



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1768136 B

(45) 授权公告日 2010.05.05

(21) 申请号 200480008897.7

C12N 15/56(2006.01)

(22) 申请日 2004.03.24

C12N 5/10(2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 1/15(2006.01)

098284/2003 2003.04.01 JP

C12N 1/19(2006.01)

098285/2003 2003.04.01 JP

C12N 1/21(2006.01)

098286/2003 2003.04.01 JP

C12Q 1/68(2006.01)

C12P 19/12(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C12P 19/14(2006.01)

2005.09.29

(56) 对比文件

(86) PCT申请的申请数据

JP 特开平 5-252947 A, 1993.10.05, 全文.

PCT/JP2004/004128 2004.03.24

Yasushi Sugano et al. Purification and

(87) PCT申请的公布数据

Characterization of a new agarase from
a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107.
Applied and Environmental Microbiology 59

W02004/090127 JA 2004.10.21

5. 1993, 59(5), 1549-1554.

(73) 专利权人 独立行政法人海洋研究开发机构

地址 日本神奈川县

审查员 陈中伟

(72) 发明人 大田优佳莉 秦田勇二 能木裕一

伊藤进 掘越弘毅

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

代理人 丁香兰

(51) Int. Cl.

C12N 9/42(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 51 页 附图 11 页

(54) 发明名称

琼脂分解酶及其应用

(57) 摘要

本发明公开了具有如下性质的琼脂分解酶。

(1) 作用:水解琼脂糖的 β -1,4 键,生成新琼脂寡聚糖。(2) 底物特异性:至少作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互形成的 β -1,4 键和 α -1,3 键骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖,生成来源于琼脂的寡聚糖。

(3) 温度的影响:于大于或等于 54°C 温度进行 30 分钟的热处理后活性仍残留。与以往的琼脂分解酶相比,此酶在高温下仍有活性,因此能够提高分解琼脂的速度,利于在工业上应用。

1. 一种琼脂分解酶,其氨基酸序列是序列号 9 所表示的氨基酸序列。
2. 一种多核苷酸,其为 (a3) 编码如序列表的序列号 9 所示的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。
3. 如权利要求 2 所述的多核苷酸,其为 (c3) 核苷酸序列是序列表的序列号 10 所示的核苷酸序列的多核苷酸。
4. 一种重组载体,其具有权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸。
5. 一种微生物,其以权利要求 4 所述的重组载体进行了转化。
6. 一种琼脂分解酶的制造方法,其特征在于,对权利要求 5 所述的微生物进行培养,从培养物中提取琼脂分解酶。
7. 一种新琼脂寡聚糖的制造方法,其特征在于,将权利要求 1 所述的琼脂分解酶作用于藻类,从而得到新琼脂寡聚糖。
8. 一种藻类原生质体的制造方法,其特征在于,将权利要求 1 所述的琼脂分解酶作用于藻类,从而得到原生质体。
9. 一种回收琼脂糖凝胶中 DNA 的方法,其特征在于,将权利要求 1 所述的琼脂分解酶作用于施用了 DNA 的琼脂糖凝胶,以此回收琼脂糖凝胶中的 DNA。
10. 保藏号为 FERM BP-8321 的微球茎菌属 sp. A94。

琼脂分解酶及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及琼脂分解酶及其应用,更具体地说,本发明涉及比以往琼脂分解酶活性更高、耐热性更强的新型琼脂分解酶及其应用。

背景技术

[0002] 琼脂是从石花菜、发菜等红藻类中得到的多糖类物质,其主要成分是琼脂糖。另外琼脂中还存有少量被总称为琼脂胶的多糖,琼脂胶是琼脂糖与硫酸、硫酸丙酮酸等成酯而形成的。

[0003] 用琼脂分解酶 β -琼脂糖酶水解琼脂糖可以得到新琼脂寡聚糖(ネオアガロオリゴ糖),此物质以其防止淀粉老化作用强、经加热处理会产生抑菌作用、热量低等方面的特点在食品领域作为高性能食品的原料非常有用(例如,参照河野敏明,《琼脂寡聚糖(新琼脂寡聚糖)》,食品包装,(1990),22(1):100-105)。而且,用 β -琼脂糖酶水解海藻成分得到的寡聚糖中具有免疫功能活性(例如,参照 Yoshizawa Y., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., (1995), 59(10):1933-1937.)、美白和保湿皮肤的效果(例如,参照 Kobayashi R., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., (1997), 61(1):162-163.) 已得到确认。

[0004] 另一方面,作为未开发的海洋生物资源的新型有效应用,人们期待使用琼脂分解酶分解海藻类的坚固的细胞组织以提取具有生理活性的物质,或是利用使用该酶制得的原生质体(例如,参照 Araki T., et al., J. Mar. Biotechnol., (1998), 6(3):193-197.) 来开发海藻的有用品种。

[0005] 然而,由于以往大家知道的琼脂分解酶(例如,参照特开平 6-284888 号公报)生产率低且价格高,因而存在难以应用于工业的问题,并且其酶活性及耐热性不充分,不能广泛应用于产业界。

[0006] 因此,本发明的课题在于提供一种琼脂分解酶,其比以往的琼脂分解酶具有更出色的分解琼脂能力及耐热性,并且能够大量生产;还提供能够利用基因工程技术制造该酶的基因。

发明内容

[0007] 本发明的发明人为了解决上述课题,专心研究了自然界中产生琼脂分解酶的微生物,结果发现,从海底的土壤中分离的新型微球茎菌属(Microbulbifer)微生物具有极高的分解琼脂能力,并能产生耐热性等也很出色的琼脂分解酶。并且,克隆了该微生物的琼脂分解酶基因,发现了利用该基因通过基因重组技术能够大量生产琼脂分解酶,从而完成了本发明。

[0008] 即,本发明的第一目的在于提供具有如下性质的琼脂分解酶。

[0009] (1) 作用:水解琼脂糖的 β -1,4 键,生成新琼脂寡聚糖(ネオアガロオリゴ糖);

[0010] (2) 底物特异性:至少作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有上述骨架的寡聚

糖,生成来源于琼脂的寡聚糖;

[0011] (3) 温度的影响:于大于或等于 54℃ 的温度进行 30 分钟的热处理后活性仍残留。

[0012] 本发明的第二目的在于提供来源于微球茎菌属的微生物的所述琼脂分解酶。

[0013] 本发明的第三目的在于提供所述琼脂分解酶,其中,微球茎菌属微生物是保藏号为 FERM BP-8320 的微球茎菌属 sp. 1325-A7,所述琼脂分解酶于大于或等于 54℃ 的温度进行 30 分钟的热处理后的残留活性为未经热处理(0℃,30 分钟)时的 25% 或其以上。

[0014] 本发明的第四目的在于提供所述琼脂分解酶,其中,微球茎菌属微生物是保藏号为 FERM BP-8319 的微球茎菌属 sp. 1325-A3,所述琼脂分解酶于大于或等于 60℃ 的温度进行 30 分钟的热处理后的残留活性为未经热处理(0℃,30 分钟)时的 20% 以上。

[0015] 本发明的第五目的在于提供所述琼脂分解酶,其中,微球茎菌属微生物是保藏号为 FERM BP-8321 的微球茎菌属 sp. A94,所述琼脂分解酶于大于或等于 60℃ 的温度进行 30 分钟的热处理后的残留活性为未经热处理(0℃,30 分钟)时的 7% 以上。

[0016] 并且,本发明的其他目的在于提供上述琼脂分解酶。该分解酶具有下述氨基酸序列:序列号 1、5 或 9 所表示的氨基酸序列、或上述氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入而形成的序列。

[0017] 还有,本发明的其他目的在于提供一种多核苷酸、具有该多核苷酸的重组载体及用该重组载体进行了转化的微生物。该多核苷酸编码下述氨基酸序列:序列号码 1、5 或 9 所表示的氨基酸序列、或上述氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入而形成的序列。

[0018] 另外,本发明的其他目的还在于:提供琼脂分解酶的制造方法,其特征是培养所述经转化了的微生物并从培养物中提取琼脂分解酶;提供新琼脂寡聚糖或原生质体的制造方法,其中,通过使前述琼脂分解酶作用于藻类而得到新琼脂寡聚糖;提供回收琼脂糖凝胶中 DNA 的方法,其特征是使所述琼脂分解酶作用于加了 DNA 的琼脂糖凝胶,从而回收琼脂糖凝胶中的 DNA。

附图说明

[0019] 图 1 示意表示微球茎菌属 sp. 1325-A7 的分类学位置。

[0020] 图 2 示意表示微球茎菌属 sp. 1325-A3 的分类学位置。

[0021] 图 3 示意表示微球茎菌属 sp. A94 的分类学位置。

[0022] 图 4 示意表示 RagaA7 水解生成物的薄层色谱分析结果(P 是用来源于 *P. atlantica* 的酶所制备的新琼脂寡聚糖的泳道,G 是 D- 半乳糖的泳道,NA4 表示新琼脂四聚糖(Neoagarotetraose),NA6 表示新琼脂六聚糖(Neoagarohexaose))。

[0023] 图 5 示意表示 RagaA7 的酶活性与 pH 的关系。

[0024] 图 6 示意表示于 40℃ 保温 30 分钟后 RagaA7 的酶活性与 pH 的关系。

[0025] 图 7 示意表示 RagaA7 的酶活性与温度的关系。

[0026] 图 8 示意表示 RagaA7 及 PSA 的温度稳定性(●为 RagaA7,○为 PSA)。

[0027] 图 9 示意表示 RagaA7 及 PSA 对 SDS 的稳定性(●为 RagaA7,○为 PSA)。

[0028] 图 10 示意表示 RagaA3 水解生成物的薄层色谱分析结果(P 是用来源于 *P. atlantica* 的酶所制备的新琼脂寡聚糖的泳道,G 是 D- 半乳糖的泳道,NA4 表示新琼脂四

聚糖, NA6 表示新琼脂六聚糖)。

[0029] 图 11 示意表示 RagaA3 的酶活性与 pH 的关系。

[0030] 图 12 示意表示于 40℃保温 30 分钟后 RagaA3 的酶活性与 pH 的关系。

[0031] 图 13 示意表示 RagaA3 的酶活性与温度的关系。

[0032] 图 14 示意表示 RagaA3 及 PSA 的温度稳定性 (●为 RagaA3, ○为 PSA)。

[0033] 图 15 示意表示 RagaA3 及 PSA 对 SDS 的稳定性 (●为 RagaA3, ○为 PSA)。

[0034] 图 16 示意表示 RagaB 水解生成物的薄层色谱分析结果 (P 是用来源于 *P. atlantica* 的酶调制的新琼脂寡聚糖的泳道, G 是 D- 半乳糖的泳道, NA4 表示新琼脂四聚糖, NA6 表示新琼脂六聚糖)。

[0035] 图 17 示意表示 RagaB 的酶活性与 pH 的关系。

[0036] 图 18 示意表示于 40℃保温 30 分钟后 RagaB 的酶活性与 pH 的关系。

[0037] 图 19 示意表示 RagaB 的酶活性与温度的关系。

[0038] 图 20 示意表示 RagaB 及 PSA 的温度稳定性 (●为 RagaB, ○为 PSA)。

[0039] 图 21 示意表示 RagaB 及 PSA 对 SDS 的稳定性 (●为 RagaB, ○为 PSA)。

[0040] 另外, 表 1、表 2、及表 3 中所翻译的各细菌种属名对应的拉丁名如下:

[0041] 盐水沼栖微球茎菌: *Microbulbifer salipaludis*

[0042] 伸长假单孢菌: *Pseudomonas elongata*

[0043] 水解微球茎菌: *Microbulbifer hydrolyticus*

[0044] 微球茎菌属 sp. 2-40: *Microbulbifer* sp. 2-40

[0045] 绿脓杆菌: *Pseudomonas aeruginosa*

[0046] 大肠杆菌: *E. coli*

具体实施方式

[0047] 与以往的琼脂分解酶相比, 本发明的琼脂分解酶 (下文称为“本发明酶”) 的琼脂分解能力及耐热性显著提高, 优选来源于微球茎菌属微生物的琼脂分解酶。另外, 所谓“来源于微球茎菌属微生物” 仅是指本发明酶的存在首先在微球茎菌属微生物中被发现, 利用编码从微球茎菌属微生物提取到的本发明酶的多核苷酸在其他微生物中产生的本发明酶、或是从属于其他属的微生物中得到的具有同样性质的琼脂分解酶也属于本发明的酶。

[0048] 作为本发明酶的代表例, 可以例举为微球茎菌属 sp. 1325-A7 所产生的琼脂分解酶 (被命名为 RagaA7); 微球茎菌属 sp. 1325-A3 所产生的琼脂分解酶 (被命名为 RagaA3); 以及微球茎菌属 sp. A94 所产生的琼脂分解酶 (被命名为 RagaB)。下面依次对此进行说明。

[0049] (A1) RagaA7 的特性

[0050] (1) 作用: 水解琼脂糖的 β -1,4 键, 生成新琼脂寡聚糖;

[0051] (2) 底物特异性: 至少作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D- 半乳糖与 3,6- 脱水-L- 半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类以及具有同样骨架的寡聚糖, 生成来源于琼脂的寡聚糖;

[0052] (3) 温度的影响: 作用温度为 15℃~70℃, 最佳作用温度为 45℃~55℃。于 54℃ 进行 30 分钟的热处理后的残留活性为未经热处理 (0℃, 30 分钟) 时的 35% 或 35% 以上, 优选 40% 或 40% 以上; 70℃ 时为 25% 或 25% 以上, 优选 35% 或 35% 以上; 80℃ 时也为 25%

或 25% 以上, 优选 35% 或 35% 以上。

[0053] (4) 表面活性剂的影响: 不被 1% 的多聚仙梨醇 P40 (Nonidet P40)、粹通 X-100 (Triton X 100)、吐温 20 (Tween 20) 及十二烷基磺酸钠 (SDS) 抑制。

[0054] (5) 对 SDS 的稳定性: 于 40°C、1.5% 的 SDS 中处理 1 小时后保持与未处理时同样的活性。

[0055] (6) 比活性: 大于等于 100U/mg, 优选大于等于 200U/mg。

[0056] (7) pH 稳定性及作用最佳 pH: 在 pH4 ~ 10 的范围中稳定。作用 pH 范围为 3 ~ 10, 最佳 pH 为 5 ~ 7.5。

[0057] (8) 分子量: 30 ~ 49kDa (以 SDS-PAGE 测定)。

[0058] (9) 金属盐等的影响: 受 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的强烈抑制。不受 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cs^+ 、 Fe^{3+} 、 Li^+ 、 Mn^{2+} 的抑制。在 1M 的 NaCl 中保持约 80% 的活性。于 40°C 在 100mM 的 EDTA 中处理 1 小时后保持约 60% 的活性。

[0059] (10) 等电点: 3.5 ~ 4.5

[0060] (11) 对化学试剂的耐性: 受 0.1mM 的 N-溴代丁二酰亚胺抑制。不受 0.5mM 的碘代乙酰胺及对 (氯汞) 苯甲酸、1mM 的 N-乙基顺丁烯二酰亚胺、10mM 的二硫苏糖醇及 2-巯基乙醇的抑制。

[0061] 产生所述 RagaA7 的微球茎菌属 sp. 1325-A7, 具有以下细菌学性质。

[0062] (A2) 微球茎菌属 sp. 1325-A7 的细菌学性质:

[0063] < 形态 >

[0064] 在 Marine broth 2216 培养液 (Difco 公司制造) 中生长的细胞的形态。

[0065] 细胞的形态: 杆菌

[0066] 细胞的大小: $0.5 \mu m \sim 0.8 \mu m \times 1.5 \mu m \sim 5.0 \mu m$

[0067] 运动性: 有

[0068] 鞭毛: 有

[0069] 革兰氏染色性: 阴性

[0070] 孢子形成: 无

[0071] < 生长状态 >

[0072] 在液体培养液中的生长状态。

[0073] 最适温度: 于 10°C ~ 43°C 生长良好

[0074] 食盐浓度: 于 0.5% ~ 10% 生长良好

[0075] < 生理学性质 >

[0076] O-F 测试: F

[0077] 过氧化氢酶测试: 阳性

[0078] 氧化酶测试: 阳性

[0079] 凝胶分解性能: 有

[0080] 淀粉分解性能: 有

[0081] ONPG 测试: 阴性

[0082] 尿素酶产生: 无

[0083] 硫化氢产生: 无

- [0084] 吡啶产生 : 无
- [0085] 硝酸还原性能 : 无
- [0086] 利用特性 (L- 阿拉伯糖、纤维二糖、D- 果糖、D- 半乳糖、D- 葡萄糖) : 有
- [0087] (B1) RagaA3 的特性
- [0088] (1) 作用 : 水解琼脂糖的 β -1,4 键, 生成新琼脂寡聚糖 ;
- [0089] (2) 底物特异性 : 至少作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D- 半乳糖与 3,6- 脱水 -L- 半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖, 生成来源于琼脂的寡聚糖 ;
- [0090] (3) 温度的影响 : 作用温度为 $5^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$, 最佳作用温度为 $50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 。于 60°C 进行 30 分钟的热处理后的残留活性为未经热处理 (0°C , 30 分钟) 时的 40% 或 40% 以上, 优选 50% 或 50% 以上 ; 80°C 时为 20% 或 20% 以上, 优选 30% 或 30% 以上。
- [0091] (4) 表面活性剂的影响 : 不被 1% 的 Nonidet P40、Triton X100、Tween20 及 SDS 抑制。
- [0092] (5) 对 SDS 的稳定性 : 于 40°C 、至少 1% 的 SDS 中处理 1 小时后, 保持未处理时 40% 的活性。
- [0093] (6) 比活性 : 大于等于 300U/mg, 优选大于等于 350U/mg。
- [0094] (7) pH 稳定性及作用最佳 pH : 在 pH5 ~ 10 的范围中稳定。作用 pH 范围为 3.5 ~ 9.5, 最佳 pH 为 6.5 ~ 7.5。
- [0095] (8) 分子量 : 30 ~ 66kDa (以 SDS-PAGE 测定)。
- [0096] (9) 金属盐等的影响 : 受 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的强烈抑制。略受 Fe^{2+} 的抑制。不受 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Co^{2+} 、 Cs^{+} 、 Fe^{3+} 、 Li^{+} 、 Mn^{2+} 的抑制。
- [0097] 在 1M 的 NaCl 中保持约 90% 的活性。
- [0098] 于 40°C 、100mM 的 EDTA 中处理 1 小时后保持约 80% 的活性。
- [0099] (10) 等电点 : 3.5 ~ 4.5
- [0100] (11) 对化学试剂的耐性 : 受 0.1mM 的 N- 溴代丁二酰亚胺抑制。不受 0.5mM 的碘代乙酰胺及对 (氯汞) 苯甲酸、1mM 的 N- 乙基顺丁烯二酰亚胺、10mM 的二硫苏糖醇及 2- 巯基乙醇的抑制。
- [0101] 产生所述 RagaA3 的微球茎菌属 sp. 1325-A3, 具有以下的细菌学性质。
- [0102] (B2) 微球茎菌属 sp. 1325-A3 的细菌学性质 :
- [0103] < 形态 >
- [0104] 在 Marine broth 2216 培养液 (Difco 公司制造) 中生长的细胞的形态。
- [0105] 细胞的形态 : 杆菌
- [0106] 细胞的大小 : $0.4 \mu\text{m} \sim 0.6 \mu\text{m} \times 4.0 \mu\text{m} \sim 8.0 \mu\text{m}$
- [0107] 运动性 : 无
- [0108] 鞭毛 : 无
- [0109] 革兰氏染色性 : 阴性
- [0110] 孢子形成 : 无
- [0111] < 生长状态 >
- [0112] 在液体培养液中的生长状态。

- [0113] 最适温度 :于 15℃~ 35℃生长良好
- [0114] 食盐浓度 :于 1%~ 5%生长良好
- [0115] < 生理学性质 >
- [0116] O-F 测试 :F
- [0117] 过氧化氢酶测试 :阳性
- [0118] 氧化酶测试 :阳性
- [0119] 凝胶分解性能 :有
- [0120] 淀粉分解性能 :有
- [0121] ONPG 测试 :阳性
- [0122] 尿素酶产生 :无
- [0123] 硫化氢产生 :无
- [0124] 吲哚产生 :无
- [0125] 硝酸还原性能 :有
- [0126] 利用特性 (L- 阿拉伯糖、纤维二糖、D- 果糖、D- 半乳糖、D- 葡萄糖) :有
- [0127] (C1)RagaB 的特性
- [0128] (1) 作用 :水解琼脂糖的 β -1,4 键,生成新琼脂寡聚糖 ;
- [0129] (2) 底物特异性 :至少作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D- 半乳糖与 3,6- 脱水 -L- 半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖,生成来源于琼脂的寡聚糖 ;
- [0130] (3) 温度的影响 :作用温度为 10℃~ 70℃,最佳作用温度为 50℃~ 60℃。于 60℃ 进行 30 分钟的热处理后的残留活性为未经热处理 (0℃,30 分钟) 时的 25%或 25%以上,优选 30%或 30%以上 ;80℃时为 7%或 7%以上,优选 10%或 10%以上。
- [0131] (4) 表面活性剂的影响 :不被 1%的 Nonidet P40、Triton X 100、Tween20 及 SDS 抑制。
- [0132] (5) 对 SDS 的稳定性 :于 40℃、2.0%的 SDS 中处理 1 小时后保持与未处理时同样的活性。于 40℃、0.4%的 SDS 中处理 1 小时后,具有未处理时 2 倍的活性。
- [0133] (6) 比活性 :大于等于 400U/mg,优选大于等于 450U/mg。
- [0134] (7) pH 稳定性及作用最佳 pH :在 pH8~ 9 的范围中稳定。在 pH4~ 10 的范围中残留约 50%的活性。作用最佳 pH 为 6.5~ 7.5。
- [0135] (8) 分子量 :30~ 49kDa(以 SDS-PAGE 测定)。
- [0136] (9) 金属盐等的影响 :受 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的强烈抑制。略受 Fe^{2+} 的抑制。不受 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cs^{+} 、 Fe^{3+} 、 Li^{+} 、 Mn^{2+} 的抑制。在 1M 的 NaCl 中保持约 90%的活性。于 40℃、100mM 的 EDTA 中处理 1 小时后约保持 74%的活性。
- [0137] (10) 等电点 :3.7~ 5.2
- [0138] (11) 对化学试剂的耐性 :受 0.1mM 的 N- 溴代丁二酰亚胺抑制。不受 0.5mM 的碘代乙酰胺及对 (氯汞) 苯甲酸、1mM 的 N- 乙基顺丁烯二酰亚胺、10mM 的二硫苏糖醇及 2- 巯基乙醇的抑制。
- [0139] 产生所述 RagaB 的微球茎菌属 sp. A94,具有以下的细菌学性质。
- [0140] (C2) 微球茎菌属 sp. A94 的细菌学性质 :

- [0141] < 形态 >
- [0142] 在 Marine broth 2216 培养液 (Difco 公司制造) 中生长的细胞的形态。
- [0143] 细胞的形态 : 杆菌
- [0144] 细胞的大小 : $0.6 \mu\text{m} \sim 0.8 \mu\text{m} \times 3.0 \mu\text{m} \sim 6.0 \mu\text{m}$
- [0145] 运动性 : 有
- [0146] 鞭毛 : 有
- [0147] 革兰氏染色性 : 阴性
- [0148] 孢子形成 : 无
- [0149] < 生长状态 >
- [0150] 在液体培养液中的生长状态。
- [0151] 最适温度 : 于 $20^{\circ}\text{C} \sim 52^{\circ}\text{C}$ 生长良好
- [0152] 食盐浓度 : 于 $1\% \sim 5\%$ 生长良好
- [0153] < 生理学性质 >
- [0154] O-F 测试 : F
- [0155] 过氧化氢酶测试 : 阳性
- [0156] 氧化酶测试 : 阳性
- [0157] 凝胶分解性能 : 有
- [0158] 淀粉分解性能 : 有
- [0159] ONPG 测试 : 阴性
- [0160] 尿素酶产生 : 无
- [0161] 硫化氢产生 : 无
- [0162] 吲哚产生 : 无
- [0163] 硝酸还原性能 : 有
- [0164] 利用特性 (L- 阿拉伯糖、纤维二糖、D- 半乳糖、D- 葡萄糖) : 有
- [0165] 含有所述微生物的产生本发明酶的微生物能够以如下方法得到, 当然并不仅限于如下方法。首先, 在含有琼脂或琼脂糖的平板培养基上培养提取到的微生物群, 挑选具有分解琼脂能力的微生物。此培养基既可以是在含有琼脂的培养基里适量含有氮源、无机化合物等营养成分的培养基, 也可以使用天然培养基或合成培养基的任意一种。
- [0166] 所述微球茎菌属 sp. 1325-A7、微球茎菌属 sp. 1325-A3 及微球茎菌属 sp. A94 的每一种都是发明人从相模湾、骏河湾的海底的淤泥中得到的微球茎菌属微生物。
- [0167] 然后, 用 CLUSTAL X 多重序列排列程序 (Multiple Sequence Alignment Program, version 1.81) 测定各微球茎菌属菌株的 16S rDNA 序列, 解析分类学的位置。基于邻位相连法 (neighbor-joining method) 于图 1、图 2 及图 3 表示记载了解析结果的系统树。从其结果中发现, 微球茎菌属 sp. 1325-A7、微球茎菌属 sp. 1325-A3 及微球茎菌属 sp. A94 是微球茎菌属的新型种。
- [0168] 另外, 由于微球茎菌属 sp. 1325-A7 及微球茎菌属 sp. A94 具有运动性, 它们也可能属于微球茎菌属以外的新型属, 但为了方便将其归为关系最近的微球茎菌属的新型种。
- [0169] 于是, 本申请人将其分别命名为 1325-A7、1325-A3 及 A94, 并于 2003 年 3 月 6 日将其保藏在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心 (305-8566 日本国茨城县

筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 进行国际保藏 (保藏号为 FERM BP-8319 ~ 8321)。

[0170] 从包含所述微球茎菌属 sp. 1325-A7、1325-A3 及 A94 的产生本发明酶的微生物中提取本发明酶时,例如可以按常规方法培养该微生物,然后从培养物中回收本发明酶。

[0171] 为了得到本发明酶,可以使用如下的方法培养微生物,当然并不仅限于如下方法。将菌株接种至培养基,然后可以按照常规方法进行培养。用于培养的培养基最好含有琼脂或琼脂糖、琼脂分解物等作为碳源。另外,培养基中也可以适量含有本菌株能够利用的碳源及氮源。琼脂和琼脂糖可以单独或混合使用市面上出售的商品、或是加工精制之前的红藻类。对于其他的碳源及氮源没有特殊限制,作为氮源可以例举为牛肉浸膏、酵母浸膏、酪蛋白分解物、胰蛋白胨、蛋白胨等,优选使用酵母浸膏和蛋白胨。这些氮源也可以用作琼脂、琼脂糖以外的碳源。并且,作为盐类可以组合使用氯化钠、枸橼酸铁、氯化镁、硫酸钠、氯化钙、氯化钾、碳酸钠、碳酸氢钠、溴化钾、氯化铯、硼酸钠、硅酸钠、氟化钠、硝酸铵、磷酸氢钠等。还可以向含有琼脂、琼脂糖以外的所述成分的 Marine broth 2216 (Difco 公司制造) 中添加含有琼脂或琼脂糖的物质来使用。并且,还可以使用含有适量所述盐类的人工海水,在其中添加有蛋白胨、酵母浸膏、琼脂或琼脂糖等物质,将其用作培养基。优选琼脂或琼脂糖的浓度为 0.1% ~ 1.5%,此时通过任意改变琼脂或琼脂糖的浓度可以分别制作固体培养基和液体培养基;以生产酶为目的时,优选浓度为 0.1% ~ 0.4% 的液体培养基;以保存菌株为目的时,优选浓度为 1.2% ~ 1.5% 的固体培养基。培养条件根据培养基的构成稍有不同,培养温度为 10°C ~ 43°C,优选 25°C ~ 39°C;培养时间为 15 小时 ~ 48 小时,优选 18 小时 ~ 24 小时。

[0172] 可以按照一般提取酶的方式从如此得到的培养物中回收目的物质琼脂分解酶。回收方法并不仅限于如下方法,可以例举为,用超声波破碎法、法式压滤 (French press) 法、玻璃珠破碎法、ダイノミル 破碎法等菌体破碎法得到菌体破碎物,通过离心过滤该菌体破碎物或培养物等的操作,将分离得到的培养液上清液用作粗酶液。

[0173] 该粗酶液,既可以直接使用,也可以根据需要,结合使用盐析法、沉淀法、超滤法等分离手段以及离子交换色谱法、等电点色谱法、疏水性色谱法、凝胶过滤色谱法、吸附色谱法、亲和性色谱法、逆相色谱法等众所周知的方法,进一步分离精制后的酶液进行使用。

[0174] 另外,作为得到本发明酶的其他方法,还可以例举为,从微球茎菌属 sp. 1325-A7、微球茎菌属 sp. 1325-A3、微球茎菌属 sp. A94 等产生本发明酶的微生物中提取编码本发明酶的基因后,用基因工程技术制作重组微生物,然后培养该重组微生物。具体地说就是,从所述菌株中提取编码本发明酶氨基酸序列的核苷酸序列,之后将此核苷酸序列导入合适的载体,然后用此载体对大肠杆菌等宿主进行转化,培养此细胞以生产本发明酶,再从培养物中提取本发明酶。

[0175] 下面对使用基因工程技术制造本发明酶的方法进行具体说明。

[0176] 在本发明酶中, RagaA7 为具有下述氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列为以序列表中序列号 1 所表示的氨基酸序列、或所述序列号 1 所表示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的氨基酸序列、或与所述序列号 1 所表示的序列具有 56% 或其以上同源性的氨基酸序列。优选 RagaA7 为具有下述氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列为以序列号 1 所表示的氨基酸序列、或所述序列号 1 所表示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的序列。

[0177] 因此,应用基因工程技术制造与 RagaA7 相对应的本发明酶时,需要使用与其对应的核苷酸序列。另外,可以例举所述同源性大于等于 56%,优选大于等于 80%,更优选大于等于 95%。

[0178] 编码 RagaA7 的氨基酸序列的核苷酸序列具体可以例举为从如下 (a1) ~ (d1) 中选出的多核苷酸。

[0179] (a1) 编码具有如序列表的序列号 1 所示的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0180] (b1) 编码具有下述氨基酸序列的多肽的多核苷酸,所述氨基酸序列为序列表的序列号 1 所示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的氨基酸序列;

[0181] (c1) 具有如序列表的序列号 2 所示的核苷酸序列的多核苷酸;

[0182] (d1) 具有下述核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列为序列表的序列号 2 所示的核苷酸序列中有 1 个或多个碱基缺失、置换、增加或插入的核苷酸序列。

[0183] 同样的,在本发明酶中,RagaA3 为具有下述氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列为以序列号 5 所表示的氨基酸序列、或所述序列号 5 所表示的该氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的氨基酸序列、或与所述序列号 1 所表示的序列具有 56%或其以上同源性的氨基酸序列。优选 RagaA3 为具有下述氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列为以序列号 5 所表示的氨基酸序列、或所述序列号 5 所表示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的序列。

[0184] 因此,应用基因工程技术制造与 RagaA3 相对应的本发明酶时,需要使用与其对应的核苷酸序列。另外,可以例举所述同源性大于等于 56%,优选大于等于 80%,更优选大于等于 95%。

[0185] 编码 RagaA3 的氨基酸序列的核苷酸序列可以具体例举为从如下 (a2) ~ (d2) 中选出的多核苷酸。

[0186] (a2) 编码具有如序列表的序列号 5 所示的氨基酸序列的多肽的多核苷酸;

[0187] (b2) 编码具有下述氨基酸序列的多肽的多核苷酸,所述氨基酸序列为序列表的序列号 5 所示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的氨基酸序列;

[0188] (c2) 具有如序列表的序列号 6 所示的核苷酸序列的多核苷酸;

[0189] (d2) 具有下述核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列为序列表的序列号 6 所示的核苷酸序列中有 1 个或多个碱基缺失、置换、增加或插入的核苷酸序列。

[0190] 并且,在本发明酶中,RagaB 为具有下述氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列为以序列表中序列号 9 所表示的氨基酸序列、或所述序列号 9 所表示的该氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的氨基酸序列、或与所述序列号 9 所表示序列具有 63%或其以上同源性的氨基酸序列。优选 RagaB 为具有下述氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列为以序列号 9 所表示的氨基酸序列、或所述序列号 9 所表示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的序列。

[0191] 因此,应用基因工程技术制造与 RagaA3 相对应的本发明酶时,需要使用与其对应的核苷酸序列。另外,可以例举所述同源性大于等于 63%,优选大于等于 80%,更优选大于等于 95%。

[0192] 编码 RagaB 的氨基酸序列的核苷酸序列可以具体例举为从如下 (a3) ~ (d3) 中选出的多核苷酸。

[0193] (a3) 编码具有如序列表的序列号 9 所示的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

[0194] (b3) 编码具有下述氨基酸序列的多肽的多核苷酸,所述氨基酸序列为序列表的序列号 9 所示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸缺失、置换、增加或插入的氨基酸序列；

[0195] (c3) 具有如序列表的序列号 10 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

[0196] (d3) 具有下述核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列为序列表的序列号 10 所示的核苷酸序列中有 1 个或多个碱基缺失、置换、增加或插入的核苷酸序列。

[0197] 生产本发明酶的重组微生物可以结合多种公认的方式进行制造。即,可利用该领域既成的方法,从所述微球茎菌属 *sp.* 1325-A7、微球茎菌属 *sp.* 1325-A3、微球茎菌属 *sp.* A94 中提取编码本发明酶的核苷酸序列,并扩增该核苷酸序列,然后将核苷酸序列导入载体,再以此基因对宿主进行转化。

[0198] 其中,制造重组微生物可以使用例如如下所示的方法,当然并不只限于此方法。用鸟枪克隆法、或是使用特定的引物进行 PCR 扩增,从产生琼脂分解酶的细菌中得到琼脂分解酶基因。将此基因导入以 EK 系的 *E. coli* (大肠杆菌) 等为代表的革兰氏阴性菌或以 BS 系的 *B. subtilis* (枯草芽孢杆菌) 等为代表的革兰氏阳性菌,得到重组体。进行转化时,可以将质粒等核外基因用作载体,或是利用宿主细菌原来就具有的 DNA 吸收能力来进行转化。

[0199] 而且,也可以按照前述方法、公知的方法、或是基于这些方法的方法,来培养如上制造的重组微生物、从培养物中提取本发明酶、并且精制该酶。

[0200] 另外,本发明中,若不作特殊表示,则以 0.2% 精制琼脂 (Nacalai 公司制造) 作为底物时,酶的活性是在 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 中测定的。以 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定酶反应生成的还原糖。因此,本发明中,将每分钟生成相当于 1 μmol 的 D-半乳糖的量的还原糖的酶活性表示为 1 个单位 (U)。

[0201] 与以往的琼脂分解酶相同,如上得到的本发明酶,可以用于以藻类破碎物或是提取物为原料的来源于琼脂的寡聚糖的制造 (其中,藻类破碎物或提取物包含具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖),还可以作为研究用试剂在电泳后从凝胶中回收点样在琼脂糖中的 DNA。并且本发明酶还能用于从藻类、特别是红藻类制造原生质体,或是提取有用的物质。

[0202] 具体地说就是,来源于琼脂的寡聚糖可以用如下方法制造,当然并不只限于此方法。将本发明的琼脂分解酶混合在藻类的破碎物或提取物中 (其中,藻类破碎物或提取物包含具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖),通过在 pH4 ~ 10、30°C ~ 55°C 的条件下保温,能够生成来源于琼脂的寡聚糖等寡聚糖。

[0203] 如此得到的来源于琼脂的寡聚糖等寡聚糖可以具有如下用途,当然并不限于以下用途。例如,可以用作低热量食品、对加热处理后产生的某种微生物具有抑菌作用或是具有防止淀粉老化作用的食物改良剂、具有药理作用 (例如,调节免疫功能、降血压、抗癌、促进肠蠕动等) 的医药品或功能性食品、或具有保湿美白作用的化妆品成分等。

[0204] 另外,例如可以用如下方法从电泳后的琼脂糖凝胶中回收点样在凝胶中的 DNA,当然并不只限于此方法。电泳分离 DNA 后,向含有目的 DNA 片段的琼脂糖片段中添加本发明

酶,进行溶解。溶解后,还可以根据需要对含有 DNA 片段的溶液进一步进行精制处理,例如单独或并用苯酚处理、乙醇沉淀、以柱层析或树脂精制等方法。

[0205] 并且,可以按如下顺序以藻类为原料来制造原生质体(其中,藻类的细胞组织成分中具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类),当然不只限于此方法。在含有 0.7M 甘露醇的 MES 缓冲液 (pH7.5) 中用木瓜蛋白酶作用于海藻试样,之后使用含有 0.7M 甘露醇的 MES 缓冲液 (pH7.5),将上述处理后的海藻试样于 40 μ m 的尼龙网上进行过滤清洗,然后用刀片将洗净的叶片切成数毫米的碎片。将碎片于含有本发明酶和市售的纤维素酶 Onozuka RS 及 α -1,4- β -D-セルロース R-10 的含有 0.7M 甘露醇的 MES 缓冲液 (pH6.0) 中震荡,能够得到原生质体。

[0206] 如此得到的原生质体可以有如下用途,当然不止限于以下用途。例如,可用于提取海藻中的生理活性物质等有用物质、培养海藻组织、研究海藻细胞的生化及生理学性质、开发利用了细胞融合或基因导入等的海藻有用品种。

[0207] 实施例

[0208] 下面举出实施例对本发明进行详细说明,但本发明并不只限于这些实施例。

[0209] 在如下实施例中,分别按照 Saito 等 (Saito H, Miura K., *BiochemBiophys Acta*, 72:619-629, (1963)) 及 Birnboim 等 (Birnboim HC, Doly J., *Nucreic Acids Res.*, 7:1513-1523, (1979)) 记述的方法制备染色体 DNA 和质粒 DNA。其他的基本基因操作按照 Sambrook 等 (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1982)) 记述的方法进行。并且,按照 Hanahan 等 (Hanahan D., *J. Mol. Gen. Genet.*, 166:557-580, (1983)) 记述的方法进行了转化,按照 Chang 等 (Chang S., Cohen SN., *Mol. Gen. Genet.*, 168:111-115, (1979)) 记述的方法进行了对枯草杆菌的转化。

[0210] 实施例 1

[0211] 琼脂分解细菌的筛选:

[0212] 用 Marine broth 2216 培养液 (Difco 公司制造) 适度稀释保存于海洋科学技术中心的海底土壤样品后,接种于 Marine 琼脂平板培养基,在 15 $^{\circ}$ C~55 $^{\circ}$ C 的各种温度下培养 16~48 小时。将分解了菌落周围的琼脂并在所应用的平板培养基上形成有凹陷的细菌再接种于另外的 Marine 琼脂平板培养基,在适合该细菌的温度条件下培养。然后,在同样的培养基上反复进行划线培养以分离琼脂分解细菌。

[0213] 在如上筛选得到的琼脂分解细菌中得到了 1325-A7 菌株、1325-A3 菌株及 A94 菌株,这些菌株是能够产生比以往被人们所知的琼脂分解酶活性更高的琼脂分解酶的微生物。用 CLUSTALX 多重序列排列程序 (Multiple Sequence Alignment Program, version 1.81) 测定这些菌株的 16SrDNA 序列,解析分类学的位置后我们认为,1325-A7 菌株、1325-A3 菌株及 A94 菌株都很可能是微球茎菌属的新型种。然而,由于 1325-A7 菌株及 A94 菌株具有运动性,也不排除其属于微球茎菌属以外的的新型属的可能性。

[0214] 实施例 2

[0215] (1) 琼脂糖酶基因的解析 (1)

[0216] 用 HindIII 和 EcoRI 消化微球茎菌属 sp. 1325-A7 菌株 (下文省略为“1325-A7 菌株”) 的染色体 DNA,得到 DNA 片段。用高纯度 PCR 产品纯化试剂盒 (Roche 公司制造) 精

制该 DNA 片段,得到精制 DNA 片段。用 DNA 连接试剂盒 ver. 2.0(TaKaRa 公司制造)将此精制 DNA 片段和预先用 HindIII 和 EcoRI 消化过的质粒载体 pUC18(TaKaRa 公司制造)连接起来。用此连接混合液对 *E. coli* HB101(F'supE44 hsdS20 recA13 ara-14 proA2lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5mtl-1 leuB6 thi-1) 进行转化,以此制备转化体。

[0217] 将如上制作的转化体接种至琼脂培养基,挑选在琼脂培养基上形成有凹陷的菌落作为具有琼脂分解活性的克隆体。将挑选出的具有琼脂分解活性的克隆在 LB 琼脂培养基(1%细菌培养液、0.5%酵母浸膏、1%氯化钠、7.5 μg/ml 的四环素或 50 μg/ml 的氨苄青霉素)上划线培养,于 37℃ 培养一夜。之后,用碘溶液染色培养基,将在菌体的周围形成了被认为是生成了源自琼脂的还原糖的透明光环的菌落视为目的克隆体。将如此得到的克隆体培养在含有 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,再从培养得到的细胞中提取质粒 DNA,得到重组质粒 pUA7。

[0218] 用与 pUC18 的多克隆位点的上游及下游序列相对应的如下引物,对所得重组质粒 pUA7 的插入片段的核苷酸序列进行解析。

[0219] 引物 1 :5' -GTGGAATTGTGAGCGGATAAC-3'

[0220] 引物 2 :5' -CGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'

[0221] 确定此重组质粒 pUA7 的插入片段的核苷酸序列(序列号 3)后,发现插入片段的大小为 2747bp, G+C 含量为 55%,其中有 1326bp 的开放阅读框(ORF)。此开放阅读框编码由 441 个氨基酸组成的蛋白质。并且在起始密码子的 8bp 上游存在有被推断为核糖体结合位点(RBS)的序列 5'-AAGGAG-3',在 64bp 上游存在有被推断为大肠杆菌(*E. coli*) σ 70 型的启动子序列 5'-TTCAAA-3'(-35 区域)和 5'-TAACCT-3'(-10 区域)(经 GENETYX-MAC 10.1 启动子检索,启动子值为 50.9)。在终止密码子的 36bp 下游处存在有反向重复序列,推测其起到转录终止子的作用。

[0222] 并且,对所述 ORF(下文称为“AgaA7”)编码的氨基酸序列进行了 FASTA 同源性检索(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>),结果发现,全部氨基酸(441 个氨基酸)与源自假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)ND137 菌株、气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)B9 菌株、大西洋假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas atlantica*)、*Zobellia galactaninovorans* Dsij 菌株(2 种)、微颤菌属(*Microscilla* sp.)PRE1 菌株、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)A3(2) 菌株的 β -琼脂糖酶分别有 55.3%、54.3%、52.6%、47.5%、41.2%、37.5%、34.5% 的部分具有一致性。

[0223] (2) 琼脂糖酶的表达及精制 (1)

[0224] 将编码 AgaA7 的 DNA 片段导入表达用载体 pHSP64(Sumitomo N, Ozaki K, Hitomi J, Kawaminami S, Kobayashi T, Kawai S, Ito S. (1995). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2172-2175) 中,将得到的重组质粒命名为 pA7AG。用 pA7AG 转化大肠杆菌 HB101。将得到的转化体于 LB 琼脂培养基培养一夜后,通过琼脂上的凹陷来确认在大肠杆菌 HB101 中重组体的琼脂糖酶活性。

[0225] 另外,还以革兰氏阳性菌中的枯草杆菌(*B. subtilis*) ISW1214(leuA8metB5 hsrM1) 为宿主对重组琼脂糖酶进行了高表达。用 pA7AG 转化枯草杆菌 ISW1214,用 CSL 培养基(10%谷物浸提液、0.5%鱼肉浸膏、0.05%酵母浸膏、0.2%磷酸二氢钾、0.02%七水硫酸镁、0.05%氯化钙、6%麦芽糖、15 μg/ml 四环素、pH6.8) 培养该转化体 72 小时,得到 82.5ml

的培养物上清液。

[0226] 于 4℃ 或以下进行所述培养物上清液的精制。首先,以 6500×g 的转速离心培养物上清液 10 分钟,分离菌体和培养物上清液。向得到的培养物上清液中缓缓添加硫酸铵,使其达到 60% 的饱和。以 8000×g 的转速离心回收生成的盐析物,再用少量 20mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 重悬沉淀物,用前述的缓冲液进行一夜透析。以 8000×g 的转速离心 15 分钟除去不溶残渣后,将其吸附在预先用 20mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 平衡的 DEAE-Toyopearl 650M 层析柱 (Tosoh 公司制造,2.5cm×15cm)。用 200ml 包含 50mM NaCl 的前述缓冲液清洗层析柱后,用 50mM ~ 500mM NaCl 的直线浓度梯度法 (总溶出量为 500ml) 进行了酶的溶出。合并具有琼脂糖酶活性的溶出成分,用超滤膜 PM-10 (Amicon 公司制造) 进行浓缩,再用 2.5mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 进行缓冲液交换,得到 5ml 的酶溶液。将此酶溶液加入预先用 2.5mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 平衡化后的羟基磷灰石层析柱 (日本 Chemical 公司制造,2.5cm×15cm) 后,活性几乎都在流出的部分中被检测到。接着,用超滤膜 PM-10 对该活性部分进行浓缩。再用 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 对得到的浓缩液进行一夜透析,得到 6.3ml 的酶液。

[0227] 以 0.2% 的精制琼脂 (Nacalai 公司制造) 为底物,在 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 中进行琼脂糖酶活性的测定。以 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定酶反应生成的还原糖。将每分钟生成相当于 1 μmol D-半乳糖的量的还原糖的酶活性表示为 1 个单位 (U)。并且,以 BSA 为标准品,用 DC 蛋白检测试剂盒 (Bio-Rad 公司制造) 进行蛋白质浓度的定量。

[0228] 如下表 1 所示,经过了阴离子交换色谱及羟基磷灰石色谱后的活性成分的酶比活性 (217U/mg 蛋白) 比培养物上清液的比活性上升了 310 倍,活性收率为 53.8%。在得到的酶溶液的 SDS-PAGE 和活性染色中只有一条条带,由此断定酶精制得很纯净。

[0229] 表 1

[0230]

精制方式	总蛋白质量 (mg)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	收率 (%)	精制度 (倍数)
培养物上清液	1763	1179	0.7	100	1.0
60%硫酸铵	212	975	4.6	82.7	6.6
DEAE-650M	70.4	889	12.6	75.4	18
羟基磷灰石	2.9	635	217	53.8	310

[0231] (3) 精制琼脂糖酶的性质 (1)

[0232] 对如上精制的琼脂糖酶 (下文称为“RagaA7”) 的下述性质进行研究。另外,除了特殊记述外,均以琼脂作底物。

[0233] < 作用 >

[0234] 用 TLC (薄层色谱) 分析了以通用性琼脂糖 (Agarose L 03; TaKaRa 公司制造) 为底物时 RagaA7 的反应生成物的经时变化 (图 4)。通过结果发现,本发明酶是催化琼脂糖的

β -1,4 键分解为末端型的反应的 β -琼脂糖酶。

[0235] <底物特异性>

[0236] 调查了 RagaA7 的底物特异性后发现,其作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖,生成来源于琼脂的寡聚糖,但是不分解具有与琼脂糖相同的 2 糖重复单位且该糖的一部分被硫酸基取代了的多糖类,如 ι 、 κ 、 λ -卡拉胶。

[0237] <pH 稳定性及作用最佳 pH>

[0238] 在 pH3 ~ pH9.5 之间用 50mM Britton-Robinson (BR) 广域缓冲液测定了 RagaA7 的作用最佳 pH,其中性的 pH 范围内具有活性,最佳 pH 为 pH5 ~ pH7.5 (图 5)。并且,通过在 pH3 ~ pH12 之间用 Britton-Robinson 广域缓冲液测定了于 40°C 分别保温 30 分钟后的残留活性,测定了 RagaA7 的 pH 稳定性。其在 pH4 ~ pH10 之间保持了最大活性的 50% 或 50% 以上 (图 6)。

[0239] <分子量>

[0240] 以 SDS-PAGE 测定的 RagaA7 的表观分子量约为 39kDa。该值小于 AgaA7 基因编码的成熟蛋白质的推定分子量 47kDa。推测是 RagaA7 受到宿主枯草杆菌 ISW1214 分泌的蛋白酶的分解,被低分子化了。测定了 RagaA7 的 N 末端氨基酸序列,该序列为 Met-Ala-Ala-Asp-Trp-Asp-Gly-Thr-Pro-Val,此序列相当于 RagaA7 的第 18 ~ 第 27 的氨基酸序列。

[0241] <温度的影响>

[0242] 为了调查 RagaA7 的热稳定性,测定了以 50mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 在各种温度下保温之后的残留活性,该酶在 15°C ~ 70°C 中稳定,最佳作用温度为 45°C ~ 55°C (图 7)。而且,于 54.8°C 进行 30 分钟热处理后的残留活性为未经热处理 (0°C, 30 分钟) 时的 43%,62.3°C 时为 42.6%,71.9°C 时为 37.9%,80.0°C 时为 37.9%。该酶的耐热性比 PSA 高 (图 8)。

[0243] <金属盐等的影响>

[0244] 考虑到产生 RagaA7 的微生物是从海洋分离得到,因此海水中的各种离子的浓度可能会影响酶活性,于是调查了 RagaA7 对这些离子的活性特性。首先调查了 NaCl 对本发明酶活性的影响,结果发现 RagaA7 的琼脂分解活性中并非必须有 NaCl,也几乎观察不到依赖于 NaCl 浓度的活性变化。即使在添加有更高浓度的 NaCl (1M) 时也保持了 80% 的活性。

[0245] 而且,也几乎没有观察到由海水中主要金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ (5mM 及 100mM) 的添加引起的活性的变化 (100% ~ 108%)。另外,还调查了被认为是海水中的微量金属离子对 RagaA7 活性的影响,结果发现, RagaA7 受浓度为 1mM 的 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的强烈抑制 (0% ~ 20%),略微受浓度为 1mM 的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 的抑制 (56% ~ 89%)。另外,不受 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cs^+ 、 Fe^{3+} 、 Li^+ 、 Mn^{2+} 的抑制 (101% ~ 108%)。并且,由此可以认为, RagaA7 的活性中,涉及 SH 基、CO 基、NH 基的酶蛋白的结构的维持是重要的。

[0246] 另外还进行了 EDTA 抑制酶活性的试验,通过在 40°C 处理 1 小时,该酶活性受到抑制,所述抑制与 EDTA 的浓度成比例,不过即使在 100mM 的 EDTA 中处理后仍保持 60% 的活性。由此可以认为,并不是 2 价金属离子与 RagaA7 的活性中心有关,而是部分 2 价金属离子在维持其结构上是必须的。

[0247] < 等电点 >

[0248] 按照等电点电泳法,用Multiphore II凝胶电聚焦系统、聚丙烯酰胺凝胶盘及广范围等电点标准试剂盒 (Pharmacia Fine Chemica AB, Uppsala, Sweden) 测定了 RagaA7 的等电点,结果为 3.5 ~ 5.5。

[0249] < 表面活性剂的影响 >

[0250] 按如下表 A2 所示的种类及浓度调查了表面活性剂对 RagaA7 的影响。分别向 RagaA7 中添加了 0.1% 及 1% 的非离子性表面活性剂 NonidetP40 (Nacalai Tesque 公司制造) 和 Triton X100 (Nacalai Tesque 公司制造) 以及阴离子性表面活性剂 Tween 20 (和光纯药工业会社制造) 和 SDS (Bio-Rad 公司制造) 后, RagaA7 的残留活性为不添加任何表面活性剂时的 100% 或其以上。

[0251] 表 2

[0252]

	浓度 (质量%)	相对活性 (%)
NonidetP40	0.1	136
	1	136
TritonX100	0.1	125
	1	127
Tween20	0.1	123
	1	123
SDS	0.1	141
	1	123
无添加	0	100

[0253] < 对 SDS 的稳定性 >

[0254] 调查了 RagaA7 对 SDS 的稳定性后发现,于 40℃、1.5% 的 SDS 中处理 1 小时后保持了与未处理时同样的活性。并且,以 0.1% 的 SDS 进行同样处理后,活性上升至未添加 SDS 时的 1.5 倍。RagaA7 对 SDS 的耐性比 PSA 高 (图 9)。

[0255] < 对化学试剂的耐性 >

[0256] 按如下表 3 所示的种类及浓度调查了 RagaA7 对化学试剂的耐性。RagaA7 受 0.1mM N-溴代丁二酰亚胺 (Sigma 公司制造) 的抑制,不受 0.5mM 碘代乙酰胺 (关东化学会社制造) 及对 (氯汞) 苯甲酸 (Nacalai Tesque 公司制造)、1mM N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (和光纯药工业会社制造)、10mM 二硫苏糖醇 (Pharmacia Biotech 公司制造) 及 2-巯基乙醇

(Nacalai Tesque 公司制造) 的抑制。

[0257] 表 3

[0258]

	浓度 (mM)	相对活性 (%)
N- 溴代丁二酰亚胺	0.1	5
碘代乙酰胺	0.5	106
N- 乙基顺丁烯二酰亚胺	1	110
对 (氯汞) 苯甲酸 *	0.5	97
二硫苏糖醇	10	109
2- 巯基乙醇	10	112
无添加	0	100

[0259] * 包含 5% 的二甲基亚砷

[0260] 实施例 3

[0261] (1) 琼脂糖酶基因的解析 (2)

[0262] 用 HindIII 消化微球茎菌属 sp. 1325-A3 菌株 (下文省略为“1325-A3 菌株”) 的染色体 DNA, 得到 DNA 片段。用高纯度 PCR 产品纯化试剂盒 (Roche 公司制造) 精制该 DNA 片段, 得到精制 DNA 片段。用 DNA 连接试剂盒 ver. 2.0 (TaKaRa 公司制造) 将此精制 DNA 片段和预先用 HindIII 消化、并经过虾的碱性磷酸酶 (Roche 公司制造) 处理的质粒载体 pUC18 (TaKaRa 公司制造) 连接起来。用此连接混合液对 E. coli HB101 (F' supE44 hsdS20 recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5mtl-1 leuB6 thi-1) 进行转化, 以此制作转化体。

[0263] 将如上制作的转化体接种至琼脂培养基, 挑选在琼脂培养基上形成有凹陷的菌落作为具有琼脂分解活性的克隆体。将挑选出的具有琼脂分解活性的克隆体在 LB 琼脂培养基 (1% 细菌培养胺、0.5% 酵母浸膏、1% 氯化钠、7.5 μ g/ml 的四环素或 50 μ g/ml 的氨苄青霉素) 上划线培养, 于 37°C 培养一夜。之后, 用碘溶液染色培养基, 将在菌体的周围形成了被认为是生成了源自琼脂的还原糖的透明光环的菌落视为目的克隆体。将如此得到的克隆体培养在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 再从培养得到的细胞中提取质粒 DNA, 得到重组质粒 pUA3。

[0264] 用与 pUC18 的多克隆位点的上游及下游序列相对应的如下引物, 对所得重组质粒 pUA3 的插入片段的核苷酸序列进行解析。

[0265] 引物 3 : 5' -GTGGAATTGTGAGCGGATAAC-3'

[0266] 引物 4 :5' -CGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'

[0267] 此重组质粒 pUA3 的插入片段的大小约为 3.9kb。测定 pUA3 的插入片段的碱基序列,比较此基因片段编码的氨基酸序列和已知蛋白质的氨基酸序列,进行同源性检索。结果显示,此基因片段编码的氨基酸序列中的一部分与源自其他微生物的琼脂糖酶具有同源性,因此此基因片段编码琼脂糖酶的一部分。但是认为,被推测编码了部分琼脂糖酶的碱基序列中不包含终止密码子,琼脂糖酶的 C 末端部分缺失。于是通过反向 PCR 法及盒式连接 PCR(cassette ligation PCR) 测定了此片段下游区域的碱基序列。序列号 7 显示了 pUA3 的插入片段及其下游区域的碱基序列。在其中检测出由 1809bp 组成的开放阅读框 (ORF)。此开放阅读框编码由 602 个氨基酸组成的蛋白质。并且在开始密码子的 6bp 上游存在有被推断为核糖体结合位点 (RBS) 的序列 5' -AAGGAG-3',在 136bp 上游存在有被推断为大肠杆菌的 σ 70 型的启动子序列 5' -TTGTTA-3' (-35 区域) 和 5' -TATTAT-3' (-10 区域) (经 GENETYX-MAC 10.1 启动子检索,启动子值为 50.9)。在终止位点的 15bp 下游处存在有反向重复序列,推测其起到转录终止子的作用。

[0268] 并且,对所述 ORF (下文称为“AgaA3”) 编码的氨基酸序列进行了 FASTA 同源性检索 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>),结果发现,全部氨基酸 (602 个氨基酸) 与源自大西洋假交替单胞菌、气单胞菌属 (*Aeromonas* sp.) B9 菌株、*Zobellia galactaninovorans* Dsij 菌株 (2 种)、假单胞菌属 ND137 菌株、天蓝色链霉菌 A3 (2) 菌株、微颤菌属 PRE1 菌株的 β -琼脂糖酶分别有 55.3%、54.3%、49.8%、36.8%、45.8%、34.6%、33.0% 的部分具有一致性。

[0269] (2) 琼脂糖酶的表达及精制 (2)

[0270] 将编码 AgaA3 的 DNA 片段导入表达用载体 pHSP64 (Sumitomo N, Ozaki K, Hitomi J, Kawaminami S, Kobayashi T, Kawai S, Ito S. (1995). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2172-2175) 中,将得到的重组质粒命名为 pA3AG。用 pA3AG 转化大肠杆菌 HB101。将得到的转化体于 LB 琼脂培养基培养一夜后,通过琼脂上的凹陷来确认在大肠杆菌 HB101 中重组体的琼脂糖酶活性。

[0271] 另外,还以革兰氏阳性菌中的枯草杆菌 ISW1214 (*leuA8 metB5 hsrM1*) 为宿主对重组琼脂糖酶进行了高表达。用 pA3AG 转化枯草杆菌 ISW1214,用 CSL 培养基 (10% 谷物浸提液、0.5% 鱼肉浸膏、0.05% 酵母浸膏、0.2% 磷酸二氢钾、0.02% 七水硫酸镁、0.05% 氯化钙、6% 麦芽糖、15 μ g/ml 四环素、pH6.8) 培养该转化体 72 小时,得到 82.5ml 的培养物上清液。

[0272] 于 4°C 或以下进行所述培养物上清液的精制。首先,以 6500 \times g 的转速离心培养物上清液 10 分钟,分离菌体和培养物上清液。向得到的培养物上清液中缓缓添加硫酸铵,使其达到 90% 的饱和。以 8000 \times g 的转速离心 25 分钟回收生成的盐析物,再用少量 20mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 重悬沉淀物,用前述的缓冲液进行一夜透析。以 8000 \times g 的转速离心 15 分钟除去不溶残渣后,将其吸附在预先用 20mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 平衡的 DEAE-Toyopearl 650M 层析柱 (Tosoh 公司制造,2.5cm \times 15cm)。用 200ml 包含 50mM NaCl 的前述缓冲液清洗层析柱后,用 50mM ~ 500mM NaCl 的直线浓度梯度法 (总溶出量为 500ml) 进行了酶的溶出。混合具有琼脂糖酶活性的溶出成分,用超滤膜 PM-10 (Amicon 公司制造) 进行浓缩,再用 2.5mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 进行缓冲液交换,得到 5ml 的酶溶液。将此酶溶液加入预先用 2.5mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 平衡的羟基磷灰石层析柱 (日

本 Chemical 公司制造, 2.5cm×15cm) 后, 活性几乎都在流出的部分中被检测到。接着, 用超滤膜 PM-10 对该活性部分进行浓缩。再用 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 对得到的浓缩液进行一夜透析, 得到 2.0ml 的酵母液。

[0273] 以 0.2% 的精制琼脂 (Nacalai 公司制造) 为底物, 在 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 中进行琼脂糖酶活性的测定。以 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定酶反应生成的还原糖。将每分钟生成相当于 1 μmol D-半乳糖的量的还原糖的酶活性表示为 1 个单位 (U)。并且, 以 BSA 为标准品, 用 DC 蛋白检测试剂盒 (Bio-Rad 公司制造) 进行蛋白质浓度的定量。

[0274] 如下表 4 所示, 经过了阴离子交换层析及羟基磷灰石层析后的活性成分的酶比活性 (364U/mg 蛋白) 比培养物上清液的比活性上升了 530 倍, 活性收率为 64.9%。在得到的酶溶液的 SDS-PAGE 和活性染色中具有非常接近的分子量, 包含 3 个具有琼脂糖酶活性的蛋白质。

[0275] 表 4

[0276]

精制方式	总蛋白质质量 (mg)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	收率 (%)	精制度 (倍数)
培养物上清液	803	551	0.7	100	1.0
90% 硫酸铵	203	547	2.7	99.3	3.9
DEAE-650M	10	408	40.7	74.1	59
羟基磷灰石	1.0	358	364	64.9	529

[0277] (3) 精制琼脂糖酶的性质 (2)

[0278] 对如上精制的琼脂糖酶 (下文称为“RagaA3”) 的下述性质进行研究。另外, 除了特殊记述外, 均以琼脂作底物。

[0279] < 作用 >

[0280] 用 TLC 分析了以通用性琼脂糖 (Agarose L 03; TaKaRa 公司制造) 为底物时 RagaA3 的反应生成物的经时变化 (图 10)。通过结果发现, 本发明酶是催化琼脂糖的 β-1,4 键分解为末端型的反应的 β-琼脂糖酶。

[0281] < 底物特异性 >

[0282] 调查了 RagaA3 的底物特异性后发现, 其作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互进行 β-1,4 键合以及 α-1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖, 生成来源于琼脂的寡聚糖, 但不分解具有与琼脂糖相同的 2 糖重复单位且该糖的一部分被硫酸基取代了的多糖类, 如 ι、κ、λ-卡拉胶。

[0283] < pH 稳定性及作用最佳 pH >

[0284] 在 pH3 ~ pH9.5 之间用 50mM Britton-Robinson 广域缓冲液测定了 RagaA3 的作用最佳 pH, 其中性的 pH 范围内具有活性, 最佳 pH 为 pH6.5 ~ pH7.5 (图 11)。并且, 通过在 pH3 ~ pH12 之间用 Britton-Robinson 广域缓冲液测定了于 40°C 分别保温 30 分钟后的

残留活性,测定了 RagaA3 的 pH 稳定性。其在 pH4 ~ pH10.5 之间保持了最大活性的 50% 或以上(图 12)。

[0285] <分子量>

[0286] 以 SDS-PAGE 测定的 RagaA3 的表观分子量约为 34kDa。该值小于 AgaA3 基因编码的成熟蛋白质的推定分子量 47kDa。推测是 RagaA3 受到宿主枯草杆菌 ISW1214 分泌的蛋白酶的分解,被低分子化了。测定了 RagaA3 的 N 末端氨基酸序列,该序列为 Ala-Leu-Ala-Ala-Asp-Trp-Asp-Asn-Ile-Pro,此序列相当于 RagaA3 的第 17 ~ 第 26 的氨基酸序列。

[0287] <温度的影响>

[0288] 为了调查 RagaA3 的热稳定性,测定了以 50mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 在各种温度下保温之后的残留活性,该酶在 50℃ 以下稳定,最佳作用温度为 50℃ ~ 60℃ (图 13)。而且,于 50℃ 进行 30 分钟热处理后的残留活性为未经热处理 (0℃, 30 分钟) 时的 96.3%, 64℃ 时为 52.3%, 74℃ 时为 39.5%, 83℃ 时为 32.6%。该酶的耐热性比 PSA 高 (图 14)。

[0289] <金属盐等的影响>

[0290] 考虑到产生 RagaA3 的微生物是从海洋分离得到,因此海水中含有的各种离子的浓度可能会影响酶活性,于是调查了 RagaA3 对这些离子的活性特性。首先调查了 NaCl 对本发明酶活性的影响,结果发现 RagaA3 的琼脂分解活性中并非必须有 NaCl,也几乎观察不到依赖于 NaCl 浓度的活性变化。即使在添加有更高浓度的 NaCl (1M) 时也保持了 90% 的活性。

[0291] 而且,也几乎没有观察到由海水中主要金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ (5mM 及 100mM) 的添加引起的活性的变化 (107% ~ 121%)。然后又调查了被认为是海水中的微量金属离子对 RagaA3 活性的影响,结果发现, RagaA3 受浓度为 1mM 的 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的强烈抑制 (残留活性 0% ~ 13%), 略受 Fe^{2+} 的抑制 (53%)。另外,不受 Co^{2+} 、 Cs^+ 、 Fe^{3+} 、 Li^+ 、 Mn^{2+} 的抑制 (100% ~ 111%)。并且,由此可以认为, RagaA3 的活性中,涉及 SH 基、CO 基、NH 基的酶蛋白的结构维持是重要的。

[0292] 另外还进行了 EDTA 抑制酶活性的试验,通过在 40℃ 处理 1 小时,该酶活性受到抑制,所述抑制与 EDTA 的浓度成比例,不过即使在 100mM 的 EDTA 中处理后仍保持 80% 的活性。由此可以认为,并不是 2 价金属离子与 RagaA3 的活性中心有关,而是部分 2 价金属离子在维持其结构上是必须的。

[0293] <等电点>

[0294] 按照等电点电泳法,用 Multiphore II 凝胶电聚焦系统、聚丙烯酰胺凝胶盘及广范围等电点标准试剂盒 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) 测定了 RagaA3 的等电点,结果为 3.5 ~ 4.5。

[0295] <表面活性剂的影响>

[0296] 按如下表 5 所示的种类及浓度调查了表面活性剂对 RagaA3 的影响。分别向 RagaA3 中添加了 0.1% 及 1% 的非离子性表面活性剂 NonidetP40 (Nacalai Tesque 公司制造) 和 Triton X100 (Nacalai Tesque 公司制造) 以及阴离子性表面活性剂 Tween 20 (和光纯药工业会社制造) 和 0.1% 的 SDS (Bio-Rad 公司制造) 后, RagaA3 的残留活性为不添加任何表面活性剂时的 100% 以上。不过,添加了 1% 的 SDS 时的残留活性约为不添加任何表面活性剂时的 50%。

[0297] 表 5

[0298]

	浓度 (质量%)	相对活性 (%)
NonidetP40	0.1	137
	1	140
TritonX100	0.1	130
	1	144
Tween20	0.1	136
	1	138
SDS	0.1	103
	1	48
无添加	0	100

[0299] <对 SDS 的稳定性>

[0300] 调查了 RagaA3 对 SDS 的稳定性后发现,于 40℃、至少 1% 的 SDS 中处理 1 小时后保持了未处理时 48% 的活性。RagaA3 对 SDS 的耐性比 PSA 高 (图 15)。

[0301] <对化学试剂的耐性>

[0302] 按如下表 6 所示的种类及浓度调查了 RagaA3 对化学试剂的耐性。RagaA3 受 0.1mM N- 溴代丁二酰亚胺 (Sigma 公司制造) 的抑制,不受 0.5mM 碘代乙酰胺 (关东化学会社制造) 及对 (氯汞) 苯甲酸 (Nacalai Tesque 公司制造)、1mM N- 乙基顺丁烯二酰亚胺 (和光纯药工业会社制造)、10mM 二硫苏糖醇 (Pharmacia Biotech 公司制造) 及 2- 巯基乙醇 (Nacalai Tesque 公司制造) 的抑制。

[0303] 表 6

[0304]

	浓度 (mM)	相对活性 (%)
N- 溴代丁二酰亚胺	0.1	3
碘代乙酰胺	0.5	104
N- 乙基顺丁烯二酰亚胺	1	129
对 (氯汞) 苯甲酸 *	0.5	120

	浓度 (mM)	相对活性 (%)
二硫苏糖醇	10	94
2- 巯基乙醇	10	97
无添加	0	100

[0305] * 包含 5% 的二甲基亚砷

[0306] 实施例 4

[0307] (1) 琼脂糖酶基因的解析 (3)

[0308] 用 Pst I 消化微球茎菌属 *sp.* A94 菌株 (下文省略为“A94 菌株”) 的染色体 DNA, 得到 DNA 片段。用高纯度 PCR 产品纯化试剂盒 (Roche 公司制造) 精制该 DNA 片段, 得到精制 DNA 片段。用 DNA 连接试剂盒 ver. 2.0 (TaKaRa 公司制造) 将此精制 DNA 片段和预先用 PstI 消化、并经过虾的碱性磷酸酶 (Roche 公司制造) 处理过的质粒载体 pUC18 (TaKaRa 公司制造) 连接起来。用此连接混合液对 *E. coli* HB101 (F' supE44 hsdS20 recA13ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1) 进行转化, 以此制作转化体。

[0309] 将如上制作的转化体接种至琼脂培养基, 挑选在琼脂培养基上形成有凹陷的菌落作为具有琼脂分解活性的克隆体。将挑选出的具有琼脂分解活性的克隆体在 LB 琼脂培养基 (1% 细菌培养液、0.5% 酵母浸膏、1% 氯化钠、7.5 μ g/ml 的四环素或 50 μ g/ml 的氨苄青霉素) 上划线培养, 于 37°C 培养一夜。之后, 用碘溶液染色培养基, 将在菌体的周围形成了被认为是生成了源自琼脂的还原糖的透明光环的菌落视为目的克隆体。将如此得到的克隆体培养在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 再从培养得到的细胞中提取质粒 DNA, 得到重组质粒 pUB。

[0310] 用与 pUC18 的多克隆位点的上游及下游序列相对应的如下引物, 对所得重组质粒 pUB 的插入片段的核苷酸序列进行解析。

[0311] 引物 5 :5' -GTGGAATTGTGAGCGGATAAC-3'

[0312] 引物 6 :5' -CGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'

[0313] 确定此重组质粒 pUB 的插入片段的核苷酸序列后 (序列号 11), 发现插入片段的大小为 3910bp, G+C 含量为 51%, 其中有 1302bp 的开放阅读框 (ORF)。此开放阅读框编码由 433 个氨基酸组成的蛋白质。并且在 ATG (起始密码子) 的 9bp 上游存在有被推断为核糖体结合位点 (RBS) 的序列 5' -AAGGAG-3', 在起始密码子 42bp 上游存在有与大肠杆菌的启动子保守序列 5' -TTGACA-3' (-35 区域) 和 5' -TATAAT-3' (-10 区域) 具有同源性的序列区域 5' -TTGTAG-3' (-35 区域) 和 5' -TATGGT-3' (-10 区域) (经 GENETYX-MAC 10.1 启动子检索, 启动子值为 56.2)。在终止密码子的 48bp 下游处存在有反向重复序列, 推测其起到转录终止子的作用。

[0314] 并且, 对所述 ORF (下文称为“AgaB”) 编码的氨基酸序列进行了 FASTA 同源性检索 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>), 结果发现, 全部氨基酸 (433 个氨基酸) 与源自假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*) ND137 菌株、气单胞菌属 (*Aeromonas sp.*) B9 菌株、大西洋假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas atlantica*)、*Zobellia galactaninovorans* Dsij 菌株 (2 种)、微

颤菌属 (*Microscillasp.*)PRE1 菌株、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)A3(2) 菌株的 β -琼脂糖酶分别有 61.8%、54.3%、52.1%、55.0%、44.6%、36.5%、37.5% 的部分具有一致性。

[0315] (2) 琼脂糖酶的表达及精制 (3)

[0316] 将编码 AgaB 的 DNA 片段导入表达用载体 pHSP64 (Sumitomo N, Ozaki K, Hitomi J, Kawaminami S, Kobayashi T, Kawai S, Ito S. (1995). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2172-2175) 中, 将得到的重组质粒命名为 pBAG1。用 pBAG1 转化大肠杆菌 HB101。将得到的转化体于 LB 琼脂培养基培养一夜后, 通过琼脂上的凹陷来确认在大肠杆菌 HB101 中重组体的琼脂糖酶活性。

[0317] 另外, 还以革兰氏阳性菌中的枯草杆菌 ISW1214 (*leuA8 metB5 hsrM1*) 为宿主对重组琼脂糖酶进行了高表达。用 pBAG1 转化枯草杆菌 ISW1214, 用 CSL 培养基 (10% 谷物浸提液、0.5% 鱼肉浸膏、0.05% 酵母浸膏、0.2% 磷酸二氢钾、0.02% 七水硫酸镁、0.05% 氯化钙、6% 麦芽糖、15 μ g/ml 四环素、pH6.8) 培养该转化体 72 小时, 得到 669ml 的培养物上清液。

[0318] 于 4°C 或以下进行所述培养物上清液的精制。首先, 以 6500 \times g 的转速离心培养物上清液 10 分钟, 分离菌体和培养物上清液。向得到的培养物上清液中缓缓添加硫酸铵, 使其达到 80% 的饱和。以 8000 \times g 的转速离心 25 分钟回收生成的盐析物, 再用少量 20mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 重悬沉淀物, 用前述的缓冲液进行一夜透析。以 8000 \times g 的转速离心 15 分钟除去不溶残渣后, 将其吸附在预先用 20mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 平衡的 DEAE-Toyopearl 650M 层析柱 (Tosoh 公司制造, 2.5cm \times 15cm)。用 200ml 包含 50mM NaCl 的前述缓冲液清洗层析柱后, 用 50mM ~ 500mM NaCl 的直线浓度梯度法 (总溶出量为 500ml) 进行了酶的溶出。混合具有琼脂糖酶活性的溶出成分, 用超滤膜 PM-10 (Amicon 公司制造) 进行浓缩, 再用 2.5mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 进行缓冲液交换, 得到 5ml 的酶溶液。将此酶溶液加入预先用 2.5mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 平衡的羟基磷灰石层析柱 (日本 Chemical 公司制造, 2.5cm \times 15cm) 后, 活性几乎都在流出的部分中被检测到。接着, 用超滤膜 PM-10 对该活性部分进行浓缩。再用 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 对得到的浓缩液进行一夜透析, 得到 0.6ml 的酵母液。

[0319] 以 0.2% 的精制琼脂 (Nacalai 公司制造) 为底物, 在 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 中进行琼脂糖酶活性的测定。以 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定酶反应生成的还原糖。将每分钟生成相当于 1 μ mol D-半乳糖的量的还原糖的酶活性表示为 1 个单位 (U)。并且, 以 BSA 为标准品, 用 DC 蛋白检测试剂盒 (Bio-Rad 公司制造) 进行蛋白质浓度的定量。

[0320] 如下表 7 所示, 经过了阴离子交换层析及羟基磷灰石层析后的活性成分的酶比活性 (459U/mg 蛋白) 比培养物上清液的比活性上升了 219 倍, 活性收率为 9.0%。在得到的酶溶液的 SDS-PAGE 和活性染色中只有一条条带, 由此断定酶精制得很纯净。

[0321] 表 7

[0322]

精制方式	总蛋白质质量 (mg)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	收率 (%)	精制度 (倍数)
培养物上清液	669	1393	2.1	100	1.0
80%硫酸铵	97.6	1239	12.7	88.9	6.1
DEAE-650M	12.1	686	56.8	49.2	27.2
羟基磷灰石	0.3	126	459	27.2	220

[0323] (3) 精制琼脂糖酶的性质 (3)

[0324] 对如上精制的琼脂糖酶（下文称为“RagaB”）的下述性质进行研究。另外，除了特殊记述外，均以琼脂作底物。

[0325] < 作用 >

[0326] 用 TLC 分析了以通用性琼脂糖 (Agarose L 03 :TaKaRa 公司制造) 为底物时 RagaB 的反应生成物的经时变化 (图 16)。通过结果发现,本发明酶是催化琼脂糖的 β -1,4 键分解为末端型的反应的 β -琼脂糖酶。

[0327] < 底物特异性 >

[0328] 调查了 RagaB 的底物特异性后发现,其作用于具有由琼脂、琼脂糖等 D-半乳糖与 3,6-脱水-L-半乳糖相互进行 β -1,4 键合以及 α -1,3 键合而形成的骨架的多糖类及具有相同骨架的寡聚糖,生成来源于琼脂的寡聚糖,但不分解具有与琼脂糖相同的 2 糖重复单位且该糖的一部分被硫酸基取代了的多糖类,如 ι 、 κ 、 λ -卡拉胶。

[0329] < pH 稳定性及作用最佳 pH >

[0330] 在 pH3 ~ pH11 之间用 50mM Britton-Robinson 广域缓冲液测定了 RagaB 的作用最佳 pH,其在中性的 pH 范围内具有活性,最佳 pH 为 pH6.5 ~ pH7.5 (图 17)。并且,通过在 pH3 ~ pH12 之间用 Britton-Robinson 广域缓冲液测定了于 40°C 分别保温 30 分钟后的残留活性,测定了 RagaB 的 pH 稳定性。其在 pH4 ~ pH10 之间保持了最大活性的 50% 以上 (图 18)。

[0331] < 分子量 >

[0332] 以 SDS-PAGE 测定的 RagaB 的表观分子量为 32kDa。该值小于以 AgaB 基因编码的成熟蛋白质的推定分子量 46kDa。推测是 RagaB 受到宿主枯草杆菌 ISW1214 分泌的蛋白酶的分解,被低分子化了。测定了 RagaB 的 N 末端氨基酸序列,该序列为 Tyr-Ala-Ala-Asp-Trp-Asp-Gly-Val-Pro-Val,此序列相当于 RagaB 的第 19 ~ 第 28 的氨基酸序列。

[0333] < 温度的影响 >

[0334] 为了调查 RagaB 的热稳定性,测定了以 50mM 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 在各种温度下保温之后的残留活性,该酶在 50°C 或其以下稳定,最佳作用温度为 50°C ~ 60°C (图 19)。而且,于 50°C 进行 30 分钟热处理后的残留活性为未经热处理 (0°C, 30 分钟) 时的 88.0%, 64°C 时为 17.6%, 74°C 时为 15.1%, 83°C 时为 11.3%。该酶的耐热性比 PSA 高 (图 20)。

[0335] < 金属盐等的影响 >

[0336] 考虑到产生 RagaB 的微生物是从海洋分离得到,因此海水中的各种离子的浓度可能会影响酶活性,于是调查了 RagaB 对这些离子的活性特性。首先调查了 NaCl 对本发明酶活性的影响,结果发现 RagaA7 的琼脂分解活性中并非必须有 NaCl,也观察不到依赖于 NaCl 浓度的活性变化。即使在添加有更高浓度的 NaCl (1M) 时也保持了 90% 的活性。

[0337] 而且,也几乎没有观察到由海水中主要金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ (5mM 及 100mM) 的添加引起的活性的变化 (96% ~ 114%)。还调查了被认为是海水中的微量金属离子对 RagaB 活性的影响,结果发现,RagaB 受浓度为 1mM 的 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的强烈抑制 (0% ~ 35%)。另外,不受 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cs^+ 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Li^+ 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 的抑制 (101% ~ 118%)。并且,由此可以认为,RagaB 的活性中,涉及 SH 基、CO 基、NH 基的酶蛋白的结构的维持是重要的。

[0338] 另外还进行了 EDTA 抑制酶活性的试验,通过在 40℃ 处理 1 小时,该酶活性受到抑制,所述抑制与 EDTA 的浓度成比例,不过即使在 100mM 的 EDTA 中处理后仍保持 74% 的活性。由此可以认为,并不是 2 价金属离子与 RagaB 的活性中心有关,而是部分 2 价金属离子在维持其结构上是必须的。

[0339] < 等电点 >

[0340] 按照等电点电泳法,用 Multiphore II 凝胶电聚焦系统、聚丙烯酰胺凝胶盘及广范围等电点标准试剂盒 (Pharmacia Fine Chemical AB, Uppsala, Sweden) 测定了 RagaB 的等电点,结果为 3.7 ~ 5.2。

[0341] < 表面活性剂的影响 >

[0342] 按如下表 8 所示的种类及浓度调查了表面活性剂对 RagaB 的影响。分别向 RagaB 中添加了 0.1% 及 1% 的非离子性表面活性剂 NonidetP40 (Nacalai Tesque 公司制造) 和 Triton X100 (Nacalai Tesque 公司制造) 以及阴离子性表面活性剂 Tween 20 (和光纯药工业会社制造) 和 SDS (Bio-Rad 公司制造) 后, RagaB 的残留活性为不添加任何表面活性剂时的 100% 或其以上。

[0343] 表 8

[0344]

	浓度 (质量%)	相对活性 (%)
NonidetP40	0.1	156
	1	147
TritonX100	0.1	146
	1	162
Tween20	0.1	145
	1	144

	浓度(质量%)	相对活性(%)
SDS	0.1	137
	1	139
无添加	0	100

[0345] <对 SDS 的稳定性>

[0346] 调查了 RagaB 对 SDS 的稳定性后发现,于 40℃、2.0% 的 SDS 中处理 1 小时后保持了与未处理时同样的活性。并且,以 0.4% 的 SDS 进行同样处理后,活性上升至未添加 SDS 时的 2.0 倍。RagaB 对 SDS 的耐性比 PSA 高(图 21)。

[0347] <对化学试剂的耐性>

[0348] 按如下表 9 所示的种类及浓度调查了 RagaB 对化学试剂的耐性。RagaB 受 0.1mM N-溴代丁二酰亚胺(Sigma 公司制造)的抑制,不受 0.5mM 碘代乙酰胺(关东化学会社制造)及对(氯汞)苯甲酸(Nacalai Tesque 公司制造)、1mM N-乙基顺丁烯二酰亚胺(和光纯药工业会社制造)、10mM 二硫苏糖醇(Pharmacia Biotech 公司制造)及 2-巯基乙醇(Nacalai Tesque 公司制造)的抑制。

[0349] 表 9

[0350]

	浓度(mM)	相对活性(%)
N-溴代丁二酰亚胺	0.1	5
碘代乙酰胺	0.5	100
N-乙基顺丁烯二酰亚胺	1	121
对(氯汞)苯甲酸*	0.5	118
二硫苏糖醇	10	98
2-巯基乙醇	10	101
无添加	0	100

[0351] *包含 5% 的双甲基亚砷

[0352] 工业上的可利用性

[0353] 由本发明提供具有耐热性的新型琼脂分解酶及编码所述琼脂分解酶的核苷酸序列。

[0354] 应用此酶可以提供在工业中大量生产源自琼脂的寡聚糖的生产方法,该寡聚糖在

[0391]	115	120	125
[0392]	Asn Leu Thr Met Ala Asn Ala Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr		
[0393]	130	135	140
[0394]	Gln Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Pro Ser Glu		
[0395]	145	150	155
[0396]	Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg		
[0397]	165	170	175
[0398]	Glu Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Asp Gly Ser Trp Tyr Pro		
[0399]	180	185	190
[0400]	Asn Pro Asn Gly Gly Thr Trp Arg Asp Gln Trp Ile Arg Ile Gly Thr		
[0401]	195	200	205
[0402]	Tyr Trp Val Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu His		
[0403]	210	215	220
[0404]	Val Arg Thr Val Thr Gly Pro Ser Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr		
[0405]	225	230	235
[0406]	Gly Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu		
[0407]	245	250	255
[0408]	His Gln Pro Trp Arg Asp Thr Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Glu		
[0409]	260	265	270
[0410]	Glu Leu Ala Asp Pro Ser Arg Asn Lys Phe Leu Val Asp Trp Val Arg		
[0411]	275	280	285
[0412]	Phe Tyr Lys Pro Val Pro Asp Thr Asn Gly Gly Gly Pro Gly Asn Gly		
[0413]	290	295	300
[0414]	Ser Ile Ser Val Glu Lys Glu Ala Glu Asp Phe Asp Asn Val Gly Gly		
[0415]	305	310	315
[0416]	Tyr Phe Ser Asp Gly Gln Ser Gln Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Gly		
[0417]	325	330	335
[0418]	Ala Thr Thr Ala Ile Asn Tyr Val Asn Arg Glu Asp Tyr Ala Asp Tyr		
[0419]	340	345	350
[0420]	Thr Val Thr Val Pro Glu Asp Arg Ile Tyr Asn Ile Thr Tyr Asn Ile		
[0421]	355	360	365
[0422]	Ser Ser Gly Ile Thr Gly Gly Arg Ile Asp Phe Leu Val Asn Glu Ser		
[0423]	370	375	380
[0424]	Gly Thr Trp Ser Asn Lys Thr Gln Thr Ala Val Pro Asn Ala Gly Trp		
[0425]	385	390	395
[0426]	Asn Asn Phe Gln Pro Leu Ser Gly Gly Thr Val Tyr Leu Glu Ala Gly		
[0427]	405	410	415
[0428]	Thr His Thr Val Arg Leu Tyr Gly Ala Gly Thr His Asp Trp Gln Trp		
[0429]	420	425	430

[0430]	Asn Leu Asp Lys Phe Thr Leu Ser Asn	
[0431]	435	440
[0432]	<210>2	
[0433]	<211>1326	
[0434]	<212>DNA	
[0435]	<213> 琼脂分解酶 (RagaA7)	
[0436]	<400>2	
[0437]	atgaaaacca ctcaagtgcg cctggcgggc ctcgtgttta gtacccccct gatggccgcc	60
[0438]	gactgggacg gactccggt tccagccgat gcgggccccg gcaacacctg ggagctacac	120
[0439]	ccgctctctg atgacttcaa ctactcggca ccagcttccg gtaagagcgc cacattcttc	180
[0440]	gagcgctgga gcaaggcctt tatcaacccc tggctaggcc cgggcgaaac cgagtactac	240
[0441]	ggcccaaact cctcggtaga aagcggtaac ctggtcatta aagccagccg caaggccgga	300
[0442]	accaccaaga ttcattgccg cgctatccac tccaatgaaa gcgtcaccta ccccctgtat	360
[0443]	atggaagcgc gcgttcaggt caccaacctc accatggcca acgccttctg gttgctgagc	420
[0444]	tctgattcca cccaggaaat cgacgtactg gaatcctacg gcagtgaccg tcccagcgag	480
[0445]	acctggttcg atgagcgctt gcacctcagc catcacgtgt ttatccgca gccgttccag	540
[0446]	gactaccagc ccaaagatga cggcagctgg tacccaaacc ccaatggcgg cacctggcgc	600
[0447]	gatcaatgga ttcgaatcgg cacctactgg gtagatccct ggacactgga gtactacgtc	660
[0448]	aacggcgagc acgtacgcac tgtcaccggc ccgagtatga tcgacccta cggtataca	720
[0449]	ggcggcacgg gcctcagcaa accgatgcag gtaatcttcg acgcagaaca ccaaccctgg	780
[0450]	cgcgatacgc agggcacagc gccgcccaca gatgaagaac tggccgatcc gagccgaaac	840
[0451]	aaattcctgg ttgactgggt tcgcttttat aaaccctgc ctgataccaa tggcgggtggc	900
[0452]	cccggcaatg ggagcatcag tgtcagaaaa gaggcggaag atttcgataa cgttggaggc	960
[0453]	tatttttcag acggccaatc gcaagccatt agcactaca caacgggagc tacgacagcg	1020
[0454]	atcaattacg tgaatcgca agactatgca gactataccg tcaccgtgcc tgaagatcgc	1080
[0455]	atctacaaca ttacctataa catcagtagc ggtattaccg gtggacgtat tgacttcctt	1140
[0456]	gtcaatgaaa gtggaacctg gagcaacaag acacagacag cggtacctaa tgccggtgg	1200
[0457]	aacaatttc aaccattaag cggaggtacg gtttatctcg aagccgtac acatactgtg	1260
[0458]	agactttacg ggcaggtac acacgactgg cagtggaatc tegacaaatt tacgttgagc	1320
[0459]	aactga	1326
[0460]	<210>3	
[0461]	<211>2747	
[0462]	<212>DNA	
[0463]	<213>Microbulbifer sp. 1325-A7	
[0464]	<220>	
[0465]	<221>-35_信号	
[0466]	<222>(782).. (787)	
[0467]	<223>	
[0468]	<220>	

[0469]	<221>-10_信号	
[0470]	<222>(805)..(810)	
[0471]	<223>	
[0472]	<220>	
[0473]	<221>RBS	
[0474]	<222>(861)..(866)	
[0475]	<223>	
[0476]	<220>	
[0477]	<221>信号肽	
[0478]	<222>(874)..(930)	
[0479]	<223>	
[0480]	<220>	
[0481]	<221>CDS	
[0482]	<222>(874)..(2196)	
[0483]	<223>	
[0484]	<400>3	
[0485]	aagcttgcca ctggagaagg ccagacggat attgccccag ctcaccgccg cggaacgttc	60
[0486]	accgacattt accgaagact tctgateccg ctcttggctc gccgcagcgc caatgtcact	120
[0487]	ctcgggctca cgatacagcc agtaccagat cgccgccag acgatcccga tcacccaga	180
[0488]	gataataaac agcccgcgc agccaaaaca ctctgaatc aaagccagta ccggcatcaa	240
[0489]	aaatgcgaga ccgataaact gcccggaggt atacaccgca atcgactgg cccgctcctg	300
[0490]	ctgagaaaac cattgggtaa cgatcttatt attcgcgggg taggacggcg cctcgaaaaa	360
[0491]	accgatgcc atgcggcac ccaccagcgc gccagtgaa ctgaccagac cctgtacgat	420
[0492]	ggtcgccagc gaccaggcca ccagaatgaa gggatacagg atccgcacct tcaccacatc	480
[0493]	cacaatcatc ccaccgggaa tctgcatgat ggaatagtc caggcgaagg cagagaagat	540
[0494]	aatccccatc tgtacggatg tgaggctcag atcctcagaa atcgattgg ccgccaccga	600
[0495]	gatattggtg cggtcctat agttgatcac cacactgata aagatcagtg ccagaacccc	660
[0496]	gaatttattg getgcttca taccgctact gcatcgctgt tgttatgtgg tegcgacgcg	720
[0497]	gcattgagtg cctggaaatg cgaacgagtc ccattccgt acctgcgcaa tcaatggcca	780
[0498]	cttcaaattg tcaacaatta acagtaacct aaccgctcca atataacaat aacgcgctca	840
[0499]	tccagtacca gaatgagcgc aaggagcaaa gca atg aaa acc act cag tgc gcc	894
[0500]		Met Lys Thr Thr Gln Cys Ala
[0501]		1 5
[0502]	ctg gcg gcg ctc gtg ttt agt acc ccc ctg atg gcc gcc gac tgg gac	942
[0503]	Leu Ala Ala Leu Val Phe Ser Thr Pro Leu Met Ala Ala Asp Trp Asp	
[0504]	10 15 20	
[0505]	ggc act ccg gtt cca gcc gat gcg ggc ccc ggc aac acc tgg gag cta	990
[0506]	Gly Thr Pro Val Pro Ala Asp Ala Gly Pro Gly Asn Thr Trp Glu Leu	
[0507]	25 30 35	

[0508]	cac ccg ctc tct gat gac ttc aac tac tcg gca cca gct tcc ggt aag	1038
[0509]	His Pro Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr Ser Ala Pro Ala Ser Gly Lys	
[0510]	40 45 50 55	
[0511]	agc gcc aca ttc ttc gag cgc tgg agc gaa ggc ttt atc aac ccc tgg	1086
[0512]	Ser Ala Thr Phe Phe Glu Arg Trp Ser Glu Gly Phe Ile Asn Pro Trp	
[0513]	60 65 70	
[0514]	cta ggc ccg ggc gaa acc gag tac tac ggc cca aac tcc tcg gta gaa	1134
[0515]	Leu Gly Pro Gly Glu Thr Glu Tyr Tyr Gly Pro Asn Ser Ser Val Glu	
[0516]	75 80 85	
[0517]	agc ggt aac ctg gtc att aaa gcc agc cgc aag gcc gga acc acc aag	1182
[0518]	Ser Gly Asn Leu Val Ile Lys Ala Ser Arg Lys Ala Gly Thr Thr Lys	
[0519]	90 95 100	
[0520]	att cat gcc ggc gct atc cac tcc aat gaa agc gtc acc tac ccc ctg	1230
[0521]	Ile His Ala Gly Ala Ile His Ser Asn Glu Ser Val Thr Tyr Pro Leu	
[0522]	105 110 115	
[0523]	tat atg gaa gcg cgc gtt cag gtc acc aac ctc acc atg gcc aac gcc	1278
[0524]	Tyr Met Glu Ala Arg Val Gln Val Thr Asn Leu Thr Met Ala Asn Ala	
[0525]	120 125 130 135	
[0526]	ttc tgg ttg ctg agc tct gat tcc acc cag gaa atc gac gta ctg gaa	1326
[0527]	Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr Gln Glu Ile Asp Val Leu Glu	
[0528]	140 145 150	
[0529]	tcc tac ggc agt gac cgt ccc agc gag acc tgg ttc gat gag cgc ctg	1374
[0530]	Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Pro Ser Glu Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu	
[0531]	155 160 165	
[0532]	cac ctc agc cat cac gtg ttt atc cgc gag ccg ttc cag gac tac cag	1422
[0533]	His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg Glu Pro Phe Gln Asp Tyr Gln	
[0534]	170 175 180	
[0535]	ccc aaa gat gac ggc agc tgg tac cca aac ccc aat ggc ggc acc tgg	1470
[0536]	Pro Lys Asp Asp Gly Ser Trp Tyr Pro Asn Pro Asn Gly Gly Thr Trp	
[0537]	185 190 195	
[0538]	cgc gat caa tgg att cga atc ggc acc tac tgg gta gat ccc tgg aca	1518
[0539]	Arg Asp Gln Trp Ile Arg Ile Gly Thr Tyr Trp Val Asp Pro Trp Thr	
[0540]	200 205 210 215	
[0541]	ctg gag tac tac gtc aac ggc gag cac gta cgc act gtc acc ggc ccg	1566
[0542]	Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu His Val Arg Thr Val Thr Gly Pro	
[0543]	220 225 230	
[0544]	agt atg atc gac ccc tac ggc tat aca ggc ggc acg ggc ctc agc aaa	1614
[0545]	Ser Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Leu Ser Lys	
[0546]	235 240 245	

[0547] ccg atg cag gta atc ttc gac gca gaa cac caa ccc tgg cgc gat acg 1662
 [0548] Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu His Gln Pro Trp Arg Asp Thr
 [0549] 250 255 260
 [0550] cag ggc aca gcg ccg ccg aca gat gaa gaa ctg gcc gat ccg agc cga 1710
 [0551] Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Ala Asp Pro Ser Arg
 [0552] 265 270 275
 [0553] aac aaa ttc ctg gtt gac tgg gtt cgc ttt tat aaa ccc gtg cct gat 1758
 [0554] Asn Lys Phe Leu Val Asp Trp Val Arg Phe Tyr Lys Pro Val Pro Asp
 [0555] 280 285 290 295
 [0556] acc aat ggc ggt ggc ccc ggc aat ggg agc atc agt gtc gag aaa gag 1806
 [0557] Thr Asn Gly Gly Gly Pro Gly Asn Gly Ser Ile Ser Val Glu Lys Glu
 [0558] 300 305 310
 [0559] gcg gaa gat ttc gat aac gtt gga ggc tat ttt tca gac ggc caa tcg 1854
 [0560] Ala Glu Asp Phe Asp Asn Val Gly Gly Tyr Phe Ser Asp Gly Gln Ser
 [0561] 315 320 325
 [0562] caa gcc att agc acc tac aca acg gga gct acg aca gcg atc aat tac 1902
 [0563] Gln Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Gly Ala Thr Thr Ala Ile Asn Tyr
 [0564] 330 335 340
 [0565] gtg aat cgc gaa gac tat gca gac tat acc gtc acc gtg cct gaa gat 1950
 [0566] Val Asn Arg Glu Asp Tyr Ala Asp Tyr Thr Val Thr Val Pro Glu Asp
 [0567] 345 350 355
 [0568] cgc atc tac aac att acc tat aac atc agt agc ggt att acc ggt gga 1998
 [0569] Arg Ile Tyr Asn Ile Thr Tyr Asn Ile Ser Ser Gly Ile Thr Gly Gly
 [0570] 360 365 370 375
 [0571] cgt att gac ttc ctt gtc aat gaa agt gga acc tgg agc aac aag aca 2046
 [0572] Arg Ile Asp Phe Leu Val Asn Glu Ser Gly Thr Trp Ser Asn Lys Thr
 [0573] 380 385 390
 [0574] cag aca gcg gta cct aat gcc ggc tgg aac aat ttc caa cca tta agc 2094
 [0575] Gln Thr Ala Val Pro Asn Ala Gly Trp Asn Asn Phe Gln Pro Leu Ser
 [0576] 395 400 405
 [0577] gga ggt acg gtt tat ctc gaa gcc ggt aca cat act gtg aga ctt tac 2142
 [0578] Gly Gly Thr Val Tyr Leu Glu Ala Gly Thr His Thr Val Arg Leu Tyr
 [0579] 410 415 420
 [0580] ggg gca ggt aca cac gac tgg cag tgg aat ctc gac aaa ttt acg ttg 2190
 [0581] Gly Ala Gly Thr His Asp Trp Gln Trp Asn Leu Asp Lys Phe Thr Leu
 [0582] 425 430 435
 [0583] agc aac tgacaatcac caaagcaaaa ggccggagcg gaagctccct ccggcctttt 2246
 [0584] Ser Asn
 [0585] 440

[0625]	195	200	205
[0626]	Tyr Trp Val Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu His		
[0627]	210	215	220
[0628]	Val Arg Thr Val Thr Gly Pro Ser Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr		
[0629]	225	230	235
[0630]	Gly Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu		
[0631]	245	250	255
[0632]	His Gln Pro Trp Arg Asp Thr Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Glu		
[0633]	260	265	270
[0634]	Glu Leu Ala Asp Pro Ser Arg Asn Lys Phe Leu Val Asp Trp Val Arg		
[0635]	275	280	285
[0636]	Phe Tyr Lys Pro Val Pro Asp Thr Asn Gly Gly Gly Pro Gly Asn Gly		
[0637]	290	295	300
[0638]	Ser Ile Ser Val Glu Lys Glu Ala Glu Asp Phe Asp Asn Val Gly Gly		
[0639]	305	310	315
[0640]	Tyr Phe Ser Asp Gly Gln Ser Gln Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Gly		
[0641]	325	330	335
[0642]	Ala Thr Thr Ala Ile Asn Tyr Val Asn Arg Glu Asp Tyr Ala Asp Tyr		
[0643]	340	345	350
[0644]	Thr Val Thr Val Pro Glu Asp Arg Ile Tyr Asn Ile Thr Tyr Asn Ile		
[0645]	355	360	365
[0646]	Ser Ser Gly Ile Thr Gly Gly Arg Ile Asp Phe Leu Val Asn Glu Ser		
[0647]	370	375	380
[0648]	Gly Thr Trp Ser Asn Lys Thr Gln Thr Ala Val Pro Asn Ala Gly Trp		
[0649]	385	390	395
[0650]	Asn Asn Phe Gln Pro Leu Ser Gly Gly Thr Val Tyr Leu Glu Ala Gly		
[0651]	405	410	415
[0652]	Thr His Thr Val Arg Leu Tyr Gly Ala Gly Thr His Asp Trp Gln Trp		
[0653]	420	425	430
[0654]	Asn Leu Asp Lys Phe Thr Leu Ser Asn		
[0655]	435	440	
[0656]	<210>5		
[0657]	<211>602		
[0658]	<212>PRT		
[0659]	<213> 琼脂分解酶 (RagaA3)		
[0660]	<400>5		
[0661]	Met Lys Thr Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu Ser Ser Ser		
[0662]	1	5	10
[0663]	Ala Leu Ala Ala Asp Trp Asp Asn Ile Pro Val Pro Ala Asp Ala Gly		

[0664]	20	25	30
[0665]	Ala Gly Asn Thr Trp Glu Leu His Ser Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr		
[0666]	35	40	45
[0667]	Ala Ala Pro Pro Val Gly Lys Ser Ala Thr Phe Phe Glu Arg Trp Ser		
[0668]	50	55	60
[0669]	Glu Gly Phe Ile Asn Pro Trp Leu Gly Pro Gly Glu Thr Glu Tyr Tyr		
[0670]	65	70	75
[0671]	Ala Pro Asn Ser Tyr Val Glu Gly Gly Asn Leu Val Ile Lys Ala Ser		
[0672]	85	90	95
[0673]	Arg Lys Pro Gly Thr Ile Lys Val His Thr Gly Ala Ile His Ser Lys		
[0674]	100	105	110
[0675]	Glu Ser Met Thr Tyr Pro Leu Phe Met Glu Ala Arg Val Lys Ile Thr		
[0676]	115	120	125
[0677]	Asn Leu Thr Leu Ala Asn Ala Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr		
[0678]	130	135	140
[0679]	Glu Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Pro Ser Glu		
[0680]	145	150	155
[0681]	Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg		
[0682]	165	170	175
[0683]	Glu Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro		
[0684]	180	185	190
[0685]	Asn Pro Asp Gly Gly His Trp Arg Asp Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val		
[0686]	195	200	205
[0687]	Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu His		
[0688]	210	215	220
[0689]	Val Arg Thr Val Ser Gly Val Glu Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr		
[0690]	225	230	235
[0691]	Asn Gly Asn Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu		
[0692]	245	250	255
[0693]	His Gln Pro Trp Arg Asp Ala Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Glu		
[0694]	260	265	270
[0695]	Glu Leu Ala Asp Pro Ser Arg Asn Lys Phe Leu Val Asp Trp Val Arg		
[0696]	275	280	285
[0697]	Phe Tyr Lys Pro Val Ala Asp Asn Asn Gly Gly Gly Asp Pro Asp Asn		
[0698]	290	295	300
[0699]	Gly Gly Asp Pro Gly Asn Gly Gly Asn Pro Gly Ser Gly Glu Thr Ile		
[0700]	305	310	315
[0701]	Arg Val Glu Met Gly Ser Phe Ser Ala Thr Gly Lys Ala Gly Ala Ala		
[0702]	325	330	335

[0703] Val Ala Gly Asp Thr Val Ala Gly Phe Asn Ser Asn Gly Asp Asn Ile
 [0704] 340 345 350
 [0705] Asn Tyr Asn Thr Leu Gly Asp Trp Gly Asp Tyr Thr Val Asn Phe Pro
 [0706] 355 360 365
 [0707] Glu Ala Gly Asn Tyr Asn Val Glu Leu Leu Ala Ala Ser Pro Thr Thr
 [0708] 370 375 380
 [0709] Ser Gly Ile Ala Ala Asp Val Gln Val Asp Gly Ser Tyr Val Gly Thr
 [0710] 385 390 395 400
 [0711] Ile Pro Leu Ser Ser Thr Gly Asp Trp Glu Leu Tyr Asn Thr Phe Thr
 [0712] 405 410 415
 [0713] Leu Pro Ser Thr Ile Tyr Ile Ala Ser Ala Gly Asn His Thr Ile Arg
 [0714] 420 425 430
 [0715] Val Gln Ser Ala Gly Gly Ser Ala Trp Gln Trp Asn Gly Asp Glu Ile
 [0716] 435 440 445
 [0717] Arg Phe Thr Lys Thr Glu Asp Asp Asn Thr Pro Pro Pro Pro Ala
 [0718] 450 455 460
 [0719] Thr Gly Ala Thr Ile Asn Val Glu Ala Glu Ser Phe Ala Ser Val Gly
 [0720] 465 470 475 480
 [0721] Gly Thr Tyr Ala Asp Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ser Val Tyr Thr Thr
 [0722] 485 490 495
 [0723] Asn Gly Ser Thr Ala Ile Asn Tyr Val Asn Ala Gly Asp Phe Ala Asp
 [0724] 500 505 510
 [0725] Tyr Thr Ile Asn Val Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Ala Ile Thr Tyr His
 [0726] 515 520 525
 [0727] Val Gly Ser Gly Val Thr Gly Gly Ser Ile Glu Phe Leu Val Asn Glu
 [0728] 530 535 540
 [0729] Gly Gly Ser Trp Asn Ser Lys Thr Ala Thr Pro Val Pro Asn Gln Gly
 [0730] 545 550 555 560
 [0731] Trp Asp Asn Phe Gln Pro Leu Asp Gly Gly Ser Val Tyr Leu Glu Ala
 [0732] 565 570 575
 [0733] Gly Thr His Gln Val Arg Leu His Gly Val Gly Ser Asn Asp Trp Gln
 [0734] 580 585 590
 [0735] Trp Asn Leu Asp Lys Phe Val Leu Ser Asn
 [0736] 595 600
 [0737] <210>6
 [0738] <211>1809
 [0739] <212>DNA
 [0740] <213> 琼脂分解酶 (RagaA3)
 [0741] <400>6

[0742]	atgaaaacca cctctctcac tttggcggcc cttgcgctgt catcctccgc gctggctgcg	60
[0743]	gactgggaca atattcccgt tcctgccgat gccggagccg gaaacacctg ggaactccac	120
[0744]	agcctttctg acgatttcaa ctacgccgca ccaccgctcg gcaagagtgc gacctttttt	180
[0745]	gagcgctgga gcaaggctt tatcaacccc tggctgggcc cgggtgaaac cgagtactac	240
[0746]	gcccccaact cctatgtgga aggcggtaac ctggatcaat aggccagccg caagcccggc	300
[0747]	accatcaagg tgcatacagg cgccatccac tccaaggaga gcatgacctc tccgctgttt	360
[0748]	atggaagcgc gggtaaaaat caccaacctc aactggcca atgcgttctg gctgctgagc	420
[0749]	tcgatttcca cagaagagat cgatgtactg gagtcctacg gcagtgaccg ccccagcgag	480
[0750]	acctggtttg acgagcgctt gcacctcagc catcacgtat ttatccgcga gccgtttcag	540
[0751]	gactaccagc cgaagatgc ggggagctgg tatccgaacc ccgatggcgg cactggcgt	600
[0752]	gaccagtttt tccgtattgg cgtttactgg atcgaccctg ggacactgga gtactacgta	660
[0753]	aatggtgagc acgtgcgcac cgtctccggt gttgaaatga ttgacctta tggctacacc	720
[0754]	aacggcaatg gcctcagcaa gccgatgcag gtcactttg atgcggagca ccagccctgg	780
[0755]	cgcgatgcgc aaggcactgc gccccacc gatgaagagc tcgccgacc aagccgcaac	840
[0756]	aagtccctgg tggactgggt acgcttctac aagccagtgg cagacaacaa cggggcgcc	900
[0757]	gaccagata atggcgtgga tccaggtaat gggggcaacc caggaagtgg cgaaccatt	960
[0758]	cgcgttgaaa tggcagctt ctccgctacc ggtaaagcag gcgccgctt tggcggcagc	1020
[0759]	accgttgctg gcttcaactc caatggcgac aacatcaact acaaccctt cggggattgg	1080
[0760]	ggcgactaca ccgtaaacct cccggaagcg ggtaactaca acgtggaatt gctcgccgcc	1140
[0761]	tccccacca ctccggcat cgcagcggat gtgcaggtgg acggcagcta cgtaggtacc	1200
[0762]	attcccctta gcagtaccgg tgactgggag ctgtacaaca catttacctt gccgagcagc	1260
[0763]	atattatatt ctccagcagg caaccacacc atccgtgtac aaagcgctgg tggcagtgcc	1320
[0764]	tggcagtgga acggcgatga aatacgcttt accaaaaccg aggatgacaa cacaccaccg	1380
[0765]	ccgccaccag cgactggtgc caccatcaat gtggaagcgg aaagctttgc ttctgtcggc	1440
[0766]	ggcacctatg ccgacgggca ggccgagccc atcagcgttt acaccaccaa tggcagcacc	1500
[0767]	gcgattaact acgtgaatgc cgggtgacttt gccgactaca ccatcaatgt tggcagcga	1560
[0768]	ggcacctatg ccattaccta tcacgtgggt agcggcgtaa ccggtggcag cattgagttt	1620
[0769]	ctggtgaacg aagcggttag ctggaatagt aaaacggcaa cgcctgtacc gaaccagggc	1680
[0770]	tgggacaact tccagccact agacggtggc agcgtctact tggaggcagg tacgcatcag	1740
[0771]	gtgcgcctgc acggtgtcgg cagtaacgac tggcagtgga acctggataa gtttgtgctg	1800
[0772]	agtaactaa	1809
[0773]	<210>7	
[0774]	<211>5021	
[0775]	<212>DNA	
[0776]	<213>Microbulbifer sp. 1325-A3	
[0777]	<220>	
[0778]	<221>-35_信号	
[0779]	<222>(2259).. (2264)	
[0780]	<223>	

[0781]	<220>	
[0782]	<221>-10_信号	
[0783]	<222>(2284)..(2289)	
[0784]	<223>	
[0785]	<220>	
[0786]	<221>RBS	
[0787]	<222>(2414)..(2419)	
[0788]	<223>	
[0789]	<220>	
[0790]	<221>信号肽	
[0791]	<222>(2425)..(2481)	
[0792]	<223>	
[0793]	<220>	
[0794]	<221>CDS	
[0795]	<222>(2425)..(4230)	
[0796]	<223>	
[0797]	<400>7	
[0798]	aagctttggt cctgggtcc aaccaccgaa gcgagagcgc cctccagtg gttgctcgcg	60
[0799]	caggatggat cttcttcct cagcttgctg gcgcaaagt gcaaccgaat ctaccttgcc	120
[0800]	tgcaaattcg cgctttgtac ttgcccga ggcactgact aaatctttca ggtagtcctg	180
[0801]	atccaacgat tgcggttgaa tcaaacgaac attgtcgatg cgaatctctt tgtcttccag	240
[0802]	cactccgaca acgttgaatt caatacgcgc aattgcgctc acatccaaat ctttcgcgcc	300
[0803]	gtagcgaaag ataatgtctt ggtactcact ttccatgaa ggcgggttg accggatgcc	360
[0804]	ggtctctacc ccaagatccg gacctttcag ctcaaagaag taggtgttat cegagcgttc	420
[0805]	tggcacgaca aaactgcggt tatgggtctt accctgttga tcgtgggctt tcacataaaa	480
[0806]	atgcacggaa gatggctgct gattggcgat gtccagtgea aatgcaaacg taccagttc	540
[0807]	actccagtcc catggcgatt ggggtgaaaa ggaaaagccg gcggtgtagt ggttttccgt	600
[0808]	ttgcagcttg atattcagtg cctgcccact cttgtcagtt gtgcctccaa ccaacgtggc	660
[0809]	caccgcgtta tgcaatttga tctctggcgg tactgcagtg tcttcgaaat cccataaggc	720
[0810]	ttcgccaatc gggcgcttat ccaattgcgc cgactggtc tgetgctggc catccaaacg	780
[0811]	ctcgccacag gcagctacca gcgctcccgc aaagcaagta aaagccagca acaagattcg	840
[0812]	ataccgcatt gtgagtccca cctgaatgat tatgaaaata tgggtgtttt acgcaacctg	900
[0813]	tggctcgacc gtggattctt cttegccttc gtgaagcgta atttgcctga tttttccaac	960
[0814]	gagaaacaaa taggaacaaa gccccaccac ggcaagcgca ccaatcaatg ccagggcagg	1020
[0815]	acgaaaatea ccacgtgtg cgagcgcccc gattgcgacc gggataatta cggcggacaa	1080
[0816]	tccaccaaca aaattaaac aaccgcctac cagtccgacc atatTTTTGG gcgcaatcaa	1140
[0817]	ggagacaaat acccaggtga tagaggcgag gccattgcca aaaaaggcaa gagagaggaa	1200
[0818]	aaatgtcacc gggccgtag actccacata atttgcacca atcatcgagc aggagagcat	1260
[0819]	tagcccaatg atgaccgggg ttttacgtga aaattcattg gagaaaccgc gccgcaccag	1320

[0820]	ccaatcggag gtgaagccgg agagcaagac accgcaaaa gcagcgagaa aaggaatgga	1380
[0821]	agcaagaaag ccggttttta ggtcacccat accgcggtac tcggcgagat aggtaggaaa	1440
[0822]	ccaggttaaa aagaaaatca gggtactgcc aaggcaaac tggccgatgt aaattcccca	1500
[0823]	cagtttgceg ctagaaaacg ccaggcgcag gctctgcca ttaattgccg cctgttgceg	1560
[0824]	ggccgcacgt acaggtttcg ccgccgctga atgggtttct gcttgcccgg catcctcttc	1620
[0825]	ccgctctttg acgacgtctt gggaatctcc cgattcgcga tacaggaaat accaaaccac	1680
[0826]	cgcccacacg atgccgataa ggcccgacac gataaacagg ccacgccaac caaaccactc	1740
[0827]	ctgaatcacc gccagcacgg gcatcagaaa ggccaatcca ataaattgcc cagaggata	1800
[0828]	cacggcaatg gactggcgc gctcacgctc agggaaacca tgggtaacaa ttttattgtt	1860
[0829]	cgcaggatac gagggcgctt caaacagccc gatcgccata cggcagccca ccagggccgc	1920
[0830]	gagggagcta accaaccctt gcacaaccgt cgccaacgac caggcgatca ggataaaggg	1980
[0831]	gtacaggatc cgtacacgca ccgcatccac gatcatgccg ccgggaatct gcatgatgga	2040
[0832]	ataggtccag gcgaacgccg aaaaaataat cccatttgt accggagaga gctccaggtc	2100
[0833]	ctgtgagatc gattggccg caaccgaaat attggtgceg tccatgtagt tgatcaccac	2160
[0834]	actgatgaaa atcagtgcga gcacacaaa cttgtcgctc tttacgctag cactgccgct	2220
[0835]	ccgtcctttg gtcccgccgc tcactcgctt ggttactctt gttaatgcgc ttatcagcac	2280
[0836]	tcttattatt ttgtgacgtg atcgagcaat cgctggctac accatcacga gaacaaggtc	2340
[0837]	gcccttaca attgttaaca atttacatta ctctctcgg cataacaata accgcccctc	2400
[0838]	aaaccggggg cacaaggaga cgcg atg aaa acc acc tct ctc act ttg gcg	2451
[0839]	Met Lys Thr Thr Ser Leu Thr Leu Ala	
[0840]	1 5	
[0841]	gcc ctt gcg ctg tca tcc tcc gcg ctg gct gcg gac tgg gac aat att	2499
[0842]	Ala Leu Ala Leu Ser Ser Ser Ala Leu Ala Ala Asp Trp Asp Asn Ile	
[0843]	10 15 20 25	
[0844]	ccc gtt cct gcc gat gcc gga gcc gga aac acc tgg gaa ctc cac agc	2547
[0845]	Pro Val Pro Ala Asp Ala Gly Ala Gly Asn Thr Trp Glu Leu His Ser	
[0846]	30 35 40	
[0847]	ctt tct gac gat ttc aac tac gcc gea cca ccc gtc ggc aag agt gcg	2595
[0848]	Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Val Gly Lys Ser Ala	
[0849]	45 50 55	
[0850]	acc ttt ttt gag cgc tgg agc gaa ggc ttt atc aac ccc tgg ctg ggc	2643
[0851]	Thr Phe Phe Glu Arg Trp Ser Glu Gly Phe Ile Asn Pro Trp Leu Gly	
[0852]	60 65 70	
[0853]	ccg ggt gaa acc gag tac tac gcc ccc aac tcc tat gtg gaa ggc ggt	2691
[0854]	Pro Gly Glu Thr Glu Tyr Tyr Ala Pro Asn Ser Tyr Val Glu Gly Gly	
[0855]	75 80 85	
[0856]	aac ctg gtc atc aag gcc agc cgc aag ccc ggt acc atc aag gtg cat	2739
[0857]	Asn Leu Val Ile Lys Ala Ser Arg Lys Pro Gly Thr Ile Lys Val His	
[0858]	90 95 100 105	

[0859] aca ggc gcc atc cac tcc aag gag agc atg acc tat ccg ctg ttt atg 2787
 [0860] Thr Gly Ala Ile His Ser Lys Glu Ser Met Thr Tyr Pro Leu Phe Met
 [0861] 110 115 120
 [0862] gaa gcg cgg gta aaa atc acc aac ctc aca ctg gcc aat gcg ttc tgg 2835
 [0863] Glu Ala Arg Val Lys Ile Thr Asn Leu Thr Leu Ala Asn Ala Phe Trp
 [0864] 125 130 135
 [0865] ctg ctg agc tcg gat tcc aca gaa gag atc gat gta ctg gag tcc tac 2883
 [0866] Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr Glu Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr
 [0867] 140 145 150
 [0868] ggc agt gac cgc ccc agc gag acc tgg ttt gac gag cgc ctg cac ctc 2931
 [0869] Gly Ser Asp Arg Pro Ser Glu Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu
 [0870] 155 160 165
 [0871] agc cat cac gta ttt atc cgc gag ccg ttt cag gac tac cag ccg aaa 2979
 [0872] Ser His His Val Phe Ile Arg Glu Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys
 [0873] 170 175 180 185
 [0874] gat gcg ggg agc tgg tat ccg aac ccc gat ggc ggc cac tgg cgt gac 3027
 [0875] Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro Asn Pro Asp Gly Gly His Trp Arg Asp
 [0876] 190 195 200
 [0877] cag ttt ttc cgt att ggc gtt tac tgg atc gac ccg tgg aca ctg gag 3075
 [0878] Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu
 [0879] 205 210 215
 [0880] tac tac gta aat ggt gag cac gtg cgc acc gtc tcc ggt gtt gaa atg 3123
 [0881] Tyr Tyr Val Asn Gly Glu His Val Arg Thr Val Ser Gly Val Glu Met
 [0882] 220 225 230
 [0883] att gac cct tat ggc tac acc aac ggc aat ggc ctc agc aag ccg atg 3171
 [0884] Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr Asn Gly Asn Gly Leu Ser Lys Pro Met
 [0885] 235 240 245
 [0886] cag gtc atc ttt gat gcg gag cac cag ccc tgg cgc gat gcg caa ggc 3219
 [0887] Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu His Gln Pro Trp Arg Asp Ala Gln Gly
 [0888] 250 255 260 265
 [0889] act gcg ccc ccc acc gat gaa gag ctc gcc gac cca agc cgc aac aag 3267
 [0890] Thr Ala Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Ala Asp Pro Ser Arg Asn Lys
 [0891] 270 275 280
 [0892] ttc ctg gtg gac tgg gta cgc ttc tac aag cca gtg gca gac aac aac 3315
 [0893] Phe Leu Val Asp Trp Val Arg Phe Tyr Lys Pro Val Ala Asp Asn Asn
 [0894] 285 290 295
 [0895] ggg ggc ggc gac cca gat aat ggc ggt gat cca ggt aat ggg ggc aac 3363
 [0896] Gly Gly Gly Asp Pro Asp Asn Gly Gly Asp Pro Gly Asn Gly Gly Asn
 [0897] 300 305 310

[0898] cca gga agt ggc gaa acc att cgc gtt gaa atg ggc agc ttc tcc gct 3411
 [0899] Pro Gly Ser Gly Glu Thr Ile Arg Val Glu Met Gly Ser Phe Ser Ala
 [0900] 315 320 325
 [0901] acc ggt aaa gca ggc gcc gcc gtt gcc ggc gac acc gtt gct ggc ttc 3459
 [0902] Thr Gly Lys Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Asp Thr Val Ala Gly Phe
 [0903] 330 335 340 345
 [0904] aac tcc aat ggc gac aac atc aac tac aac acc ctc ggg gat tgg ggc 3507
 [0905] Asn Ser Asn Gly Asp Asn Ile Asn Tyr Asn Thr Leu Gly Asp Trp Gly
 [0906] 350 355 360
 [0907] gac tac acc gta aac ttc ccg gaa gcg ggt aac tac aac gtg gaa ttg 3555
 [0908] Asp Tyr Thr Val Asn Phe Pro Glu Ala Gly Asn Tyr Asn Val Glu Leu
 [0909] 365 370 375
 [0910] ctc gcc gcc tcc ccc acc act tcc ggc atc gca gcg gat gtg cag gtg 3603
 [0911] Leu Ala Ala Ser Pro Thr Thr Ser Gly Ile Ala Ala Asp Val Gln Val
 [0912] 380 385 390
 [0913] gac ggc agc tac gta ggt acc att ccc ctt agc agt acc ggt gac tgg 3651
 [0914] Asp Gly Ser Tyr Val Gly Thr Ile Pro Leu Ser Ser Thr Gly Asp Trp
 [0915] 395 400 405
 [0916] gag ctg tac aac aca ttt acc ctg ccg agc acg att tat att gct tca 3699
 [0917] Glu Leu Tyr Asn Thr Phe Thr Leu Pro Ser Thr Ile Tyr Ile Ala Ser
 [0918] 410 415 420 425
 [0919] gca ggc aac cac acc atc cgt gta caa agc gct ggt ggc agt gcc tgg 3747
 [0920] Ala Gly Asn His Thr Ile Arg Val Gln Ser Ala Gly Gly Ser Ala Trp
 [0921] 430 435 440
 [0922] cag tgg aac ggc gat gaa ata cgc ttt acc aaa acc gag gat gac aac 3795
 [0923] Gln Trp Asn Gly Asp Glu Ile Arg Phe Thr Lys Thr Glu Asp Asp Asn
 [0924] 445 450 455
 [0925] aca cca ccg ccg cca cca gcg act ggt gcc acc atc aat gtg gaa gcg 3843
 [0926] Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ala Thr Gly Ala Thr Ile Asn Val Glu Ala
 [0927] 460 465 470
 [0928] gaa agc ttt gct tct gtc ggc ggc acc tat gcc gac ggg cag gcg cag 3891
 [0929] Glu Ser Phe Ala Ser Val Gly Gly Thr Tyr Ala Asp Gly Gln Ala Gln
 [0930] 475 480 485
 [0931] ccc atc agc gtt tac acc acc aat ggc agc acc gcg att aac tac gtg 3939
 [0932] Pro Ile Ser Val Tyr Thr Thr Asn Gly Ser Thr Ala Ile Asn Tyr Val
 [0933] 490 495 500 505
 [0934] aat gcc ggt gac ttt gcc gac tac acc atc aat gtt gcc gac gca ggc 3987
 [0935] Asn Ala Gly Asp Phe Ala Asp Tyr Thr Ile Asn Val Ala Asp Ala Gly
 [0936] 510 515 520

[0937]	acc tat gcc att acc tat cac gtg ggt agc ggc gta acc ggt ggc agc	4035
[0938]	Thr Tyr Ala Ile Thr Tyr His Val Gly Ser Gly Val Thr Gly Gly Ser	
[0939]	525 530 535	
[0940]	att gag ttt ctg gtg aac gaa ggc ggt agc tgg aat agt aaa acg gca	4083
[0941]	Ile Glu Phe Leu Val Asn Glu Gly Gly Ser Trp Asn Ser Lys Thr Ala	
[0942]	540 545 550	
[0943]	acg cct gta ccg aac cag ggc tgg gac aac ttc cag cca cta gac ggt	4131
[0944]	Thr Pro Val Pro Asn Gln Gly Trp Asp Asn Phe Gln Pro Leu Asp Gly	
[0945]	555 560 565	
[0946]	ggc agc gtc tac ttg gag gca ggt acg cat cag gtg cgc ctg cac ggt	4179
[0947]	Gly Ser Val Tyr Leu Glu Ala Gly Thr His Gln Val Arg Leu His Gly	
[0948]	570 575 580 585	
[0949]	gtc ggc agt aac gac tgg cag tgg aac ctg gat aag ttt gtg ctg agt	4227
[0950]	Val Gly Ser Asn Asp Trp Gln Trp Asn Leu Asp Lys Phe Val Leu Ser	
[0951]	590 595 600	
[0952]	aac taatcaccag tcatacaaac taaaaaaggg ggccagtggc cccctttttt	4280
[0953]	Asn	
[0954]	agttacgcca taaaaatac agcactacaa gtcactacca ctaaaggca gtggctgctc	4340
[0955]	gcttacctct tgcgggtcaa acggttaactt tttgggatca accggtgcgg tataaatctc	4400
[0956]	cacggtctca ggtcgcacat tttccagtcc agtcaatgca ggteccggcg ttgcgtccgg	4460
[0957]	gcgattgggg tatttttttaa tccacagttc gtggcgctgc cgctgccggg tgaacatgct	4520
[0958]	ctttacatga aactgttcga tcattctgcc atgcatttca cgcgggtcgg taaacaggtc	4580
[0959]	gtagaactca ttttttgaca agcccacttc ggcattcttc cagtcccgt tgaagcgccc	4640
[0960]	cttaacgcca gccgccagat atggcccctg gtaaatcadc acatagtcgc ggcgactgaa	4700
[0961]	cccgtccca ttcaggaaca gcgacgtctg gtccacgcca tegataatcc ggtcgcgcgg	4760
[0962]	tatgtatttc ttggcggcac ccaggttggc gaacgtggta tacaatcgg tgacatgcaa	4820
[0963]	tatatccccg acaatctgcc cgggcttaat gacaccggc caggttgcca gcatgggcac	4880
[0964]	ccgcaccccg cctcggtaa agtcccctt accgccagg tataaggtct ccaccatgcc	4940
[0965]	gcgcggggcg tagtggataa agggaccatt gtcggccatc actattacca gegtatttct	5000
[0966]	ggcgatgccg tgtctctgca g	5021
[0967]	<210>8	
[0968]	<211>602	
[0969]	<212>PRT	
[0970]	<213>Microbulbifer sp. 1325-A3	
[0971]	<400>8	
[0972]	Met Lys Thr Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu Ser Ser Ser	
[0973]	1 5 10 15	
[0974]	Ala Leu Ala Ala Asp Trp Asp Asn Ile Pro Val Pro Ala Asp Ala Gly	
[0975]	20 25 30	

[0976]	Ala Gly Asn Thr Trp Glu Leu His Ser Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr
[0977]	35 40 45
[0978]	Ala Ala Pro Pro Val Gly Lys Ser Ala Thr Phe Phe Glu Arg Trp Ser
[0979]	50 55 60
[0980]	Glu Gly Phe Ile Asn Pro Trp Leu Gly Pro Gly Glu Thr Glu Tyr Tyr
[0981]	65 70 75 80
[0982]	Ala Pro Asn Ser Tyr Val Glu Gly Gly Asn Leu Val Ile Lys Ala Ser
[0983]	85 90 95
[0984]	Arg Lys Pro Gly Thr Ile Lys Val His Thr Gly Ala Ile His Ser Lys
[0985]	100 105 110
[0986]	Glu Ser Met Thr Tyr Pro Leu Phe Met Glu Ala Arg Val Lys Ile Thr
[0987]	115 120 125
[0988]	Asn Leu Thr Leu Ala Asn Ala Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr
[0989]	130 135 140
[0990]	Glu Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Pro Ser Glu
[0991]	145 150 155 160
[0992]	Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg
[0993]	165 170 175
[0994]	Glu Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro
[0995]	180 185 190
[0996]	Asn Pro Asp Gly Gly His Trp Arg Asp Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val
[0997]	195 200 205
[0998]	Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu His
[0999]	210 215 220
[1000]	Val Arg Thr Val Ser Gly Val Glu Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr
[1001]	225 230 235 240
[1002]	Asn Gly Asn Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu
[1003]	245 250 255
[1004]	His Gln Pro Trp Arg Asp Ala Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Glu
[1005]	260 265 270
[1006]	Glu Leu Ala Asp Pro Ser Arg Asn Lys Phe Leu Val Asp Trp Val Arg
[1007]	275 280 285
[1008]	Phe Tyr Lys Pro Val Ala Asp Asn Asn Gly Gly Gly Asp Pro Asp Asn
[1009]	290 295 300
[1010]	Gly Gly Asp Pro Gly Asn Gly Gly Asn Pro Gly Ser Gly Glu Thr Ile
[1011]	305 310 315 320
[1012]	Arg Val Glu Met Gly Ser Phe Ser Ala Thr Gly Lys Ala Gly Ala Ala
[1013]	325 330 335
[1014]	Val Ala Gly Asp Thr Val Ala Gly Phe Asn Ser Asn Gly Asp Asn Ile

[1015]	340	345	350
[1016]	Asn Tyr Asn Thr Leu Gly Asp Trp Gly Asp Tyr Thr Val Asn Phe Pro		
[1017]	355	360	365
[1018]	Glu Ala Gly Asn Tyr Asn Val Glu Leu Leu Ala Ala Ser Pro Thr Thr		
[1019]	370	375	380
[1020]	Ser Gly Ile Ala Ala Asp Val Gln Val Asp Gly Ser Tyr Val Gly Thr		
[1021]	385	390	400
[1022]	Ile Pro Leu Ser Ser Thr Gly Asp Trp Glu Leu Tyr Asn Thr Phe Thr		
[1023]	405	410	415
[1024]	Leu Pro Ser Thr Ile Tyr Ile Ala Ser Ala Gly Asn His Thr Ile Arg		
[1025]	420	425	430
[1026]	Val Gln Ser Ala Gly Gly Ser Ala Trp Gln Trp Asn Gly Asp Glu Ile		
[1027]	435	440	445
[1028]	Arg Phe Thr Lys Thr Glu Asp Asp Asn Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ala		
[1029]	450	455	460
[1030]	Thr Gly Ala Thr Ile Asn Val Glu Ala Glu Ser Phe Ala Ser Val Gly		
[1031]	465	470	480
[1032]	Gly Thr Tyr Ala Asp Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ser Val Tyr Thr Thr		
[1033]	485	490	495
[1034]	Asn Gly Ser Thr Ala Ile Asn Tyr Val Asn Ala Gly Asp Phe Ala Asp		
[1035]	500	505	510
[1036]	Tyr Thr Ile Asn Val Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Ala Ile Thr Tyr His		
[1037]	515	520	525
[1038]	Val Gly Ser Gly Val Thr Gly Gly Ser Ile Glu Phe Leu Val Asn Glu		
[1039]	530	535	540
[1040]	Gly Gly Ser Trp Asn Ser Lys Thr Ala Thr Pro Val Pro Asn Gln Gly		
[1041]	545	550	560
[1042]	Trp Asp Asn Phe Gln Pro Leu Asp Gly Gly Ser Val Tyr Leu Glu Ala		
[1043]	565	570	575
[1044]	Gly Thr His Gln Val Arg Leu His Gly Val Gly Ser Asn Asp Trp Gln		
[1045]	580	585	590
[1046]	Trp Asn Leu Asp Lys Phe Val Leu Ser Asn		
[1047]	595	600	
[1048]	<210>9		
[1049]	<211>433		
[1050]	<212>PRT		
[1051]	<213> 琼脂分解酶 (RagaB)		
[1052]	<400>9		
[1053]	Met Arg Lys Ile Thr Ser Ile Leu Leu Thr Cys Val Met Gly Cys Thr		

[1054]	1	5	10	15
[1055]	Ala Thr Tyr Ala Ala Asp Trp Asp Gly Val Pro Val Pro Ala Asn Pro			
[1056]		20	25	30
[1057]	Gly Ser Gly Lys Thr Trp Glu Leu His Pro Leu Ser Asp Asp Phe Asn			
[1058]		35	40	45
[1059]	Tyr Glu Ala Pro Ala Ala Gly Lys Ser Thr Arg Phe Tyr Glu Arg Trp			
[1060]		50	55	60
[1061]	Lys Glu Gly Phe Ile Asn Pro Trp Thr Gly Pro Gly Leu Thr Glu Trp			
[1062]		65	70	75
[1063]	His Pro His Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Gly Lys Leu Ala Ile Thr Ser			
[1064]		85	90	95
[1065]	Gly Arg Lys Pro Gly Thr Asn Gln Val Tyr Leu Gly Ser Ile Thr Ser			
[1066]		100	105	110
[1067]	Lys Ala Pro Leu Thr Tyr Pro Val Tyr Met Glu Ala Arg Ala Lys Leu			
[1068]		115	120	125
[1069]	Ser Asn Met Val Leu Ala Ser Asp Phe Trp Phe Leu Ser Ala Asp Ser			
[1070]		130	135	140
[1071]	Thr Glu Glu Ile Asp Val Ile Glu Ala Tyr Gly Ser Asp Arg Pro Gly			
[1072]		145	150	155
[1073]	Gln Glu Trp Tyr Ala Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile			
[1074]		165	170	175
[1075]	Arg Asp Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Thr Asp Ala Gly Ser Trp Tyr			
[1076]		180	185	190
[1077]	Ala Asp Gly Lys Gly Thr Lys Trp Arg Asp Ala Phe His Arg Val Gly			
[1078]		195	200	205
[1079]	Val Tyr Trp Arg Asp Pro Trp His Leu Glu Tyr Tyr Val Asp Gly Lys			
[1080]		210	215	220
[1081]	Leu Val Arg Thr Val Ser Gly Gln Asp Ile Ile Asp Pro Asn Gly Phe			
[1082]		225	230	235
[1083]	Thr Gly Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Tyr Ala Ile Ile Asn Met			
[1084]		245	250	255
[1085]	Glu Asp Gln Asn Trp Arg Ser Asp Asn Gly Ile Thr Pro Thr Asp Ala			
[1086]		260	265	270
[1087]	Glu Leu Ala Asp Pro Asn Arg Asn Thr Tyr Tyr Val Asp Trp Val Arg			
[1088]		275	280	285
[1089]	Phe Tyr Lys Pro Val Pro Ile Asn Gly Asn Ala Thr Thr Val Glu Leu			
[1090]		290	295	300
[1091]	Gly Asn Phe His Asn Thr Gly Lys Asp Gly Ala Asn Val Thr Gly Asp			
[1092]		305	310	315
				320

[1093]	Thr Val Leu Gly Phe Asn Lys Asn Gly Asn Asn Ile Asn Tyr Asn Thr		
[1094]		325	330 335
[1095]	Lys Gly Asp Trp Ala Asp Tyr Thr Val Asn Leu Pro Ala Ala Gly Glu		
[1096]		340	345 350
[1097]	Tyr Arg Val Asp Leu Val Ile Ala Ser Pro Met Ser Ser Gly Leu Gly		
[1098]		355	360 365
[1099]	Ala Glu Leu Thr Phe Ala Gly Asn Ala Ala Lys Thr Val Thr Leu Ser		
[1100]		370	375 380
[1101]	Asn Thr Gly Gly Trp Glu Ser Tyr Gln Thr Phe Thr Leu Pro Gln Thr		
[1102]		385	390 395 400
[1103]	Ile Ser Val Ser Ser Pro Gly Asn Tyr Asn Phe Arg Leu Lys Ser Thr		
[1104]		405	410 415
[1105]	Gly Ser Ser Asn Trp Gln Trp Asn Gly Asp Glu Ile Arg Phe Val Lys		
[1106]		420	425 430
[1107]	Leu		
[1108]	<210>10		
[1109]	<211>1302		
[1110]	<212>DNA		
[1111]	<213> 琼脂分解酶 (RagaB)		
[1112]	<400>10		
[1113]	atgagaaaaa taacctcaat actactcagc tgtgtaatgg gctgtaccgc gacatacgcc		60
[1114]	gcagattggg atggagtcc cgtacccegcc aaccccgga gcggcaaac ctgggagcta		120
[1115]	catcccctct cagacgactt caactacgag gcaccggccg ccggtaaaag cacccgcttc		180
[1116]	tacgagcggtt ggaaagagg ctttattaac ccctggaccg ggccaggcct gaccgagtgg		240
[1117]	caccgcact actcctacgt cagcggcggc aaactggcta tcacctccgg gcgcaaaccg		300
[1118]	ggcacaacc aggtatatct cggcagcatt acatcaaaag cgccccttac ctaccccgtc		360
[1119]	tatatggaag cccgagccaa actgagcaat atggttctgg cctccgattt ctggttctctg		420
[1120]	agtgcagact caacagaaga gatcgatggt atcgaagcct acggcagtga ccgccaggg		480
[1121]	caggaatggt atgcagaacg gctgcacctc agccaccatg tattcattcg cgacccttt		540
[1122]	caggactatc agcccacgga tgcgggttcc tggatgcgg acggcaaaagg aaccaagtgg		600
[1123]	cgggatgctt tccaccgtgt cggcgtttac tggcgtgacc cctggcacct ggagtactac		660
[1124]	gtggatggaa agctggttcg cactgttttcg ggccaggaca tcatagacc caacgggttc		720
[1125]	actggcggca ccggtctcag taaacctatg tacgccatta tcaatatgga agatcaaaac		780
[1126]	tggcgtcctgg ataacggcat taccctacc gatgccgagc tagccgatcc caaccgcaat		840
[1127]	acctactacg tagactgggt acggttctac aagcccgctt ccatcaacgg caatgcaacc		900
[1128]	accgttgagc ttggaaactt ccacaacacg ggtaaagacg gcgtaaatgt gaccggtgat		960
[1129]	acagtgttgg gttcaacaa aaacggcaac aacatcaact acaacaccaa gggcgactgg		1020
[1130]	gctgactaca ctgtcaacct gcccgtgcc ggcgagtacc gcgtcgatct ggttatcgcg		1080
[1131]	tctcccatga gcagcggctt gggcgcagaa ctacctttg ccggcaatgc agccaaaacc		1140

[1132]	gtgacactct caaataccgg cggctgggag tcctatcaaa cattcactct cccacaaacc	1200
[1133]	attagcgtct catccccgg caactacaac ttccgattga aaagcactgg cagcagtaac	1260
[1134]	tggcagtgga atggcgatga aatccgcttt gtgaagctgt aa	1302
[1135]	<210>11	
[1136]	<211>3910	
[1137]	<212>DNA	
[1138]	<213>Microbulbifer sp.A94	
[1139]	<220>	
[1140]	<221>-35_ 信号	
[1141]	<222>(442).. (447)	
[1142]	<223>	
[1143]	<220>	
[1144]	<221>-10_ 信号	
[1145]	<222>(465).. (470)	
[1146]	<223>	
[1147]	<220>	
[1148]	<221>RBS	
[1149]	<222>(498).. (503)	
[1150]	<223>	
[1151]	<220>	
[1152]	<221> 信号肽	
[1153]	<222>(512).. (571)	
[1154]	<223>	
[1155]	<220>	
[1156]	<221>CDS	
[1157]	<222>(512).. (1810)	
[1158]	<223>	
[1159]	<400>11	
[1160]	ctgcagggac tcagccaaat tggatatccgg gaatttgccg atgcctcgg cggaaattgc	60
[1161]	ctccacaaca ccggaagagt ctctcttaat atccatggca ttggtaagg actggcggat	120
[1162]	accggttacg gtaatctctt ccagagccgc gtcacatag ttagaagtct cttgcgcttg	180
[1163]	cagattgaca ctggcggcaa ctacagcagc ggacaaggcg ctcaagtgga agcgccttatt	240
[1164]	attgatagge atgggtgctt ctctcttcat ccgggcgctc gatgcctagg tccaagtcct	300
[1165]	tttgaccaag gtagatagtg cctcattggt attggataga acctctcggt acagccgccg	360
[1166]	ggagtgggtg attattggtt atccactcac gtggctgacg cgaatatcct gggcgcgatgc	420
[1167]	tcaccaatg tcaatagtta attgtagatt gtcaacaaaa ctgctatggt cgcggtcca	480
[1168]	ataatgataa tgacccaaag gagaaaccgc g atg aga aaa ata acc tea ata	532
[1169]		Met Arg Lys Ile Thr Ser Ile
[1170]		1 5

[1171]	cta ctc acg tgt gta atg ggc tgt acc gcg aca tac gcc gca gat tgg	580
[1172]	Leu Leu Thr Cys Val Met Gly Cys Thr Ala Thr Tyr Ala Ala Asp Trp	
[1173]	10 15 20	
[1174]	gat gga gtt ccc gta ccc gcc aac ccc ggg agc ggc aaa acc tgg gag	628
[1175]	Asp Gly Val Pro Val Pro Ala Asn Pro Gly Ser Gly Lys Thr Trp Glu	
[1176]	25 30 35	
[1177]	cta cat ccc ctc tca gac gac ttc aac tac gag gca ccg gcc gcc ggt	676
[1178]	Leu His Pro Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr Glu Ala Pro Ala Ala Gly	
[1179]	40 45 50 55	
[1180]	aaa agc acc cgc ttc tac gag cgt tgg aaa gag ggc ttt att aac ccc	724
[1181]	Lys Ser Thr Arg Phe Tyr Glu Arg Trp Lys Glu Gly Phe Ile Asn Pro	
[1182]	60 65 70	
[1183]	tgg acc ggg cca ggc ctg acc gag tgg cac ccg cac tac tcc tac gtc	772
[1184]	Trp Thr Gly Pro Gly Leu Thr Glu Trp His Pro His Tyr Ser Tyr Val	
[1185]	75 80 85	
[1186]	agc ggc ggc aaa ctg gct atc acc tcc ggg cgc aaa ccg ggc aca aac	820
[1187]	Ser Gly Gly Lys Leu Ala Ile Thr Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Asn	
[1188]	90 95 100	
[1189]	cag gta tat ctc ggc agc att aca tca aaa gcg ccc ctt acc tac ccc	868
[1190]	Gln Val Tyr Leu Gly Ser Ile Thr Ser Lys Ala Pro Leu Thr Tyr Pro	
[1191]	105 110 115	
[1192]	gtc tat atg gaa gcc cga gcc aaa ctg agc aat atg gtt ctg gcc tcc	916
[1193]	Val Tyr Met Glu Ala Arg Ala Lys Leu Ser Asn Met Val Leu Ala Ser	
[1194]	120 125 130 135	
[1195]	gat ttc tgg ttc ctg agt gca gac tca aca gaa gag atc gat gtt atc	964
[1196]	Asp Phe Trp Phe Leu Ser Ala Asp Ser Thr Glu Glu Ile Asp Val Ile	
[1197]	140 145 150	
[1198]	gaa gcc tac ggc agt gac cgc cca ggg cag gaa tgg tat gca gaa cgg	1012
[1199]	Glu Ala Tyr Gly Ser Asp Arg Pro Gly Gln Glu Trp Tyr Ala Glu Arg	
[1200]	155 160 165	
[1201]	ctg cac ctc agc cac cat gta ttc att cgc gac ccc ttt cag gac tat	1060
[1202]	Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg Asp Pro Phe Gln Asp Tyr	
[1203]	170 175 180	
[1204]	cag ccc acg gat gcg ggt tcc tgg tat gcg gac ggc aaa gga acc aag	1108
[1205]	Gln Pro Thr Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Ala Asp Gly Lys Gly Thr Lys	
[1206]	185 190 195	
[1207]	tgg cgg gat gct ttc cac cgt gtc ggc gtt tac tgg cgt gac ccc tgg	1156
[1208]	Trp Arg Asp Ala Phe His Arg Val Gly Val Tyr Trp Arg Asp Pro Trp	
[1209]	200 205 210 215	

[1210] cac ctg gag tac tac gtg gat gga aag ctg gtt cgc act gtt tcg ggc 1204
 [1211] His Leu Glu Tyr Tyr Val Asp Gly Lys Leu Val Arg Thr Val Ser Gly
 [1212] 220 225 230
 [1213] cag gac atc ata gac ccc aac ggg ttc act ggc ggc acc ggt ctc agt 1252
 [1214] Gln Asp Ile Ile Asp Pro Asn Gly Phe Thr Gly Gly Thr Gly Leu Ser
 [1215] 235 240 245
 [1216] aaa cct atg tac gcc att atc aat atg gaa gat caa aac tgg cgc tcg 1300
 [1217] Lys Pro Met Tyr Ala Ile Ile Asn Met Glu Asp Gln Asn Trp Arg Ser
 [1218] 250 255 260
 [1219] gat aac ggc att acc cct acc gat gcc gag cta gcc gat ccc aac cgc 1348
 [1220] Asp Asn Gly Ile Thr Pro Thr Asp Ala Glu Leu Ala Asp Pro Asn Arg
 [1221] 265 270 275
 [1222] aat acc tac tac gta gac tgg gta cgg ttc tac aag ccc gtt ccc atc 1396
 [1223] Asn Thr Tyr Tyr Val Asp Trp Val Arg Phe Tyr Lys Pro Val Pro Ile
 [1224] 280 285 290 295
 [1225] aac ggc aat gca acc acc gtt gag ctt gga aac ttc cac aac acg ggt 1444
 [1226] Asn Gly Asn Ala Thr Thr Val Glu Leu Gly Asn Phe His Asn Thr Gly
 [1227] 300 305 310
 [1228] aaa gac ggc gct aat gtg acc ggt gat aca gtg ttg ggc ttc aac aaa 1492
 [1229] Lys Asp Gly Ala Asn Val Thr Gly Asp Thr Val Leu Gly Phe Asn Lys
 [1230] 315 320 325
 [1231] aac ggc aac aac atc aac tac aac acc aag ggc gac tgg gct gac tac 1540
 [1232] Asn Gly Asn Asn Ile Asn Tyr Asn Thr Lys Gly Asp Trp Ala Asp Tyr
 [1233] 330 335 340
 [1234] act gtc aac ctg ccc gct gcc ggc gag tac cgc gtc gat ctg gtt atc 1588
 [1235] Thr Val Asn Leu Pro Ala Ala Gly Glu Tyr Arg Val Asp Leu Val Ile
 [1236] 345 350 355
 [1237] gcg tct ccc atg agc agc ggt ctg ggc gca gaa ctc acc ttt gcc ggc 1636
 [1238] Ala Ser Pro Met Ser Ser Gly Leu Gly Ala Glu Leu Thr Phe Ala Gly
 [1239] 360 365 370 375
 [1240] aat gca gcc aaa acc gtg aca ctc tca aat acc ggc ggc tgg gag tcc 1684
 [1241] Asn Ala Ala Lys Thr Val Thr Leu Ser Asn Thr Gly Gly Trp Glu Ser
 [1242] 380 385 390
 [1243] tat caa aca ttc act ctc cea caa acc att agc gtc tca tcc ccc ggc 1732
 [1244] Tyr Gln Thr Phe Thr Leu Pro Gln Thr Ile Ser Val Ser Ser Pro Gly
 [1245] 395 400 405
 [1246] aac tac aac ttc cga ttg aaa agc act ggc agc agt aac tgg cag tgg
 1780
 [1247] Asn Tyr Asn Phe Arg Leu Lys Ser Thr Gly Ser Ser Asn Trp Gln Trp

[1248]	410	415	420	
[1249]	aat ggc gat gaa atc cgc ttt gtg aag ctg taatgccacc ctaccccgca			1830
[1250]	Asn Gly Asp Glu Ile Arg Phe Val Lys Leu			
[1251]	425	430		
[1252]	gtgcctgcca cgggcgctgc ggcaaccatt gcaccaccgc gccggctctc cggcgcggtg			1890
[1253]	gtccccgacac cagagatgcc atagcacaac agccccaatc taacgccaac tggcacactc			1950
[1254]	gtacagttta aaaattgacc atctcttgcc gaacagacac cttctggctg agccccgtct			2010
[1255]	aatcagcgaa acgcagacaa atgctatcta tgatcgcaaa ttaataaatt attgctatga			2070
[1256]	cttctattcc accactctac cgcttcgaat taagggaccg ctgattaatt ctcgggggtt			2130
[1257]	tcccagatac ttactcccc gctcttaaag aaggcggcg ccaggggaaa gaagctcaac			2190
[1258]	tgatggggtg ggcatthaag gaacctctga ttaagtcaact ttctgggtggc agaggcgctt			2250
[1259]	cgggggcgga tgtgaagctc aggtgatagg acggacattt cgaaaccgctc ggagctacag			2310
[1260]	ggaagtactc gtgcgttttc gaaatgcccc tctatttcc tgagcgcccc ggaagctacc			2370
[1261]	atagtgtcca cgcgaattaa tcagaggttc cttaaagccc atcgaatacg ggatgagagc			2430
[1262]	tacagcgaag tacttgtgcg cttccgaaat attcacccat tgectgagca tcttggaaat			2490
[1263]	tgtacagcac ttagctaaat aatcacaag cccgtctgtt aatcagttag caggtacaat			2550
[1264]	ttggaagccc tctaattctc ctattgcatt ttgctacgtt gctttacttt ttcgtaaat			2610
[1265]	ctcgcactaa gtatgatttt cgagggctct agtggccagc tctttttggc catcacaaca			2670
[1266]	ttacaggacg gatggaacaa caatacaaaa tcttcagaac agctacttaa acaccgaagc			2730
[1267]	ccgcacatta aaaagcacca ggtctacaag tctctcttaa aaacttatta cgtgtcagaa			2790
[1268]	ccagggcatt tacgctctac ttttggtaga accactccat ctaaaccagc atgtgcacca			2850
[1269]	caagagaaga tgtatcttgc acagtgcgca tttgttcac ttattgttaa tttccgccc			2910
[1270]	tcaaaagaaa ataccaactt gcagttaata tcgtattctg gategtcctc actatagaca			2970
[1271]	agcgtgttat caacatatgc cttttcagc ggaccttcat ctccctcaag cggagaacct			3030
[1272]	atatggcaaa catgaaagtt cccccctga atgacgcat ccacaaagaa gtcacggca			3090
[1273]	acctttgaga ctctatata tgttagtttt cctctgact cattggacac aaggctggtg			3150
[1274]	atctcateac tttcaaata gcagccttcc attgcaacag cctgcgtcga gcccaaaaa			3210
[1275]	agcaatccag tcaacggtat aaactttatc atctcatcct cataacacag aacaccggc			3270
[1276]	taatggcgcc aacgctgtga acagcctact ttaagctgtt tattatactt acggtcttc			3330
[1277]	gcacagtatg agctctgggt ctgattaag tattttggcc aacttatcat teagettccc			3390
[1278]	cagaggagac gttaaggaac ctctgattaa ttgcgtaag cgctccggaa tcaactacag			3450
[1279]	cgctcattcg aattaatccg agtctcccta aataaagtga gtgaagaatg gaggcacggc			3510
[1280]	tgacgggtgt aactggttat tgctcaaac atccgcccga gtggctgccc ttcctcaga			3570
[1281]	gccttttctg agacttctgc aaaatgctcc ttcagccaat ccattagccc acgtactctt			3630
[1282]	ttcagttgat gccggtgctg tgggcagacc agtgacagct gagttgtttc ggaccactct			3690
[1283]	ggaagcactt ccaccagatc accccgcgcg atatctgcct gcacatgggt gtcggtcagc			3750
[1284]	cgtgtgactc caagaccgga aagagccgcc tgacgcatgg cacgtccgct tacaattcta			3810
[1285]	aaaccatttt ttgctcgaat cagttgctgc tegtctcccc gctccagtag ccaatggtea			3870
[1286]	acactaccgt agataagcgg cagctcccgt aggtctgcag			3910

[1287] <210>12
 [1288] <211>433
 [1289] <212>PRT
 [1290] <213>Microbulbifer sp. A94
 [1291] <400>12
 [1292] Met Arg Lys Ile Thr Ser Ile Leu Leu Thr Cys Val Met Gly Cys Thr
 [1293] 1 5 10 15
 [1294] Ala Thr Tyr Ala Ala Asp Trp Asp Gly Val Pro Val Pro Ala Asn Pro
 [1295] 20 25 30
 [1296] Gly Ser Gly Lys Thr Trp Glu Leu His Pro Leu Ser Asp Asp Phe Asn
 [1297] 35 40 45
 [1298] Tyr Glu Ala Pro Ala Ala Gly Lys Ser Thr Arg Phe Tyr Glu Arg Trp
 [1299] 50 55 60
 [1300] Lys Glu Gly Phe Ile Asn Pro Trp Thr Gly Pro Gly Leu Thr Glu Trp
 [1301] 65 70 75 80
 [1302] His Pro His Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Gly Lys Leu Ala Ile Thr Ser
 [1303] 85 90 95
 [1304] Gly Arg Lys Pro Gly Thr Asn Gln Val Tyr Leu Gly Ser Ile Thr Ser
 [1305] 100 105 110
 [1306] Lys Ala Pro Leu Thr Tyr Pro Val Tyr Met Glu Ala Arg Ala Lys Leu
 [1307] 115 120 125
 [1308] Ser Asn Met Val Leu Ala Ser Asp Phe Trp Phe Leu Ser Ala Asp Ser
 [1309] 130 135 140
 [1310] Thr Glu Glu Ile Asp Val Ile Glu Ala Tyr Gly Ser Asp Arg Pro Gly
 [1311] 145 150 155 160
 [1312] Gln Glu Trp Tyr Ala Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile
 [1313] 165 170 175
 [1314] Arg Asp Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Thr Asp Ala Gly Ser Trp Tyr
 [1315] 180 185 190
 [1316] Ala Asp Gly Lys Gly Thr Lys Trp Arg Asp Ala Phe His Arg Val Gly
 [1317] 195 200 205
 [1318] Val Tyr Trp Arg Asp Pro Trp His Leu Glu Tyr Tyr Val Asp Gly Lys
 [1319] 210 215 220
 [1320] Leu Val Arg Thr Val Ser Gly Gln Asp Ile Ile Asp Pro Asn Gly Phe
 [1321] 225 230 235 240
 [1322] Thr Gly Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Tyr Ala Ile Ile Asn Met
 [1323] 245 250 255
 [1324] Glu Asp Gln Asn Trp Arg Ser Asp Asn Gly Ile Thr Pro Thr Asp Ala
 [1325] 260 265 270

[1326] Glu Leu Ala Asp Pro Asn Arg Asn Thr Tyr Tyr Val Asp Trp Val Arg
 [1327] 275 280 285
 [1328] Phe Tyr Lys Pro Val Pro Ile Asn Gly Asn Ala Thr Thr Val Glu Leu
 [1329] 290 295 300
 [1330] Gly Asn Phe His Asn Thr Gly Lys Asp Gly Ala Asn Val Thr Gly Asp
 [1331] 305 310 315 320
 [1332] Thr Val Leu Gly Phe Asn Lys Asn Gly Asn Asn Ile Asn Tyr Asn Thr
 [1333] 325 330 335
 [1334] Lys Gly Asp Trp Ala Asp Tyr Thr Val Asn Leu Pro Ala Ala Gly Glu
 [1335] 340 345 350
 [1336] Tyr Arg Val Asp Leu Val Ile Ala Ser Pro Met Ser Ser Gly Leu Gly
 [1337] 355 360 365
 [1338] Ala Glu Leu Thr Phe Ala Gly Asn Ala Ala Lys Thr Val Thr Leu Ser
 [1339] 370 375 380
 [1340] Asn Thr Gly Gly Trp Glu Ser Tyr Gln Thr Phe Thr Leu Pro Gln Thr
 [1341] 385 390 395 400
 [1342] Ile Ser Val Ser Ser Pro Gly Asn Tyr Asn Phe Arg Leu Lys Ser Thr
 [1343] 405 410 415
 [1344] Gly Ser Ser Asn Trp Gln Trp Asn Gly Asp Glu Ile Arg Phe Val Lys
 [1345] 420 425 430
 [1346] Leu

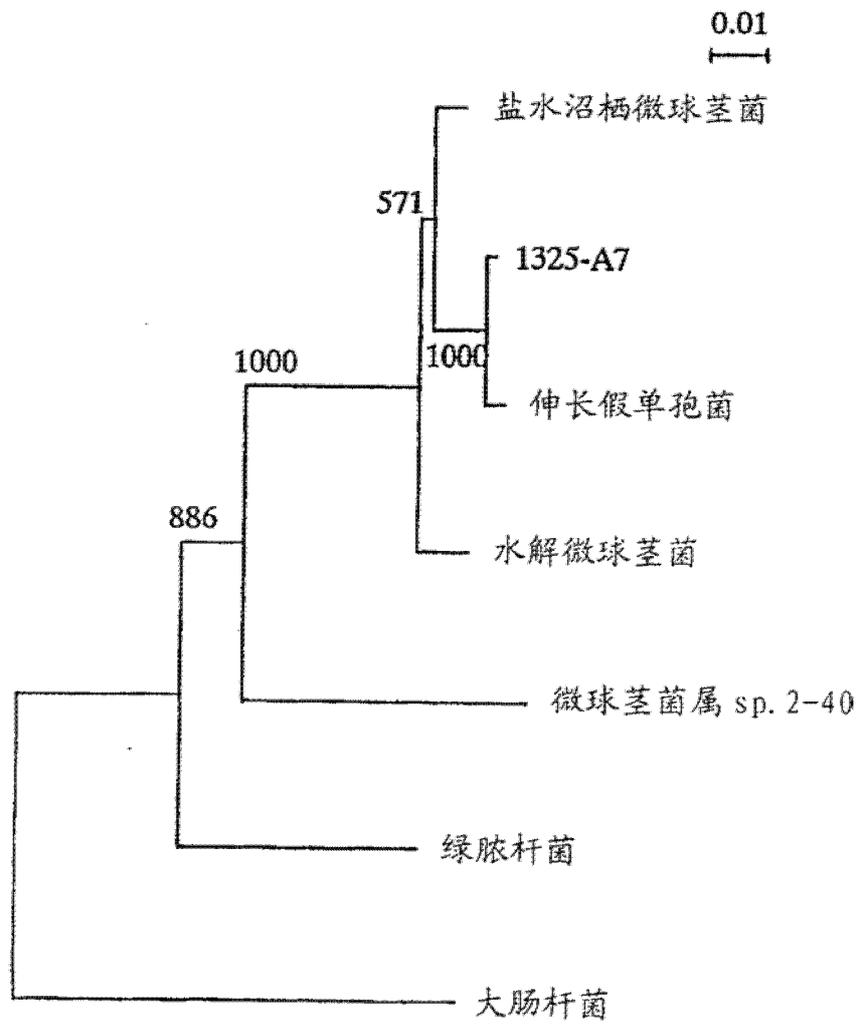


图 1

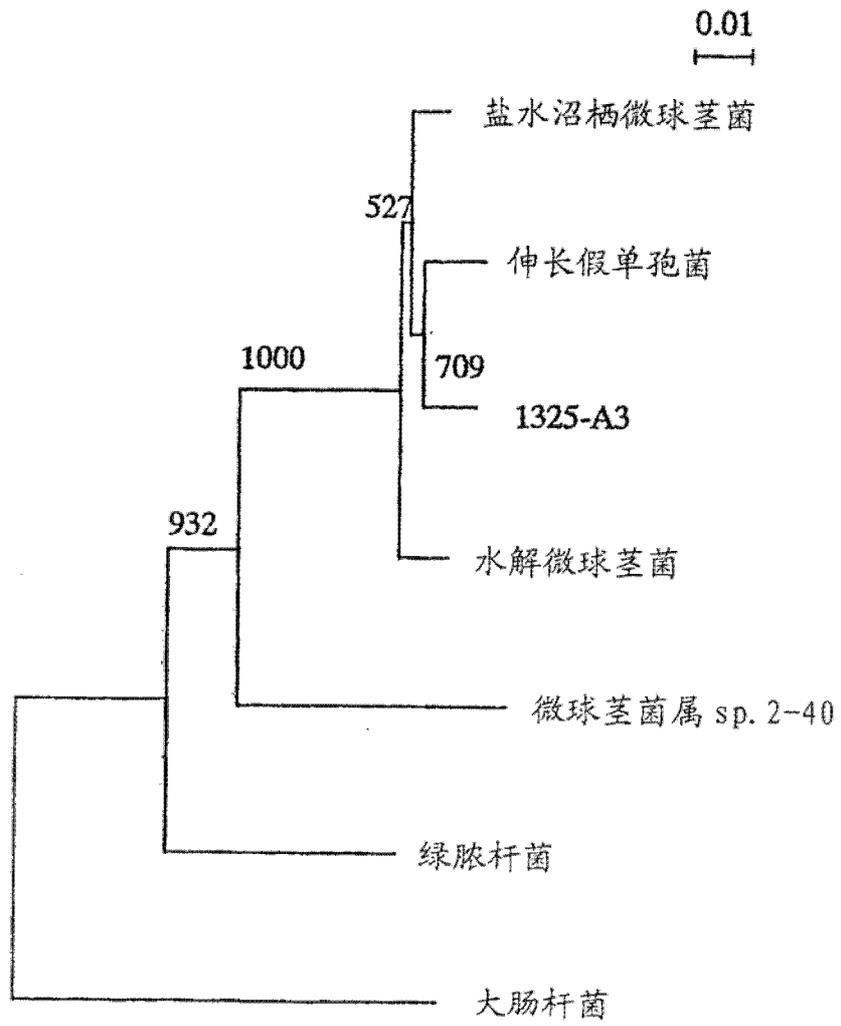


图 2

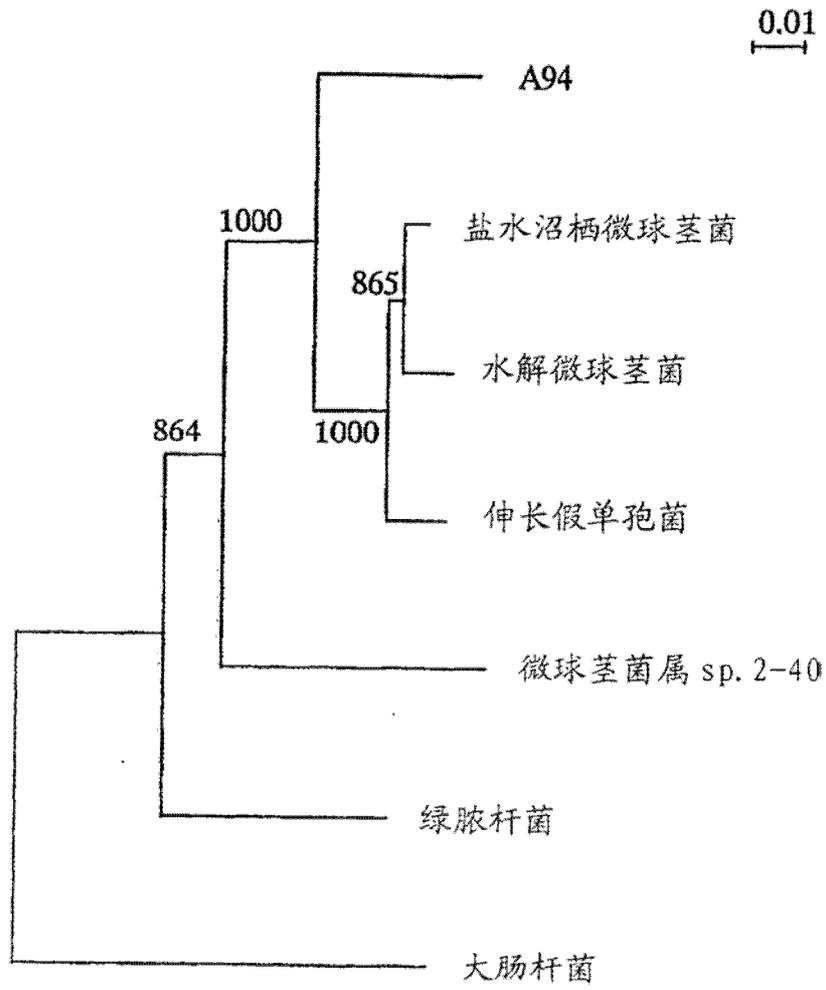


图 3

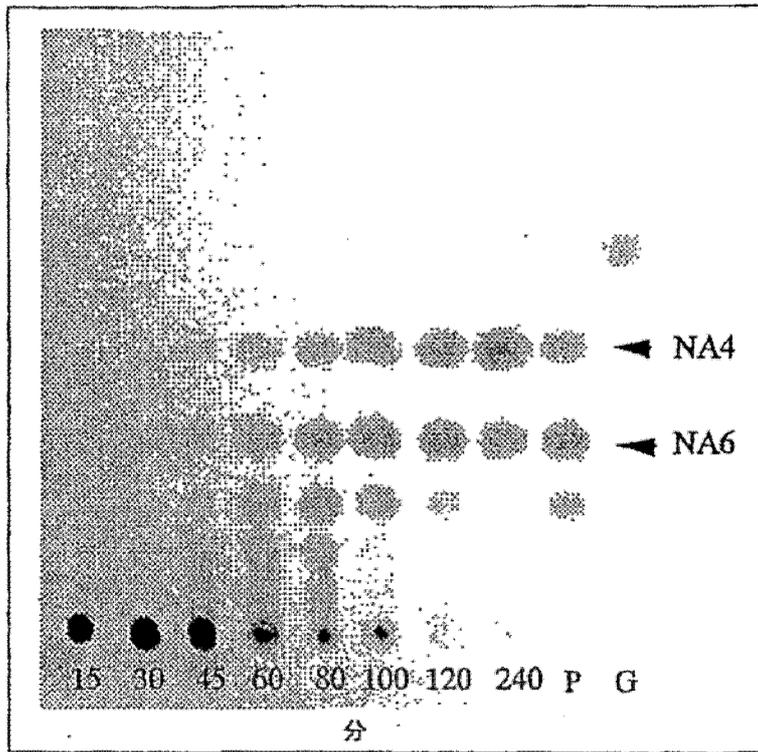


图 4

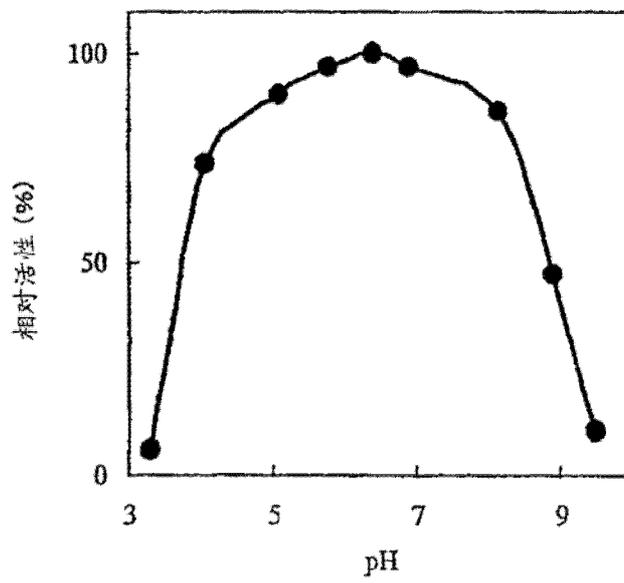


图 5

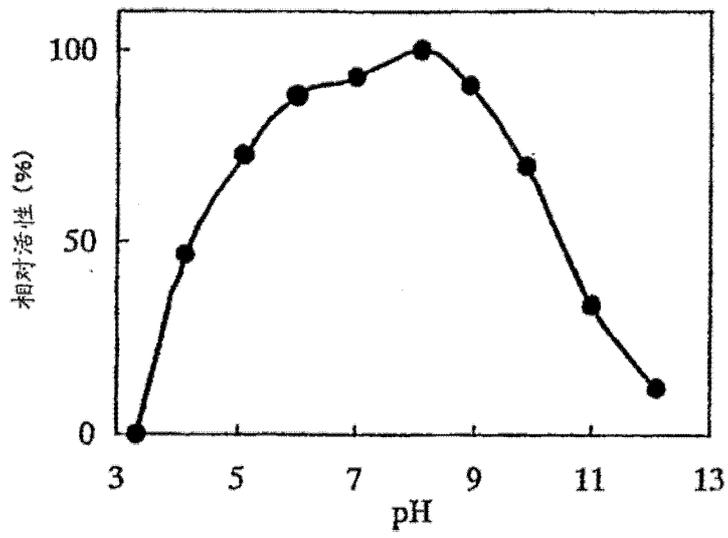


图 6

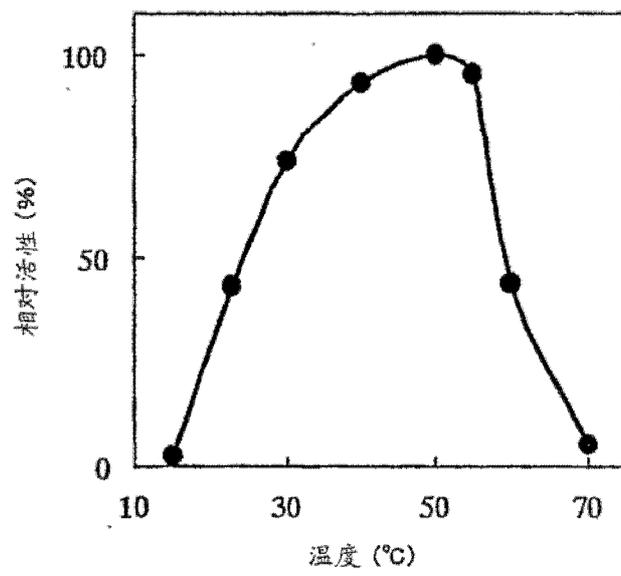


图 7

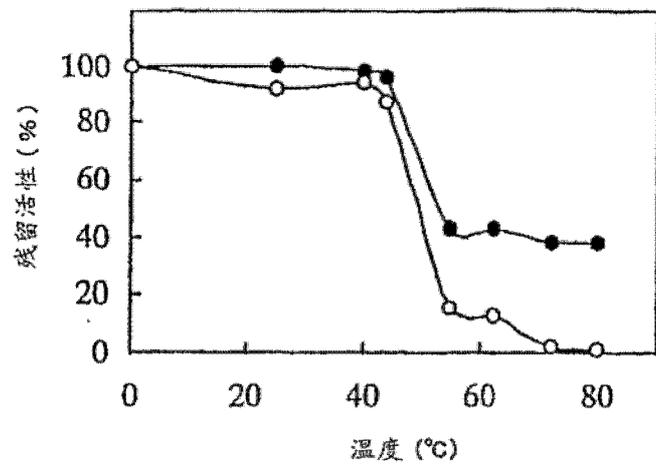


图 8

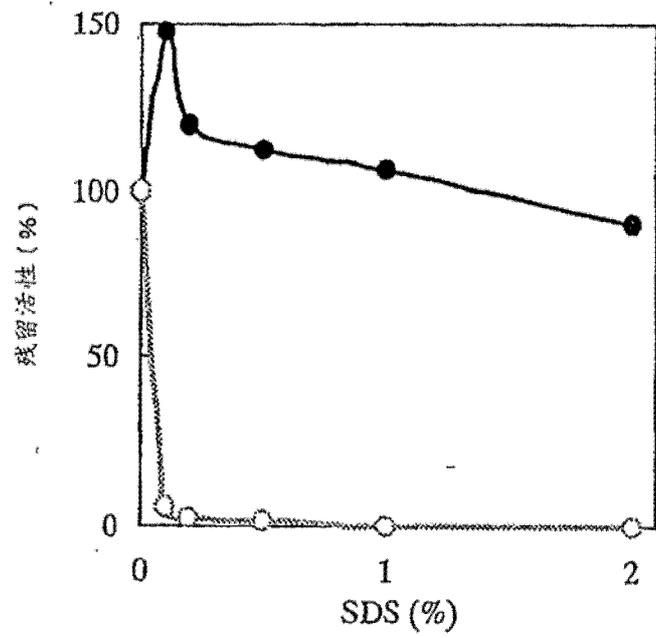


图 9

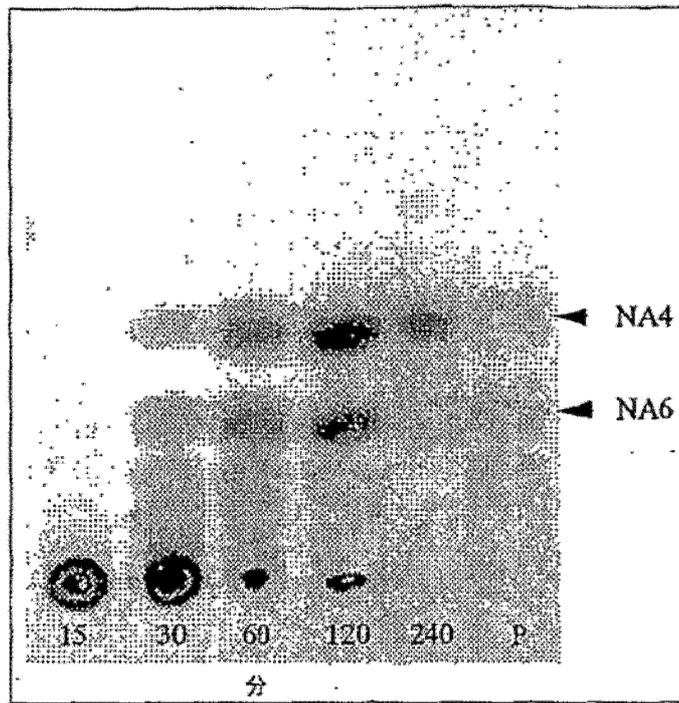


图 10

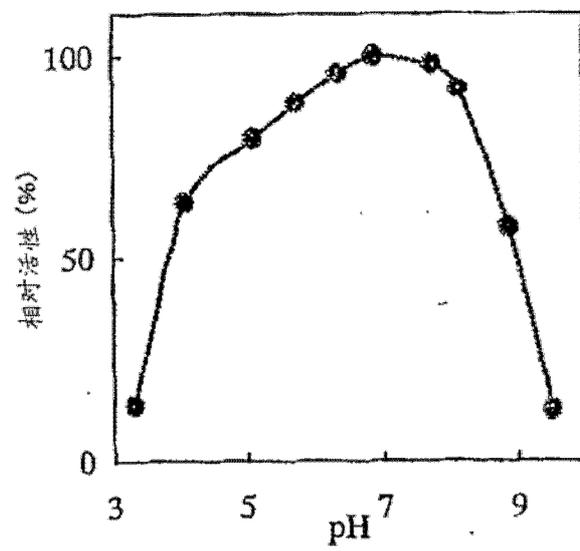


图 11

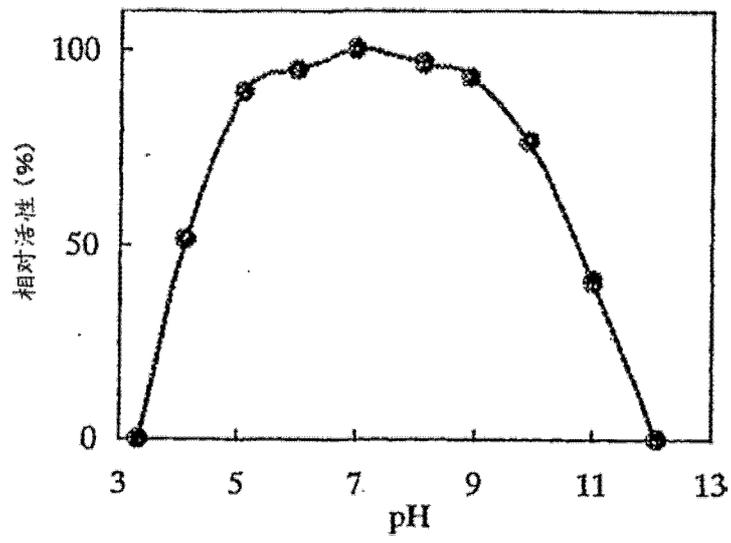


图 12

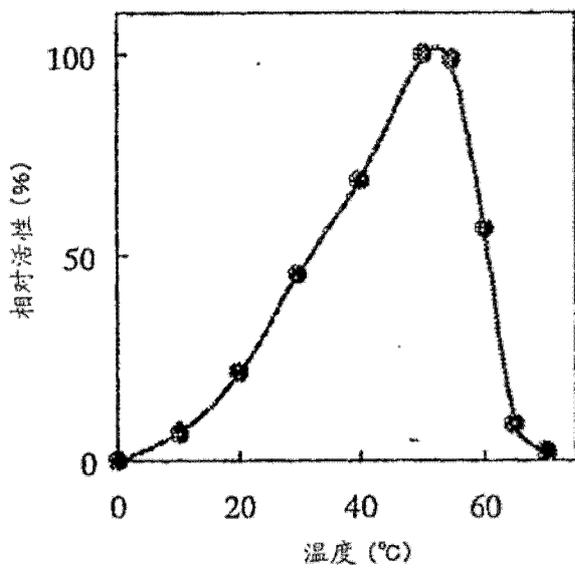


图 13

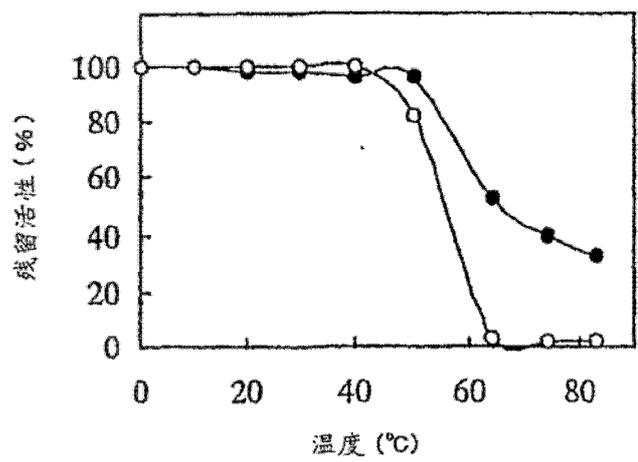


图 14

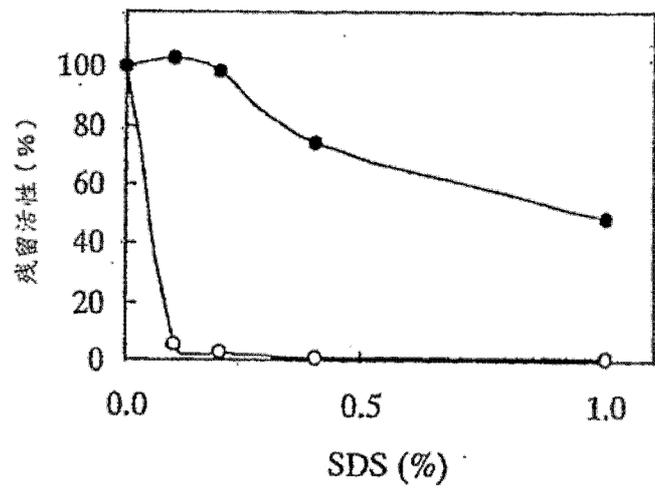


图 15

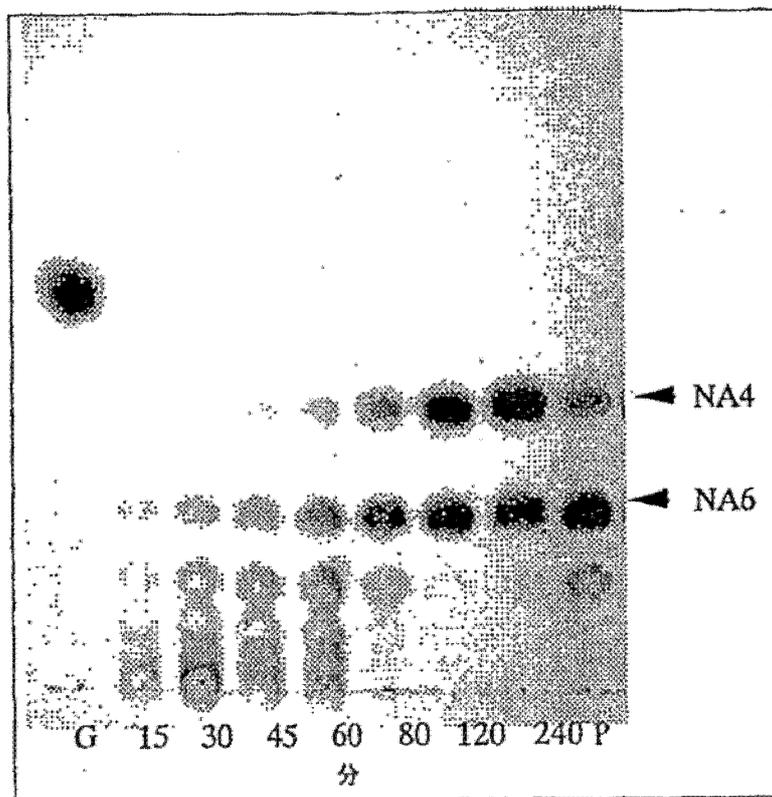


图 16

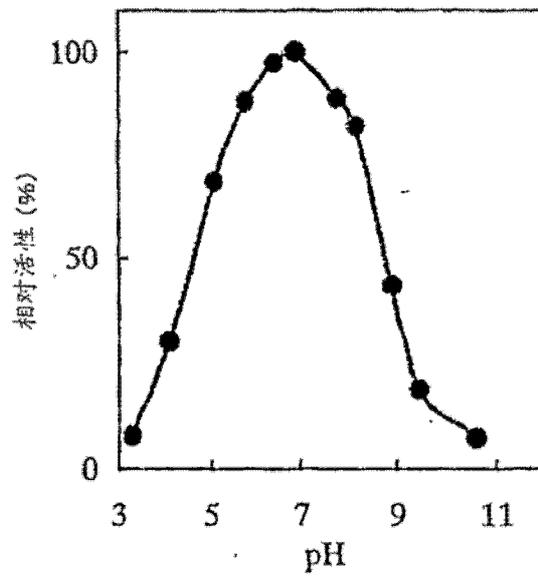


图 17

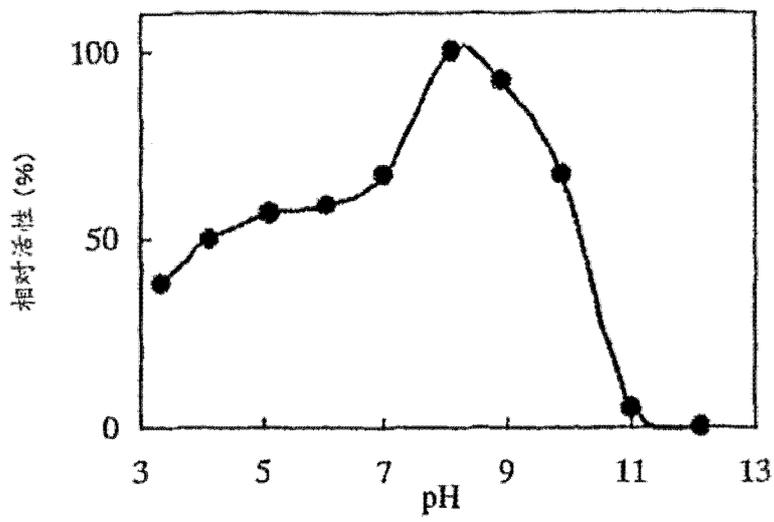


图 18

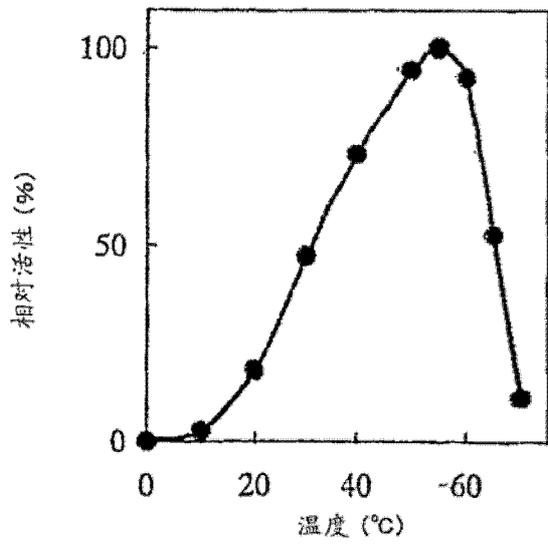


图 19

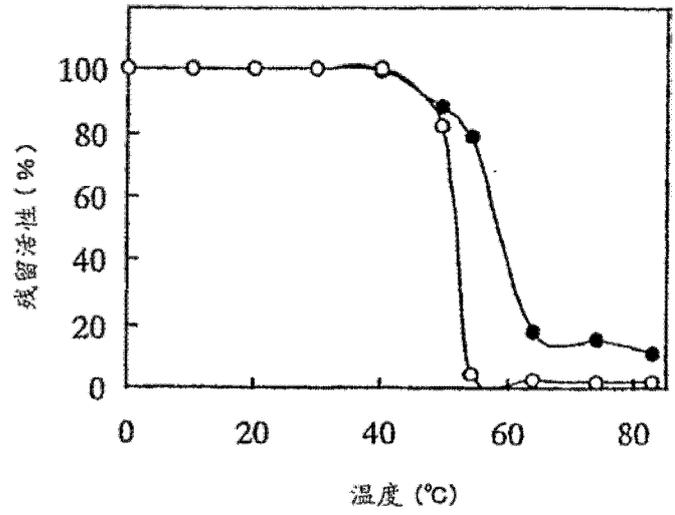


图 20

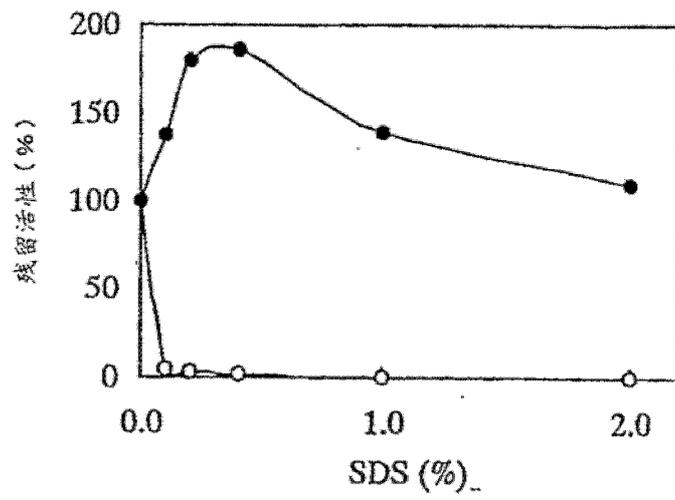


图 21