



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104152425 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201310178873. 7

C12R 1/01 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 05. 14

A62D 101/28 (2007. 01)

(71) 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路 130 号

(72) 发明人 范翔 张晓彦 李骋远 邢帅

许建和

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

31002

代理人 钟华 沈利

(51) Int. Cl.

C12N 9/18 (2006. 01)

C12N 15/55 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

A62D 3/02 (2007. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书15页

序列表5页 附图4页

(54) 发明名称

一种嗜热酯酶及其在降解 PAEs 中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种嗜热酯酶及其在降解 PAEs (邻苯二甲酸酯) 中的用途。该酯酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。在含水介质中, 在该酯酶或其融合蛋白的催化下, 邻苯二甲酸酯进行水解反应, 形成邻苯二甲单酸和醇, 再形成邻苯二甲酸和醇。本发明的酯酶能够将塑化剂初步降解。该酶对中低浓度的变性剂和有机溶剂具有一定抗性, 热稳定性优越, 并且显示了对多种 PAEs 底物的降解功能, 该酶是文献中报道的唯一一个从嗜热微生物中克隆得到的, 其优良的性能使其在 PAEs 的纯酶法降解中有着良好的应用前景。本发明无害化降解 PAEs, 降解反应稳定性好, 反应条件粗放, 反应速度快。

一种嗜热酯酶及其在降解 PAEs 中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,特别涉及一种嗜热酯酶及其在降解 PAEs 中的应用。

背景技术

[0002] 各种各样的化学合成物质在人类的生活中起着至关重要的作用,它们改善了人们的生活,推动了人类社会文明的发展。但同时它们也污染了我们的地球,给我们的生存环境带来了极大的压力。还有一些化合物,它们对于环境的危害是经过多年的科学实验才验证的,此时,其在自然界中的蓄积范围和蓄积量已经达到了严重的地步。邻苯二甲酸酯(PAEs)类又称酞酸酯类,是大约 30 种化合物的总称,在生活中广泛使用,主要作为塑料制品的塑化剂,它在很低浓度时即具有生殖毒性,且它进入环境后,不易迅速降解,可在环境中蓄积和通过生物链富集,PAEs 已成为全球最普遍的污染物之一。

[0003] 目前一致认为,PAEs 降解最有效的途径是微生物介导的生物降解,围绕 PAEs 的生物降解性研究主要应集中在三个方面:一是研究不同生物的降解代谢途径,二是分子机制的研究,关注负责催化反应的酶系、相关基因或操纵子结构。三是筛选适合和驯化的特异菌种及适宜的生物酶。

[0004] 酯水解酶在 PAEs 的无害化降解中起着重要的作用,有一些具有初步催化功能的微生物被分离出来,但负责相关反应的酶却仅有数个得到表征。这些酶都是从生态环境单一的中温微生物中分离得到的,稳定性差,实际应用价值不大。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种邻苯二甲酸酯的生物酶降解法,该方法可以快速降解邻苯二甲酸酯,并且反应条件粗放,可以在高温下进行,在酶变性剂、有机溶剂、金属离子等污染物的存在下,邻苯二甲酸酯还是可以快速的彻底降解。

[0006] 本发明人发现了一种可以快速彻底降解邻苯二甲酸酯的酯酶,并且该酯酶热稳定性高,对酶变性剂、有机溶剂、金属离子耐受性好,催化活性高,从而可以将邻苯二甲酸酯快速彻底降解成邻苯二甲酸和相应的醇。

[0007] 本发明的技术方案之一是:一种分离的酯酶,其特征在于,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

[0008] 本发明的技术方案之二是:一种酯酶融合蛋白,其特征在于,所述的酯酶融合蛋白是氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示的酯酶添加一肽段后的融合蛋白,所述的肽段是表达亲和层析标签 His-tag。

[0009] 本发明的技术方案之三是:一种分离的编码所述的酯酶的核酸,其特征在于,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0010] 本发明的技术方案之四是:一种包含所述的核酸的重组表达载体。

[0011] 本发明的技术方案之五是:一种重组表达转化体,其特征在于,该重组转化体包含

所述的重组表达载体。

[0012] 本发明的技术方案之六是：一种邻苯二甲酸酯的生物酶降解法，其特征在于，包括以下步骤，在含水介质中，在氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示的酯酶或其融合蛋白的催化下，邻苯二甲酸酯进行水解反应，形成邻苯二甲单酸和醇，再形成邻苯二甲酸和醇。

[0013] 本发明中，所述的酯酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。其是来源于嗜酸硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus acidophilus*)的酯酶。

[0014] 本发明中，所述的酯酶可以从嗜酸硫化芽孢杆菌中分离获得，也可以从重组表达该酯酶的表达子中分离获得，也可以人工合成获得。

[0015] 本发明中，较佳的，所述的酯酶由包括以下步骤的方法制备而得：培养含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示的酯酶的核酸的表达载体的大肠杆菌，从发酵液中得到重组酯酶。

[0016] 本发明中，所述的编码氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示的酯酶的核酸可以从嗜酸硫化芽孢杆菌基因组中分离获得，也可以从含有该 SEQ ID No. 2 所示的核酸的重组载体中或者重组表达转化提中分离获得，也可以全人工合成获得。

[0017] 本发明中，如本领域技术人员所知，由于密码子的简并性，编码 SEQ ID No. 2 的氨基酸序列的核苷酸序列不仅仅局限于嗜酸硫化芽孢杆菌基因组中相应的酯酶基因序列。本发明的酯酶的编码核苷酸序列也可以是编码序列中 SEQ ID No. 2 所示氨基酸序列的其他任何核苷酸序列。另外，还可以通过适当引入替换、缺失或插入来提供一个多聚核苷酸的同系物。较佳的，所述的编码 SEQ ID No. 2 的氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0018] 其中，所述的多聚核苷酸的同系物也指启动子变体。在所述的核苷酸序列之前的启动子或信号序列可通过一个或多个核苷酸的替换、插入或缺失而改变，但这些改变对启动子的功能没有负面影响。而且通过改变启动子的序列或甚至用来自不同种生物体的更有效的启动子完全替换，可提高目标蛋白的表达水平。

[0019] 其中，所述的多聚核苷酸的同系物还指一种具有在标准条件下能够与嗜酸硫化芽孢杆菌基因组中相应的酯酶基因序列的多聚核苷酸进行杂交的碱基序列的多聚核苷酸。在标准条件下进行杂交可根据“分子克隆”中描述的方式进行：Cold Spring Harbor Laboratory Press, 分子生物学中的通用方案 (Current Protocols in Molecular Biology)。具体来说，杂交可以按照如下步骤进行，将一个载有被转录的待测 DNA 或 RNA 分子的膜与一个标记探针在杂交缓冲液中进行杂交。杂交缓冲液的组成为 0.1wt%SDS、5wt% 硫酸右旋糖苷、一盒 1/20 的稀释抑制剂以及 2 ~ 8×SSC。20×SSC 为 3M 氯化钠和 0.3M 的柠檬酸组成的溶液。杂交温度为 50 ~ 70° C。在培养几个小时或过夜后，用清洗缓冲液清洗膜。清洗温度为室温，更优选为杂交温度。清洗缓冲液的组成为 6×SSC+0.1wt%SDS 溶液，更优选为 5×SSC+0.1wt% SDS。当用这种清洗缓冲液清洗完膜后，就可以通过在 DNA 或 RNA 分子内被杂交的探针上的标记来识别 DNA 或 RNA 分子。

[0020] 本发明所述的表达载体可通过本领域常规方法将本发明的编码氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示的酯酶的核酸连接于各种表达载体上构建而成。所述的载体可为本领域常规的各种载体，如市售的质粒(大肠杆菌中合适载体有 pLG338、pACYC184、pBR322、pUC18、pUC19、pKC30、pRep4、pHS1、pHS2、pMBL 等)、粘粒(pHZ132)、噬菌体或病毒载体(反转录病毒载体，腺病毒载体)等所述质粒代表一小部分的可能质粒，其他质粒为技术人员公知。本发

明所述重组载体较佳地采用 pET28a 质粒。较佳地,可通过下述方法制得本发明的重组表达载体:将上游引物:5'-GGAATTCATATGCCACTTGATCCGCGGGTTGAAC-3',下游引物:5'-CCCAAGCTTTCATGGCTCTTCAAACCGGGTCTTATA-3',模板为嗜酸硫化芽孢杆菌基因组进行 PCR 扩增所得的扩增产物和表达载体 pET28a 用限制性内切酶 Nde I 和 Hind III 双酶切,形成互补的粘性末端,生成含有本发明的酯酶编码核酸片段的重组表达载体 pET28a-10332。

[0021] 本发明中,所述的含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示的酯酶的核酸的表达载体的大肠杆菌,可通过将本发明的重组表达载体转化至宿主大肠杆菌中制得。所述的大肠杆菌优选大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 或大肠埃希氏菌 (*E. coli*)DH5 α ,更优选 (*E. coli*)BL21 (DE3)。将本发明前述重组表达载体 pET28a-10332 通过常规转化方法,转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中,即可得本发明优选的基因工程菌株,即表达转化体 BL21 (DE3)/pET28-10332。

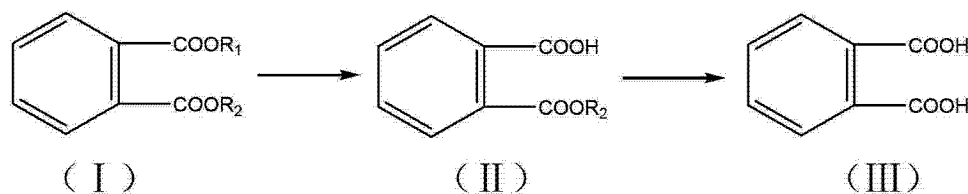
[0022] 其中,所述的表达转化体由常规方法培养,较佳的培养方法包括以下步骤:以 1% 的接种量将表达转化体 BL21 (DE3)/pET28-10332 接入 LB 发酵液中,37 $^{\circ}$ C、200rpm 下培养至菌体 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6 之间时加入终浓度为 1mM 的 IPTG 继续在 25~37 $^{\circ}$ C、160~220rpm,诱导表达 12h 之后,即可。

[0023] 本发明由发酵液中获得表达产物——氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示的酯酶。较佳的将发酵液固液分离取湿菌体,破碎细胞后,取上清液,用表达序列标签亲和层析分离纯化得到 SEQ ID NO. 1 所示的酯酶。

[0024] 本发明中,所述的融合蛋白是氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示的酯酶添加一肽段后的融合蛋白,只要该融合蛋白还是具有酯酶活性即可。所述的添加的一肽段可以是本领域常规的肽段,优选表达亲和层析标签(如 His-tag)或者外分泌信号肽。所述的表达亲和层析标签 His-tag 是本领域常规,较佳的是 6 个组氨酸。

[0025] 本发明中,所述的邻苯二甲酸酯是如式(I)所示的化合物。邻苯二甲酸酯在本发明所述的酯酶的催化作用下水解,先形成如式(II)所示的邻苯二甲酸单酯,再形成如式(III)所示的邻苯二甲酸。

[0026]



[0027] 其中, R_1 和 R_2 分别或同时代表 C2-C10 烷基,更佳的是 C2-C10 直链烷基,最佳的是 C2-C6 直链烷基。

[0028] 其中,所述含水介质为常规的水溶液,较佳的为常规的缓冲液,更佳的为磷酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、巴比妥钠缓冲液或者硼酸-硼砂缓冲液,更佳的为磷酸缓冲液;较佳地所述的含水介质还含有有机溶剂;所述的有机溶剂优选溶解邻苯二甲酸酯的有机溶剂,如 DMSO;优选地,所述有机溶剂和含水介质的体积比为 1:1000-1:9,更优选 1:9。

[0029] 本发明的方法中,所述的底物邻苯二甲酸酯浓度优选为 1~500mmol/L。考虑到反应的效率,底物浓度更优选 10mmol/L。在反应时分批添加底物,可以提高生产效率。反应所生成的产物可以在反应结束后分离,也可以通过原位分离的方法不断地将产物移走。

[0030] 本发明的方法中,所使用的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示的酯酶或其融合蛋白的用量较佳的为 1 ~ 36000U/L,更佳的为 20300U/L。

[0031] 本发明的方法中,所述水解反应的反应温度可以是 20-70℃,优选 37-60℃,最优选 50℃。

[0032] 本发明的方法中,所述水解反应的反应时间是常规,一般到反应至反应完全为止,优选 1 分钟-24 小时。

[0033] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0034] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0035] 本发明从嗜酸硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus acidophilus*)基因组中克隆基因,构建具有表达功能的质粒,导入大肠杆菌 BL21 中进行异源表达,通过在表达质粒上添加标签 6His,实现目标酶的快速亲和纯化和可溶性表达,得到具有高活性的嗜热酯酶。

[0036] 本发明提供一个能够将塑化剂初步降解的酯酶,并且是目前唯一一个能够水解塑化剂酯键的嗜热酯酶。该酶对中低浓度的变性剂和有机溶剂具有一定的抗性,热稳定性较为优越,并且显示了对多种 PAEs 底物的降解功能,该酶是文献中报道的唯一一个从嗜热微生物中克隆得到的,其优良的性能使其在 PAEs 的纯酶法降解中有着良好的应用前景。

[0037] 本发明提供了一种 PAEs 无害化降解的方法,采用所述的酯酶进行生物催化降解,降解反应稳定性好,反应条件粗放,反应速度快,实际应用价值大。

附图说明

[0038] 图 1 为构建重组表达载体 pET28a-10332 的示意图。

[0039] 图 2 显示纯化后的 pET28a-10332 表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。1, 100mM 洗脱液;2, 上清液;3, 诱导后;4, 诱导前;M, Marker。

[0040] 图 3 显示 10332 酯酶以 DBP 为底物在 37℃ 和 50℃ 的反应的 HPLC 分析。其中图 3(A) 显示 254nm DBP 反应底物残留百分比,图 3(B) 显示 254nm DBP 反应产物峰面积比。

[0041] 图 4 显示 10332 酯酶对 DEP 的降解,其中是 254nm 反应底物残留百分比。

[0042] 图 5 显示 10332 酯酶对 DPrP 的降解,其中是 254nm 反应底物残留百分比。

[0043] 图 6 显示 10332 酯酶对 DPeP 的降解,其中是 254nm 反应底物残留百分比。

具体实施方式

[0044] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0045] 实施例 1 嗜热酯酶基因的质粒构建

[0046] 以嗜酸硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus acidophilus*)基因组为模板,以 10332-Nde I-F 和 10332-HindIII-R 为正反向引物 PCR 扩增约 900bp 大小的编码 PAEs 水解酶的 10332 基因片段,PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳检查将得到的 PCR 产物连接到 pET28a 载体中再转化进大肠杆菌 DH5 α 中,挑选多颗白色菌落进行鉴定。通过菌体电泳筛选,提取质粒进行双酶切验证,得到正确的含有目的基因的 pET28a-10332 重组质粒,并将该重组质粒转化保存

到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,经测序正确,成功构建了可以异源表达目标基因 10332 的重组质粒 pET28a-10332 及其表达转化体。重组质粒 pET28-10332 的构建过程示意图见图 1。

[0047] dNTP、各种限制性内切酶、LA Taq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶均购自大连 TaKaRa 公司。细菌总 DNA 提取试剂盒,质粒提取试剂盒,PCR 产物纯化试剂盒,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒是从天根生化科技(北京)有限公司购买。PCR 引物合成及基因测序委托上海捷瑞生物技术有限公司完成。嗜酸硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus acidophilus*),从德国微生物保藏中心(DSMZ)购买所得。其他菌种和质粒见表 1。

[0048] 表 1 菌株和质粒

[0049]

菌株/质粒	性质或产物	来源
菌株 <i>Sulfobacillus acidophilus</i>	提供基因组 DNA	DSMZ
菌株 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	高效表达质粒 pET28a-10332	Invitrogen
质粒 pET28a	N-端 His-Tag/thrombin/T7-Tag 附带一个 C-端 His-Tag 序列	Novagen
质粒 pET28-10332	Nde I-HindIII 10332 基因片段克隆到 pET28a 中 高效表达嗜热酯酶	本发明

[0050] 1.1 嗜酸硫化芽孢杆菌总基因组的获取

[0051] 嗜酸硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus acidophilus*) DSM 10332 (购自 DSMZ) 在刻度试管中生长 5 天左右,培养基有浑浊。取少量进行 2 代培养,在 45℃,200rpm 转速下试管培养。取培养 3 天的菌体培养液 1-5mL,10,000rpm 离心 1min,尽量吸净上清,获得湿菌体。按照天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒的书进行菌体基因组提取。

[0052] 1.2 质粒的提取

[0053] 质粒提取质是按照天根生化科技(北京)有限公司购得的质粒提取试剂盒说明书进行。通过收集相应的培养过夜的含有质粒的大肠杆菌菌体,经过重悬浮、裂解、洗涤、去杂蛋白、洗脱最终获得 40-70 μl 的质粒存于洁净的 EP 管中,立即用于下一步分子生物学试验操作或 -80℃ 保存。

[0054] 1.3 大肠杆菌 DH5 α、BL21 (DE3) 感受态的制备

[0055] 从 4℃ 保存的 LB 平板上挑相应的大肠杆菌(DH5 α、BL21 (DE3)) 单菌落划线接种到 LB 平板,或直接从 -80℃ 保存的感受态细胞划线到相对应的 LB 平板,37℃ 培养 12 ~ 16h,直至可辨别单菌落。

[0056] 无菌操作台上分别挑各种平板一个单菌落接入装载 5ml LB 培养基的试管中,在 220rpm、37℃ 下预培养活化 12 至 14h,直至菌体 OD₆₀₀ 约为 0.6。

[0057] 取 1ml 活化好的预培养的菌液接入含 100ml LB 培养基三角瓶中,37℃、220rpm 培养约 2h 后测 OD₆₀₀,至 OD₆₀₀ 到 0.5 ~ 0.6。

[0058] 将装有菌液的锥形瓶置于冰浴上冷却 15min。

[0059] 4℃ 下 5000rpm 离心 5min 后去上清。

[0060] 加 100ml 冰浴的 CaCl_2 溶液重悬浮菌体,反复吹打迫使菌体充分扩散。

[0061] 于 4°C 5000rpm 离心 2min,弃掉上清。

[0062] 加入 2ml 预冷的 CaCl_2 溶液,混合均匀,放置于冰浴中。

[0063] 分装至已灭菌的 EP 管中,每管 $100\ \mu\text{l}$,用于转化或于 -80°C 保存备用。

[0064] 2.1 引物的合成

[0065] 合成表 2 中的二条引物,用来扩增嗜酸硫化芽孢杆菌的基因片段。该引物的 5' 端为限制性内酶切位点 (Nde I、Hind III) 序列和 3-4 个保护碱基。引物经人工合成后,配成 $30\ \mu\text{M}$ 的浓度待用。

[0066] 表 2 试验中用到的引物

[0067]

编号	引物名称	序列 (5' 到3')
1	10332-Nde I-F (正向引物)	GGAATTCATATGCCACTTGATCCGCGGGTTGAAC
2	10332-BamHIII-F (反向引物)	CCCAAGCTTTCATGGCTCTTCAAACCGGGTTCTTATA

[0068] 2.2PCR 反应

[0069] 以 *S. acidophilus* 基因组为模板,以 10332-Nde I-F 和 10332-HindIII-R 为正反向引物,进行 PCR 扩增,用以扩增 10332 基因片段,其反应体系如表 3 示。

[0070] 表 3 PCR 反应体系

	试剂	加入体积
	模板	1 μl
	正向引物	0.5 μl
[0071]	反向引物	0.5 μl
	2xTaq MasterMix	10 μl
	双蒸水	8 μl
	总计	20 μl

[0072] PCR 扩增程序如下：

[0073]

98 $^\circ\text{C}$	5 min	循环 30 次
98 $^\circ\text{C}$	30 sec	
55~65 $^\circ\text{C}$	30 sec -30sec	
72 $^\circ\text{C}$	1 min 30 s	
72 $^\circ\text{C}$	10 min	

[0074] PCR 扩增完成后取其产物 $5\ \mu\text{l}$ 在 0.8% 琼脂糖上进行核酸电泳验证。电泳结果表明扩增片段大小约为 900bp,与预期的结果相符。

[0075] 2.3 目的条带的胶回收

[0076] 在暗箱式紫外分析仪中观察核酸电泳后的琼脂糖凝胶并切下约 900bp 左右长度的目的条带。

[0077] 参照天根生化科技(北京)有限公司提供的胶回收试剂盒的说明书,按胶块:溶胶液的体积比为 1:5 的比例向胶块中加入溶胶液,置于 55-65℃溶胶约需要 10min,其间不时的摇动直至胶块完全溶解。

[0078] 将胶块完全溶解后的溶解液转移到吸附柱中,室温下 12000rpm 离心 30 秒。

[0079] 向吸附柱中加 500 μl 漂洗液,室温下 12000rpm 离心 30s,弃掉废液。重复此操作一次。

[0080] 12000rpm 下空管离心 2min 以完全去除漂洗液。

[0081] 将吸附柱移至一个洁净的 1.5mL 的离心管中,向吸附柱膜中央悬空加入适当体积(通常用 30-50 μL)的洗脱缓冲液或去离子水,室温放置 1-2 分钟后 12000rpm 离心 2min 洗脱得到目的 DNA 片段。

[0082] 2.4DNA 的酶切与连接

[0083] 按产品使用书,将胶回收的目的 DNA 片段和质粒 pET-28a 分别用限制性内切酶 Nde I、Hind III 酶切消化,经琼脂糖凝胶电泳,使用胶回收试剂盒回收用于下面的连接反应,在进行连接反应前先将纯化的目的基因片段和质粒片段同时进行凝胶电泳分析其浓度。

[0084] 连接反应参照连接酶使用说明,具体反应体系如表 4。其中质粒 DNA 与外源 DNA 片段的摩尔比控制在 1:3-10,16℃连接 12h 以上,连接产物用于转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。

[0085] 表 4 连接反应体系

	试剂	加入体积
	T4 DNA 连接酶	1 μl
[0086]	T4 DNA 连接酶缓冲液	1μl
	质粒	若干
	外源DNA片段	若干
	总计	10μl

[0087] 2.5 利用化学转化法把连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞

[0088] 从 -80℃冰箱中取出一管大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞至于冰沙中,向 EP 管中加入适量的连接反应液(1-10 μl),用手轻轻弹匀后立即之余冰上冰浴 30min。

[0089] 在 42℃水浴热激 90sec。

[0090] 放置冰浴 2min 后向 EP 管中加入 300 μl 无抗性的 LB 培养基后置于 37℃、220rpm 的摇床培养 45min。

[0091] 离心去掉 200 μl 上清后混匀之后取适量体积的转化菌均匀涂布到含有 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 平板上。

[0092] 将平板置于 37℃恒温箱培养 12h 后筛选阳性转化子。

[0093] 2.6 菌体电泳

[0094] 挑选 10-20 颗白色菌落置于含有 50 μg/ml 卡那霉素的抗性 300 μl 的 LB 液体培养中,37℃,220rpm 培养 6-12h 后,取其中 150 μl 菌液离心取上清。

[0095] 将菌体裂解后进行核酸电泳,以空载质粒作为对照组,筛选出滞后条带对应的菌株进行进一步培养提取质粒,进行酶切验证。

[0096] 2.7 双酶切验证和 PCR 验证

[0097] 用引物上含有的两个限制性内切酶酶切位点的酶 Nde I、Hind III 酶切通过菌体电泳筛选出来的重组质粒,之后进行核酸电泳,可以看到与目标质粒大小一致的片段,证明筛选的重组子正确。

[0098] 酶切反应体系如表 5。

[0099] 表 5 酶切反应体系

	试剂	加入体积
	质粒	7 μ l
[0100]	10 \times 上样缓冲液	1 μ l
	限制性内切酶1	1 μ l
	限制性内切酶2	1 μ l
	总计	10 μ l

[0101] 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h 以上。

[0102] 用之前合成的引物 10332-Nde I-F 和 10332-BamHIII-F,以所选的重组质粒为模板进行 PCR 扩增,经电泳验证得到了目标片段,验证了重组质粒的正确性。

[0103] 2.8 表达转化体 BL21 (DE3)/pET28 - 10332 的制备

[0104] 将双酶切验证和 PCR 验证正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),经测序验证正确,成功构建了可以异源表达目标基因 10332 的重组质粒 pET28a-10332 及其表达转化体 BL21 (DE3)/pET28 - 10332。

[0105] 实施例 3 重组大肠杆菌的异源表达和分离纯化

[0106] 培养表达转化体 BL21 (DE3)/pET28 - 10332,通过合适的温度和合适浓度诱导剂 IPTG,使得目标蛋白得以可溶性表达,从而可大量制备获得该酶。对诱导表达的的菌体进行超声破碎,将超声后上清液通过组氨酸标签亲和层析分离法分离纯化得到电泳纯的带有 his-tag 标签的嗜热酯酶的蛋白。

[0107] 1 外源片段在大肠杆菌中的诱导表达

[0108] 将表达转化体 BL21 (DE3)/pET28 - 10332 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温平板培养 12h 后,挑一个单菌落于 5ml LB (含 50 μ g/ml 卡那霉素)液体培养基中,培养 8h 以后,做甘油管保种备用。取其中 5 μ l 甘油管菌液加入 5ml LB 液体培养基(卡那霉素 50 μ g/ml),活化培养过夜后,以 1% 的接种量转接入二级瓶,37 $^{\circ}$ C、200rpm 下培养至菌体 OD₆₀₀ 达到 0.4 ~ 0.6 之间时加入终浓度为 1mM 的 IPTG 继续在 25 ~ 37 $^{\circ}$ C、160 ~ 220rpm,诱导表达 12h 之后,收集菌体,进行蛋白表达测定以及酶活力等操作。

[0109] 2 大肠杆菌细胞的破碎

[0110] 对表达转化体 BL21 (DE3)/pET28 - 10332 进行细胞破碎,具体步骤如下:

[0111] 室温下 8000rpm 离心 10min 收集菌体细胞。弃上清,沉淀重悬浮于 10-20ml 的冰浴预冷的磷酸盐缓冲液(1M KH₂PO₄3.85ml,加 1M6.15ml 的 K₂HPO₄,定容到 100ml,高温高压灭菌后室温保存而得)中。

[0112] 将离心管置于冰浴,用带直径 5mm 探头的超声波发生器裂解细胞,调整频率和强度避免产生泡沫,同时及时更换冰防止温度过高使酶失活。

[0113] 破碎之后产物于 12000rpm 下 4℃离心 10min,取上清(即粗蛋白酶液),弃沉淀。该上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤,得细胞破碎液,备用。

[0114] 3 表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0115] 用 10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测样品中蛋白的表达。

[0116] 4 重组蛋白的纯化

[0117] 4.1 缓冲液的配置

[0118] (1) 结合液:100mM 磷酸缓冲液,2M 氯化钠,20mM 咪唑,30% 甘油,1%triton, pH7.0。

[0119] (2) 洗脱缓冲液:100mM 磷酸缓冲液,2M 氯化钠,50, 100, 200, 500mM 咪唑, pH7.4。

[0120] 4.2 His-tag 柱的分离

[0121] Ni 分离柱 (GE Health Histrap crude FF) 预装柱,柱床体积为 1ml。

[0122] 用结合液平衡 2 ~ 5 个柱床体积,流速控制在 2ml/min。

[0123] 将细胞破碎液 0.45 μ M 无机滤膜过滤,上样,流速控制在 1ml/min。

[0124] 用结合液再洗 2 ~ 5 个柱床体积,流速为 2ml/min。

[0125] 分别用不同梯度的咪唑的缓冲液(即洗脱缓冲液)进行阶段洗脱,流速为 2ml/min,收集各阶段洗脱峰,用 SDS-page 检测融合蛋白的分子量大小和纯度。

[0126] 结果

[0127] 从表达转化体 BL21 (DE3) /pET28 - 10332 菌体破碎的上清液的聚丙烯酰胺凝胶电泳图(见图 2)可以看出,经过 IPTG 诱导,在 35KD 左右处有明显过表达的条带,该条带大小与 10332 酯酶预测大小接近。且该蛋白大多以可溶性形式表达在超声上清中。在常规的表达宿主的表达温度和诱导剂 IPTG 的浓度中,对于 BL21 (DE3) /pET28 - 10332 的重组的目标蛋白均可溶性目标蛋白进行表达。

[0128] 在 His-tag 柱的分离的对比试验中,结合液中只有缓冲液和 10mM 的咪唑,蛋白的纯化效果较差,杂蛋白的含量高。在本发明中,在结合液中加入降低疏水作用的甘油、Triton、NaCl,并把咪唑的浓度提高到 20mM,即一步即可纯化至电泳纯,纯化效率极高。经电泳及测活,该蛋白在 100mM 咪唑浓度可以被全部洗脱下来,得到电泳纯级别的表达产物。因此,本发明成功构建重组表达编码嗜热酯酶的表达系统,及通过组氨酸标签亲和层析分离法分离纯化得到了带有 his-tag 标签的嗜热酯酶的纯化蛋白。

[0129] 实施例 4 重组大肠杆菌表达产物的酶学性质以及底物谱

[0130] 对所得到的粗蛋白酶液和纯化蛋白进行蛋白浓度检测和酶活检测,该酶比活很高,最高达到 2600U/mg。采用不同链长的 pNP 酯,测量该酶对于不同底物的反应效率,得到该酶的反应底物谱及该酶对 pNP 酯的最佳底物。检测该酶对热、变性剂、有机溶剂和金属离子的耐受性,该酶具有良好的热稳定性,对低浓度尿素和吐温有较高的耐受性,对有机溶剂和金属离子具普遍的耐受性。行氨基酸比对分析以及保守序列分析,该酶与其他酶的最高相似度仅为 52%,确定为新酶。

[0131] 1 蛋白浓度的测定

[0132] 考马斯亮兰法检测样品的蛋白质含量。

[0133] 2 酶活检测的

[0134] 该酯酶的检测是根据通用底物对硝基苯酚丁酸酯(PNPB)与酶反应过程中的PNPB颜色的改变,从而通过实时监控的分光光度计的数值来确定酶活的大小。

[0135] 检测体系 3ml,包括以下溶液:

[0136] 2. 87mL $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ (100mM, pH7.0);

[0137] 30 μ L PNPB 母液;

[0138] 100 μ L 酶液。

[0139] 检测波长 405nm,温度 50℃。先加入缓冲液和底物保温 2min,再加入酶液。每隔 10s 记录一个 A_{405} 值,记录时长为 1min。1min 内吸光值的变化大于 1.2,最佳范围在 0.4-0.8 之间,可适当稀释酶液。

[0140] 计算酶活的动力学参数时所用到的方程如下:

[0141] 酶活 $U/mL = (\Delta Abs_{405}/t) \cdot 2.24 \times 10^5$

[0142] 3 反应底物谱

[0143] 采用不同链长的 pNP 酯,分别是 C2, C3, C4, C5, C8, C10, C12, C14, C16 测量该酶对于不同底物的反应效率,以探明该酶对 pNP 酯的最佳底物。测活方法利用 1-100 μ L 的纯化后的嗜热酯酶与 PNP 酯在 1min 内的反应,通过分光光度计测量其在 A_{405nm} 的吸光度。

[0144] 4 热稳定性检测

[0145] 将纯化得到的酯酶分别放置在 50℃ 水浴器中,间隔 5 小时取酶液进行与 PNPB 进行反应,对照组采用在室温下放置的同批次纯化的酶液,进行分光光度计的测量;同时用该批次纯化的酶液保温在 70℃ 恒温箱中,间隔约 1 分钟取酶液与 PNPB 进行反应,测定其稳定时分光光度计的数值。

[0146] 5 变性剂对酶活的影响

[0147] 将纯化得到的酶,分别与不同浓度的变性剂、有机溶剂以及金属离子溶液混合,再与 PNPB 进行反应,测定其分光光度计的数值,与对照组进行比对,得到酶活百分比。

[0148] 结果

[0149] (1) 蛋白浓度与酶活

[0150] 100mM 为最适洗脱液,在此条件下所得的酶活为 203U/ml,比活为 2600U/mg,活力回收为 54.6%。可见得到的是具有高活性的酯酶。

[0151] (2) 反应底物谱

[0152] 通过与对硝基苯酚不同碳原子数酯化的 PNP 酯反应,来确定底物谱范围,如表 6 所示。通过活力百分比的比较,该酶与对硝基苯酚丁酸酯(PNPB)的反应活性最高,对于长链底物反应活性较低,该特征与典型酯酶的特征相似,对低链长的底物反应活性高,高链长活性低,而脂肪酶相反。

[0153] 表 6 PNP 酯化的酸的碳链长度与活性的变化

[0154]

PNP酯化的酸的碳链	C2	C3	C4	C6	C8	C10	C12
活力百分数%	20.8	59	100	77.7	9.4	4.4	0

[0155] (3) 热稳定性

[0156] 该酶在 50℃ 和 70℃ 的高温情况下保存后,检测该酶与 PNPB 的反应活性,结果如下

表 7、8 所示。可知,该酶 50℃保温 20 小时,仍具有对 PNPB 的 50%活性,且 70℃保温 6 分钟,该酶仍具有对 PNPB 的活性。表明其在 50℃具有良好的热稳定性。

[0157] 表 7 50℃热稳定性数据

[0158]

保温时间h	0	5	10	14	22	44
百分比%	100	106	89	54.9	40.9	26.1

[0159] 表 8 70℃热稳定性数据

[0160]

保温时间min	0	1	2	3	4	5	7	9
百分比%	100	105.97	105.98	76.85	56.3	50.87	31.42	30.89

[0161] (4) 不同变性剂对酶活的影响

[0162] 将该酶在与不同变性剂、有机溶剂、金属离子溶液混合,测定其对 PNPB 的反应活性,如下表 9、10、11 所示。通过比较,该酶对于低浓度的尿素和吐温有较高的耐受性,而对于有机溶剂和金属离子溶液则具有普遍地耐受性。从表中还发现,2M,4M 的尿素以及较低浓度的吐温对酶活有提高作用。表 9 不同变性剂对酶活的影响

[0163]

变性剂	活力百分比
0 (对照)	100
8M 尿素	2.44
4M 尿素	119.6
2M 尿素	89
2M NaCl	85
90% 乙腈	1.35
50% 乙腈	25.9
90% 乙醇	2.7
50% 乙醇	59.8
5% Tw80	103.2
1% Tw80	165.8
5% SDS	0.22
1% SDS	0.31

[0164] 表 10 不同有机溶剂对酶活的影响

[0165]

有机溶剂	活力百分比%
0 (对照)	100
乙酸乙酯10%	103.3
乙酸乙酯30%	145
异戊醇10%	169
异戊醇30%	70.1
二甲基亚砷10%	114.8
二甲基亚砷30%	136.7
乙醇10%	123.2
乙醇30%	146.7
甲醇10%	121.6
甲醇30%	149.4
乙氰10%	121.1
乙氰30%	42.8
乙醚10%	123.9
乙醚30%	55.5

[0166] 表 11 不同有机溶剂对酶活的影响

[0167]

金属离子类型	活力百分比%
0 (对照)	100
Fe ²⁺ 1mM	55.14
Zn ²⁺ 1mM	46.8
Co ²⁺ 1mM	72.45
Ca ²⁺ 1mM	63.97
Mn ²⁺ 1mM	61.29
Mg ²⁺ 1mM	55.46
EDTA 1mM	68.23

[0168] (5) 氨基酸序列比对

[0169] 从 *S. acidophilus* 的基因可以看出,10332 酯酶的序列和 *Nocardia cyriacigeorgica*, *Pyrobaculum oguniense*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus* 相比,相似度分别为 52%, 42%, 39% 和 37%。说明这些酶属于同一个家族,BLAST 的最大相似度为 52%,说明该酶属于未发现的新酶。

[0170] 实施例 5 重组 10332 酯酶对 PAEs 不同底物的降解

[0171] 采用 10332 酯酶纯酶对邻苯二甲酸酯的不同底物进行降解,发现 10332 酯酶对 2C-6C 直链 PAEs 底物均具有降解功能,3C,4C 直链 PAEs 底物在 4h 左右全部被降解,5C 和 2C 直链 PAEs 底物在 24h 内全部降解。并且,0332 酯酶对邻苯二甲酸酯在 50℃ 的降解效果

好于 37℃ 的降解效果。

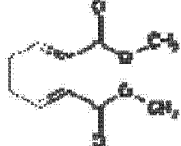
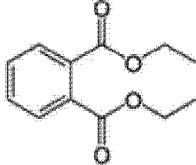
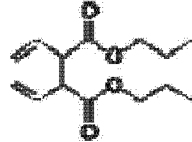
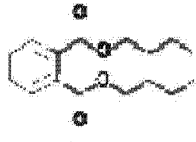
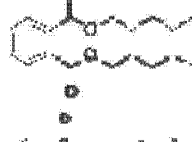

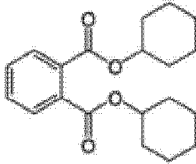
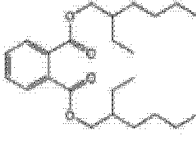
[0172] 1. 与 PAEs 的反应分析

[0173] 将不同的 PAEs 配制成 100mM 的母液, 溶解在 DMSO 中, 取 100 μ l 加入到 900 μ l 磷酸缓冲液中 (pH7.0), 加入纯化酯酶 36U/ml, 在不同温度下进行反应, 定时取样, 用乙酸乙酯进行萃取, 分层后吸取上清, 并过滤后分别利用 TLC 和 HPLC 测定产物的减少。

[0174] 所用的 PAEs 如表 12。

[0175] 表 12 PAEs

[0176]

名称	缩写	结构式
邻苯二甲酸二甲酯 (Dimethyl Phthalate)	DMP	
邻苯二甲酸二乙酯 (Diethyl Phthalate)	DEP	
邻苯二甲酸二丙酯 (Di-n-propyl Phthalate)	DPrP	
邻苯二甲酸二丁酯 (Di-n-butyl Phthalate)	DBP	
邻苯二甲酸二戊酯 (Di-n-pentyl Phthalate)	DPeP	
邻苯二甲酸二己酯 (Di-n-hexyl Phthalate)	DHP	
邻苯二甲酸二环己酯 (Dicyclohexyl Phthalate)	DCHP	
邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯 (Di(2-ethylhexyl) Phthalate)	DEHP	

[0177] 2. TLC 分析

[0178] 流动性配比为石油醚:乙酸乙酯:乙酸(10:1:0.1), 层析后, 在紫外灯下检测底物和产物。

[0179] 3. HPLC 分析

[0180] 流动性为甲醇-水(90:1-80:1),不同底物流动相略有不同,检测波长 254nm,柱温 40 度。所使用的是 Prominence UV/VIS DETECTOR SPD-20A。4. GC-MS

[0181] 为了检测产物的生成,采用安捷伦 5973N GC-MS,装配 HP6890GC 和 HP7683B 自动进样器。柱温控制如下:初始 80°C,保持 1min,以 7° C/min 上升到 280° C,进样口温度 280° C,氦气作为载气。以 HP 化学工作站分析。

[0182] 结果

[0183] 纯化后的酶首先与塑化剂 DBP 进行反应,测的其 TLC 与 HPLC 的数据,判断其催化效率。

[0184] 通过 TLC 分析可见,该酯酶具有降解 DBP 的能力,且在反应开始 3h 后完全降解 DBP 生成单酯 MBP (邻苯二甲酸单丁酯)(以 MBP 标准品为对照)。

[0185] 利用 HPLC,流动性为甲醇-水(85:15),对 DBP 标样进行分析,DBP 出峰时间为 6.4min,反应之后在 2.2min 出现一产物峰,该峰与 MBP 标样出峰时间一致,可以认定 10332 酯酶对 DBP 降解生产了邻苯二甲酸单丁酯。将反应后的产物进行甲酯化,在 GC-MS 上分析,邻苯二甲酸单丁酯的羧酸基团被甲酯化,进一步表明 DBP 的降解产物为 MBP。

[0186] 为了检测 10332 酯酶对于 DBP 的降解速率,在不同时间点取样,经过萃取过滤后在 HPLC 上分析,以初始峰面积为 100,以不同时间的峰面积百分率表示降解速率。从结果可见,10332 酯酶在 3h,37°C 内将所有的 DBP 降解。将反应温度提高到 50°C 时,2h 内将所有 DBP 降解完全,完全反应时间缩短了 1h(如图 3A)。产物的生成曲线与底物的降解曲线形成正相关关系(如图 3B)。

[0187] 为了验证该酯酶对其它 PAEs 底物是否有反应,使用 DMP, DEP、DPrP、DPeP 和 DCHP 作为底物进行反应,且在 37°C 和 50°C 分别进行反应,用 HPLC 的方法进行分析,各个底物降解速率如图 4-6 所示,其余结果如表 13 所示。可见,10332 酯酶对几种直链 PAEs 具有良好的降解功能。DBP, DPrP, DPeP 37°C 时分别在 3h, 5h, 5h 完成全部降解, DEP 完全降解需要 48h; 当反应温度提高到 50°C 时,反应速度大为提高, DBP, DPrP, DPeP 和 DEP 完全降解所需要的时间分别为 2h, 4h, 1h 和 24h。DBP, DPrP, DPeP 三种底物的初始反应速度较快(如表 13 所示),其中邻苯二甲酸二戊酯初始反应最快。反应两分钟,底物减少就超过了 50%。DEP 反应最慢。

[0188] 表 13 几种直链 PAEs 初始反应速率比较

[0189]

底物类型	2min		5min		30min	
	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C
DEP	-	-	-	-	86%	75%
DPrP	74%	80%	69%	70%	43%	37%
DBP	59%	57%	58%	56%	33%	18%
DPeP	45%	42%	36%	34%	17%	15%

[0190] 以六碳侧链的邻苯二甲酸二己酯为底物时,在 24h 内也检测到底物完全降解。另外,10332 酯酶对 DMP 和 DCHP 无反应,这说明侧链基团过大或过小均会影响其降解。

[0191] 10332 酯酶在高温下对几种 PAEs 优良的降解性能使其能够用于 PAEs 工业化酶法降解。

[0001]

<110> 华东理工大学

<120> 一种嗜热酯酶及其在降解PAEs中的应用

<130> P4E1310239C

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 915

<212> DNA

<213> Sulfobacillus acidophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (915)

<400> 1

atg cca ctt gat ccg cgg gtt gaa cag ttt ttg gcg cag atg ccg ccc	48
Met Pro Leu Asp Pro Arg Val Glu Gln Phe Leu Ala Gln Met Pro Pro	
1 5 10 15	

ctg aac cgg gag ggc ctg agt ctg gcg gaa gcg cgt cag caa ttt aag	96
Leu Asn Arg Glu Gly Leu Ser Leu Ala Glu Ala Arg Gln Gln Phe Lys	
20 25 30	

caa gga gcg cta ttg ctg gat caa atg gtg cct cca cca ccg gtt gat	144
Gln Gly Ala Leu Leu Leu Asp Gln Met Val Pro Pro Pro Pro Val Asp	
35 40 45	

acc gaa gac gga acg gtc gtc acc acg cat ggg ccg gtc cgg atc cgt	192
Thr Glu Asp Gly Thr Val Val Thr Thr His Gly Pro Val Arg Ile Arg	

[0002]

50	55	60	
egg tat atc ccg gac egg ttg cgg ttc tct cat ccg ctg gtg ttt tat			240
Arg Tyr Ile Pro Asp Arg Leu Arg Phe Ser His Pro Leu Val Phe Tyr			
65	70	75	80
cac ggc ggc gga ttt gtg ttt ggg gat atc gac acc cat cat ggg ttg			288
His Gly Gly Gly Phe Val Phe Gly Asp Ile Asp Thr His His Gly Leu			
	85	90	95
gtg gcc cgc tta tgc caa acg gtg gga gcc acc gtc att tcc gtc gac			336
Val Ala Arg Leu Cys Gln Thr Val Gly Ala Thr Val Ile Ser Val Asp			
	100	105	110
tat tcg ttg gca cct gaa gcc aaa ttt ccg gtg ccg gtc gcc gaa tgt			384
Tyr Ser Leu Ala Pro Glu Ala Lys Phe Pro Val Pro Val Ala Glu Cys			
	115	120	125
att gac gtg gca cgc tgg gcg gct cac gag gcc ccc gga tgg ggg cta			432
Ile Asp Val Ala Arg Trp Ala Ala His Glu Ala Pro Gly Trp Gly Leu			
	130	135	140
aag ccg tcg att gtg gtg gcc ggg gac agc gcc ggc ggc aat ttg gcg			480
Lys Pro Ser Ile Val Val Ala Gly Asp Ser Ala Gly Gly Asn Leu Ala			
145	150	155	160
gcg gtc gtc teg caa cgg gcc aaa gac gaa teg cta ccg att gcg gcc			528
Ala Val Val Ser Gln Arg Ala Lys Asp Glu Ser Leu Pro Ile Ala Ala			
	165	170	175
caa etc ctg ttt tat cca gca ctt gac atg gtc cac gaa acg ccg tcc			576
Gln Leu Leu Phe Tyr Pro Ala Leu Asp Met Val His Glu Thr Pro Ser			
	180	185	190
aag cgg gat ttt gcc cgc ggt tat ctt ttg gag gcg gac gcg atg caa			624
Lys Arg Asp Phe Ala Arg Gly Tyr Leu Leu Glu Ala Asp Ala Met Gln			

[0003]

195	200	205	
tgg ttt ggc gaa caa tat ctg aga act ccg gac gat gta agc cat ecc			672
Trp Phe Gly Glu Gln Tyr Leu Arg Thr Pro Asp Asp Val Ser His Pro			
210	215	220	
tgg gcc tcg ccc gct ttg tcc ccc gac ctg acc gga etc ccg ccc gcg			720
Trp Ala Ser Pro Ala Leu Ser Pro Asp Leu Thr Gly Leu Pro Pro Ala			
225	230	235	240
ctg gtg att acc gcc gag tac gat ccg ttg cgg gat gaa ggc gag gct			768
Leu Val Ile Thr Ala Glu Tyr Asp Pro Leu Arg Asp Glu Gly Glu Ala			
245	250	255	
tat gcc gaa gcc cta cgg gcc gcc ggc gtg ccg acg gaa cag att cgc			816
Tyr Ala Glu Ala Leu Arg Ala Ala Gly Val Pro Thr Glu Gln Ile Arg			
260	265	270	
ttt gac ggc atg att cac gga ttt atg acc atg ccc atc ttt ccc caa			864
Phe Asp Gly Met Ile His Gly Phe Met Thr Met Pro Ile Phe Pro Gln			
275	280	285	
atg gag gcc gcc atc gag gcg gta gcc cgg ttt ttg gag cgg atc gac			912
Met Glu Ala Ala Ile Glu Ala Val Ala Arg Phe Leu Glu Arg Ile Asp			
290	295	300	
tag			915

<210> 2

<211> 301

<212> PRT

<213> *Sulfobacillus acidophilus*

<400> 2

[0004]

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

[0005]

Lys Arg Asp Phe Ala Arg Gly Tyr Leu Leu Glu Ala Asp Ala Met Gln
 195 200 205

Trp Phe Gly Glu Gln Tyr Leu Arg Thr Pro Asp Asp Val Ser His Pro
 210 215 220

Trp Ala Ser Pro Ala Leu Ser Pro Asp Leu Thr Gly Leu Pro Pro Ala
 225 230 235 240

Leu Val Ile Thr Ala Glu Tyr Asp Pro Leu Arg Asp Glu Gly Glu Ala
 245 250 255

Tyr Ala Glu Ala Leu Arg Ala Ala Gly Val Pro Thr Glu Gln Ile Arg
 260 265 270

Phe Asp Gly Met Ile His Gly Phe Met Thr Met Pro Ile Phe Pro Gln
 275 280 285

Met Glu Ala Ala Ile Glu Ala Val Ala Arg Phe Leu Glu Arg Ile Asp
 290 295 300

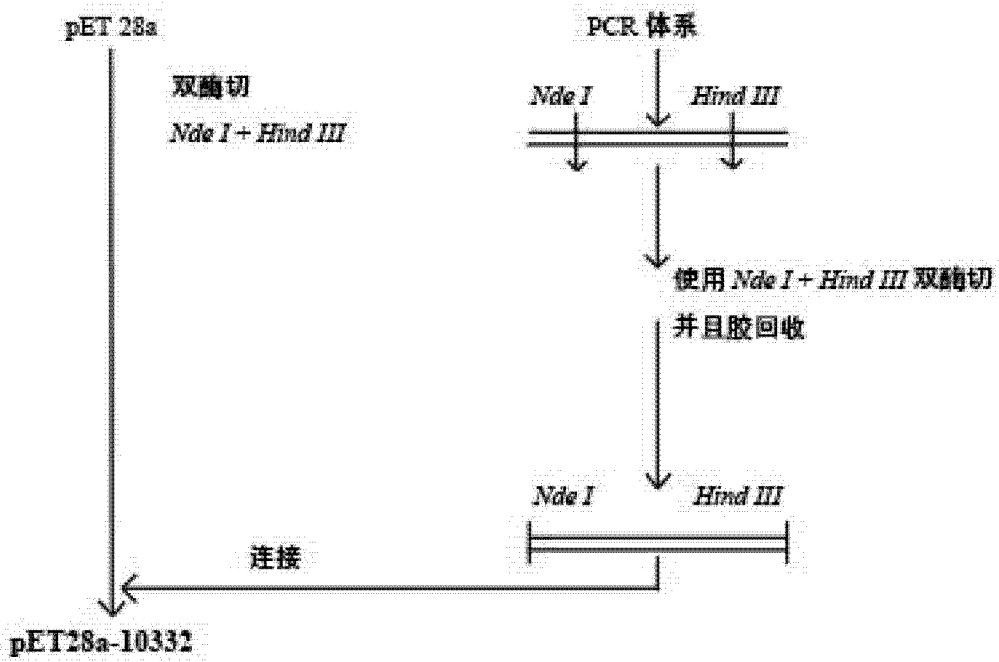


图 1

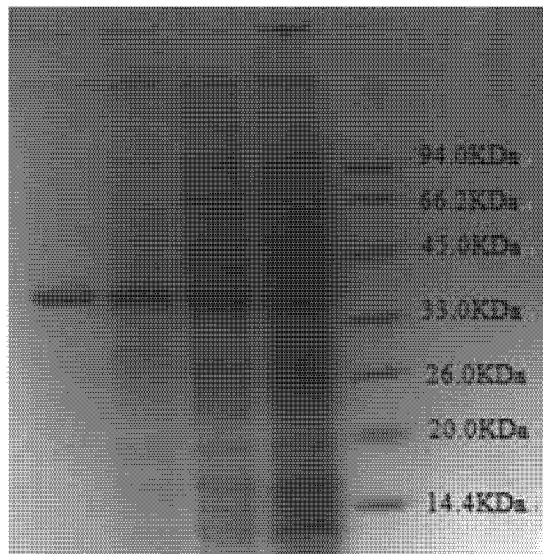


图 2

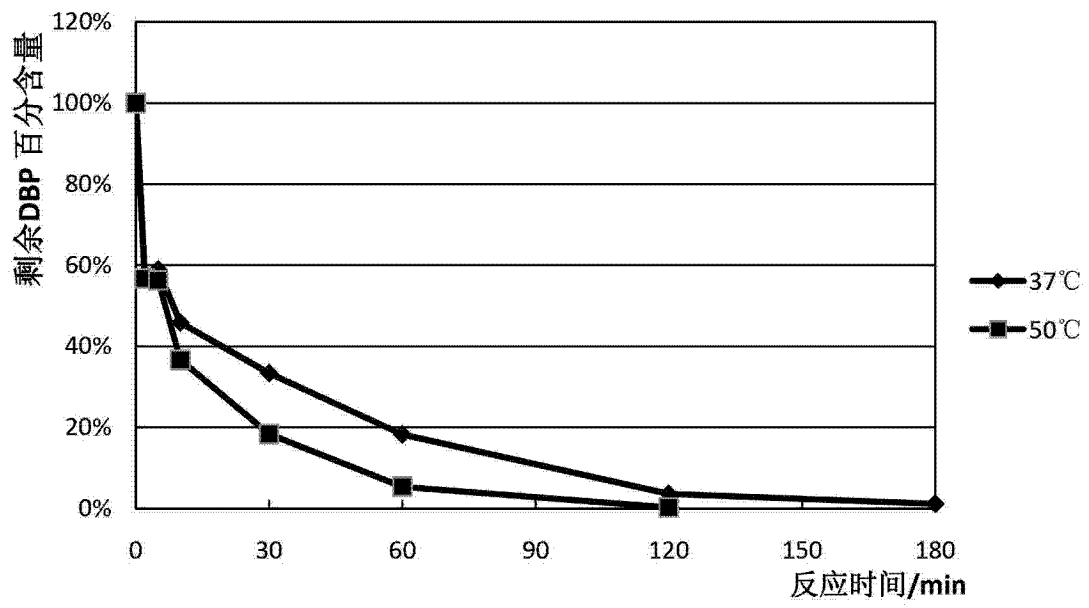


图 3(A)

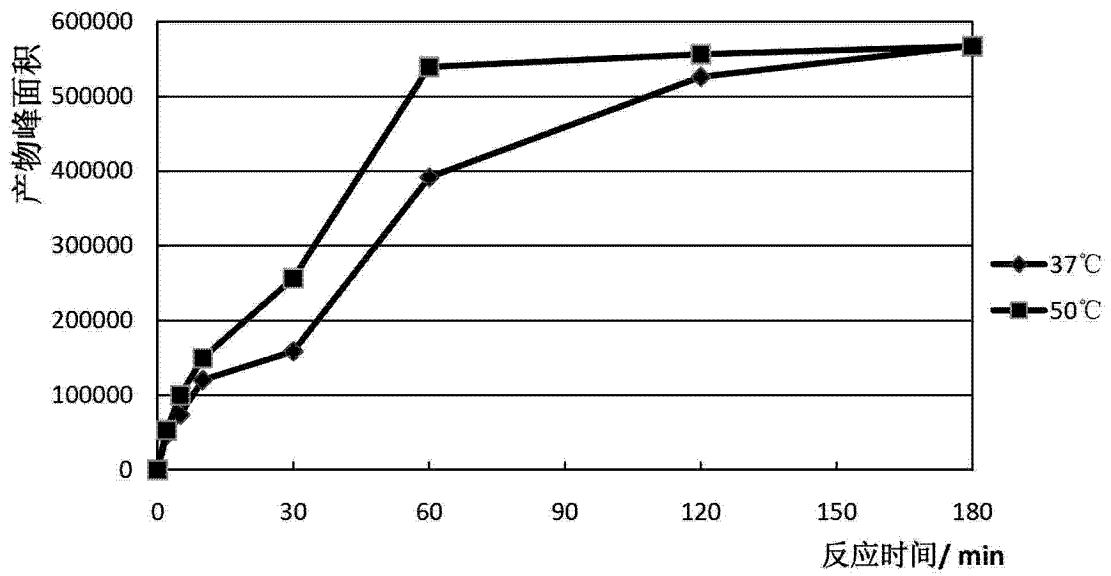


图 3(B)

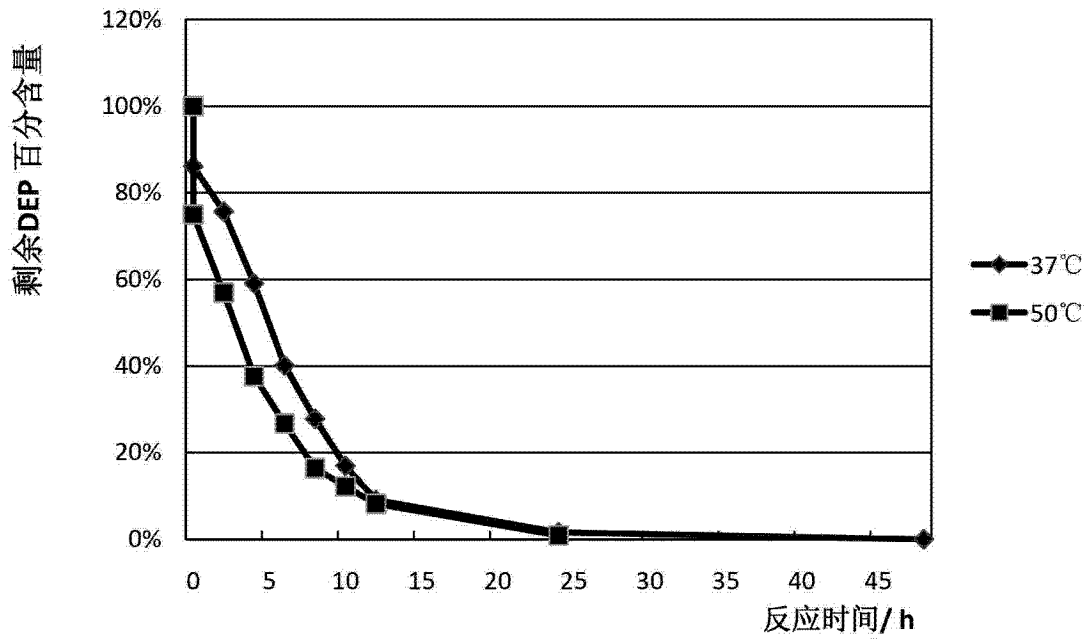


图 4

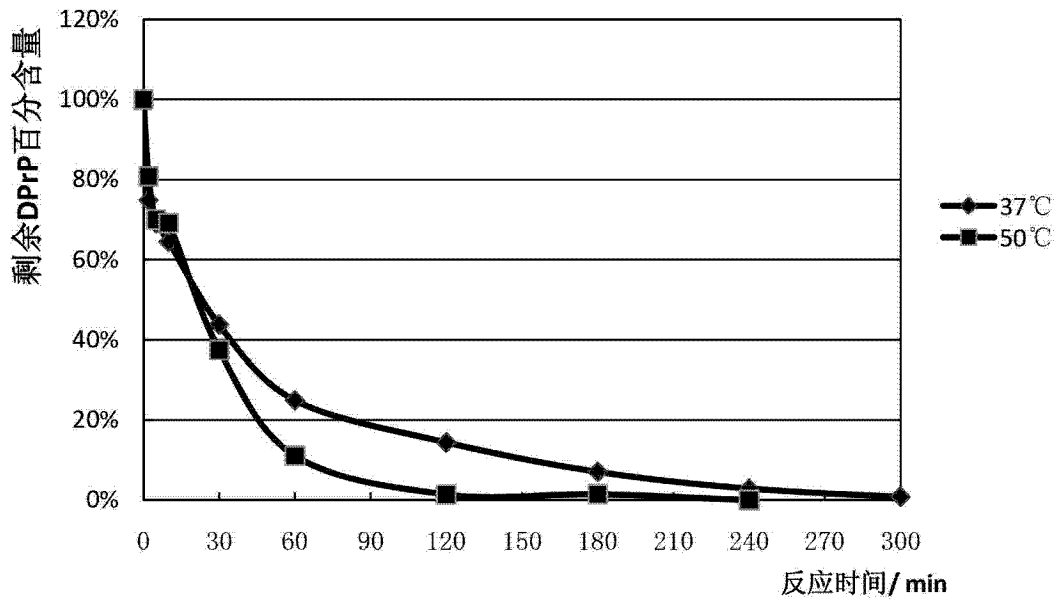


图 5

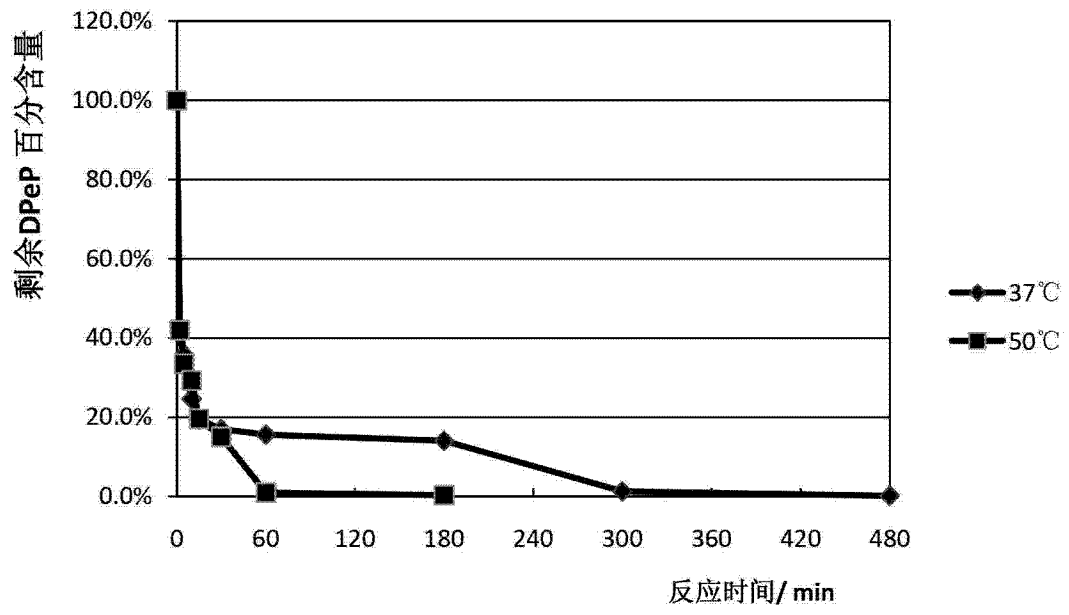


图 6