



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112852790 B

(45) 授权公告日 2022.04.29

(21) 申请号 202110054609.7

(22) 申请日 2018.07.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112852790 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(62) 分案原申请数据
201810765047.5 2018.07.12

(73) 专利权人 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 郑仁朝 郑裕国 张琴 汤晓玲

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 韩聪

(51) Int. Cl.

C12N 9/78 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104962540 A, 2015.10.07

CN 105176955 A, 2015.12.23

CN 104152500 A, 2014.11.19

CN 108715881 A, 2018.10.30

CN 111172140 A, 2020.05.19

CN 104212784 A, 2014.12.17

CN 105505904 A, 2016.04.20

CN 111100856 A, 2020.05.05

US 2021189374 A1, 2021.06.24

US 2021009981 A1, 2021.01.14

龚劲松等. 腈水解酶在医药中间体生物催化研究中的最新进展.《化学进展》.2015, (第04期),

Zhang Qin等.Highly regio- and enantioselective synthesis of chiral intermediate for pregabalin using one-pot bienzymatic cascade of nitrilase and amidase.《Applied microbiology and biotechnology》.2019,第103卷 (续)

审查员 刘波

权利要求书1页 说明书9页

序列表16页 附图2页

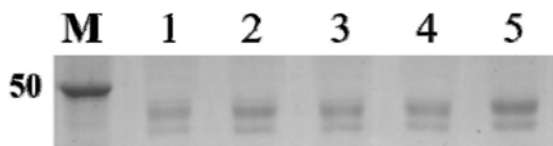
(54) 发明名称

一种植物腈水解酶嵌合酶突变体、编码基因及其应用

(57) 摘要

本分案申请公开了一种十字花科植物腈水解酶嵌合酶突变体,属于生物工程技术领域。本发明将高山南芥腈水解酶氨基酸序列的225-285位肽段嵌入到缺失对应肽段的芜菁腈水解酶中,获得芜菁/高山南芥腈水解酶嵌合体BaNIT,进而对嵌合体BaNIT的编码基因进行定点饱和突变,使得嵌合体氨基酸序列的第223位的L突变为Q,获得植物腈水解酶嵌合酶突变体BaNIT-L223Q。本发明提供的植物腈水解酶嵌合酶突变体的催

化活力提高1.31倍,重组蛋白的可溶性提高,对映体选择率E值保持在400以上,在高效催化外消旋异丁基丁二腈合成(S)-3-氰基-5-甲基己酸中具有良好的应用前景。



CN 112852790 B

[接上页]

(56) 对比文件

Toshiki Ishikawa等. Isoform-Specific Localization of Brassica rapa Nitrilases in Root Infected with Plasmodiophora brassicae Revealed Using In Situ

Hybridization Probes Improved with Locked Nucleic Acids.《Journal of Plant Growth Regulation》.2009,第29卷

李继彬等. 脲水解酶克隆表达、固定化及分子改造的研究进展.《中国生物工程杂志》.2017,第37卷(第9期),

1. 一种植物脲水解酶突变体,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。
2. 一种编码如权利要求1所述的植物脲水解酶突变体的编码基因,其特征在于,所述编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。
3. 一种包含如权利要求2所述的编码基因的重组载体。
4. 一种包含如权利要求3所述的重组载体的重组基因工程菌。
5. 一种植物脲水解酶突变体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - (1) 针对茺菁脲水解酶基因序列,设计PCR引物,以高山南芥cDNA为模板,利用所述PCR引物扩增获得含有高山南芥脲水解酶核苷酸序列675-855位的DNA片段I;
 - (2) 以携带有茺菁脲水解酶基因的重组质粒为模板,利用反向PCR扩增获得茺菁脲水解酶核苷酸序列678-858位缺失的BrNIT质粒片段;
 - (3) 将DNA片段I和BrNIT质粒片段重组,再将重组产物转化至宿主菌,筛选获得重组后的亲本脲水解酶表达菌株,其中亲本脲水解酶的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;
 - (4) 设计定点突变引物,以步骤(3)获得的携带有亲本脲水解酶基因的重组质粒为模板,进行重叠延伸PCR,获得亲本脲水解酶中第223位的L突变为Q单位点突变产物;
 - (5) 将所述单位点突变产物转化至宿主菌,筛选获得脲水解酶突变体表达菌株,诱导表达,获得所述的植物脲水解酶突变体。
6. 如权利要求1所述的植物脲水解酶突变体在催化外消旋异丁基丁二脲制备(S)-3-氰基-5-甲基己酸中的应用。
7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述的应用为以含有植物脲水解酶突变体编码基因的工程菌经发酵培养后离心获得的湿菌体、湿菌体固定化细胞、湿菌体超声破碎后提取的酶或者固定化酶为催化剂,以外消旋异丁基丁二脲为底物,以pH为6-10的缓冲液为反应介质,在20-50℃、200-400rpm条件下水浴反应,反应结束后,将反应液分离纯化,获得(S)-3-氰基-5-甲基己酸。
8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,反应体系中,底物的浓度为100-150g/L,催化剂的用量以湿菌体重量计为5-20g/L,其中湿菌体含水质量为70-90%。
9. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述反应介质为pH值为8.0的Tris-HCl缓冲液,催化反应温度为35℃。

一种植物脘水解酶嵌合酶突变体、编码基因及其应用

[0001] 本申请为申请号201810765047.5、申请日2018年7月12日、发明名称“一种植物脘水解酶突变体、编码基因及其应用”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及生物工程技术领域,具体涉及一种十字花科植物脘水解酶突变体、编码基因,及其在水解外消旋异丁基丁二脘制备普瑞巴林关键手性中间体(S)-3-氰基-5-甲基己酸中的应用。

背景技术

[0003] 脘类化合物是有机合成的重要中间体,可以合成酰胺、羧酸、氧肟酸等附加值更高、应用范围更广的化学品,广泛应用于化工、农药和医药等工业领域。但脘的化学水解往往需要强酸(或强碱)、高温、高压等反应条件,环境污染严重。脘水解酶生物催化具有高度的化学、区域及立体选择性,且反应条件温和、环境污染小,符合绿色可持续发展的要求,在有机化工领域具有广阔的应用前景。目前脘水解酶已成功应用于烟酸、(R)-扁桃酸和1,5-二甲基-2-哌啶酮等精细和医药化学品的工业化生产。

[0004] 随着现代分子生物学技术的发展以及工业生产环境对生物催化剂的需求,蛋白质分子改造已成为当前酶工程研究的热点。分子改造技术在脘水解酶催化活力、底物特异性、热稳定性和立体选择性等应用属性的改造中发挥了重要作用。

[0005] Schreiner等对*Alcaligenes faecalis*脘水解酶进行分子改造,获得了一株可以高效催化(R)-2-氯-扁桃脘水解合成(R)-2-氯-扁桃酸的突变体(Enzyme Microb.Tech., 2010, 47, 140-146)。DeSantis等利用DNA改组技术改造脘水解酶,分别获得能够催化3-羟基戊二脘合成S-型和R-型产物的脘水解酶突变体,ee值大于95%,产率达到98%(J.Am.Chem.Soc., 2003, 125, 11476-11477)。

[0006] 外源基因在大肠杆菌表达的一个挑战是目的蛋白常形成无活性的包涵体,严重影响酶的催化性能。分子改造技术可通过替换某个或某几个氨基酸,减少包涵体的形成,提高蛋白的可溶性表达。Xie等人通过对Lov D氨基酸序列半胱氨酸残基的替换,成功构建催化活力和蛋白可溶性表达均提高50%的双突变体C40A/C60N(Biotechnol.Bioeng., 2009, 102, 20-28)。

[0007] 普瑞巴林(Pregabalin,简称PGB),化学名为(S)-3-氨基-5-甲基己酸,是抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)的3位异丁基取代物(Angew.Chem.Int.Ed., 2008, 47, 3500-3504),是治疗脊髓损伤、焦虑以及癫痫等疾病的主要药物。脘水解酶区域、立体选择性水解外消旋异丁基丁二脘(IBSN)合成普瑞巴林关键手性中间体(S)-3-氰基-5-甲基己酸((S)-CMHA)路线具有原料廉价、工艺简单、原子经济性高等显著优势。但目前已报道的脘水解酶催化活力及立体选择性低,不能满足工业化生产需求。因此,开发能够高效拆分IBSN的新型、高效脘水解酶具有重要意义。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种可溶性和催化活性均提高的十字花科植物腓水解酶突变体,满足工业化生产的要求。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0010] 本发明将高山南芥腓水解酶(AaNIT)氨基酸序列的225-285位肽段嵌入到缺失对应肽段的芜菁腓水解酶(BrNIT)中,获得芜菁/高山南芥腓水解酶嵌合体(BaNIT),其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。进而对嵌合体BaNIT的编码基因进行定点饱和突变,使得嵌合体BaNIT的第223位的L突变为Q,获得植物腓水解酶突变体BaNIT-L223Q。

[0011] 具体地,BaNIT-L223Q(第223位的L突变为Q)氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0012] 研究表明,相较于野生型腓水解酶,嵌合体(BaNIT)对底物外消旋IBSN的催化活性、立体选择性显著提升。上述的植物腓水解酶突变体的可溶性、催化活力比嵌合体(BaNIT)又有进一步的提升。

[0013] 对所述植物腓水解酶突变体的其他氨基酸位点的保守取代形式、增加或缺失一个或几个氨基酸的形式、氨基端截断的形式、羧基端截断的形式,这些突变体形式也包括在本发明的范围内。

[0014] 本发明还提供了编码所述植物腓水解酶突变体的编码基因,所述编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0015] 本发明还提供了包含所述编码基因的重组载体。作为优选,原始载体为pET28b。

[0016] 本发明还提供了包含所述重组载体的重组基因工程菌。所述重组载体转化宿主细胞获得重组基因工程菌,所述宿主细胞可以为本领域的各种常规宿主细胞,作为优选,宿主细胞为大肠杆菌E.coli BL21。

[0017] 本发明还提供了一种构建所述的植物腓水解酶突变体的制备方法,所述的制备方法包括以下步骤:

[0018] (1) 针对芜菁腓水解酶基因序列,设计PCR引物,以高山南芥cDNA为模板,利用所述PCR引物扩增获得含有高山南芥腓水解酶核苷酸序列675-855位的DNA片段I;

[0019] (2) 以携带有芜菁腓水解酶基因的重组质粒为模板,利用反向PCR扩增获得芜菁腓水解酶核苷酸序列678-858位缺失的BrNIT质粒片段;

[0020] (3) 将DNA片段I和BrNIT质粒片段重组,再将重组产物转化至宿主菌,筛选获得重组后的亲本腓水解酶表达菌株,其中亲本腓水解酶的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

[0021] (4) 设计定点突变引物,以步骤(3)获得的携带有亲本腓水解酶基因的重组质粒为模板,进行重叠延伸PCR,获得亲本腓水解酶中第223位的L突变为Q单位点突变产物;

[0022] (5) 将所述单位点突变产物转化至宿主菌,筛选获得腓水解酶突变体表达菌株,诱导表达,获得所述的植物腓水解酶突变体。

[0023] 步骤(1)-(3)中,采用一步克隆的方法将高山南芥腓水解酶(AaNIT)225-285位肽段对应的核苷酸序列嵌入到缺失对应肽段的芜菁腓水解酶(BrNIT)质粒片段中,获得亲本腓水解酶(BaNIT)工程菌。

[0024] 其中扩增DNA片段I所需的引物:

[0025] 上游引物:5'-GAATGGCAGTCTTCTATGATGCACATCGC-3'(SEQ ID NO.17);

[0026] 下游引物:5'-GAAGTTCGGACCAGCCAGAACCTGACCC-3'(SEQ ID NO.18)。

[0027] 扩增BrNIT质粒片段所需引物:

[0028] 上游引物:5'-GCGATGTGCATCATAGAAGACTGCCATTC-3' (SEQ ID NO.19);

[0029] 下游引物:5'-GGGTCAGGTTCTGGCTGGTCCGAACCTTC-3' (SEQ ID NO.20)。

[0030] 步骤(4)中,对亲本脲水解酶基因进行饱和和定点突变。

[0031] 其中223位的Leu突变为Gln所需的引物:

[0032] 上游引物:5'-CAGTCTTCTATGCTGCACATCGCTCTGGAAGG-3' (SEQ ID NO.21);

[0033] 下游引物:5'-CCTTCCAGAGCGATGTGCAGCATAGAAGACTG-3' (SEQ ID NO.22)。

[0034] 进一步地,所述制备方法还包括:步骤(5)中,以所述单位点突变产物为模板,利用定点突变引物进行重叠延伸PCR获得第263位的H突变为D或第279位的Q突变为E的双位点突变产物,将所述双位点突变产物转化至宿主菌,筛选获得脲水解酶突变体表达菌株,诱导表达,获得植物脲水解酶突变体BaNIT-L223Q/H263D(223位的L突变为Q、263位的H突变为D,氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示)或BaNIT-L223Q/Q279E(223位的L突变为Q、279位的Q突变为E,氨基酸序列如SEQ ID NO.12所示)。

[0035] 具体地,其中263位的His突变为Asp所需的引物:

[0036] 上游引物:5'-CAACCAGGAAGACGACGCTATCGTTTCTCAGGG-3' (SEQ ID NO.23);

[0037] 下游引物:5'-CCCTGAGAAACGATAGCGTCGCTTCTGTTG-3' (SEQ ID NO.24)。

[0038] 279位的Gln突变为Glu所需的引物:

[0039] 上游引物:5'-CATCTCTCCGCTGGGTCAGGTTCTGGCTGG-3' (SEQ ID NO.25);

[0040] 下游引物:5'-CCAGCCAGAACCTGACCCAGCGGAGAGATG-3' (SEQ ID NO.26)。

[0041] 作为优选,所述重组质粒的原始载体为pET28b。所述宿主菌为大肠杆菌*E.coli* BL21。

[0042] 本发明的另一个目的是提供所述的植物脲水解酶突变体在催化外消旋异丁基丁二脲制备(S)-3-氰基-5-甲基己酸中的应用。

[0043] 所述的应用为以含有植物脲水解酶突变体编码基因的工程菌经发酵培养后离心获得的湿菌体、湿菌体固定化细胞、湿菌体超声破碎后提取的酶或者固定化酶为催化剂,以外消旋异丁基丁二脲为底物,以pH为6-10的缓冲液为反应介质,在20-50℃、200-400rpm条件下水浴反应,反应结束后,将反应液分离纯化,获得(S)-3-氰基-5-甲基己酸。

[0044] 本发明所述的脲水解酶突变体可以以工程菌全细胞形式使用,也可以是未经纯化的粗酶形式使用,也可以是部分纯化的或完全纯化的酶的形式使用。还可以利用本领域已知的固定化技术将本发明的脲水解酶突变体制成固定化酶或固定化细胞形式的生物催化剂。

[0045] 作为优选,反应体系中,底物的浓度为100-150g/L,催化剂的用量以湿菌体重量计为5-20g/L,其中湿菌体含水质量为70-90%。

[0046] 作为优选,所述反应介质为pH值为8.0的Tris-HCl缓冲液,催化反应温度为35℃。

[0047] 作为优选,所述的湿菌体为含植物脲水解酶突变体编码基因的重组工程菌*E.coli* BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q。

[0048] 发酵培养方法为:重组工程菌接种至含卡那霉素(终浓度为50mg/L)的LB液体培养基中,37℃、200rpm条件下振荡培养8h;种子液以2%体积比接种至新鲜的含有卡那霉素(终浓度为50mg/L)的LB液体培养基中,37℃、150rpm条件下振荡培养至菌体OD₆₀₀为0.6-0.8,加

入终浓度为0.1mM的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),28℃、150rpm诱导培养10h,于4℃、9000rpm离心10min收集菌体细胞。生理盐水洗涤两次,并将离心所得菌体放置-20℃冰箱保存。

[0049] 本发明具备的有益效果:

[0050] 本发明提供的植物脲水解酶嵌合酶突变体BaNIT-L223Q较亲本脲水解酶嵌合体(BaNIT)的催化活力提高1.31倍,重组蛋白的可溶性提高,对映体选择率E值保持在400以上,在高效催化外消旋异丁基丁二脲合成(S)-3-氰基-5-甲基己酸中具有良好的应用前景。

附图说明

[0051] 图1为脲水解酶突变体的可溶性表达(SDS-PAGE凝胶电泳图),其中M为marker,其条带位置代表50kD,泳道1为BaNIT,泳道2为BaNIT-L223Q,泳道3为BaNIT-H263D,泳道4为BaNIT-Q279E,泳道5为BaNIT-L223Q/H263D/Q279E。

[0052] 图2为脲水解酶突变体L223Q/H263D/Q279E与亲本BaNIT及野生型BrNIT全细胞催化IBSN对比图。

[0053] 图3为脲水解酶突变体L223Q/H263D/Q279E全细胞(5g/L)催化IBSN(100g/L)制备(S)-CMHA反应进程图。

具体实施方式

[0054] 下面结合具体实施例对本发明作进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0055] 实施例1

[0056] 亲本脲水解酶基因的构建

[0057] 通过对十字花科植物脲水解酶核苷酸和氨基酸序列进行比对分析,确定关键的肽段225-285区域。野生型芜菁脲水解酶(BrNIT)序列见GenBank登录号:ABM55734.1;野生型高山南芥脲水解酶(AaNIT)序列见GenBank登录号:KFK44999。

[0058] 采用一步克隆的方法将高山南芥脲水解酶(AaNIT)225-285位肽段对应的核苷酸序列嵌入到缺失对应肽段的芜菁脲水解酶(BrNIT)质粒片段中。设计引物见表1。

[0059] 表1:BaNIT嵌合酶引物设计表

	引物名称	引物序列(5' to 3')
[0060]	肽段(225-285)上游引物	GAATGGCAGTCTTCTATGCTGCACATCGC
	肽段(225-285)下游引物	GAAGTTCGGACCAGCCAGAACCTGACCC
[0061]	克隆载体(226-286)上游引物	GCGATGTGCAGCATAGAAGACTGCCATTC
	克隆载体(226-286)下游引物	GGGTCAGGTTCTGGCTGGTCCGAACCTC

[0062] 以AaNIT核苷酸序列为模板,克隆225-285位肽段的DNA片段。PCR反应体系(50μL): Template DNA<1μg, 2×TsingKe[®] Master Mix,上下游引物各0.2μM,其余ddH₂O补充至总体积。PCR反应参数:(1)94℃预变性5min;(2)94℃变性30s;(3)58℃退火30s;(4)72℃延伸

10s,步骤(2)-(4)循环30次;(5)72℃再次延伸10min,4℃保存。PCR产物经过琼脂糖凝胶电泳分析后切胶回收,65℃灭活10min,放置4℃备用。

[0063] 同时,以包含BrNIT核苷酸序列的重组质粒为模板,设计引物扩增缺失226-286位肽段的BrNIT质粒片段。

[0064] 载体线性化采用反向PCR扩增的方式获得。PCR反应体系(50μL):模板DNA 0.1ng-1ng,2×Phanta Max Buffer,dNTPs(10mM each)0.2mM,上下游引物各0.2μM,Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1U,其余ddH₂O补充至总体积。PCR反应参数:(1)95℃预变性30s;(2)95℃变性15s;(3)63℃退火15s;(4)72℃延伸6.0min,步骤(2)-(4)循环30次;(5)72℃彻底延伸5min,4℃保存。PCR产物经过琼脂糖凝胶电泳分析后,加入内切酶Dpn I于37℃消化3h,65℃灭活10min。

[0065] 将缺失对应肽段基因片段的BrNIT载体序列进行线性化,在插入片段正/反向PCR引物5'端引入线性化载体的末端序列,使得PCR产物5'和3'最末端分别带有和线性化载体两末端一致的序列。

[0066] 将上述所获得的插入片段和线性化载体利用NanoDrop™ One/OneC超微量紫外分光光度计进行基因浓度测定,计算出各个插入肽段及对应缺失肽段的线性化载体的添加量。连接反应体系:线性化载体0.03pmol、插入片段0.06pmol、5×CE II Buffer4μL、Exnase II 2μL、ddH₂O to 20μL。将PCR样品混匀后,放置37℃保温30min,降至4℃。

[0067] 将连接好的PCR产物热击转化入大肠杆菌E.coli BL21 (DH5α)感受态细胞中,复苏后涂布于含卡那霉素抗性的固体LB平板培养。挑取单菌落,接入LB液体培养基孵育,提取质粒测序。测序结果正确者即为亲本脲水解酶基因核苷酸序列,即序列表中的SEQ ID NO.1(氨基酸序列为SEQ ID NO.2)。将亲本脲水解酶基因转化入大肠杆菌E.coli BL21 (DE3)感受态细胞中,涂布于含卡那霉素的LB平板上培养过夜,即可获得亲本脲水解酶工程菌E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT。

[0068] 实施例2

[0069] 脲水解酶位点223、263及279的定点饱和突变

[0070] 为了将亲本氨基酸序列中的第223位点的Leu(L)、第263位点的His(H)及第279位点的Gln(Q)进行饱和突变,设计相对应的引物,如表2所示。

[0071] 表2:引物设计表

引物名称	引物序列(5' to 3')
L223-Forward	CAGTCTTCTAIGNNKACATCGCTCTGGAAGG
L223-Reverse	CCTTCCAGAGCGATGTGMNNCATAGAAGACTG
[0072] H263-Forward	CAACCAGGAAGACNNKGCTATCGTTTCTCAGGG
H263-Reverse	CCCTGAGAAACGATAGCMNNGTCTTCCTGGTTG
Q279-Forward	CATCTCTCCGCTGGGTNNKGTCTGGCTGG
Q279-Reverse	CCAGCCAGAACMNNACCCAGCGGAGAGATG

[0073] 注:N=A/G/C/T,K=G/T,M=A/C。

[0074] 以含有目的基因片段的重组质粒pET28b-BaNIT作为模板,根据重叠延伸PCR的方

法对模板进行全质粒扩增。

[0075] PCR扩增体系为(50 μ L):模板DNA 0.1ng-1ng,2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L,dNTPs (10mM each) 1 μ L,突变引物上游和下游各1 μ L,Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1U,其余ddH₂O补充至总体积。

[0076] PCR反应参数:(1)95 $^{\circ}$ C预变性30s;(2)95 $^{\circ}$ C变性15s;(3)63 $^{\circ}$ C退火15s;(4)72 $^{\circ}$ C延伸6min,步骤(2)-(4)循环30次;(5)72 $^{\circ}$ C彻底延伸5min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0077] PCR产物经过0.9%琼脂糖凝胶电泳分析为阳性后,取PCR反应液20 μ L,加入1 μ L内切酶Dpn I于37 $^{\circ}$ C酶切3h去除模板质粒DNA,65 $^{\circ}$ C灭活10min。热击转化到E.coliBL21 (DE3)感受态细胞中,复苏后涂布于含卡那霉素的LB平板上培养过夜,每个平板均获得约300个克隆的突变体库。

[0078] 挑取单菌落于装有LB培养基的96孔培养板,37 $^{\circ}$ C培养至菌体OD₆₀₀约为0.6-0.8时,向上述LB液体培养基中加入IPTG(终浓度为0.1mM),28 $^{\circ}$ C,150rpm诱导培养10-12h。采用96孔板离心机进行离心,条件为4 $^{\circ}$ C,3000rpm离心30min,弃上清,于收集的菌体中加入600 μ L磷酸钠缓冲液(50mM,pH 7.4)混合均匀。

[0079] 取200 μ L菌悬液与10 μ L IBSN(100mg/mL溶解于N,N-二甲基亚砷中)混匀,37 $^{\circ}$ C振荡反应1h,每个孔中加入30 μ L 2M HCl中止反应。吸取10 μ L反应液与150 μ L邻苯二甲醛与巯基乙醇的组合剂混匀,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育30min;于酶标仪下检测各个样品荧光值强度,其中激发波长设为412nm,发射波长设为467nm。根据荧光强度的变化,判断突变体的催化活性,进而筛选出变化强度远远大于对照菌株(出发菌株)的克隆子。

[0080] 筛选出的阳性克隆子经过复筛验证后,抽取突变株的全质粒,经DNA测序确定引入的点突变,各个位点活力最高的突变株DNA测序结果显示223位的Leu突变为Gln(L223Q)、263位的His突变为Asp(H263D)及279位的Gln突变为Glu(Q279E),进而获得脲水解酶突变体工程菌E.coli BL21 (DE3)/pET28b-BaNIT-L223Q、E.coli BL21 (DE3)/pET28b-BaNIT-H263D及E.coli BL21 (DE3)/pET28b-BaNIT-Q279E。突变体L223Q、H263D及Q279E的核苷酸序列分别为SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5及SEQ ID NO.7(对应的氨基酸序列为SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6及SEQ ID NO.8)。

[0081] 实施例3

[0082] 脲水解酶组合突变体的构建

[0083] 以表达质粒pET28b-BaNIT-L223Q或pET28b-BaNIT-H263D为模板,通过全质粒扩增进行定点突变。

[0084] PCR扩增体系为(50 μ L):模板DNA 0.1ng-1ng,2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L,dNTPs (10mM each) 1 μ L,突变引物上游和下游各1 μ L,Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L,其余ddH₂O补充至总体积。

[0085] PCR反应参数:(1)95 $^{\circ}$ C预变性30s;(2)95 $^{\circ}$ C变性15s;(3)60 $^{\circ}$ C退火15s;(4)72 $^{\circ}$ C延伸6min,步骤(2)-(4)循环30次;(5)72 $^{\circ}$ C彻底延伸5min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0086] PCR产物经过0.9%琼脂糖凝胶电泳分析为阳性后,取PCR反应液20 μ L,加入1 μ L内切酶Dpn I于37 $^{\circ}$ C酶切3h去除模板质粒DNA,65 $^{\circ}$ C灭活10min。热击转化到E.coli BL21 (DE3)感受态细胞中,复苏后涂布于含卡那霉素的LB平板上培养过夜,挑取单菌落培养于含卡那霉素抗性(终浓度为50mg/L)的LB液体培养基中,提取质粒测序。

[0087] 测序结果正确者即为脲水解酶组合突变体工程菌株E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/H263D、E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/Q279E、E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-H263D/Q279E、E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/H263D/Q279E,组合突变体工程菌株对应的的核苷酸序列分别为SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13及SEQ ID NO.15 (对应的氨基酸序列为SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14及SEQ ID NO.16)。

[0088] 实施例4

[0089] 脲水解酶突变体的表达

[0090] 实施例2和实施例3中得到的突变体BaNIT-L223Q、BaNIT-H263D、BaNIT-Q279E,组合突变体BaNIT-L223Q/H263D、BaNIT-L223Q/Q279E、BaNIT-H263D/Q279E及BaNIT-L223Q/H263D/Q279E,以及亲本BaNIT和野生型BrNIT接种到含有卡那霉素(终浓度为50mg/L)的LB培养基中,37℃培养6-8h,以2% (v/v) 接种量转接至新鲜的含有卡那霉素(终浓度为50mg/L)的LB液体培养基中进行扩大培养,37℃,150rpm培养至菌体OD₆₀₀约为0.6-0.8时,向上述LB液体培养基中加入IPTG(终浓度为0.1mM),28℃、150rpm诱导培养10-12h,于4℃、9000rpm离心10min收集菌体细胞。生理盐水洗涤两次,并将离心所得菌体放置-20℃冰箱保存。

[0091] 实施例5

[0092] 脲水解酶突变体的可溶性表达研究

[0093] 将实施例4中收集到的菌体细胞(等量)溶解于pH为8.0的Tris-HCl(50mM)缓冲液中,重悬菌体后超声波破碎(400W,5min,1s破碎1s暂停)。破碎产物离心(12000rpm,5min)后分别取上清液(粗酶液)进行变性处理,采用SDS-PAGE凝胶电泳验证蛋白的可溶性表达水平。

[0094] 由SDS-PAGE凝胶电泳结果(图1)可知,突变体BaNIT-L223Q、BaNIT-H263D、BaNIT-Q279E的可溶性表达水平相较亲本BaNIT略有提高,三重突变体BaNIT-L223Q/H263D/Q279E的可溶性表达水平有大幅度的提高。由此可知,通过对亲本BaNIT进行改造,提高了目的蛋白的可溶性。

[0095] 实施例6

[0096] 含脲水解酶突变体的重组大肠杆菌活力的测定

[0097] 对实施例4中获得的重组大肠杆菌进行活力测定。反应体系组成:1mL的Tris-HCl缓冲溶液(50mM,pH 8.0),IBSN 20mM,湿菌体0.2mg。反应液于40℃预热2min后,600rpm反应10min。取样500μL,加入200μL 2M HCl终止反应并用乙酸乙酯进行萃取,取上层有机相用无水硫酸钠干燥后,采用气相色谱测定底物的转化率和产物的对映体过量值(ee)。

[0098] 底物IBSN和产物CMHA的对映体过量值由气相色谱测定。气相色谱型号为7890N(安捷伦),毛细管柱型号为BGB-174(BGB Analytik Switzerland)。色谱条件为:进样量1.0μL,进样口、检测器温度均为250℃,柱温为120℃保持15min,10℃/min升温至170℃,保持9min。载气为高纯氦气,流速为1.0mL/min,分流比为50:1。对映体过量值(ee)、转化率(c)的计算参考Rakels等的计算方法(Enzyme Microb.Technol.,1993,15:1051)。

[0099] 含脲水解酶突变体的重组大肠杆菌活力测定结果见表3和表4,组合突变体催化活力较亲本明显提高,其中三重突变体BaNIT-L223Q/H263D/Q279E的活力是亲本的2.2倍,且所有突变体的E值保持在400以上。

[0100] 表3:脲水解酶的活力对比

酶的名称	氨基酸序列号	相对活力	<i>E</i>
<i>Ba</i> NIT	SEQ ID NO.2	100	> 400
<i>Ba</i> NIT-L223Q	SEQ ID NO.4	131	> 400
<i>Ba</i> NIT-H263D	SEQ ID NO.6	125	> 400
[0101] <i>Ba</i> NIT-Q279E	SEQ ID NO.8	144	> 400
<i>Ba</i> NIT-L223Q/H263D	SEQ ID NO.10	179	> 400
<i>Ba</i> NIT-L223Q /Q279E	SEQ ID NO.12	173	> 400
<i>Ba</i> NIT-H263D /Q279E	SEQ ID NO.14	176	> 400
<i>Ba</i> NIT-L223Q/H263D/Q279E	SEQ ID NO.16	223	> 400

[0102] 表4:脲水解酶的活力对比

酶的名称	氨基酸序列号	相对活力	<i>E</i>
野生型 <i>Br</i> NIT	GenBank: ABM55734.1	100	150
[0104] 亲本 <i>Ba</i> NIT	SEQ ID NO.2	249.5	> 400

[0105] 实施例7

[0106] 含脲水解酶重组大肠杆菌在(S)-CMHA制备中的应用(一)

[0107] 转化体系组成及转化操作如下:1L的Tris-HCl缓冲溶液(50mM,pH 8.0)中,分别加入实施例4中获得的重组脲水解酶突变体*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b-*Ba*NIT-L223Q/H263D/Q279E、亲本*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b-*Ba*NIT及野生型*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b-*Br*NIT(添加量分别为15g/L),底物的含量为100g/L。反应条件:35℃、400rpm,反应期间用手性气相色谱检测反应进程,气相色谱检测条件如实施例6所示。

[0108] 由图2可知,反应10h,突变体*Ba*NIT-L223Q/H263D/Q279E和亲本*Ba*NIT的转化率分别达到48.1%和40.4%,且产物(S)-CMHA的*E*值均保持在400以上;而野生型*Br*NIT的转化率为35.1%,产物(S)-CMHA的*E*值约为150左右。

[0109] 反应10h后中止上述反应,离心除去大肠杆菌细胞,反应液减压蒸馏至1/3体积。加入2倍体积(减压蒸馏后样品)的乙酸乙酯进行萃取,收集下层水相。用2M HCl调节下层水相收集液pH至4.0。再次加入2体积的乙酸乙酯萃取,弃下层水相。收集上层有机相并进行旋转蒸发除去乙酸乙酯,得到呈油状的(S)-3-氰基-5-甲基己酸(ee>99.5%)。

[0110] 实施例8

[0111] 含脲水解酶的重组大肠杆菌在(S)-CMHA制备中的应用(二)

[0112] 催化体系组成及催化操作如下:100mL Tris-HCl缓冲体系中(50mM,pH 8.0),底物IBSN添加量为150g/L,加入实施例4中获得的重组脲水解酶突变体*E. coli* BL21 (DE3) /pET28b-*Ba*NIT-L223Q/H263D/Q279E(20g/L);反应条件:30℃、400rpm,反应进程通过气相色谱进行检测,气相色谱检测条件如实施例6所示。

[0113] 反应10h,转化率达到40.1%,产物ee>99.6%。

[0114] 实施例9

[0115] 含脲水解酶的重组大肠杆菌在(S)-CMHA制备中的应用(三)

[0116] 分别称取0.1g的实施例4中获得的E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/H263D,E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/Q279E,E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-H263D/Q279及亲本菌株E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT湿菌体悬浮于10mL的Tris-HCl缓冲体系中(50mM,pH 8.0)。加入100g/L的IBSN,30℃、200rpm条件下水浴反应。于不同时间取样检测其反应进程,样品处理方式和检测方式如实施例6所示。

[0117] 反应10h,E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/H263D,E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/Q279E,E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-H263D/Q279及亲本菌株E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT的转化率分别达到43.6%,41.9%,42.7%及30.2%。

[0118] 实施例10

[0119] 含脲水解酶的重组大肠杆菌在(S)-CMHA制备中的应用(四)

[0120] 称取0.05g的实施例4中获得的E.coli BL21 (DE3) /pET28b-BaNIT-L223Q/H263D/Q279E湿菌体悬浮于10mL的Tris-HCl缓冲体系中(50mM,pH 8.0)。加入1.0g的IBSN,35℃、200rpm条件下水浴反应。于不同时间取样检测其反应进程,样品处理方式和检测方式如实施例6所示。由图3可知,反应18h,转化率达到43.5%,产物ee>99.3%。

[0121] 本发明不受上述具体文字描述的限制,本发明可在权利要求书所概括的范围内做各种改变,这些改变均在本发明的范围之内。

[0001]		序列表	
[0002]	<110>	浙江工业大学	
[0003]	<120>	一种植物腓水解酶嵌合酶突变体、编码基因及其应用	
[0004]	<160>	26	
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
[0006]	<210>	1	
[0007]	<211>	1050	
[0008]	<212>	DNA	
[0009]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[0010]	<400>	1	
[0011]		atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgcta ccaactccagg tttccccggac	60
[0012]		atccctagca ccatcgttcg cgccacgata gttcaggett ccaactgtata caacgacact	120
[0013]		cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaattc atcgcggaag ctgctagcga cgggtgcgcag	180
[0014]		ctgggtgtct ttccggaagc tttcatcgct ggttacccgc gtggctatcg tttcggcatc	240
[0015]		ggtgtaggtg tgcacaacga ggcgggccgt gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg	300
[0016]		atcgttgtcc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc	360
[0017]		tacctggtaa tgggtgcat ggagaaagat ggttataccc tgtactgtac tgcgctgttt	420
[0018]		ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgccgac gtctctggaa	480
[0019]		cgttgcactt ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc	540
[0020]		aagctgggcg ccgcaatctg ttgggaaaac cgcataccgc tgtaccgtac tagcctgtac	600
[0021]		ggcaaaggta tcagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct	660
[0022]		tctatgctgc acatcgtctt ggaagtggt tgcttcgttc tgtctgcttg ccagttctgc	720
[0023]		cgctgtaaag acttcccgga ccacccggac tacctgttca ccgactggga cgacaaccag	780
[0024]		gaagaccacg ctatcgtttc tcagggtggt tctgttatca tctctccgct gggtcaggtt	840
[0025]		ctggttggtc cgaactcga gtctgagggc ctgateactg cagatctgga tctgggcgat	900
[0026]		gtagcgcgtg caaaactgta tttcgatgtt gttggtcact actcccgcc tgagatTTTT	960
[0027]		aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtccgtaaaa	1020
[0028]		gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa	1050
[0029]	<210>	2	
[0030]	<211>	350	
[0031]	<212>	PRT	
[0032]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[0033]	<400>	2	
[0034]		Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro	
[0035]		1 5 10 15	
[0036]		Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln	
[0037]		20 25 30	
[0038]		Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu	
[0039]		35 40 45	
[0040]		Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe	
[0041]		50 55 60	

[0042]	Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile
[0043]	65 70 75 80
[0044]	Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr
[0045]	85 90 95
[0046]	His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala
[0047]	100 105 110
[0048]	Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu
[0049]	115 120 125
[0050]	Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu
[0051]	130 135 140
[0052]	Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu
[0053]	145 150 155 160
[0054]	Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp
[0055]	165 170 175
[0056]	Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met
[0057]	180 185 190
[0058]	Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys
[0059]	195 200 205
[0060]	Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Leu His
[0061]	210 215 220
[0062]	Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys
[0063]	225 230 235 240
[0064]	Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp
[0065]	245 250 255
[0066]	Asp Asp Asn Gln Glu Asp His Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val
[0067]	260 265 270
[0068]	Ile Ile Ser Pro Leu Gly Gln Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser
[0069]	275 280 285
[0070]	Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala
[0071]	290 295 300
[0072]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe
[0073]	305 310 315 320
[0074]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser
[0075]	325 330 335
[0076]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys
[0077]	340 345 350
[0078]	<210> 3
[0079]	<211> 1050
[0080]	<212> DNA
[0081]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082]	<400> 3
[0083]	atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgeta cactccagg tttcccgac 60

[0084]	atccctagca ccatcgttcg cgccacgatc gttcaggctt cactgtata caacgacact	120
[0085]	cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaattc atcgcggaag ctgctagcga cggcgcgcag	180
[0086]	ctggtggtct ttccggaagc tttcatcgct ggttaccgcg gtggctatcg tttcggcadc	240
[0087]	ggtgtaggtg tgcacaacga ggcgggcccgt gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg	300
[0088]	atcgttgtcc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc	360
[0089]	tacctggtaa tgggtgccat ggagaaagat ggttataccc tgtactgtac tgcgctgttt	420
[0090]	ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgcccac gtctctggaa	480
[0091]	cgttgcatct ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc	540
[0092]	aagctgggcg ccgcaatctg ttgggaaaac cgcataccgc tgtaccgtac tagcctgtac	600
[0093]	ggcaaaggta tcgagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct	660
[0094]	tctatgcagc acatcgtctt ggaagggtgt tgcttcgttc tgtctgcttg ccagttctgc	720
[0095]	cgctgtaaag acttcccgga ccaccggac tactgttca ccgactggga cgacaaccag	780
[0096]	gaagaccacg ctatcgtttc tcagggtggt tctgttatca tctctccgct gggtcaggtt	840
[0097]	ctggctggtc cgaacttoga gtctgagggc ctgatcactg cagatctgga tctgggcgat	900
[0098]	gtagcgctg caaaactgta tttcgatggt gttggtcact actcccgcc tgagattttt	960
[0099]	aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtccgtaaaa	1020
[0100]	gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa	1050
[0101]	<210>	4
[0102]	<211>	350
[0103]	<212>	PRT
[0104]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0105]	<400>	4
[0106]	Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro	
[0107]	1 5 10 15	
[0108]	Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln	
[0109]	20 25 30	
[0110]	Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu	
[0111]	35 40 45	
[0112]	Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe	
[0113]	50 55 60	
[0114]	Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile	
[0115]	65 70 75 80	
[0116]	Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr	
[0117]	85 90 95	
[0118]	His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala	
[0119]	100 105 110	
[0120]	Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu	
[0121]	115 120 125	
[0122]	Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu	
[0123]	130 135 140	
[0124]	Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu	
[0125]	145 150 155 160	

[0126]	Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp
[0127]	165 170 175
[0128]	Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met
[0129]	180 185 190
[0130]	Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys
[0131]	195 200 205
[0132]	Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Gln His
[0133]	210 215 220
[0134]	Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys
[0135]	225 230 235 240
[0136]	Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp
[0137]	245 250 255
[0138]	Asp Asp Asn Gln Glu Asp His Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val
[0139]	260 265 270
[0140]	Ile Ile Ser Pro Leu Gly Gln Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser
[0141]	275 280 285
[0142]	Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala
[0143]	290 295 300
[0144]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe
[0145]	305 310 315 320
[0146]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser
[0147]	325 330 335
[0148]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys
[0149]	340 345 350
[0150]	<210> 5
[0151]	<211> 1050
[0152]	<212> DNA
[0153]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0154]	<400> 5
[0155]	atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgcta ccaactccagg tttcccggac 60
[0156]	atccctagca ccatcgttcg cgccacgac gttcaggctt ccaactgtata caacgacact 120
[0157]	cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaattc atcgcggaag ctgctagcga cgggtgcgcag 180
[0158]	ctggtaggtct ttccggaagc tttcatcgct ggttaccgc gtggctatcg tttcggcatc 240
[0159]	ggtgtaggtg tgcacaacga ggcgggccgt gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg 300
[0160]	atcgttgctc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc 360
[0161]	tacctggtaa tgggtgccat ggagaaagat ggttataccc tgtactgtac tgcgctgttt 420
[0162]	ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgccgac gtctctggaa 480
[0163]	cgttgcatct ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc 540
[0164]	aagctgggcg ccgcaatctg ttgggaaaac cgcacgccc tgtaccgtac tagcctgtac 600
[0165]	ggcaaaggta tcgagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct 660
[0166]	tctatgctgc acatcgtctt ggaagtggt tgcttcgttc tgtctgcttg ccagttctgc 720
[0167]	cgctgtaaag acttcccgga ccaccggac tacctgttca ccgactggga cgacaaccag 780

[0168]	gaagacgacg ctatcgtttc tcagggtggg tctgttatca tctctccgct gggtcaggtt	840
[0169]	ctggctggtc cgaacttcga gtctgagggc ctgateactg cagatctgga tctgggcat	900
[0170]	gtagcggtg caaaactgta tttcgatgtt gttggctact actcccgcc tgagattttt	960
[0171]	aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtcgtaaaa	1020
[0172]	gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa	1050
[0173]	<210>	6
[0174]	<211>	350
[0175]	<212>	PRT
[0176]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0177]	<400>	6
[0178]	Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro	
[0179]	1 5 10 15	
[0180]	Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln	
[0181]	20 25 30	
[0182]	Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu	
[0183]	35 40 45	
[0184]	Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe	
[0185]	50 55 60	
[0186]	Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile	
[0187]	65 70 75 80	
[0188]	Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr	
[0189]	85 90 95	
[0190]	His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala	
[0191]	100 105 110	
[0192]	Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu	
[0193]	115 120 125	
[0194]	Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu	
[0195]	130 135 140	
[0196]	Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu	
[0197]	145 150 155 160	
[0198]	Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp	
[0199]	165 170 175	
[0200]	Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met	
[0201]	180 185 190	
[0202]	Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys	
[0203]	195 200 205	
[0204]	Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Leu His	
[0205]	210 215 220	
[0206]	Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys	
[0207]	225 230 235 240	
[0208]	Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp	
[0209]	245 250 255	

[0210]	Asp Asp Asn Gln Glu Asp Asp Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val	
[0211]	260	265 270
[0212]	Ile Ile Ser Pro Leu Gly Gln Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser	
[0213]	275	280 285
[0214]	Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala	
[0215]	290	295 300
[0216]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe	
[0217]	305	310 315 320
[0218]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser	
[0219]	325	330 335
[0220]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys	
[0221]	340	345 350
[0222]	<210> 7	
[0223]	<211> 1050	
[0224]	<212> DNA	
[0225]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0226]	<400> 7	
[0227]	atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgcta ccaactccagg tttcccggac	60
[0228]	atccctagca ccatcgttcg cgccacgata gttcaggctt ccaactgtata caacgacact	120
[0229]	cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaattc atcgcggaag ctgctagcga cgggtgcgcag	180
[0230]	ctgggtgtct ttccggaagc tttcatcgtt ggttaccgcg gtggctatcg tttcggcatc	240
[0231]	ggtgtaggtg tgcacaacga ggcgggcccgt gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg	300
[0232]	atcgttgtcc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc	360
[0233]	tacctggtaa tgggtgccat ggagaaagat ggttataccc tgtactgtac tgcgctgttt	420
[0234]	ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgccgac gtctctggaa	480
[0235]	cgttgcatct ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc	540
[0236]	aagctgggcg ccgcaatctg ttgggaaaac cgcataccgc tgtaccgtac tagcctgtac	600
[0237]	ggcaaaggta tcgagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct	660
[0238]	tctatgctgc acatcgtctt ggaaggtggt tgcttcgttc tgtctgcttg ccagttctgc	720
[0239]	cgctgtaaag acttcccgga ccaccggac tacctgttca ccgactggga cgacaaccag	780
[0240]	gaagaccacg ctatcgtttc tcagggtggt tctgttatca tctctccgct ggggtgaagt	840
[0241]	ctggctggtc cgaacttoga gtctgagggc ctgatcactg cagatctgga tctgggcgat	900
[0242]	gtagcgcgtg caaaactgta tttcgatggt gttggctact actcccgcc tgagatTTTT	960
[0243]	aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtccgtaaaa	1020
[0244]	gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa	1050
[0245]	<210> 8	
[0246]	<211> 350	
[0247]	<212> PRT	
[0248]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0249]	<400> 8	
[0250]	Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro	
[0251]	1	5 10 15

[0252]	Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln
[0253]	20 25 30
[0254]	Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu
[0255]	35 40 45
[0256]	Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe
[0257]	50 55 60
[0258]	Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile
[0259]	65 70 75 80
[0260]	Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr
[0261]	85 90 95
[0262]	His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala
[0263]	100 105 110
[0264]	Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu
[0265]	115 120 125
[0266]	Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu
[0267]	130 135 140
[0268]	Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu
[0269]	145 150 155 160
[0270]	Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp
[0271]	165 170 175
[0272]	Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met
[0273]	180 185 190
[0274]	Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys
[0275]	195 200 205
[0276]	Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Leu His
[0277]	210 215 220
[0278]	Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys
[0279]	225 230 235 240
[0280]	Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp
[0281]	245 250 255
[0282]	Asp Asp Asn Gln Glu Asp His Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val
[0283]	260 265 270
[0284]	Ile Ile Ser Pro Leu Gly Glu Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser
[0285]	275 280 285
[0286]	Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala
[0287]	290 295 300
[0288]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe
[0289]	305 310 315 320
[0290]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser
[0291]	325 330 335
[0292]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys
[0293]	340 345 350

[0294] <210> 9

[0295] <211> 1050

[0296] <212> DNA

[0297] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0298] <400> 9

[0299] atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgcta ccaactccagg tttcccggac 60

[0300] atccctagca ccatcgttcg cgccacgacg gttcaggett ccaactgtata caacgacact 120

[0301] cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaatc atcgcggaag ctgctagcga cgggtgcgcag 180

[0302] ctggtggtct ttccggaagc tttcatcgct ggttaccgcg gtggctatcg tttcggcatc 240

[0303] ggtgtaggtg tgcacaacga ggcgggcctg gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg 300

[0304] atcgttgctc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc 360

[0305] tacctggtaa tgggtgccat ggagaaagat ggttataccc tgtactgtac tgcgctgttt 420

[0306] ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgccgac gtctctggaa 480

[0307] cgttgcatct ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc 540

[0308] aagctgggcg ccgcaatctg ttgggaaaac cgcatgccgc tgtaccgtac tagcctgtac 600

[0309] ggcaaaggta tcgagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct 660

[0310] tctatgcagc acatcgctct ggaagtggtt tgcttcgctt tgtctgcttg ccagttctgc 720

[0311] cgctgtaaag acttcccgga ccaccggac tacctgttca ccgactggga cgacaaccag 780

[0312] gaagacgacg ctatcgtttc tcagggtggt tctgttatca tctctccgct gggtcaggtt 840

[0313] ctggetggtc cgaacttcca gtctgagggc ctgatcaact cagatctgga tctgggcgat 900

[0314] gtagcgcgtg caaaactgta tttcgaatgt gttggtcact actcccgcc tgagattttt 960

[0315] aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtccgtaaaa 1020

[0316] gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa 1050

[0317] <210> 10

[0318] <211> 350

[0319] <212> PRT

[0320] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0321] <400> 10

[0322] Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro

[0323] 1 5 10 15

[0324] Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln

[0325] 20 25 30

[0326] Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu

[0327] 35 40 45

[0328] Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe

[0329] 50 55 60

[0330] Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile

[0331] 65 70 75 80

[0332] Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr

[0333] 85 90 95

[0334] His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala

[0335] 100 105 110

[0336]	Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu
[0337]	115 120 125
[0338]	Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu
[0339]	130 135 140
[0340]	Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu
[0341]	145 150 155 160
[0342]	Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp
[0343]	165 170 175
[0344]	Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met
[0345]	180 185 190
[0346]	Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys
[0347]	195 200 205
[0348]	Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Gln His
[0349]	210 215 220
[0350]	Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys
[0351]	225 230 235 240
[0352]	Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp
[0353]	245 250 255
[0354]	Asp Asp Asn Gln Glu Asp Asp Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val
[0355]	260 265 270
[0356]	Ile Ile Ser Pro Leu Gly Gln Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser
[0357]	275 280 285
[0358]	Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala
[0359]	290 295 300
[0360]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe
[0361]	305 310 315 320
[0362]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser
[0363]	325 330 335
[0364]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys
[0365]	340 345 350
[0366]	<210> 11
[0367]	<211> 1050
[0368]	<212> DNA
[0369]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0370]	<400> 11
[0371]	atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgcta ccaactccagg tttcccggac 60
[0372]	atccctagca ccatcgttcg cgccacgatac gttcaggctt ccaactgtata caacgacact 120
[0373]	cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaattc atcgcggaag ctgctagega cgggtgcgcag 180
[0374]	ctgggtgtct ttccggaagc tttcatcgct ggttaccgc gtggctatcg tttcggcacc 240
[0375]	ggtgtaggtg tgcacaacga ggcgggccgt gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg 300
[0376]	atcgttgtcc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc 360
[0377]	tacctggtaa tgggtgccat ggagaaagat ggttatacc tgtactgtac tgcgctgttt 420

[0378] ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgccgac gtctctggaa 480
 [0379] cgttgcattt ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc 540
 [0380] aagctgggcg cgcactctg ttgggaaaac cgcattgccg tgtaccgtac tagcctgtac 600
 [0381] ggcaaaggta tcgagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct 660
 [0382] tctatgcagc acatcgtctt ggaagggtgt tgcttcgttc tgtctgcttg ccagttctgc 720
 [0383] cgctgtaaag acttcccgga ccaccgggac tacctgttca ccgactggga cgacaaccag 780
 [0384] gaagaccacg ctatcgtttc tcagggtggt tctgttatca tctctccgct gggatgaatt 840
 [0385] ctgctgggtc cgaacttga gtctgagggc ctgatcactg cagatctgga tctgggcatg 900
 [0386] gtagcgcgtg caaaactgta tttcgtatgt gttggtcact actcccggcc tgagattttt 960
 [0387] aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtccgtaaaa 1020
 [0388] gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa 1050
 [0389] <210> 12
 [0390] <211> 350
 [0391] <212> PRT
 [0392] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0393] <400> 12
 [0394] Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro
 [0395] 1 5 10 15
 [0396] Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln
 [0397] 20 25 30
 [0398] Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu
 [0399] 35 40 45
 [0400] Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe
 [0401] 50 55 60
 [0402] Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile
 [0403] 65 70 75 80
 [0404] Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr
 [0405] 85 90 95
 [0406] His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala
 [0407] 100 105 110
 [0408] Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu
 [0409] 115 120 125
 [0410] Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu
 [0411] 130 135 140
 [0412] Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu
 [0413] 145 150 155 160
 [0414] Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp
 [0415] 165 170 175
 [0416] Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met
 [0417] 180 185 190
 [0418] Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys
 [0419] 195 200 205

[0420]	Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Gln His			
[0421]	210	220		
[0422]	Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys			
[0423]	225	230	235	240
[0424]	Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp			
[0425]	245	250	255	
[0426]	Asp Asp Asn Gln Glu Asp His Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val			
[0427]	260	265	270	
[0428]	Ile Ile Ser Pro Leu Gly Glu Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser			
[0429]	275	280	285	
[0430]	Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala			
[0431]	290	295	300	
[0432]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe			
[0433]	305	310	315	320
[0434]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser			
[0435]	325	330	335	
[0436]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys			
[0437]	340	345	350	
[0438]	<210>	13		
[0439]	<211>	1050		
[0440]	<212>	DNA		
[0441]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
[0442]	<400>	13		
[0443]	atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgcta ccaactccagg tttcccggac	60		
[0444]	atccctagca ccatcgttcg cgccacgac gttcaggctt ccaactgtata caacgacact	120		
[0445]	cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaatc atcgcggaag ctgctagcga cgggtgcgcag	180		
[0446]	ctgggtgtct ttccggaagc tttcatcgct ggttaccgc gtggctatcg tttcggcatc	240		
[0447]	ggtgtaggtg tgcacaacga ggcgggccgt gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg	300		
[0448]	atcgttgcc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc	360		
[0449]	tacctgtaa tgggtgcat ggagaaagat ggttatacc tgtactgtac tgcgctgttt	420		
[0450]	ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgccgac gtctctggaa	480		
[0451]	cgttgcatct ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc	540		
[0452]	aagctgggcg ccgcaatctg ttgggaaaac cgcatgccg tgtaccgtac tagcctgtac	600		
[0453]	ggcaaaggta tcgagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct	660		
[0454]	tctatgctgc acatcgctct ggaagtggt tgcttcgttc tgtctgcttg ccagttctgc	720		
[0455]	cgtcgtaaag acttcccgga ccaccggac tacctgttca ccgactggga cgacaaccag	780		
[0456]	gaagacgac ctatcgttcc cagggtggt tctgttatca tctctccgct ggggtgaagt	840		
[0457]	ctggetggtc cgaacttga gtctgagggc ctgatcactg cagatctgga tctgggcgat	900		
[0458]	gtagcgcgtg caaaactgta tttcgatgtt gttggtcact actcccgcc tgagatTTTT	960		
[0459]	aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtccgtaaaa	1020		
[0460]	gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa	1050		
[0461]	<210>	14		

[0462] <211> 350
 [0463] <212> PRT
 [0464] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0465] <400> 14
 [0466] Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro
 [0467] 1 5 10 15
 [0468] Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln
 [0469] 20 25 30
 [0470] Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu
 [0471] 35 40 45
 [0472] Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe
 [0473] 50 55 60
 [0474] Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile
 [0475] 65 70 75 80
 [0476] Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr
 [0477] 85 90 95
 [0478] His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala
 [0479] 100 105 110
 [0480] Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu
 [0481] 115 120 125
 [0482] Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu
 [0483] 130 135 140
 [0484] Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu
 [0485] 145 150 155 160
 [0486] Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp
 [0487] 165 170 175
 [0488] Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met
 [0489] 180 185 190
 [0490] Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys
 [0491] 195 200 205
 [0492] Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Leu His
 [0493] 210 215 220
 [0494] Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys
 [0495] 225 230 235 240
 [0496] Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp
 [0497] 245 250 255
 [0498] Asp Asp Asn Gln Glu Asp Asp Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val
 [0499] 260 265 270
 [0500] Ile Ile Ser Pro Leu Gly Glu Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser
 [0501] 275 280 285
 [0502] Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala
 [0503] 290 295 300

[0504]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe	
[0505]	305	310 315 320
[0506]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser	
[0507]	325	330 335
[0508]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys	
[0509]	340	345 350
[0510]	<210>	15
[0511]	<211>	1050
[0512]	<212>	DNA
[0513]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0514]	<400>	15
[0515]	atgtctggct ctgaagaaat gtccaaagct ctgaatgcta ccaactccagg tttcccggac	60
[0516]	atccctagca ccatcgttcg cgccacgacg gttcaggctt ccaactgtata caacgacact	120
[0517]	cctaaaacca tcgaaaaagc tgaaaaattc atcgcggaag ctgctagcga cgggtgcgcag	180
[0518]	ctgggtgtct ttccggaagc tttcatcgct ggttaccgcg gtggctatcg tttcggcatc	240
[0519]	ggtgtaggtg tgcacaacga ggcggggcct gattgtttcc gccgctatca tgctagcgcg	300
[0520]	atcgttgtcc cgggtccgga ggttgataaa ctggcagaaa ttgctcgtaa atacaaagtc	360
[0521]	tacctggtaa tgggtgccat ggagaaagat ggttataccc tgtactgtac tgcgctgttt	420
[0522]	ttcagctctg aaggtcgttt cctgggcaag caccgcaaag tcatgccgac gtctctggaa	480
[0523]	cgttgcatct ggggcttcgg tgatggttct actatcccgg tctacgacac cccgctgggc	540
[0524]	aagctgggcg ccgcaatctg ttgggaaaac cgcacgccgc tgtaccgtac tagcctgtac	600
[0525]	ggcaaaggta tcgagctgta ttgcgctccg actgccgatg gctctaaaga atggcagtct	660
[0526]	tctatgcagc acatcgctct ggaagggtgt tgcttcgttc tgtctgcttg ccagttctgc	720
[0527]	cgctgtaaag acttcccgga ccaccgacg tacctgttca ccgactggga cgacaaccag	780
[0528]	gaagacgacg ctatcgtttc tcagggtgtt tctgttatca tctctccgct ggggtgaagtt	840
[0529]	ctggctggtc cgaacttga gtctgagggc ctgatcactg cagatctgga tctgggcat	900
[0530]	gtagcgcgtg caaaactgta tttcgatgtt gttggtcact actcccgcc ttagatTTTT	960
[0531]	aatctgacgg ttaacgagac tccgaagaaa ccggttactt tcgtttccaa gtccgtaaaa	1020
[0532]	gctgaggacg actctgagcc gcaggacaaa	1050
[0533]	<210>	16
[0534]	<211>	350
[0535]	<212>	PRT
[0536]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0537]	<400>	16
[0538]	Met Ser Gly Ser Glu Glu Met Ser Lys Ala Leu Asn Ala Thr Thr Pro	
[0539]	1	5 10 15
[0540]	Gly Phe Pro Asp Ile Pro Ser Thr Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln	
[0541]	20	25 30
[0542]	Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr Pro Lys Thr Ile Glu Lys Ala Glu	
[0543]	35	40 45
[0544]	Lys Phe Ile Ala Glu Ala Ala Ser Asp Gly Ala Gln Leu Val Val Phe	
[0545]	50	55 60

[0546]	Pro Glu Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Tyr Arg Phe Gly Ile
[0547]	65 70 75 80
[0548]	Gly Val Gly Val His Asn Glu Ala Gly Arg Asp Cys Phe Arg Arg Tyr
[0549]	85 90 95
[0550]	His Ala Ser Ala Ile Val Val Pro Gly Pro Glu Val Asp Lys Leu Ala
[0551]	100 105 110
[0552]	Glu Ile Ala Arg Lys Tyr Lys Val Tyr Leu Val Met Gly Ala Met Glu
[0553]	115 120 125
[0554]	Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ser Ser Glu
[0555]	130 135 140
[0556]	Gly Arg Phe Leu Gly Lys His Arg Lys Val Met Pro Thr Ser Leu Glu
[0557]	145 150 155 160
[0558]	Arg Cys Ile Trp Gly Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp
[0559]	165 170 175
[0560]	Thr Pro Leu Gly Lys Leu Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met
[0561]	180 185 190
[0562]	Pro Leu Tyr Arg Thr Ser Leu Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys
[0563]	195 200 205
[0564]	Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Glu Trp Gln Ser Ser Met Gln His
[0565]	210 215 220
[0566]	Ile Ala Leu Glu Gly Gly Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys
[0567]	225 230 235 240
[0568]	Arg Arg Lys Asp Phe Pro Asp His Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp
[0569]	245 250 255
[0570]	Asp Asp Asn Gln Glu Asp Asp Ala Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val
[0571]	260 265 270
[0572]	Ile Ile Ser Pro Leu Gly Glu Val Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser
[0573]	275 280 285
[0574]	Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala
[0575]	290 295 300
[0576]	Lys Leu Tyr Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Glu Ile Phe
[0577]	305 310 315 320
[0578]	Asn Leu Thr Val Asn Glu Thr Pro Lys Lys Pro Val Thr Phe Val Ser
[0579]	325 330 335
[0580]	Lys Ser Val Lys Ala Glu Asp Asp Ser Glu Pro Gln Asp Lys
[0581]	340 345 350
[0582]	<210> 17
[0583]	<211> 29
[0584]	<212> DNA
[0585]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0586]	<400> 17
[0587]	gaatggcagt cttctatgct gcacatgcg

[0588]	<210> 18	
[0589]	<211> 28	
[0590]	<212> DNA	
[0591]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0592]	<400> 18	
[0593]	gaagttcgga ccagccagaa cctgaccc	28
[0594]	<210> 19	
[0595]	<211> 29	
[0596]	<212> DNA	
[0597]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0598]	<400> 19	
[0599]	gcgatgtgca gcatagaaga ctgccattc	29
[0600]	<210> 20	
[0601]	<211> 28	
[0602]	<212> DNA	
[0603]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0604]	<400> 20	
[0605]	gggtcagggtt ctggctggtc cgaacttc	28
[0606]	<210> 21	
[0607]	<211> 32	
[0608]	<212> DNA	
[0609]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0610]	<400> 21	
[0611]	cagtettcta tgctgcacat cgctctggaa gg	32
[0612]	<210> 22	
[0613]	<211> 32	
[0614]	<212> DNA	
[0615]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0616]	<400> 22	
[0617]	ccttcagag cgatgtgcag catagaagac tg	32
[0618]	<210> 23	
[0619]	<211> 33	
[0620]	<212> DNA	
[0621]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0622]	<400> 23	
[0623]	caaccaggaa gacgacgcta tcgtttctca ggg	33
[0624]	<210> 24	
[0625]	<211> 33	
[0626]	<212> DNA	
[0627]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0628]	<400> 24	
[0629]	ccctgagaaa cgatagcgtc gtcttcctgg ttg	33

[0630]	<210>	25	
[0631]	<211>	30	
[0632]	<212>	DNA	
[0633]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[0634]	<400>	25	
[0635]		catctctccg ctgggtcagg ttctggctgg	30
[0636]	<210>	26	
[0637]	<211>	30	
[0638]	<212>	DNA	
[0639]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[0640]	<400>	26	
[0641]		ccagccagaa cctgaccag cggagagatg	30

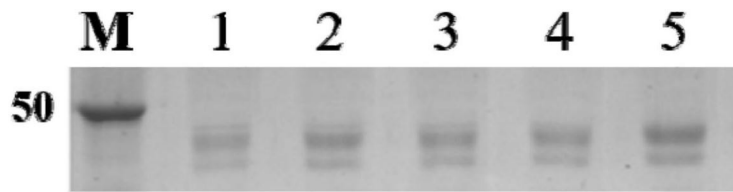


图1

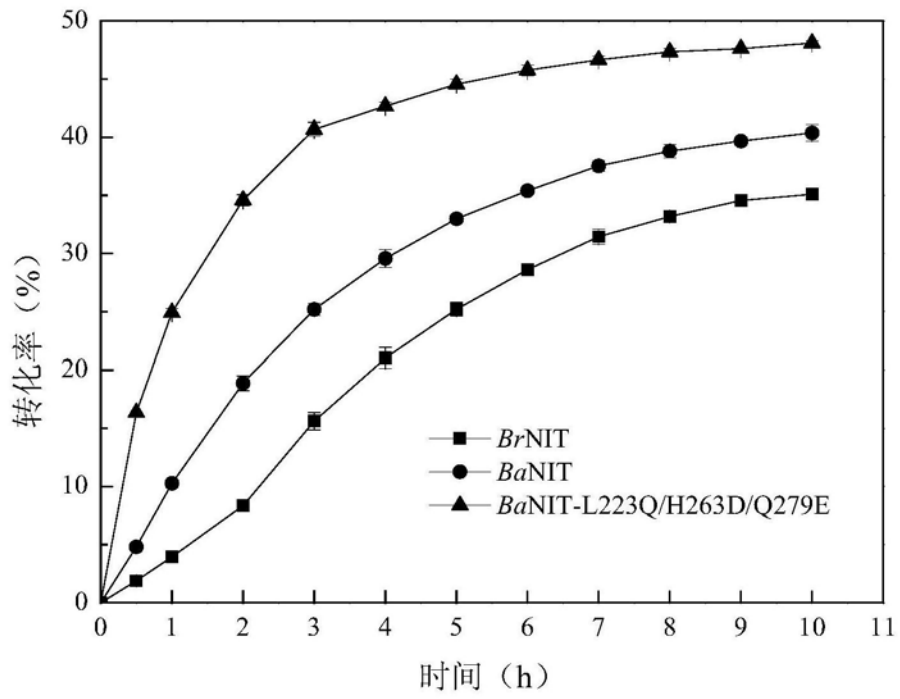


图2

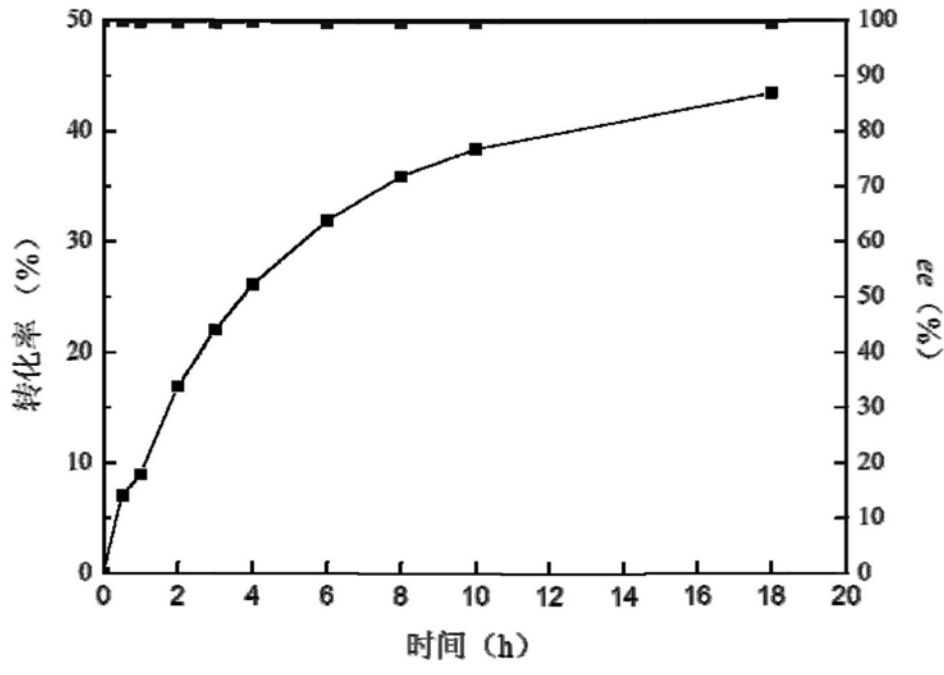


图3