



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106884009 A

(43) 申请公布日 2017. 06. 23

(21) 申请号 201510946696. 1

(22) 申请日 2015. 12. 16

(71) 申请人 丰益(上海)生物技术研发中心有限公司

地址 200137 上海市浦东新区高东工业区高
东路 118 号 A 区

(72) 发明人 宣姚吉 刘莎 顾思天 包悦佚
牛其文

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

C12N 9/20(2006. 01)

C12N 15/55(2006. 01)

C11B 3/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书19页

序列表24页 附图2页

(54) 发明名称

高效的不依赖锌离子的磷脂酶 C 突变体

(57) 摘要

本发明涉及高效的不依赖锌离子的磷脂酶 C 突变体。具体而言,本发明提供一种分离的氨基酸序列,所述氨基酸序列含有:(1)SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列;或(2)在(1)所述的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸,同时保留 SEQ ID NO:7 所具备的磷脂酶 C 活性的由(1)衍生的多肽。本发明还涉及编码所述氨基酸序列的多核苷酸序列,含有所述多核苷酸序列的核酸构建体、宿主细胞,含有所述氨基酸序列的组合物,以及所述氨基酸序列的用途。

1. 一种分离的氨基酸序列,所述氨基酸序列含有:
 - (1) SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列;或
 - (2) 在(1)所述的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸,同时保留 SEQ ID NO:7 所具备的磷脂酶 C 活性的由(1)衍生的多肽。
2. 如权利要求 1 所述的氨基酸序列,其特征在于,
SEQ ID NO:7 中第 56 位的氨基酸 Xaa 为丙氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸或色氨酸,优选组氨酸或色氨酸;和/或
 - (2) 所述的取代、缺失或添加一个或几个氨基酸为第 106 位的 M 突变为 V;优选地,(2) 所述的氨基酸序列 56 位的氨基酸残基为组氨酸,106 位的氨基酸残基为缬氨酸;和/或所述氨基酸序列含有前导肽、末端延伸、GST、麦芽糖 E 结合蛋白、蛋白 A、如 6His 或 Flag 的标签、和/或 Xa 因子或凝血酶或胰激酶的蛋白水解酶位点。
3. 如权利要求 1 所述的氨基酸序列,其特征在于,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO:2、4 和 6。
4. 一种分离的多核苷酸序列,选自:
 - (1) 编码权利要求 1-3 中任一项所述的分离的氨基酸序列的多核苷酸序列;
 - (2) (1) 所述多核苷酸序列的互补序列;和
 - (3) (1) 或 (2) 所述序列的长 15 - 30 个碱基的片段;优选地,所述多核苷酸序列如 SEQ ID NO:1、3 或 5 所示。
5. 一种核酸构建体,其特征在于,该核酸构建体包含权利要求 6 所述的多核苷酸序列,优选地,所述核酸构建体是表达载体。
6. 一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有权利要求 4 所述的多核苷酸序列或权利要求 5 所述的核酸构建体。
7. 一种组合物,其特征在于,所述组合物含有权利要求 1-3 中任一项所述的多肽和任选的辅料,优选地,所述辅料为选自活性炭、氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷、多孔玻璃的吸附材料。
8. 权利要求 1-3 中任一项所述的氨基酸序列、权利要求 4 所述的多核苷酸序列、权利要求 5 所述的核酸构建体、权利要求 6 所述的宿主细胞或权利要求 7 所述的组合物在油脂精炼、磷脂改性、饲料改良剂、食品工业和医药工业中的应用。
9. 一种酶法脱胶方法,或一种提高磷脂酶 C 脱胶性能的方法,其特征在于,所述方法包括:在 55 ~ 75°C 的温度下孵育磷脂酶 C 后,将该磷脂酶 C 加到毛油中,进行脱胶。
10. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述方法具有以下一个或多个特征:
 - (1) 所述磷脂酶 C 具有权利要求 1 - 3 中任一项所述的氨基酸序列;
 - (2) 在 60 ~ 70°C 的温度下孵育所述磷脂酶 C;
 - (3) 孵育时间为 15 ~ 45 分钟;
 - (4) 以毛油重量计,酶的添加量为 50 ~ 1000ppm,优选为 100 ~ 500ppm,更优选为 100 ~ 300ppm;
 - (5) 在将酶加入毛油前,先将毛油加热至 50 ~ 70°C,优选 50 ~ 60°C;和
 - (6) 脱胶包括在 50 ~ 60°C 下搅拌 1 ~ 3 小时,然后升温至 80 ~ 90°C 保持 1 ~ 10 分钟。

高效的不依赖锌离子的磷脂酶 C 突变体

技术领域

[0001] 本发明涉及高效的不依赖锌离子的磷脂酶 C 突变体,具体地涉及通过分子生物学中的突变筛选方法获得的磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C 突变体及其用途。

背景技术

[0002] 脱胶是油脂精炼的一个重要步骤,而传统的水化脱胶法经济成本高,物料能耗大,环境污染重,所以近些年,很多努力致力于将酶法脱胶用于油脂精炼中的脱胶环节,并取得了很大的进展。同传统方法相比,酶法脱胶能够提高经济效益,做到节能减排,对生态环境污染少,在环保、经济、质量等方面具有较大的优势。油脂脱胶所用的酶即为磷脂酶。磷脂酶具备水解一个或多个甘油磷脂酯键的能力,它代表着一类脂肪酶、酰基水解酶和磷酸酯酶。磷脂酶根据该酶在磷脂分子上作用位点的不同,可以分为磷脂酶 A1 (PLA1)、磷脂酶 A2 (PLA2)、磷脂酶 C (PLC) 和磷脂酶 D (PLD)。

[0003] 磷脂酶 C (Phospholipase C, 简称 PLC), 是一种能够水解甘油磷脂 C3 位点磷脂酰键生成甘油二酯和磷酸胆碱、磷酸肌醇、磷酸乙醇胺等的脂类水解酶。磷脂酶 C 广泛存在于动植物和微生物中,动植物来源 PLC 一般位于细胞膜上,结构较为复杂,属于内源性磷脂酶 C,难以分离。同其他脱胶酶相比,磷脂酶 C (PLC) 表现出更大的优势,比如,增加甘二酯 (DAG) 的得率,以及减少得油量的损失。

[0004] 微生物来源的磷脂酶 C 结构一般较为简单,这些酶已经从各种微生物中分离得到,细菌来源的较多包括产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens* (Yun T, Siebel C. Cloning and expression of the PLC gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*[J]. *Infection and immunity*, 1989, 2:468-476)、双酶梭菌 *C. bifermentans*、*Burkholderia pseudomallei*、*Bacillus cereus*、蕈状芽孢杆菌 *Bacillus mycooides*、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*、单核细胞增多性李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、荧光假单胞菌 *P. fluorescens*、葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、鲍氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii*、链霉菌 *Streptomyces clavuligerus*、伯克氏菌属 *Burkholderi* 等等。来自放线菌的有八丈岛链霉菌 *Streptomyces hachijyoensis* 等。还有来自酵母菌的白色念珠菌 *Candida albicans* (Analuz E, Juan-Jose R, Rosario Cueva. Sequencing of a 4.3kbp region of chromosome 2 of *Candida albicans* reveals the presence of homologues of SHE9 from *Saccharomyces cerevisiae* and of bacterial phosphatidylinositol-phospholipase C[J]. *Yeast*, 2001, 18(8):711-721)、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Payne W, Fitzgerald-Hayes M. A mutation in PLC1, a candidate phosphoinositide specific phospholipase C gene from *Saccharomyces cerevisiae*, causes aberrant mitotic chromosome segregation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13:4351-4364) 等。

[0005] *Bacillus cereus* 的 PC-PLC (BC-PC-PLC), 是研究较早的一种磷脂酶 C。

BC-PC-PLC 全长为 283 个氨基酸,其中包含 24 个氨基酸的信号肽和 14 个氨基酸的前导肽,成熟肽为 245 个氨基酸 (Johansen, T.、Holm, T.、Guddal, P. H.、Sletten, K.、Haugli, F. B.、Little, C., 1988, "Cloning and sequencing of the gene encoding the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C of *Bacillus cereus*", *Gene* 65(2):293-304)。BC-PC-PLC 的晶体结构已经被报道,其由多个螺旋结构域组成,催化位点为 55 位天冬氨酸,并且含有至少三个 Zn^{2+} 结合位点 (Hough, E.、Hansen, L. K.、Birknes, B.、Jynge, K.、Hansen, S.、Hordvik, A.、Little, C.、Dodson, E.、Derewenda, Z., 1989, "High-resolution(1.5Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*", *Nature*, 338:357-60)。BC-PC-PLC 的异源表达研究较少目前只在 *Bacillus subtilis* 和 *pichia pastoris* 中进行表达 (Durban, M. A.、Silbersack, J.、Schweder, T.、Schauer, F.、Bornscheuer, U. T., 2007, High level expression of a recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis*, *Appl Microbiol Biotechnol* 74(3):634-639; Seo, K. H.、Rhee J. I., 2004, High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization, *Biotechnol Lett* 26(19):1475-1479)。

[0006] 目前,磷脂酶 C 主要应用于酶法脱胶。在制造大豆、菜籽等食用油时,未经精炼的毛油主要含有甘油三酯、磷脂、甾醇、生育酚、游离脂肪酸、痕量金属以及其它微量化合物的复杂混合物。其中磷脂会造成色泽及口味变差、保质期变短并且影响后续的精炼效果。目前,主要的脱胶方式有水化脱胶、深度脱胶和酶法脱胶。酶法脱胶由于条件温和、无污染、油耗低,越来越受到人们的青睐。

[0007] 由于磷脂酶 C 作用于甘油磷脂可以生成甘油二酯,因此,在酶法脱胶过程中使用磷脂酶 C 可以显著提升油脂的得率,从而提高生产经济效益。因此,提升磷脂酶 C 的脱胶性能具有非常重要的生产实践意义。

[0008] 但本领域仍然需要具有更高酶活的 BC-PC-PLC。

发明内容

[0009] 本发明人通过将 BC-PC-PLC 的三个糖基化位点即 63 位, 131 位和 134 位天冬酰胺分别突变为天冬氨酸, 丝氨酸和天冬氨酸 (见 SEQ ID NO :2), 在低硫酸锌条件下其酶活相比于野生型提高 16 倍。

[0010] 进一步地, 本发明人利用易错 PCR (error-prone PCR) 得到 SEQ ID NO :2 的突变体文库, 将突变体文库中的表达载体转化毕赤酵母宿主细胞, 通过平板筛选得到比酶活 (U/mg 总蛋白) 与母本 (即 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列) 相似以及高 1.5 倍以上的数株突变体, 这些突变体中氨基酸序列第 56 位的酪氨酸突变为丙氨酸 (A)、赖氨酸 (K)、天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)、组氨酸 (H)、色氨酸 (W)、苯丙氨酸 (F)、精氨酸 (R)、丝氨酸 (S) 或苏氨酸 (T)。尤其是第 56 位为 H 或 W 的突变体, 其比酶活比母本提高 7 倍。

[0011] 本发明因此提供一种更高效的不依赖锌离子的磷脂酶 C, 可用于油脂精炼、磷脂改性、饲料改良剂、食品工业和医药工业等多个方面, 从而完成本发明。

[0012] 因此, 本发明第一方面提供一种分离的氨基酸序列, 所述氨基酸序列含有:

[0013] (1) SEQ ID NO :7 所示的氨基酸序列; 或

[0014] (2) 在 (1) 所述的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸,同时保留 SEQ ID NO :7 所具备的磷脂酶 C 活性的由 (1) 衍生的多肽。

[0015] 在一个具体实施例中,SEQ ID NO :7 中第 56 位的氨基酸 Xaa 为丙氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、或色氨酸。

[0016] 在一个具体实施例中,SEQ ID NO :7 中第 56 位的氨基酸 Xaa 为组氨酸或色氨酸。

[0017] 在一个具体实施例中,(2) 所述的取代、缺失或添加一个或几个氨基酸为第 106 位的 M 突变为 V。

[0018] 在一个具体实施例中,(2) 所述的取代、缺失或添加一个或几个氨基酸为第 20 位的 R 突变为 H。

[0019] 在一个具体实施例中,(2) 所述的取代、缺失或添加一个或几个氨基酸为第 83 位的 A 突变为 D。

[0020] 在一个具体实施例中,(2) 所述的氨基酸序列 56 位的氨基酸残基为组氨酸,106 位的氨基酸残基缬氨酸。

[0021] 在一个具体实施例中,所述氨基酸序列含有前导肽、末端延伸、GST、麦芽糖 E 结合蛋白、蛋白 A、如 6His 或 Flag 的标签、和 / 或 Xa 因子或凝血酶或肠激酶的蛋白水解酶位点。

[0022] 在一个具体实施例中,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO:2、4 和 6。

[0023] 本发明第二方面提供分离的多核苷酸序列,选自:

[0024] (1) 编码本发明分离的多肽的多核苷酸序列;

[0025] (2) (1) 所述多核苷酸序列的互补序列;和

[0026] (3) (1) 或 (2) 所述序列的长 15 - 30 个碱基的片段。

[0027] 在一个具体实施例中,所述多核苷酸序列如 SEQ ID NO:1、3 或 5 所示。

[0028] 本发明第三方面提供一种核酸构建体,其特征在于,该核酸构建体包含本发明所述的多核苷酸序列。

[0029] 在一个具体实施例中,所述核酸构建体是表达载体。

[0030] 本发明还提供一种遗传工程化的宿主细胞,所述宿主细胞含有本发明所述的多核苷酸序列或核酸构建体。

[0031] 本发明还提供一种组合物,所述组合物含有本发明的多肽和任选的辅料,优选的,所述辅料为选自活性炭、氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷、多孔玻璃的吸附材料。

[0032] 本发明还提供本发明所述氨基酸序列在油脂精炼、磷脂改性、饲料改良剂、食品工业和医药工业中的应用。

[0033] 本发明还提供一种酶法脱胶方法,所述方法包括在 55 ~ 75℃ 的温度下孵育磷脂酶 C,然后将该磷脂酶 C 加到毛油中,进行脱胶。

[0034] 在一个具体实施例中,所述磷脂酶 C 具有本发明所述的氨基酸序列。

[0035] 在一个具体实施例中,在 60 ~ 70℃ 的温度下孵育磷脂酶 C,尤其是本发明所述氨基酸序列。

[0036] 在一个具体实施例中,孵育时间为 15 ~ 45 分钟。

[0037] 在一个具体实施例中,以毛油重量计,酶的添加量为 50 ~ 1000ppm,优选为 100 ~ 500ppm,更优选为 100 ~ 300ppm。

[0038] 在一个具体实施例中,孵育酶的水溶液。

- [0039] 在一个具体实施例中,在将酶加入毛油前,先将毛油加热至 50 ~ 70℃,优选 50 ~ 60℃。
- [0040] 在一个具体实施例中,脱胶包括在 50 ~ 60℃下搅拌 1 ~ 3 小时,然后升温至 80 ~ 90℃保持 1 ~ 10 分钟。
- [0041] 本发明还提供一种提高磷脂酶 C 脱胶性能的方法,所述方法包括,在 55 ~ 75℃的温度下孵育磷脂酶 C,然后将该磷脂酶 C 加到毛油中,进行脱胶。
- [0042] 在一个具体实施例中,所述磷脂酶 C 具有本发明所述的氨基酸序列。
- [0043] 在一个具体实施例中,在 60 ~ 70℃的温度下孵育磷脂酶 C,尤其是所述氨基酸序列。
- [0044] 在一个具体实施例中,孵育时间为 15 ~ 45 分钟。
- [0045] 在一个具体实施例中,以毛油重量计,酶的添加量为 50 ~ 1000ppm,优选为 100 ~ 500ppm,更优选为 100 ~ 300ppm。
- [0046] 在一个具体实施例中,孵育酶的水溶液。
- [0047] 在一个具体实施例中,在将酶加入毛油前,先将毛油加热至 50 ~ 70℃,优选 50 ~ 60℃。
- [0048] 在一个具体实施例中,脱胶包括在 50 ~ 60℃下搅拌 1 ~ 3 小时,然后升温至 80 ~ 90℃保持 1 ~ 10 分钟。
- [0049] 在一个具体实施例中,所述毛油包括但不限于:大豆油、葵花籽油、花生油、菜籽油、米糠油、玉米油、橄榄油、棕榈油、棕榈仁油、棕榈软脂、卡诺拉油、蓖麻油、椰子油、芫荽油、棉籽油、榛子油、大麻籽油、亚麻籽油、芒果仁油、白芒花油、牛蹄油、红花油、山茶花油、妥尔油、椿油和其他植物油。

附图说明

- [0050] 图 1 显示 PLC-N63DN131SN134D-Y56H, PLC-N63DN131SN134D-M106V 和 PLC-N63DN131SN134D-Y56HM106V 三种突变体在含 10uM ZnSO₄的 BMM- 大豆磷脂筛选平板中的培养结果。
- [0051] 图 2 显示各个突变体的比酶活。
- [0052] 图 3 显示 N63DN131SN134D 和 N63DN131SN134D-Y56H 的脱胶小试结果。
- [0053] 图 4 显示各种磷脂酶在磷脂分子上的作用位点。

具体实施方式

- [0054] 具有磷脂酶 C 活性的多肽
- [0055] 本发明提供氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的多肽。本发明还包括在 SEQ ID NO:7 的基础上具有一个或多个(通常为 1-10 个,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个)氨基酸缺失、插入和/或取代,尤其是在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内,较佳地为 10 个以内,更佳地为 8 以内)氨基酸的多肽。这些变异形式仍然具有本发明磷脂酶 C 的活性。作为这类突变的一个例子,本发明包括 SEQ ID NO:7 第 20 位的 R 突变为 H、第 83 位的 A 突变为 D 和/或第 106 位的 M 突变为 V 的磷脂酶 C。
- [0056] 优选是保守性变异形式。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行保守

性取代时,通常不会改变蛋白质或多肽的功能。“性能相近或相似的氨基酸”包括例如,具有相似侧链的氨基酸残基的家族,这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,在本发明多肽中用来自同一侧链类的另一氨基酸残基替换一个或几个位点,将不会在实质上影响其活性。

[0057] 此外,本领域技术人员公知,在基因克隆操作中,常常需要设计合适的酶切位点,这势必在所表达的蛋白末端引入了一个或多个不相干的残基,而这并不影响目的蛋白的活性。又如为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化,常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内,例如,包括但不限于,适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白、蛋白A、如6His或Flag的标签,或Xa因子或凝血酶或肠激酶的蛋白水解酶位点。应理解,这些氨基酸序列的存在不会影响到所得多肽的活性。因此,本发明也包括在本发明多肽的C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸(例如前述接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸、GST、麦芽糖E结合蛋白、蛋白A、如6His或Flag的标签,或Xa因子或凝血酶或肠激酶的蛋白水解酶位点等)所得的多肽,这些多肽仍具有本文所述的磷脂酶C活性。

[0058] 根据重组生产方案所用的宿主,本发明的多肽可以是糖基化的,或可以是非糖基化的。

[0059] 本发明的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。

[0060] 多核苷酸

[0061] 本申请包括编码本发明多肽的核苷酸序列或其互补序列。SEQ ID NO:3和5显示了本发明多肽的编码序列例子。所述“编码序列”包括编码本发明所述多肽(尤其是SEQ ID NO:7)的核酸序列。编码本发明多肽的序列可以与例如SEQ ID NO:3和5所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指相同的氨基酸序列,但核苷酸序列有差别的核苷酸序列。

[0062] 编码本发明多肽的序列包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0063] 本发明还涉及上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的片段、类似物、衍生物和变异形式。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的蛋白的功能。

[0064] 本发明也包括编码本发明多肽的核酸序列(如SEQ ID NO:3、5或其互补序列)的片段。如本文所用,“核酸片段”的长度至少含15个核苷酸,较好是至少30个核苷酸,更好是至少50个核苷酸,最好是至少100个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如

PCR) 以确定和 / 或分离编码本发明多肽的多核苷酸。因此,在某些实施例中,核酸片段的长度在 15 — 30 个碱基。可采用现有技术从本发明的核酸序列中挑选出适当的核酸片段,用作引物或探针。

[0065] 本发明的多肽的编码序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次 PCR 扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0066] 核酸构建体

[0067] 本发明也涉及包括与指导编码序列在合适宿主细胞中,在与该调控序列相适合的条件下表达的一个或多个调控序列可操作连接的本发明的分离多核苷酸的核酸构建体。编码本发明多肽的多核苷酸可以多种方式被操作以保证该多肽的表达。在其插入载体之前该多核苷酸序列的操作可能根据该表达载体而是合乎需要或必需的。利用重组 DNA 方法来改变多核苷酸序列的技术是本领域已知的。

[0068] 调控序列可以是合适的启动子序列,为用于表达编码本发明多肽的多核苷酸的宿主细胞识别的核苷酸序列。启动子序列包含接到多肽表达的转录调控序列。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截短的和杂合启动子,并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

[0069] 用于指导本发明的核酸构建体,特别是在细菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从噬菌体 T7 启动子、大肠杆菌 lac 操纵子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂糖酶基因、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因等中获得的启动子序列。

[0070] 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞正转录的合适启动子的实例是从米曲霉 TAKA 淀粉酶、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定的 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉糖化酶 (*glaA*)、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、氏木霉纤维二糖水解酶 II、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、里氏木霉葡聚糖内切酶等基因获得的启动子及其突变、截短和杂合 (*hybrid*) 启动子。

[0071] 在酵母宿主中,有用的启动子可获得自酿酒酵母烯醇酶 (*ENO-1*)、酿酒酵母半乳糖激酶 (*GAL1*)、酿酒酵母乙醇脱氢酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、酿酒酵母磷酸丙糖异构酶、酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶的基因、巴斯德毕赤酵母醇氧化酶基因。用于酵母宿主细胞的其它有用启动子由 Romanos et al., 1992, *Yeast* 8:423-488 描述。

[0072] 调控序列也可以是合适的转录终止子序列,为宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的 3' 末端可操作连接。在选择宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

[0073] 用于细菌宿主的优选终止子可以是来自 T7 噬菌体的终止子。

[0074] 用于丝状真菌宿主细胞的优选终止子获得自米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶的基因。

[0075] 用于酵母宿主细胞的优选终止子获得自酿酒酵母烯醇酶、酿酒酵母细胞色素 C、酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶、巴斯德毕赤酵母醇氧化酶基因等。

[0076] 调控序列也可以是合适的前导序列,对宿主细胞翻译重要的 mRNA 的非翻译区。签到序列与编码该多肽的核苷酸序列的 5' 末端可操作连接。在选择宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

[0077] 调控序列也可以是编码与多肽的氨基酸末端连接的氨基酸序列并且指导该编码的多肽进入细胞分泌途径的信号肽编码区。核苷酸序列编码序列的 5' 端可固有地包含天然连接具有编码分泌多肽的编码区节段的翻译阅读框的信号肽编码区。备选地,编码序列的 5' 端可包含与该编码区外源的信号肽编码区。当编码序列非天然地包含信号肽编码区时,可能需要外来的信号肽编码区。备选地,外来的信号肽编码区可简单地替换天然的信号肽编码区以增强多肽的分泌。然而,指导表达的多肽进入选择的宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码区,即分泌进入培养基,都可用于本发明。

[0078] 表达载体

[0079] 本发明也涉及包括本发明多核苷酸的重组表达载体。在此各种核酸和调控序列可被连接在一起以产生可能包括一个或多个容许在这种位点插入或取代该编码多肽的核苷酸序列的方便限制性位点的重组表达载体。备选地,本发明的核苷酸序列可通过插入核苷酸序列或包括进入适当表达载体的序列的核酸构建体而被表达。在制造表达载体时,编码序列位于载体中以便使得该编码序列可操作地连接用于表达适当调控序列。

[0080] 重组表达载体可以使能够方便地经受重组 DNA 方法并且可导致感兴趣的核苷酸序列表达的任何载体(如质粒或病毒)。载体的选择一般取决于载体与其中被导入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是线性或闭合的环形质粒。

[0081] 载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在,其复制不依赖于染色体复制的载体,例如质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可包含用于保证自我复制的任何方式。备选地,载体可以是当被导入宿主细胞时,整合到基因组中并且与其已经被整合进入的染色体一起复制的载体。此外,可使用一起包含将被导入宿主细胞基因组的总 DNA 的单个载体或质粒或两个或多个载体或质粒,或转座子。

[0082] 本发明的载体优选包含一个或多个容许容易选择转化、转染、转导等细胞的可选择标记。可选择的标记是基因,其产物提供对抗生素或病毒的抗性、对重金属的抗性、原养型至营养缺陷型等。

[0083] 本发明的载体优选包含容许该载体整合进入宿主细胞基因组或该载体在细胞中独立于基因组自主复制的元件。

[0084] 一个以上拷贝的本发明的多核苷酸可被插入宿主细胞以增加该基因产物的产量。多核苷酸拷贝数的增加可通过将至少一个附加拷贝的序列整合进入宿主细胞基因组或通过包括可扩增的选择标记基因和该多核苷酸来获得,其中包含扩增拷贝的选择标记基因并且由此包含附加拷贝多核苷酸的细胞可通过在存在适当的选择剂时培养该细胞来筛选。

[0085] 本发明的载体优选包含人工合成的一段序列,含有多个限制内切酶识别位点,能为外源 DNA 提供多种可插入的位置或插入方案。

[0086] 本发明的表达载体更为优选地选择可用于毕赤酵母中表达的载体。本发明的载体优选商品化的毕赤酵母中使用的载体如 pPIC、pPICZ、pAO、pGAP 或 pGAPZ 等一系列的载体。

[0087] 宿主细胞

[0088] 本发明也涉及包括被用于重组生产多肽的本发明多核苷酸的重组宿主细胞。包括

本发明多核苷酸的载体被导入宿主细胞以使得该载体如早先说明的作为染色体的组成部分或作为染色体外的自我复制载体来维持。宿主细胞的选择很大程度上取决于编码多肽的基因及其来源。

[0089] 宿主细胞可以是单细胞微生物或非单细胞微生物。单细胞微生物例如革兰氏阳性细菌,包括但不限于芽孢杆菌细胞,例如,嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌等;或链霉菌细胞,例如钱青紫链霉菌;或革兰氏阴性细菌,例如大肠杆菌和假单胞菌属。在优选的方面,细菌宿主是枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和大肠杆菌细胞。

[0090] 宿主细胞也可以是真核生物,例如哺乳动物、昆虫、植物、酵母或真菌细胞。在优选的方面,宿主细胞是真核细胞,如在此使用的“真核”包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、接合菌门(Zygomycota)以及卵菌门等。

[0091] 在更优选的方面,宿主细胞是子囊菌门的细胞如酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)、假丝酵母属(*Candida*)以及 *Komagataella* 属等。

[0092] 在最优选的方面,宿主细胞是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)等。在另外最优选方面,宿主细胞是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞。

[0093] 生产方法

[0094] 在获得多肽的编码序列后,可采用如下方法生产本发明多肽,该方法包括:(a) 在有助于生产多肽的条件下培养含表达该多肽的表达载体的宿主细胞;以及(b) 回收该多肽。

[0095] 本发明的生产方法中,细胞可以利用本领域已知的方法在适于生产多肽的培养基中培养。例如,细胞可通过在实验室或工业发酵罐中进行的摇瓶培养和小规模或大规模的发酵(包括连续的、分批的、分批补料或固态发酵),在合适的培养基和容许该多肽表达和/或分离的条件下进行培养。培养发生在利用本领域已知的方法包括碳源和氮源和无机盐的合适培养基中。合适的培养基可获得自商业供应者或可根据公开的组合物来制备。如果该多肽分泌进入培养基,该多肽可从培养基直接回收。如果该多肽不分泌进入培养基,它可从细胞裂解物回收。

[0096] 或者,也可采用本领域已知的化学合成方法来合成本发明的多肽。多肽化学合成方法包括固相合成法和液相合成法,其中以固相合成法常用。固相合成方法包括但不限于 Fmoc 和 tBoc 两种常用方法。通常,使用树脂作为不溶性的固相载体,通常从 C 端(羧基端)向 N 端(氨基端)逐个将氨基酸连接在肽链上,每个氨基酸连接循环由以下三步反应构成:1) 脱保护:被保护的氨基酸必须用一种脱保护溶剂去除氨基的保护基团;2) 活化:待连接的氨基酸的羧基被活化剂所活化;和 3) 偶联:活化的羧基与前一个氨基酸裸露的氨基反应,形成肽键。反复循环直到肽链延伸至所需长度时即可完成。最后用切割液切割肽链和固相载体之间的连接,就可获得所需的氨基酸序列。可以在程序控制的自动化多肽合成仪上进行上述化学合成,这类仪器包括但不限于 Protein Technologies 公司推出的 Tribute 双通道多肽合成仪、C S Bio 公司的 UV Online Monitor 系统、Aapptec 公司推出的 Focus XC 三通道合成仪等。

[0097] 本发明所描述的多肽可利用本领域已知的方法来回收。例如,多肽可通过常规方法,包括但不限于离心、过滤、超滤、萃取、层析、喷雾干燥、冷冻干燥、蒸发或沉淀等从培养基回收。

[0098] 本发明的多肽可通过本领域已知的多种方法来纯化,包括但不限于色谱法(如离子交换、亲和性、疏水性、色谱聚焦、分子排阻),电泳法(例如等电聚焦)、差异溶解度(如盐析沉淀)、SDS-PAGE 或萃取法以获得基本上纯的多肽。

[0099] 多肽的性能及用途

[0100] 本发明的多肽具有磷脂酶 C 活性,可应用于油脂精炼、磷脂改性、饲料改良剂、食品工业和医药工业等多个方面,包括但不限于用于烘烤、用于洗涤剂、改善水溶液或糖浆的过滤性等。

[0101] 本发明的多肽可以纯的酶制品的形式提供,也可以组合物的形式提供。组合物可以是粉末组合物,也可以是液体组合物,或糊状组合物。以组合物形式提供时,根据该含酶组合物的不同用途,该组合物可含有不同的辅料。可将本领域已知的辅料添加到本发明的组合物中,这类辅料包括但不限于山梨醇、山梨酸钾、苯甲酸甲酯、苯甲酸乙酯、蔗糖、甘露糖、海藻糖、淀粉、氯化钠、氯化钙等稳定剂或其他物质中的一种或多种。

[0102] 本发明方法中使用的本发明多肽的量可根据实际情况加以确定。

[0103] 酶法脱胶

[0104] 本发明还提供一种酶法脱胶方法,所述方法包括在 55 ~ 75°C 的温度下孵育磷脂酶 C,然后将该磷脂酶 C 加到毛油中,进行脱胶。

[0105] 如前所述,本发明的多肽可用于油脂制备中的酶法脱胶。因此,本发明提供一种脱胶方法,所述方法包括在脱胶过程中将本发明的多肽加入到毛油中,进行脱胶。

[0106] 可直接将本发明的多肽加到待脱胶的毛油中,然后按常规的脱胶条件进行脱胶。或者,优选的是,先在 55 ~ 75°C、优选 60 ~ 70°C 的温度下孵育本发明的多肽,然后再将其加到毛油中,进行脱胶。孵育时间通常为 15 ~ 45 分钟,优选为 20 ~ 40 分钟。

[0107] 通常,先将毛油加热至 50 ~ 70°C,优选 50 ~ 60°C,然后再加入孵育或未孵育的酶。

[0108] 酶通常以水溶液的形式加入。以毛油重量计,酶的添加量为 50 ~ 1000ppm,优选为 100 ~ 500ppm,更优选为 100 ~ 300ppm。

[0109] 脱胶条件一般包括:在 50 ~ 60°C 下搅拌 1 ~ 3 小时,然后升温至 80 ~ 90°C 保持 1 ~ 10 分钟。

[0110] 本发明另一方面还提供一种提高磷脂酶 C 脱胶性能的方法,所述方法包括,先在 55 ~ 75°C、优选 60 ~ 70°C 的温度下孵育磷脂酶 C,然后再将其加到毛油中,进行脱胶。如前文所述,所述磷脂酶 C 可以是本发明的多肽。孵育时间通常为 15 ~ 45 分钟,优选为 20 ~ 40 分钟。通常,先将毛油加热至 50 ~ 70°C,优选 50 ~ 60°C,然后再加入孵育或未孵育的酶。酶通常以水溶液的形式加入。以毛油重量计,酶的添加量为 50 ~ 1000ppm,优选为 100 ~ 500ppm,更优选为 100 ~ 300ppm。脱胶条件一般包括:在 50 ~ 60°C 下搅拌 1 ~ 3 小时,然后升温至 80 ~ 90°C 保持 1 ~ 10 分钟。

[0111] 适用于本发明方法脱胶的毛油包括但不限于大豆油、葵花籽油、花生油、菜籽油、米糠油、玉米油、橄榄油、棕榈油、棕榈仁油、棕榈软脂、卡诺拉油、蓖麻油、椰子油、芫荽油、

棉籽油、榛子油、大麻籽油、亚麻籽油、芒果仁油、白芒花油、牛蹄油、红花油、山茶花油、妥尔油、椿油和其他植物油。

[0112] 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 Sambrook 等,《分子克隆:实验室指南》(美国纽约州:冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),1989)所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件进行。对于试剂的用法和用量,除非另有说明,否则按照常规的用法和用量使用。

[0113] 实验材料

[0114] 1、实验菌株和质粒

[0115] 菌株:毕赤酵母 SMD1168(Invitrogen,货号 C175-00),大肠杆菌 DH5 α (TAKARA:Catalog#. D9057A)。

[0116] 质粒:pA0815 质粒(Invitrogen,货号 V180-20),pA0-PLC 质粒(本实验室构建),pmA0-PLC 质粒(本实验室构建)。

[0117] 2、培养基和溶液

[0118] LB 液体培养基:0.5%酵母提取物,1%胰化蛋白胨,1% NaCl, pH7.0。

[0119] LB 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入琼脂浓度 1.5%。

[0120] YPD 液体培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖。

[0121] YPD 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入琼脂浓度 2%。

[0122] MGYS 固体培养基:1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,1%甘油,1M 山梨醇,4 $\times 10^{-5}$ % D-生物素,2%琼脂。

[0123] BMM-大豆磷脂筛选培养基:1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,4 $\times 10^{-5}$ % D-生物素,0.5%甲醇(灭菌后加入),2%大豆磷脂乳化液,0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH6.6,2%琼脂,添加 10 μ M 的 ZnSO₄·7H₂O。

[0124] 2%大豆磷脂乳化液:2g 大豆磷脂,100ml H₂O,用高速匀浆机 8000rpm 匀浆 1min。

[0125] BMGY 液体培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,1%甘油,4 $\times 10^{-5}$ % D-生物素,0.1M 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液 pH6.0。

[0126] BMMY 液体培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,0.3% ZnSO₄·7H₂O,0.5%甲醇(灭菌后加入),4 $\times 10^{-5}$ % D-生物素(灭菌后加入),0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH6.6。

[0127] 大豆磷脂来源:购自北京美亚斯磷脂技术有限公司,FPLA 级

[0128] 酵母提取物和胰化蛋白胨购自 OXOID,蛋白胨和酵母氮源碱购自 BD,生物素购自上海生工,硫酸铵、柠檬酸、柠檬酸钠购自国药,为分析级。

[0129] 本发明中未特别说明的化学品均购自国药,为分析级。

[0130] 3、钼蓝法检测 PLC 活力所用试剂:

[0131] PLC 反应液:0.5%大豆磷脂,25mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 6.6,10 μ M ZnSO₄;

[0132] CIAP 反应液:50mM Tris-HCl pH 9.0,10mM MgCl₂,1U CIAP(购自宝生物工程(大连)有限公司);

[0133] 钼蓝显色反应液:100 μ l CIAP 反应物,0.2%抗坏血酸,0.1%钼酸铵(用 30% H₂SO₄ 配制);

- [0134] 改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒（购自上海生工生物工程有限公司）；
- [0135] 限制性内切酶 HindIII, EcoRI（购自纽英伦生物技术（北京）有限公司）；
- [0136] PCR 酶 : TaKaRa Taq, PrimeSTAR®HS DNA Polymerase（购自宝生物工程（大连）有限公司）；
- [0137] T4 DNA 连接酶（购自富酶泰斯有限公司）。
- [0138] 4、所用到的引物如下表所示：
- [0139]

引物名称	引物序列 5'-3'
AmPLC-1	CCGGACGTCGCTAGCAGATCTAACATCCAAAGACG (SEQ ID NO: 11)
AmPLC-2	TCATCGTTTCGCCTAGGATCCTTCGAATAATTAGTTG (SEQ ID NO: 12)
AmPLC-3	GATCCTAGGCGAAACGATGAGATTTTCCTTC (SEQ ID NO: 13)
AmPLC-4	CCGGAATTCTTACCTGTCACCGTAAG (SEQ ID NO: 14)
AOXH-2	GTTAAAATCAAAACGTTGTCAATTGGAACCAGTCG (SEQ ID NO: 15)
AOXH-3	CCAATTGACAACGTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAAC (SEQ ID NO: 16)
AOX1-5	CGACTGGTTCCAATTGACAACG (SEQ ID NO: 17)
AOX1-3	GGCAAATGGCATTCTGACATCCTC (SEQ ID NO: 18)
EPPLC-1	CCCAAGCTTGGTCAGCTGAGGAC (SEQ ID NO: 19)
EPPLC-2	CCGGAATTCTTACCTGTCACCGTA (SEQ ID NO: 20)
63D-2	CGAAGGTACTGTCATCGTAATAGGGGTTTTTCATAATC (SEQ ID NO: 21)

[0140]

63D-3	CTATTACGATGACAGTACCTTCGCTTCTCAC (SEQ ID NO: 22)
DSD-2	ACAGGTCGGTAAAGGATGCGGCATGCATAGGTTGGTTG (SEQ ID NO: 23)
DSD-3	CGCATCCTTTACGGACCTGTCCTATCCACAGGGTTTTTCAC (SEQ ID NO: 24)
106V-2	GCCTGCTTCACGTCTTTATTCTTGTATGACTCTCC (SEQ ID NO: 25)
106V-3	GAATAAAGACGTGAAGCAGGCCTTCTTTTATC (SEQ ID NO: 26)
56A-2	GGGTTTTTCGGCATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 27)
56A-3	GCTGCTGATGCCGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 28)
56C-2	GGGTTTTTCGCAATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 29)
56C-3	GCTGCTGATTGCGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 30)
56D-2	GGGTTTTTCGTCATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 31)
56D-3	GCTGCTGATGACGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 32)
56E-2	GGGTTTTTCCTCATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 33)
56E-3	GCTGCTGATGAGGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 34)
56F-2	GGGTTTTTCGAAATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 35)
56F-3	GCTGCTGATTTTCGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 36)
56G-2	GGGTTTTTCACCATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 37)
56G-3	GCTGCTGATGGTGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 38)
56H-2	GGTTTTTCATGATCAGCAGCGTAGATGCCAT (SEQ ID NO: 39)
56H-3	CGCTGCTGATCATGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 40)
56I-2	GGGTTTTTCGATATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 41)
56I-3	GCTGCTGATATCGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 42)
56K-2	AGGGGTTTTTCCTTATCAGCAGCGTAGATGCCAT (SEQ ID NO: 43)
56K-3	CGCTGCTGATAAGGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 44)
56L-2	GGGTTTTTCCAAATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 45)
56L-3	GCTGCTGATTTGGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 46)
56M-2	GGGTTTTTCATATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 47)
56M-3	GCTGCTGATATGGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 48)
56N-2	GGTTTTTCGTTATCAGCAGCGTAGATGCCAT (SEQ ID NO: 49)
56N-3	CGCTGCTGATAACGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 50)

[0141]

56P-2	GGGTTTTCTGGATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 51)
56P-3	GCTGCTGATCCAGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 52)
56Q-2	GGGTTTTCTTGATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 53)
56Q-3	GCTGCTGATCAAGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 54)
56R-2	AGGGGTTTTCTCTATCAGCAGCGTAGATGCCAT (SEQ ID NO: 55)
56R-3	CGCTGCTGATAGAGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 56)
56S-2	GGTTTTTCAGAATCAGCAGCGTAGATGCCAT (SEQ ID NO: 57)
56S-3	CGCTGCTGATTCTGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 58)
56T-2	GGGTTTTTCGGTATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 59)
56T-3	GCTGCTGATACCGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 60)
56V-2	GGGTTTTTCGACATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 61)
56V-3	GCTGCTGATGTCGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 62)
56W-2	GGGTTTTTCCAATCAGCAGCGTAGATGCCA (SEQ ID NO: 63)
56W-3	GCTGCTGATTGGGAAAACCCCTATTACGATGAC (SEQ ID NO: 64)
20H-2	TATCAATGGCATGGTTCACGATCCATAAGTGAC (SEQ ID NO: 65)
20H-3	GGATCGTGAACCATGCCATTGATATAATGTCTAGG (SEQ ID NO: 66)
83D-2	CTTAGCTTGCTTGTCGAATGGGATATATGTCTTTCCG (SEQ ID NO: 67)
83D-3	ATCCCATTCGACAAGCAAGCTAAGGAGACTG (SEQ ID NO: 68)

[0142] 实施例 1 :PLC-N63DN131SN134D 突变体文库构建及筛选

[0143] 根据蜡样芽孢杆菌的磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C 的成熟肽序列 (PDB ID: 1AH7) 以及毕赤酵母密码子偏好性, 设计得到 BC-PC-PLC 的 DNA 序列 (SEQ ID NO :8, 其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO :9 所示), 并在其前端融合 α 因子信号肽序列以及毕赤酵母的 Kozak 序列, 最终得到 α -BC-PC-PLC DNA 序列 (SEQ ID NO :10)。

[0144] 将 α -BC-PC-PLC DNA 序列提供给上海生工生物有限公司进行全基因合成, 得到含 α -BC-PC-PLC DNA 序列的克隆载体 pGEM-T-PLC。以此载体为模板, 使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 AmPLC-3/AmPLC-4, 通过 PCR 扩增得到 PLC 片段。

[0145] 以 pPIC-9k 表达载体为模板, 使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 AmPLC-1/AmPLC-2, 通过 PCR 扩增得到 AOX1 启动子片段 (PAOX1)。

[0146] 通过重叠 PCR, 利用引物对 AmPLC-1/AmPLC-4 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶, 得到 PAOX1+PLC 融合片段。利用 AatII 和 EcoRI 酶切位点将 PAOX1+PLC 融合片段克隆至 pA0815 载体中, 得到表达载体 pA0-PLC。

[0147] 将 pA0-PLC 用 SalI 线性化, 胶回收 8.5kb 片段, 利用 LiAC 法制备毕赤酵母 GS115

菌株的感受态细胞,再通过电转化将线性化的 pAO-PLC 片段转化 GS115 感受态细胞,转化物涂布于 MGYS 平板上,30℃培养 3 天,将平板上的单克隆挑于 5 μL 无菌水中,取 0.5 μL 点于 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。30℃培养 3 天后,阳性克隆可在菌体周围看到白色沉淀圈,筛选得到阳性菌株,命名为 PLC-WT。

[0148] 以 pAO-PLC 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 AmPLC-1/AOXH-2,通过 PCR 扩增得到约 900 bp 片段。以 pAO-PLC 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 AOXH-3/AmPLC-4,通过 PCR 扩增得到约 1.1kb 片段,以前两步 PCR 得到的约 900bp 片段和约 1.1kb 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 AmPLC-1/AmPLC-4 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到约 1.9kb 片段。

[0149] 将该约 1.9kb 片段通过 AatII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pAO-PLC 中,得到 pmAO-PLC。在 pmAO-PLC 中,pAO-PLC 中的一个 HindIII 酶切位点被进行了突变,从而只保留位于 BC-PC-PLC 序列 5' 端的一个 HindIII 酶切位点,从而能使用 HindIII 和 EcoRI 将 BC-PC-PLC 的突变片段克隆至 pmAO-PLC。

[0150] 以 pAO-PLC 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/63D-2,通过 PCR 扩增得到约 207bp 片段。以 pAO-PLC 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 63D-3/EPPLC-2,通过 PCR 扩增得到约 576bp 片段。再以前两步 PCR 得到的 207bp 片段和 576bp 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到约 755bp 片段。将该 755bp 片段通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmAO-PLC 中,得到 pmAO-PLC-N63D 载体。

[0151] 以 pmAO-PLC-N63D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/DSD-2 序列见引物表,通过 PCR 扩增得到约 414bp 片段。以 pAO-PLC 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 DSD-3/EPPLC-2 序列见引物表,通过 PCR 扩增得到约 361bp 片段。再以前两步 PCR 得到的 414bp 片段和 361bp 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到 755bp 片段。将该 755bp 片段通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmAO-PLC 中,得到 pmAO-PLC-N63DN131SN134D 载体。

[0152] 以 pmAO-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 TaKaRa Taq 酶和引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 进行易错 PCR(在 PCR 时额外添加 0.3mM 的 MnCl₂),得到大小为约 755bp 的突变扩增子片段集合。通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点将得到的片段克隆至 pmAO-PLC,并将得到的载体转化入大肠杆菌 DH5 α 菌株,一共得到 1×10⁴个 BC-PC-PLC 突变体。

[0153] 将每 1×10³个 PLC-N63DN131SN134D 突变体用 2ml 的无菌水洗至 8ml 的 LB 液体培养基中(含 100 μg/ml 氨苄青霉素),37℃培养 4h。抽提质粒,用 SalI 进行线性化,回收约 8.5kb 的片段。取 500ng 载体(使用尽量少的 DNA,保证大多数阳性转化子含单拷贝 PLC 基因),用电转化法将载体转化至毕赤酵母 GS115 菌株的感受态细胞中。将转化物接种于 MGYS 平板上,30℃培养 3 天,得到 PLC-N63DN131SN134D 的毕赤酵母突变体文库。挑取平板上的单克隆,至 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。选取白色沉淀圈大的克隆。该克隆编号 31#。

[0154] 实施例 2:PLC-N63DN131SN134D 突变体序列分析

[0155] 将 31# 菌株接种于 3ml YPD 液体培养基中,30℃培养过夜,抽提基因组 DNA。以 31#

菌株的基因组 DNA 为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 AOX1-5/AOX1-3 进行 PCR 扩增,得到 31# 菌株中 PLC 的 DNA 序列。将得到的序列送往上海生工生物工程公司,用引物对 AOX1-5/AOX1-3 进行测序。31# 的 PLC 的 DNA 测序结果有 2 个碱基发生了突变,第 56 位酪氨酸突变为组氨酸 (TAT → CAT);第 106 位蛋氨酸突变为缬氨酸 (ATG → GTG)。序列如 SEQ ID NO :3 所示。

[0156] 实施例 3 :PLC-N63DN131SN134D 突变体单点突变体毕赤酵母表达菌株构建及筛选

[0157] 1. PLC-N63DN131SN134D-Y56H 的构建及筛选

[0158] 以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/56H-2,通过 PCR 扩增得到约 180bp 片段。以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 56H-3/EPPLC-2,通过 PCR 扩增得到约 570bp 片段。再以前两步 PCR 得到的约 180bp 片段和约 570bp 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到约 755bp 片段。

[0159] 将该约 755bp 片段通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmA0-PLC 中,得到 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-Y56H 载体。将 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-Y56H 用 SalI 线性化,凝胶回收 8.5kb 片段。利用 LiAC 法制备毕赤酵母 SMD1168 菌株的感受态细胞,再通过电转化将 500ng 线性化的 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-Y56H 转化至 SMD1168 感受态细胞。将转化物接种于 MGYS 平板上,30℃ 培养 3 天。挑取平板上的单克隆,至 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。选取白色沉淀圈大的克隆。

[0160] 2. PLC-N63DN131SN134D-M106V 的构建及筛选

[0161] 以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/106V-2,通过 PCR 扩增得到约 320bp 片段。以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 106V-3/EPPLC-2,通过 PCR 扩增得到约 440bp 片段。再以前两步 PCR 得到的约 320bp 片段和约 440bp 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到约 755bp 片段。

[0162] 将该约 755bp 片段通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmA0-PLC 中,得到 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-M106V 载体。将 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-M106V 用 SalI 线性化,凝胶回收 8.5kb 片段。利用 LiAC 法制备毕赤酵母 SMD1168 菌株的感受态细胞,再通过电转化将 500ng 线性化的 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-M106V 转化至 SMD1168 感受态细胞。将转化物接种于 MGYS 平板上,30℃ 培养 3 天。挑取平板上的单克隆,至 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。选取白色沉淀圈大的克隆。

[0163] 3. PLC-N63DN131SN134D-Y56HM106V 的构建及筛选

[0164] 以 31# 菌株基因组 DNA 为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/EPPLC-2,通过 PCR 扩增得到约 755bp 片段。将该约 755bp 片段通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmA0-PLC 中,得到 pmA0-N63DN131SN134D-Y56HM106V 载体。将 pmA0-7-7PLC-106M 用 SalI 线性化,凝胶回收 8.5kb 片段。利用 LiAC 法制备毕赤酵母 SMD1168 菌株的感受态细胞,再通过电转化将 500ng 线性化的

pmAO-N63DN131SN134D-Y56HM106V 转化至 SMD1168 感受态细胞。将转化物接种于 MGYS 平板上,30℃培养 3 天。挑取平板上的单克隆,至 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。选取白色沉淀圈大的克隆。

[0165] 如图 1 所示,比较 PLC-N63DN131SN134D-Y56H, PLC-N63DN131SN134D-M106V 和 PLC-N63DN131SN134D-Y56HM106V 三种突变体在 BMM- 大豆磷脂筛选平板上白色沉淀圈的大小可以发现,PLC-N63DN131SN134D-Y56H 和 PLC-N63DN131SN134D-Y56HM106V 的白色沉淀圈大小相当,而 PLC-N63DN131SN134D-M106V 的白色沉淀圈大小明显较 PLC-N63DN131SN134D-Y56H 和 PLC-N63DN131SN134D-Y56HM106V 小,说明 Y56H 突变使得突变体的酶活进一步提高,Y56H 为关键的突变位点。

[0166] 实施例 4 :PLC-N63DN131SN134D 第 56 位氨基酸饱和突变

[0167] 将 PLC-N63DN131SN134D 第 56 位酪氨酸分别突变为丙氨酸 (A),半胱氨酸 (C),天冬氨酸 (D),谷氨酸 (E),苯丙氨酸 (F),甘氨酸 (G),组氨酸 (H),异亮氨酸 (I),赖氨酸 (K),亮氨酸 (L),甲硫氨酸 (M),天冬酰胺 (N),脯氨酸 (P),谷氨酰胺 (Q),精氨酸 (R),苏氨酸 (T),缬氨酸 (V) 和色氨酸 (W)。

[0168] 简单而言,以 pmAO-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/56X-2(X 代表上述 18 种氨基酸的单字母简写),通过 PCR 扩增得到约 180bp 片段。以 pmAO-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 56X-3/EPPLC-2,通过 PCR 扩增得到约 570bp 片段。再以前两步 PCR 得到的约 180bp 片段和约 570bp 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到约 755bp 片段。

[0169] 将得到的 18 个约 755bp 片段分别通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmAO-PLC 中,得到 18 种 pmAO-7-7PLC-Y56X 载体,将 18 种 pmAO-PLC-N63DN131SN134D-Y56X 载体用 SalI 线性化,凝胶回收 8.5kb 片段。利用 LiAC 法制备毕赤酵母 SMD1168 菌株的感受态细胞,再通过电转化将 500ng 线性化的 18 种 pmAO-PLC-N63DN131SN134D-Y56X 分别转化 SMD1168 感受态细胞。将转化物接种于 MGYS 平板上,30℃培养 3 天。挑取平板上的单克隆,挑取平板上的单克隆,至 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。从每种突变体的筛选平板上选取白色沉淀圈大的克隆。

[0170] 取 PLC-WT, PLC-N63DN131SN134D 及 PLC-N63DN131SN134D 的 56 位饱和突变菌株,先在液体 YPD 中活化,然后接种于 BMGY 培养基中,在 30℃下,220rpm 振荡培养过夜。将培养物转至 BMMY 培养基中,初始 OD600 为 6。

[0171] 首先,用 2% 甲醇进行诱导,在 24h 和 32h 后各补加 1% 甲醇,48h 和 56h 后各补加 1% 甲醇,72h 取样。将获得的样品用截留分子量为 10kDa 的超滤管进行超滤脱盐浓缩 20 倍。将处理后的样品加入缓冲液中 (20mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH6.6),10uM ZnSO₄)。

[0172] 取 1 μl 发酵液至 190 μl PLC 反应液 (含 0.5% 大豆磷脂,25mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 6.6,10uM ZnSO₄) 中,45℃振荡孵育 30min。孵育后,加入 100 μl 氯仿振荡混匀,12000rpm 离心 2min。取 80 μl 上清,加入 20 μl CIAP 反应液 (含 50mM Tris-HCl pH 9.0,10mM MgCl₂,1U CIAP),37℃振荡孵育 1h。

[0173] 孵育后,取 100 μl 反应物,加入 900 μl 钼蓝显色液 (含 0.2% 抗坏血酸,0.1% 钼酸铵),37℃振荡孵育 10min。在 700nm 波长下测定样品的吸光度,计算得到各个发酵

液样品的 PLC 活力。用 Bradford 试剂测定 PLC-N63DN131SN134D 及 PLC-N63DN131SN134D 的 56 位饱和突变菌株的摇瓶发酵液的蛋白浓度,从而得出比酶活。如图 2 所示, PLC-N63DN131SN134D-Y56H 和 PLC-N63DN131SN134D-Y56W 较 PLC-N63DN131SN134D 的比酶活有 7 倍和 5 倍的提高。

[0174] 实施例 5 :PLC-N63DN131SN134D-Y56H 脱胶小试

[0175] 取大豆毛油 100g,加热至 55℃,分别加入 200ppm 的 PLC-WT,PLC-N63DN131SN134D 样品和 PLC-N63DN131SN134D-Y56H,使得体系中的水相为 3%,用高速剪切机高速剪切 (10000r/min) 1min,在 55℃ 下搅拌 (750r/min) 反应 2h,升温至 85℃,维持 5min,样品 12000rpm 离心 10min,取约 10g 上层油样,用 HPLC 检测其 DAG 含量 (按 AOCS Cd 11d-96 (09) 的方法测定)。PLC-N63DN131SN134D 样品和 PLC-N63DN131SN134D-Y56H 相对于毛油的 DAG 增量如图 3 所示,PLC-N63DN131SN134D-Y56H 的 DAG 增量为 PLC-N63DN131SN134D 的 1.5 倍。

[0176] 实施例 6 :突变序列及其活性

[0177] 以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/20H-2,通过 PCR 扩增得到约 78bp 片段。以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 20H-3/EPPLC-2,通过 PCR 扩增得到约 707bp 片段。再以前两步 PCR 得到的约 78bp 片段和约 707bp 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到约 755bp 片段。

[0178] 将该约 755bp 片段通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmA0-PLC 中,得到 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-R20H 载体。将 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-R20H 用 SalI 线性化,凝胶回收 8.5kb 片段。利用 LiAC 法制备毕赤酵母 SMD1168 菌株的感受态细胞,再通过电转化将 500ng 线性化的 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-R20H 转化至 SMD1168 感受态细胞。将转化物接种于 MGYS 平板上,30℃ 培养 3 天。挑取平板上的单克隆,至 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。选取白色沉淀圈大的克隆,为 PLC-N63DN131SN134D-R20H

[0179] 以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 EPPLC-1/83D-2,通过 PCR 扩增得到约 266bp 片段。以 pmA0-PLC-N63DN131SN134D 载体为模板,使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 83D-3/EPPLC-2,通过 PCR 扩增得到约 520bp 片段。再以前两步 PCR 得到的约 266bp 片段和约 520bp 片段混合作为第三步 PCR 的模板,使用引物对 EPPLC-1/EPPLC-2 和 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增得到约 755bp 片段。

[0180] 将该约 755bp 片段通过 HindIII 和 EcoRI 酶切位点克隆至 pmA0-PLC 中,得到 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-A83D 载体。将 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-A83D 用 SalI 线性化,凝胶回收 8.5kb 片段。利用 LiAC 法制备毕赤酵母 SMD1168 菌株的感受态细胞,再通过电转化将 500ng 线性化的 pmA0-PLC-N63DN131SN134D-A83D 转化至 SMD1168 感受态细胞。将转化物接种于 MGYS 平板上,30℃ 培养 3 天。挑取平板上的单克隆,至 BMM- 大豆磷脂筛选平板上。选取白色沉淀圈大的克隆,为 PLC-N63DN131SN134D-A83D。

[0181] 取 PLC-N63DN131SN134D、PLC-N63DN131SN134D-R20H 和 PLC-N63DN131SN134D-A83D 菌株,先在液体 YPD 中活化,然后接种于 BMGY 培养基中,在 30℃

下,220rpm 振荡培养过夜。将培养物转至 BMMY 培养基中,初始 OD600 为 6。

[0182] 首先,用 2% 甲醇进行诱导,在 24h 和 32h 后各补加 1% 甲醇,48h 和 56h 后各补加 1% 甲醇,72h 取样。将获得的样品用截留分子量为 10kDa 的超滤管进行超滤脱盐浓缩 20 倍。将处理后的样品加入缓冲液中(20mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH6.6),10uM ZnSO₄)。

[0183] 取 1 μl 发酵液至 190 μl PLC 反应液(含 0.5% 大豆磷脂,25mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 6.6,10uM ZnSO₄)中,45℃ 振荡孵育 30min。孵育后,加入 100 μl 氯仿振荡混匀,12000rpm 离心 2min。取 80 μl 上清,加入 20 μl CIAP 反应液(含 50mM Tris-HCl pH 9.0,10mM MgCl₂,1U CIAP),37℃ 振荡孵育 1h。

[0184] 孵育后,取 100 μl 反应物,加入 900 μl 钼蓝显色液(含 0.2% 抗坏血酸,0.1% 钼酸铵),37℃ 振荡孵育 10min。在 700nm 波长下测定样品的吸光度,计算得到各个发酵液样品的 PLC 活力。用 Bradford 试剂测定 PLC-N63DN131SN134D、PLC-N63DN131SN134D-R20H 和 PLC-N63DN131SN134D-A83D 菌株的摇瓶发酵液的蛋白浓度,从而得出比酶活,发现三者的比酶活没有明显差别。

[0185] 实施例 7

[0186] 取大豆毛油 100g,加热至 55℃;将磷脂酶 C(序列编号 SEQ ID NO:7 中 Xaa 为 His 的磷脂酶 C)样品 100 倍稀释;分别加入 1ml 纯水和 2ml 稀释后的磷脂酶 C 样品(加水量 3%、酶添加量 200ppm);高速剪切(10000r/min)1 分钟;在 55℃ 条件下搅拌(750r/min)反应 2 小时;升温至 85℃ 保持 5 分钟;12000rpm 离心 10 分钟,取约 10g 上层油样,检测其 DAG 含量(检测方法:AACS Official Method Cd 11d-96)。经过计算,脱胶后大豆油中甘油二酯的增加量 ΔDAG 为 1.02%。

[0187] 实施例 8

[0188] 将磷脂酶 C(序列编号 SEQ ID NO:7 中 Xaa 为 His 的磷脂酶 C)样品 10 倍稀释,置于 50℃ 水浴孵育 0.5 小时。

[0189] 取大豆毛油 100g,加热至 55℃;将孵育后的磷脂酶 C 样品 10 倍稀释;分别加入 1ml 纯水和 2ml 稀释后的磷脂酶 C 样品(加水量 3%、酶添加量 200ppm);高速剪切(10000r/min)1 分钟;在 55℃ 条件下搅拌(750r/min)反应 2 小时;升温至 85℃ 保持 5 分钟;12000rpm 离心 10 分钟,取约 10g 上层油样,检测其 DAG 含量(检测方法:AACS Official Method Cd 11d-96)。经过计算,脱胶后大豆油中甘油二酯的增加量 ΔDAG 为 1.02%。

[0190] 实施例 9

[0191] 将磷脂酶 C(序列编号 SEQ ID NO:7 中 Xaa 为 His 的磷脂酶 C)样品 10 倍稀释,置于 60℃ 水浴孵育 0.5 小时。

[0192] 取大豆毛油 100g,加热至 55℃;将孵育后的磷脂酶 C 样品 10 倍稀释;分别加入 1ml 纯水和 2ml 稀释后的磷脂酶 C 样品(加水量 3%、酶添加量 200ppm);高速剪切(10000r/min)1 分钟;在 55℃ 条件下搅拌(750r/min)反应 2 小时;升温至 85℃ 保持 5 分钟;12000rpm 离心 10 分钟,取约 10g 上层油样,检测其 DAG 含量(检测方法:AACS Official Method Cd 11d-96)。经过计算,脱胶后大豆油中甘油二酯的增加量 ΔDAG 为 1.06%。

[0193] 实施例 10

[0194] 将磷脂酶 C(序列编号 SEQ ID NO:7 中 Xaa 为 His 的磷脂酶 C)样品 10 倍稀释,置于 70℃ 水浴孵育 0.5 小时。

[0195] 取大豆毛油 100g,加热至 55℃;将孵育后的磷脂酶 C 样品 10 倍稀释;分别加入 1ml 纯水和 2ml 稀释后的磷脂酶 C 样品(加水量 3%、酶添加量 200ppm);高速剪切(10000r/min)1 分钟;在 55℃条件下搅拌(750r/min)反应 2 小时;升温至 85℃保持 5 分钟;12000rpm 离心 10 分钟,取约 10g 上层油样,检测其 DAG 含量(检测方法:AACS Official Method Cd 11d-96)。经过计算,脱胶后大豆油中甘油二酯的增加量 Δ DAG 为 1.11%。

[0196] 实施例 11

[0197] 将磷脂酶 C(序列编号 SEQ ID NO:7 中 Xaa 为 His 的磷脂酶 C)样品 10 倍稀释,置于 80℃水浴孵育 0.5 小时。

[0198] 取大豆毛油 100g,加热至 55℃;将孵育后的磷脂酶 C 样品 10 倍稀释;分别加入 1ml 纯水和 2ml 稀释后的磷脂酶 C 样品(加水量 3%、酶添加量 200ppm);高速剪切(10000r/min)1 分钟;在 55℃条件下搅拌(750r/min)反应 2 小时;升温至 85℃保持 5 分钟;12000rpm 离心 10 分钟,取约 10g 上层油样,检测其 DAG 含量(检测方法:AACS Official Method Cd 11d-96)。经过计算,脱胶后大豆油中甘油二酯的增加量 Δ DAG 为 0.73%。

[0001]

序列表

<110> 丰益(上海)生物技术研发中心有限公司

<120> 高效的不依赖锌离子的磷脂酶 C 突变体

<130> 155498

<160> 64

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 738

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

tggtcagctg aggacaagca taaggaaggt gtgaatagtc acctatggat cgtgaaccgt      60
gccattgata taatgtctag gaatacaact ctggttaagc aagatagagt tgetcaattg      120
aatgaatggc gtacagagct agagaatggc atctacgctg ctgattatga aaacccctat      180
tacgatgaca gtaccttgcg ttctcacttt tacgatecag acaacggaaa gacatatata      240
ccattegeca agcaagctaa ggagactgga gctaagtact tcaagttggc tggagagtca      300
tacaagaata aagacatgaa gcaggecttc ttttatcttg ggttgctcatt gcattatttg      360
ggcgatgca accaacctat gcctgcccga tecttiacgg acctgtccta tccacagggt      420
tttcactcca agtacgagaa ctttgtegat actattaaag acaactacaa agttaccgat      480
gggaacggat attggaattg gaaaggcacc aacctgaag aatggattca cgggtgcagca      540
gtagtigcaa aacaggacta ctctggaatt gtcaatgaca ataccaaaga ttggttigtg      600
aaagccgcag tctcccagga atatgcagat aatggagag ctgaagttae acctatgact      660
ggtaaacgac taatggatgc ccaaagagtt actgctggtt acattcaatt atggttegac      720
acttaecggtg acaggtaa                                                    738

```

<210> 2

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

```

Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Lys Glu Gly Val Asn Ser His Leu Trp
1           5           10           15
Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg Asn Thr Thr Leu Val
                20           25           30
Lys Gln Asp Arg Val Ala Gln Leu Asn Glu Trp Arg Thr Glu Leu Glu

```

[0002]

	35		40		45	
Asn Gly Ile Tyr Ala Ala Asp Tyr Glu Asn Pro Tyr Tyr Asp Asp Ser						
50		55		60		
Thr Phe Ala Ser His Phe Tyr Asp Pro Asp Asn Gly Lys Thr Tyr Ile						
65		70		75		80
Pro Phe Ala Lys Gln Ala Lys Glu Thr Gly Ala Lys Tyr Phe Lys Leu						
	85		90		95	
Ala Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Lys Asp Met Lys Gln Ala Phe Phe Tyr						
100		105		110		
Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Gly Asp Val Asn Gln Pro Met His						
115		120		125		
Ala Ala Ser Phe Thr Asp Leu Ser Tyr Pro Gln Gly Phe His Ser Lys						
130		135		140		
Tyr Glu Asn Phe Val Asp Thr Ile Lys Asp Asn Tyr Lys Val Thr Asp						
145		150		155		160
Gly Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Lys Gly Thr Asn Pro Glu Glu Trp Ile						
	165		170		175	
His Gly Ala Ala Val Val Ala Lys Gln Asp Tyr Ser Gly Ile Val Asn						
180		185		190		
Asp Asn Thr Lys Asp Trp Phe Val Lys Ala Ala Val Ser Gln Glu Tyr						
195		200		205		
Ala Asp Lys Trp Arg Ala Glu Val Thr Pro Met Thr Gly Lys Arg Leu						
210		215		220		
Met Asp Ala Gln Arg Val Thr Ala Gly Tyr Ile Gln Leu Trp Phe Asp						
225		230		235		240
Thr Tyr Gly Asp Arg						
	245					

- <210> 3
- <211> 738
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<400> 3

tggtcagctg aggacaagca taaggaaggt gtgaatagtc acttatggat cgtgaaccgt	60
gccattgata taatgictag gaatacaact ctggttaage aagatagagt tgetcaattg	120
aatgaatggc gtacagaget agagaatggc atctacgctg ctgateatga aaaccctat	180
taccgatgaca gtaccffecg ttctcacttt tacgatccag acaacggaaa gacatatatc	240
ccattcgcea agcaagctaa ggagactgga gctaaaglac tcaagtlgge tggagaglea	300
tacaagaata aagacatgaa gcaggccttc ttttatcttg ggttgteatt gcattattg	360
ggcgatgtea accaaectat gcatgcegea tectttaagg acctgtecta tccacagggt	420
tttcaectca agtacgagaa ctttgtcgat actattaag acaactacaa agttaaccgat	480
gggaacggat attggaattg gaaaggcacc aaccctgaag aatggattca cgggtcgaca	540

[0003]

```

gtagttgcaa aacaggacta ctctggaatt gtcaatgaca ataccaaaga tiggtttgg 600
aaageccgag tctcccagga atatgcagat aaatggagag ctgaagttac acctatgact 660
ggtaaacgac taatggatgc ccaaagagtt actgctggtt acattcaatt atggttcgac 720
acttacggig acagglaa 738

```

<210> 4

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

```

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

```

[0004]

- <210> 5
- <211> 738
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<400> 5

```

tggtcagctg aggacaagca taaggaaggt gtgaatagtc acttatggat cgtgaaccgt      60
gccattgata taatgtettag gaatacaact ctggttaage aagatagagt tgctcaattg      120
aatgaatggc gtacagagct agagaatggc atctaegctg ctgattggga aaaccectat      180
tacgatgaca gtacccttgc ttctcacttt tacgatecag acaacggaaa gacatatatc      240
ccattcgcca agcaagctaa ggagactgga gctaagtact tcaagttggc tggagagtea      300
tacaagaata aagacatgaa gcaggccttc ttttatcttg ggttgteatt gcattatttg      360
ggcgatgtea accaacetat gcatgcgcga tcttttaagg acctgtccta tccacagggt      420
tttcacteca agtacgagaa ctttgtegat actattaaag acaactacaa agttaccgat      480
gggaacggat attggaattg gaaaggcacc aacctgaag aatggattca cgggtgcagca      540
gtagttgcaa aacaggacta ctctggaatt gtcaatgaca ataccaaaga ttggtttgtg      600
aaagccgcag tetcccagga atatgcagat aatggagag ctgaagttac acctatgaet      660
ggtaaacgac taatggatgc ccaaagagtt actgetggtt acattcaatt atggttcgac      720
acttacggtg acaggtaa
                                                                                   738
    
```

- <210> 6
- <211> 245
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<400> 6

```

Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Lys Glu Gly Val Asn Ser His Leu Trp
1           5           10           15
Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg Asn Thr Thr Leu Val
           20           25           30
Lys Gln Asp Arg Val Ala Gln Leu Asn Glu Trp Arg Thr Glu Leu Glu
           35           40           45
Asn Gly Ile Tyr Ala Ala Asp Trp Glu Asn Pro Tyr Tyr Asp Asp Ser
           50           55           60
Thr Phe Ala Ser His Phe Tyr Asp Pro Asp Asn Gly Lys Thr Tyr Ile
65           70           75           80
Pro Phe Ala Lys Gln Ala Lys Glu Thr Gly Ala Lys Tyr Phe Lys Leu
           85           90           95
Ala Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Lys Asp Met Lys Gln Ala Phe Phe Tyr
           100          105          110
Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Gly Asp Val Asn Gln Pro Met His
    
```

[0005]

```

          115              120              125
Ala Ala Ser Phe Thr Asp Leu Ser Tyr Pro Gln Gly Phe His Ser Lys
    130              135              140
Tyr Glu Asn Phe Val Asp Thr Ile Lys Asp Asn Tyr Lys Val Thr Asp
145              150              155              160
Gly Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Lys Gly Thr Asn Pro Glu Glu Trp Ile
          165              170              175
His Gly Ala Ala Val Val Ala Lys Gln Asp Tyr Ser Gly Ile Val Asn
          180              185              190
Asp Asn Thr Lys Asp Trp Phe Val Lys Ala Ala Val Ser Gln Glu Tyr
          195              200              205
Ala Asp Lys Trp Arg Ala Glu Val Thr Pro Met Thr Gly Lys Arg Leu
          210              215              220
Met Asp Ala Gln Arg Val Thr Ala Gly Tyr Ile Gln Leu Trp Phe Asp
225              230              235              240
Thr Tyr Gly Asp Arg
          245

```

<210> 7

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (56).. (56)

<223> Xaa 为 Tyr、Ala、Lys、Asn、Gln、His、Phe、Arg、Ser、Thr 或 Trp

<400> 7

```

Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Lys Glu Gly Val Asn Ser His Leu Trp
1          5          10          15
Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg Asn Thr Thr Leu Val
          20          25          30
Lys Gln Asp Arg Val Ala Gln Leu Asn Glu Trp Arg Thr Glu Leu Glu
          35          40          45
Asn Gly Ile Tyr Ala Ala Asp Xaa Glu Asn Pro Tyr Tyr Asp Asp Ser
          50          55          60
Thr Phe Ala Ser His Phe Tyr Asp Pro Asp Asn Gly Lys Thr Tyr Ile
65          70          75          80
Pro Phe Ala Lys Gln Ala Lys Glu Thr Gly Ala Lys Tyr Phe Lys Leu
          85          90          95
Ala Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Lys Asp Met Lys Gln Ala Phe Phe Tyr

```

[0006]

	100		105		110										
Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	His	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Asn	Gln	Pro	Met	His
	115		120		125										
Ala	Ala	Ser	Phe	Thr	Asp	Leu	Ser	Tyr	Pro	Gln	Gly	Phe	His	Ser	Lys
	130		135		140										
Tyr	Glu	Asn	Phe	Val	Asp	Thr	Ile	Lys	Asp	Asn	Tyr	Lys	Val	Thr	Asp
145			150		155										160
Gly	Asn	Gly	Tyr	Trp	Asn	Trp	Lys	Gly	Thr	Asn	Pro	Glu	Glu	Trp	Ile
			165		170										175
His	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Lys	Gln	Asp	Tyr	Ser	Gly	Ile	Val	Asn
			180		185										190
Asp	Asn	Thr	Lys	Asp	Trp	Phe	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Ser	Gln	Glu	Tyr
			195		200										205
Ala	Asp	Lys	Trp	Arg	Ala	Glu	Val	Thr	Pro	Met	Thr	Gly	Lys	Arg	Leu
			210		215										220
Met	Asp	Ala	Gln	Arg	Val	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Gln	Leu	Trp	Phe	Asp
225			230		235										240
Thr	Tyr	Gly	Asp	Arg											
			245												

- <210> 8
- <211> 738
- <212> DNA
- <213> 蜡样芽孢杆菌 (Bacillus cereus)

<400> 8

```

tggtcagctg aggacaagca taaggaaggc gtgaatagtc acttatggat cgtgaaccgt      60
gccattgata taatgictag gaatacaact ctggttaagc aagatagagt tgetcaattg      120
aatgaatggc gtacagaget agagaatggc atctacgctg ctgattatga aaacceetat      180
tacgataaca gtaccttcgc ttctcacttt tacgatccag acaacggaaa gacatatatc      240
ccattcgcca agcaagctaa ggagactgga gctaagtaact tcaagttgge tggagagtca      300
tacaagaata aagacatgaa gcaggccttc ttttatcttg ggfttgcatt gcattatttg      360
ggcgaiglea accaacctat gcatgcegea aactttacga acctgtecta tccacagggt      420
tttcactcca agtacagaaa ctttgcgat actattaaag acaactaaa agttaccgat      480
gggaacggat attggaattg gaaaggcacc aacctgaag aatggattca cgggtcagca      540
gtagttgcaa aacaggacta ctctggaatt gtcaatgaca ataccaaaga ttggtttggt      600
aaagccgcag tctcccagga atatgcagat aatggagag ctgaagttac acctatgact      660
ggtaaacgac taatggatgc ccaaagattt actgctggtt acattcaatt atggttcgac      720
acttacggtg acagglaa

```

738

- <210> 9
- <211> 245

[0007]

<212> PRT
 <213> 蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)

 <400> 9
 Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Lys Glu Gly Val Asn Ser His Leu Trp
 1 5 10 15
 Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg Asn Thr Thr Leu Val
 20 25 30
 Lys Gln Asp Arg Val Ala Gln Leu Asn Glu Trp Arg Thr Glu Leu Glu
 35 40 45
 Asn Gly Ile Tyr Ala Ala Asp Tyr Glu Asn Pro Tyr Tyr Asp Asn Ser
 50 55 60
 Thr Phe Ala Ser His Phe Tyr Asp Pro Asp Asn Gly Lys Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Pro Phe Ala Lys Gln Ala Lys Glu Thr Gly Ala Lys Tyr Phe Lys Leu
 85 90 95
 Ala Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Lys Asp Met Lys Gln Ala Phe Phe Tyr
 100 105 110
 Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Gly Asp Val Asn Gln Pro Met His
 115 120 125
 Ala Ala Asn Phe Thr Asn Leu Ser Tyr Pro Gln Gly Phe His Ser Lys
 130 135 140
 Tyr Glu Asn Phe Val Asp Thr Ile Lys Asp Asn Tyr Lys Val Thr Asp
 145 150 155 160
 Gly Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Lys Gly Thr Asn Pro Glu Glu Trp Ile
 165 170 175
 His Gly Ala Ala Val Val Ala Lys Gln Asp Tyr Ser Gly Ile Val Asn
 180 185 190
 Asp Asn Thr Lys Asp Trp Phe Val Lys Ala Ala Val Ser Gln Glu Tyr
 195 200 205
 Ala Asp Lys Trp Arg Ala Glu Val Thr Pro Met Thr Gly Lys Arg Leu
 210 215 220
 Met Asp Ala Gln Arg Val Thr Ala Gly Tyr Ile Gln Leu Trp Phe Asp
 225 230 235 240
 Thr Tyr Gly Asp Arg
 245

<210> 10
 <211> 1012
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 10

[0008]

```

egaaacgatg agatttccctt caatTTTTac tgcagTTTTa ttgcagcat cctccgcatt    60
agctgctcca gtcaacaacta caacagaaga tgaacggca caaattccgg ctgaagctgt    120
catcggttac tcagatttag aaggggattt cgatgttgct gttttgccat ttccaacag    180
cacaaalaac gggllallgt ttataaatac tactallgcc agcattgcig ctlaagaaga    240
aggggtatct cttgagaaaa gagaggctga agcttggtea getgaggaca agcataagga    300
aggtgtgaat agtcaettat ggatcgtgaa ccgtgccatt gatataatgt ctaggaatac    360
aactctggtt aagcaagata gagttgctca attgaatgaa tggegtacag agctagagaa    420
tggcatctac gctgctgatt atgaaaacce ctattacgat aacagtacct tcgcttctca    480
cttttacgat ccagacaacg gaaagacata fatcccattc gccaaagcaag ctaaggagac    540
tggagctaaag tacttcaagt tggctggaga gtcatacaag aataaagaca lgaagcagge    600
cttcttttat cttgggttgt cattgcatta ttggggcgat gtcaaccaac ctatgcattc    660
cgcaaaacttt acgaacctgt cctatccaca gggttttccac tccaagtacg agaactttgt    720
cgatactatt aaagacaact acaaagttac cgatgggaac ggatattgga attggaaagg    780
caccaacctt gaagaatgga ttcacggtgc agcagtagtt gcaaaacagg actactctgg    840
aattgtcaat gacaatacca aagattggtt fgtgaaagcc gcagtctccc aggaatatgc    900
agataaatgg agagctgaag ttacacctat gaciggtaaa cgactaatgg atgcccagg    960
agttactgct ggttacattc aattatggtt cgacacttac ggtgacaggt aa    1012

```

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 11

ccggacgtcg ctagcagatc taacatccaa agacg

35

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

tcacgtttc gccatggatc cttcgaataa ttagtgg

37

<210> 13

[0009]

- <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 13
 gatcctaggc gaaacgatga gatttcccttc 30
- <210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 14
 ccggaattct tacctgtcac cgtaag 26
- <210> 15
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 15
 gttaaaatca aaacgttggc aattggaacc agtcg 35
- <210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 16

[0010]

ccaattgaca aegttgattt taacgacttt taacgacaaac 40

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 17
 egactgggtc caattgacaa cg 22

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 18
 ggcaaatgac attctgacat cctc 24

<210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 19
 cccaagcttg gtcagctgag gac 23

<210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0011]

<220>		
<223>	引物	
<400>	20	
	ccggaattet tacctgteac cgta	24
<210>	21	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	21	
	cgaaggtaact gtcacgtaa taggggttt cataatc	37
<210>	22	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	22	
	ctattacgat gacagtacct tcgcttctca c	31
<210>	23	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	23	
	acaggtccgt aaaggatgcg gcatgcatag gttggttg	38
<210>	24	

[0012]

- <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 24
 cgcafccttt acggacctgt cctatccaca gggttttcac 40

 <210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 25
 gcctgcttca cgtctttatf cttgtatgac tctcc 35

 <210> 26
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 26
 gaataaagac gtgaagcagg ccttctttta tc 32

 <210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 27

[0013]

gggttttcgg caccagecgc gtagatgcca 30

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 28

gctgctgatg cegaaaaccc ctattacgat gac 33

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 29

gggttttcgc aaccagecgc gtagatgcca 30

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 30

gctgctgatt gegaaaaccc ctattacgat gac 33

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 引物

<400> 31

gggttttcgt catcagcage gtagatgcca

30

<210> 32

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 32

gctgctgatg aegaaaacce ctattacgat gac

33

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 33

gggttttcct catcagcage gtagatgcca

30

<210> 34

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 34

gctgctgatg aggaaaacce ctattacgat gac

33

<210> 35

[0015]

- <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 35
 gggttttcga aatcagcagc gtagatgccca 30
- <210> 36
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 36
 gctgctgatt tcgaaaacce ctattacgat gac 33
- <210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 37
 gggttttcac catcagcagc gtagatgccca 30
- <210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 38

[0016]

getgctgaig glgaaaacce ctattacgat gac 33

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 39

ggttttcatg atcagcagcg tagatgecat 30

<210> 40

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 40

cgctgctgat catgaaaacce cctattacga tgac 34

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 41

gggttttcga taccagcagc gtagatgcca 30

<210> 42

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> 引物

<400> 42

gctgctgata tggaaaacce ctattacgat gac

33

<210> 43

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 43

aggggttttc cttatcagca gcgtagatgc cat

33

<210> 44

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 44

cgctgctgat aaggaaaace cctattacga tgac

34

<210> 45

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 45

gggttttcca aatcagcagc gfagatgcea

30

<210> 46

[0018]

- <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 46
 gctgctgatt tggaaaacc cttattacgat gac 33
- <210> 47
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 47
 gggttttcca taccagcagc gtagatgcc 30
- <210> 48
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 48
 gctgctgata tggaaaacc cttattacgat gac 33
- <210> 49
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 49

[0019]

ggtttttggtt atcagcagcg tagatgcaat 30

<210> 50

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 50

cgctgctgat aacgaaaacc cctattacga tgac 34

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 51

gggttttctg gatcagcagc gtagatgcca 30

<210> 52

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 52

gctgctgac cagaaaacc cttattacgat gac 33

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> 引物

<400> 53

gggttttctt gatcagcage gtagatgcca

30

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 54

gctgctgac aagaaaacce ctattacgat gac

33

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 55

aggggttttc tctatcagca gcgtagatgc cat

33

<210> 56

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 56

cgctgctgat agagaaaacce cctattacga tgac

34

<210> 57

[0021]

- <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 57
 ggttttcaga atcagcagcg tagatgccat 30

 <210> 58
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 58
 cgctgctgat tctgaaaacc cctattacga tgac 34

 <210> 59
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 59
 gggttttcgg tatcagcagc gtagatgccat 30

 <210> 60
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 60

[0022]

getgctgata cegaaaaccc ctattacgat gac 33

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 61

gggttttcga catcagcagc gtagatgcca 30

<210> 62

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 62

gctgctgatg tegaaaaccc ctattacgat gac 33

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 63

gggttttccc aatcagcagc gtagatgcca 30

<210> 64

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

[0023]

- <220>
<223> 引物
- <400> 64
gctgctgatt gggaaaacce ctattacgat gac 33
- <210> 65
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引物
- <400> 65
tatcaatggc atggttcag atccataagt gac 33
- <210> 66
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引物
- <400> 66
ggatcgtgaa ccaatgccatt gatataatgt ctagg 35
- <210> 67
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引物
- <400> 67
cttagcttgc ttgtcgaatg ggatafatgt ctctcgg 37
- <210> 68
<211> 31

[0024]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 68

atccattcg acaagcaagc taaggagact g

31

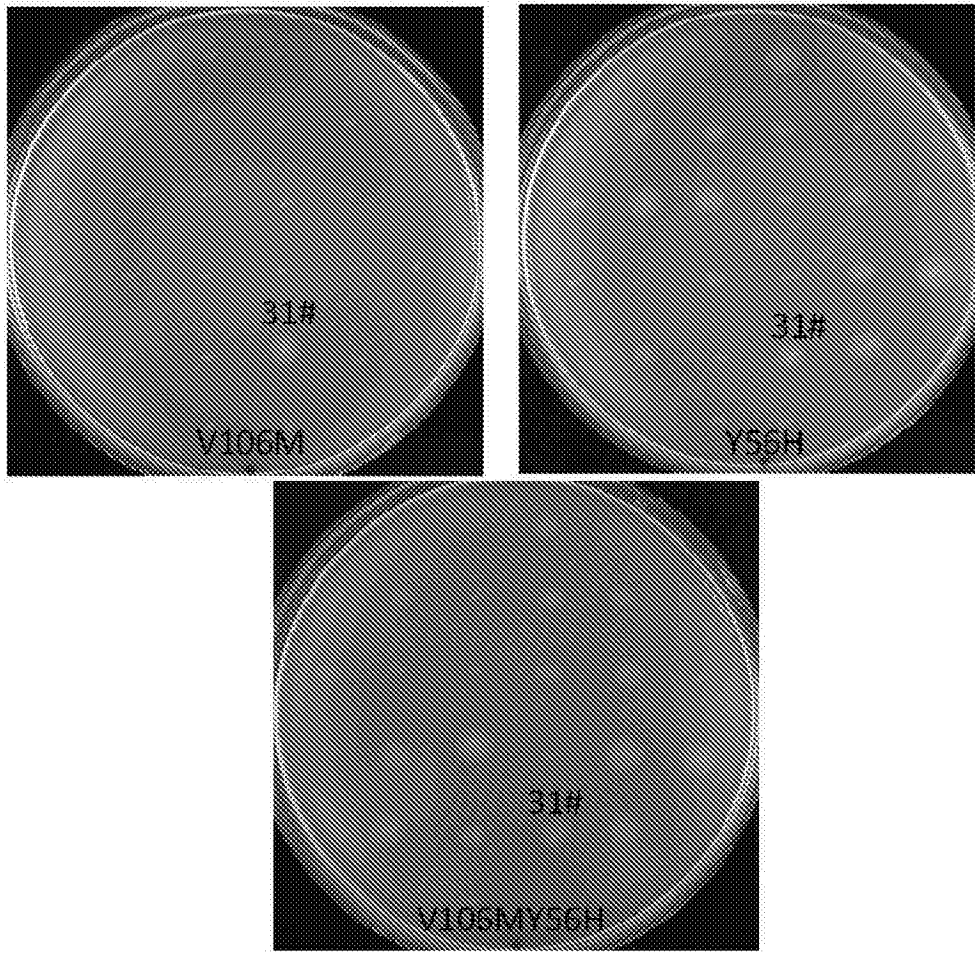


图 1

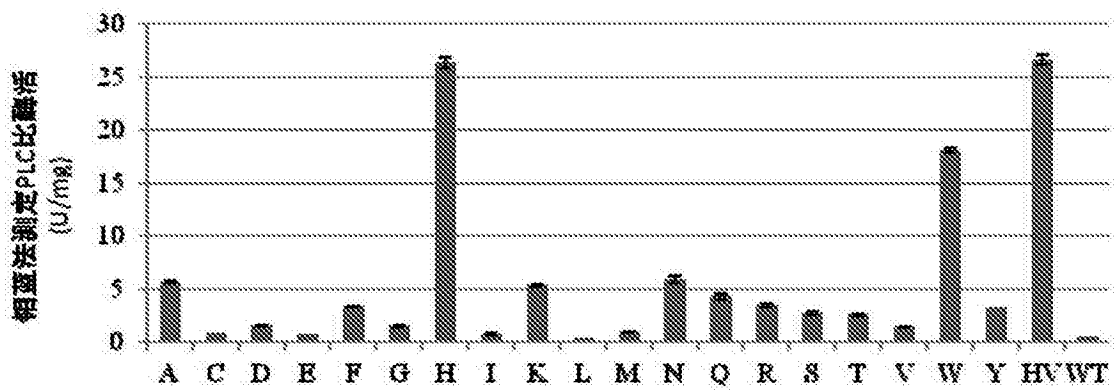


图 2

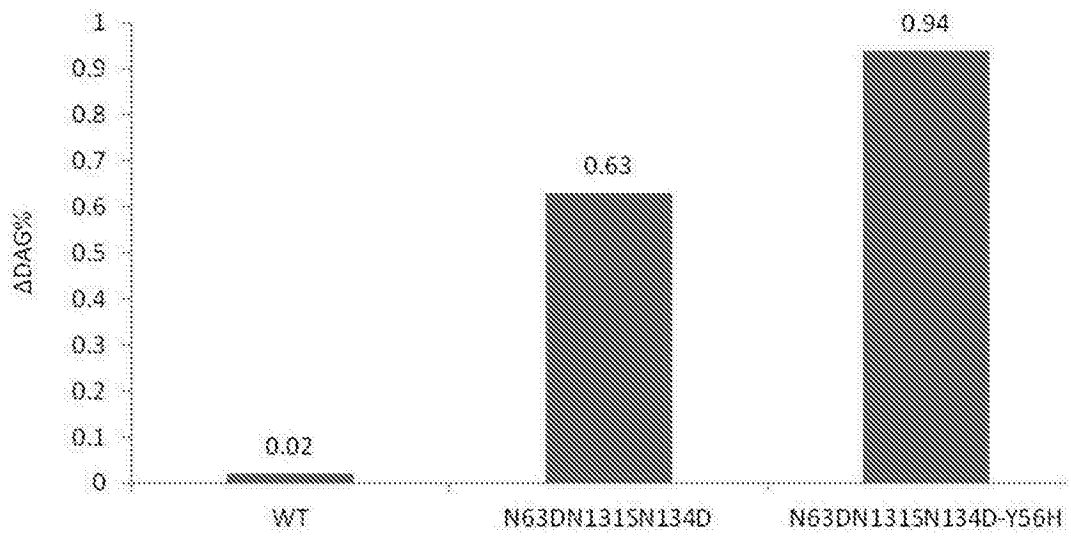


图 3

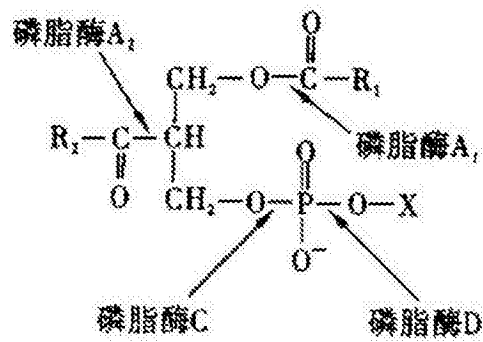


图 4