGAAAAGCAGAACTTCGGTCTGGGTATCAGCATCTTCCAGACGAGTGCCAATCTGGCCAGTTACGAGAAGGCGATCGATATCGCGTTACCCGAGGATAGTGCGATCCTCGTGGAGGAATACATCGAAGGCACCGAGTACCGCTTCTTCGTTCTGGAGGGTGACTGCATTGCGGTTCTGCTGCATGTTGCCGCCAACGTGGTGGGCGATGGCATTACATACGATCAGCCAGCTGGTGAAGCTGAAGAATCAGAACCCACTGCGTGGCTACGATCATCGCAGTCCACTGGAAGTGATTGAGCTCGGTGAAGTGGAACAGCTCATGCTGGAGCAGCAAGGCTACACCGTGAACAGCATTCCACCGGAAGGCACCAAAAATTGAGCTGCGTTCGCAACAGTAACATCAGCACCGGTGGTGACAGCATCGATGTGACCAACACGATGGACCCAACCTATAAGCAGCTGGCCGCGGAAATGGCCGAAGCCATGGGTGCGTGGGTTTTCGGTGTGGATCTGATCATTCCGAACGCCACGCAAGCCTACAGCAAGGATAAGAAGAACGCGACGTGCATCGAGCTGAACTTCAACCCGCTGATGTACATGCACACCTACTGTCAAGAAAGGTCCGGCCAGAGTATTACCCCGCTATTCTGGCCAAGCTGTTCCAGAAGCTCTAA (SEQ ID NO:4)。

[0011] 一种包含上述基因的质粒。该质粒包含用于表达上述基因的载体,优选载体是pSH系列,但并不受限于此。

[0012] 一种转化了上述质粒的微生物,该微生物可作为宿主用于表达上述谷胱甘肽双功能酶突变体SEQ ID NO:3。

[0013] 优选地,上述微生物选自大肠杆菌、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌等,优选大肠杆菌,更优选大肠杆菌BL21 (DE3)。

[0014] 上述谷胱甘肽双功能酶或者上述微生物可以用于催化谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸

反应来生产L-谷胱甘肽。

[0015] 在生产中,以为谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸底物原料,用上述谷胱甘肽双功能酶或者其表达微生物作为催化剂来催化合成反应。

[0016] 作为一种可选的实施方式,上述微生物可以呈菌体或者其细胞破碎物形式,作为缩合反应的催化剂。

[0017] 生产谷胱甘肽可采用常规的工艺条件,比如,反应温度选择20-40℃,例如25-35℃。

[0018] 优选地,反应体系中添加有ATP和氯化镁,例如添加有10-200mM的ATP,优选20-40mM的ATP;10-50mM氯化镁,例如30-40mM氯化镁。其中ATP可为谷胱甘肽的合成反应提供能量, Mg^{2+} 是gshF酶的激活因子。

[0019] 反应体系可以为pH7.0-8.0,例如pH7.2-7.5。

[0020] 相较野生型谷胱甘肽双功能酶gshF,本发明构建的突变体SEQ ID NO:3催化谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸缩合反应的酶活性提高了近10倍,具有工业化开发和应用前景。

具体实施方式

[0021] 本发明构建的谷胱甘肽双功能酶突变体是无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 来源的野生型谷胱甘肽双功能酶SEQ ID NO:1的突变体,是SEQ ID NO:1序列中多个位点氨基酸发生替换(S48N、K206E、I358S、K540Q、R588H)后形成的新蛋白质。其中SEQ ID NO:1的编码基因是序列表中的SEQ ID NO:2。

[0022] 在本发明中,术语“野生(型)酶”、“野生酶”、“野生(型)谷胱甘肽双功能酶”表示相同的意义,都是指野生型的谷胱甘肽双功能酶(SEQ ID NO:1)。

[0023] 为表述方便起见,蛋白质的氨基酸缩写既可以使用英文三字母、也可以采用英文单字母,这是本领域技术人员熟知的,这些缩写列于下表中:

[0024] 表1氨基酸中英文对照及缩写

丙氨酸	Alanine	A 或 Ala	脂肪族类
精氨酸	Arginine	R 或 Arg	碱性氨基酸类
天冬酰胺	Asparagine	N 或 Asn	酰胺类
天冬氨酸	Aspartic acid	D 或 Asp	酸性氨基酸类
半胱氨酸	Cysteine	C 或 Cys	含硫类
谷氨酰胺	Glutamine	Q 或 Gln	酰胺类
谷氨酸	Glutamic acid	E 或 Glu	酸性氨基酸类
甘氨酸	Glycine	G 或 Gly	脂肪族类
组氨酸	Histidine	H 或 His	碱性氨基酸类
异亮氨酸	Isoleucine	I 或 Ile	脂肪族类
亮氨酸	Leucine	L 或 Leu	脂肪族类

[0025]

[0026]	赖氨酸	Lysine	K 或 Lys	碱性氨基酸类
	蛋氨酸	Methionine	M 或 Met	含硫类
	苯丙氨酸	Phenylalanine	F 或 Phe	芳香族类
	脯氨酸	Proline	P 或 Pro	亚氨基酸
	丝氨酸	Serine	S 或 Ser	羟基类
	苏氨酸	Threonine	T 或 Thr	羟基类
	色氨酸	Tryptophan	W 或 Trp	芳香族类
	酪氨酸	Tyrosine	Y 或 Tyr	芳香族类
	缬氨酸	Valine	V 或 Val	脂肪族类

[0027] 为了获得酶性能更高的谷胱甘肽双功能酶,本发明对SEQ ID NO:1的基因序列SEQ ID NO:2进行点突变。通过易错PCR技术获得一系列突变体,发现有些位点的氨基酸的替换或缺失会导致突变体的酶活力的显著变化。通过实验发现S48N、K206E、I358S、K540Q、R588H的突变体SEQ ID NO:3的酶活性相比野生型酶SEQ ID NO:1有明显提高,提高了约10倍。

[0028] 本发明的谷胱甘肽双功能酶突变体的结构明确,因此本领域技术人员很容易获得其编码基因、包含这些基因的表达盒和质粒、以及包含该质粒的转化体。

[0029] 这些基因、表达盒、质粒、转化体可以通过本领域技术人员所熟知的基因工程构建方式获得。

[0030] 上述转化体宿主可以使任何适合表达谷胱甘肽双功能酶的微生物,包括细菌和真菌。微生物可以是大肠杆菌、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌等,优选大肠杆菌,更优选大肠杆菌BL21 (DE3)。

[0031] 当作为生物催化剂用于生产时,本发明的谷胱甘肽双功能酶突变体可以呈现酶的形式或者菌体的形式。所述酶的形式包括游离酶、固定化酶,包括纯化酶、粗酶、发酵液、载体固定的酶、细胞破碎物等;所述菌体的形式包括存活菌体细胞和死亡菌体细胞。

[0032] 作为另一种可选的实施方式,可以采用表达上述谷胱甘肽双功能酶突变体SEQ ID NO:3的微生物菌体细胞作为酶催化反应的生物催化剂。菌体的形式包括存活菌体和死亡菌体,当微生物比如大肠杆菌、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌等不再进行发酵增殖、而是用于酶催化反应时,本身就是一种天然的固定化酶,而且不需要进行破碎处理、甚至提取纯化处理,就可以作为一种酶制剂用于催化反应。由于反应底物和反应产物都是小分子化合物,可以很方便地穿过菌体的生物屏障--细胞膜,因此不需要对菌体进行破碎处理,这在经济方面是有利的。

[0033] 以下结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0034] 本文中涉及到多种物质的添加量、含量及浓度,其中所述的百分含量,除特别说明外,皆指质量百分含量。

[0035] 实施例

[0036] 材料和方法

[0037] 实施例中的全基因合成、引物合成及测序皆由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

[0038] 实施例中的分子生物学实验包括质粒构建、酶切、连接、感受态细胞制备、转化、培养基配制等等,主要参照《分子克隆实验指南》(第三版),J. 萨姆布鲁克,D.W. 拉塞尔(美)编

著,黄培堂等译,科学出版社,北京,2002)进行。必要时可以通过简单试验确定具体实验条件。

[0039] PCR扩增实验根据质粒或DNA模板供应商提供的反应条件或试剂盒说明书进行。必要时可以通过简单试验予以调整。

[0040] LB培养基:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,pH7.2。(LB固体培养基另加20g/L琼脂粉。)

[0041] TB培养基:24g/L酵母提取物、12g/L胰蛋白胨、16.43g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、2.31g/L KH_2PO_4 、5g/L甘油,pH7.0-7.5。(TB固体培养基另加20g/L琼脂粉。)

[0042] 底物和产物的HPLC测定条件:

[0043] 安捷伦高效液相色谱仪1260infinity II,DAD检测器,依利特BDS-C18色谱柱;流动相A,3.4g磷酸二氢钾+1.01g1-庚烷磺酸钠溶解到500ml蒸馏水(90%);流动相B,甲醇(10%);流速,1mL/min;柱温,30°C;检测波长,210nm;进样量10 μ l,检测时间20min;L-谷胱甘肽保留时间4.585min。

[0044] 实施例1野生型谷胱甘肽双功能酶表达菌株的构建

[0045] 1.1根据野生型谷胱甘肽双功能酶的氨基酸序列WP_000582678.1(即SEQ ID NO:1),通过大肠杆菌密码子频率优化,委托苏州金维智生物技术有限公司进行全基因序列合成序列SEQ ID NO:2,构建到pSH质粒(浙江华睿生物技术有限公司)中,形成用于表达野生型谷胱甘肽双功能酶的载体pSH-gshF。

[0046] 正向引物gshF-F:5' -CATATGATTATCGATCGTCTGCT-3' ,

[0047] 反向引物gshF-R:5' -GGATCCTTAGAGTTCTGGGAACAGCT-3' 。

[0048] PCR扩增约2.5kb片段,PCR反应体系包括:正向引物、反向引物各0.3 μ M,模板50ng,1xKOD Neo plus buffer,0.2mM dNTP,1.5mM $MgSO_4$,KOD neo plus 1U,补双蒸水至总体系50 μ l.PCR条件:94°C,2min;98°C 10s,55°C 30s,68°C 30s,重复30循环;68°C 10min。

[0049] PCR反应结束后,琼脂糖凝胶电泳鉴定,胶回收试剂盒回收片段。质粒载体pSH或gshF片段分别用NdeI和BamHI进行双酶切处理,酶切体系:质粒37 μ l(或片段37 μ l),10x buffer 5 μ l,NdeI 1.5 μ l,BamHI 1.5 μ l。酶切结束同样使用胶回收试剂盒回收片段。其中PCR用酶KOD Neo plus购自东洋纺(上海)生物科技有限公司,胶回收试剂盒OMEGA Gel Extraction Kit D2500购自广州飞扬生物工程有限公司。限制性内切酶均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

[0050] 1.2通过电转化将重组质粒pSH-gshF转化入宿主大肠杆菌BL21(DE3)(Invitrogen公司),得到表达野生型谷胱甘肽双功能酶gshF的重组大肠杆菌,简称为菌株gshF。

[0051] 实施例2通过易错PCR法构建gshF随机突变点库及筛选

[0052] 2.1易错PCR法构建gshF随机突变点库构建

[0053] 以序列SEQ ID NO:2模板,应用易错PCR技术构建随机突变体库。正向引物gshF-NdeI-F为5' -ATGATTATCGATCGTCTGCT-3' ,反向引物gshF-BamHI-R为5' -GGATCCTTAGAGTTCTGGGAACAGCT-3' 。

[0054] 50 μ L易错PCR反应体系包括:50ng质粒模板pSH-gshF,30pmol一对引物gshF-NdeI-F和gshF-XhoI-R,1X Taq buffer,0.2mM dGTP,0.2mM dATP,1mM dCTP,1mM dTTP,7mM $MgCl_2$, (0mM、0.05mM、0.1mM、0.15mM、0.2mM) $MnCl_2$,2.5个单位的Taq酶(Fermentas)。

[0055] PCR反应条件为:95℃ 5min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 2min/kbp;30个循环;72℃ 10min。

[0056] 胶回收2.0kb随机突变片段作为大引物,用KOD-plus DNA聚合酶做MegaPrimer PCR:94℃ 5min,;98℃ 10s,60℃ 30s,68℃ 2min/kbp,25个循环;68℃ 10min。DpnI消化质粒模板,电转化大肠杆菌BL21 (DE3),得到超过约 10^4 个克隆的随机突变库。

[0057] 2.2突变体库的高通量筛选

[0058] 配制底物反应液:200mM Tris-HCl缓冲液,pH7.2,谷氨酸钠40mM,甘氨酸40mM,ATP 20mM,MgCl₂ 40mM,半胱氨酸40mM。

[0059] 选取突变体库中的转化子接种到含700μL LB培养基的96孔深孔培养板中,培养基中含100μg/mL卡那霉素,37℃培养6h后,加入终浓度0.1mM IPTG后,降温至25℃,培养过夜。5000rpm离心10min,弃上清,置于-70℃冷冻1h,室温融化30min。加入200μL含100mMTris-HCl缓冲液(pH7.2),重悬菌体,用于gshF酶活力的高通量筛选测定。

[0060] 用排枪向96孔板中加入100μL重悬菌液,充分重悬后,放置于冰上,预冷10min;用排枪向96孔板中加入100μL底物反应液,稍作重悬后,放置于摇床,30℃280rpm反应20min。反应结束后,将96孔板放置冰上,用排枪向96孔板中加入200μL 0.5M HCl,稍作重悬后,4000rpm离心10min得到上清;将1体积0.01mol/L DTNB溶液加100体积1mol/L pH8.0的Tris-HCl缓冲液配置成DTNB分析液;将待测样品40μL,加入50μL 0.35M NaOH溶液中,摇匀,加入3%甲醛溶液50μL,摇匀,静置2min;再加入0.75ml DTNB分析液,摇匀,在室温保温5min,测定在波长412nm处的吸光值。筛选出吸光值相对较高(即酶活力相对较高)的突变菌株,用于进一步筛选。

[0061] 2.3高酶活突变体的测定和筛选

[0062] 酶活测定反应体系:5ml体系,100mM磷酸缓冲液体系,pH7.2,谷氨酸40mM,甘氨酸40mM,ATP 20mM,MgCl₂ 30mM,菌体浓度(菌浓)0.2%v/v,反应前加入半胱氨酸40mM。

[0063] 终止反应液:1M的盐酸溶液。

[0064] 酶活单位定义:在pH7.2、温度25℃的条件下,每分钟产生1微摩尔(μmol)L-谷胱甘肽所需要的酶量定义为1个单位(U)。

[0065] 从随机突变库中,通过对约1000多个突变体克隆筛选,经测序发现,发现许多位点的氨基酸的替换会导致突变体的酶活力的显著变化。部分发生了正向突变的突变体测序结果显示于表2中。

[0066] 表2、几种gshF突变体的酶活力

突变体	突变氨基酸(密码子)	相对活力(%) *
gshF	—	100
GshF-2380	Ser (AGC) 48 (AAC) Asn Asn (AAT) 180 (ACT) Thr Ala (GCG) 413 (CCG) Pro	430

[0068]	GshF-7768	Lys (AAG) 540 (CAG) Gln Ser (AGC) 48 (AAC) Asn Lys (AAG) 206 (GAG) Glu Ile (ATC) 358 (AGC) Ser Lys (AAG) 540 (CAG) Gln Arg (CGT) 588 (CAT) His	1075
	GshF-10889	Lys (AAG) 206 (GAG) Glu Lys (AAG) 540 (CAG) Gln Arg (CGT) 588 (CAT) His	229

[0069] *酶比活力:以野生酶的发酵活力(U/ml)与菌体浓度OD(OD/ml)的比值为100%。

[0070] 表2的实验结果显示,S48N、K206E、I358S、K540Q、R588H的突变所形成的突变体GshF-7768(即SEQ ID NO:3)的酶活性相比野生型酶SEQ ID NO:1有明显提高,提高了约10倍。

[0071] 实施例3突变体菌株构建

[0072] 我们重点研究了突变体GshF-7768,考察其催化谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸通过缩合反应合成L-谷胱甘肽的情况。为此,将GshF-7768突变基因SEQ ID NO:4克隆到pSH质粒中,得到表达谷胱甘肽双功能酶突变体SEQ ID NO:3的表达载体pSH-gshF-7768。

[0073] 使用该质粒pSH-gshF-7768,可以构建到不同的表达系统中,比如大肠杆菌、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌等。例如,将质粒pSH-gshF-7768转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,涂kan+LB平板,37℃培养过夜,挑选20个单菌落,接种到含有LB液体培养基的试管中,37℃培养过夜,离心收集菌体,抽提质粒,基因测序确定突变正确,得到工程菌株gshF-7768。

[0074] 实施例4菌株发酵及反应

[0075] 4.1从培养gshF-7768工程菌的LB平板上挑选单克隆,接种到5ml LB培养基中,37℃培养过夜;按1%v/v比例接种到含有100ml TB培养基的1000ml摇瓶中,37℃、220rpm培养4-6小时,OD₆₀₀值达到1.2-1.5,加入0.2mM的IPTG诱导,降温到25℃,继续培养10-16小时,离心获得菌体,-80℃冻存24小时备用。

[0076] 4.2反应体系50mL,底物半胱氨酸160mM,甘氨酸200mM,谷氨酸钠200mM,七水氯化镁40mM,ATP 200mM,菌体加入量(v/v)分别为2.5%,5%,10%,调pH7.2,装入250ml摇瓶,通氮气后密封,30℃,150rpm反应。定时取500μL样品,加入500μL 1M盐酸终止反应。结果如下表3所示:

[0077] 表3、不同酶量的突变酶GshF-7768催化合成L-谷胱甘肽的进程

[0078]	加酶量%	1h	2h	3h
	2.5	20.3g/L	33.9g/L	40g/L
	5	25.4g/L	38.7g/L	43.5g/L
	10	27.8g/L	40.2g/L	45.3g/L

[0079] 实验结果表明,突变酶GshF-7768能够有效地催化谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸合成L-谷胱甘肽。

[0080] 综上所述,相比野生型谷胱甘肽双功能酶,本发明构建的谷胱甘肽双功能酶突变体SEQ ID NO:3催化谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸反应生成L-谷胱甘肽的酶活力有了明显提高,提高了约10倍,具有工业化开发和应用前景。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 浙江华睿生物技术有限公司
 [0003] <120> 一种谷胱甘肽双功能酶突变体及其应用
 [0004] <130> SHPI1910727
 [0005] <160> 4
 [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 750
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> Streptococcus agalactiae
 [0011] <400> 1
 [0012] Met Ile Ile Asp Arg Leu Leu Gln Arg Ser His Ser His Leu Pro Ile
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Leu Gln Ala Thr Phe Gly Leu Glu Arg Glu Ser Leu Arg Ile His Gln
 [0015] 20 25 30
 [0016] Pro Thr Gln Arg Val Ala Gln Thr Pro His Pro Lys Thr Leu Gly Ser
 [0017] 35 40 45
 [0018] Arg Asn Tyr His Pro Tyr Ile Gln Thr Asp Tyr Ser Glu Pro Gln Leu
 [0019] 50 55 60
 [0020] Glu Leu Ile Thr Pro Ile Ala Lys Asp Ser Gln Glu Ala Ile Arg Phe
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Leu Lys Ala Ile Ser Asp Val Ala Gly Arg Ser Ile Asn His Asp Glu
 [0023] 85 90 95
 [0024] Tyr Leu Trp Pro Leu Ser Met Pro Pro Lys Val Arg Glu Glu Asp Ile
 [0025] 100 105 110
 [0026] Gln Ile Ala Gln Leu Glu Asp Ala Phe Glu Tyr Asp Tyr Arg Lys Tyr
 [0027] 115 120 125
 [0028] Leu Glu Lys Thr Tyr Gly Lys Leu Ile Gln Ser Ile Ser Gly Ile His
 [0029] 130 135 140
 [0030] Tyr Asn Leu Gly Leu Gly Gln Glu Leu Leu Thr Ser Leu Phe Glu Leu
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Ser Gln Ala Asp Asn Ala Ile Asp Phe Gln Asn Gln Leu Tyr Met Lys
 [0033] 165 170 175
 [0034] Leu Ser Gln Asn Phe Leu Arg Tyr Arg Trp Leu Leu Thr Tyr Leu Tyr
 [0035] 180 185 190
 [0036] Gly Ala Ser Pro Val Ala Glu Glu Asp Phe Leu Asp Gln Lys Leu Asn
 [0037] 195 200 205
 [0038] Asn Pro Val Arg Ser Leu Arg Asn Ser His Leu Gly Tyr Val Asn His
 [0039] 210 215 220
 [0040] Lys Asp Ile Arg Ile Ser Tyr Thr Ser Leu Lys Asp Tyr Val Asn Asp
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Leu Glu Asn Ala Val Lys Ser Gly Gln Leu Ile Ala Glu Lys Glu Phe		
[0043]		245	250 255
[0044]	Tyr Ser Pro Val Arg Leu Arg Gly Ser Lys Ala Cys Arg Asn Tyr Leu		
[0045]		260	265 270
[0046]	Glu Lys Gly Ile Thr Tyr Leu Glu Phe Arg Thr Phe Asp Leu Asn Pro		
[0047]		275	280 285
[0048]	Phe Ser Pro Ile Gly Ile Thr Gln Glu Thr Val Asp Thr Val His Leu		
[0049]		290	295 300
[0050]	Phe Leu Leu Ala Leu Leu Trp Ile Asp Ser Ser Ser His Ile Asp Gln		
[0051]		305	310 315 320
[0052]	Asp Ile Lys Glu Ala Asn Arg Leu Asn Asp Leu Ile Ala Leu Ser His		
[0053]		325	330 335
[0054]	Pro Leu Glu Lys Leu Pro Asn Gln Ala Pro Val Ser Asp Leu Val Asp		
[0055]		340	345 350
[0056]	Ala Met Gln Ser Val Ile Gln His Phe Asn Leu Ser Pro Tyr Tyr Gln		
[0057]		355	360 365
[0058]	Asp Leu Leu Glu Ser Val Lys Arg Gln Ile Gln Ser Pro Glu Leu Thr		
[0059]		370	375 380
[0060]	Val Ala Gly Gln Leu Leu Glu Met Ile Glu Gly Leu Ser Leu Glu Thr		
[0061]		385	390 395 400
[0062]	Phe Gly Gln Arg Gln Gly Gln Ile Tyr His Asp Tyr Ala Trp Glu Ala		
[0063]		405	410 415
[0064]	Pro Tyr Ala Leu Lys Gly Tyr Glu Thr Met Glu Leu Ser Thr Gln Leu		
[0065]		420	425 430
[0066]	Leu Leu Phe Asp Val Ile Gln Lys Gly Val Asn Phe Glu Val Leu Asp		
[0067]		435	440 445
[0068]	Glu Gln Asp Gln Phe Leu Lys Leu Trp His Asn Ser His Ile Glu Tyr		
[0069]		450	455 460
[0070]	Val Lys Asn Gly Asn Met Thr Ser Lys Asp Asn Tyr Ile Val Pro Leu		
[0071]		465	470 475 480
[0072]	Ala Met Ala Asn Lys Val Val Thr Lys Lys Ile Leu Asp Glu Lys His		
[0073]		485	490 495
[0074]	Phe Pro Thr Pro Phe Gly Asp Glu Phe Thr Asp Arg Lys Glu Ala Leu		
[0075]		500	505 510
[0076]	Asn Tyr Phe Ser Gln Ile Gln Asp Lys Pro Ile Val Val Lys Pro Lys		
[0077]		515	520 525
[0078]	Ser Thr Asn Phe Gly Leu Gly Ile Ser Ile Phe Lys Thr Ser Ala Asn		
[0079]		530	535 540
[0080]	Leu Ala Ser Tyr Glu Lys Ala Ile Asp Ile Ala Phe Thr Glu Asp Ser		
[0081]		545	550 555 560
[0082]	Ala Ile Leu Val Glu Glu Tyr Ile Glu Gly Thr Glu Tyr Arg Phe Phe		
[0083]		565	570 575

[0084]	Val Leu Glu Gly Asp Cys Ile Ala Val Leu Leu Arg Val Ala Ala Asn
[0085]	580 585 590
[0086]	Val Val Gly Asp Gly Ile His Thr Ile Ser Gln Leu Val Lys Leu Lys
[0087]	595 600 605
[0088]	Asn Gln Asn Pro Leu Arg Gly Tyr Asp His Arg Ser Pro Leu Glu Val
[0089]	610 615 620
[0090]	Ile Glu Leu Gly Glu Val Glu Gln Leu Met Leu Glu Gln Gln Gly Tyr
[0091]	625 630 635 640
[0092]	Thr Val Asn Ser Ile Pro Pro Glu Gly Thr Lys Ile Glu Leu Arg Arg
[0093]	645 650 655
[0094]	Asn Ser Asn Ile Ser Thr Gly Gly Asp Ser Ile Asp Val Thr Asn Thr
[0095]	660 665 670
[0096]	Met Asp Pro Thr Tyr Lys Gln Leu Ala Ala Glu Met Ala Glu Ala Met
[0097]	675 680 685
[0098]	Gly Ala Trp Val Cys Gly Val Asp Leu Ile Ile Pro Asn Ala Thr Gln
[0099]	690 695 700
[0100]	Ala Tyr Ser Lys Asp Lys Lys Asn Ala Thr Cys Ile Glu Leu Asn Phe
[0101]	705 710 715 720
[0102]	Asn Pro Leu Met Tyr Met His Thr Tyr Cys Gln Glu Gly Pro Gly Gln
[0103]	725 730 735
[0104]	Ser Ile Thr Pro Arg Ile Leu Ala Lys Leu Phe Pro Glu Leu
[0105]	740 745 750
[0106]	<210> 2
[0107]	<211> 2253
[0108]	<212> DNA
[0109]	<213> 人工序列()
[0110]	<400> 2
[0111]	atgattatcg atcgtctgct gcagcgcagt cacagccatc tccaatcct ccaagccacc 60
[0112]	ttcggctctgg agcgcgagag tctgctgatt caccagccga cccagcgcgt tgcgcaaacc 120
[0113]	ccacatccga aaacgctggg cagccgtaac taccaccgt acatccaaac ggactacagt 180
[0114]	gagccacagc tcgagctgat cacgccgatc gcgaaagata gccaaagaagc gatccgcttt 240
[0115]	ctgaaagcga ttagcgacgt ggccggccgc agcatcaacc acgatgaata tctgtggcca 300
[0116]	ctgagcatgc caccaaaagt gcgcgaagag gacatccaga ttgcgcagct cgaagatgcg 360
[0117]	ttcgagtagc actaccgcaa gtatctggag aagacctac gcaaactgat ccagagcatc 420
[0118]	agcggcatcc actacaatct gggctctggc caagagctgc tgacgagcct cttcgaactc 480
[0119]	agccaagcgg ataacgcgat cgacttccag aaccagctgt acatgaagct gagccagaat 540
[0120]	tttctgctgct accgctggct gctcacctat ctgtacgggtg cgagcccagt ggcggaagag 600
[0121]	gactttctgg accagaagct gaacaatcca gttegcagcc tccgcaacag ccatctgggc 660
[0122]	tatgtgaacc acaaagacat ccgcattagc tacaccagtc tgaaagacta tgtgaacgac 720
[0123]	ctcgaaaacg ccgtgaaaag tggccagctg atcgccgaga aggaattcta cagcccagtt 780
[0124]	cgtctgcgcg gcagcaaggc gtgtcgcaac tatctggaaa agggcatcac gtacctgaa 840
[0125]	ttccgcacct tcgatctgaa ccattcagc ccaatcgca tcaccaaga gacggttgac 900

[0126] accgttcatac tgtttctcct cgcgctgctg tggatcgata gcagtagcca catcgaccaa 960
 [0127] gatattaagg aggccaaccg tctgaacgat ctgattgcgc tgagtcaccc gctggaaaaa 1020
 [0128] ctcccaaatc aagccccagt tagcgatctg gttgatgcca tgcagagcgt gatccagcat 1080
 [0129] ttcaatctga gcccgtacta ccaagatctg ctggaaagcg tgaagcgcca gattcaaagc 1140
 [0130] ccagaactga cggttgccgg tcagctgctg gagatgatcg aaggtctgag cctcgagacc 1200
 [0131] ttcggtcagc gtcaaggcca gatctaccat gattatgcgt gggaggcccc atacgcgctc 1260
 [0132] aagggtatg aaaccatgga actgagcacc cagctgctcc tcttcgacgt gatccagaag 1320
 [0133] ggcgttaact tcgagtgct cgacgagca gatcaatttc tgaagctgtg gcacaacagc 1380
 [0134] catatcgagt acgtgaagaa tggcaacatg accagcaagg acaattatat cgtgccgctg 1440
 [0135] gcgatggcca acaaagtggg gacgaagaag attctggacg aaaagcactt cccgacgccg 1500
 [0136] ttcgcgatg agtttacgga ccgcaaagag gcgctgaatt acttcagcca gatccaagat 1560
 [0137] aagccgatcg tggtaagcc gaaaagcac aacttcggtc tgggtatcag catcttcaag 1620
 [0138] acgagtgcca atctggccag ttacgagaag gcgatcgata tcgcgttcac cgaggatagt 1680
 [0139] gcgatcctcg tggaggaata catcgaaggc accgagtacc gcttcttctg tctggagggt 1740
 [0140] gactgcattg cggttctgct gcgtgttccc gccaacgtgg tggcgatgg cattcatacg 1800
 [0141] atcagccagc tggtaagct gaagaatcag aaccactgc gtggctacga tcatcgcagt 1860
 [0142] ccaactggaag tgattgagct cggtaagtg gaacagctca tgctggagca gcaaggctac 1920
 [0143] accgtgaaca gcattccacc ggaaggcacc aaaattgagc tgcgtcgca cagtaacatc 1980
 [0144] agcaccggtg gtgacagcat cgatgtgacc aacacgatgg acccaaccta taagcagctg 2040
 [0145] gcccgggaaa tggccgaagc catgggtgcg tgggtttgcg gtgtggatct gatcattccg 2100
 [0146] aacgccagc aagcctacag caaggataag aagaacgca cgtgcatcga gctgaacttc 2160
 [0147] aaccgctga tgtacatgca cacctactgt caagaagtc cgggccagag tattaccccg 2220
 [0148] cgtattctgg ccaagctggt cccagaactc taa 2253
 [0149] <210> 3
 [0150] <211> 750
 [0151] <212> PRT
 [0152] <213> 人工序列()
 [0153] <400> 3
 [0154] Met Ile Ile Asp Arg Leu Leu Gln Arg Ser His Ser His Leu Pro Ile
 [0155] 1 5 10 15
 [0156] Leu Gln Ala Thr Phe Gly Leu Glu Arg Glu Ser Leu Arg Ile His Gln
 [0157] 20 25 30
 [0158] Pro Thr Gln Arg Val Ala Gln Thr Pro His Pro Lys Thr Leu Gly Asn
 [0159] 35 40 45
 [0160] Arg Asn Tyr His Pro Tyr Ile Gln Thr Asp Tyr Ser Glu Pro Gln Leu
 [0161] 50 55 60
 [0162] Glu Leu Ile Thr Pro Ile Ala Lys Asp Ser Gln Glu Ala Ile Arg Phe
 [0163] 65 70 75 80
 [0164] Leu Lys Ala Ile Ser Asp Val Ala Gly Arg Ser Ile Asn His Asp Glu
 [0165] 85 90 95
 [0166] Tyr Leu Trp Pro Leu Ser Met Pro Pro Lys Val Arg Glu Glu Asp Ile
 [0167] 100 105 110

[0168]	Gln Ile Ala Gln Leu Glu Asp Ala Phe Glu Tyr Asp Tyr Arg Lys Tyr
[0169]	115 120 125
[0170]	Leu Glu Lys Thr Tyr Gly Lys Leu Ile Gln Ser Ile Ser Gly Ile His
[0171]	130 135 140
[0172]	Tyr Asn Leu Gly Leu Gly Gln Glu Leu Leu Thr Ser Leu Phe Glu Leu
[0173]	145 150 155 160
[0174]	Ser Gln Ala Asp Asn Ala Ile Asp Phe Gln Asn Gln Leu Tyr Met Lys
[0175]	165 170 175
[0176]	Leu Ser Gln Asn Phe Leu Arg Tyr Arg Trp Leu Leu Thr Tyr Leu Tyr
[0177]	180 185 190
[0178]	Gly Ala Ser Pro Val Ala Glu Glu Asp Phe Leu Asp Gln Glu Leu Asn
[0179]	195 200 205
[0180]	Asn Pro Val Arg Ser Leu Arg Asn Ser His Leu Gly Tyr Val Asn His
[0181]	210 215 220
[0182]	Lys Asp Ile Arg Ile Ser Tyr Thr Ser Leu Lys Asp Tyr Val Asn Asp
[0183]	225 230 235 240
[0184]	Leu Glu Asn Ala Val Lys Ser Gly Gln Leu Ile Ala Glu Lys Glu Phe
[0185]	245 250 255
[0186]	Tyr Ser Pro Val Arg Leu Arg Gly Ser Lys Ala Cys Arg Asn Tyr Leu
[0187]	260 265 270
[0188]	Glu Lys Gly Ile Thr Tyr Leu Glu Phe Arg Thr Phe Asp Leu Asn Pro
[0189]	275 280 285
[0190]	Phe Ser Pro Ile Gly Ile Thr Gln Glu Thr Val Asp Thr Val His Leu
[0191]	290 295 300
[0192]	Phe Leu Leu Ala Leu Leu Trp Ile Asp Ser Ser Ser His Ile Asp Gln
[0193]	305 310 315 320
[0194]	Asp Ile Lys Glu Ala Asn Arg Leu Asn Asp Leu Ile Ala Leu Ser His
[0195]	325 330 335
[0196]	Pro Leu Glu Lys Leu Pro Asn Gln Ala Pro Val Ser Asp Leu Val Asp
[0197]	340 345 350
[0198]	Ala Met Gln Ser Val Ser Gln His Phe Asn Leu Ser Pro Tyr Tyr Gln
[0199]	355 360 365
[0200]	Asp Leu Leu Glu Ser Val Lys Arg Gln Ile Gln Ser Pro Glu Leu Thr
[0201]	370 375 380
[0202]	Val Ala Gly Gln Leu Leu Glu Met Ile Glu Gly Leu Ser Leu Glu Thr
[0203]	385 390 395 400
[0204]	Phe Gly Gln Arg Gln Gly Gln Ile Tyr His Asp Tyr Ala Trp Glu Ala
[0205]	405 410 415
[0206]	Pro Tyr Ala Leu Lys Gly Tyr Glu Thr Met Glu Leu Ser Thr Gln Leu
[0207]	420 425 430
[0208]	Leu Leu Phe Asp Val Ile Gln Lys Gly Val Asn Phe Glu Val Leu Asp
[0209]	435 440 445

[0210]	Glu Gln Asp Gln Phe Leu Lys Leu Trp His Asn Ser His Ile Glu Tyr
[0211]	450 455 460
[0212]	Val Lys Asn Gly Asn Met Thr Ser Lys Asp Asn Tyr Ile Val Pro Leu
[0213]	465 470 475 480
[0214]	Ala Met Ala Asn Lys Val Val Thr Lys Lys Ile Leu Asp Glu Lys His
[0215]	485 490 495
[0216]	Phe Pro Thr Pro Phe Gly Asp Glu Phe Thr Asp Arg Lys Glu Ala Leu
[0217]	500 505 510
[0218]	Asn Tyr Phe Ser Gln Ile Gln Asp Lys Pro Ile Val Val Lys Pro Lys
[0219]	515 520 525
[0220]	Ser Thr Asn Phe Gly Leu Gly Ile Ser Ile Phe Gln Thr Ser Ala Asn
[0221]	530 535 540
[0222]	Leu Ala Ser Tyr Glu Lys Ala Ile Asp Ile Ala Phe Thr Glu Asp Ser
[0223]	545 550 555 560
[0224]	Ala Ile Leu Val Glu Glu Tyr Ile Glu Gly Thr Glu Tyr Arg Phe Phe
[0225]	565 570 575
[0226]	Val Leu Glu Gly Asp Cys Ile Ala Val Leu Leu His Val Ala Ala Asn
[0227]	580 585 590
[0228]	Val Val Gly Asp Gly Ile His Thr Ile Ser Gln Leu Val Lys Leu Lys
[0229]	595 600 605
[0230]	Asn Gln Asn Pro Leu Arg Gly Tyr Asp His Arg Ser Pro Leu Glu Val
[0231]	610 615 620
[0232]	Ile Glu Leu Gly Glu Val Glu Gln Leu Met Leu Glu Gln Gln Gly Tyr
[0233]	625 630 635 640
[0234]	Thr Val Asn Ser Ile Pro Pro Glu Gly Thr Lys Ile Glu Leu Arg Arg
[0235]	645 650 655
[0236]	Asn Ser Asn Ile Ser Thr Gly Gly Asp Ser Ile Asp Val Thr Asn Thr
[0237]	660 665 670
[0238]	Met Asp Pro Thr Tyr Lys Gln Leu Ala Ala Glu Met Ala Glu Ala Met
[0239]	675 680 685
[0240]	Gly Ala Trp Val Cys Gly Val Asp Leu Ile Ile Pro Asn Ala Thr Gln
[0241]	690 695 700
[0242]	Ala Tyr Ser Lys Asp Lys Lys Asn Ala Thr Cys Ile Glu Leu Asn Phe
[0243]	705 710 715 720
[0244]	Asn Pro Leu Met Tyr Met His Thr Tyr Cys Gln Glu Gly Pro Gly Gln
[0245]	725 730 735
[0246]	Ser Ile Thr Pro Arg Ile Leu Ala Lys Leu Phe Pro Glu Leu
[0247]	740 745 750
[0248]	<210> 4
[0249]	<211> 2253
[0250]	<212> DNA
[0251]	<213> 人工序列()

[0252] <400> 4
[0253] atgattatcg atcgtctgct gcagcgcagt cacageccatc tccaatcct ccaagccacc 60
[0254] ttcggtctgg agcgcgagag tctgcgtatt caccagccga cccagcgcgt tgcgcaaacc 120
[0255] ccacatccga aaacgctggg caaccgtaac taccaccctg acatccaaac ggactacagt 180
[0256] gagccacagc tcgagctgat cacgccgatc gcgaaagata gccaaagaagc gatccgcttt 240
[0257] ctgaaaagcga ttagcgacgt ggccggccgc agcatcaacc acgatgaata tctgtggcca 300
[0258] ctgagcatgc caccaaaaagt gcgcgaagag gacatccaga ttgcgcagct cgaagatgcg 360
[0259] ttcagtagc actaccgcaa gtatctggag aagacctac gcaaactgat ccagagcatc 420
[0260] agcggcatcc actacaatct gggctctggc caagagctgc tgacgagcct cttcgaactc 480
[0261] agccaagcgg ataacgcgat cgacttcag aaccagctgt acatgaagct gagccagaat 540
[0262] tttctgcgt accgctggct gctcacctat ctgtacggtg cgagcccagt ggcggaagag 600
[0263] gactttctgg accaggagct gaacaatcca gttcgcagcc tccgcaacag ccatctgggc 660
[0264] tatgtgaacc acaaagacat ccgattagc tacaccagtc tgaaagacta tgtgaacgac 720
[0265] ctgaaaacg ccgtgaaaag tggccagctg atcgcgaga aggaattcta cagcccagtt 780
[0266] cgtctgcgcg gcagcaagc gtgtcgaac tatctggaaa agggcatcac gtacctgaa 840
[0267] ttccgcacct tcgatctgaa cccattcagc ccaatcgca tcaccaaga gacggttgac 900
[0268] accgttcac tgtttctcct cgcgctgctg tggatcgata gcagtagcca catcgacca 960
[0269] gatattaagg agccaaccg tctgaacgat ctgattgctc tgagtcacc gctggaaaa 1020
[0270] ctccaaaatc aagccccagt tagcgatctg gttgatgcca tgcagagcgt gagccagcat 1080
[0271] ttcaatctga gccctacta ccaagatctg ctggaaagcg tgaagcgca gattcaaagc 1140
[0272] ccagaactga cggttgccg tcagctgctg gagatgatcg aaggtctgag cctcgagacc 1200
[0273] ttcggtcagc gtcaaggcca gatctacat gattatgctg gggaggcccc atacgcgctc 1260
[0274] aaggctatg aaaccatgga actgagcacc cagctgctc tcttcgacgt gatccagaag 1320
[0275] ggcgttaact tcgagtgct cgacgagca gatcaattc tgaagctgtg gcacaacagc 1380
[0276] catatcgagt acgtgaagaa tggcaacatg accagcaagg acaattatat cgtgccgctg 1440
[0277] gcgatggcca acaaagtgtgac gacgaagaag attctggacg aaaagcactt cccgacgccg 1500
[0278] ttcgccgatg agtttacgga ccgcaaagag gcgctgaatt acttcagcca gatccaagat 1560
[0279] aagccgatcg tggtaagcc gaaaagcacg aacttcgctc tgggtatcag catcttcag 1620
[0280] acgagtgcca atctggccag ttacgagaag gcgatcgata tcgcgttcac cgaggatagt 1680
[0281] gcgatcctcg tggaggaata catcgaagc accgagtacc gcttcttctg tctggagggt 1740
[0282] gactgcattg cgttctgct gcatgttgc gccaacgtgg tggcgatgg cattcatac 1800
[0283] atcagccagc tggtaagct gaagaatcag aaccactgc gtggctacga tcatcgctg 1860
[0284] ccaactggaag tgattgagct cggtaagtg gaacagctca tgctggagca gcaaggctac 1920
[0285] accgtgaaca gcattccacc ggaaggcacc aaaattgagc tgcgtcgca cagtaacatc 1980
[0286] agcaccggtg gtgacagcat cgatgtgacc aacacgatgg acccaaccta taagcagctg 2040
[0287] gccgcgaaa tggccaagc catgggtgctg tgggtttgct gtgtggatct gatcattccg 2100
[0288] aagccacgc aagcctacag caaggataag aagaacgca cgtgcatcga gctgaacttc 2160
[0289] aaccgctga tgtacatgca cacctactgt caagaagtc cgggccagag tattaccceg 2220
[0290] cgtattctgg ccaagctgtt cccagaactc taa 2253