(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1978651 B
(45)授权公告日 2010.11.17

(21)申请号 200510126158.4

(22)申请日 2005.11.30

(73)专利权人 华北制药集团新药研究开发有限责任公司
地址 050000 河北省石家庄市和平东路 388 号

(72)发明人 王富强 任志红 刘静 戴梦 郑桂珍 王泽建 赵颖 王红怡 贾茜 贺建功

(74)专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006
代理人 黄韧敏

(51)Int.Cl.
C12N 15/52(2006.01)
C12N 9/00(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12P 37/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1226932 A,1999.08.25, 全文.
王富强等. 产黄青霉转化载体pPIPKA的构建及青霉素工业生产菌株的转化研究. 菌物学报 23 1.2004,23(1), 第66-72页.
任志红等. 产黄青霉工业生产菌种基因报告系统的构建及启动子效率的评价. 菌物学报 24 3.2005,24(3), 第376-384页.

审查员 朱宁

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54)发明名称

编码产黄青霉苯乙酸羟化酶的基因及其应用

(57)摘要

本发明涉及来自产黄青霉的新的编码苯乙酸羟化酶的基因 (pahB),该基因编码的多肽及含有该基因的表达载体,并证明了苯乙酸能显著诱导该基因的表达。本发明为利用基因工程手段改造产黄青霉菌从而提高青霉素产量提供了方向和靶点,对于青霉素的生产具有重要意义。

CN 1978651 B

1. 一种分离的多核苷酸，其为编码 SEQ ID No :2 所示的蛋白质序列的多核苷酸序列。

2. 权利要求 1 所述的多核苷酸，其为 SEQ ID No :1 所示的序列或 SEQ IDNO :1 的第 43 位～ 1593 位核苷酸的序列。

3. 一种分离的多核苷酸，其为与权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸完全互补的核苷酸序列。

4. 由权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸编码的多肽。

5. 权利要求 4 所述的多肽，其具有 SEQ ID NO.2 所示的序列，具有苯乙酸羟化酶活性。

6. 含有权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸的表达载体。

7. 含有权利要求 6 所述的表达载体的宿主细胞。

8. 权利要求 1 或 2 所述的分离的多核苷酸在提高产黄青霉菌的青霉素产量中的应用。

编码产黄青霉苯乙酸羟化酶的基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及新的分离的多核苷酸，具体地说涉及来自产黄青霉的新的编码苯乙酸羟化酶的基因 (pahB)。

[0002] 本发明还涉及该基因编码的多肽。

[0003] 本发明还涉及含有该基因的表达载体。

[0004] 本发明也提供了新基因在提高产黄青霉菌的青霉素产量中的应用。

[0005] 背景技术

[0006] 以青霉素和头孢菌素为代表的 β－内酰胺类抗生素作为最重要的抗菌药物，占据了世界抗感染药物市场的 2/3，是目前已知的抗生素中毒性最低，品种最多，临床应用最广的一类抗生素。

[0007] 青霉素由丝状真菌产黄青霉 (Penicillium chrysogenum) 生产，由于广大的市场需求，人们对青霉素生产菌的改良投入了巨大的精力。基于传统的诱变筛选技术，现在的工业生产菌株的生产水平达到了相当高的水平。而分子生物学技术的发展为我们揭示 β－内酰胺类抗生素的生物合成机制提供了帮助。

[0008] 研究表明，青霉素的生物合成步骤由三个前体氨基酸，α－氨基己二酸、半胱氨酸、缬氨酸开始，经三肽合成酶 (ACVS) 催化缩合成 LLD-ACV 三肽，在异青霉素 N 合成酶作用下环化形成异青霉素 N，最终在乙酰辅酶 A :6- 氨基青霉烷酸酰基转移酶 (AAT) 催化下侧链交换得到青霉素。生物合成相关的三个关键酶的编码基因都已克隆 (Ingolia & Queener, Med. Res. Rev. 9 :245-264, 1989 ;Aharonowitz, et al., Ann. Rev. Microbiol. 46 :461-495, 1992)。

[0009] 在青霉素的工业生产中，苯乙酸 (Phenylacetic acid,PA) 被用来作为青霉素 G 的侧链前体。在发酵过程中，苯乙酸首先被活化为辅酶 A 硫脂，再在 AAT 作用下经转酰基作用，替代异青霉素 N 的 L-α－氨基己二酰侧链，形成青霉素 G。由于 AAT 具有较宽的底物范围，因此在发酵过程中添加苯乙酸可以促进青霉素 G。由于 AAT 具有较宽的底物范围，因此在发酵过程中添加苯乙酸可以促进青霉素 G 的生物合成。作为青霉素 G 的侧链前体，其利用效率很大程度上取决于它的毒性以及青霉菌对其的氧化能力。苯乙酸在生产成本中占有相当的比重，提高苯乙酸的利用效率是青霉素菌种改良过程中非常重要的内容。

[0010] 在Pseudomonas fluorescens(Kunita, N., Med. J. Osaka Univ. 3 :703-708, 1955), Aspergillus niger(Kluyver, A. J. &J. C. M. van Zijp., Antonie vanLeeuwenhoek17 : 47-55, 1951), Nocardia salmonicolor(Sariaslani, F. S. et al. Biochem. J. 140 :31-45, 1974), 以及 Aspergillus nidulans(Mingot, J. M. et al. J. Biol. Chem. 274, 14545 14550, 1999), Penicillium chrysogenum(Wisconsin Q-176(Isono, M. J., Agric. Chem. Jpn. 27 : 297-301, 1953 ;Nishikida, T., J. Antibiot. 4 :299-300, 1951) 等微生物中，苯乙酸的代谢是 2 位羟化形成 2-OHPA，然后依次形成尿黑酸 (homogentisic acid)、马来酰乙酰乙酸 (maleylacetoacetic acid,) 富马酰乙酰乙酸 (fumarylacetoacetic acid) 最后水解成延胡索酸和乙酰乙酸进入三羧酸循环。

[0011] 作为青霉素产生菌之一的构巢曲霉 (Aspergillus nidulans) 能够在苯乙酸为唯一碳源的培养基上生长，其苯乙酸代谢的第一步 2 位羟化由一个 P450 单加氧酶催化，该酶由 phacA 基因编码，该基因的失活导致了青霉素产量提高了 5 倍，同时使苯乙酸的代谢能力部分丧失 (Mingot，J.M.et al.J.Biol.Chem.274,14545 14550,1999)。在产黄青霉中，相应的 P450 单加氧酶由 pahA 基因编码。PahA 与 PhacA 氨基酸序列的一致性为 84％。研究表明，pahA 基因的表达受苯乙酸诱导，而其表达水平则与菌种的青霉素生产能力成负相关。传统的诱变及分离筛选，造成高产产黄青霉中该酶的苯乙酸氧化能力显著下降，青霉素生产能力的提高。序列分析发现高产菌株 PahA 序列的 181 位发生的 L → F 突变是造成该酶功能降低的原因 (*Rodríguez*-Sáiz，M. et al.J.Bacteriol.183,54655471,2001)。

[0012] 尽管如此，在工业发酵条件下，发酵液中仍能够检测到相当数量的 2- 羟苯乙酸 (2-OHPA) 的存在，这表明即使在工业菌株中，仍有相当部分的侧链前体被代谢掉了。是非特异的氧化、PahA 的突变仅部分丧失了其氧化活性、还是在产黄青霉中存在其他的氧化机制尚不得而知。深入研究苯乙酸的氧化机制，发现新的苯乙酸氧化关键基因，可为青霉菌生产菌种的选育提供基因改造的靶点，对提高产量、降低发酵成本意义重大。

发明内容

[0013] 本发明的一个目的在于提供新的编码产黄青霉苯乙酸羟化酶的基因，定名为 pahB。

[0014] 本发明的另一个目的在于提供上述基因编码的多肽。

[0015] 本发明的再一个目的在于提供含有上述基因序列的表达载体。

[0016] 根据本发明的一方面，编码产黄青霉谷苯乙酸羟化酶的基因，来源于产黄青霉菌 (Penicillin chrysogenum)，定名为 pahB。该基因 ORF 长为 1551bp，编码 517 个氨基酸的蛋白，与 PahA(516aa，AAF21759)、PhacA(518aa，CAB43093) 长度相近，推测分子量为 57.7kDa。其氨基酸序列和 PahA、PhacA 的一致性分别为 44％和 42％。在其 442-451 位是 P450 蛋白家族保守的半胱氨酸血红素 - 铁配体信号序列 -YGMGYRMCAG-([FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD]，Prosite database entry PS00086)，与 PahA(-YGAGSRMCAG-)、PhacA(-YGAGSRMCAG-) 一样，苯丙氨酸残基 (F) 为酪氨酸 (Y) 所取代。基因表达研究表明，pahB 的表达同样明显受到苯乙酸的诱导。

[0017] 具体地说，本发明提供了新的分离的多核苷酸，其含有下述序列之一：

[0018] (1) 序列表中的 SEQ ID No:1 所示的序列或 SEQ ID NO:1 的第 43 位～ 1593 位核苷酸的序列；

[0019] (2) 编码序列表中 SEQ ID No:2 所示蛋白质序列的多核苷酸序列。

[0020] 上述涉及的多核苷酸还包括取代、缺失、和插入变体以及等位变体、剪接变体、片段、衍生物等，其中可以通过取代、缺失、插入或衍生一个或多个核苷酸。优选的这些多核苷酸是那些编码具有生物学活性的苯乙酸羟化酶的多核苷酸。

[0021] 本领域技术人员可以理解的是，上述的分离的多核苷酸也包括那些与 SEQID NO.1 所示序列或 SEQ ID NO:1 的第 43 位～ 1593 位核苷酸的序列具有较高同源性的序列，例如同源性大于 90％、甚至 95％、甚至 98％的序列；还包括那些在严谨条件下可与 SEQ ID NO.1 所示序列或 SEQ ID NO:1 的第 43 位～ 1593 位核苷酸的序列杂交的序列；或者可与上述序

列互补的序列。

[0022] 根据本发明的另一方面，提供新的多肽，其含有上述核苷酸序列所编码的氨基酸序列，即含有 SEQ ID NO.2 所示的序列，编码蛋白为产黄青霉 (Penicillium chrysogenum) 的苯乙酸羟化酶，其具有序列表中 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列的蛋白质或将 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID No :2 相同活性的由 SEQID No :2 衍生的蛋白质。

[0023] 根据本发明的另一方面，本发明亦提供包括一种或多种上述多核苷酸的重组载体，以及包含上述多核苷酸的载体的基因工程宿主细胞。在优选的实施方案中，这种重组载体包括上述的多核苷酸，它编码含 SEQ ID NO :2 的多肽，其含 SEQ ID NO :1 的序列或 SEQ ID NO :1 的第 43 位～ 1593 位核苷酸的序列所示的多核苷酸。

[0024] 本发明也涉及到包括任何一种上述重组载体的宿主细胞。在已经构建载体之后，可以插入全部或部分载体至适合的宿主细胞，以便扩增和 / 或多肽表达。宿主细胞可以是原核生物宿主细胞（例如 E.coli）或者真核生物宿主细胞（例如丝状真菌细胞、酵母细胞，昆虫细胞，或脊椎动物细胞）。

[0025] 本发明还提供了新的基因在提高产黄青霉青霉素产量上的应用，由于 pahB 为苯乙酸分解代谢途径的关键基因，因此可以通过降低 pahB 的表达来提高青霉素生产工艺中的苯乙酸的利用效率，从而提高青霉素的产量。

[0026] 本发明从产黄青霉中成功地分离获得了新的编码产黄青霉苯乙酸羟化酶的基因，并证明了苯乙酸能显著诱导该基因的表达，本发明为利用基因工程手段改造产黄青霉菌从而提高青霉素产量提供了方向和靶点，对于青霉素的生产具有重要意义。

[0027] 附图的简要说明

[0028] 图 1 为 pahB 基因的结构图。

[0029] 发明的具体实施方式

[0030] 下面结合附图，通过对本发明较佳实施例的描述，详细说明本发明。

[0031] 在下面使用的试剂材料如无特别说明，均为市售分析纯试剂，购自天津试剂公司。

[0032] 【实施例 1】:pahB 基因克隆

[0033] 将产黄青霉菌 Wis54-1255(ATCC28089) 在 YPD(1％酵母提取物，2％蛋白胨，2％葡萄糖）培养基中培养 24h，过滤收菌丝，取 0.1g 湿菌丝液 N_2 研磨，加 1ml Trizol 试剂 (Invitrogen 公司，15596-026) 抽提产黄青霉总 RNA，将所得产黄青霉总 RNA 溶解于 DEPC 水中，-70℃下保存备用。

[0034] 为去除可能的 DNA 污染，取产黄青霉总 RNA 5μg，在 100μl 反应体系内，加入 5μl RQ1 RNase-Free DNase(Promega 公司，M6101)，10μl RQ1 RNase-FreeDNase 反应缓冲液 (10×)，37℃保温 30 分，用酚 :氯仿抽提，乙醇沉淀，溶于 10μl DEPC 水。取 5μl 去除 DNA 的 RNA 样品，用随机引物 (RandomHexamers，Promega 公司，C1181) 进行反转录，得到 cDNA，所用反转录酶为 SuperScriptTM II RNase H-(Invitrogen 公司，18064-022)。

[0035] 以 5’-tatatatcaacgtcaagatctatc-3’ 和 5’-taccccaaatagataccaccaatg-3’ 为引物，以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 条件为 :94℃，5 分 ;94℃ 1 分，60℃ 1 分，72℃ 2 分 -40 循环 ;72℃ 7 分 ;4℃保存。将 RT-PCR 产物按常规方法克隆测序，测序结果表明 RT-PCR 产物具有序列表中 SEQ ID NO.1 的核苷酸序列，长度为 1629bp。通过序列分析和

GenBank 数据库检索，表明该序列的开放阅读框架 (Open Reading Frame，ORF) 为自 5’端的第 43 到第 1593 位碱基，长度为 1551bp。在 ORF 起始密码子 ATG 前 15bp 处，同相位有终止密码子 TAA，由此说明我们得到了该基因的全长序列，定名为 pahB。

[0036] 该基因 ORF 片段的读码框编码 517 个氨基酸，推测分子量为 57.7kDa，如序列表中 SEQ ID NO.2 所示。该氨基酸序列与与产黄青霉苯乙酸羟化酶 PahA(516aa，AAF21759)、构巢曲霉苯乙酸羟化酶 PhacA(518aa，CAB43093) 长度相近。其氨基酸序列和 PahA、PhacA 的一致性分别为 44％和 42％。。在其 442-451 位是 P450 蛋白家族保守的半胱氨酸血红素 - 铁配体信号序列 -YGMGYRMCAG-([FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD]，Prosite database entry PS00086)，与 PahA(-YGAGSRMCAG-)、PhacA(-YGAGSRMCAG-) 一样，苯丙氨酸残基 (F) 为酪氨酸 (Y) 所取代。

[0037] 同时以提取的 Wis54-1255 菌株的基因组 DNA 为模版进行 PCR 扩增，引物及反应条件同上，得到 1860bp 的扩增产物，将其与 RT-PCR 产物序列比较，确认 pahB 基因有 3 个内含子，长度分别为 97bp、67bp、67bp。

[0038] 【实施例 2】:pahB 基因的表达受苯乙酸的诱导

[0039] 将产黄青霉菌 Wis54-1255(ATCC28089) 按 2×10^6 分生孢子 /ml 接种到种子培养基，在 26℃下培养 24 小时，种子培养基配方为 (g/l) :葡萄糖，30 ;乳糖，10 ;棉籽饼粉，10 ;酵母粉，10 ;玉米浆，10 ;$(NH_4)_2SO_4$，2 ;KH_2PO_4，1 ;$CaCO_3$，5 ;pH5.8。然后将种子培养物以 5％接种量接种到发酵培养基，26℃下培养。发酵培养基为 (g/l) :乳糖，120 ;棉籽饼粉，30 ;玉米浆，20 ;$(NH_4)_2SO_4$，5 ;KH_2PO_4，1 ;K_2SO_4，5 ;$CaCO_3$，10 ;pH6.5。

[0040] 实验分为 2 组，一组每天正常补加苯乙酸前体，另一组为对照，不加苯乙酸，72 小时后收取菌体提取总 RNA，提取及处理方法见实施例 1。

[0041] 用 SYBR Green 试剂作实时定量 PCR 检测 pahB 基因的表达，仪器为 ABIPRISM 7000 定量 PCR 仪。根据 pahB 基因的 cDNA 序列，利用 Primer Express 软件设计定量 PCR 引物，AS006 :5′ -GCTGAACAGTGAGGAGTTGAC-3′

[0042] AA006 :5′ -CGCAAGAACCTTCGACAGAG-3′ 。以产黄青霉 γ-actin 基因 (AF056975) 为内标，act1 :5′ -CTCGCTGAGCGTGGTTACAC-3′

[0043] act2 :5′ -TTGATGTCACGGACGATTTCA-3′ 。引物由上海生工合成。定量 PCR 试剂为SYBR® Premix Ex Tag™ 试剂盒（宝生物工程（大连）有限公司）。反应条件为 :95℃，1 分钟 ;95℃，15 秒，60℃，1 分钟，40 循环。对定量 PCR 的结果 C_T 值进行换算，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (Livak K.J. and T.D.SchmittgenMethods 25 :402-408，2001)。结果，在不添加苯乙酸的情况下，pahB 的表达水平非常低，苯乙酸能显著诱导 pahB 基因的表达，以不添加苯乙酸的表达量为 1，则添加苯乙酸时 pahB 的表达提高了 580 倍（下表）。

[0044]

样品名称	pahB
	2^-ΔΔCt
54+PAA	580.04
54-PAA	1

[0045] 以上对本发明的详细描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明做出各种改变和变形，只要未脱离本发明的精神，均应属于本发明权利要求所定义的范围。

[0046] SEQUENCE LISTING

[0047] <110> 华北制药集团新药研究开发有限责任公司

[0048] <120> 编码产黄青霉苯乙酸羟化酶的基因及其应用

[0049] <130>05P101406

[0050] <160>2

[0051] <170>PatentIn version 3.1

[0052] <210>1

[0053] <211>1629

[0054] <212>DNA

[0055] <213> 产黄青霉菌 (Penicillin chrysogenum)

[0056] <220>

[0057] <221>CDS

[0058] <222>(43)..(1593)

[0059] <223>ORF

[0060] <400>1

[0061] tatatatcaa cgtcaagatc tatcccataa ccatccagca cc atg gct atc gcc 54

[0062] Met Ala Ile Ala

[0063] 1

[0064] gct gcc ctg gcg tcg cta caa ggc agt gtg atc gag tat ccc tac cac 102

[0065] Ala Ala Leu Ala Ser Leu Gln Gly Ser Val Ile Glu Tyr Pro Tyr His

[0066] 5 10 15 20

[0067] tca cta gcc gcc gca gcc gtc ctc gcc ccc atc ctc tat gtc atc ctt 150

[0068] Ser Leu Ala Ala Ala Ala Val Leu Ala Pro Ile Leu Tyr Val Ile Leu

[0069] 25 30 35

[0070] aat gag ttc att cgt gat gcc gcc cgc gtc aag ggt atg aag ggt ccg 198

[0071] Asn Glu Phe Ile Arg Asp Ala Ala Arg Val Lys Gly Met Lys Gly Pro

[0072] 40 45 50

[0073] cgc gga ttg ccg ttg att gga aac ctg gcc cag att cgc aaa gat gcc 246

[0074] Arg Gly Leu Pro Leu Ile Gly Asn Leu Ala Gln Ile Arg Lys Asp Ala

[0075] 55 60 65

[0076] gcg gag cag tat cgc ctc tgg tcg aaa aag cac ggc gct gtg tat cag 294

[0077] Ala Glu Gln Tyr Arg Leu Trp Ser Lys Lys His Gly Ala Val Tyr Gln

[0078] 70 75 80

[0079] att cag ctg ggg aac atc ccc gtc gtt gtg gtc aac tct gct gcg tcg 342

[0080] Ile Gln Leu Gly Asn Ile Pro Val Val Val Val Asn Ser Ala Ala Ser

[0081] 85 90 95 100

[0082] gca aaa gtg ctt ttc ggt cag aat gcg cag gct ttg agc tct agg ccc 390

[0083] Ala Lys Val Leu Phe Gly Gln Asn Ala Gln Ala Leu Ser Ser Arg Pro

[0084] 105 110 115

[0085] gaa act tat act ttc cat aag att gtt tcc aat act ccc gga aca act 438

[0086] Glu Thr Tyr Thr Phe His Lys Ile Val Ser Asn Thr Pro Gly Thr Thr

[0087] 120 125 130

[0088] atc ggc acc tcg cca tat agc gac tct ctg aag aga cgc aga aag ggc 486

[0089] Ile Gly Thr Ser Pro Tyr Ser Asp Ser Leu Lys Arg Arg Arg Lys Gly

[0090] 135 140 145

[0091] gcc gcg tcg gct ctc aac cgg ccc tct gtc gat acg tac gtg tca cat 534

[0092] Ala Ala Ser Ala Leu Asn Arg Pro Ser Val Asp Thr Tyr Val Ser His

[0093] 150 155 160

[0094] ttg gac gtc gag tca aag gcc ttc gtg gaa gag ctg tac aga tat gga 582

[0095] Leu Asp Val Glu Ser Lys Ala Phe Val Glu Glu Leu Tyr Arg Tyr Gly

[0096] 165 170 175 180

[0097] aac cac ggg aag aca ccc gtc gat ccc atg gcc atg atc cag cgt ctg 630

[0098] Asn His Gly Lys Thr Pro Val Asp Pro Met Ala Met Ile Gln Arg Leu

[0099] 185 190 195

[0100] agt ttg agt ttg gca ttg act ctg aac tgg ggc gtg cgt atc gct tca 678

[0101] Ser Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Asn Trp Gly Val Arg Ile Ala Ser

[0102] 200 205 210

[0103] cag gaa gag gaa ttg ttc gat gag atc acc gag gtg gag gaa gag atc 726

[0104] Gln Glu Glu Glu Leu Phe Asp Glu Ile Thr Glu Val Glu Glu Glu Ile

[0105] 215 220 225

[0106] agt cgg ttc cga agc acc acc gga aac ctg cag gat tat atc cct ctt 774

[0107] Ser Arg Phe Arg Ser Thr Thr Gly Asn Leu Gln Asp Tyr Ile Pro Leu

[0108] 230 235 240

[0109] ctg cgg ttg aac ccg ttt agc tcc aac tcg aag aaa gcc gcc gag atg 822

[0110] Leu Arg Leu Asn Pro Phe Ser Ser Asn Ser Lys Lys Ala Ala Glu Met

[0111] 245 250 255 260

[0112] aga agg cgt cgg gac aag tac ctc ggt gcg ctt aat agt gac ttg gat 870

[0113] Arg Arg Arg Arg Asp Lys Tyr Leu Gly Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp

[0114] 265 270 275

[0115] gat cgc atg gca aag ggg aca cat aag cct tgt att cag gcc aac gtt 918

[0116] Asp Arg Met Ala Lys Gly Thr His Lys Pro Cys Ile Gln Ala Asn Val

[0117] 280 285 290

[0118] att atg gat aag gaa gct aag ctg aac agt gag gag ttg acg tcg att 966

[0119] Ile Met Asp Lys Glu Ala Lys Leu Asn Ser Glu Glu Leu Thr Ser Ile

[0120] 295 300 305

[0121] agc ttg acc atg ctt tct ggt ggc ctt gac act gtc acc act ttg gtt 1014

[0122] Ser Leu Thr Met Leu Ser Gly Gly Leu Asp Thr Val Thr Thr Leu Val

[0123] 310 315 320

[0124] gcg tgg agt ttg ggt ttg ctg gct caa cgt cct gat att cag gat cgg 1062

[0125] Ala Trp Ser Leu Gly Leu Leu Ala Gln Arg Pro Asp Ile Gln Asp Arg

[0126] 325 330 335 340

[0127] gcg gcc aag gct atc cag gag atg tat ggc gag gat gat ccc atg tgc 1110

[0128] Ala Ala Lys Ala Ile Gln Glu Met Tyr Gly Glu Asp Asp Pro Met Cys

[0129] 345 350 355

[0130] tct cct gac gat gat cag agg tgt gcg tac att gca gct ctg gtc aag 1158

[0131] Ser Pro Asp Asp Asp Gln Arg Cys Ala Tyr Ile Ala Ala Leu Val Lys

[0132] 360 365 370

[0133] gaa tgt ctt cga ttc ttc act gta ctg cga tta gca ctt cct cgc act 1206

[0134] Glu Cys Leu Arg Phe Phe Thr Val Leu Arg Leu Ala Leu Pro Arg Thr

[0135] 375 380 385

[0136] tca atc aaa gat atc acc tat aag gga atc acc att ccc aag ggc aca 1254

[0137] Ser Ile Lys Asp Ile Thr Tyr Lys Gly Ile Thr Ile Pro Lys Gly Thr

[0138] 390 395 400

[0139] gtg ttc ttt ttg aat gcc tgg gcc tgc aac atg gac ccc gac gtg tgg 1302

[0140] Val Phe Phe Leu Asn Ala Trp Ala Cys Asn Met Asp Pro Asp Val Trp

[0141] 405 410 415 420

[0142] act gac ccg gat gac ttc cgt ccc gag cga tgg ctc gag cag ccc gac 1350

[0143] Thr Asp Pro Asp Asp Phe Arg Pro Glu Arg Trp Leu Glu Gln Pro Asp

[0144] 425 430 435

[0145] gcg cct ctc ttt acg tat ggt atg ggt tac cgg atg tgc gcc ggg tea 1398

[0146] Ala Pro Leu Phe Thr Tyr Gly Met Gly Tyr Arg Met Cys Ala Gly Ser

[0147] 440 445 450

[0148] ctg cta gcc aat cgt gag ctc tac ctg gtc ttc atc cgc acc ctc aac 1446

[0149] Leu Leu Ala Asn Arg Glu Leu Tyr Leu Val Phe Ile Arg Thr Leu Asn

[0150] 455 460 465

[0151] agc ttc cgc ctc gaa cct cat gac aaa aca gac tgt cac cct ctc cgg 1494

[0152] Ser Phe Arg Leu Glu Pro His Asp Lys Thr Asp Cys His Pro Leu Arg

[0153] 470 475 480

[0154] ggt aac tcg gat ccg act agt ctg gtg gcc att cct caa aaa tat aag 1542

[0155] Gly Asn Ser Asp Pro Thr Ser Leu Val Ala Ile Pro Gln Lys Tyr Lys

[0156] 485 490 495 500

[0157] gtc cga ttt gtg ccg aag aat gaa aag gct ctg tcg aag gtt ctt gcg 1590

[0158] Val Arg Phe Val Pro Lys Asn Glu Lys Ala Leu Ser Lys Val Leu Ala

[0159] 505 510 515

[0160] cag tgaatggtgc cacattggtg gtatctattt ggggta 1629

[0161] Gln

[0162] <210>2

[0163] <211>517

[0164] <212>PRT

[0165] <213>产黄青霉菌(Penicillin chrysogenum)

[0166] <400>2

[0167] Met Ala Ile Ala Ala Ala Leu Ala Ser Leu Gln Gly Ser Val Ile Glu

[0168] 1 5 10 15

[0169] Tyr Pro Tyr His Ser Leu Ala Ala Ala Ala Val Leu Ala Pro Ile Leu

[0170] 20 25 30

[0171] Tyr Val Ile Leu Ash Glu Phe Ile Arg Asp Ala Ala Arg Val Lys Gly

[0172] 35 40 45

[0173] Met Lys Gly Pro Arg Gly Leu Pro Leu Ile Gly Asn Leu Ala Gln Ile

[0174] 50 55 60

[0175] Arg Lys Asp Ala Ala Glu Gln Tyr Arg Leu Trp Ser Lys Lys His Gly

[0176] 65 70 75 80

[0177] Ala Val Tyr Gln Ile Gln Leu Gly Asn Ile Pro Val Val Val Val Asn

[0178] 85 90 95

[0179] Ser Ala Ala Ser Ala Lys Val Leu Phe Gly Gln Asn Ala Gln Ala Leu

[0180] 100 105 110

[0181] Ser Ser Arg Pro Glu Thr Tyr Thr Phe His Lys Ile Val Ser Asn Thr

[0182] 115 120 125

[0183] Pro Gly Thr Thr Ile Gly Thr Ser Pro Tyr Ser Asp Ser Leu Lys Arg

[0184] 130 135 140

[0185] Arg Arg Lys Gly Ala Ala Ser Ala Leu Asn Arg Pro Ser Val Asp Thr

[0186] 145 150 155 160

[0187] Tyr Val Ser His Leu Asp Val Glu Ser Lys Ala Phe Val Glu Glu Leu

[0188] 165 170 175

[0189] Tyr Arg Tyr Gly Asn His Gly Lys Thr Pro Val Asp Pro Met Ala Met

[0190] 180 185 190

[0191] Ile Gln Arg Leu Ser Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Asn Trp Gly Val

[0192] 195 200 205

[0193] Arg Ile Ala Ser Gln Glu Glu Glu Leu Phe Asp Glu Ile Thr Glu Val

[0194] 210 215 220

[0195] Glu Glu Glu Ile Ser Arg Phe Arg Ser Thr Thr Gly Asn Leu Gln Asp

[0196] 225 230 235 240

[0197] Tyr Ile Pro Leu Leu Arg Leu Asn Pro Phe Ser Ser Asn Ser Lys Lys

[0198] 245 250 255

[0199] Ala Ala Glu Met Arg Arg Arg Arg Asp Lys Tyr Leu Gly Ala Leu Asn

[0200] 260 265 270

[0201] Ser Asp Leu Asp Asp Arg Met Ala Lys Gly Thr His Lys Pro Cys Ile

[0202] 275 280 285

[0203] Gln Ala Asn Val Ile Met Asp Lys Glu Ala Lys Leu Asn Ser Glu Glu

[0204] 290 295 300

[0205] Leu Thr Ser Ile Ser Leu Thr Met Leu Ser Gly Gly Leu Asp Thr Val

[0206] 305 310 315 320

[0207] Thr Thr Leu Val Ala Trp Ser Leu Gly Leu Leu Ala Gln Arg Pro Asp

[0208] 325 330 335

[0209] Ile Gln Asp Arg Ala Ala Lys Ala Ile Gln Glu Met Tyr Gly Glu Asp

[0210] 340 345 350

[0211] Asp Pro Met Cys Ser Pro Asp Asp Asp Gln Arg Cys Ala Tyr Ile Ala

[0212] 355 360 365

[0213] Ala Leu Val Lys Glu Cys Leu Arg Phe Phe Thr Val Leu Arg Leu Ala

[0214] 370 375 380

[0215] Leu Pro Arg Thr Ser Ile Lys Asp Ile Thr Tyr Lys Gly Ile Thr Ile

[0216] 385 390 395 400

[0217] Pro Lys Gly Thr Val Phe Phe Leu Asn Ala Trp Ala Cys Asn Met Asp

[0218] 405 410 415

[0219] Pro Asp Val Trp Thr Asp Pro Asp Asp Phe Arg Pro Glu Arg Trp Leu

[0220] 420 425 430

[0221] Glu Gln Pro Asp Ala Pro Leu Phe Thr Tyr Gly Met Gly Tyr Arg Met

[0222] 435 440 445

[0223] Cys Ala Gly Ser Leu Leu Ala Asn Arg Glu Leu Tyr Leu Val Phe Ile

[0224] 450 455 460

[0225] Arg Thr Leu Asn Ser Phe Arg Leu Glu Pro His Asp Lys Thr Asp Cys

[0226] 465 470 475 480

[0227] His Pro Leu Arg Gly Asn Ser Asp Pro Thr Ser Leu Val Ala Ile Pro

[0228] 485 490 495

[0229] Gln Lys Tyr Lys Val Arg Phe Val Pro Lys Asn Glu Lys Ala Leu Ser

[0230] 500 505 510

[0231] Lys Val Leu Ala Gln

[0232] 515

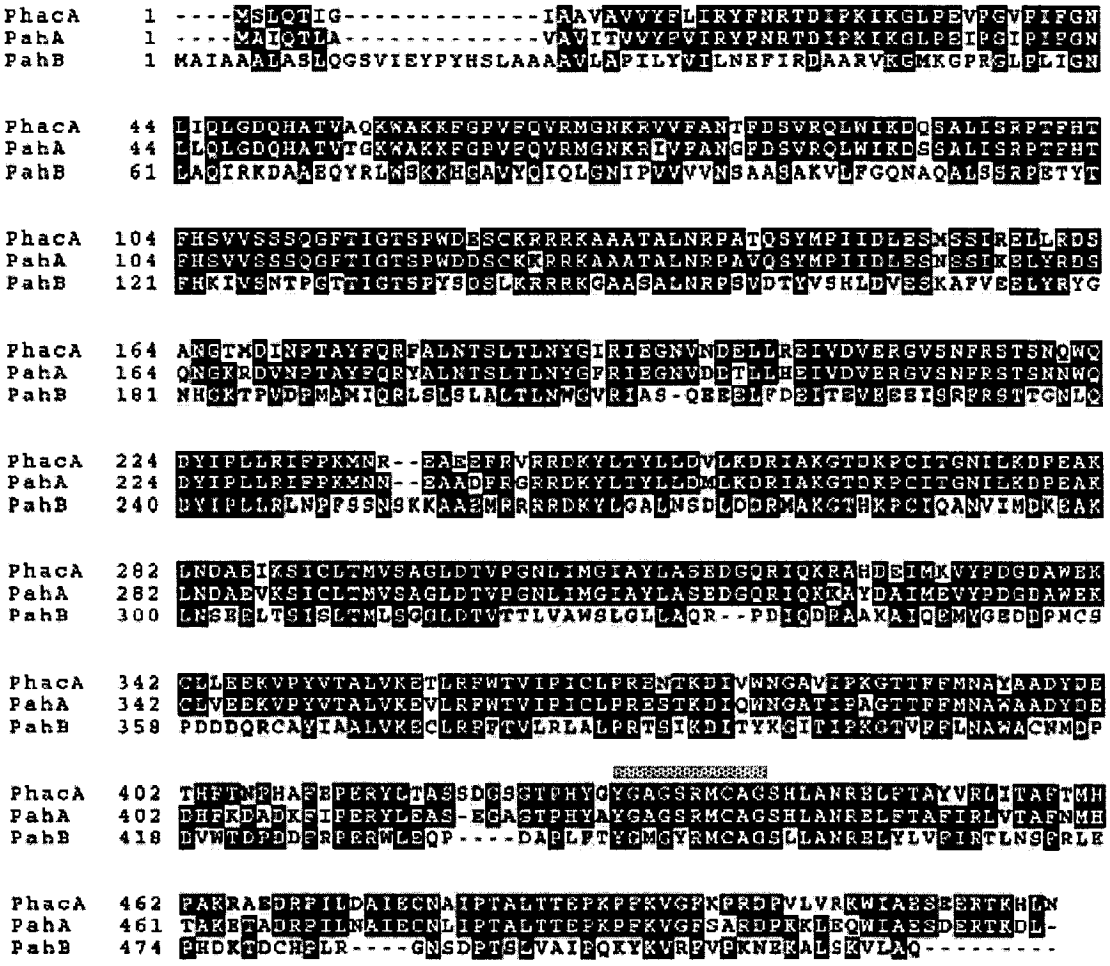


图 1