



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111172140 A

(43)申请公布日 2020.05.19

(21)申请号 202010071083.9

C12N 11/082(2020.01)

(22)申请日 2020.01.21

C12P 13/00(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

(71)申请人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路
18号

(72)发明人 薛亚平 熊能 吕佩锦 郑裕国

(74)专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 李世玉

(51) Int. Cl.

C12N 9/78(2006.01)

C12N 15/55(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 11/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表11页 附图4页

(54)发明名称

一种腈水解酶突变体及其在制备抗癫痫药
物中间体中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种腈水解酶突变体及其在制备抗癫痫药物中间体中的应用,所述突变体是将SEQ ID No.2所示氨基酸序列的第151位,第223位和第250位氨基酸中的一位或多位进行突变获得的。本发明腈水解酶突变体AcN-T151V/C223A/C250G的热稳定性提高了1.73倍,且利用含有腈水解酶突变体的重组大肠杆菌在35℃下水解1M 1-氰基环己基乙腈生成1-氰基环己基乙酸,最终产物得率达95%。在35℃下水解1.2M 1-氰基环己基乙腈时,最终产率达97%。使用本发明腈水解酶突变体合成加巴喷丁,最终产率达80%。

1. 一种脲水解酶突变体,其特征在於所述突变体是将SEQ ID No.2所示氨基酸序列的第151位,第223位和第250位氨基酸中的一位或多位进行突变获得的。

2. 如权利要求1所述脲水解酶突变体,其特征在於所述突变体为下列之一:(1)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列的第151位苏氨酸突变为缬氨酸;(2)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列第223位半胱氨酸突变为丙氨酸;(3)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列第250位半胱氨酸突变为甘氨酸;(4)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列第151位的苏氨酸突变为缬氨酸,同时将第223位半胱氨酸突变为丙氨酸和第250位半胱氨酸突变为甘氨酸。

3. 一种权利要求1所述脲水解酶突变体的编码基因。

4. 一种权利要求1所述脲水解酶突变体在催化1-氰基环己基乙脲制备1-氰基环己基乙酸中的应用。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在於所述的应用以含脲水解酶突变体编码基因工程菌经发酵培养获得的湿菌体、湿菌体固定化细胞或者湿菌体超声破碎后提取的纯酶为催化剂,以1-氰基环己基乙脲为底物,以pH=7.0、200mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液为反应介质构成反应体系,在25-50℃恒温水浴中反应,反应完全后,将反应液分离纯化,获得1-氰基环己基乙酸。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在於所述底物终浓度以缓冲液体积计为100~1200mM,所述催化剂用量以湿菌体重量计为10~100g/L缓冲液。

7. 如权利要求5所述的应用,其特征在於所述反应温度为35℃。

8. 如权利要求5所述的应用,其特征在於所述湿菌体按如下方法制备:将含脲水解酶突变体编码基因工程菌接种到LB培养基中,37℃培养10-12小时,按体积浓度2%的接种量接种至含终浓度50mg/L卡那霉素的LB培养基,37℃培养至培养液的OD₆₀₀为0.6-0.8之间,加入终浓度为0.1mM异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷,28℃诱导培养10小时,离心,收集菌体,用生理盐水清洗2次,得到湿菌体。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在於所述纯酶按如下方法制备:(1)将湿菌体用含终浓度300mM NaCl的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液重悬,超声波破碎(400W,25min,1s破碎1s暂停),破碎产物离心(12000rpm,10min)后,取上清液作为粗酶液;所述超声波破碎是在400W下25min,1s破碎1s暂停;(2)将粗酶液以1mL/min的流速通过经平衡缓冲液冲洗的Ni-NTA柱,用洗脱缓冲液洗脱弱吸附的杂蛋白,流速为2mL/min;再用蛋白洗脱缓冲液洗脱并收集目的蛋白,流速为2mL/min;最后将收集的目的蛋白以50mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液为透析液进行透析,取截留液即为纯酶;所述平衡缓冲液为含终浓度300mM NaCl的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液;所述洗脱缓冲液为含终浓度300mM NaCl和50mM咪唑的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液;所述蛋白洗脱缓冲液为含终浓度300mM NaCl和250mM咪唑的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液。

10. 如权利要求8所述的应用,其特征在於湿菌体固定化细胞按如下方法制备:将湿菌体悬浮于pH=7.0、200mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系中,加入终浓度6mg/mL硅藻土,室温搅拌1h,随后加入质量浓度5%聚乙烯亚胺水溶液,室温搅拌1h;最后加入质量浓度25%戊二醛水溶液,搅拌0.5h,真空抽滤,获得固定化细胞;所述聚乙烯亚胺水溶液体积加入量以缓冲液体积计为3%,所述戊二醛水溶液体积加入量以缓冲液体积计为1%。

一种腈水解酶突变体及其在制备抗癫痫药物中间体中的应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种来源于敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*) CCTCC NO:M 209044 腈水解酶的突变体及其在抗癫痫药物中间体1-氰基环己基乙酸合成中的应用。

(二) 背景技术

[0002] 加巴喷丁是由美国Warner-Lambert公司首先开发的一种新型的抗癫痫药。与目前市场上同类药品相比,其优点有口服吸收快,毒副作用小,治疗效果明显以及耐受性强,在体内不易与血浆蛋白结合,不诱导肝酶,不代谢等特点,能够穿过人体大脑的血脑屏障,与其他抗癫痫药物相互作用的可能性小,作为难治性癫痫病的叠加用药作用效果尤为突出。

[0003] 1-氰基环己基乙酸是合成抗癫痫药物加巴喷丁的关键中间体,目前在市场上应用前景广阔。目前工业上合成加巴喷丁及关键中间体1-氰基环己基乙酸全部采用化学合成法,生产过程中存在反应条件苛刻,环境污染严重,废弃物处理成本高等问题。

[0004] 腈水解酶(Nitrilase EC 3.5.5.1)是一类能将腈类物质(含有-CN)直接水解为相应的羧酸的酶。腈水解酶的催化反应具有高立体选择性,催化速率高,反应条件温和以及对环境污染小等特点,是一种对环境友好的绿色合成方法,对节能减排和建设和谐社会具有重要的现实意义。目前工业上应用的腈水解酶案例很多,如德国BASF公司的产品(R)-扁桃酸,首先由苯甲醛和氢氰酸反应生成外消旋扁桃腈,再选择合适的反应条件,通过腈水解酶催化的动力学拆分,可以定量地转化为(R)-扁桃酸。亚甲基戊二腈首先用固定化的含腈水解酶的微生物细胞催化剂(*Acidovorax facilis* 72W)水解为4-氰基戊酸(4-CPA)铵盐,水解反应的选择性大于98%,转化率为100%,能得到二分之一氰基羧酸铵盐,产生1~2%的唯一反应副产物2-甲基戊二酸二铵盐。由此可得化学-酶法生产工艺相较于传统化学法相比产量提高、减少浪费、立体选择性高。此外,还有许多腈水解酶已经被开发并用于多种药物中间体和精细化学品的合成工艺中。

[0005] 但是,天然的腈水解酶普遍不耐热,这个缺点阻碍了其在工业上的应用。提高酶的热稳定性可以通过对酶进行分子改造或半理性设计等方式实现。由于腈水解酶的晶体结构报道较少,关于腈水解酶的热稳定性改造也较少。Crum和Benedik等人多年来研究来源于短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)的Cyanidedihydratase ($CynD_{pum}$)的温度稳定性。研究者首先利用易错PCR,筛选出了多个正向突变株(K93R,D172N和E327K),随后将施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)Cyanidedihydratase ($CynD_{stu}$)的C端与 $CynD_{pum}$ 融合,提高了其温度稳定性(*Frontiers in Microbiology* 2016Aug12;7:1264.)。Xu等人通过易错PCR对AcN基因的随机诱变,最终得到三种突变体(AcN-T201L,AcN-Q339K,AcN-Q343K)表现出较高的热稳定性。将纯酶于45℃下保温,取样测酶活,计算其半衰期,发现多重突变体AcN-T201F/Q339K/Q343K半衰期从12.5h提高到180h(*Enzyme and Microbial Technology* 113(2018) 52-58)。从敏捷食酸菌(*Acidovorax facilis*) CCTCC NO:M 209044克隆的腈水解酶已经在 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中过量表达,通过分子改造,对底物1-氰基环己基乙酸具有较高的催化活力,能够高效催化1-氰基环己基乙腈生成1-氰基环己基乙酸

(Catalysis Communications, 2015, 66, 121-125)。由于在温度较高的条件下底物1-氰基环己基乙腈的溶解度较高,能够促进催化反应,但是催化剂酶的热稳定性较差,在高温条件下催化活力较低,因此现有的腈水解酶不能满足要求,需要通过分子改造的方法来提高腈水解酶的热稳定性,从而提高催化效率,实现工业生产。

(三) 发明内容

[0006] 本发明目的是提供一种热稳定性提高的腈水解酶突变体蛋白及其在1-氰基环己基乙酸合成中的应用,包括含有该基因的重组载体,以及重组载体转化得到的重组基因工程菌,解决了来源于敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*) CCTCC NO:M 209044腈水解酶温度稳定性较差的问题。

[0007] 本发明采用的技术方案是:

[0008] 本发明提供一种热稳定性提高的腈水解酶突变体,所述突变体是将SEQ ID No.2所示氨基酸序列的第151位,第223位和第250位氨基酸中的一位或多位进行突变获得的。

[0009] 进一步,优选所述腈水解酶突变体为下列之一:(1)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列的第151位苏氨酸突变为缬氨酸(T151V),氨基酸序列为SEQ ID No.4所示,编码基因核苷酸序列为SEQ ID No.3所示;(2)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列第223位半胱氨酸突变为丙氨酸(C223A),氨基酸序列为SEQ ID No.6所示,编码基因核苷酸序列为SEQ ID No.5所示;(3)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列第250位半胱氨酸突变为甘氨酸(C250G),氨基酸序列为SEQ ID No.8所示,编码基因核苷酸序列为SEQ ID No.7所示;(4)将SEQ ID No.2所示氨基酸序列第151位的苏氨酸突变为缬氨酸,同时将第223位半胱氨酸突变为丙氨酸和第250位半胱氨酸突变为甘氨酸,氨基酸序列为SEQ ID No.10所示,编码基因核苷酸序列为SEQ ID No.9所示。

[0010] 本发明又提供了一种包含所述腈水解酶突变体编码基因的工程菌。

[0011] 在本发明腈水解酶突变体的制备方法中,可以采用任何适当的载体。例如,适当的载体包括但不限于原核表达载体pET28、pET20、pGEX4T1、pTrc99A和pBV220;包括但不限于真核表达载体pPIC9K、pPICZ α 、pYD1和pYES2/GS;包括但不限于克隆载体pUC18/19和pBluscript-SK。

[0012] 本发明又提供一种所述腈水解酶突变体在合成抗癫痫药物中间体中的应用,具体为一种所述腈水解酶突变体在催化1-氰基环己基乙腈制备1-氰基环己基乙酸中的应用,所述的应用以含腈水解酶突变体编码基因工程菌经发酵培养获得的湿菌体、湿菌体固定化细胞或者湿菌体超声破碎后提取的纯酶为催化剂,以1-氰基环己基乙腈为底物,以pH=7.0、200mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液为反应介质构成反应体系,在25-50℃(优选35℃)恒温水浴中反应,反应完全后,将反应液分离纯化,获得1-氰基环己基乙酸。

[0013] 所述底物终浓度以缓冲液体积计为100~1200mM(优选1000-1200mM),所述催化剂用量以湿菌体重量计为10~100g/L缓冲液,优选50g/L。

[0014] 进一步,所述湿菌体按如下方法制备:将含腈水解酶突变体编码基因工程菌接种到LB培养基中,37℃培养10-12小时,按体积浓度2%的接种量接种至含终浓度50mg/L卡那霉素的LB培养基,37℃培养至培养液的OD₆₀₀为0.6-0.8之间,加入终浓度为0.1mM异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷,28℃诱导培养10小时,离心,收集菌体,用生理盐水清洗2次,得到湿

菌体。

[0015] 进一步,所述纯酶按如下方法制备:(1)将湿菌体用含终浓度300mM NaCl的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液重悬,超声波破碎(400W,25min,1s破碎1s暂停),破碎产物离心(12000rpm,10min)后,取上清液作为粗酶液;所述超声波破碎是在400W下25min,1s破碎1s暂停;(2)将粗酶液以1mL/min的流速通过经平衡缓冲液冲洗的Ni-NTA柱,用洗脱缓冲液洗脱弱吸附的杂蛋白,流速为2mL/min;再用蛋白洗脱缓冲液洗脱并收集目的蛋白,流速为2mL/min;最后将收集的目的蛋白以50mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液为透析液进行透析,取截留液即为纯酶;所述平衡缓冲液为含终浓度300mM NaCl的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液;所述洗脱缓冲液为含终浓度300mM NaCl和50mM咪唑的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液;所述蛋白洗脱缓冲液为含终浓度300mM NaCl和250mM咪唑的pH 8.0、50mM NaH₂PO₄缓冲液。

[0016] 进一步,湿菌体固定化细胞按如下方法制备:将湿菌体悬浮于pH=7.0、200mM磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系中,加入终浓度6mg/mL硅藻土,室温搅拌1h,随后加入质量浓度5%聚乙烯亚胺水溶液,室温搅拌1h;最后加入质量浓度25%戊二醛水溶液,搅拌0.5h,真空抽滤,获得固定化细胞;所述聚乙烯亚胺水溶液体积加入量以缓冲液体积计为3%,所述戊二醛水溶液体积加入量以缓冲液体积计为1%。

[0017] 本发明使用所述脘水解酶突变体作为催化剂进行催化合成1-氰基环己基乙酸,使用雷尼镍对1-氰基环己基乙酸进行化学催化加氢,合成加巴喷丁内酰胺,然后将加巴喷丁内酰胺水解,生成加巴喷丁。

[0018] 本发明具体所述的脘水解酶突变体为利用半理性设计方法及全质粒PCR技术,通过分子手段对SEQ ID No.1所示来源于敏捷食酸菌(*Acidovorax facilis*) CCTCC NO:M 209044脘水解酶编码基因菌株*E. coli* BL21 (DE3) /Pet28 (+)-AcN-M进行定点突变,诱导表达后筛选检出正突变子,然后得到温度稳定性进一步提高的突变体,是能在更耐热环境下催化双脘化合物区域选择性水解合成单氰基羧酸化合物的突变体蛋白。

[0019] 本发明具体所述的脘水解酶突变体作为催化剂的形式可以是含有所述脘水解酶突变体基因的重组表达转化体(即湿菌体,优选为大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)),也可以是未纯化的粗酶,也可以是经过部分纯化的或完全纯化后的酶,也可以是利用本领域已知的固定化技术将本发明的脘水解酶突变体制成的固定化酶或者固定化细胞。

[0020] 本发明所述LB液体培养基终浓度组成:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,溶剂为水,pH值自然。LB固体培养基终浓度组成:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,琼脂20g/L,溶剂为水,pH值自然。

[0021] 与现有技术相比,本发明的有益效果主要体现在:本发明经过半理性设计对蛋白质进行分子改造,脘水解酶突变体AcN-T151V/C223A/C250G的热稳定性提高了1.73倍,且利用含有脘水解酶突变体的重组大肠杆菌在35°C下水解1M 1-氰基环己基乙脘生成1-氰基环己基乙酸,最终产物得率达95%。在35°C下水解1.2M 1-氰基环己基乙脘时,最终产率达97%。使用本发明脘水解酶突变体合成加巴喷丁,最终产率达80%。因此,本发明所获得的突变体及应用为加巴喷丁的高效化学酶法合成奠定了基础。

(四)附图说明

[0022] 图1脘水解酶突变体蛋白纯化后的电泳图。泳道1为AcN-M,泳道2为AcN-T151V,泳

道3为AcN-C223A,泳道4为AcN-C250G,泳道5为AcN-T151V/C223A/C250G。

[0023] 图2脲水解酶突变体的活力比较。

[0024] 图3脲水解酶突变体在50℃下的热稳定性。

[0025] 图4含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌静息细胞的活力比较。

[0026] 图5含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌静息细胞50℃下温度稳定性。

[0027] 图6含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌静息细胞转化1M 1-氰基环己基乙脲时间比较曲线图。

[0028] 图7含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌静息细胞转化1.2M 1-氰基环己基乙脲时间比较曲线图。

[0029] 图8为1-氰基环己基乙酸高效液相色谱图。

(五) 具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0031] 所述LB液体培养基终浓度组成:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,溶剂为水,pH值自然。

[0032] LB固体培养基终浓度组成:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,琼脂20g/L,溶剂为水,pH值自然。

[0033] 实施例1:半理性设计及定点突变

[0034] 以含有克隆于敏捷食酸菌(*A. facilis*) CCTCC NO:M 209044脲水解酶基因AcN-M(核苷酸序列SEQ ID NO.1所示,编码蛋白氨基酸序列为SEQ ID NO.2所示)的pET-28b(+)-AcN-M质粒为模版,通过<http://kazlab.umn.edu/>计算能够提高热稳定性的位点,再进行全质粒定点突变(表1)PCR扩增。PCR反应体系(50μL):模版0.5~20ng,2×Phanta max Buffer 25μL,0.2mM dNTP,引物各0.2μM,Phanta Max Super-Fidelity DNAPolymerase 1μL,加水补至50μL。PCR条件:(1)95℃预变性3min;(2)95℃变性15s;(3)60℃退火15s;(4)72℃延伸5.5min,步骤(2)~(4)共30个循环;(5)最后72℃延伸10min,16℃保存。PCR产物经过琼脂糖凝胶电泳验证,利用DpnI消化后导入*E. coli* BL21 (DE3),涂布至含有50μg/mL卡那霉素的LB平板,得到单克隆,然后进行测序。根据测序结果,进一步做反应验证。

[0035] 表1引物设计表

引物名称	引物序列 (5' to 3')
R111L-F	AGGCAGCCTGTACCTGTCCCAGGTCTTTATCGA
R111L-R	GACAGGTACAGGCTGCCTGCCTCACGCTCGCTGTAA
T151V-F	CGGTACCGACTTTCTGGTGCATGACTTCGCATTTG
T151V-R	CAAATGCGAAGTCATGCACCAGAAAGTCGGTACCG
Q169P-F	GAAGTGTGCTGGGAGCACGTTCCGCCGCTGTCCAAATTCATG
Q169P-R	CATGAATTTGGACAGCGGGCGGAACGTGCTCCCAGCAGTTC
[0036] C223A-F	CCAAACCTTCGTTCTGGCGTCTACGCAGGTTATCG
C223V-R	CGATAACCTGCGTAGACGCCAGAACGAAGGTTTGG
C250G-F	CTGCCGCAGGGTGGCGGTTGGGCGC
C250G-R	GCGCCCAACCGCCACCCTGCGGCAG
D280P-F	GTATTCTGTACGCAGAAATCCCGCTGGAACAGATTCTGCTGG
D280P-R	CCAGCAGAATCTGTTCCAGCGGGATTCTGCGTACAGAATAC
L281P-F	CGCAGAAATCGATCCGGAACAGATTCTGC
L281P-R	GCAGAATCTGTTCCGGATCGATTTCTGCG

[0037] 利用液相色谱筛选验证,最终确定热稳定性提高突变体为T151V,C223A,C250G核苷酸序列分别为SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.7所示。并且,利用同样的方法,构建组合突变体T151V/C223A/C250G,其核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

[0038] 将上述突变体分别导入E.coli BL21 (DE3),构建突变体E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-T151V,E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-C223A,E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-C250G,和组合突变体E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-T151V/C223A/C250G,以及原始菌株E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-M。

[0039] 实施例2:脲水解酶突变体的表达

[0040] 实施例1中得到的突变体E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-T151V,E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-C223A,E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-C250G,和组合突变体E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-T151V/C223A/C250G,以及原始菌株E.coli BL21 (DE3) /pET28b (+)-AcN-M接种到LB培养基中,37℃培养10-12小时,按体积接种量2%接种至含有卡那霉素(终浓度50mg/L)的LB培养基,37℃扩大培养至培养液的OD₆₀₀为0.6-0.8之间,加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.1mM,28℃诱导培养10小时。培养液离心收集菌体,用生理盐水清洗2次,得到相应的湿菌体。

[0041] 实施例3:脲水解酶突变体蛋白的纯化

[0042] (1) 向实施例2中收集到的湿菌体中加入平衡缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl缓冲液,pH 8.0)重悬菌体后,超声波破碎(400W,25min,1s破碎1s暂停)。破碎产物离心(12000×g,10min),取上清液作为粗酶液,准备分离纯化。

[0043] (2) 预装好20mL Ni-NTA亲和层析柱后,使用平衡缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,pH 8.0)进行平衡,流速为2mL/min。

[0044] (3) 清洗8-10个柱体积后将所得到的粗酶液以1mL/min的流速通过Ni-NTA柱,目的蛋白则挂载在层析柱上。上样后大量未吸附的杂蛋白不与树脂结合,将直接被除去。

[0045] (4) 使用洗脱缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,50mM咪唑,pH 8.0)洗脱弱吸附的杂蛋白,流速为2mL/min。

[0046] (5) 使用蛋白洗脱缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,250mM咪唑,pH 8.0)洗脱并收集目的蛋白,流速为2mL/min。

[0047] (6) 收集的酶液使用透析袋(Economical Biotech Membrane,14KD,34mm Width,

购自生工生物工程(上海)股份有限公司),透析液为磷酸二氢钠-磷酸氢二钠(50mM,pH 7.0)缓冲液,取截留液即为纯化后的蛋白,获得相应的纯酶液。

[0048] (7)通过SDS-PAGE分析纯化后的蛋白,蛋白电泳结果如图1所示。

[0049] 实施例4:脲水解酶活力的测定

[0050] 对实施例3中纯化后的蛋白进行酶活的测定。脲水解酶活力检测反应体系(10mL):磷酸二氢钠-磷酸氢二钠(200mM,pH 7.0)缓冲液,200mM 1-氰基环己基乙脲,0.4mg纯酶液。反应液于35℃预热10min后,180rpm反应10min。取样200μL上清,加入4μL6M的HCl终止反应后,利用液相色谱(岛津LC-16)外标法测定转化液1-氰基环己基乙酸转化率,1-氰基环己基乙酸高效液相色谱图见图8所示。

[0051] 色谱柱为J&KCHEMICA®C-18column(250mm×4.6mm,5μm),流动相为缓冲液(0.58g/L磷酸氢二铵,1.83g/L高氯酸钠,高氯酸调节pH为1.8,溶剂为去离子水):乙脲=76:24(v/v),流速为1mL/min,紫外检测波长215nm,柱温40℃。

[0052] 酶活定义(U):在35℃、pH 7.0,200mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液条件下,每分钟催化生成1μmol 1-氰基环己基乙酸所需要的酶量定义为1U。经检测,突变体AcN-T151V和突变体AcN-C223A的相对活力分别是原始脲水解酶AcN-M的1.17和1.31倍,突变体AcN-C250G和组合突变体AcN-T151V/C223A/C250G的初始活力与原始脲水解酶AcN-M相比仅有90.38%和84.71%,结果见图2所示。

[0053] 实施例5:脲水解酶突变体50℃下温度稳定性的测定

[0054] 对实施例3中纯化后的蛋白进行热稳定性的测定。取一定量的蛋白于50mL无菌聚丙烯离心管中,保存于50℃恒温水浴锅中。于不同时间取出蛋白,按照实施例4的方法,测定蛋白的活力。以未保存时,蛋白的活力为对照,计算各时间下,蛋白的相对残余活力(Residual activity,简称RA)。以时间(h)为横坐标,相对残余活力的自然对数(Ln(RA))为纵坐标,进行线性拟合(结果见图3),得出斜率k。根据一级失活动力学的公式 $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$,可以得到酶蛋白的半衰期 $t_{1/2}$ 。

[0055] 经测定,原始脲水解酶AcN-M的半衰期为13.6h,突变体AcN-T151V的半衰期为14h,突变体AcN-C223A的半衰期为14.2h,突变体AcN-C250G的半衰期为19.9h,组合突变体AcN-T151V/C223A/C250G的半衰期为23.6h,结果见表2所示。

[0056] 表2脲水解酶突变体在50℃下的半衰期

	脲水解酶	50℃下热稳定性(h)
	AcN-M	13.6±1.5
[0057]	AcN-T151V	14±2
	AcN-C223A	14.2±2
	AcN-C250G	19.9±2
	AcN-T151V/C223A/C250G	23.6±2

[0058] 实施例6:含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌活力的测定

[0059] 将实施例2中培养得到的含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌E.coli BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-T151V,E.coli BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-C223A,E.coli BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-C250G,和组合突变体E.coli BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-T151V/

C223A/C250G,以及原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M进行活力的测定。脲水解酶活力检测反应体系(10mL):磷酸二氢钠-磷酸氢二钠(200mM、pH 7.0)缓冲液,终浓度200mM 1-氰基环己基乙腈,重组大肠杆菌湿菌体10g/L。反应液于35℃预热10min后,180rpm反应10min。取样200μL上清,利用液相色谱(岛津LC-16)外标法测定转化液1-氰基环己基乙酸转化率。液相检测条件如实施例4中所述,经检测,含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V、*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-C223A和*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G的相对活力分别是原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M的1.02、1.32和1.54倍,而*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-C250G突变体的初始活力与原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M相比仅有86.9%,结果见图4所示。

[0060] 实施例7:含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌50℃下温度稳定性的测定

[0061] 将实施例2中培养得到的含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V,*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-C223A,*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-C250G,和组合突变体*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G,以及原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M静息细胞用磷酸二氢钠-磷酸氢二钠(200mM、pH 7.0)缓冲液配置成100g/L的菌悬液,保存于50℃恒温水浴锅中。于不同时间取出菌悬液,按照实施例6的方法,测定静息细胞的活力。以未保存时,静息细胞的活力为对照,计算各时间下,静息细胞在50℃下的相对残余活力,结果见图5所示。

[0062] 实施例9:使用含脲水解酶突变体的重组大肠杆菌转化1M 1-氰基环己基乙腈

[0063] 分别称取0.5g实施例2方法获得的组合突变体*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G,以及原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M的湿菌体悬浮于10mL磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系中(200mM,pH=7.0),加入1.48g 1-氰基环己基乙腈(终浓度1M),35℃恒温水浴反应。于不同时间取样,12000rpm离心,弃去沉淀,取上清用高效液相色谱分析产物浓度。高效液相色谱分析条件如实施例4中所述。

[0064] 经测定,如图6所示,突变体*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G在2h内几乎完全转化,转化速率远快于*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M。

[0065] 实施例10:使用含脲水解酶突变体的重组大肠杆菌转化1.2M 1-氰基环己基乙腈

[0066] 分别称取0.5g实施例2方法获得的组合突变体*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G,以及原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M的湿菌体悬浮于10mL磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系中(200mM,pH=7.0),加入1.78g 1-氰基环己基乙腈(终浓度1.2M),35℃恒温水浴反应。于不同时间取样,12000rpm离心,弃去沉淀,上清液用高效液相色谱分析产物浓度。高效液相色谱分析条件如实施例4中所述。

[0067] 经测定,如表3所示,突变体*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G可在4h内将底物反应完全,远优于*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b(+)-AcN-M,结果见图7所示。

[0068] 表3含有脲水解酶突变体的重组大肠杆菌静息细胞转化1.2M 1-氰基环己基乙腈

	菌株	反应温 度(°C)	反 应 时 间 (h)	产物得率 (%)
[0069]	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-M	35	4	95
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G	35	4	99

[0070] 实施例11:使用固定化细胞转化1M 1-氰基环己基乙腈

[0071] 分别称取2g实施例2方法获得的组合突变体*E. coli*

[0072] BL21 (DE3) /pET28b (+) -AcN-T151V/C223A/C250G, 以及原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b (+) -AcN-M湿菌体悬浮于20mL磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系中 (200mM, pH=7.0), 加入终浓度0.006g/mL硅藻土, 室温搅拌1h。随后加入质量浓度5%聚乙烯亚胺水溶液, 室温搅拌1h。最后加入质量浓度25%戊二醛水溶液, 搅拌0.5h, 真空抽滤, 获得固定化细胞; 其中聚乙烯亚胺水溶液体积加入量以缓冲液体积计为3%, 戊二醛水溶液体积加入量以缓冲液体积计为1%。

[0073] 取0.5g湿菌体所对应的固定化细胞悬浮于10mL磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系中 (200mM, pH=7.0), 加入1.48g 1-氰基环己基乙腈 (终浓度1M), 25°C恒温水浴反应。其中由原始菌株*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b (+) -AcN-M制得的固定化细胞每批次反应7-8小时, 由*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b (+) -AcN-T151V/C223A/C250G制得的固定化细胞, 每批反应时间4-6小时。每批反应结束后, 进行真空抽滤固液分离, 反应液用高效液相色谱分析产物浓度 (见实施例4), 固定化细胞则投入下一批次反应。结果如表4所示。

[0074] 表4使用固定化细胞转化1M 1-氰基环己基乙腈

	菌株	批次反应 时间 (h)	转化率 (%)	反应 批次
[0075]	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-M	7-8	≥99	5
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28b(+)-AcN-T151V/C223A/C250G	4-6	≥99	7

[0076] 实施例12:用絮凝法处理1-氰基环己基乙酸

[0077] 取实施例11中的转化液1.245kg加1%聚氯化铝絮凝4h, 再加1%硅藻土吸附2h, 用布氏漏斗抽滤获得滤液, 加入一定量的盐酸将pH调节到2.0左右, 后加入等体积的二氯甲烷在三口烧瓶中搅拌20min, 然后移入分液漏斗中, 静置10min左右进行分液, 取下层旋蒸, 并在烘箱中烘干, 最后得到固体1-氰基环己基乙酸158g。

[0078] 实施例13:用化学法将1-氰基环己基乙酸合成加巴喷丁

[0079] 取实施例12制备的1-氰基环己基乙酸固体78.3g先溶解在水里, 用氢氧化钠溶液调节pH到10左右, 1M浓度, 定容至470mL, 加入20%的雷尼镍催化剂。在110°C、2.0MPa、450rpm, 加氢条件下反应约4-5h。趁热过滤, 得到加氢转化液582.5g。将加氢转化液置于三口烧瓶中, 经盐酸调节pH到中性左右, 在100°C下加热高温回流4h左右, 再用二氯甲烷萃取、旋蒸、烘干, 最后得到加巴喷丁内酰胺固体56.3g。该步收率在81%左右。

[0080] 将15.3g加巴喷丁内酰胺溶于50ml的HCl溶液, 150rpm下加热回流4h, 自然冷却至室温, 并用二氯甲烷萃取未反应完全的加巴喷丁内酰胺, 水相在0-4°C条件下冷却1h, 之后过滤获得白色晶体, 在40°C下烘干获得加巴喷丁盐酸盐。母液回收循环利用。36.4g加巴喷丁在40°C下溶于50ml水, 之后加入12.5ml甲苯, 并用200g/L的碳酸钠调节pH至7.0-7.5, 搅

拌30min,之后用甲醇或异丙醇重结晶获得加巴喷丁纯品,母液循环用于下一次结晶提纯,最终加巴喷丁产率达80%。

序列表

<110> 浙江工业大学

<120> 一种腈水解酶突变体及其在制备抗癫痫药物中间体中的应用

<160> 10

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1134

<212> DNA

<213> 敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*)

<400> 1

```

atggtatcctt acaactccaa atttctgget gctaccgtac aggctgaacc ggtttggctg 60
gacgcggacg caactatcga taaatctatt ggtatcatcg aggaggcggc ccagaaaggt 120
gcgtctctga ttgccttccc ggaagtttcc atccctggtt acccgtattg ggcttggtg 180
ggtgacgtaa agtactccct gtccttcacc tcccgttacc acgaaaactc cctggaactg 240
ggtgacgacc gtatgcgccg tctgcaactg gctgcgcgtc gtaacaaaat cgcgctggtt 300
atgggttaca gcgagcgtga ggcaggcagc cgctacctgt cccaggtctt tatcgacgaa 360
cgtggtgaaa tcgttgctaa ccgtcgtaaa ctgaaaccaa ctcacgttga acgtacgatt 420
tatggtgaag gcaacggtac cgactttctg acgcatgact tcgcatttgg tcgtgttgg 480
ggtctgaact gctgggagca cgttcagccg ctgtccaaat tcatgatgta ctccctgggt 540
gaacaggtac acgtcgcttc ttggccggct atgtccccgc tgcaaccgga cgtgtttcaa 600
ttttccatcg aggctaagc gaccgtaacc cgctcctatg ctattgaagg ccaaaccttc 660
gttctgtgct ctacgcaggt tatcgggtccg tctgcaattg aaaccttctg tctgaacgat 720
gagcaacgtg cactgctgcc gcagggttgc ggttgggcgc gtatctacgg cccggacggc 780
agcgaactgg ccaagccgct ggctgaagac gcagagggta ttctgtacgc agaaatcgat 840
ctggaacaga ttctgctggc caaggctggc gctgatccgg ttggtcacta cagccgcct 900
gatgtcctgt ccgtgcagtt cgacccgctg aaccacacc cggtacaccg cattggtatc 960
gatggccgctc tggatgttaa cacgcgttcc cgtgtagaaa actttcgctc gcgtaaagca 1020
gcagaaaaag aacgtcaggc cagcaaactg ctgggcacga aactgtttga acagtctctg 1080
ctggcggagg agccggtacc agccaaactc gagcaccacc accaccacca ctga 1134

```

<210> 2

<211> 377

<212> PRT

<213> 敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*)

<400> 2

```

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

```

Ile	Glu	Glu	Ala	Ala	Gln	Lys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ala	Phe	Pro	Glu	35	40	45	
Val	Phe	Ile	Pro	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Trp	Ala	Trp	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	50	55	60	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Ser	Arg	Tyr	His	Glu	Asn	Ser	Leu	Glu	Leu	65	70	75	80
Gly	Asp	Asp	Arg	Met	Arg	Arg	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Asn	Lys	85	90	95	
Ile	Ala	Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Arg	Tyr	100	105	110	
Leu	Ser	Gln	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Arg	115	120	125	
Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly	130	135	140	
Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly	145	150	155	160
Gly	Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	His	Val	Gln	Pro	Leu	Ser	Lys	Phe	Met	Met	165	170	175	
Tyr	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Val	His	Val	Ala	Ser	Trp	Pro	Ala	Met	Ser	180	185	190	
Pro	Leu	Gln	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr	195	200	205	
Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Phe	Val	Leu	Cys	Ser	210	215	220	
Thr	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Phe	Cys	Leu	Asn	Asp	225	230	235	240
Glu	Gln	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Gln	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Arg	Ile	Tyr	245	250	255	
Gly	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Glu	260	265	270	
Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Leu	Ala	Lys	275	280	285	
Ala	Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Gly	His	Tyr	Ser	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	290	295	300	
Val	Gln	Phe	Asp	Pro	Arg	Asn	His	Thr	Pro	Val	His	Arg	Ile	Gly	Ile	305	310	315	320
Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Arg	Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Phe	Arg	325	330	335	
Leu	Arg	Lys	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ala	Ser	Lys	Arg	Leu	Gly				

35	40	45
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys		
50	55	60
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu		
65	70	80
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys		
85	90	95
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr		
100	105	110
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg		
115	120	125
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly		
130	135	140
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Val His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly		
145	150	160
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met		
165	170	175
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser		
180	185	190
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Phe Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr		
195	200	205
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser		
210	215	220
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp		
225	230	240
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr		
245	250	255
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu		
260	265	270
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys		
275	280	285
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser		
290	295	300
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile		
305	310	320
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg		
325	330	335
Leu Arg Lys Ala Ala Glu Lys Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly		
340	345	350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
 355 360 365

Lys Leu Glu His His His His His His
 370 375

<210> 5

<211> 1134

<212> DNA

<213> 敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*)

<400> 5

atggtatctt acaactccaa atttctggct gctaccgtac aggctgaacc ggtttggctg 60
 gacgcggacg caactatcga taaatctatt ggtatcatcg aggaggcggc ccagaaaggt 120
 gcgtctctga ttgccttccc ggaagtttcc atccctgggt acccgattg ggccctggctg 180
 ggtgacgtaa agtactccct gtccttcacc tcccgttacc acgaaaactc cctggaactg 240
 ggtgacgacc gtatgcgccg tctgcaactg gctgcgcgtc gtaacaaaat cgcgctgggt 300
 atgggttaca gcgagcgtga ggcaggcagc cgctacctgt cccaggcttt tatcgacgaa 360
 cgtggtgaaa tcgttgctaa ccgtcgtaaa ctgaaaccaa ctcacgttga acgtacgatt 420
 tatggtgaag gcaacggtag cgactttctg acgcatgact tcgcatttgg tcgtgttgggt 480
 ggtctgaact gctgggagca cgttcagccg ctgtccaaat tcatgatgta ctccctgggt 540
 gaacaggtag acgtcgcttc ttggccggct atgtccccgc tgcaaccgga cgtgtttcaa 600
 ttttccatcg aggctaatgc gaccgtaacc cgctcctatg ctattgaagg ccaaaccttc 660
 gttctggcgt ctacgcaggt tatcggctccg tctgcaattg aaaccttctg tctgaacgat 720
 gagcaacgtg cactgctgcc gcagggttgc ggttgggcgc gtatctacgg cccggacggc 780
 agcgaactgg ccaagccgct ggctgaagac gcagagggta ttctgtacgc agaaatcgat 840
 ctggaacaga ttctgctggc caaggctggc gctgatccgg ttggcacta cagccgcctt 900
 gatgtcctgt ccgtgcagtt cgaccgcgt aaccacacce cggtacaccg cattggtatc 960
 gatggccgctc tggatgttaa cacgcgttcc cgtgtagaaa actttcgcct gcgtaaagca 1020
 gcagaaaaag aacgtcaggc cagcaaactg ctgggcacga aactgtttga acagtctctg 1080
 ctggcggagg agccggtacc agccaaactc gagcaccacc accaccacca ctga 1134

<210> 6

<211> 377

<212> PRT

<213> 敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*)

<400> 6

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

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu
 65 70 75 80
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys
 85 90 95
 Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr
 100 105 110
 Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg
 115 120 125
 Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly
 130 135 140
 Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly
 145 150 155 160
 Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser
 180 185 190
 Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Phe Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr
 195 200 205
 Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Ala Ser
 210 215 220
 Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp
 225 230 235 240
 Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr
 245 250 255
 Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu
 260 265 270
 Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
 275 280 285
 Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
 290 295 300
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
 305 310 315 320
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
 325 330 335
 Leu Arg Lys Ala Ala Glu Lys Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
 340 345 350
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala

50	55	60
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu		
65	70	75
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys		
	85	90
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr		
	100	105
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg		
	115	120
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly		
	130	140
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly		
145	150	155
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met		
	165	170
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser		
	180	185
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Phe Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr		
	195	200
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser		
	210	215
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp		
225	230	235
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Gly Gly Trp Ala Arg Ile Tyr		
	245	250
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu		
	260	265
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys		
	275	280
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser		
	290	295
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile		
305	310	315
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg		
	325	330
Leu Arg Lys Ala Ala Glu Lys Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly		
	340	345
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala		
	355	360
		365

Lys Leu Glu His His His His His His

370

375

<210> 9

<211> 1134

<212> DNA

<213> 敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*)

<400> 9

```

atggtatctt acaactccaa atttctggct gctaccgtac aggctgaacc ggtttggctg 60
gacgcggacg caactatcga taaatctatt ggtatcatcg aggaggcggc ccagaaaggt 120
gcgtctctga ttgccttccc ggaagttttc atccctggtt acccgtattg ggcctggctg 180
ggtgacgtaa agtactccct gtccttcacc tcccgttacc acgaaaactc cctggaactg 240
ggtgacgacc gtatgcgccc tctgcaactg gctgcgcgtc gtaacaaaat cgcgctggtt 300
atgggttaca gcgagcgtga ggcaggcagc cgctacctgt cccaggctctt tatcgacgaa 360
cgtggtgaaa tcgttgctaa ccgtcgtaaa ctgaaaccaa ctcacgttga acgtacgatt 420
tatggtgaag gcaacggtac cgactttctg gtgcatgact tcgcatttgg tcgtgttggg 480
ggtctgaact gctgggagca cgttcagccg ctgtccaaat tcatgatgta ctccctgggt 540
gaacaggtag acgtcgcttc ttggccggct atgtccccgc tgcaaccgga cgtgtttcaa 600
ttttccatcg aggctaatgc gaccgtaacc cgctcctatg ctattgaagg ccaaaccttc 660
gttctggcgt ctacgcaggt tatcgggtccg tctgcaattg aaaccttctg tctgaacgat 720
gagcaacgtg cactgctgcc gcagggtggc ggttgggcgc gtatctacgg cccggacggc 780
agcgaactgg ccaagccgct ggctgaagac gcagagggta ttctgtacgc agaaatcgat 840
ctggaacaga ttctgctggc caaggctggc gctgatccgg ttggtcacta cagccgcctt 900
gatgtcctgt ccgtgcagtt cgaccgcgct aaccacacce cggtagaccg cattggtatc 960
gatggccgctc tggatgttaa cacgcgttcc cgtgtagaaa actttcgctt gcgtaaagca 1020
gcagaaaaag aacgtcaggc cagcaaactg ctgggcacga aactgtttga acagtctctg 1080
ctggcggagg agccggtacc agccaaactc gagcaccacc accaccacca ctga 1134

```

<210> 10

<211> 377

<212> PRT

<213> 敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*)

<400> 10

```

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
1           5           10           15
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile
           20           25           30
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu
           35           40           45
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys
           50           55           60

```


370

375

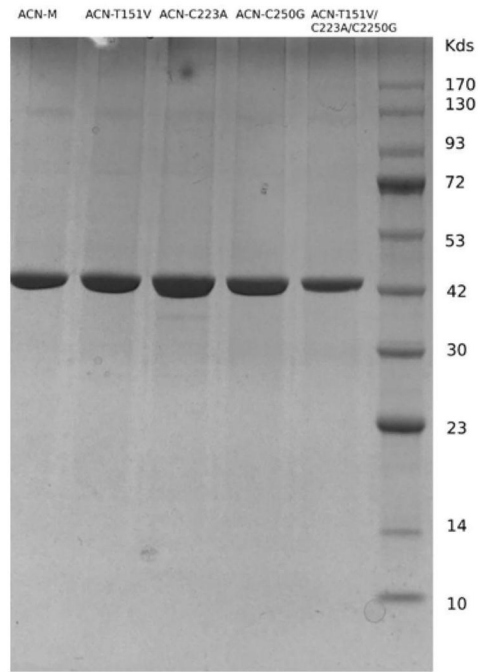


图1

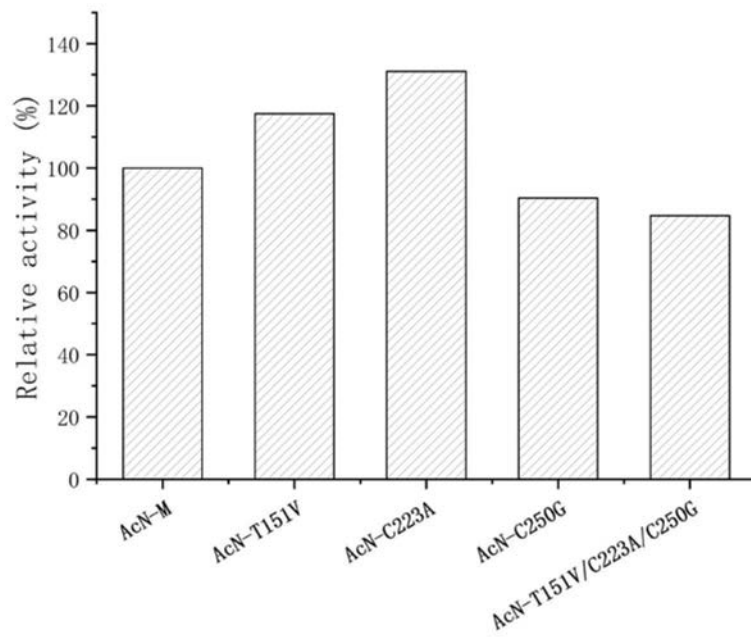


图2

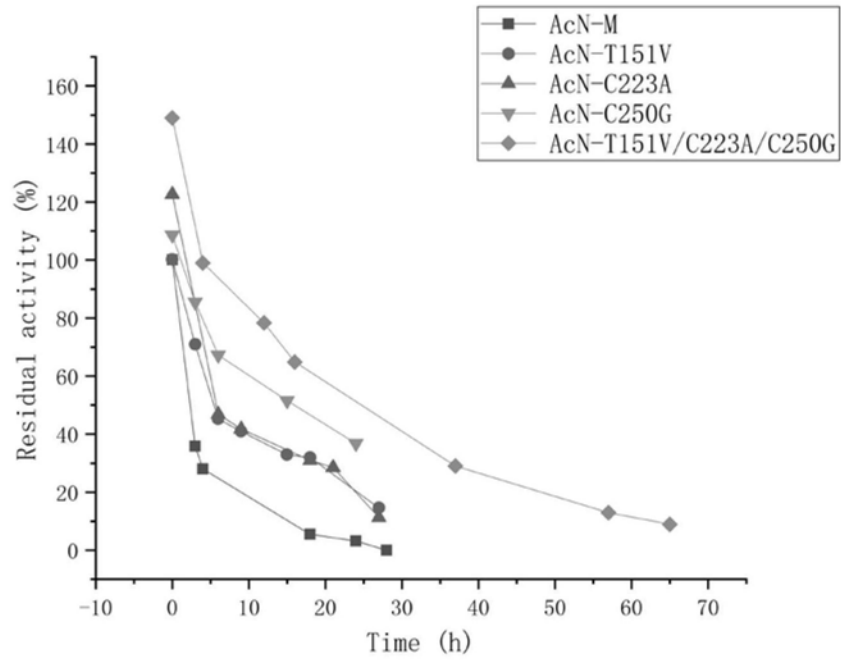


图3

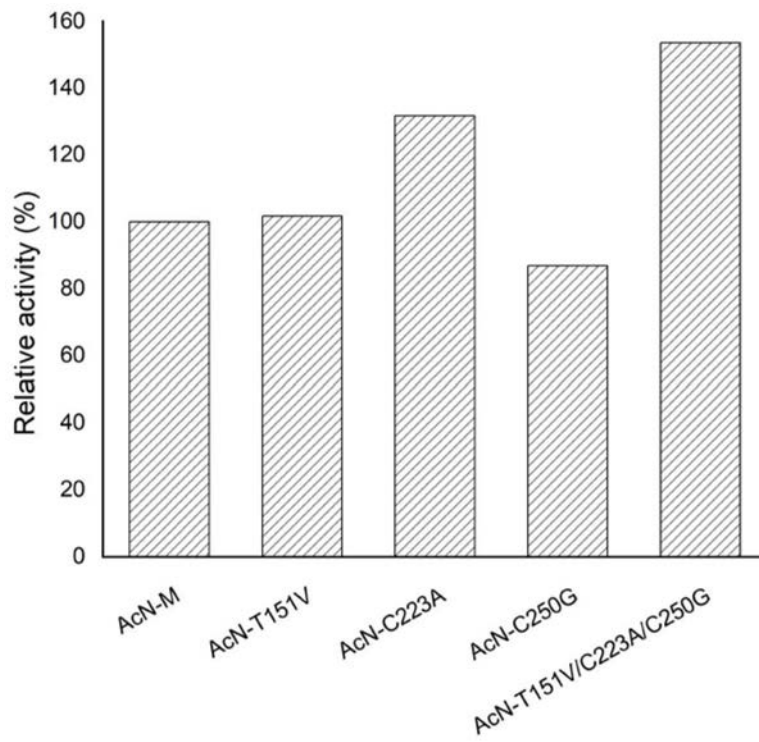


图4

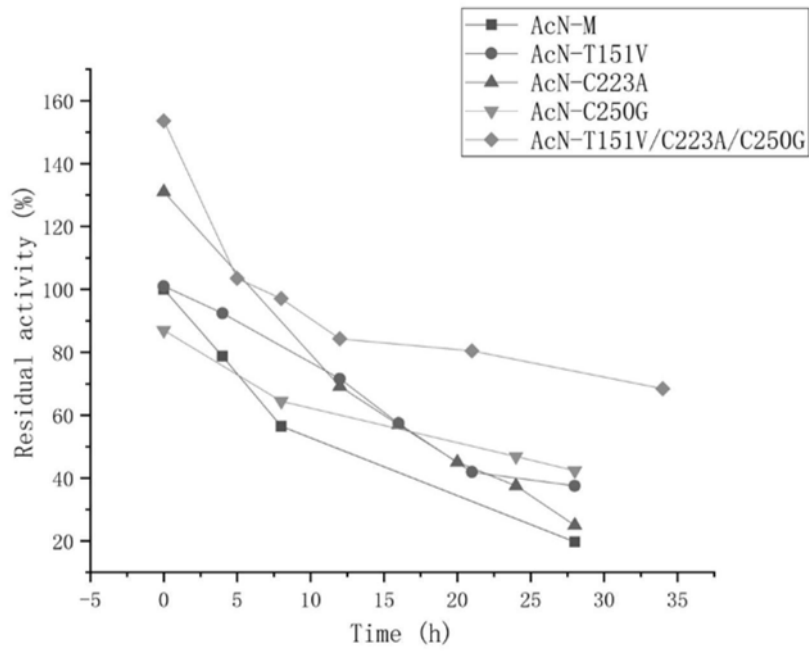


图5

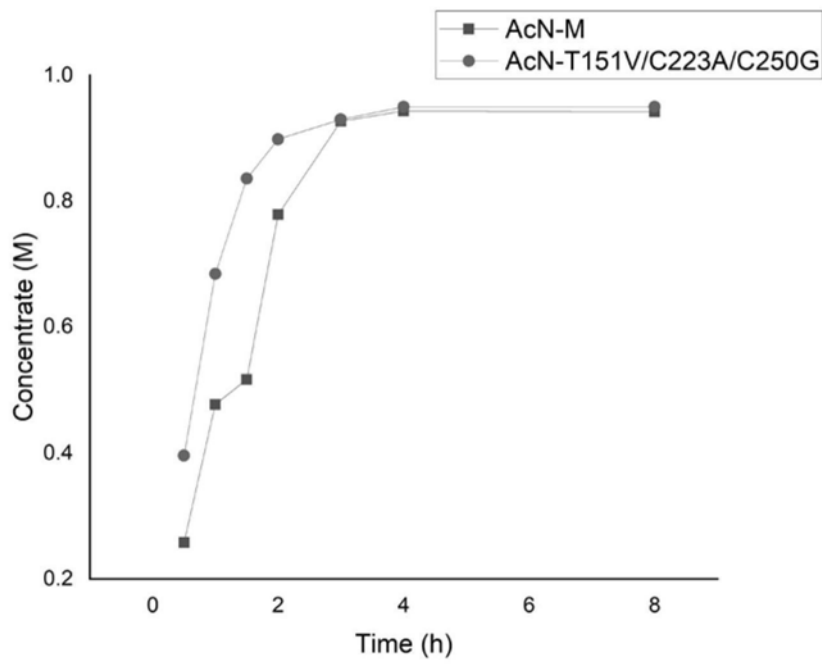


图6

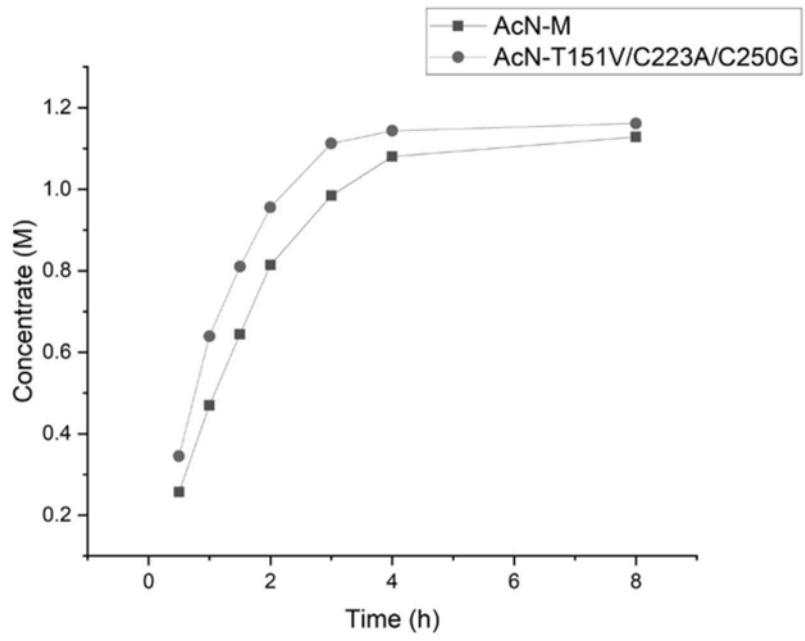


图7

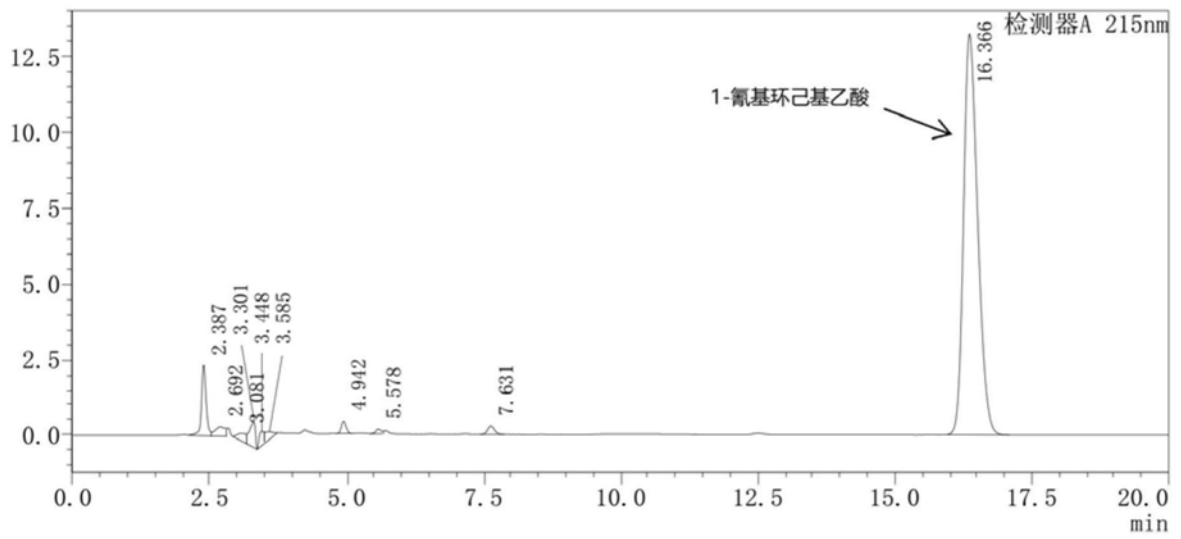


图8