



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112725311 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 22

(21) 申请号 202110239347.1

(22) 申请日 2021.03.04

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112725311 A

(43) 申请公布日 2021.04.30

(73) 专利权人 江苏科技大学

地址 212003 江苏省镇江市梦溪路2号江苏科技大学科技处

(72) 发明人 葛研 游帅 谢晨 查子千 王俊

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

专利代理师 唐循文

(51) Int. Cl.

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

A23K 20/189 (2016.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 110656099 A, 2020.01.07

审查员 崔娟娟

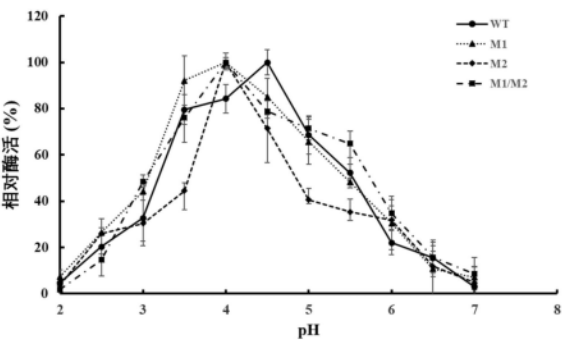
权利要求书1页 说明书5页
序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体及其应用

(57) 摘要

动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体及其应用,以木聚糖酶野生型GtXyn10的核苷酸序列SEQ ID NO.7为基础,选择突变位点R进行突变得木聚糖酶突变体:当突变位点R为G92C时,木聚糖酶突变体为GtXyn10-G92C;当突变位点R为Q99S时,木聚糖酶突变体为GtXyn10-Q99S;当突变位点R为G92C/Q99S时,木聚糖酶突变体为GtXyn10-G92C/Q99S。该木聚糖酶突变体的最适pH值在3.5-4.5之间,与野生型相比变化不大,但是在40℃条件下的比活力分别是野生型的1.8倍、1.7倍和2.4倍,尤其是突变体GtXyn10-G92C/Q99S在40℃下的比活高达587U/mg,已经超过了大部分高温木聚糖酶。



1. 一种动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体, 其特征在于, 以木聚糖酶野生型 GtXyn10 的核苷酸序列 SEQ ID NO.7 为基础, 选择突变位点 R 进行突变得木聚糖酶突变体: 当突变位点 R 为 G92C 时, 木聚糖酶突变体为 GtXyn10-G92C, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示; 当突变位点 R 为 Q99S 时, 木聚糖酶突变体为 GtXyn10-Q99S, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示; 当突变位点 R 为 G92C/Q99S 时, 木聚糖酶突变体为 GtXyn10-G92C/Q99S, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

2. 根据权利要求 1 所述动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体, 其特征在于, 编码木聚糖酶突变体 GtXyn10-G92C 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示; 编码木聚糖酶突变体 GtXyn10-Q99S 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示; 编码木聚糖酶突变体 GtXyn10-G92C/Q99S 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

3. 一种重组载体, 含有 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列。

4. 一种重组菌株, 含有权利要求 3 所述的载体。

5. 权利要求 2 所述动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体在制备饲料添加剂中的应用。

6. 权利要求 2 所述动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体在降解木质纤维素上的应用。

动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,具体涉及一种动物体温(40℃)条件下高比活耐热木聚糖酶突变体及其应用。

背景技术

[0002] 植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素组成,其中纤维素占30%-50%,半纤维素占20%-35%(Wong KK1988,52:305-317.)。半纤维素一般指自然界植物细胞壁中除果胶和纤维素类成分之外的其他聚糖类物质,主要包括木聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖。而木聚糖是半纤维素中含量最高的多糖,广泛存在于农业副产物如玉米芯、麦麸、米糠、秸秆和甘蔗渣等中,几乎占地球可更新有机碳含量的三分之一(Prade R1995,13(12):101-131.)。木聚糖的结构复杂,其主链是由吡喃木糖以 β -D-1,4-木糖苷键连接,并带有多种取代基(Collins et al.,2005)。

[0003] 木聚糖酶是木聚糖降解过程中最关键的一类酶,它能够降解木聚糖主链的 β -1,4-糖苷键。目前,利用生物酶来降解木聚糖的相关研究受到很大重视(Yuan et al.,2004),与化学法降解相比,利用生物酶降解木聚糖的方法有很多优点,比如酶解反应的作用条件较温和,消耗能量相对较低,对反应容器或设备要求低,催化效率高并且最主要的是对环境的污染很小。

[0004] 木聚糖酶在自然界中分布极广,其中微生物来源的木聚糖酶是目前实际应用和研究中最常用的材料。木聚糖酶主要分布在糖苷水解酶的第5、7、8、10、11、30和43家族,而这其中,对于第10、11家族的木聚糖酶改良报道最多,研究也相对透彻。第11家族木聚糖酶催化活力相对较高,但稳定性普遍较差;而第10家族木聚糖酶热稳定性较好,但催化效率较低,尤其是在动物体温(40℃)条件下的催化效率很低,几乎检测不到,使其难以应用于饲料工业。

[0005] 而在此前,木聚糖酶的热稳定性改造已经有许多成功的案例,比如Wang等人把二硫键引入到木聚糖酶的N末端和手指区域(Finger domain)之间,使酶的T_m值提高了8℃(Wang Q,Zhao LL,Sun JY,2012,28(3):929-935);Zhang等人将耐热性强的木聚糖酶的N端替换到其他中温木聚糖酶的N端,使酶的T_m值提高了34℃(Zhang H,Li J,Wang J,et al.2014,7(1):3-13.)。对来源于自然生物资源的酶进行分子水平的改造才能获得性质优良的木聚糖酶,科学家主要通过参考组成蛋白质的氨基酸序列和真实结构或通过同源建模获得的模拟结构以及蛋白质的功能等信息,对自然界的酶采取理性、半理性或随机定向进化、突变、区段重组、构建杂合体以及活性位点突变技术等方法进行研究。

[0006] 在此之前,木聚糖酶的热稳定性改良研究已经报道了大量的研究成果,但至今却没有一个较为通用的方法或者普适性的理论,而且大部分成功案例中都会出现类似的问题,那就是酶的热稳定性和酶活力两者无法兼顾,即热稳定性提高的同时会伴随着酶活性的损失。

发明内容

[0007] 解决的技术问题:针对上述技术问题,本发明提供一种动物体温(40℃)条件下高比活耐热木聚糖酶突变体及其应用,该突变体为木聚糖酶活性loop区上的氨基酸位点突变后得到的突变体。

[0008] 技术方案:一种动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体,以木聚糖酶野生型GtXyn10的核苷酸序列SEQ ID NO.7为基础,选择突变位点R进行突变得木聚糖酶突变体:当突变位点R为G92C时,木聚糖酶突变体为GtXyn10-G92C,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;当突变位点R为Q99S时,木聚糖酶突变体为GtXyn10-Q99S,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;当突变位点R为G92C/Q99S时,木聚糖酶突变体为GtXyn10-G92C/Q99S,其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0009] 编码木聚糖酶突变体GtXyn10-G92C的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;编码木聚糖酶突变体GtXyn10-Q99S的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;编码木聚糖酶突变体GtXyn10-G92C/Q99S的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0010] 一种重组载体,含有SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。

[0011] 一种重组菌株,含有上述的载体。

[0012] 上述动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体在制备饲料添加剂中的应用。

[0013] 上述动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体在降解木质纤维素上的应用。

[0014] 动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体的构建方法,包括以下步骤:

[0015] 1) 采用over-lap PCR的方法扩增高催化效率木聚糖酶突变体序列片段;

[0016] 2) 将木聚糖酶突变体序列片段克隆到表达载体pPIC9r的EcoR I和Not I限制性酶切位点之间,获得重组质粒;

[0017] 3) 将突变体重组质粒转化毕赤酵母GS115感受态,诱导表达,获得突变菌株;

[0018] 4) 培养突变菌株,诱导重组木聚糖酶表达;

[0019] 5) 回收并纯化所表达的高比活木聚糖酶突变体。

[0020] 有益效果:本发明提供一种性质优良的、适合于动物体温(40℃)条件下催化木质纤维素的木聚糖酶突变体。该木聚糖酶突变体的最适pH值在3.5-4.5之间,与野生型相比变化不大,但是在40℃条件下的比活力分别是野生型的1.8倍、1.7倍和2.4倍。动物肠道体温环境在40℃左右,酶在40℃下的催化活力提高有利于该酶在动物消化道中更好的发挥降解功能;且90℃下的热稳定性均比野生酶有不同程度的提高,动物饲料制粒过程中有一段瞬时高温过程(80-90℃,10s),酶在90℃下的热稳定性提高,有利于酶抵抗高温制粒过程,最后不至于失活;这样一种在酸性pH环境和动物体温条件下有较高酶活力且在高温条件下稳定的木聚糖酶被认为是饲料行业中性质优良的饲料添加用酶,有着非常广阔的应用前景。相对于通过盲目筛菌或人工(自然)诱变等手段获得适用于工业生产的木聚糖酶,酶分子改良缩短了酶学性质改造时间。这样一种在酸性pH环境和中低温范围内保持稳定并具有高酶活的木聚糖酶突变体可用于降解木质纤维素,生产还原糖,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0021] 图1为40℃下高比活木聚糖酶突变体与野生型的最适pH;

[0022] 图2为40℃下高比活木聚糖酶突变体与野生型的pH稳定性;

- [0023] 图3为高比活木聚糖酶突变体与野生型的最适温度；
 [0024] 图4为70℃下高比活木聚糖酶突变体与野生型的热稳定性；
 [0025] 图5为80℃下高比活木聚糖酶突变体与野生型的热稳定性。

具体实施方式

[0026] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步描述。

[0027] 1、菌株及载体：表达宿主 *Pichia pastoris* GS115，表达质粒载体 pPIC9r 从 Invitrogen 公司购买；

[0028] 2、酶类及其它生化试剂：内切酶购自 Fermentas 公司，连接酶购自 Promega 公司，大麦葡聚糖购自 Sigma 公司；其它都为国产分析纯试剂（均从国药集团购买）；

[0029] 3、培养基：

[0030] (1) LB培养基：0.5%酵母提取物，1%蛋白胨，1%NaCl，pH 7.0；

[0031] (2) YPD培养基：1%酵母提取物，2%蛋白胨，2%葡萄糖；

[0032] (3) MD固体培养基：2%葡萄糖，1.5%琼脂糖，1.34%YNB，0.00004%Biotin；

[0033] (4) MM固体培养基：1.5%琼脂糖，1.34%YNB，0.00004%Biotin，0.5%甲醇；

[0034] (5) BMGY培养基：1%酵母提取物，2%蛋白胨，1%甘油 (V/V)，1.34%YNB，0.00004%Biotin；

[0035] (6) BMMY培养基：1%酵母提取物，2%蛋白胨，1.34%YNB，0.00004%Biotin，0.5%甲醇 (V/V)。

[0036] 实施例1高比活木聚糖酶突变体编码基因的克隆

[0037] 以来源于GH10家族高温木聚糖酶基因 GtXyn10 为父本，在木聚糖酶的 loop 区域处设计突变引物，采用 over-lap PCR 的方法扩增高催化效率木聚糖酶突变体编码基因 SEQ ID NO.1 (GtXyn10-G92C)，SEQ ID NO.2 (GtXyn10-Q99S)，SEQ ID NO.3 (GtXyn10-G92C/Q99S)，突变方法以及克隆方法参考文献 (You, et al., 2016)。

[0038] 所用引物序列如表1所示：

[0039] 表1引物合成清单

Primers	Sequences (5'→3') ^a	Size (bp)
F-ECOR1	GTAGAATTCTCACCCCTCGCACGGCAACT	29
R-NotI	TTCGCGGCCGCTCAAGCGAGCAAGGCCTG	29
[0040] G92C-F	CTATGTCCTGCGCTGTCACAATCT	29
G92C-R	ACAGCGCAGGACATAGTCGTTGGC	24
Q99S-F	CTGGTACTCTGAGCTCGCACCGTG	24
Q99S-R	AGCTCAGAGTACCAGACGAGATTG	24

[0041] 实施例2高比活木聚糖酶突变体的制备

[0042] 将表达载体pPIC9r进行双酶切(EcoR I+Not I),同时将编码高比活木聚糖酶突变体的基因双酶切(EcoR I+Not I),再将酶切后编码成熟高比活木聚糖酶突变体的基因片段与表达载体pPIC9r连接,获得含有高比活木聚糖酶突变体基因的重组质粒并转化毕赤酵母GS115,获得重组酵母菌株。

[0043] 取含有重组质粒的GS115菌株,接种于300mL BMGY培养基的1L三角瓶中,置于30℃,220rpm摇床培养48h;后将培养液3000g离心5min,弃上清,沉淀用100mL含有0.5%甲醇的BMMY培养基重悬,并再次置于30℃,220rpm条件下诱导培养。每隔12h补加0.5mL甲醇,使菌液中的甲醇浓度保持在0.5%,同时取上清用于酶活检测。

[0044] 实施例3重组高比活木聚糖酶突变体和野生型的活性分析

[0045] 一、DNS法:具体方法如下:在给定的pH、温度条件下,1mL的反应体系包括100μL酶液,900μL底物,反应10min,加入1.5mL DNS终止反应,沸水煮5min。冷却后540nm测定OD值。1个酶活单位(U)定义为在给定的条件下,每分钟分解木聚糖生成1μmol还原糖所需的酶量。

[0046] 二、重组高比活木聚糖酶突变体和野生型的性质测定

[0047] 1、重组高比活木聚糖酶突变体和野生型的最适pH测定如下:

[0048] 将实施例2纯化的重组高比活木聚糖酶突变体和野生型在不同的pH下进行酶促反应以测定其最适pH。用不同pH的0.1mol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液稀释底物(桦木木聚糖)并在75℃下进行木聚糖酶活力测定。

[0049] 结果(图1)表明,重组高比活木聚糖酶突变体和野生型的最适反应pH值在3.5-4.5之间,且在pH3.0-7.0范围内有相同的作用趋势(图2)。符合不改变最适pH值提高较低温度下比活力的目的。

[0050] 2、重组高比活木聚糖酶突变体和野生型的最适温度测定如下:

[0051] 重组高比活木聚糖酶突变体和野生型的最适温度测定为在0.1mol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 3.5)缓冲液体系及不同温度下进行酶促反应。酶促反应最适温度测定结果(图3)表明,重组高比活木聚糖酶突变体与野生型的最适温在70℃-80℃之间,彼此相差无明显。

[0052] 3、重组高比活木聚糖酶突变体和野生型在70℃和80℃的热稳定性测定如下:

[0053] 将高比活木聚糖酶突变体和野生型在70℃和80℃下分别处理一定时间,另外保证处理时所有突变体和野生型的浓度为100μg/mL,体积为100μL,在不同时间点取样后迅速置于冰上,并在75℃、pH 4.0的条件下测定酶活性,用来衡量突变体和野生型的热稳定性情况。

[0054] 所有突变体的热稳定性均优于野生型,70℃下处理30min后,三个突变体的剩余酶活分别是野生型的1.1倍、1.5倍和1.5倍(如图4);80℃下处理20min后,三个突变体的剩余酶活分别是野生型的1.2倍、1.2倍和1.4倍(如图5)。测定结果显示,所有突变体在70℃和80℃下的热稳定性均优于野生型。

[0055] 4、重组高比活木聚糖酶突变体和野生型的动力学参数测定方法如下:

[0056] 重组高比活木聚糖酶突变体和野生型在40℃下的比活测定方法为经典的DNS法(Miller et al.,1959)。操作方法为:首先将酶液稀释到合适的稀释倍数,一般来讲木聚糖酶以桦木木聚糖为底物测定时ΔOD在0.6-1.0之间,将100μL稀释好的酶液与900μL浓度为

1%的底物混合,底物中含有适当pH的缓冲液,混合好后将玻璃管放在要求的温度下孵育10min,加入1.5ml DNS来终止反应的进行,对照组先加入1.5ml DNS后再补加100 μ L酶液,最后在沸水中煮五分钟,冷却后再在540nm下测定吸光度。对蛋白进行定量后,计算出相应的比活力。

[0057] 重组木聚糖酶在毕赤酵母中得到了表达。所表达的木聚糖酶经过纯化之后,其蛋白质的含量达到总蛋白的95%以上。以榉木木聚糖为底物时,重组高比活木聚糖酶突变体和野生型40℃下的比活分别为440U/mg、420U/mg、590U/mg和250U/mg,突变体分别是野生型的1.8倍、1.7倍和2.4倍,其中突变体G92C/Q99S的比活高于目前报道的大部分GH10家族木聚糖酶(表2)。

[0058] 表2野生酶和突变体的比活力和催化效率比较

Enzymes	K_m	V_{max}	k_{cat}/K_m	Specific activity
	(mg/mL)	(μ mol/min $\cdot$ mg)	(mL/s $\cdot$ mg)	(U/mg)
WT	3.2 ± 0.25	271 ± 30	52 ± 5	251 ± 11
[0059] G92C	2.6 ± 0.21	456 ± 51	106 ± 9	440 ± 27
Q99S	2.4 ± 0.18	428 ± 32	260 ± 15	417 ± 23
G92C/Q99S	2.0 ± 0.17	595 ± 47	361 ± 21	587 ± 76

[0060] 以上描述仅为本发明的实施例,谅能理解,在不偏离本发明构思的前提下,对本发明的简单修改和替换皆应包含在本发明的技术构思之内。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 江苏科技大学
[0003]	<120> 动物体温下高比活耐热木聚糖酶突变体及其应用
[0004]	<160> 12
[0005]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 987
[0008]	<212> DNA
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0010]	<400> 1
[0011]	tcaccctcg cacggcaact gccacgtcc cgttcgaga cgctgagggc agcagcggca 60
[0012]	ccgcgctact ttggtgcagc tctgggtgtc cccacctgt tgaatttcac gcatgatccg 120
[0013]	ctgtttgatg tgactgctgt cttgcagttc aacggtgcc aagcggagaa cgagatgaaa 180
[0014]	tgggcgtaca tcgagccgga gcggaaccag ttcaacttta ctggtggcga catcgttgct 240
[0015]	gcgttctccg ccgccaacga ctatgtcctg cgtgtgcaca atctcgtctg gtaccaggag 300
[0016]	ctcgcaccgt ggggtggagac cctgacgggt gaggacctat ggaacgctac tgtgaatcac 360
[0017]	atcacgactg tgatgacaca ctacaaggag agcttcaata tctacgcttg ggacgttgct 420
[0018]	aacgaggctt tcaacgacaa cggtacctac cgggagaacg tttggtacac ccagctcgga 480
[0019]	ccgattaca tcccgaacgc gtacgccgta gccagatccg tgaacacgcc gtctaagctg 540
[0020]	tacatcaacg actacaatac tgagggcata aacaacaagt ccgatgcact gctcgccgtt 600
[0021]	gtgcagagca tgaaagcaca taacttggtt gacgggtgtt gcttccaatg ccacttcttc 660
[0022]	gtcggcgagc tcccccgga cctcgagcag aacttcgcgc ggtttgtggc cgcgggcgtc 720
[0023]	gagatcgccg tcaccgaact cgatatcagg atgaacctcc cgccttcaca ggctgacatt 780
[0024]	gagcagcagg cccgcgacta cgccacagtc gtgaatgcat gcaaatcaca ggggtgctgcc 840
[0025]	tgcgttgga tcaccacctg gggatatcacc gacctttact catggattcc ctccacgtat 900
[0026]	cccggcgagg gatatgccct gctcttcgat gacaattatg ttccccaccc ggcaattcaat 960
[0027]	gcgactattc aggccttgct cgcttga 987
[0028]	<210> 2
[0029]	<211> 987
[0030]	<212> DNA
[0031]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0032]	<400> 2
[0033]	tcaccctcg cacggcaact gccacgtcc cgttcgaga cgctgagggc agcagcggca 60
[0034]	ccgcgctact ttggtgcagc tctgggtgtc cccacctgt tgaatttcac gcatgatccg 120
[0035]	ctgtttgatg tgactgctgt cttgcagttc aacggtgcc aagcggagaa cgagatgaaa 180
[0036]	tgggcgtaca tcgagccgga gcggaaccag ttcaacttta ctggtggcga catcgttgct 240
[0037]	gcgttctccg ccgccaacga ctatgtcctg cgcggtcaca atctcgtctg gtactctgag 300
[0038]	ctcgcaccgt ggggtggagac cctgacgggt gaggacctat ggaacgctac tgtgaatcac 360

[0039]	atcacgactg tgatgacaca ctacaaggag agcttcaata tctacgcttg ggacgttgtc	420
[0040]	aacgaggctt tcaacgacaa cggtacctac cgggagaacg tttggtacac ccagctcgga	480
[0041]	ccgattaca tcccgaacgc gtacgccgta gccagatccg tgaacacgcc gtctaagctg	540
[0042]	tacatcaacg actacaatac tgagggcac tacaacaagt ccgatgcact gctcgccgtt	600
[0043]	gtgcagagca tgaaagcaca taacttgggt gacgggtgtg gcttccaatg ccacttcttc	660
[0044]	gtcggcgagc tcccccgga cctcgagcag aacttcgcgc gggttgtggc cgcgggcgtc	720
[0045]	gagatcgccg tcaccgaact cgatatcagg atgaacctcc cgccttcaca ggctgacatt	780
[0046]	gagcagcagg cccgcgacta cgccacagtc gtgaatgcat gcaaatcaca gggtgctgcc	840
[0047]	tgcgttggga tcaccacctg gggatcacc gacctttact catggattcc ctccacgtat	900
[0048]	ccggcgagg gatatgccct gctcttcgat gacaattatg ttccccaccc ggcattcaat	960
[0049]	gcgactattc aggccttgct cgcttga	987
[0050]	<210> 3	
[0051]	<211> 987	
[0052]	<212> DNA	
[0053]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0054]	<400> 3	
[0055]	tcaccctcg cacggcaact gccacgtcc ccgttcgaga cgctgagggc agcagcggca	60
[0056]	ccgcgctact ttggtgcagc tctgggtgtc cccacctgt tgaatttcac gcatgatccg	120
[0057]	ctgtttgatg tgactgctgt cttgcagttc aacgggtgcca cgcggagaa cgagatgaaa	180
[0058]	tgggcgtaca tcgagccgga gcggaaccag ttcaacttta ctgggtggcga catcgttgct	240
[0059]	gcgttctccg ccgccaacga ctatgtcctg cgctgtcaca atctcgtctg gtactctgag	300
[0060]	ctcgcaccgt ggggtggagac cctgacgggt gaggacctat ggaacgctac tgtgaatcac	360
[0061]	atcacgactg tgatgacaca ctacaaggag agcttcaata tctacgcttg ggacgttgtc	420
[0062]	aacgaggctt tcaacgacaa cggtacctac cgggagaacg tttggtacac ccagctcgga	480
[0063]	ccgattaca tcccgaacgc gtacgccgta gccagatccg tgaacacgcc gtctaagctg	540
[0064]	tacatcaacg actacaatac tgagggcac tacaacaagt ccgatgcact gctcgccgtt	600
[0065]	gtgcagagca tgaaagcaca taacttgggt gacgggtgtg gcttccaatg ccacttcttc	660
[0066]	gtcggcgagc tcccccgga cctcgagcag aacttcgcgc gggttgtggc cgcgggcgtc	720
[0067]	gagatcgccg tcaccgaact cgatatcagg atgaacctcc cgccttcaca ggctgacatt	780
[0068]	gagcagcagg cccgcgacta cgccacagtc gtgaatgcat gcaaatcaca gggtgctgcc	840
[0069]	tgcgttggga tcaccacctg gggatcacc gacctttact catggattcc ctccacgtat	900
[0070]	ccggcgagg gatatgccct gctcttcgat gacaattatg ttccccaccc ggcattcaat	960
[0071]	gcgactattc aggccttgct cgcttga	987
[0072]	<210> 4	
[0073]	<211> 328	
[0074]	<212> PRT	
[0075]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0076]	<400> 4	
[0077]	Ser Pro Leu Ala Arg Gln Leu Pro Thr Ser Pro Phe Glu Thr Leu Arg	

[0078]	1	5	10	15
[0079]	Ala Ala Ala Ala Pro Arg Tyr Phe Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro His			
[0080]	20	25	30	
[0081]	Leu Leu Asn Phe Thr His Asp Pro Leu Phe Asp Val Thr Ala Val Leu			
[0082]	35	40	45	
[0083]	Gln Phe Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Glu Met Lys Trp Ala Tyr Ile			
[0084]	50	55	60	
[0085]	Glu Pro Glu Arg Asn Gln Phe Asn Phe Thr Gly Gly Asp Ile Val Ala			
[0086]	65	70	75	80
[0087]	Ala Phe Ser Ala Ala Asn Asp Tyr Val Leu Arg Cys His Asn Leu Val			
[0088]	85	90	95	
[0089]	Trp Tyr Gln Glu Leu Ala Pro Trp Val Glu Thr Leu Thr Gly Glu Asp			
[0090]	100	105	110	
[0091]	Leu Trp Asn Ala Thr Val Asn His Ile Thr Thr Val Met Thr His Tyr			
[0092]	115	120	125	
[0093]	Lys Glu Ser Phe Asn Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe			
[0094]	130	135	140	
[0095]	Asn Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Glu Asn Val Trp Tyr Thr Gln Leu Gly			
[0096]	145	150	155	160
[0097]	Pro Asp Tyr Ile Pro Asn Ala Tyr Ala Val Ala Arg Ser Val Asn Thr			
[0098]	165	170	175	
[0099]	Pro Ser Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Thr Glu Gly Ile Asn Asn			
[0100]	180	185	190	
[0101]	Lys Ser Asp Ala Leu Leu Ala Val Val Gln Ser Met Lys Ala His Asn			
[0102]	195	200	205	
[0103]	Leu Val Asp Gly Val Gly Phe Gln Cys His Phe Phe Val Gly Glu Leu			
[0104]	210	215	220	
[0105]	Pro Pro Asp Leu Glu Gln Asn Phe Ala Arg Phe Val Ala Ala Gly Val			
[0106]	225	230	235	240
[0107]	Glu Ile Ala Val Thr Glu Leu Asp Ile Arg Met Asn Leu Pro Pro Ser			
[0108]	245	250	255	
[0109]	Gln Ala Asp Ile Glu Gln Gln Ala Arg Asp Tyr Ala Thr Val Val Asn			
[0110]	260	265	270	
[0111]	Ala Cys Lys Ser Gln Gly Ala Ala Cys Val Gly Ile Thr Thr Trp Gly			
[0112]	275	280	285	
[0113]	Ile Thr Asp Leu Tyr Ser Trp Ile Pro Ser Thr Tyr Pro Gly Glu Gly			
[0114]	290	295	300	
[0115]	Tyr Ala Leu Leu Phe Asp Asp Asn Tyr Val Pro His Pro Ala Phe Asn			
[0116]	305	310	315	320

[0117]	Ala Thr Ile Gln Ala Leu Leu Ala
[0118]	325
[0119]	<210> 5
[0120]	<211> 328
[0121]	<212> PRT
[0122]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0123]	<400> 5
[0124]	Ser Pro Leu Ala Arg Gln Leu Pro Thr Ser Pro Phe Glu Thr Leu Arg
[0125]	1 5 10 15
[0126]	Ala Ala Ala Ala Pro Arg Tyr Phe Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro His
[0127]	20 25 30
[0128]	Leu Leu Asn Phe Thr His Asp Pro Leu Phe Asp Val Thr Ala Val Leu
[0129]	35 40 45
[0130]	Gln Phe Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Glu Met Lys Trp Ala Tyr Ile
[0131]	50 55 60
[0132]	Glu Pro Glu Arg Asn Gln Phe Asn Phe Thr Gly Gly Asp Ile Val Ala
[0133]	65 70 75 80
[0134]	Ala Phe Ser Ala Ala Asn Asp Tyr Val Leu Arg Gly His Asn Leu Val
[0135]	85 90 95
[0136]	Trp Tyr Ser Glu Leu Ala Pro Trp Val Glu Thr Leu Thr Gly Glu Asp
[0137]	100 105 110
[0138]	Leu Trp Asn Ala Thr Val Asn His Ile Thr Thr Val Met Thr His Tyr
[0139]	115 120 125
[0140]	Lys Glu Ser Phe Asn Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe
[0141]	130 135 140
[0142]	Asn Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Glu Asn Val Trp Tyr Thr Gln Leu Gly
[0143]	145 150 155 160
[0144]	Pro Asp Tyr Ile Pro Asn Ala Tyr Ala Val Ala Arg Ser Val Asn Thr
[0145]	165 170 175
[0146]	Pro Ser Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Thr Glu Gly Ile Asn Asn
[0147]	180 185 190
[0148]	Lys Ser Asp Ala Leu Leu Ala Val Val Gln Ser Met Lys Ala His Asn
[0149]	195 200 205
[0150]	Leu Val Asp Gly Val Gly Phe Gln Cys His Phe Phe Val Gly Glu Leu
[0151]	210 215 220
[0152]	Pro Pro Asp Leu Glu Gln Asn Phe Ala Arg Phe Val Ala Ala Gly Val
[0153]	225 230 235 240
[0154]	Glu Ile Ala Val Thr Glu Leu Asp Ile Arg Met Asn Leu Pro Pro Ser
[0155]	245 250 255

[0156]	Gln Ala Asp Ile Glu Gln Gln Ala Arg Asp Tyr Ala Thr Val Val Asn
[0157]	260 265 270
[0158]	Ala Cys Lys Ser Gln Gly Ala Ala Cys Val Gly Ile Thr Thr Trp Gly
[0159]	275 280 285
[0160]	Ile Thr Asp Leu Tyr Ser Trp Ile Pro Ser Thr Tyr Pro Gly Glu Gly
[0161]	290 295 300
[0162]	Tyr Ala Leu Leu Phe Asp Asp Asn Tyr Val Pro His Pro Ala Phe Asn
[0163]	305 310 315 320
[0164]	Ala Thr Ile Gln Ala Leu Leu Ala
[0165]	325
[0166]	<210> 6
[0167]	<211> 328
[0168]	<212> PRT
[0169]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0170]	<400> 6
[0171]	Ser Pro Leu Ala Arg Gln Leu Pro Thr Ser Pro Phe Glu Thr Leu Arg
[0172]	1 5 10 15
[0173]	Ala Ala Ala Ala Pro Arg Tyr Phe Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro His
[0174]	20 25 30
[0175]	Leu Leu Asn Phe Thr His Asp Pro Leu Phe Asp Val Thr Ala Val Leu
[0176]	35 40 45
[0177]	Gln Phe Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Glu Met Lys Trp Ala Tyr Ile
[0178]	50 55 60
[0179]	Glu Pro Glu Arg Asn Gln Phe Asn Phe Thr Gly Gly Asp Ile Val Ala
[0180]	65 70 75 80
[0181]	Ala Phe Ser Ala Ala Asn Asp Tyr Val Leu Arg Cys His Asn Leu Val
[0182]	85 90 95
[0183]	Trp Tyr Ser Glu Leu Ala Pro Trp Val Glu Thr Leu Thr Gly Glu Asp
[0184]	100 105 110
[0185]	Leu Trp Asn Ala Thr Val Asn His Ile Thr Thr Val Met Thr His Tyr
[0186]	115 120 125
[0187]	Lys Glu Ser Phe Asn Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe
[0188]	130 135 140
[0189]	Asn Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Glu Asn Val Trp Tyr Thr Gln Leu Gly
[0190]	145 150 155 160
[0191]	Pro Asp Tyr Ile Pro Asn Ala Tyr Ala Val Ala Arg Ser Val Asn Thr
[0192]	165 170 175
[0193]	Pro Ser Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Thr Glu Gly Ile Asn Asn
[0194]	180 185 190

[0195]	Lys Ser Asp Ala Leu Leu Ala Val Val Gln Ser Met Lys Ala His Asn
[0196]	195 200 205
[0197]	Leu Val Asp Gly Val Gly Phe Gln Cys His Phe Phe Val Gly Glu Leu
[0198]	210 215 220
[0199]	Pro Pro Asp Leu Glu Gln Asn Phe Ala Arg Phe Val Ala Ala Gly Val
[0200]	225 230 235 240
[0201]	Glu Ile Ala Val Thr Glu Leu Asp Ile Arg Met Asn Leu Pro Pro Ser
[0202]	245 250 255
[0203]	Gln Ala Asp Ile Glu Gln Gln Ala Arg Asp Tyr Ala Thr Val Val Asn
[0204]	260 265 270
[0205]	Ala Cys Lys Ser Gln Gly Ala Ala Cys Val Gly Ile Thr Thr Trp Gly
[0206]	275 280 285
[0207]	Ile Thr Asp Leu Tyr Ser Trp Ile Pro Ser Thr Tyr Pro Gly Glu Gly
[0208]	290 295 300
[0209]	Tyr Ala Leu Leu Phe Asp Asp Asn Tyr Val Pro His Pro Ala Phe Asn
[0210]	305 310 315 320
[0211]	Ala Thr Ile Gln Ala Leu Leu Ala
[0212]	325
[0213]	<210> 7
[0214]	<211> 29
[0215]	<212> DNA
[0216]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0217]	<400> 7
[0218]	gtagaattct caccctcgc acggcaact 29
[0219]	<210> 8
[0220]	<211> 29
[0221]	<212> DNA
[0222]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0223]	<400> 8
[0224]	ttcgcgccg ctcaagcgag caaggcctg 29
[0225]	<210> 9
[0226]	<211> 24
[0227]	<212> DNA
[0228]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0229]	<400> 9
[0230]	ctatgtcctg cgctgtcaca atct 24
[0231]	<210> 10
[0232]	<211> 24
[0233]	<212> DNA

- [0234] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0235] <400> 10
[0236] acagcgcagg acatagtcgt tggc 24
[0237] <210> 11
[0238] <211> 24
[0239] <212> DNA
[0240] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0241] <400> 11
[0242] ctggtactct gagctcgac cgtg 24
[0243] <210> 12
[0244] <211> 24
[0245] <212> DNA
[0246] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0247] <400> 12
[0248] agctcagagt accagacgag attg 24

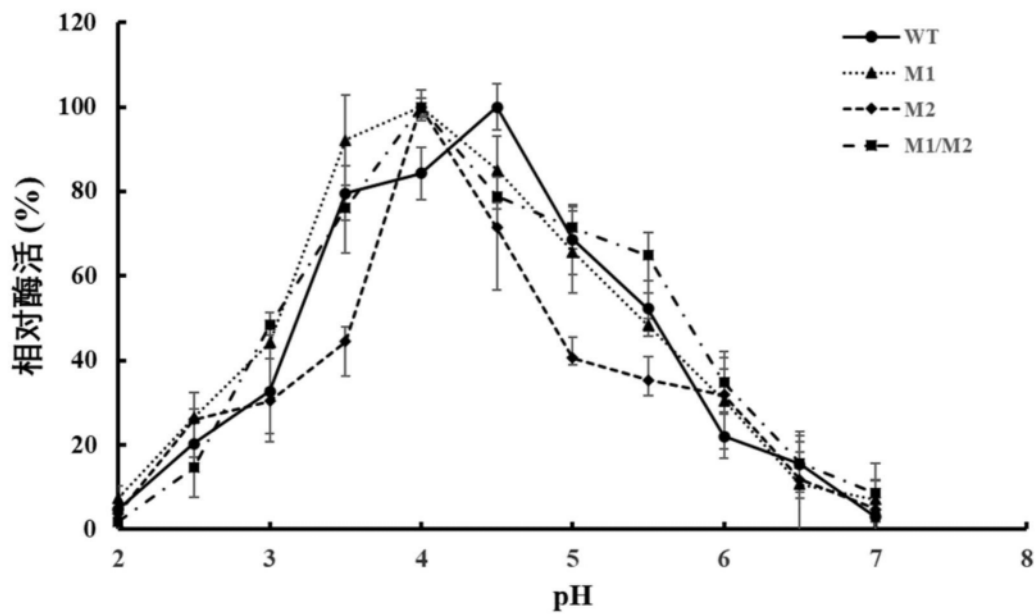


图1

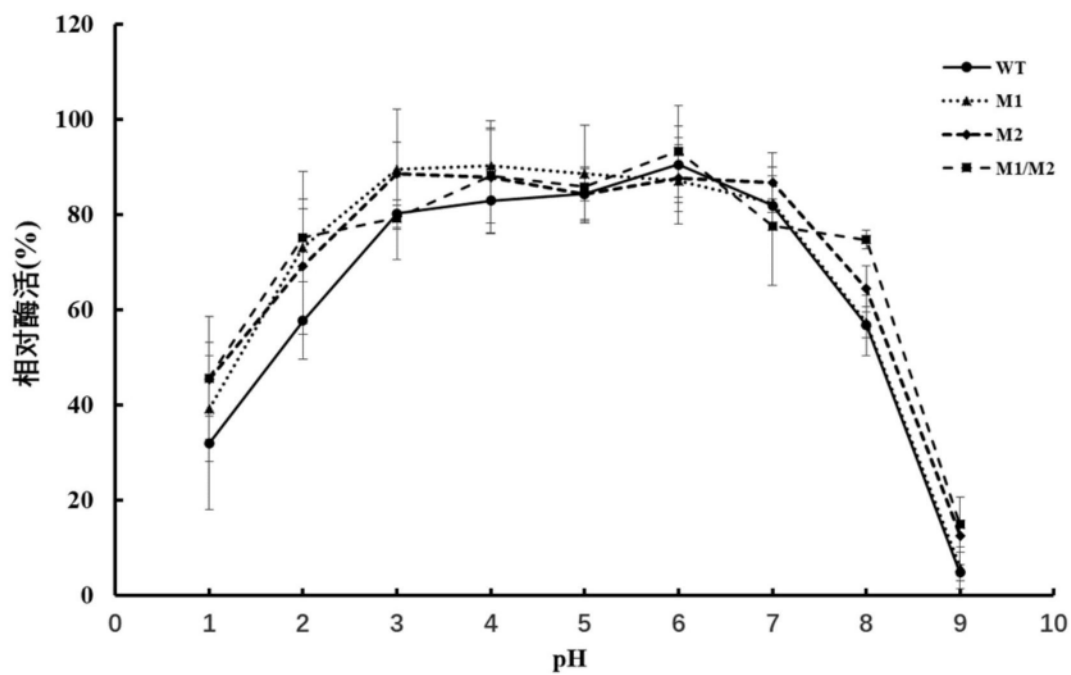


图2

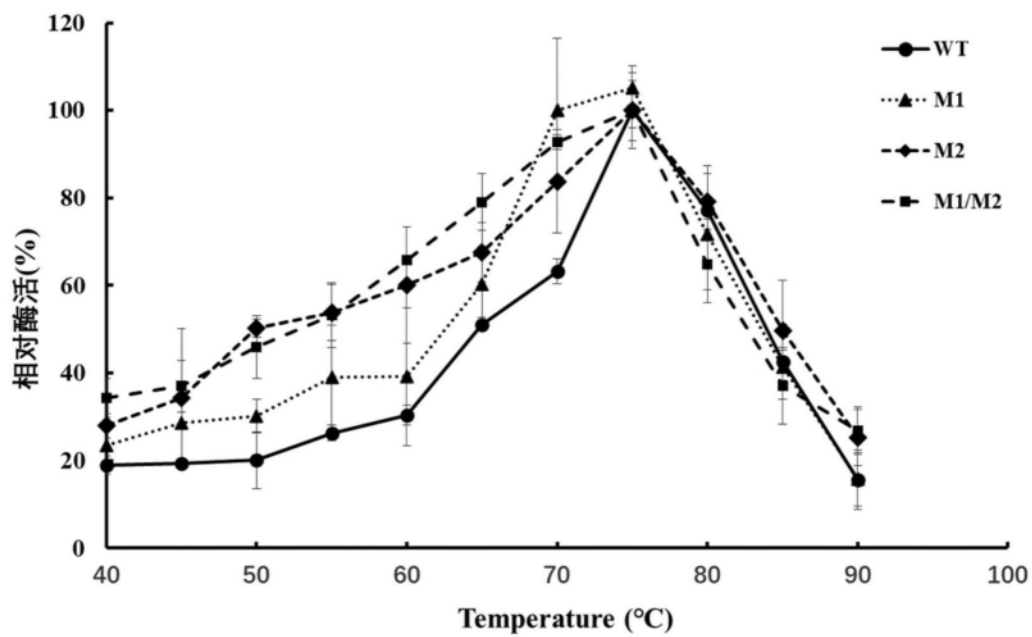


图3

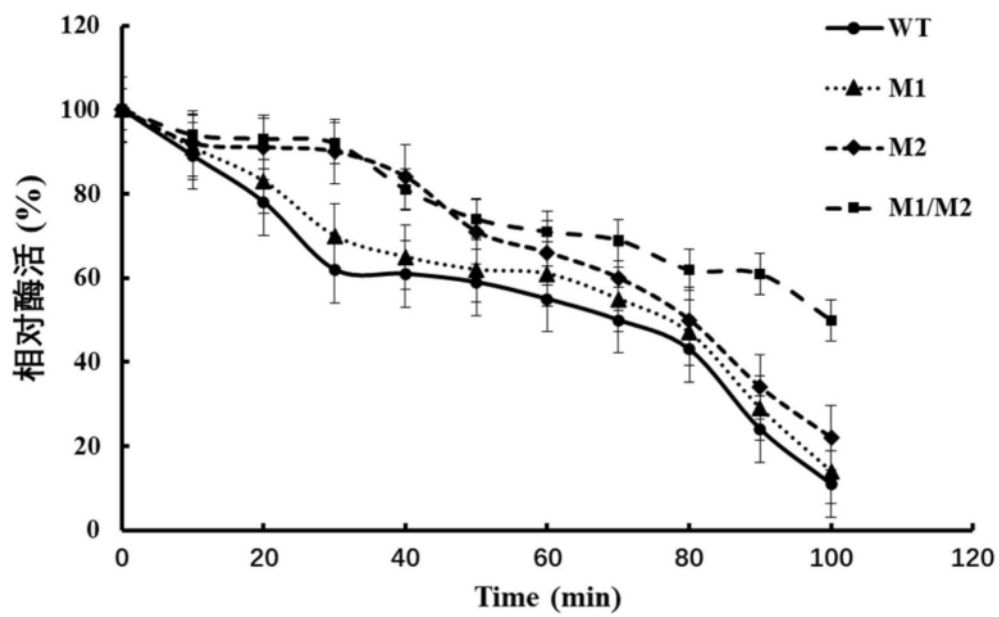


图4

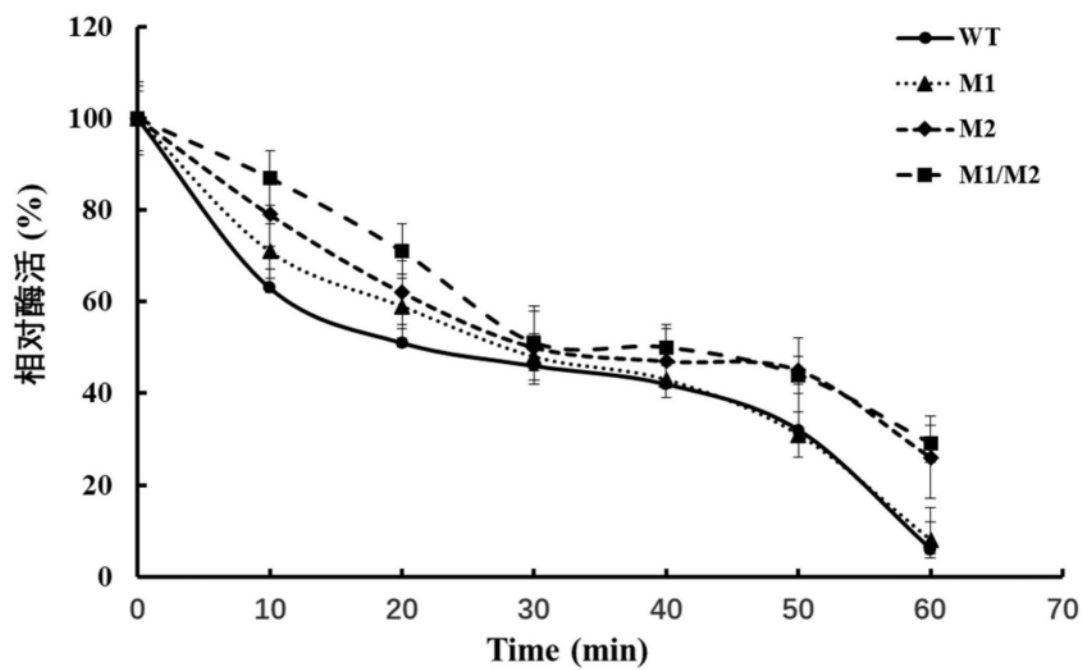


图5