

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102533876 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201210050833. X

C12P 7/62(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 10. 29

(62) 分案原申请数据

201010527409. 0 2010. 10. 29

(71) 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路 130 号

(72) 发明人 许建和 倪燕 李春秀 张杰

潘江 王丽娟

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

31002

代理人 朱水平 钟华

(51) Int. Cl.

C12P 7/22(2006. 01)

C12P 17/12(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

序列表 9 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种还原酶及其基因、重组酶及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一类还原酶及其基因,以及含有该基因的重组表达载体和重组表达转化体,以及其重组酶和该重组酶的制备方法,以及该还原酶或其重组酶作为催化剂在不对称还原前手性羰基化合物以制备光学活性手性醇中的应用。本发明的还原酶或其重组酶可来源于芽孢杆菌(Bacillus sp.)CGMCC No. 2549,可作为催化剂应用于不对称还原前手性羰基化合物以制备多种光学活性手性醇,其催化效率高、立体选择性强,且适用的反应条件温和、对环境友好。与野生型芽孢杆菌(Bacillus sp.)CGMCC No. 2549的整细胞相比,本发明的还原酶催化效果更佳,底物适用性更广,具有很好的工业应用开发前景。

1. 一种还原酶作为催化剂在不对称还原前手性羰基化合物以制备光学活性手性醇中的应用；所述的还原酶的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 2 所示。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述的应用按下述方法进行：在 pH 6-8 的磷酸盐缓冲液中，在葡萄糖脱氢酶、葡萄糖和 NADP⁺ 的存在下，在如权利要求 1 所述的还原酶的作用下，将前手性羰基化合物进行不对称还原反应，制得光学活性手性醇。

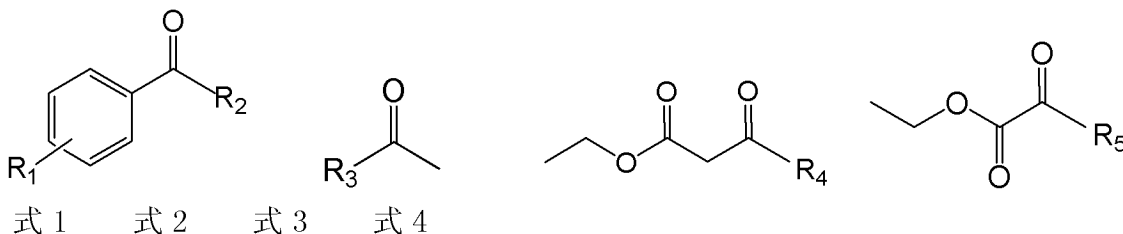
3. 如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：所述的前手性羰基化合物为芳基酮类化合物或酮酯类化合物。

4. 如权利要求 3 所述的应用，其特征在于：所述的芳基酮中的芳基为苯基或芳杂基。

5. 如权利要求 4 所述的应用，其特征在于：所述的芳杂基为含有 1 ~ 2 个选自 N、S 和 O 的杂原子的五元或六元芳杂基。

6. 如权利要求 5 所述的应用，其特征在于：所述的芳杂基为吡啶基。

7. 如权利要求 3 所述的应用，其特征在于：所述的前手性羰基化合物为如式 1、2、3 或 4 所示的前手性羰基化合物：



其中， R_1 为 -H、-Cl 或 -Br， R_1 取代的位置为苯基的对位；

R_2 为 -CH₃、-CH₂Cl、-CH₂Br 或 -CF₃；

R_3 为 2-吡啶基、3-吡啶基或 4-吡啶基；

R_4 为 -CH₃、-CH₂Cl、-CH₂Br 或 -CF₃；

R_5 为 -CH₃、*o*-Cl-C₆H₅- 或 -(CH₂)₂C₆H₅。

8. 如权利要求 3 ~ 7 任一项所述的应用，其特征在于：所述的前手性羰基化合物在反应液中的浓度为 1 ~ 15mmol/L；所述的还原酶或重组还原酶的用量为 1 ~ 10U/L；葡萄糖脱氢酶的用量为 10 ~ 100U/L；所述的葡萄糖的用量为 5 ~ 50g/L；所述的 NADP⁺ 的用量为 0.5 ~ 1.0mmol/L；所述的磷酸盐缓冲液的浓度为 0.05 ~ 0.1mol/L；所述的不对称还原反应的温度为 20 ~ 35℃；所述的不对称还原反应的时间以反应完全为准。

一种还原酶及其基因、重组酶及制备方法和应用

[0001] 本申请为发明名称为“一种还原酶及其基因、重组酶及制备方法和应用”、申请号为 201010527409.0、申请日为 2010 年 10 月 29 日的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种还原酶及其基因,以及含有该基因的重组表达载体和重组表达转化体,以及其重组酶和该重组酶的制备方法,以及该还原酶或其重组酶作为催化剂在不对称还原前手性羰基化合物以制备光学活性手性醇中的应用。

背景技术

[0003] 含有特定功能基团的光学活性手性醇是合成医药、农药及其它精细化学品的重要手性砌块。研究人员已开发出多种光学活性手性醇合成的方法,包括动力学拆分和不对称合成。其中,利用前手性羰基化合物的不对称还原合成光学活性手性醇的途径,可实现理论 100% 的产率,是生产光学活性手性醇的重要方法。化学家们已经发现手性金属化合物可作为催化剂用于羰基的不对称还原,尽管该化学方法已被用于工业生产,然而该方法操作难度大,反应条件苛刻,且产物中可能会残留重金属,因此其应用受到限制。生物催化方法不仅反应条件温和、对环境友好,具有高度的区域选择性和立体选择性,而且避免了产物中重金属残留,恰好弥补了化学方法的不足之处,因此近几年来生物催化的羰基不对称还原反应在手性醇不对称合成中的应用越来越受到重视。

[0004] 氧化还原酶是催化生物氧化 / 还原反应的一大类酶,被广泛应用于不对称合成光学活性手性药物和功能性类固醇等化合物,因此开发具有实际应用价值的氧化还原酶一直是生物技术领域的一项重要内容。醛酮还原酶 (AKR) 和短链醇脱氢酶 (SDR) 是羰基还原酶家族的两大重要超家族。其中 AKR 超家族可分成 15 个家族,包含约 150 个成员。相比而言,SDR 超家族成员数目较为庞大,目前已有 46000 多个成员。醛酮还原酶多为 NADPH 依赖型,通常为单亚基结构,亚基大小一般在 35 ~ 40kDa 左右;而短链醇脱氢酶多数由双亚基或四个亚基组成,亚基大小一般在 27kDa 左右。还原酶来源十分广泛,在微生物中普遍存在。例如,面包酵母全基因组中包含 49 个编码还原酶的开放读码框,其中 18 个还原酶的基因已被克隆表达并用于酮酯的不对称还原 (J. Am. Chem. Soc., 2004, 126 :12827-12832)。另外,从许多其它微生物中也分离得到了具有立体选择性的还原酶,有些被进一步克隆表达,并应用于生物催化领域。例如, Kita 等 (J. Mol. Catal. B :Enzym., 1999, 6 :305-313) 从掷孢酵母 (*Sporobolomyces salmonicolor*) AKU4429 中分离得到三种可催化 4- 氯乙酰乙酸乙酯不对称还原的还原酶; Itoh 等 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 66 :53-62) 对青霉菌 (*Penicillium citrinum*) IF04631 中的一种 β - 酮酯还原酶 (AKR3E1) 进行了异源表达,并应用于 (S)-4- 溴 -3- 羟基丁酸甲酯的生产中。

[0005] 然而目前应用于工业的还原酶类催化剂所占的比率尚不足总量的 14%。如何针对特定的底物找到具有高催化活性和选择性的生物催化剂是该领域至关重要的问题。将生物信息学和基因重组技术相结合,快速高效地开发性能优异的新型生物催化剂,是发展

生物不对称还原技术的有效途径。Yamamoto 等 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 61 : 133-139) 利用该手段克隆了来自枯草芽孢杆菌中的重组还原酶 FabG 以及其他多种微生物中的 FabG 结构类似酶,用以催化 4- 氯乙酰乙酸乙酯的不对称还原。另外,其它一些来自枯草芽孢杆菌的还原酶的结构和性质也已有研究报道。如枯草芽孢杆菌还原酶 YtbE 对多种醛类化合物有还原活性 (Protein Science, 2009, 18 :1792-1800) ;还原酶 YueD 对联苯甲酰有还原活性 (J. Biotechnol., 2002, 96 :157-169)。但这三种来自枯草芽孢杆菌的还原酶是否可以用于催化其他羰基化合物的不对称还原,迄今尚无文献报道。

[0006] 目前已知芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) ECU0013, 即 CGMCC No. 2549 可催化多种芳基酮不对称还原生成光学活性手性仲醇 (Bioresour. Technol., 2010, 101 :1054-1059 ;发明专利 CN101372677B)。但是以该野生菌株整细胞作为催化剂时,由于酶产量很低,导致总体催化活性不高,从而限制了生物催化剂的优势发挥。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是针对以野生芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) CGMCC No. 2549 整细胞作为芳基酮不对称还原催化剂时酶产量较低使总体催化活性不高,不对称还原底物谱较窄的缺陷,而提供一种具有优异的不对称催化活性、底物适用性广、对环境友好的还原酶及其基因,以及含有该基因的重组表达载体和重组表达转化体,以及其重组酶和该重组酶的制备方法,以及该还原酶或其重组酶的应用。

[0008] 本发明通过下述技术方案以解决上述技术问题 :

[0009] 本发明的还原酶的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 6 所示。本发明以来源于芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) ECU0013 的辅酶依赖类型为 NADPH 型的该还原酶为例进行说明。本发明中,所述的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) ECU0013 现保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏号为 CGMCC No. 2549。该菌株从土壤中筛选得到,在发明专利 (CN101372677B) 中有详细说明。

[0010] 本发明还涉及一种还原酶基因,其为 (1) 其碱基序列如序列表中 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3 或 SEQ ID No. 5 所示 ;或 (2) 其编码由序列表中 SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 6 所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0011] 本发明的还原酶基因可来源于芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) CGMCC No. 2549,具体制备方法可为 :根据 Genbank 中收录的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 的还原酶 YtbE、FabG 和 YueD 的基因序列设计合成引物,然后以芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) CGMCC No. 2549 的基因组 DNA 为模板,利用聚合酶链式反应 (PCR) 进行基因扩增,获得三条完整的还原酶全长基因序列,分别为 :

[0012] 碱基序列如序列表中 SEQ ID No. 1 所示的基因,命名为 BCR I,全长 843bp。其中,其编码序列 (CDS) 从第 1 个碱基起至第 840 个碱基止,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA。该序列无内含子,其编码的蛋白质的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 2 所示。

[0013] 碱基序列如序列表中 SEQ ID No. 3 所示的基因,命名为 BCR II,全长 741bp。其中,其编码序列 (CDS) 从第 1 个碱基起至第 738 个碱基止,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA。该序列无内含子,其编码的蛋白质的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 4 所示。

[0014] 碱基序列如序列表中 SEQ ID No. 5 所示的基因,命名为 BCR III,全长 732bp。其

中,其编码序列(CDS)从第1个碱基起至第729个碱基止,起始密码子为ATG,终止密码子为TAG。该序列无内含子,其编码的蛋白质的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No. 6所示。

[0015] 如本领域技术人员所知,本发明的还原酶基因的碱基序列也可以是编码由序列表中SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 4或SEQ ID No. 6所示的氨基酸序列组成的蛋白质的其他任何碱基序列。

[0016] 本发明另涉及包含本发明的还原酶基因的核苷酸序列的重组表达载体。其可通过本领域常规方法将本发明的还原酶基因的核苷酸序列连接于各种载体上构建而成。所述的载体可为本领域常规的各种载体,如市售的质粒、粘粒、噬菌体或病毒载体等,优选pET28a。较佳的,可通过下述方法制得本发明的重组表达载体:将通过PCR扩增所得的还原酶基因产物与载体pMD-18T连接,形成克隆载体pBCRI-18T、pBCRII-18T或pBCRIII-18T,之后将克隆载体和表达载体pET28a用限制性内切酶BamHI和XhoI双酶切,形成互补的粘性末端,再经T4DNA连接酶连接,形成含有本发明的还原酶基因的重组表达质粒pET-BCRI、pET-BCRII或pET-BCRIII。

[0017] 本发明进一步涉及包含本发明的还原酶基因或其重组表达载体的重组表达转化体。其可通过将本发明的重组表达载体转化至宿主微生物中制得。所述的宿主微生物可为本领域常规的各种宿主微生物,只要能满足重组表达载体可稳定的自行复制,且所携带的本发明的还原酶基因可被有效表达即可。本发明优选大肠杆菌,更优选大肠埃希氏菌(*E. coli*)BL21(DE3)或大肠埃希氏菌(*E. coli*)DH5 α 。将前述重组表达质粒pET-BCRI、pET-BCRII或pET-BCRIII转化至大肠埃希氏菌(*E. coli*)BL21(DE3)中,即可得本发明优选的基因工程菌株,即大肠埃希氏菌(*E. coli*)BL21(DE3)/pET-BCRI、大肠埃希氏菌(*E. coli*)BL21(DE3)/pET-BCRII或大肠埃希氏菌(*E. coli*)BL21(DE3)/pET-BCRIII。

[0018] 本发明还进一步涉及一种重组还原酶的制备方法,其包括如下步骤:培养本发明的重组表达转化体,获得重组还原酶。其中,所述的重组表达转化体同前述介绍,可通过将本发明的重组表达载体转化至宿主微生物得到。

[0019] 其中,所述的培养重组表达转化体中所用的培养基可本领域任何可使转化体生长并产生本发明的还原酶的培养基,对于菌株,优选LB培养基:蛋白胨10g/L,酵母膏5g/L,NaCl 10g/L,pH 7.0。培养方法和培养条件没有特殊的限制,可以根据宿主类型和培养方法等因素的不同按本领域普通知识进行适当的选择,只要使转化体能够生长并产生还原酶即可。其他培养转化体具体操作均可按本领域常规操作进行。对于菌株,优选下述方法:将表达本发明的还原酶基因的重组大肠杆菌(优选本发明的大肠埃希氏菌(*E. coli*)BL21(DE3)重组表达转化体)接种至含氨苄青霉素的LB培养基中培养,当培养液的光密度OD₆₀₀达到0.5-0.7(优选0.6)时,在终浓度为0.1-1mmol/L(优选0.5mmol/L)的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)的诱导下,即可高效表达本发明的重组还原酶。

[0020] 本发明再进一步涉及一种重组还原酶,其为(1)按上述方法制得的重组还原酶;或(2)氨基酸序列如序列表中SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 4或SEQ ID No. 6所示的重组还原酶。本发明的重组还原酶的辅酶依赖类型为NADPH型。

[0021] 本发明更进一步涉及本发明的还原酶或其重组酶作为催化剂在不对称还原前手性羰基化合物以制备光学活性手性醇中的应用。

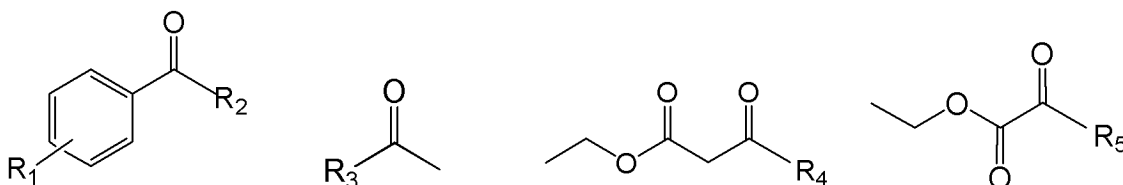
[0022] 较佳的,所述的应用按下述方法进行:在pH 6-8的磷酸盐缓冲液中,在葡萄糖脱

氢酶、葡萄糖和 NADP^+ 的存在下,在本发明的还原酶或重组还原酶的作用下,将前手性羰基化合物进行不对称还原反应,制得光学活性手性醇。

[0023] 上述应用中,所述的不对称还原反应的条件可按本领域此类反应的常规条件进行选择,优选如下:

[0024] 所述的前手性羰基化合物较佳的为芳基酮类化合物或酮酯类化合物。所述的芳基酮中的芳基较佳的为苯基或芳杂基,如含有 1~2 个选自 N、S 和 O 的杂原子的五元或六元芳杂基,优选吡啶基。本发明优选如式 1、2、3 或 4 所示的前手性羰基化合物:

[0025]



[0026] 式 1 式 2 式 3 式 4

[0027] 其中, R_1 为 $-\text{H}$ 、 $-\text{Cl}$ 或 $-\text{Br}$, R_1 取代的位置为苯基的邻位、间位或对位;

[0028] R_2 为 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 或 $-\text{CF}_3$;

[0029] R_3 为 2-吡啶基、3-吡啶基或 4-吡啶基;

[0030] R_4 为 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 或 $-\text{CF}_3$;

[0031] R_5 为 $-\text{CH}_3$ 、 $o\text{-Cl-C}_6\text{H}_5$ 或 $-(\text{CH}_2)_2\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0032] 所述的前手性羰基化合物在反应液中的浓度较佳的为 1~15mmol/L。本发明的还原酶或重组还原酶的用量为催化有效量,较佳的为 1~10U/L(酶活测定方法及定义见实施例 4)。葡萄糖脱氢酶的用量较佳的为 10~100U/L(酶活测定方法及定义见实施例 4)。葡萄糖的用量较佳的为 5~50g/L。 NADP^+ 的用量较佳的为 0.5~1.0mmol/L。所述的磷酸盐缓冲液可为本领域常规磷酸盐缓冲液,如磷酸-磷酸钠缓冲液。磷酸盐缓冲液的浓度较佳的为 0.05~0.1mol/L,所述的浓度是指缓冲溶液中共轭酸碱的总浓度。所述的不对称还原反应较佳的在振荡条件下进行。所述的不对称还原反应的温度较佳的为 20~35℃。所述的不对称还原反应的时间较佳的以反应完全为准,一般为 1~12 小时。不对称还原反应结束后,可按本领域常规方法从反应液中提取 (S)- 或 (R)- 型手性醇产物。

[0033] 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。

[0034] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0035] 本发明的积极进步效果在于:本发明的还原酶或其重组酶可作为催化剂应用于不对称还原前手性羰基化合物以制备多种光学活性手性醇,其催化效率高、立体选择性强,且适用的反应条件温和、对环境友好。与野生型芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) CGMCC No. 2549 的整细胞相比,本发明的还原酶催化效果更佳,底物适用性更广,具有很好的工业应用开发前景。

附图说明

[0036] 图 1 为基因 BCRI、BCRII 和 BCRIII 的 PCR 扩增电泳图谱,其中,1、DNA Marker (Marker II, 北京天根生化科技有限公司); 2、基因 BCRIII 的 PCR 扩增产物; 3、基因

BCRI 的 PCR 扩增产物 ;4、基因 BCRII 的 PCR 扩增产物。

[0037] 图 2 为克隆质粒 pBCRI-18T、pBCRII-18T 和 pBCRIII-18T 的 BamHI 和 XhoI 的双酶切分析图谱,其中,1、pBCRI-18T/BamHI+XhoI ;2、pBCRII-18T/BamHI+XhoI ;3、pBCRIII-18T/BamHI+XhoI ;4、DNA Marker (Marker IV,北京天根生化科技有限公司)。

[0038] 图 3 为大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRI、大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRII 的菌液 PCR 扩增电泳图,其中,1 ~ 6、大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRI 的菌液 PCR 扩增电泳图 ;7 ~ 12、大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRII 的菌液 PCR 扩增电泳图 ;13、DNA Marker (Marker II,北京天根生化科技有限公司)。

[0039] 图 4 为大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRIII 的菌液 PCR 扩增电泳图,其中,1 ~ 6、大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRIII 的菌液 PCR 扩增电泳图 ;7、DNA Marker (Marker IV,北京天根生化科技有限公司)。

[0040] 图 5 为重组表达质粒 pET-BCRI 的构建示意图。

[0041] 图 6 为重组表达质粒 pET-BCRII 的构建示意图。

[0042] 图 7 为重组表达质粒 pET-BCRIII 的构建示意图。

[0043] 图 8 为重组还原酶 BCRI、BCRII 和 BCRIII 的聚丙烯凝胶电泳图。

具体实施方式

[0044] 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。

[0045] 下列实施例中的材料来源为 :

[0046] 质粒 pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司。

[0047] 表达质粒 pET28a 购自上海 Novagen 公司。

[0048] *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,2 \times Taq PCR MasterMix,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

[0049] 实施例 1 ~ 2 过程如图 5 ~ 7 所示。

[0050] 实施例 1 还原酶基因的克隆

[0051] 根据 Genbank 中已收录的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)168 的还原酶 YtbE、FabG 和 YueD 的基因序列为依据,设计 PCR 引物如下 :

[0052] 引物 1 (扩增 BCR I 基因) :

[0053] 上游引物 :CGCGGATCCATGACAACACATTTACAAGCAAAAG

[0054] 下游引物 :CCGGTCGAGTTAAAAATCAAAGTTGTCCGGATC

[0055] 引物 2 (扩增 BCR II 基因) :

[0056] 上游引物 :CGCGGATCCATGCTTAATGATAAAACGGCT

[0057] 下游引物 :CCGGTCGAGTTACATCACCATTCCGCC

[0058] 引物 3 (扩增 BCR III 基因) :

[0059] 上游引物 :CGCGGATCCATGGAACTTTATATCATCACCGGAG

[0060] 下游引物 :CCGGTCGAGCTACAAAACTCTTTAATATCATAAATGCC

[0061] 其中,上游引物下划线部分为 BmHI 酶切位点,下游引物下划线部分为 XhoI 酶切位点。

[0062] 以芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)CGMCC No. 2549 的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 体系为:2×Taq PCR MasterMix 15 μl,上游引物和下游引物各 1 μl(0.3 μmol/L),DNA 模板 1 μl(0.1 μg) 和 ddH₂O 12 μl。PCR 扩增步骤为:(1)95℃,预变性 5min;(2)94℃,变性 45s;(3)60℃退火 1min;(4)72℃延伸 1min;步骤(2)~(4)重复 35次;(5)72℃继续延伸 10min,冷却至 4℃。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化,利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 700~900bp 区间的目标条带(图 1)。获得三条完整的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)CGMCC No. 2549 的还原酶全长基因序列,经 DNA 测序,分别如下:

[0063] 基因 1,命名为 BCR I,全长 843bp,碱基序列如序列表中 SEQ ID No. 1。

[0064] 基因 2,命名为 BCR II,全长 741bp,碱基序列如序列表中 SEQ ID No. 3。

[0065] 基因 3,命名为 BCR III,全长 732bp,碱基序列如序列表中 SEQ ID No. 5。

[0066] 实施例 2 重组表达载体(质粒)和重组表达转化体的制备

[0067] 将实施例 1 所得的还原酶基因与 pMD-18T 载体连接,分别构建克隆质粒 pBCRI-18T、pBCRII-18T 和 pBCRIII-18T。之后分别转化至大肠埃希氏菌 (*E. coli*)DH5 α 感受态细胞,通过菌落 PCR 筛选阳性克隆,提取质粒,在 37℃用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 双酶切 12h,经琼脂糖凝胶电泳纯化,利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目标片段,证明含有正确的插入片段(图 2)。将目标片段在 T4DNA 连接酶的作用下,与同样经 BamHI 和 XhoI 酶切后的质粒 pET28a,在 4℃下连接过夜得到重组表达质粒 pET-BCRI、pET-BCRII 和 pET-BCRIII。

[0068] 分别将上述重组表达质粒转化到大肠埃希氏菌 (*E. coli*)DH5 α 感受态细胞中,在含有卡那霉素的抗性平板上对阳性重组体进行筛选,挑取单克隆,培养重组菌,待质粒扩增后提取质粒,重新转化至大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 感受态细胞中,转化液涂布到含有卡那霉素的 LB 平板上,37℃倒置培养过夜,即分别获得阳性重组转化体大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRI、大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3)/pET-BCRII 和大肠埃希氏菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-BCRIII,菌落 PCR 验证阳性克隆(图 3 和 4)。

[0069] 实施例 3 重组还原酶的表达

[0070] 分别将实施例 2 所得的 3 种重组大肠杆菌,接种至含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃振荡培养过夜,按 1% (v/v) 的接种量接入装有 50ml LB 培养基(蛋白胨 10g/L,酵母膏 5g/L, NaCl 10g/L, pH 7.0) 的 250ml 三角瓶中,置 37℃、180rpm 摇床培养,当培养液的 OD₆₀₀ 达到 0.6 时,加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG 作为诱导剂,25℃诱导 12h 后,将培养液离心,收集细胞,并用生理盐水洗涤两次,将所得的静息细胞悬浮于 pH 7.0 的缓冲液中,在冰浴中超声破碎,离心收集上清液,即为重组还原酶的粗酶液。粗酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳图分析(图 8),三个重组蛋白大部分以可溶性形式存在。聚丙烯酰胺凝胶电泳图分别经 BandScan 软件分析得,表达的目的蛋白还原酶 BCRI 约占粗酶液总蛋白的 55%、表达的目的蛋白还原酶 BCRII 约占粗酶液总蛋白的 58%,表达的目的蛋白还原酶 BCRIII 约占粗酶液总蛋白的 63%。

[0071] 实施例 4 重组还原酶和葡萄糖脱氢酶活力的测定

[0072] 利用分光光度计检测 340nm 吸光值的变化计算还原酶和葡萄糖脱氢酶活力。

[0073] 重组还原酶活力测定方法如下：于 1ml 反应体系（100mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.0）中，加入 2mmol/L 2-氯苯乙酮，0.05mmol/L NADPH，30℃保温 2 分钟后加入适量酶液，迅速摇匀，检测 340nm 处吸光值的变化。

[0074] 葡萄糖脱氢酶活力测定方法如下：于 1ml 反应体系（100mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.0）中，加入 2mmol/L 葡萄糖，0.05mmol/L NADP⁺，30℃保温 2 分钟后加入适量酶液，迅速摇匀，检测 340nm 处吸光值的变化。

[0075] 酶活力的计算公式为：酶活力 (U) = $EW \times V \times 10^3 / (6220 \times l)$ ；式中，EW 为 1min 内 340nm 处吸光度的变化；V 为反应液的体积，单位 mL；6220 为摩尔消光系数，单位 L/(mol · cm)；l 为光程距离，单位 cm。

[0076] 还原酶每单位酶活定义为在上述条件下，每分钟催化氧化 1 μmol NADPH 所需的酶量。重组还原酶 BCRI、BCRII 和 BCRIII 的酶活分别为 0.017U/mg 蛋白、0.28U/mg 蛋白和 0.14U/mg 蛋白。

[0077] 每单位葡萄糖脱氢酶酶活定义为在上述条件下，每分钟催化还原 1 μmol NADP⁺ 所需的酶量。

[0078] 实施例 5-19 重组还原酶 BCR I 催化羰基化合物的不对称还原

[0079] 在 0.4ml 磷酸-磷酸钠缓冲液（100mmol/L，pH 7.0）中加入 0.002U 的 BCR I 酶液和 0.04U 的葡萄糖脱氢酶，分别加入终浓度为 2mmol/L 的芳香酮（实施例 5-13）或终浓度为 10mmol/L 的酮酯（实施例 14-19），再加入终浓度为 0.5mmol/L 的 NADP⁺ 和 50g/L 的葡萄糖。在 30℃，1100rpm 振荡反应一定时间。反应结束后用等体积乙酸乙酯进行萃取，萃取两次，合并萃取液，加无水硫酸钠干燥过夜，用气相色谱（手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEXCB 或 Beta-DEX 120）或液相色谱（手性 OD-H 柱）分析测定底物转化率和还原产物的 ee 值。结果见表 1。

[0080] 产物 ee 值具体分析条件如下：

[0081] 实施例 5-17 及 19 使用气相色谱分析手性，载气氮气，进样口温度 280℃，检测器温度 280℃，其他条件如下：

[0082] 实施例 5：手性毛细管柱 Beta-DEX 120，柱温 130℃；

[0083] 实施例 6：手性毛细管柱 Beta-DEX 120，柱温 150℃；

[0084] 实施例 7：手性毛细管柱 Beta-DEX 120，柱温 160℃；

[0085] 实施例 8：手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEX CB，柱温 130℃；

[0086] 实施例 9：手性毛细管柱 Beta-DEX 120，柱温 160℃；

[0087] 实施例 10：手性毛细管柱 Beta-DEX 120，柱温 170℃；

[0088] 实施例 11：手性毛细管柱 Beta-DEX 120，柱温 110℃；

[0089] 实施例 12 和 13：手性毛细管柱 Beta-DEX 120，柱温 140℃；

[0090] 实施例 14：手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEX CB，柱温 90℃维持 2min，1℃/min 升至 120℃；

[0091] 实施例 15：乙酰化产物，手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEX CB，柱温 110℃维持 2min，2℃/min 升至 126℃维持 2min；

[0092] 实施例 16：手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEX CB，柱温 130℃；

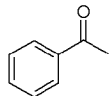
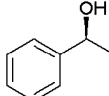
[0093] 实施例 17：手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEX CB，柱温 70℃；

[0094] 实施例 19 :手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEX CB,柱温 160℃。

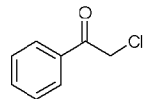
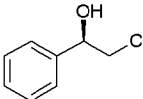
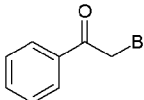
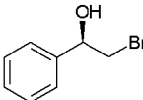
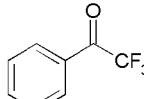
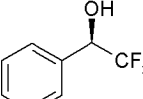
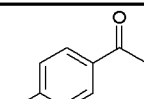
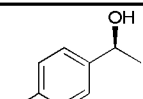
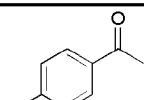
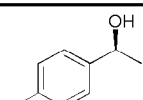
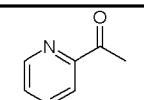
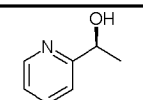
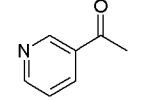
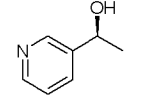
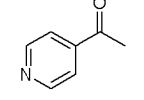
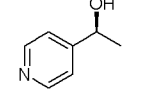
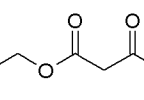
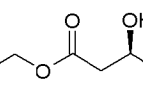
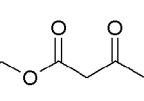
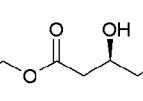
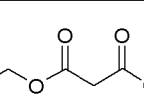
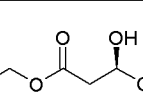
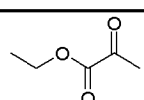
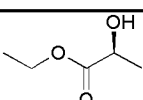
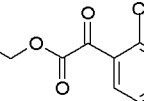
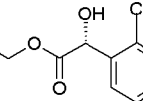
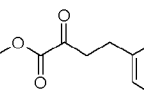
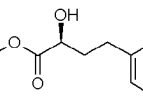
[0095] 实施例 18 使用液相色谱分析手性,手性 OD-H 柱,流动相 :正己烷 / 异丙醇 = 97/3,流速 1ml/min,检测器波长 254nm。

[0096] 表 1 重组还原酶 BCR I 催化羰基化合物不对称还原反应的结果

[0097]

实施例	底物	产物	反应时间 (h)	转化率 (%)	ee 值 (%) (产物构型)
5			12	70.8	> 99 (S)

[0098]

6			12	74.5	> 99 (R)
7			12	72.8	> 99 (R)
8			12	100	> 99 (R)
9			12	49.6	> 99 (S)
10			12	56.0	> 99 (S)
11			12	100	> 99 (S)
12			12	33.2	> 99 (S)
13			12	66.8	> 99 (S)
14			2	100	> 99 (R)
15			1	100	62.2 (R)
16			1	100	>99 (R)
17			1	100	> 99 (S)
18			1	100	> 99 (R)
19			1	100	85.7 (S)

[0099] 实施例 20-33 重组还原酶 BCR II 催化羰基化合物不对称还原

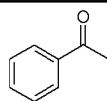
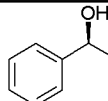
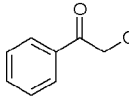
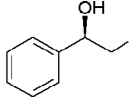
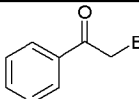
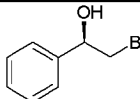
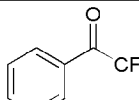
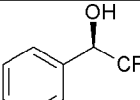
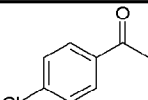
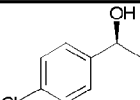
[0100] 在 0.4ml 磷酸-磷酸钠缓冲液 (100mmol/L, pH 7.0) 中加入 0.002U 的 BCR II 酶液和 0.04U 的葡萄糖脱氢酶, 分别加入终浓度为 2mmol/L 的芳香酮 (实施例 20-28) 或终浓度

为 10mmol/L 的酮酯 (实施例 29-33), 再加入终浓度为 0.5mmol/L 的 NADP^+ 和 50g/L 的葡萄糖。在 30°C, 1100rpm 振摇反应一定时间。反应结束后用等体积乙酸乙酯进行萃取, 萃取两次, 合并萃取液, 加无水硫酸钠干燥过夜, 用气相色谱 (手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEXCB) 或液相色谱 (手性 OD-H 柱) 分析测定底物转化率和还原产物的 ee 值。结果见表 2。

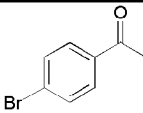
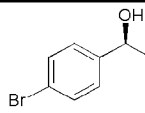
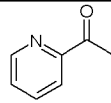
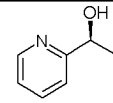
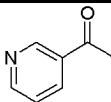
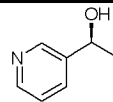
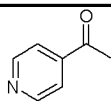
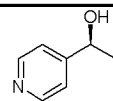
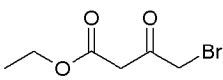
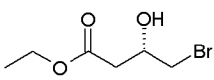
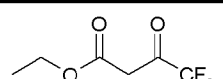
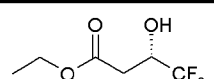
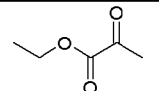
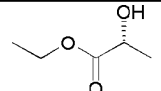
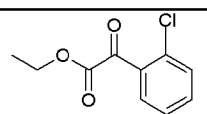
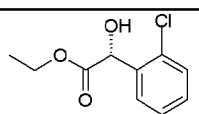
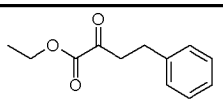
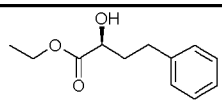
[0101] 产物 ee 值具体分析条件如下: 实施例 29: 乙酰化产物, 气相色谱 (手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEX CB), 柱温 110°C 维持 2min, 5°C/min 升至 180°C。其他产物 ee 值分析条件同实施例 5 ~ 19 中所述。

[0102] 表 2 重组还原酶 BCR II 催化羰基化合物不对称还原的结果

[0103]

实施 例	底物	产物	反应时间 (h)	转化率 (%)	ee 值 (%) (产物构型)
20			12	50.2	64.9 (S)
21			12	100	90.0 (R)
22			12	100	96.0 (R)
23			12	100	49.9 (R)
24			12	91.1	88.3 (S)

[0104]

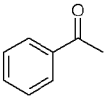
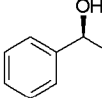
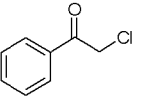
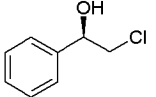
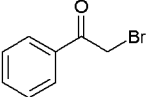
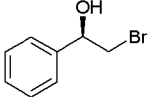
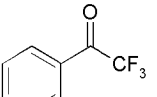
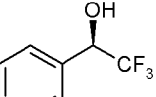
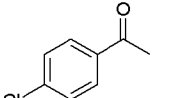
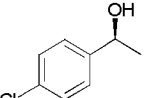
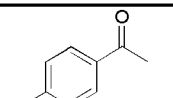
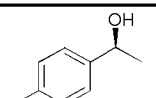
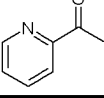
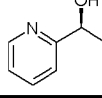
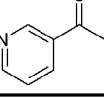
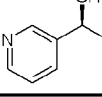
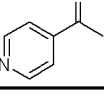
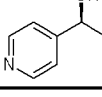
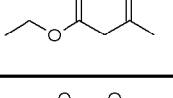
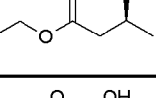
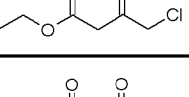
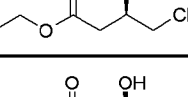
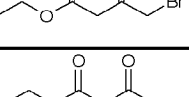
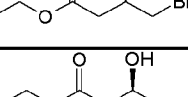
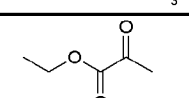
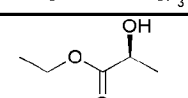
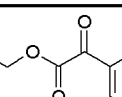
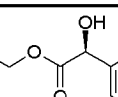


25			12	31.1	92.6 (<i>S</i>)
26			12	87.7	> 99 (<i>S</i>)
27			12	82.8	88.4 (<i>R</i>)
28			12	90.8	12.1 (<i>S</i>)
29			2	100	92.9 (<i>S</i>)
30			2	96.1	>99 (<i>S</i>)
31			1	100	85.5 (<i>R</i>)
32			1	100	64.3 (<i>R</i>)
33			1	100	>99 (<i>S</i>)

[0105] 实施例 34-48 重组还原酶 BCR III 催化羰基化合物的不对称还原

[0106] 在 0.4ml 磷酸-磷酸钠缓冲液 (100mmol/L, pH 7.0) 中加入 0.002U 的 BCR III 酶液和 0.04U 的葡萄糖脱氢酶, 分别加入终浓度为 2mmol/L 的芳香酮 (实施例 34-42) 或终浓度为 10mmol/L 的酮酯 (实施例 43-48), 再加入终浓度为 0.5mmol/L 的 NADP⁺ 和 50g/L 的葡萄糖。在 30℃, 1100rpm 振摇反应一定时间。反应结束后用等体积乙酸乙酯进行萃取, 萃取两次, 合并萃取液, 加无水硫酸钠干燥过夜, 用气相色谱 (手性毛细管柱 CP-Chirasil-DEXCB) 或液相色谱 (手性 OD-H 柱) 分析测定底物转化率和还原产物的 ee 值。结果见表 3。产物 ee 值分析条件同实施例 5 ~ 33。

[0107] 表 3 重组还原酶 BCR III 催化羰基化合物不对称还原的结果

[0108]

实施例	底物	产物	反应时间 (h)	转化率 (%)	ee 值 (%) (产物构型)
34			12	78.3	> 99 (S)
35			12	100	>99 (R)
36			12	100	95.8 (R)
37			1	100	>99 (R)
38			12	53.9	> 99 (S)
39			12	23.1	> 99 (S)
40			12	100	> 99 (S)
41			12	39.7	> 99 (S)
42			12	79.8	> 99 (S)
43			2	100	>99 (S)
44			1	100	>99 (R)
45			2	100	>99 (R)
46			2	84.6	>99 (R)
47			1	100	>99 (S)
48			1	100	51.4 (R)

[0001]

序列表

<110> 华东理工大学

<120> 一种还原酶及其基因、重组酶及制备方法和应用

<130> P4E1210112C

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 843

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) CGMCC No. 2549

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (840)

<400> 1

atg aca aca cat tta caa gca aaa gca aca ctt cat aat ggg gta gaa 48

Met Thr Thr His Leu Gln Ala Lys Ala Thr Leu His Asn Gly Val Glu

1 5 10 15

atg cct tgg ttc ggc ctt ggc gtg ttc caa gtg gaa gaa gga tct gaa 96

Met Pro Trp Phe Gly Leu Gly Val Phe Gln Val Glu Glu Gly Ser Glu

20 25 30

ctg gta aac gca gtt aaa act gcc att gtt cac ggg tac cgc agt att 144

Leu Val Asn Ala Val Lys Thr Ala Ile Val His Gly Tyr Arg Ser Ile

35 40 45

gat act gca gca atc tat gga aat gaa gct gga gtc gga gaa ggg att 192

Asp Thr Ala Ala Ile Tyr Gly Asn Glu Ala Gly Val Gly Glu Gly Ile

50 55 60

cgg gaa ggc att gaa gaa gca ggc att tca aga gag gat ctg ttt atc 240

Arg Glu Gly Ile Glu Glu Ala Gly Ile Ser Arg Glu Asp Leu Phe Ile

65 70 75 80

aca tcg aaa gta tgg aat gcg gat tta ggc tac gaa gaa aca ctc gcc 288

[0002]

Thr Ser Lys Val Trp Asn Ala Asp Leu Gly Tyr Glu Glu Thr Leu Ala	
85	90
gcg ttt gaa aca agt ctg tcc aaa ctc ggt ctg gat tat ttg gat cta	336
Ala Phe Glu Thr Ser Leu Ser Lys Leu Gly Leu Asp Tyr Leu Asp Leu	
100	105
tac ctc atc cac tgg cct gta gaa gga aag tat aaa gaa gct tgg aga	384
Tyr Leu Ile His Trp Pro Val Glu Gly Lys Tyr Lys Glu Ala Trp Arg	
115	120
gcg ctt gaa acg ctg tat aaa gaa ggc cgc atc aaa gcg att ggc gta	432
Ala Leu Glu Thr Leu Tyr Lys Glu Gly Arg Ile Lys Ala Ile Gly Val	
130	135
agc aac ttc caa att cac cat ctt gaa gat ctg atg acg gca gct gaa	480
Ser Asn Phe Gln Ile His His Leu Glu Asp Leu Met Thr Ala Ala Glu	
145	150
att aag cct atg att aac caa gtg gaa ttt cac ccg cgc ctc aca cag	528
Ile Lys Pro Met Ile Asn Gln Val Glu Phe His Pro Arg Leu Thr Gln	
165	170
aaa gag ttg ata aga tac tgc caa aat cag ggc atc cag atg gag gct	576
Lys Glu Leu Ile Arg Tyr Cys Gln Asn Gln Gly Ile Gln Met Glu Ala	
180	185
tgg tca cct tta atg cag gga cag ctg ctg gat cac cct gta ttg gct	624
Trp Ser Pro Leu Met Gln Gly Gln Leu Leu Asp His Pro Val Leu Ala	
195	200
gac atc gct caa aca tat aat aaa tct gtc gca caa att att ttg cgc	672
Asp Ile Ala Gln Thr Tyr Asn Lys Ser Val Ala Gln Ile Ile Leu Arg	
210	215
tgg gat ctg cag cat ggc atc att acg att cct aaa tca acg aag gaa	720
Trp Asp Leu Gln His Gly Ile Ile Thr Ile Pro Lys Ser Thr Lys Glu	
225	230
cac cgc att aaa gaa aat gca agc gta ttt gac ttt gaa tta acg cag	768
His Arg Ile Lys Glu Asn Ala Ser Val Phe Asp Phe Glu Leu Thr Gln	
245	250
gat gac atg aac cga atc gat gca ctg aat gaa aac ttg cgc gtc ggt	816

[0003]

Asp Asp Met Asn Arg Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Leu Arg Val Gly
 260 265 270
 cct gat ccg gac aac ttt gat ttt taa 843
 Pro Asp Pro Asp Asn Phe Asp Phe
 275 280
 <210> 2
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) CGMCC No. 2549
 <400> 2
 Met Thr Thr His Leu Gln Ala Lys Ala Thr Leu His Asn Gly Val Glu
 1 5 10 15
 Met Pro Trp Phe Gly Leu Gly Val Phe Gln Val Glu Glu Gly Ser Glu
 20 25 30
 Leu Val Asn Ala Val Lys Thr Ala Ile Val His Gly Tyr Arg Ser Ile
 35 40 45
 Asp Thr Ala Ala Ile Tyr Gly Asn Glu Ala Gly Val Gly Glu Gly Ile
 50 55 60
 Arg Glu Gly Ile Glu Glu Ala Gly Ile Ser Arg Glu Asp Leu Phe Ile
 65 70 75 80
 Thr Ser Lys Val Trp Asn Ala Asp Leu Gly Tyr Glu Glu Thr Leu Ala
 85 90 95
 Ala Phe Glu Thr Ser Leu Ser Lys Leu Gly Leu Asp Tyr Leu Asp Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Ile His Trp Pro Val Glu Gly Lys Tyr Lys Glu Ala Trp Arg
 115 120 125
 Ala Leu Glu Thr Leu Tyr Lys Glu Gly Arg Ile Lys Ala Ile Gly Val
 130 135 140
 Ser Asn Phe Gln Ile His His Leu Glu Asp Leu Met Thr Ala Ala Glu
 145 150 155 160
 Ile Lys Pro Met Ile Asn Gln Val Glu Phe His Pro Arg Leu Thr Gln
 165 170 175
 Lys Glu Leu Ile Arg Tyr Cys Gln Asn Gln Gly Ile Gln Met Glu Ala

[0004]

	180	185	190
Trp Ser Pro Leu Met Gln Gly Gln Leu Leu Asp His Pro Val Leu Ala			
	195	200	205
Asp Ile Ala Gln Thr Tyr Asn Lys Ser Val Ala Gln Ile Ile Leu Arg			
	210	215	220
Trp Asp Leu Gln His Gly Ile Ile Thr Ile Pro Lys Ser Thr Lys Glu			
225	230	235	240
His Arg Ile Lys Glu Asn Ala Ser Val Phe Asp Phe Glu Leu Thr Gln			
	245	250	255
Asp Asp Met Asn Arg Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Leu Arg Val Gly			
	260	265	270
Pro Asp Pro Asp Asn Phe Asp Phe			
	275	280	

<210> 3

<211> 741

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) CGMCC No. 2549

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (738)

<400> 3

atg ctt aat gat aaa acg gct att gtc act ggc gca tcc cgc gga atc	48
Met Leu Asn Asp Lys Thr Ala Ile Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile	
1 5 10 15	
ggc cgc tca atc gcc ctt gat ctg gca aaa agc ggc gcc aat gtt gtc	96
Gly Arg Ser Ile Ala Leu Asp Leu Ala Lys Ser Gly Ala Asn Val Val	
20 25 30	
gtg aac tac tcc ggc aat gaa gcg aaa gca aat gaa gtg gta gat gaa	144
Val Asn Tyr Ser Gly Asn Glu Ala Lys Ala Asn Glu Val Val Asp Glu	
35 40 45	
atc aaa tct atg ggc aga aac gca att gct gtc aaa gcg gat gta tca	192
Ile Lys Ser Met Gly Arg Asn Ala Ile Ala Val Lys Ala Asp Val Ser	
50 55 60	

[0005]

gac ggc gga atg gtg atg taa

741

Asp Gly Gly Met Val Met

245

<210> 4

<211> 246

<212> PRT

<213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) CGMCC No. 2549

<400> 4

Met Leu Asn Asp Lys Thr Ala Ile Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Gly Arg Ser Ile Ala Leu Asp Leu Ala Lys Ser Gly Ala Asn Val Val

20 25 30

Val Asn Tyr Ser Gly Asn Glu Ala Lys Ala Asn Glu Val Val Asp Glu

35 40 45

Ile Lys Ser Met Gly Arg Asn Ala Ile Ala Val Lys Ala Asp Val Ser

50 55 60

Asn Pro Glu Asp Val Gln Asn Met Ile Lys Glu Thr Leu Ala Val Phe

65 70 75 80

Ser Thr Ile Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Asn

85 90 95

Leu Ile Met Arg Met Lys Glu Asp Glu Trp Asp Asp Val Ile Asn Ile

100 105 110

Asn Leu Lys Gly Val Phe Asn Cys Thr Lys Ala Val Thr Arg Gln Met

115 120 125

Met Lys Gln Arg Ser Gly Arg Ile Ile Asn Val Ser Ser Ile Val Gly

130 135 140

Val Ser Gly Asn Pro Gly Gln Ala Asn Tyr Val Ala Ala Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Ile Gly Leu Thr Lys Ser Ser Ala Lys Glu Leu Ala Ser Arg Asn

165 170 175

Ile Thr Val Asn Ala Ile Ala Pro Gly Phe Ile Ser Thr Asp Met Thr

180 185 190

Asp Lys Leu Ala Lys Asp Val Gln Asp Glu Met Leu Lys Gln Ile Pro

[0007]

195	200	205	
Leu Ala Arg Phe Gly Glu Pro Ser Asp Val Ser Ser Val Val Thr Phe			
210	215	220	
Leu Ala Ser Glu Gly Ala Arg Tyr Met Thr Gly Gln Thr Leu His Ile			
225	230	235	240
Asp Gly Gly Met Val Met			
	245		
<210>	5		
<211>	732		
<212>	DNA		
<213>	芽孢杆菌 (Bacillus sp.) CGMCC No. 2549		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1) .. (729)		
<400>	5		
atg gaa ctt tat atc atc acc gga gcg tca aaa ggg ctg ggt caa gcc			48
Met Glu Leu Tyr Ile Ile Thr Gly Ala Ser Lys Gly Leu Gly Gln Ala			
1	5	10	15
gtt gca tta cag gct tta gaa aag ggg cat gaa gtc cat gcc tta tcc			96
Val Ala Leu Gln Ala Leu Glu Lys Gly His Glu Val His Ala Leu Ser			
	20	25	30
aga acg aaa acg gat gtc tct cac aaa aaa cta acg cag cat caa ata			144
Arg Thr Lys Thr Asp Val Ser His Lys Lys Leu Thr Gln His Gln Ile			
	35	40	45
gac ctc atc aat ctt gaa gaa gct gga cag caa ttt gaa aca ttg ctc			192
Asp Leu Ile Asn Leu Glu Glu Ala Gly Gln Gln Phe Glu Thr Leu Leu			
	50	55	60
tca tcc atc gat cca gat cgt tat tct ggt att acc ctt atc aat aac			240
Ser Ser Ile Asp Pro Asp Arg Tyr Ser Gly Ile Thr Leu Ile Asn Asn			
	65	70	75
gcc gga atg gta acg ccg atc aaa cgt gcc ggc gaa gcg tct ctt gac			288
Ala Gly Met Val Thr Pro Ile Lys Arg Ala Gly Glu Ala Ser Leu Asp			
	85	90	95

[0008]

gag ctt cag cgc cat tat cag ctg aac ctg act gcg ccc gtg ctt ttg	336
Glu Leu Gln Arg His Tyr Gln Leu Asn Leu Thr Ala Pro Val Leu Leu	
100 105 110	
agt cag ctg ttt aca aaa cgg ttt gct tca tac agc ggc aaa aag acg	384
Ser Gln Leu Phe Thr Lys Arg Phe Ala Ser Tyr Ser Gly Lys Lys Thr	
115 120 125	
gtt gtt aac att act tca gga gcc gcc aaa aat cca tat aag gga tgg	432
Val Val Asn Ile Thr Ser Gly Ala Ala Lys Asn Pro Tyr Lys Gly Trp	
130 135 140	
agc gcg tat tgc agt tca aaa gcc ggg ctc gac atg ttt acg agg aca	480
Ser Ala Tyr Cys Ser Ser Lys Ala Gly Leu Asp Met Phe Thr Arg Thr	
145 150 155 160	
ttc gga ttt gaa cag gag gat gaa gag ctg ccg gtg aac atg att tcg	528
Phe Gly Phe Glu Gln Glu Asp Glu Glu Leu Pro Val Asn Met Ile Ser	
165 170 175	
ttt tca cct gga gtg atg gac act gag atg cag gcc gtc atc cgt tct	576
Phe Ser Pro Gly Val Met Asp Thr Glu Met Gln Ala Val Ile Arg Ser	
180 185 190	
tca tcg aaa aag gat ttc cac cac att gaa cga ttc cgg aaa tta aat	624
Ser Ser Lys Lys Asp Phe His His Ile Glu Arg Phe Arg Lys Leu Asn	
195 200 205	
gaa aca gga agc ctt cgc agt ccg gac ttt att gcc ggc acg ctg ctt	672
Glu Thr Gly Ser Leu Arg Ser Pro Asp Phe Ile Ala Gly Thr Leu Leu	
210 215 220	
tct tta cta gaa aaa ggg acg gaa aac ggc cgc att tat gat att aaa	720
Ser Leu Leu Glu Lys Gly Thr Glu Asn Gly Arg Ile Tyr Asp Ile Lys	
225 230 235 240	
gag ttt ttg tag	732
Glu Phe Leu	

<210> 6

<211> 243

<212> PRT

<213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) CGMCC No. 2549

[0009]

<400> 6
 Met Glu Leu Tyr Ile Ile Thr Gly Ala Ser Lys Gly Leu Gly Gln Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Leu Gln Ala Leu Glu Lys Gly His Glu Val His Ala Leu Ser
 20 25 30
 Arg Thr Lys Thr Asp Val Ser His Lys Lys Leu Thr Gln His Gln Ile
 35 40 45
 Asp Leu Ile Asn Leu Glu Glu Ala Gly Gln Gln Phe Glu Thr Leu Leu
 50 55 60
 Ser Ser Ile Asp Pro Asp Arg Tyr Ser Gly Ile Thr Leu Ile Asn Asn
 65 70 75 80
 Ala Gly Met Val Thr Pro Ile Lys Arg Ala Gly Glu Ala Ser Leu Asp
 85 90 95
 Glu Leu Gln Arg His Tyr Gln Leu Asn Leu Thr Ala Pro Val Leu Leu
 100 105 110
 Ser Gln Leu Phe Thr Lys Arg Phe Ala Ser Tyr Ser Gly Lys Lys Thr
 115 120 125
 Val Val Asn Ile Thr Ser Gly Ala Ala Lys Asn Pro Tyr Lys Gly Trp
 130 135 140
 Ser Ala Tyr Cys Ser Ser Lys Ala Gly Leu Asp Met Phe Thr Arg Thr
 145 150 155 160
 Phe Gly Phe Glu Gln Glu Asp Glu Glu Leu Pro Val Asn Met Ile Ser
 165 170 175
 Phe Ser Pro Gly Val Met Asp Thr Glu Met Gln Ala Val Ile Arg Ser
 180 185 190
 Ser Ser Lys Lys Asp Phe His His Ile Glu Arg Phe Arg Lys Leu Asn
 195 200 205
 Glu Thr Gly Ser Leu Arg Ser Pro Asp Phe Ile Ala Gly Thr Leu Leu
 210 215 220
 Ser Leu Leu Glu Lys Gly Thr Glu Asn Gly Arg Ile Tyr Asp Ile Lys
 225 230 235 240
 Glu Phe Leu

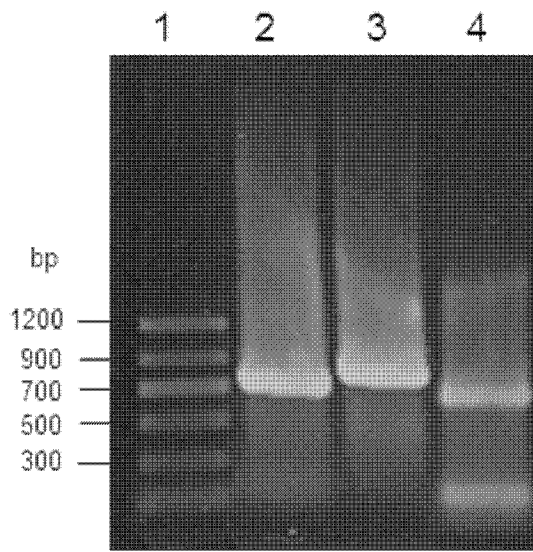


图 1

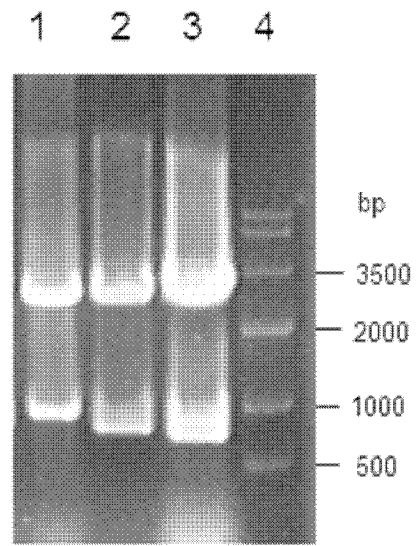


图 2

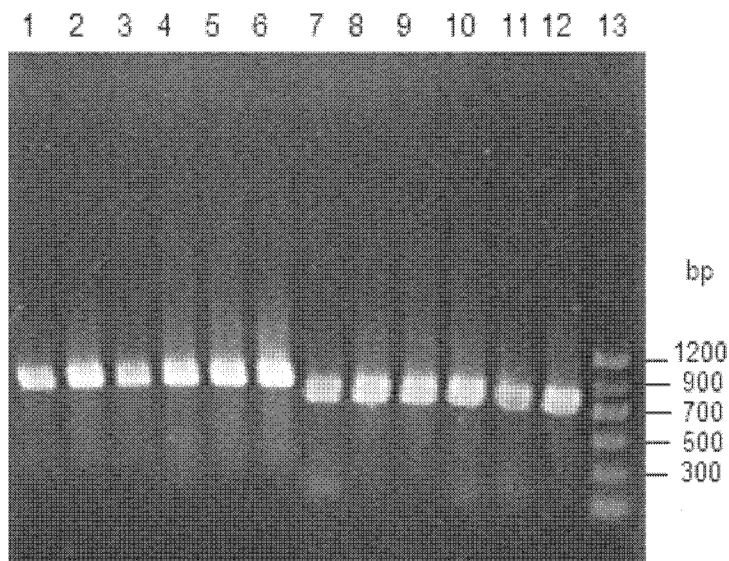


图 3

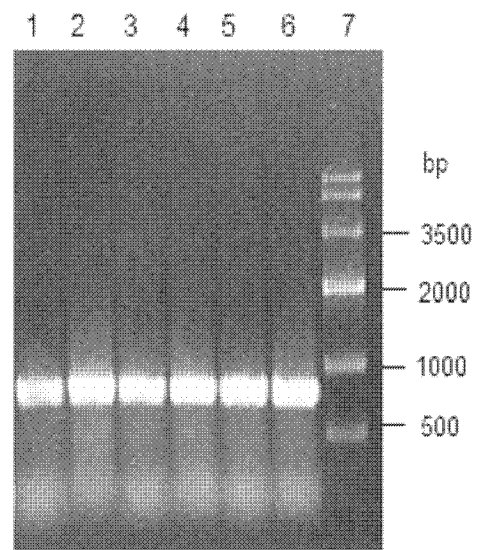


图 4

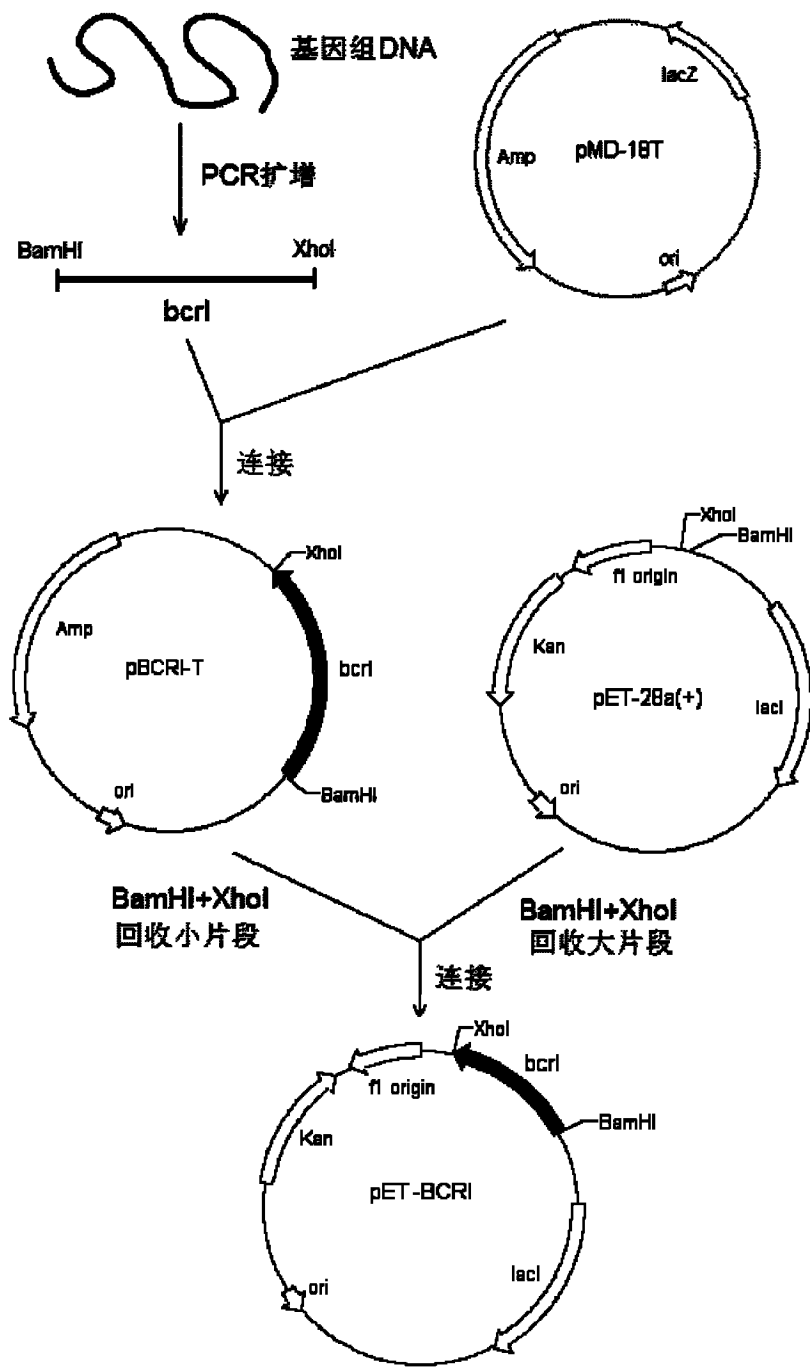


图 5

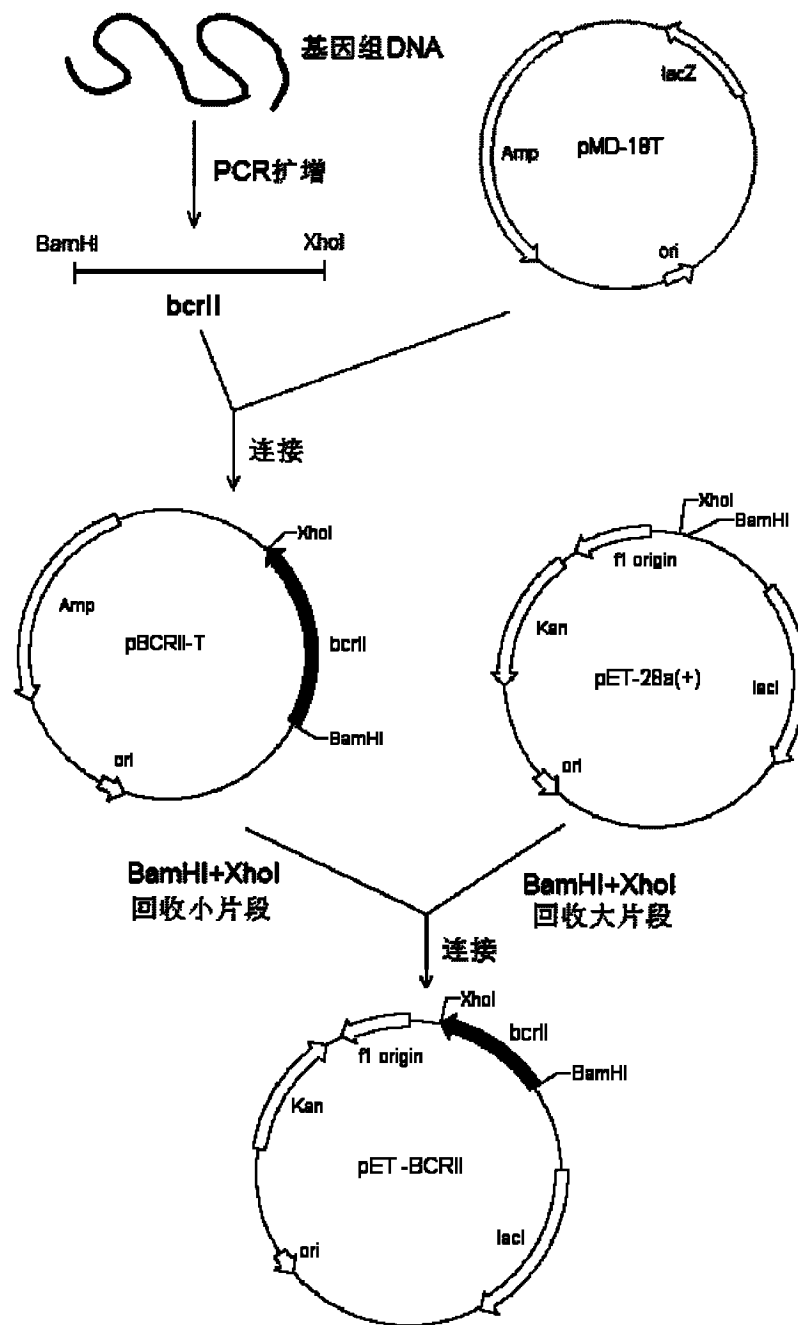


图 6

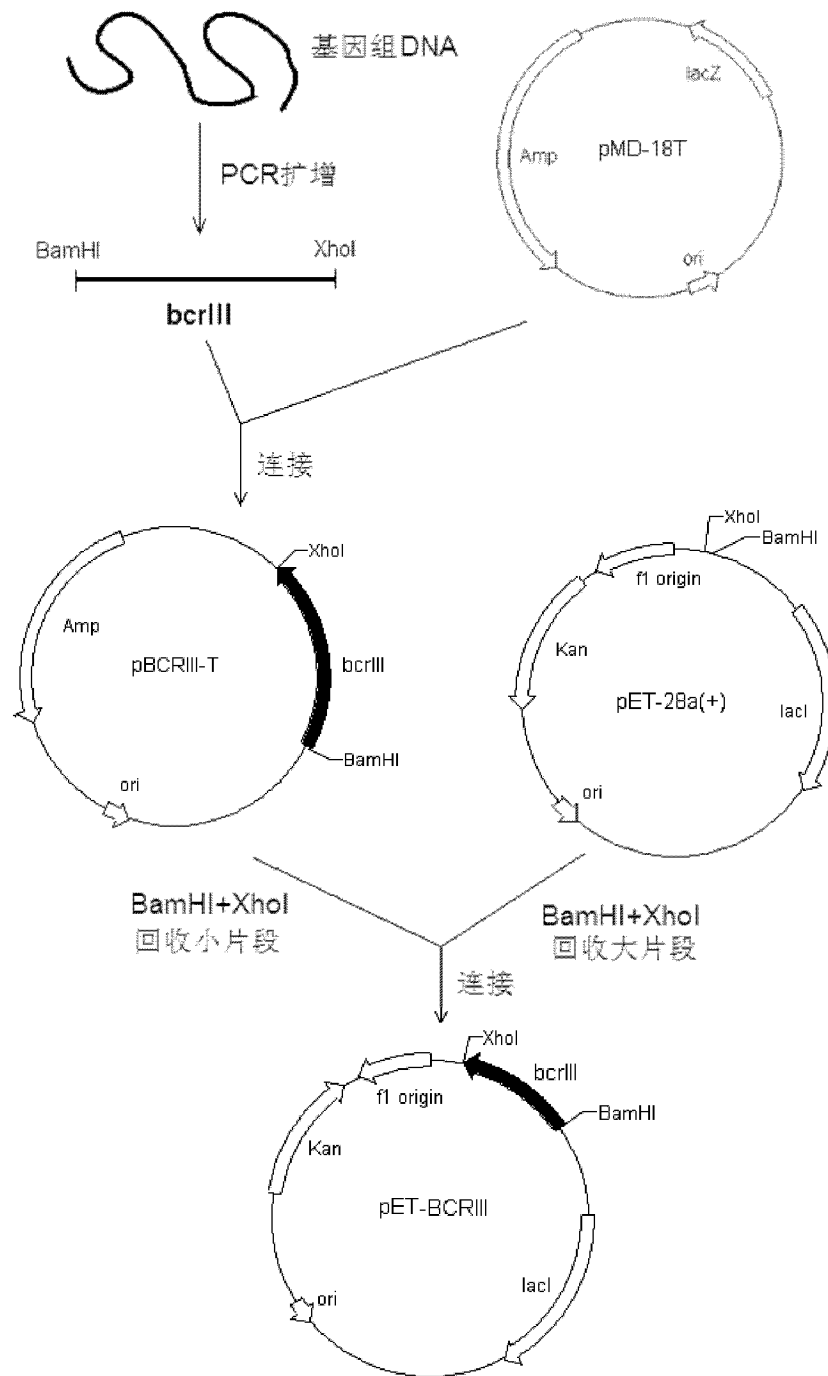


图 7

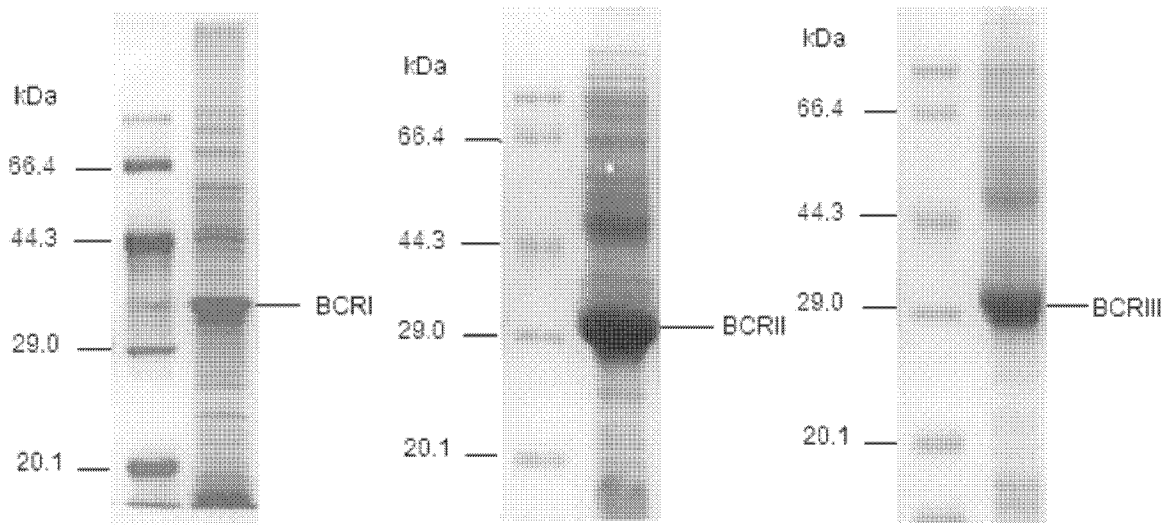


图 8