

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/55

C12N 9/80 C12P 41/00

C12P 13/04



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02818136.0

[43] 公开日 2004 年 12 月 15 日

[11] 公开号 CN 1555416A

[22] 申请日 2002.7.15 [21] 申请号 02818136.0

[30] 优先权

[32] 2001.7.23 [33] EP [31] 01202822.1

[32] 2001.7.23 [33] EP [31] 01202821.3

[86] 国际申请 PCT/NL2002/000471 2002.7.15

[87] 国际公布 WO2003/010312 英 2003.2.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.16

[71] 申请人 DSM IP 财产有限公司

地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 T·桑科 R·F·坦德勒

C·G·N·科雷瓦尔

F·B·J·阿塞马范 R·珀范德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 孟凡宏

权利要求书 1 页 说明书 17 页 序列表 2 页

[54] 发明名称 编码对映选择性酰胺酶的核酸序列

[57] 摘要

本发明涉及编码一种对映选择性酰胺酶的核酸序列，该酰胺酶的氨基酸序列与 SEQ ID NO. 2 具有至少 70% 的同一性，本发明还涉及一种包括分批和补料阶段的用于在发酵培养基中对一种微生物进行发酵的方法，其中，所述微生物能表达本发明的核酸，并且，其中，在发酵期间，在每升发酵培养基中补充 0.5 - 50 毫克的  $Zn^{2+}$ 。本发明还涉及制备对映体富集的羧酸和/或对映体富集的羧酸酰胺的方法，其中，在存在 0.01mM - 100mM  $Zn^{2+}$  的条件下，让相应的 D - 和 L - 羧酸酰胺的混合物与本发明的表达产物接触，以便所述羧酸酰胺的一种对映体被对映选择性水解，从而形成相应的对映体富集的羧酸，而所述羧酸酰胺的另一种对映体保持不变。

ISSN 1008-4274

1. 编码一种对映选择性酰胺酶的核酸序列，所述酰胺酶的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 具有至少 70% 的同一性。
2. 编码一种对映选择性酰胺酶的核酸序列，所述核酸优选能在中等严格条件下与 (i) SEQ ID NO. 1, (ii) 包括 SEQ ID NO. 1 的基因组 DNA 序列或 (iii) (i) 或 (ii) 的互补链杂交。
3. 编码具有 SEQ ID : NO. 2 的氨基酸序列的对映选择性酰胺酶的核酸序列，在所述氨基酸序列的大约 15 或更少的氨基酸位置上具有改变，其中，所述改变独立地是 (i) 氨基酸的插入 (ii) 氨基酸的缺失 (iii) 氨基酸的取代。
4. 编码一种对映选择性酰胺酶的核酸序列，所述对映选择性酰胺酶表现出与抗 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列片段的抗体的免疫学交叉反应性。
5. 编码一种对映选择性酰胺酶融合蛋白的核酸序列，它由可操作地与一种或多种编码标记多肽的核酸序列连接的编码权利要求 1-4 中任意一项的多肽的核酸序列组成。
6. 包括权利要求 1-5 中任意一项的核酸序列的载体。
7. 正常情况下不具有权利要求 1-5 中任意一项的核酸序列的宿主细胞，它包括权利要求 1-5 中任意一项的核酸序列，优选包括权利要求 6 的载体。
8. 用于制备权利要求 1-5 中任意一项的核酸序列的表达产物的方法，其中，在第一个步骤中，将所述核酸序列导入合适的宿主中，并且，其中，所述核酸序列随后在所述宿主中表达。
9. 包括分批和补料阶段的用于在发酵培养基中对微生物进行发酵的方法，其中，所述微生物表达权利要求 1-5 中任意一项的核酸，并且，其中，在发酵期间向每升发酵培养基中添加 0.5-50 毫克的  $Zn^{2+}$ 。
10. 用于制备对映体富集的羧酸和/或对映体富集的羧酸酰胺的方法，其中，在存在 0.01mM-100mM  $Zn^{2+}$  的条件下，让相应的 D-和 L-羧酸酰胺的混合物与权利要求 1-5 中任意一项的表达产物接触，以便所述羧酸酰胺的一种对映体被对映体选择性地水解，从而形成相应的对映体富集的羧酸，而所述羧酸酰胺的另一种对映体保持不变。

## 编码对映选择性酰胺酶的核酸序列

5 本发明涉及编码对映选择性酰胺酶的核酸序列。本发明还涉及载体，以及包括本发明核酸序列的宿主细胞，和用于生产和使用所述核酸序列的表达产物的方法。

酰胺酶是具有酰胺酶活性的多肽，并且是具有催化羧酸酰胺水解形成相应的羧酸和氨的能力的酶。对映选择性酰胺酶是优选羧酸酰胺的对映体之一作为底物的酰胺酶。已知对映选择性酰胺酶在生产对映体富集的羧酸的商业化生物工艺中具有价值。例如，羧酸包括 $\alpha$ -H- $\alpha$ -氨基酸， $\alpha$ ， $\alpha$ -二烷基氨基酸， $\alpha$ -羟酸和/或它的衍生物以及它的肽。对映体富集的羧酸和/或它的衍生物以及它的肽被用于各种行业，例如，用于制药工业，农药工业等。例如，氨基酸 L-缬氨酸非常适合作为环孢菌素 A 发酵的前体， $\alpha$ -羟基丙酸被用于生产除草剂，某些 $\alpha$ -N-羟基氨基酸可以用作抗肿瘤制剂，而 D-p-羟基苯基甘氨酸和 D-苯基甘氨酸被用于生产某些半合成的广谱性 $\beta$ -内酰胺抗生素。在 EP 494 716 B1 中，提供了具有酰胺酶活性的微生物的两种例子：人苍白杆菌 NCIB 40321 (又被称作 NCIMB 40321) 和克雷伯氏菌 NCIB 40322。

20 本发明特别涉及编码其氨基酸序列与 SEQ ID : NO. 2 具有至少 70% 同一性的对映选择性酰胺酶的核酸序列。在 SEQ ID : NO. 1 中，提供了编码来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶的核酸序列。在 SEQ ID : NO. 2 中，提供了相应于 SEQ ID : NO. 1 的核酸序列的氨基酸序列。业已令人吃惊地发现，在发酵培养基中进行的能表达具有与 SEQ ID : NO. 2 有至少 70% 的同一性的氨基酸序列的对映选择性酰胺酶的核酸的微生物的包括分批阶段和补料阶段的发酵，导致了对映选择性酰胺酶活性的产量的提高，前提是在补料阶段在每升发酵培养基中补充 0.5-50 毫克  $Zn^{2+}$ 。

30 对映选择性酰胺酶活性的产量的这种提高，可能是由于对映选择性酰胺酶本身活性的增强，以及所产生的对映选择性酰胺酶数量的增加。在 EP 1, 174, 499 中，业已披露了编码来自阴沟肠杆菌 N-7901 的对映选择性酰胺酶的核酸序列；相应的氨基酸序列与相应于 SEQ ID NO: 1 的核酸序列的氨基酸序列有 68% 的同一性。因此，编码本发明的

对映选择性酰胺酶的核酸序列是新的。在 EP 1, 174, 499 中尚未披露表达编码阴沟肠杆菌 N-7901 的对映选择性酰胺酶的核酸序列的微生物发酵的  $Zn^{2+}$  依赖性。

5 本发明优选涉及编码其氨基酸序列与 SEQ ID NO. 2 具有至少大约 75% 的同一性程度的对映选择性酰胺酶的核酸序列, 同一性更优选为 80%, 更优选至少大约 85%, 最优选至少大约 90%, 更优选至少 95%, 更优选至少 97%, 特别优选至少 98%, 更特别优选至少 99%, 最特别优选 100%。

10 对于本发明来说, 两种氨基酸序列之间的同一性程度, 是通过 BLASTP 成对比对程序 (NCBI) 确定的, 采用以下同一性表和比对参数: 错配=-15, 罚分=-3, 空位-延伸= 1, 配对-奖分= 1, 空位 x-droff = 50, 预期值=10, 字长= 3。

本发明还涉及编码对映选择性酰胺酶的核酸序列, 所述核酸序列优选在中等, 更优选在高严格条件下, 最优选在极高严格性条件下与  
15 (i) SEQ ID NO. 1, (ii) 包括 SEQ ID NO. 1 的基因组 DNA 序列或 (iii) (i) 或 (ii) 的互补链杂交。

杂交实验可以通过多种方法进行, 这些方法为技术人员所熟知。例如, 从多种方法中进行选择的一般指南, 可以参见以下文献的第 9 章, Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. Molecular  
20 Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989。

杂交条件的严格性表示进行杂交的条件, 所述杂交由实际杂交和洗涤步骤组成。洗涤步骤被用于洗掉没有与固定在诸如硝酸纤维素滤  
25 膜上的靶核酸杂交的核酸。例如, 杂交条件的严格性, 可以通过改变洗涤溶液的盐浓度和/或改变进行洗涤步骤的温度 (洗涤温度) 而改变。通过降低洗涤溶液中的盐浓度或提高洗涤温度, 可以提高杂交的严格性。对于本申请来说, 杂交在 6X 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 中, 在大约 45℃ 下进行大约 12 小时。在 1 X SSC, 0. 1 % SDS 中, 在 50 ℃  
30 下进行两个连续的 30 分钟的洗涤步骤是低严格性的例子, 在 55℃ 下进行的洗涤是中等严格性的例子, 在 60℃ 下的洗涤是高严格性的例子, 在 65℃ 下的洗涤是极高严格性的例子。

本发明还涉及编码具有 SEQ ID : NO. 2 的氨基酸序列的对映选择性酰胺酶的核酸序列, 在所述氨基酸序列的大约 15 或更少的氨基酸位置上具有改变, 优选至少 10 个或更少的氨基酸位置, 更优选大约 5 个或更少, 更优选大约 3 个或更少的氨基酸位置, 其中, 所述改变独立地是 (i) 氨基酸的插入 (ii) 氨基酸的缺失 (iii) 氨基酸的取代。

编码具有包括多种改变的 SEQ ID : NO. 2 所示氨基酸序列的对映选择性酰胺酶的核酸序列, 可以按本领域已知方法制备, 例如, 核酸序列的定点诱变。在该方法中, 将编码所需突变, 如在特定氨基酸位置上的取代, 插入或缺失的诱变寡核苷酸与感兴趣的 DNA 的一条链退火, 并且用作启动 DNA 合成的引物。通过 DNA 合成, 将诱变寡核苷酸掺入新合成的 DNA 链上。通常, 本领域已知的方法还具有诱变核酸序列的阳性选择技术, 以便提高定点诱变方法的效率。某些定点诱变技术使用 PCR, 其中, 将诱变寡核苷酸用作引物用于实现定点诱变的方法, 披露于很多公司的产品手册中, 例如, Stratagene 和 Invitrogen 公司的产品手册, 并且, 用于实现定点诱变的试剂盒可以通过商业渠道获得。

本发明还涉及编码对映选择性酰胺酶的核酸序列, 这种酰胺酶与抗 SEQ ID : NO. 2 的氨基酸序列片段的抗体具有免疫交叉反应性。每一个片段的长度优选至少 20 个氨基酸。所述免疫学交叉反应性可以使用抗具有酰胺酶活性的本发明分离的多肽的至少一个表位或者与其反应的抗体测定。所述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体, 可以用本领域所公知的方法生产, 例如, 披露于以下文献中的方法: Hudson 等, Practical Immunology, Third Edition (1989), Blackwell Scientific Publications。所述免疫化学交叉反应性可以通过本领域已知的测定方法测定, 所述方法的一种例子是 Western 印迹, 例如, 在以下文献中所披露的: Hudson 等, Practical Immunology, Third Edition (1989), Blackwell Scientific Publications。

本发明还涉及编码对映选择性酰胺酶的融合蛋白的核酸序列, 它由可操作地与编码标记多肽的一种或多种核酸序列连接的编码本发明多肽的核酸组成。可操作地连接表示两种核酸序列是这样连接的: 如果表达的话, 能产生对映选择性酰胺酶的融合蛋白, 所述标记多肽存在于它的 N-和/或 C-末端。所述标记多肽可用于多种目的, 例如, 可

以用它提高融合蛋白的稳定性或可溶性，还可以用它作为分泌信号，它是指导融合蛋白进入细胞的某些区室的信号，或者可将它用于促进融合蛋白的纯化。用于促进融合蛋白纯化的标记多肽的例子是 MBP-和 GST-标记。例如，具有 MBP-标记或 GST-标记的融合蛋白的纯化披露于  
5 以下文献中：F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, 和 K. Struhl eds. , Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. , New York, NY, USA, 1990。例如，可以在 pMAL 载体中生产具有 MBP-标记的融合蛋白 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)，而具有 GST-标记的融  
10 合蛋白可以在 pGEX 载体 (Amersham Biosciences, Inc. , Piscataway, NJ, USA) 中生产，采用各自供应商的方法。

本发明的核酸序列，例如，具有 SEQ ID : NO. 1 的序列的核酸序列可以用标准分子生物学技术和其中所提供的序列信息分离。例如，将 SEQ ID : NO. 1 的全部或部分核酸序列作为杂交探针用于人苍白杆菌 NCIB 40321 上，可以通过标准杂交和克隆技术分离本发明的核酸序列（例如，披露于以下文献中：Sambrook, J. , Fritsh, E. F. , and Maniatis, T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd, ed. , Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。

20 另外，包括 SEQ ID : NO. 1 的全部或一部分的核酸序列可以通过聚合酶链式反应 (PCR) 使用根据 SEQ ID : NO. 1 或 SEQ ID : NO. 2 所包含的序列信息设计的合成寡核苷酸引物分离，在人苍白杆菌 NCIB 40321 上采用 PCR，并且，如果将所述寡核苷酸引物用于具有对映选择性酰胺酶活性的微生物的话，也可以分离。

25 本发明的核酸序列还可以使用诸如来自具有对映选择性酰胺酶活性的微生物的基因组 DNA，cDNA 或者合适的 mRNA 作模板，和基于按照标准 (RT) -PCR 扩增技术提供的序列信息的合适的寡核苷酸引物扩增。可以将由此扩增的核酸克隆到合适的载体上，并且通过 DNA 序列分析表征。

30 另外，相当于本发明核酸序列或者能与本发明核酸序列杂交的寡核苷酸可以通过标准合成技术制备，例如，使用自动 DNA 合成仪。

可以按照本领域技术人员所公知的标准克隆和表达技术将本发明

的核酸序列克隆到合适载体上，并且在导入合适的宿主之后，该序列能够表达，以便产生相应的对映选择性酰胺酶（例如，在以下文献中所披露的：Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。本发明还涉及包括本发明核酸序列的载体。

合适的载体是通常被用于克隆和表达的载体，并且为本领域技术人员所公知。例如，用于在大肠杆菌中表达的合适载体的例子披露于以下文献中的表1中：Makrides, S. C., *Microbiological Reviews*, Vol. 60, No. 3, (1996), 512-538。所述载体优选包括位于克隆位点上游的启动子，所述克隆位点包括编码具有酰胺酶活性的多肽的核酸序列，所述启动子在所述宿主已生长到能表达具有酰胺酶活性的相应的多肽时启动，可以启动和关闭的启动子为本领域技术人员所公知，并且，举例来说，包括 lac 启动子，araBAD 启动子，T7 启动子，trc 启动子，tac 启动子和 trp 启动子。例如，特别适用于本发明范围的是披露于 WO 00/66751 中的载体，例如，没有插入的青霉素 G 酰基转移酶基因的 pKAFssECtrp 或 pKAFssECaro。合适的宿主通常是用于克隆或表达的宿主，并且为本领域技术人员所公知。例如，合适宿主菌株的例子是大肠杆菌菌株，例如大肠杆菌 TOP10F'，TOP10，DH10B，DH5a，HB101，W3110，BL21 (DE3) 和 BL21 (DE3) pLysS。特别适用于本发明范围的是大肠杆菌 K-12 菌株，例如，DH1，HB101，RV308，RR1，W3110，C600。

有时，载体的选择取决于宿主的选择，反之亦然。例如，如果使用具有 araBAD 启动子的载体的话，不能破坏阿拉伯糖诱导物 (ara-) 的大肠杆菌宿主菌株是非常优选的。

另外，可以将本发明的核酸序列整合到正常情况下不包括本发明核酸序列的宿主细胞的基因组中，并且（超量）表达。这一目的可以按照本领域技术人员所公知的方法实现。本发明还涉及正常情况下不包括本发明核酸序列，现在包括本发明核酸序列的宿主细胞，优选包括含有本发明核酸序列的载体的宿主细胞。

本发明还涉及用于制备权利要求 1-5 中任意一项的核酸序列的表达产物的方法，其中，在第一个步骤中，将所述核酸序列导入合适的

宿主，该宿主正常情况下不包括本发明的核酸序列，并且，其中，所述核酸序列随后在所述宿主中表达。核酸序列的导入和随后的表达是本领域技术人员所公知的标准技术。

5 本发明还涉及包括分批和补料阶段的在发酵培养基中对微生物进行发酵的方法，其中，所述微生物表达本发明的核酸，并且，在发酵期间向每升发酵培养基中添加 0.5-50 毫克的  $Zn^{2+}$ （相当于  $7.7 \mu M$ - $770 \mu M$ ）。

通常，所述补料阶段是在大约 10 小时之后开始。0.5-50 毫克/升发酵培养基的  $Zn^{2+}$  用量可以一次补充到发酵培养基中。不过，优选分次补充，因为一次添加  $Zn^{2+}$  会导致在发酵培养基上形成泡沫，并且导致随后在发酵中分解微生物。例如， $Zn^{2+}$  可以分成 5-10 个相等的部分添加，不过，当然还可以将  $Zn^{2+}$  分成不同的部分在补料阶段添加。优选将  $Zn^{2+}$  连续补充到发酵培养基中，如果采用连续补料方法的话，将  $Zn^{2+}$  与其他成分组合在一种补料中是非常实用的。

15 例如， $Zn^{2+}$  存在于锌盐中。在本发明的方法中，优选使用能很好地溶解在水中的锌盐（高于 0.1 摩尔/升），例如  $Zn(NO_3)_2$ ， $Zn(CH_3COO)_2$ ， $ZnSO_4$ ， $ZnCl_2$ ， $ZnBr_2$ ， $ZnI_2$ 。

用于发酵的微生物可以是本身就具有并且能表达本发明核酸序列的微生物，不过优选是能表达本发明核酸序列，更优选超量表达所述核酸序列的宿主。

20 业已发现，在存在 0.01mM-100mM  $Zn^{2+}$  的条件下，也能提高本发明核酸序列的表达产物的对映选择性酰胺酶活性。因此，本发明还涉及用于制备对映体富集的羧酸和/或对映体富集的羧酸酰胺的方法，其中，在存在 0.01mM-100mM  $Zn^{2+}$  的条件下，让相应的 D-和 L-羧酸酰胺的混合物与权利要求 1-5 中任意一项的表达产物接触，以便对所述羧酸酰胺的一种对映体进行对映选择性水解，形成相应的对映体富集的羧酸，而所述羧酸酰胺的其他对映体保持不变。如果必要，可以水解其余的对映体富集的羧酸酰胺，以便形成相应的对映体富集的酸。所述其余羧酸酰胺的水解可以用本领域已知方法进行，例如，在碱性或酸性条件下进行，或通过酶促进行。

30 通过本发明核酸序列的表达产物催化的对映选择性水解优选是在存在 0.5-50，更优选 0.5-20mM  $Zn^{2+}$  的条件下进行的。

进行由本发明核酸序列的表达产物催化的对映选择性水解的 pH 并不重要，所述对映选择性水解优选是在 5-9，更优选 6.5-8.5 的 pH 下进行的。

5 在存在本发明表达产物的条件下进行的对映选择性水解的温度优选为 10-75℃，更优选 30-65℃，特别优选 40-60℃。

作为混合物，可以使用 D-和 L-羧酸酰胺的消旋混合物，不过，当然也可以使用随机选择的 D-和 L-羧酸酰胺的混合物。

合适的羧酸酰胺的例子有：具有 2-20 个 C 原子的  $\alpha$ -H- $\alpha$ -氨基酸酰胺或它的衍生物，例如，丙氨酸酰胺，苯基甘氨酸酰胺，苯丙氨酸酰胺，对羟基苯基甘氨酸酰胺，脯氨酸酰胺，缬氨酸酰胺，亮氨酸酰胺，叔亮氨酸酰胺，甲硫氨酸酰胺，脯氨酸酰胺，谷氨酸酰胺，具有 2-20 个 C 原子的  $\alpha$ -H- $\alpha$ -羟酸酰胺，例如，扁桃酸酰胺，具有 2-20 个 C 原子的  $\alpha$ - $\alpha$ -二烷基-氨基酸酰胺，例如  $\alpha$ -甲基缬氨酸酰胺， $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺， $\alpha$ -乙基苯基甘氨酸酰胺， $\alpha$ -丁基苯基甘氨酸酰胺， $\alpha$ -甲基苯丙氨酸酰胺， $\alpha$ -乙基苯丙氨酸酰胺， $\alpha$ -乙基- $\alpha$ -丁基甘氨酸酰胺。叔亮氨酸或  $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸优选是按照本发明的方法制备的。

为了说明本发明，补充了以下实施例。

## 20 实施例

### 实施例 1

通过在补料阶段向发酵培养基中添加  $Zn^{2+}$  对能表达 SEQ ID : NO. 1 所示核酸序列的大肠杆菌 K-12 进行发酵。

制备了以下种子培养基：

25

酵母提取粉 (DIFCO, Bacto™)	38 g
$Na_2HPO_4$	17.8 g
$KH_2PO_4$	13.6 g
$NH_4Cl$	4.8 g
30 蒸馏水	1500 ml

用 NaOH 水溶液将 pH 调整到 6.8。将 100 和 200 ml 的等分样品放

入 500 和 2000 ml 的三角烧瓶中，并且消毒(121℃，20 分钟)。在无菌条件下将 1.1 ml 的 50% (w/v) 葡萄糖和 2.2 ml 的青霉素(1.2 g/l) 溶液添加到 500 ml 烧瓶中(接种阶段 1)。将 1 和 2 ml 的 50% (w/v) 葡萄糖和新霉素(1.2 g/l) 溶液添加到 2000 ml 烧瓶中(接种阶段 2)。

5 然后，用能表达 SEQ ID : NO. 1 所示核酸的大肠杆菌 K-12 菌株的 1.8 ml 50% v/v 甘油/水悬浮液，接种所述接种阶段 1 的三角烧瓶，并且在稳定的定轨振荡条件下，在 27℃ 的温度下培养并且温育 22 小时。为了在大肠杆菌 K12 菌株 308 中表达 SEQ ID : NO 1 所示的核酸序列，使用具有包括限制位点(对于正向引物来说为 NdeI，而对于反向引物来说为 SmaI) 的 5' 延伸部分的酰胺酶特异性引物通过 PCR 扩增所述核酸序列。使用限制酶 NdeI 和 SmaI，将所获得的片段克隆到大肠杆菌表达载体 pKECtrp 的衍生物的大肠杆菌青霉素 G 酰基转移酶编码序列的位点上。所使用的衍生的表达载体与构建体 pKECtrp 类似，它的构建披露于 W000/66751 中，所不同的是，它包括大肠杆菌 aro 启动子而不是 trp 启动子。将整个接种阶段 1 三角烧瓶用于接种接种阶段 2 的 2000ml 三角烧瓶。在稳定定轨振荡条件下，在 27℃ 的温度下将接种阶段 2 培养和温育 3 小时。

将 2% (v/v) 的接种阶段 2 的培养物用于接种 20L 玻璃发酵罐中的 6.4L 分批阶段培养基。所述分批阶段培养基具有以下组分：

20	Gistex® LS pasta	24.6 g/l
	柠檬酸	10 g/l
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.1 g/l
25	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5 g/l
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.169 g/l
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.0 g/l
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.006 g/l
	NaMoSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.004 g/l
30	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.004 g/l
	消泡剂: Basildon 86/013	数滴

$K_2HPO_4$ <sup>1</sup>	8.1 g/l
葡萄糖 <sup>2</sup>	11.4 g/l
新霉素 <sup>2</sup>	0.012 g/l
硫胺素 <sup>2</sup>	0.014 g/l

5

在将 pH 调整到 4.5 (用 NaOH) 之后, 在 121℃ 下将所述分批阶段培养基消毒 65 分钟。用<sup>1</sup>和<sup>2</sup>标注各自是分别溶解的培养基成分, 并且将包括用<sup>1</sup>标注的成分的溶液在 121℃ 下消毒 65 分钟, 而包括用<sup>2</sup>标注的成分的溶液进行过滤消毒。这两种成分都是在无菌条件下添加

10 到所述培养基中的。在转移接种阶段 1 之前, 将分批阶段培养基的 pH 调整到 pH 7.0。发酵是在 27℃ 下, 在稳定搅拌和最佳通气条件下进行的。在 50-54 小时之间, 发酵温度在 4 小时内从 27℃ 线性降低到 25℃, 并且直到发酵结束都一直保持在该温度下。

在发酵期间 (分批和补料阶段), pH 可以在 7.00 和 7.30 之间变动。分批阶段随着补料 1 和补料 2 的开始而结束 (补料阶段的开始),

15 此时, pH 达到 7.15。此时, 碳源被耗尽。分批阶段持续大约 9 小时。补料 1 具有以下组分:

葡萄糖	670 g/l
20 硫胺素 <sup>1</sup>	0.18 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ <sup>1</sup>	14.4 g/l
脯氨酸 <sup>1</sup>	6.1 g/l
谷氨酸一钠 <sup>1</sup>	12.2 g/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ <sup>1</sup>	0.022 g/l

25

补料 1 是按以下方法制备的。首先溶解葡萄糖。将大约 0.4 ml/1 4N HCl 添加到葡萄糖溶液中。对该溶液进行消毒 (121℃, 30 分钟)。

硫胺素,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 脯氨酸和谷氨酸一钠和  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  是分别溶解的, 并且在添加 (无菌) 到葡萄糖溶液之前, 对它们的溶液进行过

30 滤消毒。在下面的表 1 中提供了用于将补料 1 导入分批阶段培养基的参数。

表 1. 用于导入补料 1 的补料参数

时间	设置点 [g 补料 / (I 起始 * h)]
0 (补料开始) -14 小时	$2.59 \times e^{(0.07 \times \text{时间})}$
14-40 小时	$6.91 + 0.48 \times (\text{时间} - 14)$
40 小时-发酵结束	19.3

补料 2 具有以下组分:

Gistex® LS pasta 300 g/l

- 5 补料 2 是按以下方法制备的。首先将酵母提取膏溶解在水中。然后，将 pH 调整到 4.5 +/- 0.1。对该溶液进行消毒 (121°C, 30 分钟)。在下面的表 2 中提供了用于将补料 2 导入分批阶段培养基的参数。在表 1 和 2 中的参数中的‘时间’表示‘补料开始之后的小时数’。

10 表 2. 用于导入补料 2 的参数

时间	设置点 [g 补料 / (I 起始 * h)]
0 (补料开始) -14 小时	$0.81 \times e^{(0.07 \times \text{时间})}$
14-34 小时	$2.15 + 0.15 \times (\text{时间} - 14)$
34-38 小时	5.15
38 小时-发酵结束	0

补料 1 和补料 2 构成了补料阶段培养基。发酵在 120 小时之后结束。

- 15 所述发酵是重复进行的，所不同的是，在补料 1 中没有添加 ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O。

在补料阶段开始之后，用下文所披露的方法测定两种发酵的发酵液 (发酵培养基和细胞) L-酰胺酶活性。

- 20 分析在补料 1 中有 Zn<sup>2+</sup>和在补料 1 中没有 Zn<sup>2+</sup>的条件下，从能表达 SEQ ID : NO. 1 所示核酸序列的大肠杆菌 K-12 的发酵获得的发酵液 (具有细胞的发酵培养基) 样品的 L-酰胺酶活性。

在水浴中将 1.5 ml 的温育试剂 (含有 1.1 w% L-苯基甘氨酸酰胺, 0.11 M HEPES-NaOH 缓冲液, pH 8.0 和 1.1 mM MnSO<sub>4</sub> · 1 H<sub>2</sub>O) 加热到 55°C。10 分钟之后，将 100 微升样品溶液 (含有用 20 mM HEPES-

NaOH 稀释的发酵液, pH 7.5/2mM DTT) 添加到加热的温育试剂中。将合并的温育试剂与样品溶液一起温育 20 分钟。然后通过将 100 微升的合并的温育试剂添加到 1.5 ml 终止试剂 (53 mM 磷酸) 中终止该反应。以 14,000 rpm 的速度将该终止的反应混合物离心 5 分钟。在以下条件下通过 HPLC 分析上清液:

柱: nucleosil 120-3C18 (125 × 4mm)

波长检测仪: 220 nm

流速: 1.0 ml/分钟

注入体积: 20 微升

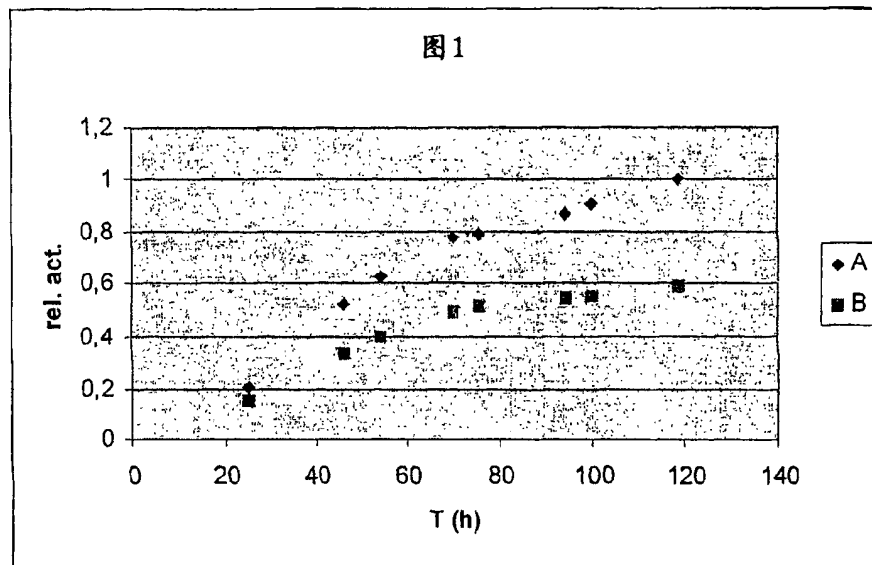
10 洗脱液: 100 mM 磷酸缓冲液 pH 3.0

L-苯基甘氨酸和 L-苯基甘氨酸酰胺的保留时间分别为大约 1.8 和 2.7 分钟

计算相当于苯基甘氨酸的 HPLC 峰下的面积, 并且在校正发酵液的稀释系数之后与来自其他样品的苯基甘氨酸峰下面的面积进行比较。

15 来自所述样品的相对峰面积等于相对 L-酰胺酶活性, 该活性是所述样品彼此比较的活性。在图 1 中提供了来自具有含有  $Zn^{2+}$  的补料 1 的发酵样品 (A) 和不含  $Zn^{2+}$  的补料 1 的发酵样品 (B) 的相对 L-酰胺酶活性 (rel. act.), 其中, 相对活性业已相对采集样品的时间 T (h) (分批阶段开始之后的小时数) 进行了作图。

20



从图 1 中可以看出, 如果在补料阶段将  $Zn^{2+}$  添加到发酵液中的话,

能够产生更高的 L-酰胺酶活性。

从在补料 1 中使用  $Zn^{2+}$  的发酵中制备酶溶液 LAM0011。

用 4 g/l 辛醇处理来自在补料 1 中使用  $Zn^{2+}$  的发酵的发酵液，以便杀灭微生物，并且通过高压匀浆(600-700 巴)，匀浆 2 次。在匀浆之后，通过添加根据发酵液体积计算的 10 v%的 C577 的 10%溶液使之絮凝。添加根据发酵液体积计算的 10 v%的过滤助剂 Dicalite 448。在膜式过滤压力器上过滤所得到的浆，并且用 1 倍体积的处理水洗涤。然后对生物物质块进行烧灼灭菌。用 Seitz 过滤平板(大小为 5-15 微米)过滤滤液，然后用 0.1-0.3 微米的微生物过滤平板过滤。所得到的滤液在容器中冷冻保存待用。

从在补料 1 中不使用  $Zn^{2+}$  的发酵制备酶溶液 LAM0001

用 4 g/l 辛醇处理来自在补料 1 中不使用  $Zn^{2+}$  的发酵的发酵液，以便杀灭微生物，并且通过高压匀浆(600-700 巴)，匀浆 2 次。在匀浆之后，通过添加根据发酵液体积计算的 10 v%的 C577 的 10%溶液使之絮凝。添加根据发酵液体积计算的 10 v%的过滤助剂 Dicalite 448。在膜式过滤压力器上过滤所得到的浆，并且用 2.2 倍体积的处理水洗涤。然后对生物物质块进行烧灼灭菌。用大小为 5-15 微米的 Seitz 过滤平板过滤所述滤液，然后用 0.1-0.3 微米的微生物过滤平板过滤。然后，使用 50 kD Polysulphon 膜将所得到的滤液浓缩 3 倍，用 1/4 保留物体积的 RO 水洗涤保留物。然后再次用大小为 5-15 微米的 Seitz 过滤平板过滤所述保留物，然后用 0.1-0.3 微米的微生物过滤平板过滤。将所得到的滤液保存在容器中直到在应用反应中使用(实施例 2-5)。

25 实施例 2

在存在不同浓度的  $Zn^{2+}$  的条件下，在 pH 6.5 的条件下用来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺进行对映选择性水解

30 通过在存在 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 和 9.0 mM  $Zn^{2+}$  的条件下进行反应，确定  $Zn^{2+}$  浓度对来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的水解反应的影响。作为对照，还进行了进行没有额外  $Zn^{2+}$  的反应。

对于本实验来说，在烧瓶中填充 25 g 反应混合物，每一种反应混合物含有 2.5 g DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺（最终浓度为 10 wt%），46 微升来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的批号 LAM0011，不另外添加 ZnSO<sub>4</sub>，或添加 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 或 9.0 mM 的 ZnSO<sub>4</sub>，所有反应混合物的 pH 为 6.5。通过添加酶液启动所述反应。

所有反应混合物都是在定轨摇床上，在 55℃ 下以 200 rpm 的速度温度。在添加所述酶之后（t = 0 小时）马上，以及在 1, 4 和 11 小时之后采集 1g 样品，并且转移到装有 4g 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 小瓶中，以便马上终止该反应。样品和终止溶液的确切量是通过称重确定的，在用 0.22 微米的过滤器过滤之后，按照以下方法通过 HPLC 测定  $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸和  $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的浓度：

柱：Inertsil ODS-3 (3 微米) 50 mm \* 4.6 mm ID

洗脱液：50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH, pH=2.5

流速：0.8 ml/分钟

温度：40℃

V<sub>inj</sub>: 15 L

检测：UV 210 nm

在表 3 中提供了该实验的结果，其中，所述反应的转化率（与起始氨基酸酰胺的总量相比所形成的氨基酸的量）是以相对转化率形式提供的；最大转化率被设定为 100。

表 3. Zn<sup>2+</sup> 浓度对来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶（批号 LAM 0011）对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的水解反应的影响。

项目	[Zn <sup>2+</sup> ] (mM)	以下时间之后的转化率		
		1 h	4 h	11 h
A	9.0	28	85	100
B	3.0	24	87	100
C	1.0	19	83	100
D	0.3	16	74	97
E	0.1	11	61	92
F	0	1.4	3.1	5.3

从表 3 可以看出,  $Zn^{2+}$  的存在对于人苍白杆菌 L-酰胺酶对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的活性来说是非常有利的。在不添加  $Zn^{2+}$  的情况下, 几乎不会发生对该底物的任何水解反应 (参见项目 F)。

### 5 实施例 3

在存在不同的二价金属离子, pH 6.5 的条件下, 使用来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的对映选择性水解作用。

在与实施例 2 类似的反应设置中, 研究了添加的  $Zn^{2+}$  是否对来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的转化率有利影响, 所述酰胺酶是在没有多余  $Zn^{2+}$  的条件下发酵的。所述水解反应是在存在等摩尔数量的  $Mn^{2+}$  或  $Zn^{2+}$  的条件下进行的。另外, 使用在存在过量  $Zn^{2+}$  的条件下发酵的来自苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶进行对照反应。

在烧瓶中填充 25 g 反应混合物, 每一种反应混合物含有 2.5 g DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺 (最终浓度为 10 wt%), 240 微升来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 制剂 LAM0011 的 L-酰胺酶, 和 1mM  $MnSO_4$  或  $ZnSO_4$ 。所制备的第三种反应混合物含有 (除了底物之外) 1mM  $Zn^{2+}$  和 92 微升来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 制剂 LAM0011 的 L-酰胺酶 (92 微升 LAM0001 相当于 240 微升 LAM0011 的 L-酰胺酶活性)。底物温育, 取样和分析都是按实施例 2 所述方法进行的。在表 4 中提供了该实验的结果, 其中, 所述反应的转化率 (与起始氨基酸酰胺相比所形成的氨基酸的数量) 是以相对转化率形式提供的, 将最大转化率设定为 100。

表 4. 添加  $Zn^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的水解反应的影响, 所述酰胺酶是在补料 1 中没有  $Zn^{2+}$  的条件下发酵的 (批号 LAM 0001) 和在补料 1 中有  $Zn^{2+}$  的条件下发酵的 (批号 LAM 0011)。

项目	Enzyme 酶制剂	金属离子	以下时间之后的转化率		
			1 h	3 h	5 h
A	LAM0001	Mn <sup>2+</sup>	11	33	55
B	LAM0001	Zn <sup>2+</sup>	33	94	100
C	LAM0011	Zn <sup>2+</sup>	36	93	100

从表 4 可以看出，在存在 1 mM Zn<sup>2+</sup> 的条件下，在有和没有额外 Zn<sup>2+</sup> 的条件下发酵的酶对 DL- $\alpha$ -甲基苯基甘氨酸酰胺的转化率是类似的，并且这两种转化率都高于在存在 1 mM Mn<sup>2+</sup> 的条件下的转化率。

#### 实施例 4

在存在不同二价金属离子的条件下，在 pH 7.0 的条件下来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL-叔-甲基苯基亮氨酸酰胺的对映选择性水解作用。

在与实施例 2 类似的设置中，测定了等摩尔数量的 Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 的存在对来自苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL-叔-亮氨酸酰胺的水解反应的影响。作为对照，进行了没有添加任何二价金属离子的反应。

为了进行该实验，用 25 g 的反应混合物填充烧瓶，每一种反应混合物含有 3.13 g DL-叔-亮氨酸酰胺（最终浓度为 12.5 wt%），1.45 微升来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶（批号 LAM0011）和 1.0mM ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 或 MnSO<sub>4</sub>。此外，在没有任何额外二价金属离子的条件下进行了一种独立的反应。所有反应混合物的 pH 为 7.0。所述反应是通过添加所述酶液体启动的。

所有反应混合物是在定轨摇床上在 55℃ 以 150 rpm 的速度温育的。在添加酶之后 (t = 0 小时)，以及小 1, 3 和 6.7 小时之后，采集 1g 的样品，并且转移到装有 4 g 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的小瓶中，以便马上终止该反应。通过称重确定样品和终止溶液的确切量。在用 0.22 微米的滤膜过滤之后，按照以下方法通过 HPLC 测定叔-亮氨酸和叔-亮氨酸酰胺的浓度：

柱: Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm I. D. , 5 μ), 由 Varian Chrompack 提供

洗脱液: 99 v/v% 50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH=2.3, 使用 1 N NaOH + 1 v/v% 乙腈

5 流速: 1.0 ml/分钟

温度: 30 °C

V<sub>inj.</sub> : 20 微升

检测: 在柱后衍生化之后用 OPA/MCE<sup>(a)</sup> 检测荧光 (λ<sub>ex</sub> 365 nm 和 λ<sub>em</sub> > 420 nm)。

10 <sup>(a)</sup> 柱后衍生化是在反应螺旋管 (2 m × 0.25 mm I. D. ) 中, 在环境温度下, 用 pH10 的含有 o-邻苯二甲醛 (OPA) 和 2-巯基乙醇 (MCE) 的 0.4 M 硼酸缓冲液进行的。衍生化试剂的流速为 1.0 ml/分钟。所述试剂是通过以下方法制备的: 首先将 49.46 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 和 35 g KOH 溶解在 2 升 Milli-Q 水中, 然后用 1 M KOH 将 pH 调整到 10。然后将 1.6 g OPA  
15 (溶解在 20 ml 乙醇中) 和 2ml MCE 添加到该硼酸缓冲液中。

在表 5 中提供了该实验的结果, 其中, 该反应的转化率 (与起始氨基酸酰胺的数量相比所形成的氨基酸的数量) 是以相对转化率形式提供的, 将最大转化率设定为 100。

20 表 5. 不同二价金属离子的存在对来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶 (批号 LAM 0011) 对 DL-叔-亮氨酸酰胺的水解反应的影响。

项目	金属离子	以下时间之后的转化率		
		1 h	3 h	6.7 h
A	Zn <sup>2+</sup>	15	56	100
B	Mg <sup>2+</sup>	8.9	32	77
C	无	8.1	30	69

25 表 5 中的数据清楚地表明, 在存在 1 mM Zn<sup>2+</sup> 的条件下, 所获得的来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL-叔-亮氨酸酰胺的水解反应, 快于在存在等摩尔数量的 Mg<sup>2+</sup> 或在缺少额外二价金属离子条件下所获得的水解反应。

### 实施例 5

在存在  $Zn^{2+}$  的条件下, 在不同 pH 值下来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL-叔-亮氨酸酰胺的对映选择性水解

5 为了研究 pH 对来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶对 DL-叔-亮氨酸酰胺的对映选择性水解作用的影响, 在有和没有 1 mM  $Zn^{2+}$  的条件下, 在 pH 7.0, 8.0 和 9.0 的条件下进行反应。

所有实验设置与实施例 3 中的实验设置相同。在表 6 中提供了该实验的结果。

10 表 6. 在有和没有 1 mM  $ZnSO_4$  的条件下, 反应混合物的 pH 对来自人苍白杆菌 NCIMB 40321 的 L-酰胺酶 (批号 LAM 0011) 对 DL-叔-亮氨酸酰胺的水解反应的影响。

项目	pH	$Zn^{2+}$ (1 mM)	以下时间之后的转化率		
			1 h	3 h	6.7 h
A	7	+	15	56	100
B		-	8.1	30	69
C	8	+	14	46	94
D		-	11	38	82
E	9	+	14	43	93
F		-	13	39	77

<110> DSM NV

5 <120> **编码对映选择性酰胺酸的核酸序列**

<130> 20594WO

10 <140>  
<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 945  
<212> DNA

20 <213> **人苍白杆菌 (Ochrobactrum anthropi) NCIMB 40321**

<400> 1  
atgtgcaata attgccatta caccattcac ggcgpgcatc atcatttcgg ctgggacaac 60  
tcgttccagc cggctgaaac ggtcgcgcc ggctcgacce tgaaattcga atgtctggac 120  
25 agcggcgag gccactatca tcgcggcagc acagtcgccg atgtgtcgac gatggatttt 180  
tccaaggtca atccggttac cggccccatc ttcgtcgatg gagccaaacc gggcgatgtc 240  
ctgaaaatca ccatccacca gttcgagcca tcaggcttcg gctggacggc aaatattccg 300  
ggcttcggtc ttctcgccga cgaactcaag gaaccggcgc tagcattgtg gaactacaat 360  
cccacaacgc tggagccagc actcttcgga gacggtgcgc gcgtgccgct gaagcogttc 420  
30 gccggaacca tggcgctcgc accggcgga aagggcctgc attcggctgt accacogcgt 480  
cgtgtcggcg gcaatctcga catccgcgat cttgcagccg gaaaccgct ttatctgccg 540  
atcgaagtgc aaggcgcttt gttctccatt ggtgataacc atgcggcaca gggcgacggc 600  
gaagtgtcgc gcaaccgcat cgaaagcgcg atgaatgtcg ctctgacgct ggatctcacc 660  
aaggatacgc cactgaagat gccccggttc accacgcccg ggccagtgc gggcacctc 720  
35 gataccaagg gttacgaagt caccaccggt atcgggtccg atctgtggga aggcgcgaaa 780  
gccgcctct ccaacatgat cgaccttctt tgccagacgc agaacctcaa cccggtggat 840  
gcctatatgc tctgctcggc ctgcggtgat ctgcgtatca gcgaaatcgt cgatcagccc 900  
aactgggtcg tategttcta ctteccgcgt tccgttttcg aataa 945

40  
<210> 2  
<211> 314  
<212> PRT  
<213> **人苍白杆菌 (Ochrobactrum anthropi) NCIMB 40321**

45  
<400> 2  
Met Cys Asn Asn Cys His Tyr Thr Ile His Gly Arg His His His Phe  
1 5 10 15  
50 Gly Trp Asp Asn Ser Phe Gln Pro Ala Glu Thr Val Ala Pro Gly Ser  
20 25 30  
Thr Leu Lys Phe Glu Cys Leu Asp Ser Gly Ala Gly His Tyr His Arg  
35 40 45  
55 Gly Ser Thr Val Ala Asp Val Ser Thr Met Asp Phe Ser Lys Val Asn  
50 55 60  
Pro Val Thr Gly Pro Ile Phe Val Asp Gly Ala Lys Pro Gly Asp Val

	65				70					75				80		
	Leu	Lys	Ile	Thr	Ile	His	Gln	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Phe	Gly	Trp	Thr
					85					90					95	
5	Ala	Asn	Ile	Pro	Gly	Phe	Gly	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	Glu	Pro
				100					105					110		
10	Ala	Leu	Ala	Leu	Trp	Asn	Tyr	Asn	Pro	Thr	Thr	Leu	Glu	Pro	Ala	Leu
			115						120				125			
	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Arg	Val	Pro	Leu	Lys	Pro	Phe	Ala	Gly	Thr	Ile
		130					135					140				
15	Gly	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Lys	Gly	Leu	His	Ser	Val	Val	Pro	Pro	Arg
	145					150					155					160
	Arg	Val	Gly	Gly	Asn	Leu	Asp	Ile	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr
					165					170					175	
20	Leu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Glu	Val	Glu	Gly	Ala	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Asp
				180					185					190		
	Thr	His	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Val	Cys	Gly	Thr	Ala	Ile	Glu
25			195					200					205			
	Ser	Ala	Met	Asn	Val	Ala	Leu	Thr	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Asp	Thr	Pro
		210					215					220				
30	Leu	Lys	Met	Pro	Arg	Phe	Thr	Thr	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Arg	His	Leu
	225					230					235					240
	Asp	Thr	Lys	Gly	Tyr	Glu	Val	Thr	Thr	Gly	Ile	Gly	Ser	Asp	Leu	Trp
					245					250					255	
35	Glu	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Ser	Asn	Met	Ile	Asp	Leu	Leu	Cys	Gln
			260						265				270			
	Thr	Gln	Asn	Leu	Asn	Pro	Val	Asp	Ala	Tyr	Met	Leu	Cys	Ser	Ala	Cys
40			275					280					285			
	Gly	Asp	Leu	Arg	Ile	Ser	Glu	Ile	Val	Asp	Gln	Pro	Asn	Trp	Val	Val
		290					295					300				
45	Ser	Phe	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ser	Val	Phe	Glu						
	305					310										