

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 25/00

C12N 15/00 C12N 15/31



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96195479.5

[43] 授权公告日 2003 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1110569C

[22] 申请日 1996.7.10 [21] 申请号 96195479.5

[30] 优先权

[32] 1995.7.13 [33] DE [31] 19525281.0

[32] 1995.12.6 [33] DE [31] 19545468.5

[86] 国际申请 PCT/EP96/03009 1996.7.10

[87] 国际公布 WO97/03208 德 1997.1.30

[85] 进入国家阶段日期 1998.1.13

[71] 专利权人 巴斯福股份公司

地址 联邦德国路德维希港

共同专利权人 尤里西研究中心有限公司

[72] 发明人 B·卡斯尔 H·萨姆

K-P·斯塔曼 G·施密德

T·博德克尔 H·瑟尔伯格

[56] 参考文献

EP405370A 1991.01.02 C12P25/00

审查员 王文庆

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 陈文平

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 8 页

[54] 发明名称 利用异柠檬酸裂合酶活性被改变的
微生物制备核黄素

[57] 摘要

本发明公开了核黄素的一种微生物制备方法，其中先把生产核黄素的微生物在营养培养基中培养，然后分离产生的核黄素，它包括应用内源性异柠檬酸裂合酶(ICL)活性被改变的微生物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 核黄素的一种微生物制备方法，其中先把生产核黄素的微生物在营养培养基中培养，然后分离产生的核黄素，它包括应用内源性异柠檬酸裂合酶活性被改变的微生物。

2. 根据权利要求1的方法，其中通过内源性异柠檬酸裂合酶基因的突变，该微生物显示出一种有较高异柠檬酸裂合酶活性的酶。

3. 根据权利要求1的方法，其中通过异柠檬酸裂合酶基因拷贝数的增加，该微生物有更高的异柠檬酸裂合酶基因表达。

4. 根据权利要求1的方法，其中异柠檬酸裂合酶基因已与增强异柠檬酸裂合酶基因表达的调节性DNA序列功能性连接。

5. 根据权利要求1的方法，其中使用耐受异柠檬酸裂合酶抑制性物质的微生物。

6. 根据权利要求5的方法，其中微生物耐受衣康酸和草酸。

7. 根据权利要求1到6任一项的方法，其中真菌被用作微生物。

8. 根据权利要求7的方法，其中来自阿舒囊霉属的真菌被用作微生物。

9. 一种异柠檬酸裂合酶基因，其编码 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列。

10. 一种包含根据权利要求9的异柠檬酸裂合酶基因的基因组建物。

11. 根据权利要求10的基因组建物，其中异柠檬酸裂合酶基因已与一个或多个增强基因表达的调节信号功能性连接。

利用异柠檬酸裂合酶活性被改变的微生物制备核黄素

本发明涉及核黄素的一种微生物制备方法，其中该微生物含活性被改变的异柠檬酸裂合酶。

维生素 B₂，亦称核黄素，是人和动物体的必需成分。维生素 B₂ 缺乏会导致口腔和咽部黏膜炎症、口角裂口、皮肤皱褶处发痒和炎症及类似的皮肤损伤、结膜炎、视敏度下降和角膜浑浊。婴幼儿中可能发生生长停滞和体重下降。因此维生素 B₂ 作为一种用于维生素缺乏和食品添加剂的维生素制剂具有特别的经济价值。另外，它亦用做食品染色剂，例如蛋黄酱，冰激凌，餐末点心如牛奶冻中等等。

核黄素可以化学制备或微生物制备。在化学制备方法中，核黄素常作为一种纯净的终产物经多步程序得到，其中需要使用相对昂贵的起始化合物，例如 D-核糖。

应用微生物制备核黄素提供了化学制备这种化合物的一种替代途径。可再生的原材料，如植物油类，可以用做微生物合成的起始化合物。

通过发酵真菌如棉阿舒囊霉 (*Ashbya gossypii*) 或阿舒假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) 制备核黄素已有公开报道 (默克索引 (The Merck Index) , Windholz 等编, Merck & Co., 1183 页, 1983); 然而酵母, 如念珠菌属和酵母属, 和细菌, 如梭状芽胞杆菌亦适合制造核黄素。过量产生核黄素的菌株已被描述过, 如在 EP 405370 中就谈到可以通过转化来自枯草芽孢杆菌的核黄素生物合成基因而得到它们。然而, 这些原核基因不适合于用真核生物如酿酒酵母或棉阿舒囊霉制备核黄素的重组方法。

WO 93/03183描述的是从真核生物如酿酒酵母克隆核黄素生物合成特异性基因。这些基因可用来构建重组真核微生物使其有效地生成核黄素。

然而常常是因为起始化合物和核黄素生物合成酶的底物在微生物体内数量有限，导致尽管核黄素生物合成活性增加，核黄素产量并不高。

因此本发明的目的即提供一种改良的制备核黄素的微生物方法，这种方法应用那些无底物限制或仅有轻微底物限制的微生物，从而使核黄素以更高的速率生产出来。

依据本发明，通过改变所用微生物体内的内源性异柠檬酸裂合酶活性，已经达到以上目的。这种活性改变可以与未改变活性的起始株比较得到测定。有很大范围的选择自由来得到 ICL 活性改变的微生物。

一种选择是改变内源性 ICL 基因，使其编码的酶与起始酶相比 ICL 活性增加。增加酶活性可以通过，如改变催化中心而增加底物转化，消除酶抑制剂影响，而达到目的。也可以增加酶本身的合成来增加酶活性，例如通过基因扩增或通过消除抑制酶生物合成的因素。内源性 ICL 活性增加优选通过促使内源性 ICL 基因突变而完成。这种性质的突变可以是采用标准方法，如紫外线照射或致突变的化学物质引起的随机突变；也可以是采用基因工程方法，如缺失，插入，或取代引起的特异性突变。

ICL 基因表达的增强可以通过增加 ICL 基因的拷贝数和/或增强对 ICL 基因表达起正性调节的调控因子。这样，调控因子优选可在转录水平通过使用强转录信号如启动子和增强子来增强。然而，也可例如通过提高 mRNA 的稳定性来增强翻译。为了增加基因拷贝数，ICL 基因可以掺入一个基因组建物或载体中，此基因组建物或载体优选含一个可作用于 ICL 基因的调控基因序列，特别用来增强基因表达。然后，用此含 ICL 基因基因组建物转化产生核黄素的微生物。

优选从微生物中分离 ICL 基因，尤其是从真菌棉阿舒囊霉。然而其他

生物，若其细胞内含有乙醛酸循环的回补序列，因而含异柠檬酸裂合酶，植物也一样，都适合从中分离 ICL 基因。分离 ICL 基因可以通过与 ICL 基因中的缺损突变体同源或异源互补，或异源探针，或用异源引物进行 PCR 而完成。关于亚克隆，互补质粒中插入子的大小可以通过适宜的限制酶酶切而减到最小。此推定基因经测序和确认后，通过融合 PCR 的方法，以精确的装配方式被亚克隆。所得片段以插入子形式插入质粒中。携带该片段的质粒导入 ICL 基因缺陷突变体，然后检测该突变体中 ICL 基因发挥功能的能力。最后，功能性组建物被用来转化核黄素生产菌。

分离和测序后，可以得到异柠檬酸裂合酶基因。此基因含有编码 SEQ ID NO: 2 给出的氨基酸序列或其等位变体的核苷酸序列。等位变体特别包括功能性衍生物，它们可由缺失、插入、取代 SEQ ID NO: 1 所示序列中的核苷酸而得到，不过仍然保留 ICL 活性。

一个具有 SEQ ID NO: 1 176-550 核苷酸之核苷酸序列的启动子或一个具有基本同样效应的 DNA 序列被刻意放在异柠檬酸裂合酶基因上游。这样，位于该基因上游的启动子能够通过一个或多个核苷酸取代，或（一个）多个插入和 / 或缺失与含指定核苷酸序列的启动子有所区别，但是此启动子的功能和效用不受损伤。而且，此启动子的效用可通过改变序列得到加强，或完全被更有效的启动子取代。

进一步讲，多个特别增加 ICL 基因活性的调节性基因序列或调控基因可被指定给 ICL 基因。因此，增强子可被指定给 ICL 基因，其通过增加 RNA 聚合酶和 DNA 的相互作用增强 ICL 基因的表达。

一个或多个 DNA 序列可被置于异柠檬酸裂合酶基因上游和 / 或下游，可伴有或不伴有上游启动子和 / 或调节基因，而使异柠檬酸裂合酶基因包含在一个基因结构中。

通过克隆 ICL 基因，有可能得到含 ICL 基因且如上文提到适于转化核

黄素生产菌的质粒或载体。那些通过转化得到的细胞，优选棉阿舒囊霉中，含有可复制基因，也就是说在染色体中有额外的相同拷贝。这些基因拷贝可通过同源重组整合在基因组任何想要的位点，和/或在质粒或载体中。

产生 ICL 活性改变的生产微生物的另一选择是制造那些耐受抑制 ICL 活性物质的微生物，并把它们选择出来。异柠檬酸裂合酶 (ICL) 抑制剂已为技术人员所知，并列举在如《酶抑制剂手册》 (Handbook of Enzyme Inhibitors) 第 291 页，编者：Hellmut Zollner, Verlag Chemie, Weinheim, 1993. 特别合适的抑制剂是磷酸烯醇丙酮酸 (PEP)，6 - 磷酸 - 葡萄糖酸和马来酸，尤其是衣康酸和草酸。

如果生产核黄素的微生物株在以上抑制剂存在的情况下培养，会令人吃惊地出现核黄素合成抑制。在培养板上，这可以通过形成不变黄色而仍保持白色的菌落得到显示。所以应用此系统，那些耐受异柠檬酸裂合酶抑制菌株可以迅速被辨认出来。因为这些菌株在抑制剂存在的情况下也能生产核黄素，从而形成黄色的菌落。这种性质的菌株可以通过自发突变形形成，也可以通过常规方法如化学方法或紫外线照射诱导出的合适突变形形成。如此就有可能得到向培养基分泌更多量核黄素的微生物株。具体得到的核黄素合成增加的抗性株是棉阿舒囊霉菌株，该菌株以保藏号 10067 保藏在 DSM [德国微生物保藏中心]。

这种新颖方法优选选用真菌作为微生物。合适的真菌例子列举在《印度化学工程》 (Indian Chem. Engr.), B 部, 37 卷, 第 1, 2 号 (1995) 第 15 页表 6 中。

那些属于皮契茄属、假囊酵母属和阿舒囊霉属，尤其是棉阿舒囊霉的微生物是特别合适的。

然而，除真菌以外的微生物，例如细菌，尤其是在《印度化学工程》，B 部, 137 卷, 1, 2 号 (1995) 第 16 页表 6 中列出的细菌，也可以使用。

实施例 1

棉阿舒囊霉基因组文库的构建

用 Wright 和 Philippsen 方法 (1991, 基因(Gene)109: 99 - 105) 分离染色体 DNA 用来构建基因组 DNA 文库。DNA 先用 Sau 3A 不完全消化, 再用蔗糖密度梯度分级分离。最长的片段 (图 4) 与 Bam HI 切割的大肠杆菌 / 酿酒酵母菌穿梭质粒 YEp352 (J. E. Hill 等, 1993, 酵母 (Yeast) 2; 163-167) 连接。用连接混合物转化大肠杆菌 DH5 a。在含氨苄青霉素和 X - Gal 的平板上, 3 6 0 0 个可辨认的白色克隆被分离出来。它们被认为是因为含有携带插入片段的质粒而呈白色的。当随机挑选其中 3 0 个克隆来研究时, 发现它们的确都含有质粒。这些质粒含有 7 - 8 Kb 的插入片段, 并且这些插入片段并不相同。这些情况从限制性酶切图谱上看一目了然。基于棉阿舒囊霉基因组有 7×10^3 Kb 大小, 因此每一个基因都存在于此基因文库中的几率是 9 7 % - 9 9 . 9 9 %。每 1 0 0 个克隆在琼脂平板上大量划线培养, 所含质粒随后制备成库。结果该基因文库包含了 3 6 个质粒库。

实施例 2

基因文库中携带 ICL1 片段的挑选

基因文库中的质粒制品被用来转化酿酒酵母 ICL1d ura3(fs) (E. Fernandez 等, 1992, 欧洲生化期刊 (Eur. J. Biochem.), 204: 983-990)。该突变株本身的 ICL1 基因遭到破坏, ura3 基因在本身的阅读框架上也存在突变。由于这样的基因型, 此株不能以乙醇作为碳源生长从而表现尿嘧啶营养缺陷。第一步, 被基因文库转化的酵母细胞在葡萄糖为其唯一碳源的基本培养基上筛选。由于 ura3 基因存在于质粒中, 仅有那些吸收了质粒的细胞能够生长。这是因为基本培养基内不含任何尿嘧啶。这一步得到了 1 9 0 0 个克隆。这些克隆通过复制铺板转移到含乙醇作为唯一碳源的基本培养基上。由于异柠檬酸裂合酶 (一种回补酶) 是在菌株靠乙醇生长时无条件需要的, 因此仅那些所含质粒携带了 ICL 基因的克隆能

够生长。这样分离到能够靠乙醇生长的两个克隆。

实施例 3

基因文库分离片段行使功能的能力检测

为了检测染色体 ICL 缺陷互补是否由质粒编码完成的, 所选酵母克隆在含尿嘧啶的完全培养基上培养两次。所得细胞在培养板上呈单菌落生长。在随机挑选的 16 和 13 个克隆中, 分别有 7 和 5 个克隆不再能够在含葡萄糖的基本培养基上生长, 同是这些克隆也不再能在含乙醇的基本培养基上生长。因此质粒消除就与 ICL1d 互补丧失联系起来。

质粒从两克隆之一被重新分离。它含大约 8 Kb 长的插入子。酵母突变株的重新转化导致发现的所有克隆都有互补现象。可以利用 SphI 把 8Kb 的片段缩短到具有全部功能的 2.9Kb 大小。

在依赖乙醇生长的转化体的粗提取物中, 发现了 0.3U/mg 蛋白质的特异性异柠檬酸裂合酶活性。另外, 应用抗阿舒囊霉 ICL 多克隆抗体, 蛋白质印迹法可显示出清楚的信号。

应用根据 ICL 胰蛋白酶分解肽推出的引物, PCR 显示了所期望大小片段的强信号。用双向凝胶电泳分离蛋白质。此蛋白质用胰蛋白酶分解成多肽。用 Edman 降解法对这些多肽行末端测序。把这些肽的序列与数据库中的相比发现, 它们与酿酒酵母异柠檬酸裂合酶有 70% 以上的一致性。根据这些序列设计的引物被用来进行 PCR。大约 8 Kb 互补基因文库片段的 3.3Kb 被测序 (Sanger 等, 美国科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 74(1977) 5463-5467)。经与数据库比较, 在已确定序列中发现了两个编码区。一个含 1680 个碱基的阅读框架 (SEQ ID NO:1) 与酿酒酵母 ICL1 基因有 65% 的一致性; ICL 基因处于一个与酿酒酵母 Ser-tRNA 序列有 84% 一致性的序列上游 375 个碱基部位 (SEQ ID No:1)。

实施例 4

亚克隆的 ICL 在大肠杆菌 / 酵母 / 阿舒囊霉穿梭质粒中发挥功能的能力

两个经限制性酶切得到的片段和一个分离的基因文库片段的 PCR 产物 (图 5) 被克隆进 pAG100 质粒 (图 6)。此质粒由 Steiner 和 Philippsen 构建 (1994, Mol. Gen. Genet 242: 263-271)。这两个片段是 2.9Kb 的 SphI 片段 (pAG100 icl.4) 和 2.2Kb 的 Bgl I/EcoRV 片段 (pAG100 icl.6)。这两个片段都含 Ser-tRNA。因此, 还进行了推定基因和融合的 Bam HI 切割位点 (pAG100 icl.8) 的 PCR 扩增。这三个 DNA 均被克隆进 pAG100 质粒的 Bam HI 位点。此质粒再用来转化酵母突变株酿酒酵母 ICL1d ura3(fs)。这三个构建物完全互补了 ICL1d 的缺陷。也就是说, 它们携带功能基因。

实施例 5

携带 ICL 的质粒对棉阿舒囊霉形成核黄素的影响

以上所述质粒对棉阿舒囊霉的转化 (方法: Wright 和 Philippsen, 1991, 基因 109: 99-105) 导致了核黄素形成显著增加。这些菌株在装有两个隔板的 500ml 摇瓶中培养。每瓶盛 50 ml 含 10g/L 大豆油, 10 g/L 酵母提取物和 200 μ g/ml 遗传霉素的培养基。对照株棉阿舒囊霉 pAG100 胞内质粒无任何插入子, 两天后产生 18.7 ± 0.1 mg/l 核黄素。棉阿舒囊霉 pAG100.4 和棉阿舒囊霉 pAG100.6 株则分别产生 31.2 ± 6.1 mg/l 和 31.0 ± 2.0 mg/l 的核黄素 (图 7)。由于其高度变异性, 不可能去测量异柠檬酸裂合酶比活性的显著变化。在补充了 3g/l 甘氨酸的培养基中, 棉阿舒囊霉 pAG100.8 株三天内产生了 65 ± 5.6 mg/l 核黄素。与此对照, 通过直接对比, 棉阿舒囊霉 pAG100 对照株仅形成了 29.9 ± 1.8 mg/l 核黄素 (图 8) 不可能去测量异柠檬酸裂合酶比活性和菌丝体干重的显著性差异。

实施例 6

异柠檬酸裂合酶 (ICL) 的纯化

为鉴定对 ICL 有抑制效应的物质, 棉阿舒囊霉 ICL 首先被纯化出来。此真菌菌丝体在植物油上长出后, 分离纯化该酶。纯化的每一步骤都简要列于表 1。从此表可看出, 大约 2.5 g 菌丝体经弗氏压碎器破坏细胞后得到的典型粗提取物有 220 单位的 ICL 活性。经 40,000 g 离心后, 回收得到约 78% 的酶活性, 并在上清液中呈溶解状态。随后用硫酸铵沉淀法分级分离使此酶富集为原来的三倍。通过 SephacrylS-300 柱凝胶过滤后, ICL 被结合在阳离子交换剂 Mono S-琼脂糖凝胶上, 然后被氯化钠洗脱。所得制剂通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳均质后具有 18.4U/mg 的比活性。

实施例 7

ICL 抑制剂的鉴定

通过比色实验 (Dixon, H. 和 Kornberg, H. L. (1959), 生化杂志 (Biochem. J.) 72, 3: 乙醛酸循环关键酶的检测法), 纯化的酶可以用来测定其它物质对其活性的影响。所测物质对纯化酶的影响总结和描绘在表 2 和图 1 中。所研究物质包括那些真菌细胞中对酶可能有抑制效应的代谢物。其中, 6-磷酸-葡萄糖酸和磷酸烯醇丙酮酸表现出最明显的抑制效应。在 10 mM 浓度时, 抑制大于 50%。然而, 被认为不参加真菌代谢的衣康酸和草酸基本上都表现出显著的更大的抑制效应。在浓度为 1mM 时, 各自有 78% 和 95% 的抑制。

实施例 8

衣康酸选择性突变株的鉴定

所分离真菌孢子中遗传物质的突变可通过紫外线照射孢子而产生。当照射剂量达到只有 10-20% 的孢子存活时, 就能得到耐受衣康酸对核黄素形成抑制的突变株。当用此法分离得到的突变株在大豆油中生长时, 它产生的核黄素比原株高 2.5 倍 (图 2)。ICL 比活性在核黄素形成期升高了 15% (图 2)。利用抗体可证明蛋白质数量增加。就对衣康酸抑制的反应来说, 来自突变株的 ICL 有与起始株一样的反应。

实施例 9

核黄素形成与 ICL 比活性的相关性

观察发现，当葡萄糖作为底物存在时，真菌仅在葡萄糖消耗后才开始产生核黄素。这令人吃惊地表明 ICL 和核黄素形成之间有因果关系。简言之，当其在油中生长时先前被葡萄糖抑制的 ICL 在粗提取物中也变成可测量的了，并且其活性升高到如前所述的水平（图 3）。

序列表

(1) 一般信息

(i) 申请人:

- (A) 名称: BASF Aktiengesellschaft
- (B) 街道: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) 城市: Ludwigshafen
- (E) 国家: 联邦德国
- (F) 邮政编码: D-67056
- (G) 电话号码: 0 6 2 1 / 6 0 4 8 5 2 6
- (H) 传真: 0 6 2 1 / 6 0 4 3 1 2 3
- (I) 电传: 1 7 6 2 1 7 5 1 7 0

- (A) 名称: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) 街道: Leo-Brandt - Strasse
- (C) 城市: Juelich
- (E) 国家: 德国
- (F) 邮政编码: D-52425
- (G) 电话号码: 02461 / 61 3004

(ii) 申请名称: 利用异柠檬酸裂合酶活性被改变的微生物制备核黄素

(iii) 序列数: 2

(iv) 电脑可读形式:

- (A) 媒体类型: 软磁盘
- (B) 电脑: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: Patentin Release #1.0, #1.25 版本 (EPO)

(2) SEQ ID NO: 1 的信息

(i) 序列特性:

- (A) 长度: 2364 碱基对

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA
- (iii) 假拟结构: 无
- (iii)反义: 无
- (ix) 特性:
 - (A) 名称/关键词: 5' UTR
 - (B) 位点: 1..550
- (ix) 特性:
 - (A) 名称/关键词: CDS
 - (B) 位点: 551..2233
- (ix) 特性:
 - (A) 名称/关键词: 3' UTR
 - (B) 位点: 2234..2364
- (xi) 序列描述: : SEQ ID NO : 1

CGAAAGCGCC AAATACCGGA AACGGCACAG GCGCAGCTCT AATAGCCGTT CCACGATAAC	60
TTTGGAAGTT ATGGCACTAT GGCCGAGTGG TTAAGGCGAC AGACTTGAAA TCTGTTGGGC	120
TCTGCCCCGCG CTGGTTCAAA TCCTGCTGGT GTCGTTATTT TTGCCGTTTC TTTTATAGTG	180
AAACTCAGGG GCCTTTAGTC CGCCCTTTTG CCCGCTGATT CATCGCCCGC CAGCAACACC	240
GGTTGAGCCG ATCAGCGCAA GAACGCGCAA AGTCACGTAT GGCCCTAAG AGTTGAGCTC	300
TCCCCCTCGG CTCCTTCCGG GCGCGGAAAA GCCTGCGTCA CCCCATTAAG TCCGAAACCG	360
CGTTCAAGTG TACTTGGTCC GGGCCAATGT GGTTCCTCA TCCGAGTCAC CGATACGCAG	420
GTGCGCCCGT CGAGTCACCA TTAGGAGTAG AGCATCTGAT TATATATAGG CCTAGTTACA	480
GCGGTAACAT AGACTGATAG CTCCAGCTCC AGCACTAGCT TGTAGGACAT CTGCGCGACA	540
CCCAGTGAAC ATG TCC CCT TCC GTC AGA GAC GCC CGC AAC GAC CTT GCC	589
Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala	
1 5 10	
AGC CTG CAA CAG CAG GCA GCC GCC GAA GCC GAG GAT ATT AGG AGA TGG	637
Ser Leu Gln Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp	
15 20 25	
TGG AGC CAG CCA CGG TGG GCG GGC ACC AAG CGC GTG TAC ACG GCC GAG	685
Trp Ser Gln Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu	
30 35 40 45	
GAC ATC GTC AAG CGC CGC GGC ACG TTC CCT GTC GTC GAA TAC CCA TCT	733
Asp Ile Val Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser	
50 55 60	
TCC GTA ATG GCG GAC AAG CTC GTG GAG ACA TTG GCG CGG CAC TCG CGC	781
Ser Val Met Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg	
65 70 75	
AAC GGC ACG GTT TCA CAG ACG TTC GGA GTG CTC GAC CCA GTG CAA ATG	829
Asn Gly Thr Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met	
80 85 90	
ACG CAA ATG GTG AAG TAT CTG GAC ACG ATT TAC GTG TCT GGC TGG CAA	877
Thr Gln Met Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln	
95 100 105	
TGC AGC GCC ACG GCT TCG ACC TCG AAC GAG CCT GGG CCC GAT CTC GCG	925
Cys Ser Ala Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala	
110 115 120 125	
GAC TAT CCG ATG GAC ACC GTG CCA AAC AAG GTC GAG CAC CTG TTC ATG	973
Asp Tyr Pro Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met	

130										135										140										
GCG	CAG	CTG	TTC	CAC	GAC	CGG	AAA	CAG	CGC	GAG	GCC	CGC	CTG	TCG	TGC															1021
Ala	Gln	Leu	Phe	His	Asp	Arg	Lys	Gln	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Cys															
			145					150					155																	
ACT	ACC	CAG	CGC	GAG	CTC	GAC	CAA	TTG	GGG	CCT	GAG	ATT	GAC	TAC	TTG															1069
Thr	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Gly	Pro	Glu	Ile	Asp	Tyr	Leu															
			160					165					170																	
AGG	CCG	ATT	GTC	GCT	GAC	GCA	GAC	ACC	GGC	CAC	GGC	GGG	CTA	ACA	GCC															1117
Arg	Pro	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala															
			175					180					185																	
GTC	TTT	AAA	CTC	ACG	AAG	ATG	TTC	ATC	GAG	CGC	GGT	GCA	GCC	GGT	ATC															1165
Val	Phe	Lys	Leu	Thr	Lys	Met	Phe	Ile	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile															
			190					195					200																	
CAC	ATG	GAG	GAC	CAG	TCC	TCC	AGC	AAC	AAA	AAG	TGC	GGG	CAC	ATG	GCG															1213
His	Met	Glu	Asp	Gln	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Lys	Cys	Gly	His	Met	Ala															
				210					215					220																
GGC	CGC	TGC	GTG	ATC	CCT	GTT	CAG	GAG	CAC	ATT	AGT	CGT	TTA	GTG	ACT															1261
Gly	Arg	Cys	Val	Ile	Pro	Val	Gln	Glu	His	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Thr															
			225					230					235																	
GTG	CGC	ATG	TGT	GCG	GAC	GTG	ATG	CAC	TCG	AAC	CTG	GTG	CTT	GTC	GCG															1309
Val	Arg	Met	Cys	Ala	Asp	Val	Met	His	Ser	Asn	Leu	Val	Leu	Val	Ala															
			240					245					250																	
AGA	ACA	GAC	TCG	GAG	GCC	GCC	ACC	TTA	CTT	AGC	TCG	AAC	ATT	GAC	GCG															1357
Arg	Thr	Asp	Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala															
			255					260					265																	
CGC	GAT	CAT	TAC	TAC	ATT	GTC	GGG	GCC	TCG	AAC	CCT	GAG	GTA	ACT	GTA															1405
Arg	Asp	His	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Thr	Val															
			270					275					280																	
CCG	CTG	ATC	GAA	GTT	TTG	GAC	GCC	GCG	CAG	CAG	GCC	GGC	GCC	TCA	GGT															1453
Pro	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly															
			290						295				300																	
GAC	AGA	TTG	GCT	CAG	CTA	GAG	GAG	GAC	TGG	TGC	AAG	AAG	GCC	AAG	TTG															1501
Asp	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Trp	Cys	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu															
			305					310					315																	
AGG	CTC	TTC	CAC	GAG	GCA	TTT	GCC	GAC	CAG	GTG	AAT	GCC	AGC	CCT	TCG															1549
Arg	Leu	Phe	His	Glu	Ala	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser															
			320					325					330																	
ATC	AAA	GAC	AAG	GCG	GGC	GTT	ATT	GCC	AAA	TTT	AAC	TCA	CAG	ATC	GGG															1597
Ile	Lys	Asp	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Ile	Gly															
			335					340					345																	

CCA CAG ACA GGC GCG TCG ATC AGA GAG ATG CGC AAA CTG GGC CGC GAG	1645
Pro Gln Thr Gly Ala Ser Ile Arg Glu Met Arg Lys Leu Gly Arg Glu	
350 355 360 365	
CTG CTC GGG CAG GAC GTC TAC TTC GAC TGG GAC CTG CCT CGC GCT AGA	1693
Leu Leu Gly Gln Asp Val Tyr Phe Asp Trp Asp Leu Pro Arg Ala Arg	
370 375 380	
GAG GGC TTG TAC CGC TAC AAG GGC GGC ACC CAG TGC GCG ATC ATG CGC	1741
Glu Gly Leu Tyr Arg Tyr Lys Gly Gly Thr Gln Cys Ala Ile Met Arg	
385 390 395	
GCA CGC GCG TTC GCG CCG TAC GCC GAC CTG GTC TGG TTC GAA TCC AAC	1789
Ala Arg Ala Phe Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Phe Glu Ser Asn	
400 405 410	
TTC CCT GAC TTC CAG CAG GCT AAG GAG TTT GCG CAG GGC GTG CGC GAG	1837
Phe Pro Asp Phe Gln Gln Ala Lys Glu Phe Ala Gln Gly Val Arg Glu	
415 420 425	
AAG TTC CCC AAC AAG TGG ATG GCC TAC AAC TTG TCG CCC AGC TTC AAC	1885
Lys Phe Pro Asn Lys Trp Met Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Ser Phe Asn	
430 435 440 445	
TGG CCG AAG GCC ATG CCT CCC AAG GAG CAG GAG AAC TAC ATC CAA CGG	1933
Trp Pro Lys Ala Met Pro Pro Lys Glu Gln Glu Asn Tyr Ile Gln Arg	
450 455 460	
CTG GGC GAG ATC GGA TAT GTG TGG CAG TTC ATC ACG CTA GCC GGC CTG	1981
Leu Gly Glu Ile Gly Tyr Val Trp Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Leu	
465 470 475	
CAT ACC AAT GCC TTG GCC ATC GAC AAC TTC TCG CGC GAA TTC AGC AGG	2029
His Thr Asn Ala Leu Ala Ile Asp Asn Phe Ser Arg Glu Phe Ser Arg	
480 485 490	
TTC GGA ATG CGT GCG TAT GCA CAA GGC ATC CAG CAG AGG GAG ATG GAC	2077
Phe Gly Met Arg Ala Tyr Ala Gln Gly Ile Gln Gln Arg Glu Met Asp	
495 500 505	
GAG GGC GTC GAT GTC CTA AAA CAC CAG AAG TGG GCC GGC GCA GAG TAT	2125
Glu Gly Val Asp Val Leu Lys His Gln Lys Trp Ala Gly Ala Glu Tyr	
510 515 520 525	
GTT GAC AGC ATT CTC AAG CTT GCC CAG GGC GGT GTG TCT TCG ACA GCC	2173
Val Asp Ser Ile Leu Lys Leu Ala Gln Gly Gly Val Ser Ser Thr Ala	
530 535 540	
TCG ATG GGT AAG GGT GTA ACC GAA GAG CAG TTC GGC TCC TCA AAC GGT	2221
Ser Met Gly Lys Gly Val Thr Glu Glu Gln Phe Gly Ser Ser Asn Gly	
545 550 555	
GCC AAA CTA TGATATCATC TCTGAGTCAT TTCTCTCGAC AAGATCCTCG	2270
Ala Lys Leu	

560

GCCAGACTTC TGGAATATAT ATAACATCGG GTACCCCGAC ATCCCTGCCT TCCGCAACGT 2330

GCGAAGCAGC TGATACGTAT ACTTTAAACG CACA 2364

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 560 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

```

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

```

Asp	Gln	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Lys	Cys	Gly	His	Met	Ala	Gly	Arg	Cys		
210						215					220						
Val	Ile	Pro	Val	Gln	Glu	His	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	Val	Arg	Met		
225					230					235					240		
Cys	Ala	Asp	Val	Met	His	Ser	Asn	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Arg	Thr	Asp		
				245					250					255			
Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	Arg	Asp	His		
			260					265					270				
Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Thr	Val	Pro	Leu	Ile		
	275						280					285					
Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Arg	Leu		
290						295					300						
Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Trp	Cys	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	Arg	Leu	Phe		
305					310					315					320		
His	Glu	Ala	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	Ile	Lys	Asp		
				325					330					335			
Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Ile	Gly	Pro	Gln	Thr		
			340					345					350				
Gly	Ala	Ser	Ile	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Arg	Glu	Leu	Leu	Gly		
		355					360					365					
Gln	Asp	Val	Tyr	Phe	Asp	Trp	Asp	Leu	Pro	Arg	Ala	Arg	Glu	Gly	Leu		
370						375					380						
Tyr	Arg	Tyr	Lys	Gly	Gly	Thr	Gln	Cys	Ala	Ile	Met	Arg	Ala	Arg	Ala		
385					390					395					400		
Phe	Ala	Pro	Tyr	Ala	Asp	Leu	Val	Trp	Phe	Glu	Ser	Asn	Phe	Pro	Asp		
				405					410					415			
Phe	Gln	Gln	Ala	Lys	Glu	Phe	Ala	Gln	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Phe	Pro		
			420					425					430				
Asn	Lys	Trp	Met	Ala	Tyr	Asn	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Asn	Trp	Pro	Lys		
		435					440					445					
Ala	Met	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Glu	Asn	Tyr	Ile	Gln	Arg	Leu	Gly	Glu		
450						455					460						
Ile	Gly	Tyr	Val	Trp	Gln	Phe	Ile	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	His	Thr	Asn		
465					470					475					480		
Ala	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Phe	Ser	Arg	Glu	Phe	Ser	Arg	Phe	Gly	Met		
				485					490					495			
Arg	Ala	Tyr	Ala	Gln	Gly	Ile	Gln	Gln	Arg	Glu	Met	Asp	Glu	Gly	Val		
			500					505					510				

Asp	Val	Leu	Lys	His	Gln	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Tyr	Val	Asp	Ser
	515						520						525		
Ile	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Met	Gly
	530						535					540			
Lys	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe	Gly	Ser	Ser	Asn	Gly	Ala	Lys	Leu
545						550					555				560

表 1

级分	总活性 (单位)	总蛋白量 (mg)	比活性 (U/mg 蛋白)	纯化因子 (倍数)	收率 (%)
粗提取液	220	1310	0.17	1.0	100
40,000g 上清液	170	730	0.23	1.3	78
35 % (NH ₄) ₂ SO ₄ 上清液	160	630	0.25	1.5	72
60 % (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	160	300	0.53	3.1	72
Sephacryl S-300 洗脱液	52	5	10.8	63	23
Mono S 洗脱液	35	0.5	18.4	108	16

表 2

抑制剂	浓度 (mM)	抑制率 (%)	抑制方式
6-磷酸葡萄糖	10	<5	
柠檬酸	10	22	
富马酸	10	25	
琥珀酸	10	34	非竞争性; K _j : 15.8mM
苹果酸	10	36	
磷酸烯醇丙酮酸	10	55	双曲线混合型
6-磷酸-葡萄糖酸	10	60	
甘氨酸	10	<5	
天冬氨酸	10	13	
谷氨酸	10	15	
磷酸苯酯	10	7	
马来酸	10	68	
衣康酸	1	78	直线混合型 K _j : 0.17mM
草酸	1	95	非竞争性 K _j : 0.004mM

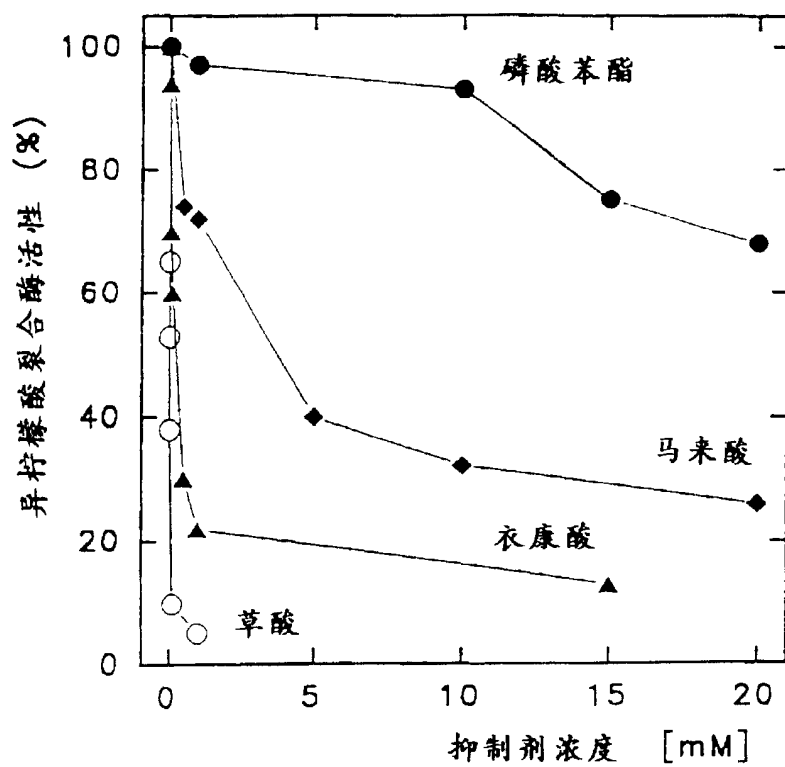


图 1

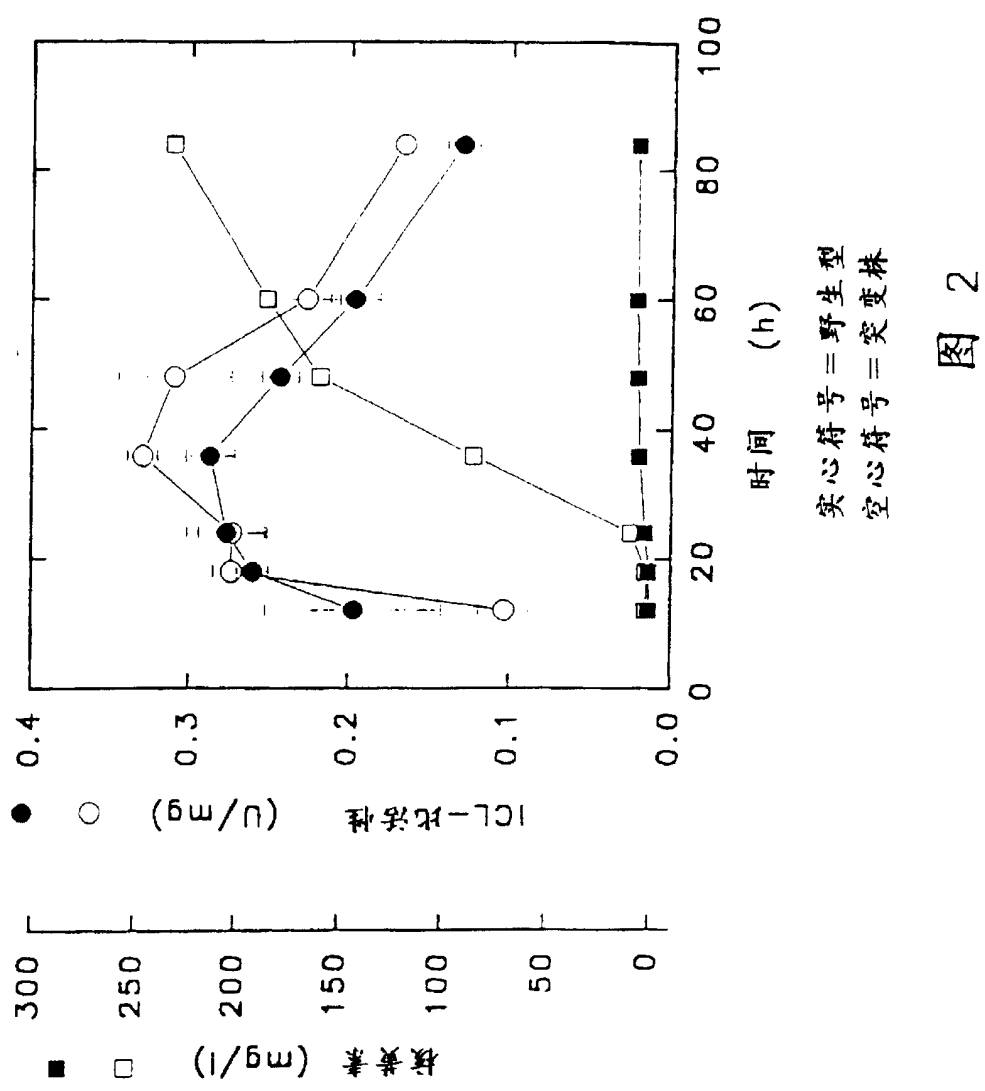


图 2

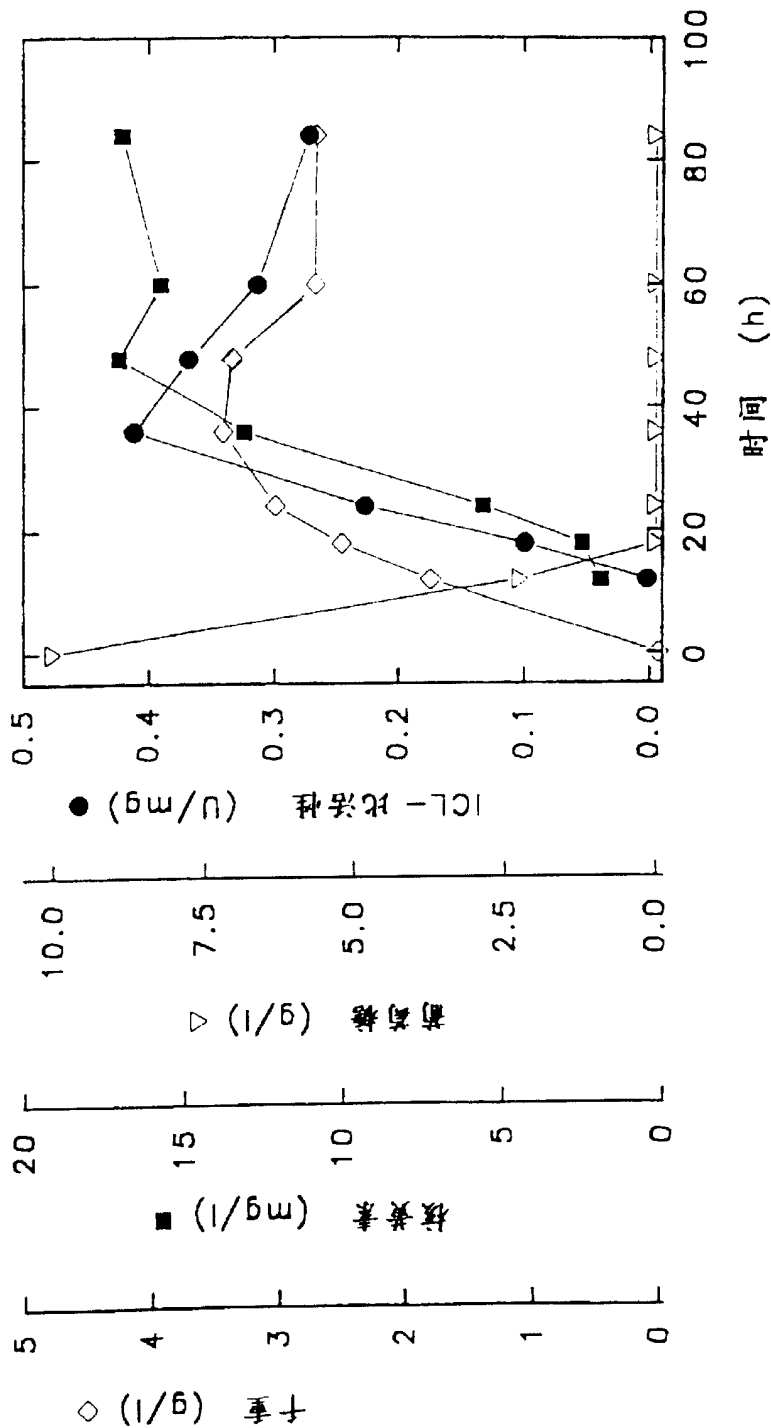


图 3

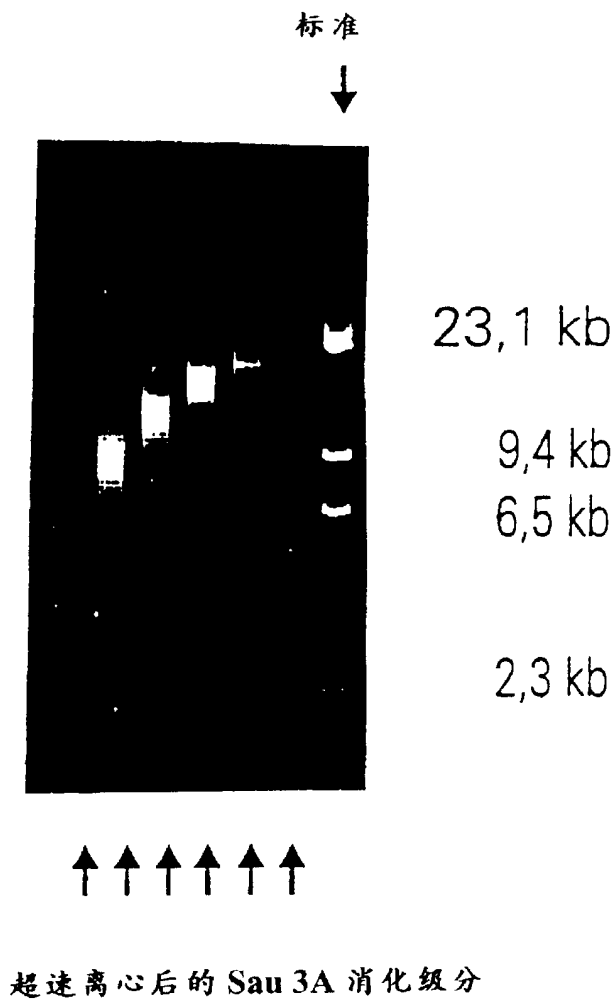


图 4

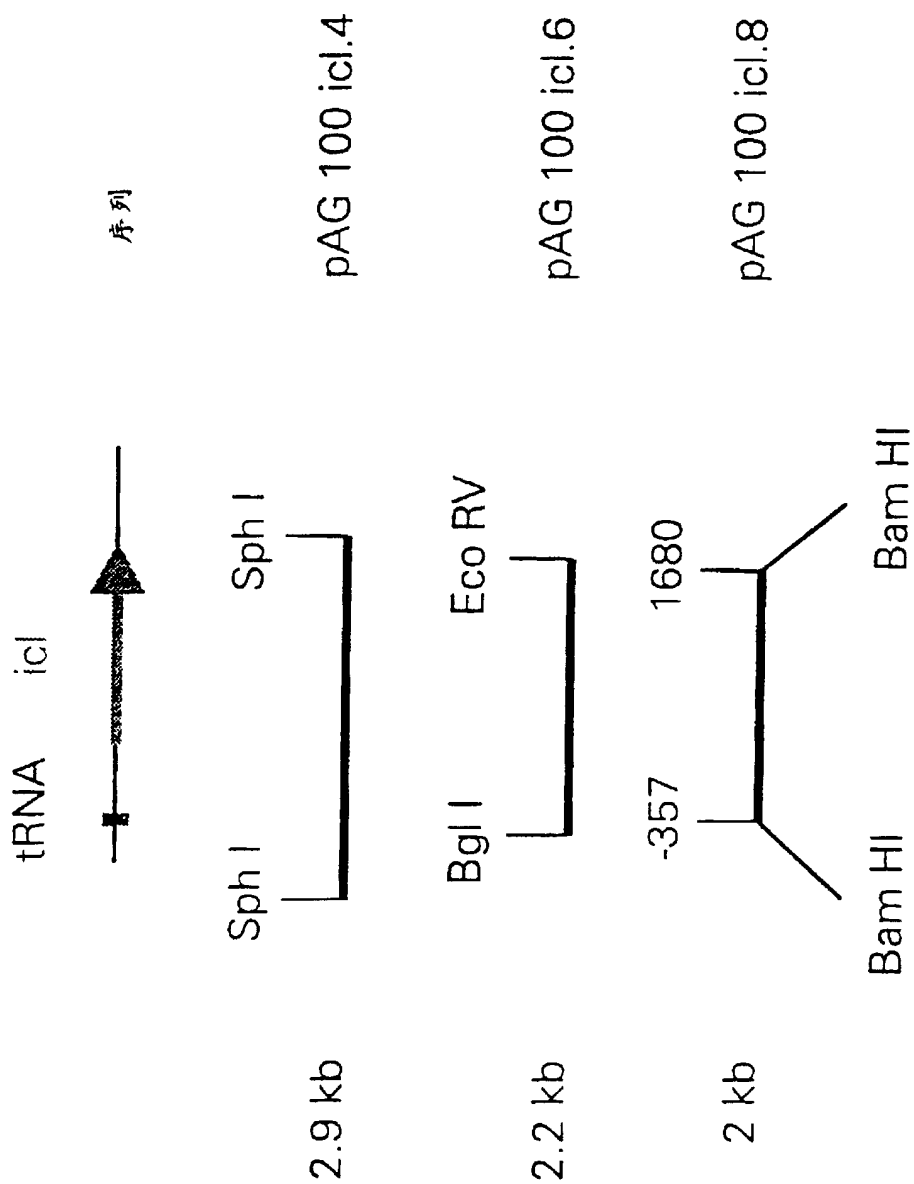


图 5

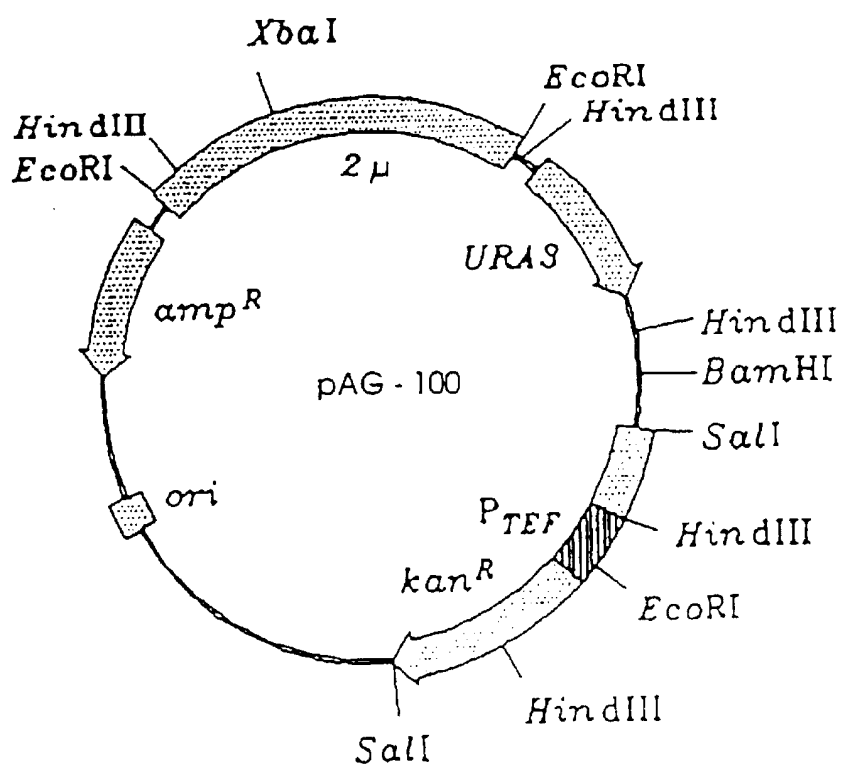


图 6

