

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102286501 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201110207944. 2

C12R 1/19(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 07. 25

A62D 101/04(2007. 01)

A62D 101/28(2007. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No1479 2005. 10. 12

(56) 对比文件

CN 102027970 A, 2011. 04. 27, 全文.

MX 2008005520 A1, 2008. 07. 31, 全文.

CN 101548685 A, 2009. 10. 07, 全文.

WO 2008141154 A2, 2008. 11. 20, 全文.

陈志石等. 玉米田化学除草剂的发展及其在我国的应用. 《杂草科学》. 2008, (第 02 期), 1-4.

(73) 专利权人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市玄武区卫岗 1 号

(72) 发明人 李顺鹏 何健 杭宝建 黄星
谢香庭

审查员 彭海航

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

C12N 15/55(2006. 01)

C12N 9/14(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

A62D 3/02(2007. 01)

C02F 3/34(2006. 01)

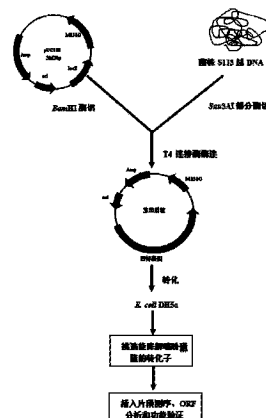
权利要求书 1 页 说明书 6 页
序列表 3 页 附图 6 页

(54) 发明名称

噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 及其应用

(57) 摘要

本发明属于应用环境微生物和农业领域, 公开了噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 及其应用。一种噻吩磺隆水解酶基因 tsmE, 其核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1, 全长为 1194bp, G+C 含量为 51. 09%, 编码 398 个氨基酸, 氨基酸序列为 SEQ ID NO. 2。本发明提供的噻吩磺隆水解酶 TsmE 能在 1hr 内完全降解 100mg/L 的噻吩磺隆, 并将噻吩磺隆水解为无除草活性的产物噻吩磺酸; 此外 TsmE 还能在 1hr 内完全降解 100mg/L 的除草剂高效盖草能。因此噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 在构建抗噻吩磺隆的转基因作物中应用。噻吩磺隆水解酶蛋白质 TsmE 在降解噻吩磺隆和高效盖草能中应用。



1. 一种噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE*, 其核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1。
2. 权利要求 1 所述的噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 核苷酸序列所编码的噻吩磺隆水解酶蛋白质 TsmE, 其氨基酸序列为 :SEQ ID NO. 2。
3. 含有权利要求 1 所述的噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 的重组表达载体。
4. 根据权利要求 3 所述的重组表达载体, 其特征在于是将权利要求 1 所述的噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 插入 pET-29a(+) 的 *Nde*I 和 *Hind*III 位点之间所得。
5. 含有权利要求 1 所述的噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 的基因工程菌。
6. 根据权利要求 5 所述的基因工程菌, 其特征在于所述的基因工程菌的出发菌株为大肠杆菌 BL21 (DE3)。
7. 权利要求 1 所述噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 在降解噻吩磺隆和高效盖草能中的应用。
8. 权利要求 2 所述噻吩磺隆水解酶蛋白质 TsmE 在降解噻吩磺隆和高效盖草能中的应用。
9. 权利要求 2 所述噻吩磺隆水解酶蛋白质 TsmE 在去除土壤、水体中除草剂噻吩磺隆和高效盖草能残留中的应用。

噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于应用环境微生物和农业领域,涉及噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 及其应用。

背景技术

[0002] 除草剂的使用在减轻农业劳动强度、保证农业正常生产的同时,其残留也带来了严重的作物药害问题,据统计我国每年农田受除草剂药害面积达到 3000 万亩,其中严重药害面积达到 500 万亩,每年造成几十亿元的损失,而抗除草剂转基因是解决除草剂药害的最佳途径。磺酰脲类除草剂在中国使用量大,研究和应用发展迅速,已经成为继有机磷、乙酰胺类除草剂后的第三大除草剂,全球年销售额达到 30 亿美元以上,我国磺酰脲类除草剂每年的应用面积已超过 200 万公顷,并仍呈扩大的趋势,噻吩磺隆是使用非常广泛的一类磺酰脲类除草剂。磺酰脲类除草剂残留期较长,在土壤中积累会对下茬作物产生严重的药害作用,现已发现磺酰脲类除草剂的残留药害可伤及水稻、大豆、玉米、油菜、棉花、甜菜、亚麻和向日葵等多种重要作物。

[0003] 获得磺酰脲类除草剂降解菌株和降解基因在治理除草剂残留,消除其药害技术研发中具有以下作用和功能,(一)通过现代生物技术将降解基因导入作物构建相应的除草剂抗性转基因作物,(二)通过现代微生物发酵技术将磺酰脲类除草剂降解菌株和基因制成降解菌剂或酶制剂将土壤中磺酰脲类除草剂残留降解。此外磺酰脲类除草剂降解基因还可用于有用化工产品及药物合成的生物转化。因此噻吩磺隆降解基因在消除该类除草剂药害及生物转化领域中具有非常重要的理论和应用价值。

[0004] 磺酰脲类除草剂噻吩磺隆应用日益广泛,但其残留期较长,在土壤中积累会对下茬作物产生严重的药害作用,而构建和种植抗除草剂转基因是解决除草剂药害的最佳途径。目前能够降解噻吩磺隆的基因还未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供一种噻吩磺隆水解酶基因,该基因可用于构建抗噻吩磺隆的转基因作物,也可用于土壤、水体中除草剂噻吩磺隆和高效盖草能残留的去除及药物合成的生物转化。

[0006] 本发明的另一目的是提供该基因的应用。

[0007] 本发明的目的通过如下技术方案实现:

[0008] 一种噻吩磺隆水解酶基因 tsmE,其核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1。

[0009] 本专利所用的出发菌株为一株能够降解噻吩磺隆的细菌菌株 S113,在分类上属于嗜甲基菌 (*Methylophilus* sp.),保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为 CGMCC 1479,保藏日期为 2005 年 10 月 12 日。质谱分析结果表明菌株 S113 的粗酶液可以把噻吩磺隆水解为噻磺酸。

[0010] 克隆噻吩磺隆水解酶基因采取的策略为鸟枪法(见图 1)。首先提取菌株 S113 的

总 DNA,总 DNA 采用 Sau3AI 部分酶切后和用 BamHI 酶切的质粒 pUC118 酶连,酶连产物转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞构建菌株 S113 的总 DNA 文库,含有噻吩磺隆降解基因的克隆子能使培养基中的噻吩磺隆降解,生成的噻磺酸不抑制大肠杆菌生长,解除对大肠杆菌的抑制而生长。不含噻吩磺隆降解基因的克隆子则因受到噻吩磺隆的抑制而不能生长。利用这种克隆方法可以对文库进行高通量的筛选。

[0011] 用上面的策略筛选鸟枪法构建的基因文库获得一个能在加入 10ppm 噻吩磺隆的基础盐培养基(葡萄糖为碳源)上生长的阳性克隆子,进一步的降解实验表明该阳性克隆子能降解噻吩磺隆。测序结果表明该阳性克隆子含有 5143 个碱基对,其中包含有 18 个潜在的 ORF(大于 150bp),对这些潜在的 ORF 分别进行亚克隆和序列比对分析,最后确定编码噻吩磺隆水解酶的基因的大小为 1194kb,命名为 tsmE。这是首次克隆到能降解磺酰脲类除草剂的水解酶基因。

[0012] 所述的噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 核苷酸序列所编码的噻吩磺隆水解酶蛋白质 TsmE,其氨基酸序列为:SEQ ID NO. 2。

[0013] 含有所述的噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 的重组表达载体。

[0014] 所述的重组表达载体优选将所述的噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 插入 pET-29a(+) 的 NdeI 和 HindIII 位点之间所得。

[0015] 含有所述的噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 的基因工程菌。

[0016] 所述的基因工程菌优选以大肠杆菌 BL21(DE3) 为出发菌株。

[0017] 所述噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 在构建抗噻吩磺隆的转基因作物中的应用。

[0018] 所述噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 在降解噻吩磺隆和高效盖草能中的应用。

[0019] 所述噻吩磺隆水解酶蛋白质 TsmE 在降解噻吩磺隆和高效盖草能中的应用。

[0020] 所述噻吩磺隆水解酶蛋白质 TsmE 在去除土壤、水体中除草剂噻吩磺隆残留和高效盖草能中的应用。

[0021] 本发明的有益效果如下:

[0022] 1. 本发明用鸟枪法成功的从菌株 S113(CGMCC 1479) 中克隆出噻吩磺隆水解酶基因 tsmE。在 GenBank 比对结果表明该基因为一个新的基因,全长(从起始密码子到终止密码子)为 1194bp, G+C 含量为 51.09%,编码 398 个氨基酸。

[0023] 2. 本发明提供的噻吩磺隆水解酶 TsmE 能在 1hr 内完全降解 100mg/L 的噻吩磺隆,并将噻吩磺隆水解为无除草活性的产物噻磺酸(见图 4 和图 5),此外 TsmE 还能在 1hr 内完全降解 100mg/L 的除草剂高效盖草能(见图 6 和图 7)。tsmE 可用于构建抗噻吩磺隆的转基因作物,也可用于土壤、水体中除草剂噻吩磺隆和高效盖草能残留的去除及药物合成的生物转化,具有非常重要的理论和应用价值。

附图说明

[0024] 图 1 噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 克隆的策略图。

[0025] 图 2 噻吩磺隆水解酶基因 tsmE 在 BL21(pET-29a(+)) 中表达策略图。

[0026] 图 3 噻吩磺隆水解酶 TsmE 蛋白电泳图谱;

[0027] 其中泳道 1 为蛋白质 marker,泳道 2 为纯化的噻吩磺隆水解酶 TsmE 蛋白。

[0028] 图 4 噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解噻吩磺隆 LC-MS 图;

- [0029] A :噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解噻吩磺隆的液相色谱图 ;
- [0030] B :噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解噻吩磺隆的一级质谱图 ;
- [0031] C :噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解噻吩磺隆的子离子二级质谱图。
- [0032] 图 5 噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解噻吩磺隆的途径。
- [0033] 图 6 噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解高效盖草能 MS/MS 图。
- [0034] A :噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解高效盖草能的一级质谱图。
- [0035] B :噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解高效盖草能的二级质谱图。
- [0036] 图 7 噻吩磺隆和高效盖草能水解酶 TsmE 降解高效盖草的途径。
- [0037] 生物材料保藏信息
- [0038] 嗜甲基菌 S113(*Methylophilus* sp.), 保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC), 地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所, 保藏编号为 CGMCC 1479, 保藏日期为 2005 年 10 月 12 日。

具体实施方式

- [0039] 实施例 1. 噻吩磺隆水解酶基因的克隆
- [0040] 1.1 细菌基因组总 DNA 的提取
- [0041] S113 (CGMCC 1479) 大量培养后, 采用 CTAB 法提取高纯度、大片的 S113 的基因组总 DNA, 溶于 TE 缓冲液 (pH8.0) 中, 置于 -20°C 保藏, 具体方法参考 F·奥斯伯等编的《精编分子生物学实验指南》。
- [0042] 1.2 总 DNA 的酶切 S113 (CGMCC 1479) 总 DNA 采用 *Sau3AI* 部分酶切。
- [0043] 1.3 DNA 的回收
- [0044] 酶切后的总 DNA 通过电泳 (TAE 缓冲液) 进行纯化, 采用 axygen biosciences (China) 回收试剂盒进行回收, 回收的 DNA 溶于 10mmol/L 的 $\text{Tris}\cdot\text{Cl}$ (pH8.0) 中, 置于 -20°C 保藏。
- [0045] 1.4 酶连
- [0046] 建立如下反应体系:
- [0047]
- | | |
|------------------------|-------------------|
| pUC118(<i>Bam</i> HI) | 0.1 μg |
| 总DNA片段 | 0.1 μg |
| 10 \times 连接酶缓冲液 | 1 μl |
| T4DNA连接酶 | 0.5 μl |
| 加双蒸水至 | 10 μl |
- 16°C 温育 12 小时。
- [0048] 1.5 制备大肠杆菌 DH10B 高效感受态细胞
- [0049] 大肠杆菌 DH10B 购自上海英骏生物技术有限公司。高效感受态细胞制备的具体方法参照 F. 奥斯伯等编的《精编分子生物学实验指南》P 22-23。
- [0050] 1.6 转化
- [0051] 取 $10\ \mu\text{l}$ 酶连产物转化 $200\ \mu\text{l}$ 大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 具体方法参照 F. 奥

斯伯等编的《精编分子生物学实验指南》P 23。涂布含有 10mg/kg 的噻吩磺隆, 100mg/kg 氨基青霉素的基础培养基平板, 培养 24h 后挑取生长的菌落, 进一步验证获得一个能将噻吩磺隆转化为噻磺酸的转化子。基础盐培养基配方为 5.0 glucose, 1.0 NH_4NO_3 , 1.0 NaCl, 1.5 K_2HPO_4 , 0.5 KH_2PO_4 , 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0。

[0052] 1.7 基因核苷酸序列测定

[0053] 将 1.6 中获得的能将噻吩磺隆转化为噻磺酸的转化子送交上海英骏生物技术有限公司进行序列测定, 噻吩磺隆水解酶基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1, 根据噻吩磺隆水解酶基因核苷酸序列所推到的 398 个氨基酸序列为 SEQ ID NO. 2。

[0054] 实施例 2 噻吩磺隆水解酶基因在 BL21 (pET-29a(+)) 中的高效表达 (图 2)

[0055] 2.1 噻吩磺隆水解酶基因的 PCR 扩增

[0056] 以正向引物: 5' -TGCAGACATATGGAAACCGATAAAAAAAC-3' (SEQ ID NO. 3) 和反向引物: 5' -TGCAGAGAATTCCCTTCCATAAGAGCGCCGAT-3' (SEQ ID NO. 4) 为引物, 用 PCR 从 S113 (CGMCC 1479) 基因组 DNA 中扩增出噻吩磺隆水解酶基因片段。

[0057] 扩增体系:

[0058]

<i>Primer star</i> 酶 (5U/ μl)	0.5 μl
5 \times PCR Buffer II (Mg^{2+} Plus)	10 μl
dNTP Mixture (各 2.5mM)	5 μl
模板 DNA	10 ng
正向引物 (20 μM)	1 μl
反向引物 (20 μM)	1 μl
灭菌蒸馏水	至 50 μl

[0059] PCR 扩增程序:

[0060] a. 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3min;

[0061] b. 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1.5min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 0.5min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5min, 进行 25 个循环;

[0062] c. 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min, 冷却到室温。

[0063] 2.2 PCR 产物用 NdeI 和 HindIII 双酶切。

[0064] 酶切体系:

[0065]

<i>Nde</i> I	1 μl
<i>Hind</i> III	1 μl
DNA	$\leq 1 \mu\text{g}$
灭菌的蒸馏水	加至 20 μl

[0066] 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 反应 3h 以上。酶切产物进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳切胶回收。

2.3 pET-29a(+) 用 NdeI 和 HindIII 双酶切 (参考 2.2)。

[0067] 2.4 转化

[0068] 2.2 中的回收片段和 2.3 中酶切好的 pET-29a(+) 进行酶连 (参考 1.5)。酶连好

的含噻吩磺隆水解酶基因的 pET-29a(+) 重组质粒转化到表达宿主菌 BL21 (DE3) 获得重组微生物 BL21 (TsmE)。

[0069] 2.5TsmE 的表达、纯化和功能验证

[0070] BL21 (TsmE) 在 LB 培养基中培养至 OD_{600nm} 为 0.6 到 0.8 之间,加 IPTG 至浓度 1mM,30℃ 培养 4 个小时。100ml 菌液离心,用 10ml (50mM, pH 7.0) PBS 缓冲液重悬菌体,超声破碎 (Auto Science,UH-650B ultrasonic processor,30% intensity)5 分钟,离心,收集上清,用镍离子亲和层析柱对 TsmE 进行了纯化,纯化后的酶进行蛋白质电泳,见图 3。

[0071] 2.6TsmE 活力测定

[0072] 酶活反应体系:50mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0),0.2mM 噻吩磺隆或 0.2mM 高效盖草能、反应酶量 (2.5 中纯化所得)50 μ l,30℃ 反应 20min。每个反应以加入酶开始计时,用 3ml 二氯甲烷终止反应,分层后有机相经无水硫酸钠脱水,噻吩磺隆或高效盖草能含量用反向 HPLC 测定 (具体方法见 2.7)。一个酶活力单位 (U) 定义为:在 pH 7.0,温度 30℃ 条件下,每分钟催化减少 1 μ mol 噻吩磺隆或高效盖草能所需的酶量。降解试验表明纯化后的 TsmE 能在 1hr 内降解 100mg/kg 的噻吩磺隆或高效盖草能,酶学试验表明 TsmE 对噻吩磺隆和高效盖草能的比酶活分别为 67 和 55U/mg protein。

[0073] 2.7 代谢产物的确定

[0074] 2.7.1 噻吩磺隆降解代谢产物的确定

[0075] 2.6 中的噻吩磺隆的酶反应液过滤,取 20 μ L 滤液进行 LC-MS,液相色谱条件:色谱柱:Agilent Zorbax XDB-C18 柱 (2.1×50mm,3.5 μ m),流动相:甲醇:水=80:20,流速 0.25ml/min;紫外检测波长 255nm。一级质谱条件:离子检测方式为多反应离子检测;离子极性为负离子;离子化方式为电喷雾离子化;毛细管电压为 4000 伏;干燥气温度:330℃;干燥气流速:10.0L/min,雾化气压力:35psi,碰撞电压:135 伏;质量扫描范围 (m/z):300-500。二级子离子质谱条件:碰撞电压:90 伏;质量扫描范围 (m/z):30-400。

[0076] LC-MS 的液谱图 (见图 4A) 表明,其产物的保留时间为 1.95min,一级质谱图 (见图 4B) 显示其有 m/z 为 372.30 分子负离子峰,m/z 为 372.30 的分子负离子其二级质谱图 (见图 4C) 中有 m/z 为 162.10,188.10,206.20 的片段,这与噻磺酸相符。因此,TsmE 水解噻吩磺隆的生化反应是就噻吩磺隆转化成噻磺酸 (见图 5)。

[0077] 2.7.2 高效盖草能降解代谢产物的确定

[0078] 利用串联质谱测定高效盖草能降解代谢产物,2ml 2.6 中的高效盖草能酶反应液二氯甲烷提取物经氮气吹干后溶于 100 μ L 甲醇,进行串联质谱测定,串联质谱条件:MS/MS (Finnigan TSQ Quantum Ultra AM, Thermal, U. SA.),采用电喷雾形式离子化,正负离子同时检测,质量扫描范围 (m/z):30-1200。

[0079] MS/MS 的一级质谱图 (见图 6A) 中有 m/z 为 359.87 的分子负离子峰,m/z 为 359.87 的分子负离子其二级质谱 (见图 6B) 中有 m/z 为 287.60 的片段,这与 TsmE 水解高效盖草能的代谢产物 2-[4-(3-氯-5-三氟甲基-2-吡啶氧基)苯氧基]丙酸相符。因此,TsmE 水解高效盖草能的生化反应是就将高效盖草能转化成 2-[4-(3-氯-5-三氟甲基-2-吡啶氧基)苯氧基]丙酸 (见图 7)。以上实施例中使用的微生物来源如下:

[0080] pUC118 (BamHI) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司,

[0081] 大肠杆菌 DH10B 购自上海英骏生物技术有限公司,

-
- [0082] 大肠杆菌高表达载体 pET-29a(+) 购自 Novogen 公司，
[0083] 表达宿主菌大肠杆菌 BL21 (DE3) 购自上海英骏生物技术有限公司。

[0001]

<110> 南京农业大学

<120> 噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 及其应用

<160> 4

<210> 1

<211> 1194

<212> DNA

<213> 嗜甲基菌 S113 (*Methylophilus* sp.)

<220>

<223> 除草剂噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE*

<400> 1

```

atggaaaccg ataaaaaac cggaacgtcc cgcagatcat ttgtgaagc tgctggaacc 60
ggcgcaatag gaatagegac gctgccgctt tcgactgcaa ctgctttcgc ggaaactgac 120
aacgtggagc ttgcccaatc gaagcggaag gttgtccttg ctgaacaagg cagtttctac 180
atcgggggca gaacagtaac cgggcctgga aaattcgatc cgtcaaagcc ggtaattcca 240
tatccaacg aaggtgccac gttttatata aatcaaatgt acgtaaactt teaagctcct 300
gtgcgcctc gtgggctgcc tctagtcttt tggcatgggg gcggaactaac cggccatata 360
tgggaatcta cccagacgg ccgccccgga ttteagacc tctttgttca agatcggcat 420
acggtctaca cgattgatca gccagggcgc ggaaggggca atattctac ctttaatgga 480
ccttttgggc agttggaaga agagtcgatt gttaacactg ttaccgaaa ctccagtaaa 540
gaaggagcgt gggtagaga tcgactaggg cccgctcccg gccagtttt tgagaacage 600
caatleccac glggllalga agacaactac llcaaggaga lgggllcag tccgtcgcac 660
tcatcagatg agatagtega cgtgtgtgtt aaactagtaa ctcacatagg tccttgtgtt 720
ctggtgacct attcgcttc cggagtactg ggcacgcgag tcgcgacaca cgccaagaac 780
gtgaggggga tcgttgctta tgagcctgcg acaagtatct ttcccaaagg aaaagtgcct 840
gagataccgc ctctgccga taaaagtcg caaatltcc cgccgttcga gatccaggag 900
tctacttta agaagctcgc gaagataccc attcagttg tctteggaga taatateccc 960
aagaacccta aatccgcta ttggtctctg gactggtgga gagtcactcg ctacgctcac 1020
agcttgteac tcagagctat caataagctc ggtggtcaag cgtctctttt ggatttgcgc 1080
actgcgggac ttgcggcaa cacgcatttt ccattcaccg accggaataa cgtgcaggtc 1140
gcttctctgt tatctgattt cctcggaaag cacggcttag atcagaacga aagc 1194

```

<210> 2

<211> 398

<212> PRT

<213> 嗜甲基菌 S113 (*Methylophilus* sp.)

<220>

<223> 除草剂噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE*

<400> 2

[0002]

Met	Glu	Thr	Asp	Lys	Lys	Thr	Gly	Thr	Ser	Arg	Arg	Ser	Phe	Val
1				5					10					15
Lys	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ile	Gly	Ile	Ala	Thr	Leu	Pro	Leu
				20					25					30
Ser	Thr	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Glu	Thr	Asp	Asn	Val	Glu	Leu	Ala
				35					40					45
Gln	Ser	Lys	Arg	Lys	Val	Val	Leu	Ala	Glu	Gln	Gly	Ser	Phe	Tyr
				50					55					60
Ile	Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	Lys	Phe	Asp	Pro	Ser
				65					70					75
Lys	Pro	Val	Ile	Pro	Tyr	Ser	Asn	Glu	Gly	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ile
				80					85					90
Asn	Gln	Met	Tyr	Val	Asn	Phe	Gln	Ala	Pro	Val	Arg	Pro	Arg	Gly
				95					100					105
Leu	Pro	Leu	Val	Phe	Trp	His	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Gly	His	Ile
				110					115					120
Trp	Glu	Ser	Thr	Pro	Asp	Gly	Arg	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	Leu	Phe
				125					130					135
Val	Gln	Asp	Arg	His	Thr	Val	Tyr	Thr	Ile	Asp	Gln	Pro	Gly	Arg
				140					145					150
Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Pro	Thr	Phe	Asn	Gly	Pro	Phe	Gly	Gln	Leu
				155					160					165
Glu	Glu	Glu	Ser	Ile	Val	Asn	Thr	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Lys
				170					175					180
Glu	Gly	Ala	Trp	Val	Arg	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Ala	Pro	Gly	Gln
				185					190					195
Phe	Phe	Glu	Asn	Ser	Gln	Phe	Pro	Arg	Gly	Tyr	Glu	Asp	Asn	Tyr
				200					205					210
Phe	Lys	Glu	Met	Gly	Phe	Ser	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asp	Glu	Ile
				215					220					225
Val	Asp	Ala	Val	Val	Lys	Leu	Val	Thr	His	Ile	Gly	Pro	Cys	Val
				230					235					240
Leu	Val	Thr	His	Ser	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Gly	Met	Arg	Val	Ala
				245					250					255
Thr	His	Ala	Lys	Asn	Val	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Tyr	Glu	Pro	Ala
				260					265					270
Thr	Ser	Ile	Phe	Pro	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	Glu	Ile	Pro	Pro	Leu
				275					280					285
Ala	Asp	Lys	Lys	Ser	Gln	Ile	Phe	Pro	Pro	Phe	Glu	Ile	Gln	Glu
				290					295					300

[0003]

Ser Tyr Phe Lys Lys Leu Ala Lys Ile Pro Ile Gln Phe Val Phe
 305 310 315

Gly Asp Asn Ile Pro Lys Asn Pro Lys Ser Ala Tyr Trp Phe Leu
 320 325 330

Asp Trp Trp Arg Val Thr Arg Tyr Ala His Ser Leu Ser Leu Glu
 335 340 345

Ala Ile Asn Lys Leu Gly Gly Gln Ala Ser Leu Leu Asp Leu Pro
 350 355 360

Thr Ala Gly Leu Arg Gly Asn Thr His Phe Pro Phe Thr Asp Arg
 365 370 375

Asn Asn Val Gln Val Ala Ser Leu Leu Ser Asp Phe Leu Gly Lys
 380 385 390

His Gly Leu Asp Gln Asn Glu Ser
 395

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 的 PCR 扩增正向引物

<400> 3

tgcagacata tggaaaccga taaaaaac 29

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 噻吩磺隆水解酶基因 *tsmE* 的 PCR 扩增反向引物

<400> 4

tgcagagaat tccttccat aagagcgccg at 32

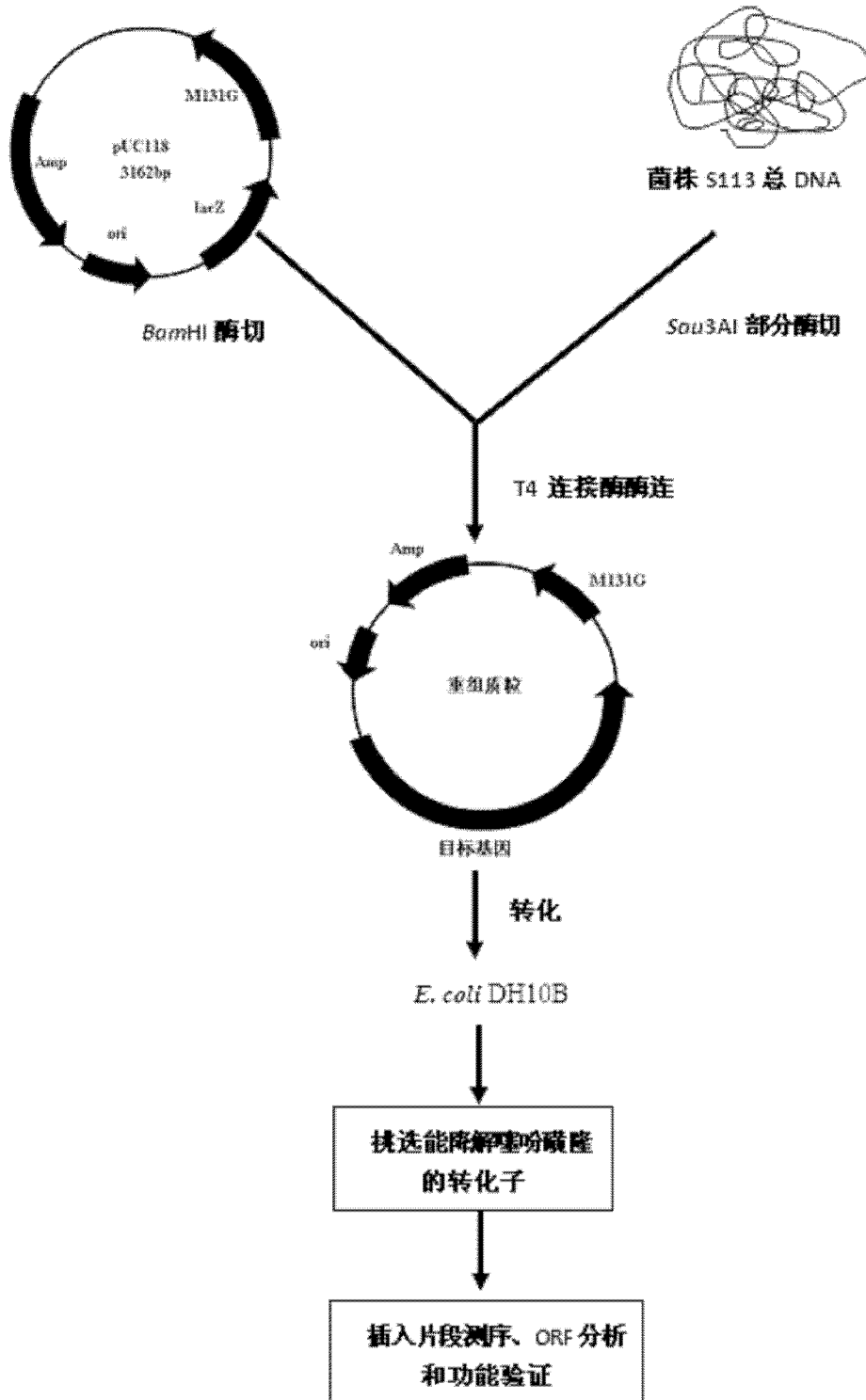


图 1

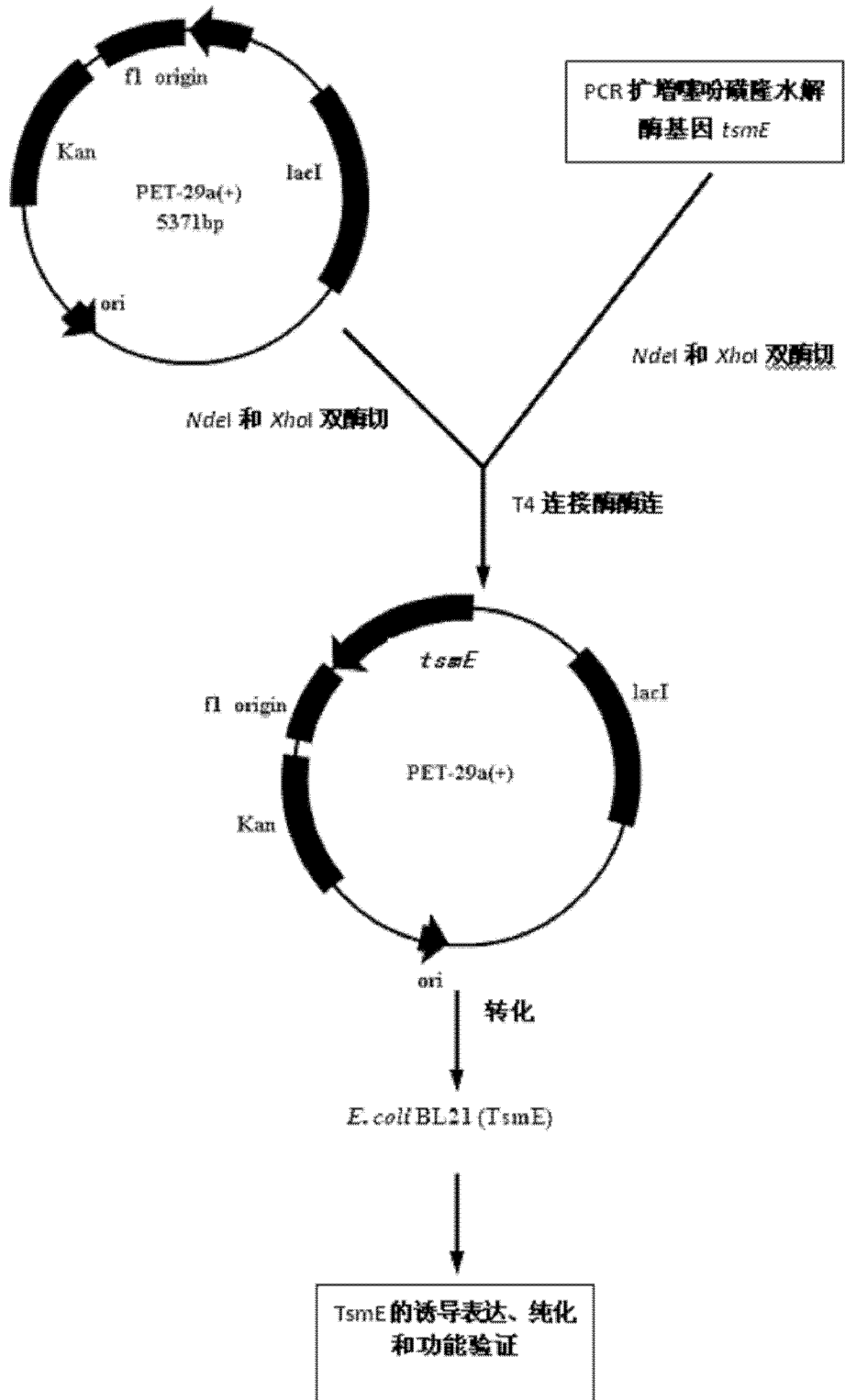


图 2

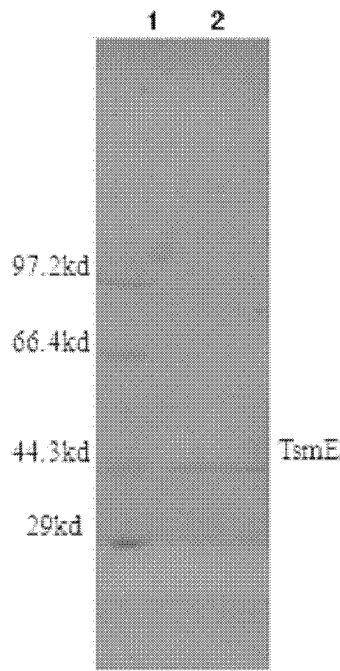
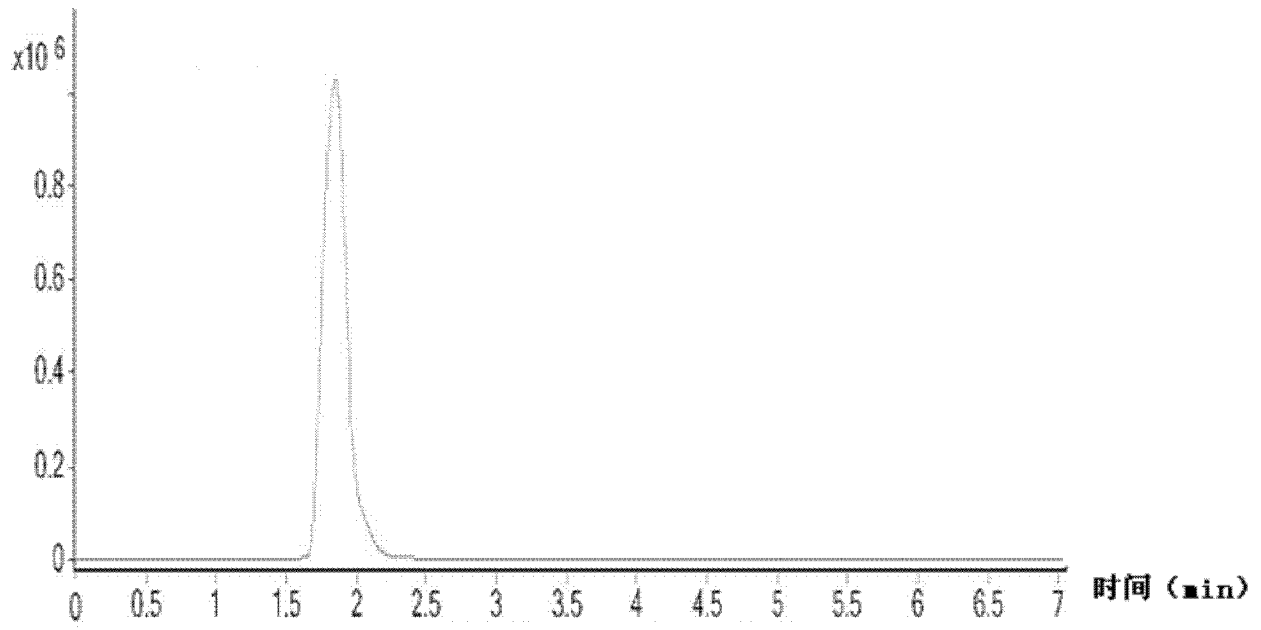
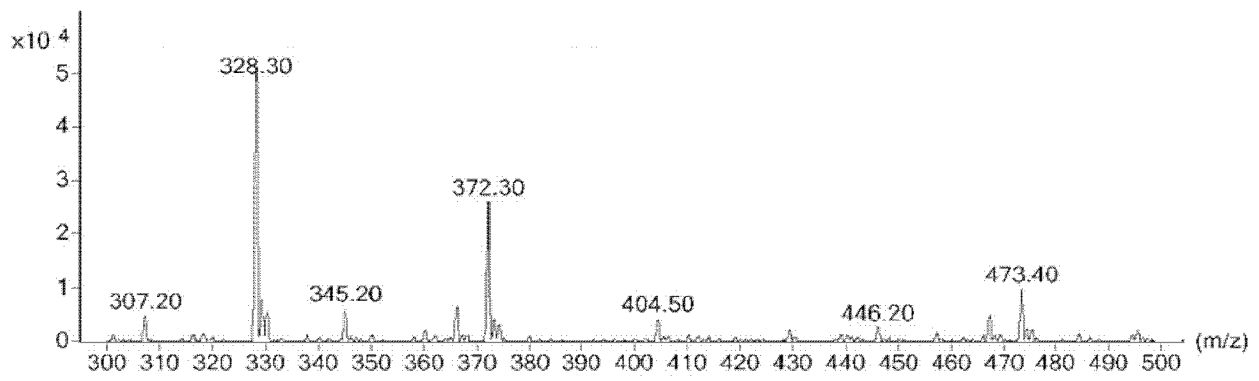


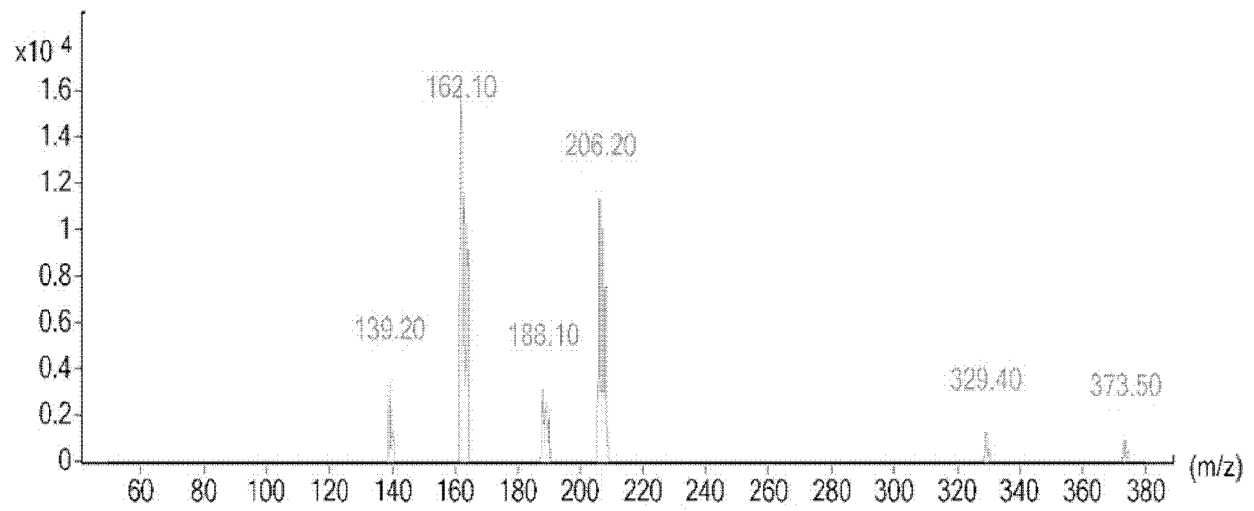
图 3



A



B



C

图 4

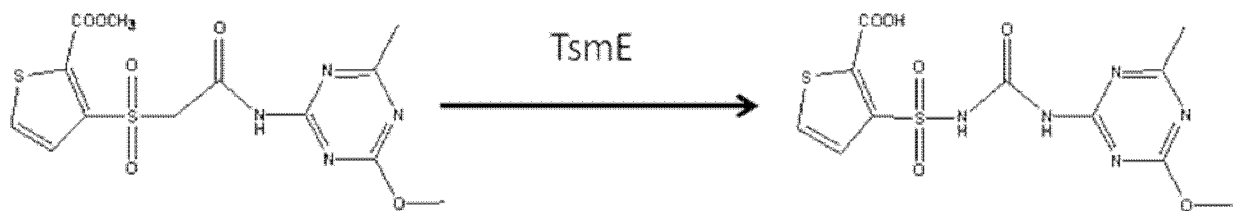
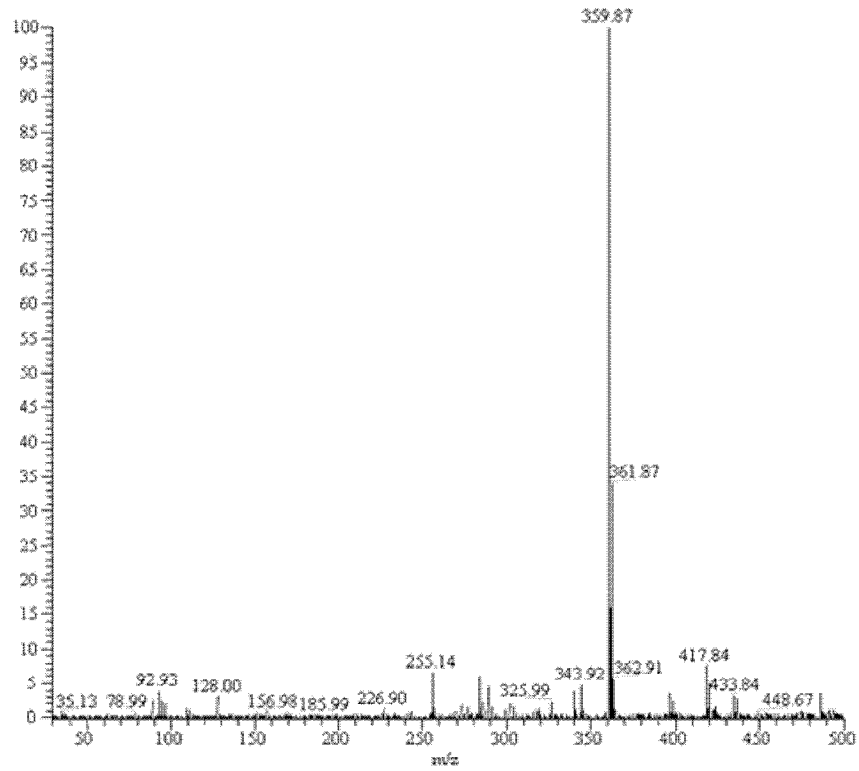
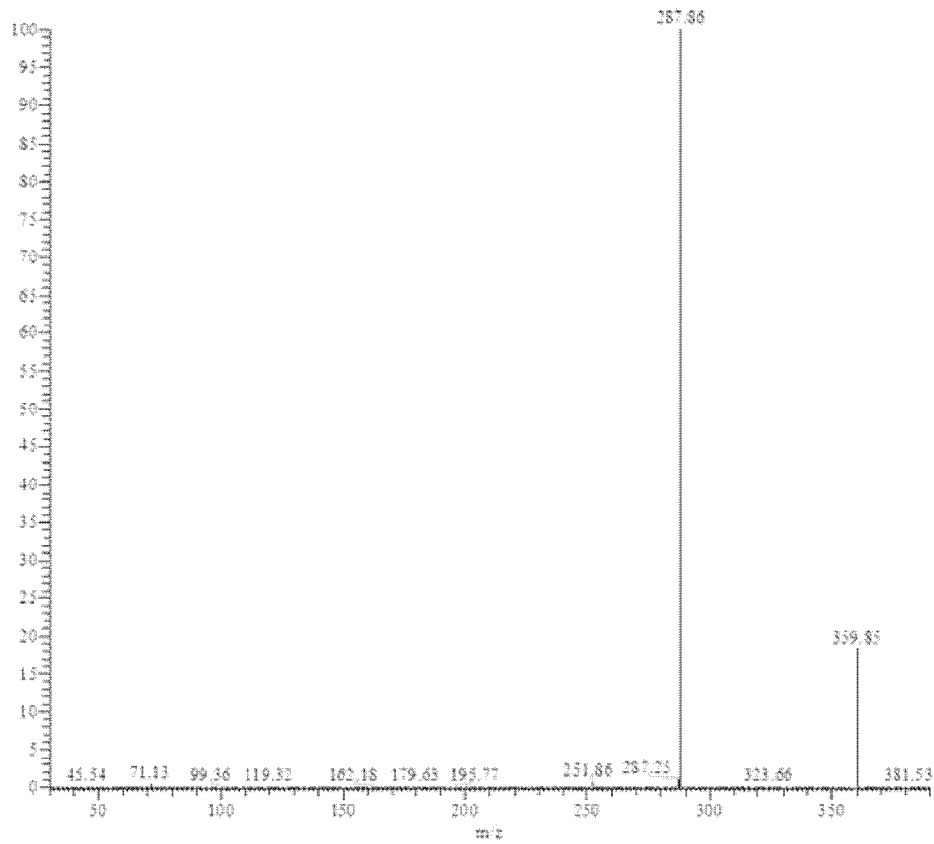


图 5



A



B

图 6

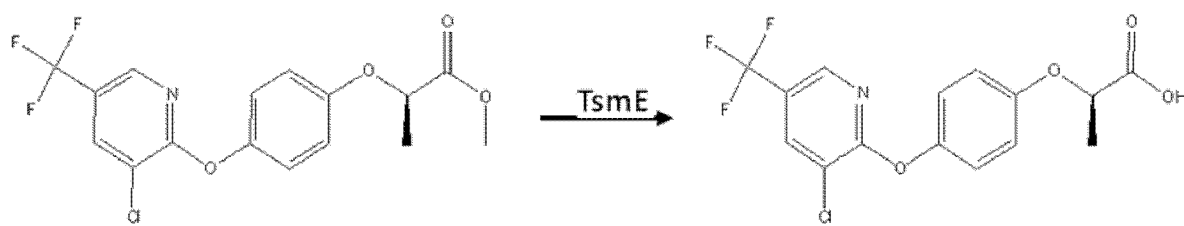


图 7