



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114752583 A

(43) 申请公布日 2022.07.15

(21) 申请号 202210333541.0

C12N 1/21 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.30

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 齐鲁工业大学

地址 250300 山东省济南市长清区大学路
3501号

(72) 发明人 汪俊卿 王国栋 王瑞明 陆捷

李丕武 肖静 王婷 吉兴香

田中建 刘开泉

(74) 专利代理机构 济南竹森知识产权代理事务

所(普通合伙) 37270

专利代理师 朱家富

(51) Int. Cl.

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表6页 附图1页

(54) 发明名称

一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体及其
制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体及其制备方法与应用,属于酶工程技术领域。一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体,其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。本发明的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体是在原始酶的基础上,将其氨基酸序列第9位的苏氨酸(Thr)和第43位的甘氨酸(Gly)突变成半胱氨酸(Cys)得到的。与原始酶相比,显著提高了酶的最适反应温度,由60℃提升到了75℃,还在一定程度上增加了突变酶Eccs1G69金属离子耐受性,拓宽了耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体应用范围及应用潜力。

1. 一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体,其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。
2. 编码权利要求1所述的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的核苷酸序列,如SEQ ID NO.4所示。
3. 一种含有权利要求2所述的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的核苷酸序列的重组质粒。
4. 如权利要求3所述的重组质粒,其特征在于,所述重组质粒的载体为pET28a(+).
5. 一种含有权利要求2所述的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的核苷酸序列或权利要求3所述的重组质粒的基因工程菌。
6. 如权利要求5所述的基因工程菌,其特征在于,所述基因工程菌的表达宿主为大肠杆菌;
进一步优选的,所述表达宿主菌为大肠杆菌BL21。
7. 权利要求1所述的耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 人工合成含有原始酶 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)核苷酸序列的质粒pET28a(+)
Eccs1G,设计引物G35-69U和G35-69D以及G35-69WU和G35-69WD,以质粒pET28a(+)
Eccs1G为模板,以G35-69U和G35-69D为引物,PCR合成目的基因Eccs1G69^T,以质粒pET28a(+)
Eccs1G为模板,以G35-69WU和G35-69WD为引物,反向PCR合成目的基因Eccs1G69^G;
 - (2) 将步骤(1)合成的目的基因Eccs1G69^G与Eccs1G69^T连接环化,构建突变质粒,将突变
质粒转入大肠杆菌BL21,构建重组大肠杆菌,诱导表达耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体。
8. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述原始酶 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。
9. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述G35-69U的核苷酸序列为:5'-CCGTTAtgcTACCACAACCTCCTCCACCT-3'(SEQ ID NO:9),
所述G35-69D的核苷酸序列为:5'-AGCTTgcaATCGTTGGTAAAAGTTGCATT-3'(SEQ ID NO:10),
所述G35-69WU的核苷酸序列为:5'-TTTTACCAACGATtgcAAGCTGCGT-3'(SEQ ID NO:7),
所述G35-69WD的核苷酸序列为:5'-GAGTTGTGGTAgcaTAACGGTTCCCA-3'(SEQ ID NO:8)。
10. 权利要求1所述的耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体在食品、饲料、造纸领域中的应用。

一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于酶工程技术领域,特别涉及一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)是从一株分离的土壤细菌中得到的,初步鉴定为拟芽孢杆菌(Paenibacillus),具有耐碱、耐盐的特性,能够水解大麦 β -葡聚糖、海带多糖。耐碱、耐盐的特征使该酶成为进一步研究和工业应用的好的候选者,可以应用于工业造纸、酿酒等领域,应用前景广泛。但该葡聚糖酶在高温下会迅速失活,在实际应用中可能损失较大,因此改善其热稳定性对拓宽其实际应用具有十分重要的意义。

[0003] 二硫键与蛋白质高级结构的生物活性有关,是蛋白质中唯一的共价键,约需要209.3-418.6kJ/mol的能量才能将其打断,对维持蛋白质的结构和功能具有关键的作用。形成的二硫键会成为折叠后蛋白质的疏水核心,局部的疏水残基会凝聚在二硫键的周边,透过疏水性作用而联系在一起。在蛋白质中构建二硫键是提高其稳定性的主要策略之一,已经成功地应用于多种酶学研究。中国专利文献CN107177581(申请号201710456875.6)公开了一种改造的脲水合酶,改造脲水合酶的方法,是将脲水合酶氨基酸序列的 α 亚基的133位Pro和 β 亚基的215位Asp分别置换为Cys,使两个亚基之间形成二硫键。本发明改造脲水合酶的抗逆性、耐热性和产物耐受性都有显著提升,并且没有导致脲水合酶活性的降低。中国专利文献CN104531729A(申请号201410758084.5)公开了一种突变阿魏酸酯酶A,根据来源于A.usamii E001阿魏酸酯酶A的空间结构设计突变A126C和N152C,得到突变阿魏酸酯酶A:AuFaeAA126C-N152C,C126和C152可以形成一个二硫键。实验结果表明突变后该酶热稳定性有了明显的提高。中国专利文献CN103642776A(申请号201310666411.X)公开了一种突变木聚糖酶,根据来源于A.oryzae CICC40186木聚糖酶Aoxyn11A的空间结构设计突变S108C和N152C,得到突变木聚糖酶:Aoxyn11AELJ,其成熟肽108C和152C可以形成一个跨二级结构的二硫键。实验结果表明突变后该酶热稳定性有了明显的提高。

[0004] 二硫键的正确形成是蛋白质折叠的限速步骤之一,控制引入二硫键的位置非常必要。因此,在引入二硫键时,合理地进行添加才能最大限度地提高酶分子的热稳定性能。本发明的首要目的在于克服现有的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)在高温条件下失去活力,有针对性地设计添加二硫键,使酶的耐热性提高。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体及其制备方法与应用。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体,其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0008] 本发明的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的原始酶为 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA),

其氨基酸序列GenBank ACCESSION NO:AGK07610.1 (SEQ ID NO:1),其核苷酸序列GenBank ACCESSION NO:KC513762.1 (SEQ ID NO:2)。

[0009] 本发明的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体是在原始酶的基础上,将其氨基酸序列第9位的苏氨酸(Thr)和第43位的甘氨酸(Gly)突变成半胱氨酸(Cys)得到的。

[0010] 编码上述 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的核苷酸序列,如SEQ ID NO.4所示。

[0011] 一种含有上述 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的核苷酸序列的重组质粒。

[0012] 根据本发明优选的,所述重组质粒的载体为pET28a(+)

[0013] 一种含有上述 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体核苷酸序列或上述重组质粒的基因工程菌。

[0014] 根据本发明优选的,所述基因工程菌的表达宿主为大肠杆菌。

[0015] 进一步优选的,所述表达宿主菌为大肠杆菌BL21。

[0016] 本发明所述耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的制备方法,包括如下步骤:

[0017] (1)人工合成含有原始酶 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)核苷酸序列的质粒pET28a(+)*Eccs1G*,设计引物G35-69U和G35-69D以及G35-69WU和G35-69WD,以质粒pET28a(+)*Eccs1G*为模板,以G35-69U和G35-69D为引物,PCR合成目的基因*Eccs1G69^T*,以质粒pET28a(+)*Eccs1G*为模板,以G35-69WU和G35-69WD为引物,反向PCR合成目的基因*Eccs1G69^G*;

[0018] (2)将步骤(1)合成的目的基因*Eccs1G69^G*与*Eccs1G69^T*连接环化,构建突变质粒,将突变质粒转入大肠杆菌BL21,构建重组大肠杆菌,诱导表达耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体。

[0019] 根据本发明优选的,步骤(1)中所述G35-69U的核苷酸序列为:5'-CCGTTAtgcTACCACAACCTCCTCCACCT-3'(SEQ ID NO:9),

[0020] 所述G35-69D的核苷酸序列为:5'-AGCTTgcaATCGTTGGTAAAAGTTGCATT-3'(SEQ ID NO:10),

[0021] 所述G35-69WU的核苷酸序列为:5'-TTTTACCAACGATtgcAAGCTGCGT-3'(SEQ ID NO:7),

[0022] 所述G35-69WD的核苷酸序列为:5'-GAGTTGTGGTAgcaTAACGGTTCCCA-3'(SEQ ID NO:8)。

[0023] 上述耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体在食品、饲料、造纸领域中的应用。

[0024] 本发明的耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体可以在高温条件下作用于 β -葡聚糖的1,3及1,4糖苷键,产生低聚糖及葡萄糖,可以应用于食品、饲料、造纸等领域。

[0025] 本发明中未详细说明的实验步骤均按照现有技术记载的方法进行。

[0026] 本发明的有益效果:

[0027] 本发明提供了一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体,是在原始酶(SEQ ID NO:1)的基础上,将其氨基酸序列第9位的苏氨酸(Thr)和第43位的甘氨酸(Gly)突变成半胱氨酸(Cys)得到的,与原始酶相比,显著提高了酶的最适反应温度,由60℃提升到了75℃,还在一定程度上增加了突变酶*Eccs1G69*金属离子耐受性,拓宽了耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体应用范围及应用潜力。

附图说明

[0028] 图1为野生酶和突变酶在不同温度下的酶活变化曲线。

[0029] 图2为野生酶和突变酶在不同金属离子存在条件下的相对活性柱状图。

具体实施方式

[0030] 以下结合具体实施例,进一步阐述本发明的操作方法。但是这些实施例仅用于详细说明本发明,而不适用于限制本发明的范围。实施例中涉及的实验操作,若无特殊说明,均为本领域常规技术操作。

[0031] 材料来源:

[0032] 材料与试剂:含有原始酶 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)核苷酸序列的质粒pET28a(+)*Eccs1G*由上海金斯瑞生物公司全基因合成。质粒提取试剂盒购自诺唯赞贸易有限公司, BL21大肠杆菌感受态细胞购自诺唯赞生物公司;引物由上海生工生物工程公司合成;DpnI限制性内切酶购自上海生物工程公司;PCR产物纯化回收试剂盒购自天根生物公司;LB培养基包含蛋白胨1%,酵母浸粉0.5%,氯化钠1%,pH 7.0~7.4;镍柱纯化试剂盒购自七海生物公司;其余试剂均为国内外购买的分析纯级别。

[0033] 实施例1

[0034] 以 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)为模板,其氨基酸序列GenBank ACCESSION NO: AGK07610.1 (SEQ ID NO:1),核苷酸序列GenBank ACCESSION NO:KC513762.1 (SEQ ID NO:2),利用Swiss Model软件进行 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)二级结构的建模,再利用Disulfide By Design预测可以添加二硫键的位置,再根据三级结构当中的具体位点,避开底物结合部位,最终选择了两种不同的组合,构建二硫键,分别是在Thr⁹和Gly⁴³之间以及Ser⁷⁶和Asp²⁰⁵之间构建二硫键。

[0035] 实施例2 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体的制备

[0036] 在Thr⁹和Gly⁴³之间构建二硫键,具体是将编码Thr⁹的密码子ACC以及编码Gly⁴³的密码子GGC突变为编码Cys的密码子TGC,突变得到突变酶*Eccs1G69*,突变酶*Eccs1G69*的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:4;

[0037] 在Ser⁷⁶和Asp²⁰⁵之间构建二硫键,具体是将编码Ser⁷⁶的密码子AGC以及编码Asp²⁰⁵的密码子GAT突变为编码Cys的密码子TGC,突变得到突变酶*Eccs1G102*,突变酶*Eccs1G102*的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:6;

[0038] 上述突变酶的具体制备方法如下:

[0039] (1) 根据人工合成的含有原始酶 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(PlicA)核苷酸序列的质粒pET28a(+)*Eccs1G*设计引物,质粒pET28a(+)*Eccs1G*中 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的核苷酸序列经过了密码子优化,适于在大肠杆菌中表达,其中,用于突变酶*Eccs1G69*的引物为G35-69U和G35-69D以及G35-69WU和G35-69WD,用于突变酶*Eccs1G102*的引物为G102-231U和G102-231D以及G102-231WU和G102-231WD,引物的核苷酸序列信息如下表:

[0040] 表1. 引物的核苷酸序列信息

突变体	引物名称	引物序列	序列编号
[0041] Eccs1G69	G35-69WU	TTTTACCAACGAT <i>ggc</i> AAGCTGCGT	SEQ ID NO:7
	G35-69WD	GAGTTGTGGTA <i>gca</i> TAACGGTTCCCA	SEQ ID NO:8
	G35-69U	CCGTTA <i>atg</i> CACCACAACCTCCTCCACCT	SEQ ID NO:9
	G35-69D	AGCTT <i>gca</i> ATCGTTGGTAAAAGTTGCATT	SEQ ID NO:10
Eccs1G102	G102-231WU	GTACTAT <i>tgc</i> TGGGTAAAGTACACCTCAAAC	SEQ ID NO:11
	G102-231WD	GGTTTCAT <i>gca</i> CACCTTCGCACTTGCCGTAA	SEQ ID NO:12
	G102-231U	TGCGAAGT <i>ggc</i> ATGAAACCGGC	SEQ ID NO:13
	G102-231D	CTTAACCC <i>agca</i> ATAGTACGCATACAG	SEQ ID NO:14

[0042] 注:表格中下划线粗斜体字母表示引入半胱氨酸突变。

[0043] 以质粒pET28a (+) Eccs1G为模板,以G35-69U和G35-69D为引物,进行PCR扩增,获得目的基因Eccs1G69^T;

[0044] 以质粒pET28a (+) Eccs1G为模板,以G35-69WU和G35-69WD为引物,进行反向PCR扩增,获得目的基因Eccs1G69^G;

[0045] 以质粒pET28a (+) Eccs1G为模板,以G102-231U和G102-231D为引物,进行PCR扩增,获得目的基因Eccs1G102^S;

[0046] 以质粒pET28a (+) Eccs1G为模板,以G102-231WU和G102-231WD为引物,进行反向PCR扩增,获得目的基因Eccs1G102^D;

[0047] 上述PCR扩增及反向PCR扩增的反应体系如表2所示:

[0048] 表2.PCR扩增及反向PCR扩增的反应体系

成分	体积
模板	2 μ L
上游引物	2 μ L
下游引物	2 μ L
phanta酶	19 μ L
双蒸水	25 μ L
总体系	50 μ L

[0050] 上述PCR扩增及反向PCR扩增的反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3min;95 $^{\circ}$ C 15s,70 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 3min、30个循环;72 $^{\circ}$ C 5min,4 $^{\circ}$ C 保温。

[0051] (2) 将步骤(1)反向PCR扩增得到的产物Eccs1G69^G和Eccs1G102^D,分别以DpnI酶消化模板,回收目的条带后,使用C112试剂盒,分别与相应的PCR扩增产物Eccs1G69^T和Eccs1G102^S连接环化,构建得到突变质粒,随后使用化转法将突变质粒转入BL21大肠杆菌感受态细胞,并涂布于含卡那霉素抗性的LB平板(卡那霉素浓度30 μ g/mL)上,37 $^{\circ}$ C过夜培养,测序正确后获得阳性转化子,即重组大肠杆菌;

[0052] (3) 将步骤(2)构建的重组大肠杆菌接种至50mL含有卡那霉素的LB液体培养基(卡那霉素浓度为30 μ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C、250r/min培养4小时至OD值为0.8-1.0,加入诱导剂IPTG25 μ L,诱导表达8h,离心保留沉淀,采用镍柱纯化试剂盒纯化目的蛋白,得突变酶Eccs1G69和突变酶Eccs1G102。

[0053] 实施例3突变酶的性质分析

[0054] (1) 酶活测定

[0055] 酶活测定方法为DNS法,即3,5-二硝基水杨酸法。2.0mL葡聚糖溶液(pH6.0)中加入2.0mL适当稀释的酶液,37℃反应30min,加入5.0mLDNS试剂,沸水浴中显色5min,分光光度计测定OD₅₄₀。

[0056] 酶活定义:1个酶活性单位(U)定义为每分钟释放1μmol还原糖所需的酶量。

[0057] 蛋白浓度测定方法为Bradford法,以牛血清白蛋白为标准。

[0058] (2) 最适温度测定

[0059] 在不同温度(55℃-90℃)下,测定原始酶、突变酶Eccs1G102和Eccs1G69的酶活。最适温度定义为最高酶活性(以相对活性100%计)所对应的温度。结果如图1所示,原始酶Eccs1G的最适温度为60℃,突变酶Eccs1G102的最适温度为50℃,相较于原始酶有着一定程度的下降,突变酶Eccs1G69的最适温度为75℃,相较于原始酶有较为明显的提高。

[0060] (3) 酶稳定性测定

[0061] 将酶液置于55℃、65℃、75℃下保温2h,测定残余酶活性,以初始酶活为100%计。结果显示原始酶Eccs1G以及突变酶Eccs1G102、Eccs1G69在55℃、65℃以及75℃下酶活稳定,在1h均能保持90%以上的活性。

[0062] (4) 最适pH测定

[0063] 用不同pH值(4.0-11.0)的50mmol/L乙酸-乙酸钠缓冲液配制0.5%(w/v,g/mL)葡聚糖溶液,测量原始酶、突变酶Eccs1G102和Eccs1G69的最适pH值。结果表明三种酶在pH9-10活性最高,且原始酶突变前后的pH特性保持一致。

[0064] (5) 金属离子耐受性测定

[0065] 配制0.1M浓度的Zn²⁺、Ni⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺、Na⁺、Ca²⁺、K⁺、Mg²⁺的金属离子溶液,取40μL加入到反应体系中,分别测定不同金属离子条件下,原始酶、突变酶Eccs1G69和Eccs1G102的酶活,其中,以不添加任何金属离子的原始酶的反应体系为空白对照组,空白对照组的原始酶相对活性以100%计,其他实验组酶的相对活性以空白对照为基准进行计算,结果如图2所示。

[0066] 结果显示,与原始酶相比,突变酶Eccs1G69对于Ni⁺、Mn²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺、Na⁺、Ca²⁺、K⁺、Mg²⁺的耐受性有不同程度的提高,而突变酶仅对于Mn²⁺、Fe³⁺、Na⁺、Ca²⁺、K⁺的耐受性有不同程度的提高。因此,增加了二硫键之间,还在一定程度上增加了突变酶Eccs1G69金属离子耐受性。

[0067] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所做的改变、修饰、替代、组合、简化,均为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 齐鲁工业大学

<120> 一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶突变体及其制备方法与应用

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 238

<212> PRT

<213> Paenibacillus sp.

<400> 1

```

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

```


115	120	125
Glu Lys Val Ile Asp Leu Gly Phe Asp Ala Ser Gln Gly Tyr His Thr		
130	135	140
Tyr Ala Phe Asp Trp Gln Pro Gly Ser Ile Thr Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Gln Lys His Lys Ala Thr Thr Asn Ile Pro Thr His Pro Gly Lys		
165	170	175
Ile Met Met Asn Leu Trp Asn Gly Ile Gly Val Asp Ser Trp Leu Gly		
180	185	190
Ala Tyr Asn Gly Ala Asn Pro Leu Tyr Ala Tyr Tyr Asp Trp Val Lys		
195	200	205
Tyr Thr Ser Asn Leu		

210

<210> 4

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

```

gcgaccgtgt tttgggaacc gttatgctac cacaactcct ccacctggca aaaggcggac 60
ggttacagca acggcggtat gttcaactgc acctggcgtg ctaataatgc aacttttacc 120
aacgattgca agctgctgtt ggcgctgacg tcttcaagct ataacaaatt cgacggcgct 180
gagtatcgta ccacctttaa aaccggttac ggcaagtgcg aagtgagcat gaaaccggcg 240
aaaaacccgg gcatcgtgag ctcttttttc atctatactg gtccaagtga tggcaccccc 300
tgggatgaaa tcgacatcgg tttcctgggt aaggatacca ccaaagtcca atttaactac 360
ttaccaacg gtgtgggtgg tcatgagaaa gtgatcgacc tgggcttcga cgcttcgcaa 420
ggttaccaca cctacgcctt cgactggcag ccgggcagta ttacctggta tgttgatggg 480
gtgcagaagc acaaagctac gactaacatt ccgaccatc cgggcaagat catgatgaat 540
ctgtggaatg gcattggtgt tgatagctgg ctgggtgcgt acaatggtgc caaccgctg 600
tatgcgtact atgattgggt taagtacacc tcaaacctcg ag 642

```

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

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

35	40	45
Leu Thr Ser Ser Ser Tyr Asn Lys Phe Asp Gly Ala Glu Tyr Arg Thr		
50	55	60
Thr Phe Lys Thr Gly Tyr Gly Lys Cys Glu Val Cys Met Lys Pro Ala		
65	70	75
Lys Asn Pro Gly Ile Val Ser Ser Phe Phe Ile Tyr Thr Gly Pro Ser		
85	90	95
Asp Gly Thr Pro Trp Asp Glu Ile Asp Ile Gly Phe Leu Gly Lys Asp		
100	105	110
Thr Thr Lys Val Gln Phe Asn Tyr Phe Thr Asn Gly Val Gly Gly His		
115	120	125
Glu Lys Val Ile Asp Leu Gly Phe Asp Ala Ser Gln Gly Tyr His Thr		
130	135	140
Tyr Ala Phe Asp Trp Gln Pro Gly Ser Ile Thr Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Gln Lys His Lys Ala Thr Thr Asn Ile Pro Thr His Pro Gly Lys		
165	170	175
Ile Met Met Asn Leu Trp Asn Gly Ile Gly Val Asp Ser Trp Leu Gly		
180	185	190
Ala Tyr Asn Gly Ala Asn Pro Leu Tyr Ala Tyr Tyr Cys Trp Val Lys		
195	200	205

Tyr Thr Ser Asn Leu Glu

210

<210> 6

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

gcgaccgtgt tttgggaacc gttaacctac cacaactcct ccacctggca aaaggcggac 60
 ggttacagca acggcggat gttcaactgc acctggcgtg ctaataatgc aacttttacc 120
 aacgatggca agctgcgttt ggcgctgacg tcttcaagct ataacaaatt cgacggcgct 180
 gagtatcgta ccacctttaa aaccggttac ggcaagtgcg aagtgtgcat gaaaccggcg 240
 aaaaaccgg gcatcgtgag ctcttttttc atctatactg gtccaagtga tggcaccgcc 300
 tgggatgaaa tcgacatcgg tttcctgggt aaggatacca ccaaagttca atttaactac 360
 ttcaccaacg gtgtgggtgg tcatgagaaa gtgatcgacc tgggcttcga cgcttcgcaa 420
 ggttaccaca cctacgcctt cgactggcag ccgggcagta ttacctggta tgttgatggg 480
 gtgcagaagc acaaagctac gactaacatt ccgaccatc cgggcaagat catgatgaat 540
 ctgtggaatg gcattgggtg tgatagctgg ctgggtgcgt acaatggtgc caaccgctg 600
 tatgcgtact attgctgggt taagtacacc tcaaacctcg ag 642

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 7
ttttaccaac gattgcaagc tgcgt 25
<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
gagttgtggt agcataacgg ttccca 26
<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 9
ccgttatgct accacaactc ctccacct 28
<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
agcttgcaat cgttggtaaa agttgcatt 29
<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
gtactattgc tgggttaagt acacctcaaa c 31
<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 12
ggtttcatgc aacttcgca cttgccgtaa 30
<210> 13
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

tgCGAAGTGT gCATGAAACC ggc 23

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

CTTAACCCAG CAATAGTACG CATAcag 27

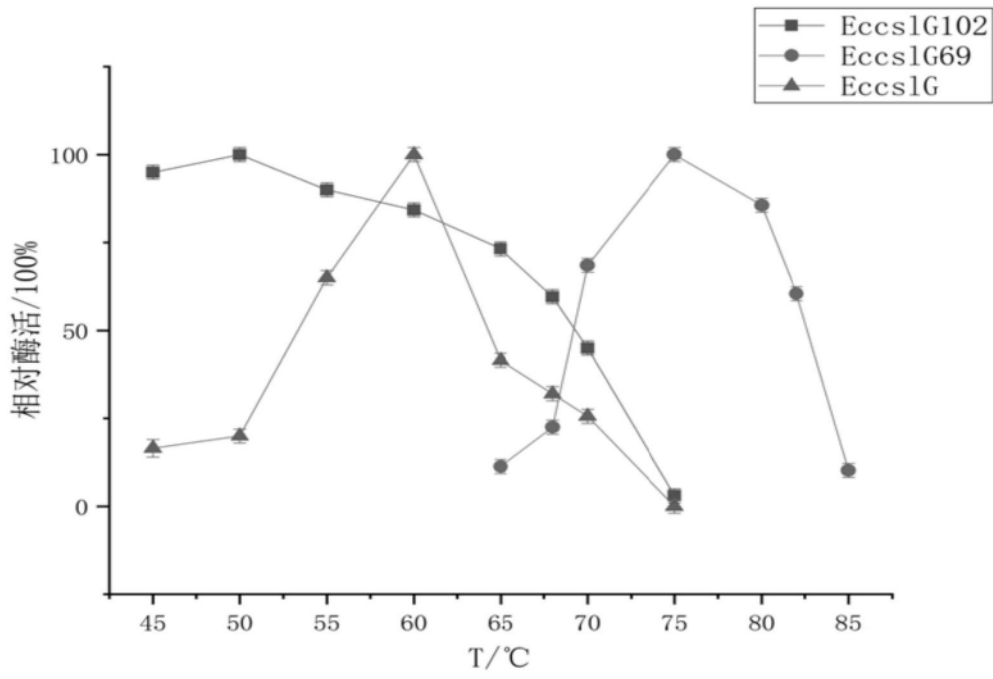


图1

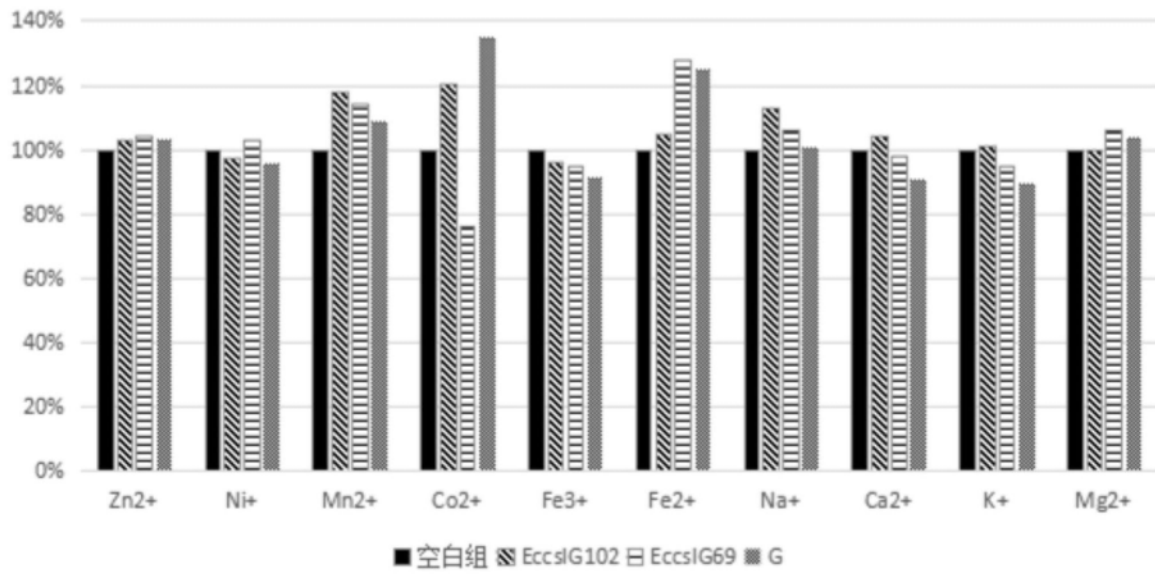


图2