



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108118037 A

(43)申请公布日 2018.06.05

(21)申请号 201611064282.7

(22)申请日 2016.11.28

(71)申请人 青岛蔚蓝生物集团有限公司

地址 266061 山东省青岛市崂山区苗岭路  
29号山东高速大厦12A07

(72)发明人 吴秀秀 邵昭

(51)Int. Cl.

*C12N 9/04*(2006.01)

*C12N 15/53*(2006.01)

*C12N 15/81*(2006.01)

*C12N 1/19*(2006.01)

*A23K 20/189*(2016.01)

*C12R 1/84*(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表4页

(54)发明名称

一种耐热性提高的葡萄糖氧化酶突变体

(57)摘要

本发明涉及基因改造技术领域,具体提供了一种耐热性提高的葡萄糖氧化酶突变体。与野生型相比,所述葡萄糖氧化酶突变体的耐热性得到大幅提高,60℃处理10 min后残余酶活提高了11.3-66.9%,65℃处理5 min后残余酶活提高了23.7-105.5%,有利于葡萄糖氧化酶在饲料中的广泛应用,因而市场前景广阔。

1. 一种葡萄糖氧化酶突变体,其具有(I)、(II)或(III)所示的氨基酸序列中任一个:
  - (I) 与葡萄糖氧化酶的氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少95%同源性的序列;
  - (II) 具有(I)中所述葡萄糖氧化酶的至少一个免疫表位,且所述葡萄糖氧化酶的氨基酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或几个氨基酸获得的氨基酸序列;
  - (III) 由如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列或其互补序列或因遗传密码的简并性而与如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列或其互补序列的核苷酸序列不同的序列编码的氨基酸序列。
2. 如权利要求1所述的葡萄糖氧化酶突变体,其特征在于,所述的取代为取代1个氨基酸。
3. 如权利要求2所述的葡萄糖氧化酶突变体,其特征在于,所述的取代包括氨基酸序列为SEQ ID NO:1的葡萄糖氧化酶的第193,199,201,218,250,253,254,257,274,275,280,289,293,302,303,304,312,337,338,348,357,359,361,371,384位氨基酸中任意一个发生了取代。
4. 如权利要求3所述的葡萄糖氧化酶突变体,其特征在于,所述的取代包括R193L, K199A, K199D, K199E, F201P, E218P, V250I, S253D, S253K, S253Y, Q254F, Q254K, T257D, T257E, T257K, H274F, H274Y, N275E, N275K, N275T, N275Y, H280K, H280R, A289L, T293L, M302D, K303P, S304D, S304P, S304R, D312P, S337P, A338D, F348Y, D357P, S359A, K361F, K361L, E371P, H384D, H384L中的任意一个。
5. 编码权利要求1-4任一项所述的葡萄糖氧化酶突变体的DNA分子。
6. 一种重组表达载体,其特征在于,所述的重组表达载体携带有权利要求5所述的DNA分子。
7. 一种宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞包含有权利要求6所述的重组表达载体。
8. 权利要求1-4任一项所述的葡萄糖氧化酶突变体在饲料制备中的应用。

## 一种耐热性提高的葡萄糖氧化酶突变体

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因改造技术领域,具体涉及一种耐热性提高的葡萄糖氧化酶突变体。

### 背景技术

[0002] 葡萄糖氧化酶是一种需氧脱氢酶,能专一地氧化 $\beta$ -D-葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢。葡萄糖氧化酶通常与过氧化氢酶组成一个氧化还原系统,在分子氧存在下氧化 $\beta$ -D-葡萄糖生成D-葡萄糖酸内酯,同时消耗氧生成过氧化氢。过氧化氢酶将过氧化氢分解生成水和 $1/2$ 氧,而后水又与葡萄糖酸内酯结合产生葡萄糖酸。葡萄糖氧化酶对 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖表现出强烈的特异性,葡萄糖分子C1上的羟基对酶的催化活性至关重要,且羟基处于 $\beta$ 位时要在 $\alpha$ 位时高160倍。葡萄糖氧化酶对L-葡萄糖和2-O-甲基-D-葡萄糖完全没有活性。

[0003] 由于葡萄糖氧化酶的除氧和抗氧化作用,使其在食品、医药、饲料等方面应用非常广泛。在食品工业中,葡萄糖氧化酶作为一种食品保鲜剂,在防止啤酒老化、保持产品原有风味、延长保质期方面有显著效果,还可作为面粉改良剂和面包品质改良剂提高食品质量。在医药领域,我国医院普遍采用葡萄糖氧化酶电极法、葡萄糖氧化酶-过氧化物酶偶联法等检测血液、血清中葡萄糖含量。作为一种新型的饲料添加剂,葡萄糖氧化酶能够改善动物肠道环境,调节饲料消化,促进动物生长。

[0004] 葡萄糖氧化酶广泛分布于动物、植物及微生物体内,工业上主要利用黑曲霉菌或青霉菌进行生产,但是常出现酶活力不高、稳定性差、杂蛋白污染以及分离纯化繁琐等问题。因为目前在颗粒生产过程中有一个短暂的 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 的高温阶段。而黑曲霉来源的葡萄糖氧化酶热稳定性较差,其水溶液在 $65^{\circ}\text{C}$ 下保温5分钟剩余酶活性低于40%,使该酶在颗粒饲料的应用受到限制。目前采用饲料制粒后将葡萄糖氧化酶液体喷涂到饲料上的方法不仅增加设备投入,而且无法保证酶制剂的稳定性以及酶制剂在饲料中的分布均一性。因此,提高葡萄糖氧化酶热稳定性对目前饲料用葡萄糖氧化酶具有重要的现实意义。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种葡萄糖氧化酶突变体,其耐热性得到显著提高,有利于其在饲料领域的广泛应用。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

本发明提供了一种葡萄糖氧化酶突变体,其具有(I)、(II)或(III)所示的氨基酸序列中任意一个:

(I) 与葡萄糖氧化酶的氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少95%同源性的序列;

(II) 具有所述(I)中所述的葡萄糖氧化酶的至少一个免疫表位,且所述葡萄糖氧化酶的氨基酸序列经修饰、取代、缺失或添加一个或几个氨基酸获得的氨基酸序列;

(III) 由如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列或其互补序列或因遗传密码的简并性而与如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列或其互补序列的核苷酸序列不同的序列编码的氨基酸序

列；

在本发明的另一些实施例中，所述取代为取代1个氨基酸。

[0007] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括氨基酸序列为SEQ ID NO:1的葡萄糖氧化酶的第193,199,201,218,250,253,254,257,274,275,280,289,293,302,303,304,312,337,338,348,357,359,361,371,384位氨基酸中任意一个发生了取代。

[0008] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第193位氨基酸由R变为L。

[0009] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第199位氨基酸由K变为A,或D,或E。

[0010] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第201位氨基酸由F变为P。

[0011] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第218位氨基酸由E变为P。

[0012] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第250位氨基酸由V变为I。

[0013] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第253位氨基酸由S变为D,或K,或Y。

[0014] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第254位氨基酸由Q变为F,或K。

[0015] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第257位氨基酸由T变为D,或E,或K。

[0016] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第274位氨基酸由H变为F,或Y。

[0017] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第275位氨基酸由N变为E,或K,或T,或Y。

[0018] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第280位氨基酸由H变为K,或R。

[0019] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第289位氨基酸由A变为L。

[0020] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第293位氨基酸由T变为L。

[0021] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第302位氨基酸由M变为D。

[0022] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第303位氨基酸由K变为P。

[0023] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第304位氨基酸由S变为D,或P,或R。

[0024] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第312位氨基酸由D变为P。

[0025] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第337位氨基酸由S变为P。

[0026] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第338位氨基酸由A变为D。

[0027] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第348位氨基酸由F变为Y。

[0028] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第357位氨基酸由D变为P。

[0029] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第359位氨基酸由S变为A。

[0030] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第361位氨基酸由K变为F,或L。

[0031] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第371位氨基酸由E变为P。

[0032] 在本发明的另一些实施例中，所述取代包括第384位氨基酸由H变为D,或L。

[0033] 本发明还提供了上述葡萄糖氧化酶突变体在饲料中的应用。

[0034] 本发明还提供了具有上述DNA分子的重组表达载体。

[0035] 本发明还提供了一种宿主细胞,包含上述重组表达载体。

[0036] 在本发明的一些实施例中,宿主细胞为毕赤酵母。

[0037] 本发明提供的葡萄糖氧化酶单点突变体的耐热性普遍高于野生型,60℃处理10 min后残余酶活提高了11.3-66.9%,65℃处理5 min后残余酶活提高了23.7-105.5%。从而说明上述单点突变导致葡萄糖氧化酶的耐热性得到大幅提升,比野生型更适合用作饲料添加剂,有利于葡萄糖氧化酶在饲料中的广泛应用,因而市场前景广阔。

[0038] 具体实施方式:

本发明用到了遗传工程和分子生物学领域使用的常规技术和方法,例如MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd Ed. (Sambrook, 2001)和CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, 2003)中所记载的方法。这些一般性参考文献提供了本领域技术人员已知的定义和方法。但是,本领域的技术人员可以在本发明所记载的技术方案的基础上,采用本领域其它常规的方法、实验方案和试剂,而限于本发明具体实施例的限定。

[0039] 本发明中A,R,D,C,Q,E,H,I,G,N,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V分别是丙氨酸Ala,精氨酸Arg,天冬氨酸Asp,半胱氨酸Cys,谷氨酰胺Gln,谷氨酸Glu,组氨酸His,异亮氨酸Ile,甘氨酸Gly,天冬酰胺Asn,亮氨酸Leu,赖氨酸Lys,甲硫氨酸Met,苯丙氨酸Phe,脯氨酸Pro,丝氨酸Ser,苏氨酸Thr,色氨酸Trp,酪氨酸Tyr,缬氨酸Val的缩写。

[0040] 本发明具体实施例所使用的实验材料和试剂如下:

菌株与载体:大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、毕赤酵母GS115、载体pPIC9K、Amp、G418购自Invitrogen公司。

[0041] 酶与试剂盒:PCR酶及连接酶购买自Takara公司,限制性内切酶购自Fermentas公司,质粒提取试剂盒及胶纯化回收试剂盒购自Omega公司,GeneMorph II随机诱变试剂盒购自北京博迈斯生物科技有限公司。

[0042] 培养基配方:

大肠杆菌培养基(LB培养基):0.5%酵母提取物,1%蛋白胨,1% NaCl,pH7.0);

LB-AMP培养基:LB培养基加100  $\mu$ g/ml氨苄青霉素;

酵母培养基(YPD培养基):1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖;

酵母筛选培养基(MD培养基):2%葡萄糖,2%琼脂糖,1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}$ 生物素;

BMGY培养基:2%蛋白胨,1%酵母提取物,100 mM磷酸钾缓冲液(pH6.0),1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}$ 生物素,1%甘油;

BMMY培养基:2%蛋白胨,1%酵母提取物,100 mM磷酸钾缓冲液(pH6.0),1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}$ 生物素,0.5%甲醇。

[0043] 下面结合实施例对本发明进行详细的描述。

[0044] 实施例1 葡萄糖氧化酶耐热单点突变体的获得

1.1 葡萄糖氧化酶基因的扩增

以黑曲霉(*Aspergillus niger*)基因组为模板进行PCR扩增,PCR引物GOD-F1、GOD-R1如下:

GOD-F1:GGTATTGAGGCATCTTTGTTGAC

GOD-R1:TTATTGCATAGAAGCGTAATC

胶回收PCR产物,连接pEASY-T载体,转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,挑取正确的转化子进行测序。测序结果显示,扩增得到的基因片段的核苷酸序列为SEQ ID NO:2,其编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:1。通过NCBI BLAST比对发现,SEQ ID NO:1与来源于黑曲霉的葡萄糖氧化酶序列相似性高达100%,从而确定通过PCR获得的基因为葡萄糖氧化酶基因,命名为GOD。

[0045] 葡萄糖氧化酶突变体基因的扩增及合成

为了提高上述葡萄糖氧化酶GOD的耐热性,申请人通过定向进化技术对该酶进行了大

量突变的筛选,设计PCR引物GOD-F2、GOD-R2如下:

GOD-F2:GGCGAATTCGGTATTGAGGCATCTTTGTTGAC(下划线为限制性内切酶*EcoRI*识别位点)

GOD-R2:ATAGCGGCCGCTTATTGCATAGAAGCGTAATC(下划线为限制性内切酶*Not I*识别位点)

以GOD基因为模板,以上述引物用GeneMorph II随机突变PCR试剂盒(Stratagene)进行PCR扩增,胶回收PCR产物,*EcoRI*、*Not I*进行酶切处理后与经同样酶切后的pET21a载体连接,转化至大肠杆菌BL21(DE3)中,涂布于LB+Amp平板,37℃倒置培养,待转化子出现后,用牙签逐个挑至96孔板,每个孔中加入150 μl含有0.1mM IPTG的LB+Amp培养基,37℃ 220 rpm培养6 h左右,离心弃上清,菌体用缓冲液重悬,反复冻融破壁,获得含有葡萄糖氧化酶的大肠杆菌细胞裂解液。

[0046] 分别取出10μL裂解液至两块新的96孔板,其中一块于70℃处理5min后,两块96孔板都加入40μL底物,于30℃反应30 min后,DNS法测定生成的还原糖,计算高温处理的酶液相比于未处理酶液的相对酶活。实验结果表明,有些突变对葡萄糖氧化酶GOD的耐热性没有影响,有些突变甚至使其耐热性或酶活变得更差了;另外还有些突变,虽然能提高葡萄糖氧化酶对温度的耐受性,但突变后其酶学性质发生了显著的变化,这些均不符合要求。最终,申请人筛选到既能显著提高葡萄糖氧化酶GOD的耐热性,又不会影响其酶活及原有酶学性质的突变位点:R193L,K199A/D/E,F201P,E218P,V250I,S253D/K/Y,Q254F/K,T257D/E/K,H274F/Y,N275E/K/T/Y,H280K/R,A289L,T293L,M302D,K303P,S304D/P/R,D312P,S337P,A338D,F348Y,D357P,S359A,K361F/L,E371P,H384D/L。

[0047] 用引物GOD-F2、GOD-R2对上述突变体分别进行PCR扩增,引物两端引入*EcoRI*、*Not I*位点。PCR反应条件为:94℃变性5min;然后94℃变性30s,56℃复性30s,72℃延伸1min,30个循环后,72℃保温10min。琼脂糖凝胶电泳结果显示,扩增得到的突变体基因均为大小1800bp左右的片段。

[0048] 通过上述同样的PCR方法扩增得到野生型葡萄糖氧化酶GOD的基因片段。

[0049] 毕赤酵母工程菌株的构建

将上述克隆得到的葡萄糖氧化酶突变体基因通过*EcoRI*和*Not I*位点与表达载体pPIC9K相连接,构建表达载体。

[0050] 将表达载体用*Sal I*进行线性化,表达载体线性化片段通过电穿孔法转化毕赤酵母GS115,在MD平板上分别筛选得到毕赤酵母重组菌株,然后分别在含不同浓度遗传霉素的YPD平板上筛选多拷贝的转化子。

[0051] 将筛选得到的含上述单点突变体的转化子转接于BMGY培养基中,30℃、250 rpm振荡培养1 d;再转入BMMY培养基中,30℃、250 rpm振荡培养;每天添加0.5%的甲醇,诱导表达4 d;离心去除菌体,得到含葡萄糖氧化酶突变体的发酵上清液;将其进行SDS-PAGE电泳检测分析。结果显示,发酵上清液中葡萄糖氧化酶突变体的分子量大小约为64 kDa,与理论分子量大小相同。

[0052] 通过上述同样的方法构建得到重组表达野生型葡萄糖氧化酶的毕赤酵母工程菌。摇瓶水平发酵,30℃、250 rpm振荡培养;每天添加0.5%的甲醇,诱导表达4 d;离心去除菌体,得到含野生型葡萄糖氧化酶GOD的发酵上清液。

## [0053] (1) 葡萄糖氧化酶酶活单位的定义

在pH6.0, 30℃条件下, 每分钟能把1 $\mu$ mol的 $\beta$ -D-葡萄糖氧化为D-葡萄糖酸和过氧化氢所需要的酶量, 定义为1个酶活力单位(IU)。

## [0054] (2) 酶活测定方法

将粗酶液直接用缓冲液稀释至约10U/mL。取4支150\*15的试管, 加入2ml缓冲液、0.3ml葡萄糖、0.4ml苯酚、0.1ml 4-氨基安替吡啉、0.1ml 辣根过氧化物酶, 30℃预热5min。向其中一管加入0.1ml蒸馏水, 作为空白调零。水浴锅放在分光光度计旁以方便操作, 向样品管中加入0.1ml样品溶液, 此时开始计时, 涡旋混匀后立即在500nm波长处用1cm比色杯比色。读取0.5 min时吸光度值为A<sub>0</sub>, 再反应1min后, 读取吸光度值A<sub>1</sub>, 得出  $\Delta A_{500}=A_1-A_0$ 。

## [0055] 酶活计算公式:

试样中酶活力X<sub>1</sub> (U/mL或U/g) 按照如下公式计算:

$$X_1 = \Delta A_{500} \times f \times B \times 1000 / (887 \times t \times A \times d) = 33.82 \times \Delta A_{500} \times f$$

式中:

f-----酶液稀释倍数

B-----反应液体积 (3 ml)

1000-----消光系数单位转换系数

887-----消光系数 ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

t-----反应时间 (min), 即读数A<sub>1</sub>与A<sub>0</sub>之间的时间差值1min。

## [0056]

A-----加入样品体积 (0.1 ml)

d-----比色皿的厚度 (cm)

## (3) 酶活测定结果

按照上述方法进行发酵上清液的酶活测定, 结果显示: 重组表达野生型葡萄糖氧化酶的毕赤酵母发酵上清液的酶活为105 U/ml, 而重组表达葡萄糖氧化酶突变体的毕赤酵母发酵上清液的酶活约为102-154 U/mL。

## [0057] 发酵验证

在10升发酵罐上分别进行上述构建得到的毕赤酵母工程菌的发酵, 发酵使用的培养基配方为: 硫酸钙1.1 g/L、磷酸二氢钾5.5 g/L、磷酸二氢铵55 g/L、硫酸钾20.3 g/L、硫酸镁16.4 g/L、氢氧化钾1.65 g/L、消泡剂0.05%。

[0058] 发酵工艺: pH值5.0、温度30℃、搅拌速率300 rpm、通风量1.0-1.5(v/v)、溶氧控制在20%以上。

[0059] 整个发酵过程分为三个阶段: 第一阶段为菌体培养阶段, 按7%比例接入种子, 30℃培养24-26 h, 以补完葡萄糖为标志; 第二阶段为饥饿阶段, 当葡萄糖补完之后, 不流加任何碳源, 当溶氧上升至80%以上表明该阶段结束, 为期约30-60 min; 第三阶段为诱导表达阶段, 流加甲醇诱导, 并且保持溶氧在20%以上, 培养时间在150-180 h之间。发酵结束后, 发酵液通过板框过滤机处理后获得粗酶液。

[0060] 采用实施例1中1.3所述葡萄糖氧化酶酶活测定方法对粗酶液进行酶活检测, 结果显示, 重组表达野生型葡萄糖氧化酶的毕赤酵母最终的发酵酶活为3050 U/ml, 而重组表达葡萄糖氧化酶突变体的毕赤酵母最终的发酵酶活达到3030-3590 U/ml。

[0061] 葡萄糖氧化酶酶学性质测定

1、最适作用pH

采用pH值分别为2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,在30℃条件下对实施例1中1.4所述发酵粗酶液进行葡萄糖氧化酶活力测定,以最高酶活为100%,计算相对酶活,结果显示野生型葡萄糖氧化酶GOD与突变体的最适作用pH值都为6.0,且在不同 pH条件下的相对酶活水平差别不大。

[0062] 2、热稳定性分析

将上述粗酶液用pH 6.0的乙酸-乙酸钠缓冲液稀释后,在60℃处理10min、65℃处理5min后,分别测定酶活,以未处理样品的酶活为100%,计算残余酶活。结果如下表所示。



葡萄糖氧化酶突变体	60℃处理 10 min 残余酶活 (%)	65℃处理 5 min 残余酶活 (%)
野生型	40.35	22.80
R193L	49.29	31.48
K199A	52.28	33.24
K199D	54.63	30.77
K199E	53.38	31.18
F201P	48.22	33.23
E218P	50.41	32.82
V250I	50.17	33.17
S253D	58.64	38.86
S253K	62.67	41.73
S253Y	48.83	33.63
Q254F	49.98	32.56
Q254K	49.49	30.77
T257D	55.54	35.91
T257E	48.84	28.20
T257K	44.92	29.23
H274F	67.34	42.75
H274Y	58.05	38.89
N275E	55.53	34.61
N275K	54.58	30.46
N275T	54.11	34.75
N275Y	51.04	34.14
H280K	52.68	33.25
H280R	52.17	35.19
A289L	58.77	34.71
T293L	51.07	30.93
M302D	50.09	30.35
K303P	58.09	39.73
S304D	57.67	44.07
S304P	58.23	35.15
S304R	61.53	36.17
D312P	50.54	35.39
S337P	52.19	35.65
A338D	57.63	46.85
F348Y	49.95	29.62
D357P	49.09	34.56
S359A	50.68	31.33
K361F	49.41	29.89
K361L	51.36	31.76
E371P	49.24	29.54

[0063] 从表中的数据可以看出,与野生型相比,本发明提供的41个单点突变体的耐热性均有显著提高,60℃处理10 min后残余酶活提高了11.3~66.9%,65℃处理5 min后残余酶活

提高了23.7-105.5%。从而说明上述单点突变导致葡萄糖氧化酶的耐热性得到大幅提升,比野生型更适合用作饲料添加剂,有利于葡萄糖氧化酶在饲料中的广泛应用,市场前景广阔。

[0064] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。



210	215	220
Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu		
225	230	235
Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn		
	245	250
Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly		
	260	265
Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly		
	275	280
Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys		
290	295	300
Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val		
305	310	315
Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Ala Thr Val Arg Ser Arg Ile		
	325	330
Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe		
	340	345
Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn		
	355	360
Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe		
370	375	380
His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp		
385	390	395
Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala		
	405	410
Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly		
	420	425
Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe Ala Tyr		
	435	440
Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala		
450	455	460
Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr		
465	470	475
Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala		
	485	490
Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg Pro Asn		
	500	505
Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly		
515	520	525

Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val  
 530 535 540  
 Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Val Met Thr  
 545 550 555 560  
 Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu Glu Asp  
 565 570 575  
 Tyr Ala Ser Met Gln  
 580

<210> 2

<211> 1746

<212> DNA

<213> 2

<400> 2

ggtattgagg catctttgtt gacagaccet aaggatgttt ctggaagaac cgttgactac 60  
 attattgctg gtgggtggtt gaccggattg accactgccg caagattgac tgaaaatcca 120  
 aacatctctg ttttggatcat cgagtctggt tcttacgaat ctgacagagg acctattatc 180  
 gaagacttga acgcttacgg tgatattttc ggatcttctg ttgatcatgc ctacgagaca 240  
 gttgagttgg ctactaacia tcagactgct ttgattaggt ctggaaatgg tttgggtgga 300  
 tctactttgg ttaatggagg tacttgact agaccacata aggctcaggt tgattcttgg 360  
 gaaactgttt ttggtaacga aggttggaaac tgggataacg ttgcagetta ctctttgcaa 420  
 gcagaaagag ctagggctcc aaacgctaag caaattgctg ctggtcatta cttaaacgct 480  
 tcttgtcacg gtgttaacgg aactgtccac gccggaccta gagacactgg agatgattac 540  
 tctccaattg tcaaggcatt gatgtctgct gttgaagata gaggagtccc aaccaagaag 600  
 gatttcgggt gtggatgac acatggtggt tctatgttcc caatacatt gcacgaagat 660  
 caagttaggt ctgacgctgc tagagaatgg ttgttgccaa attatcaaag accaaacttg 720  
 caggctctga ctggtcagta cgtcggtaag gttttgtgt ctcaaacggt tactactcca 780  
 agagctgtcg gtgtcgagtt cggactcat aagggttaata ctcaaacgt ttacgctaag 840  
 catgaagttt tgttgctgc tggttctgct gtttctcaa ccatcttga gtattctgga 900  
 attggtatga agtctatctt ggaaccattg ggtattgata ctgtcgttga tttgccagtt 960  
 ggtttgaaact tgcaggatca gactacagcc actgtcagat ccagaattac ttctgctggt 1020  
 gctgggtcaag gtcaggctgc atggtttgct acttttaacg aaacttttgg tgattactct 1080  
 gaaaaggctc atgaattggt gaacactaag ttggaacaat gggctgaaga agctgttct 1140  
 agaggtgggt ttcataatac tactgctttg ttgattcaat acgaaaacta cagagactgg 1200  
 attgttaacc ataacgttgc ctattctgag ttgtttttgg acaccgctgg tgttgcttct 1260  
 tttgatgttt gggatttgtt gccatttaca agaggttacg ttcacatttt ggataaagat 1320  
 ccatacttgc atcacttgc atacgatcca caatactttt tgaacgaatt ggacttgttg 1380  
 ggtcaagctg ctgctactca attggetaga aacatttcta actctggtgc aatgcaaact 1440  
 tactttgccg gtgaaactat cccaggagat aacttggett acgatgctga tttgtctgct 1500  
 tggactgaat acattccata ccatttcaga ccaaactacc acggtgtcgg tacttgttct 1560

---

atgatccaa aggaaatggg aggtgttgc gataacgctg caagagtcta cggagttcaa 1620  
ggtttgagag ttattgatgg ttctattcca ccaactcaaa tgtcttctca tgttatgact 1680  
gttttttacg ctatggcttt gaagatttct gatgctatct tggaagatta cgcttctatg 1740  
caataa 1746