

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年5月14日 (14.05.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/087894 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/04 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01) *C12P 7/22* (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/116360

(22) 国际申请日: 2019年11月7日 (07.11.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 凯莱英医药化学(阜新)技术有限公司(ASYMCHEM LABORATORIES (FUXIN) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国辽宁省阜新市高新技术产业开发区开发大街90号, Liaoning 123000 (CN)。

(72) 发明人: 洪浩(HONG, Hao); 美国北卡罗莱纳州莫里斯威尔机场大道600号, North Carolina 27560 (US)。詹姆斯·盖吉(JAMES, Gage); 美国北卡罗莱纳州莫里斯威尔机场大道600号, North Carolina 27560 (US)。肖毅(HSIAO, Yi); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。张娜(ZHANG, Na); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。焦学成(JIAO, Xuecheng); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。张克俭(ZHANG, Kejian); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。杨益明(YANG, Yiming); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。王翔(WANG, Xiang); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。张燕青(ZHANG, Yanqing); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。

(74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司(KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲48号盈都大厦A座16层, Beijing 100098 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: KETOREDUCTASE MUTANT AND METHOD FOR PRODUCING CHIRAL ALCOHOL

(54) 发明名称: 酮还原酶突变体及生产手性醇的方法

(57) Abstract: Disclosed are a ketoreductase mutant and a method for producing a chiral alcohol. The ketoreductase mutant has a sequence with amino acid mutations in the sequence shown in SEQ ID NO:1. The mutation sites comprise K200H. In the present invention, the mutant obtained by mutation takes a ketone compound as a raw material, a chiral alcohol can be efficiently produced by stereoselective reduction, and the stability is greatly improved, which is suitable for popularization and application to the industrial production of the chiral alcohol.

(57) 摘要: 本发明公开了一种酮还原酶突变体及生产手性醇的方法。其中, 该酮还原酶突变体具有SEQ ID NO:1所示序列发生氨基酸突变的序列, 突变的位点包括K200H。本发明突变得到的突变体, 可以以酮类化合物为原料, 通过立体选择性地还原作用, 高效生产手性醇, 并且稳定性得到极大的提高, 适合推广用于手性醇的工业生产。



WO 2021/087894 A1

酮还原酶突变体及生产手性醇的方法

技术领域

本发明涉及化合物合成技术领域，具体而言，涉及一种酮还原酶突变体及生产手性醇的方法。

背景技术

手性醇广泛存在于自然界中，是很多重要生物活性分子的结构单元，是合成天然产物和手性药物的重要中间体。许多手性药物都含有一个或多个手性中心，不同手性药物的药理活性、代谢过程、代谢速率以及毒性有显著差异，通常一种对映体是有效的，而另一种对映体则是低效或无效的，甚至是有毒的。因此，如何高效立体选择性地构建含手性中心的化合物在医药研发中有着重要意义。

酮还原酶（Ketoreductase, KRED）也可以称作羰基还原酶（Carbonyl-reductase），酶分类号 EC 1.1.1.184，常被用于还原潜手性醛或者酮从而制备手性醇。KRED 不仅可以还原醛类或者酮类底物转化为对应的醇产品，而且还可以催化其逆反应，即催化氧化醇底物得到对应的醛或者酮。在酮还原酶催化的反应中，需要辅因子的参与，包括还原型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)，还原型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH），氧化型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)或氧化型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP⁺）。

在进行醛或者酮的还原反应过程中，一般需要还原型的辅因子 NADH 或者 NADPH 的参与，而在实际反应中，会添加氧化型的辅因子 NAD⁺或者 NADP⁺，然后通过合适的辅因子再生体系再生为还原型的 NADH 或者 NADPH。常用的辅因子再生体系包括葡萄糖和葡萄糖脱氢酶、甲酸盐和甲酸脱氢酶、仲醇和仲醇脱氢酶，亚磷酸盐和亚磷酸脱氢酶以及其它类似的系统。一般来说，辅酶再生体系的更换不会实质的影响酮还原酶的功能。

尽管有多种 KRED 已经被用于商业化生产当中，但 KRED 一般在应用中存在稳定性较低的缺点，具体体现在热稳定性以及有机溶剂的耐受性。通过定向进化的手段对酶进行改造，可以提高酶的稳定性，从而更好的应用在生产当中。

发明内容

本发明旨在提供一种酮还原酶突变体及生产手性醇的方法，以提高酮还原酶的稳定性。

为了实现上述目的，根据本发明的一个方面，提供了一种酮还原酶突变体。该酮还原酶突变体具有 SEQ ID NO: 1 所示序列发生氨基酸突变的序列，突变的位点包括 K200H。

进一步地，突变的位点还至少包括如下位点之一：A15、K28、G36、K39、G43、Q44、

A46、V47、F59、K61、T65、K71、A94V、A144、M146、Y152、N156、I86、K208 和 K237；或者酮还原酶突变体的氨基酸序列具有发生突变的氨基酸序列中的突变位点，且与发生突变的氨基酸序列具有 95%以上同一性的氨基酸序列。

进一步地，突变的位点还至少包括如下突变之一：A15C、K28A/E/M/Q/R/S、G36C、K39I/V、G43C/M、Q44R、A46C、V47C、F59C、K61E/H、T65A、K71R、A94V、A144T、M146I、Y152F、N156S、I86V、K208R 和 K237E。

进一步地，氨基酸突变包括如下任一种位点组合突变：Q44R+N156S+K200H、Q44R+N156S+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M。

进一步地，发生氨基酸突变包括如下任一种位点组合突变：I86V+M146I+K200H、M146I+K200H、M146L+N156S+K200H、M146L+K200H、K200H+G201D、Q44R+M146I+K200H、K61E+K200H+K237E、I86V+M146I+K200H、M146I+K200H+G201D、M146L+K200H+G201D、N156S+K200H+G201D、K200H+G201D+K237E、K28E+M146I+K200H+G201D、K28E+M146L+K200H+G201D、K28E+N156S+K200H+G201D、Q44R+M146L+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D、I86V+M146I+K200H+K61H、I86V+M146I+K200H+K208R、I86V+M146I+K200H+G201D、I86V+M146L+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K28E、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+T65A、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K28E、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K39I、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+T65A、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+A94V、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K208R、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K28E、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K39I。

Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+T65A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+V47C+F59C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+G43C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28Q 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28S 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+I86V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C
 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+I39V、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K71R
 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+A144
 T 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+Y152
 F 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K28E
 、 和
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C
 。

根据本发明的另一个方面，提供一种 DNA 分子。该 DNA 分子编码上述酮还原酶突变体。

根据本发明的再一个方面，提供一种重组质粒。该重组质粒连接有上述 DNA 分子。

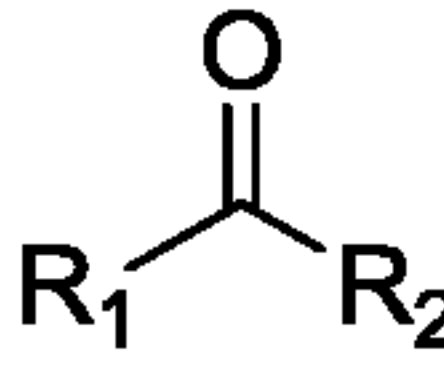
进一步地，重组质粒为 pET-22a (+)、pET-22b (+)、pET-3a (+)、pET-3d (+)、pET-11a (+)、pET-12a (+)、pET-14b (+)、pET-15b (+)、pET-16b (+)、pET-17b (+)、pET-19b (+)、pET-20b (+)、pET-21a (+)、pET-23a (+)、pET-23b (+)、pET-24a (+)、pET-25b (+)、pET-26b (+)、pET-27b (+)、pET-28a (+)、pET-29a (+)、pET-30a (+)、pET-31b (+)、pET-32a (+)、

pET-35b (+)、pET-38b (+)、pET-39b (+)、pET-40b (+)、pET-41a (+)、pET-41b (+)、pET-42a (+)、pET-43a (+)、pET-43b (+)、pET-44a (+)、pET-49b (+)、pQE2、pQE9、pQE30、pQE31、pQE32、pQE40、pQE70、pQE80、pRSET-A、pRSET-B、pRSET-C、pGEX-5X-1、pGEX-6p-1、pGEX-6p-2、pBV220、pBV221、pBV222、pTrc99A、pTwin1、pEZZ18、pKK232-18、pUC-18 或 pUC-19。

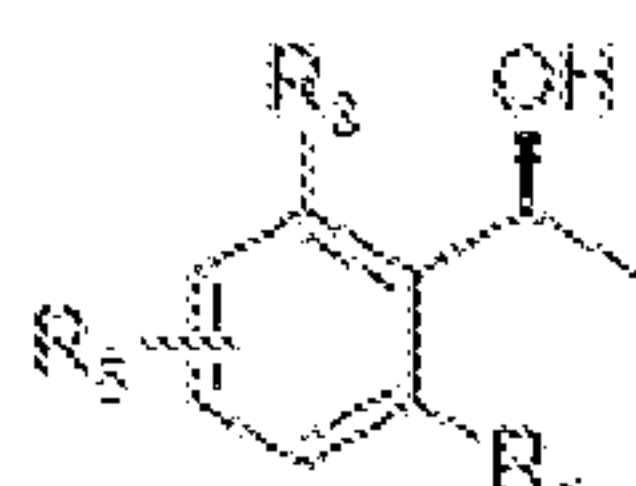
根据本发明的又一个方面，提供一种宿主细胞。该宿主细胞含有上述任一种重组质粒。

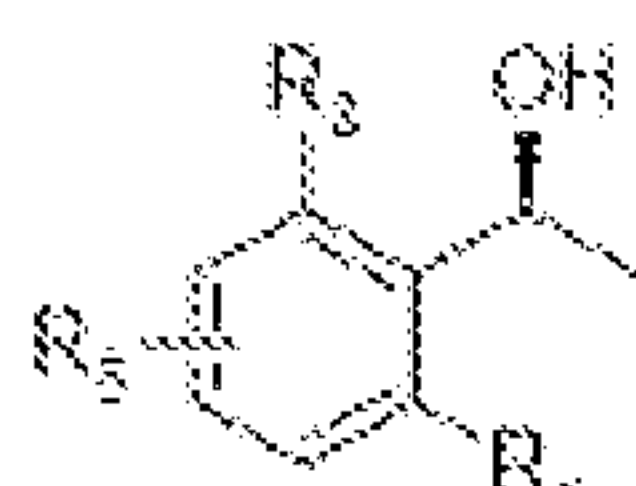
进一步地，宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选原核细胞为大肠杆菌。

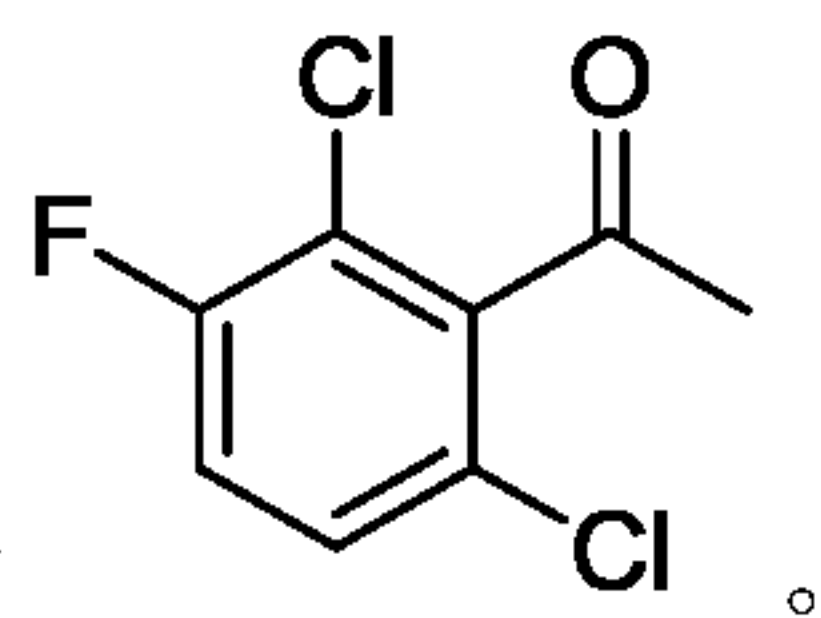
根据本发明的另一个方面，提供一种生产手性醇的方法。该方法包括采用酮还原酶催化潜手性酮类化合物进行还原反应生产手性醇的步骤，酮还原酶为上述任一种的酮还原酶突变体。

进一步地，手性酮类化合物具有如下结构式 ，其中 R₁ 和 R₂ 各自独立地为烷基、环烷基、芳基或杂芳基，或者 R₁ 和 R₂ 与羰基上的碳共同形成杂环基、碳环基或杂芳基，杂环基和杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种，芳基中的芳基、杂芳基中的杂芳基、碳环基中的碳环基或杂环基中的杂环基各自独立地未被取代或被卤素、烷氧基或烷基中的至少一个基团所取代；

R₁ 和 R₂ 各自独立地为 C₁~C₈ 烷基、C₅~C₁₀ 环烷基、C₅~C₁₀ 芳基或 C₅~C₁₀ 杂芳基，或者 R₁ 和 R₂ 与羰基上的碳共同形成 C₅~C₁₀ 杂环基、C₅~C₁₀ 碳环基或 C₅~C₁₀ 杂芳基，C₅~C₁₀ 杂环基和 C₅~C₁₀ 杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种，C₅~C₁₀ 芳基中的芳基、C₅~C₁₀ 杂芳基中的杂芳基、C₅~C₁₀ 碳环基中的碳环基或 C₅~C₁₀ 杂环基中的杂环基各自独立地未被取代或被卤素、烷氧基或烷基中的至少一个基团所取代；



优选地，酮类化合物的结构是为 ，其中，R₃ 为 H、F、Cl、Br 或 CH₃，R₄ 为 H、F、Cl、Br 或 CH₃，R₅ 为 H、F、Cl、Br、CH₃、OCH₃ 或 CH₂CH₃；



更优选的，酮类化合物为 。

进一步地，采用酮还原酶对酮类化合物进行还原反应生产手性醇的反应体系中还包括辅酶、辅酶再生体系和缓冲液。

进一步地，反应体系中酮类化合物的浓度为 1 g/L~200 g/L。

进一步地，反应体系的 pH 值为 5~9，反应体系的反应温度为 4~60℃。

进一步地，辅酶为 NADH。

进一步地，辅酶再生体系包括：异丙醇、辅酶 NAD⁺和酮还原酶。

进一步地，缓冲液为磷酸盐缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液或柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

本发明突变得到的突变体，可以以酮类化合物为原料，通过立体选择性地还原作用，高效生产手性醇，并且稳定性得到极大的提高，适合推广用于手性醇的工业生产。

具体实施方式

需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

名称解释：

“酮还原酶”和“KRED”在本申请中可相互交换使用，指能够将酮基还原为其对应的醇的多肽。具体地，本申请的酮还原酶多肽能够立体选择性地还原酮化合物为相应的醇产物。该多肽通常利用辅因子还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）或还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸烟作为还原剂。在本申请中，酮还原酶包括天然存在的（野生型）酮还原酶以及由人工处理产生的非天然存在的酮还原酶突变体。

“天然存在的”或“野生型”与“突变体”相对，指在自然界中发现的形式。例如，天然存在的或野生型的多肽或多核苷酸序列是存在于生物体的序列，它可以从自然界中的来源中分离，并且没有被人工所特意地修饰或改变。

本申请中，涉及例如，细胞、核酸或多肽“重组”时，是指已经以自然界中未存在的方式进行修饰的，或与自然界中存在的形式相同，但是由合成材料和/或通过使用重组技术的处理制备或衍生而得到，或对应于天然或固有形式的细胞、核酸或多肽。其中，非限制性的实例包括在细胞中表达固有（非重组）形式之外的基因或以不同水平表达固有基因的重组细胞。

“序列同一性的百分比”是指多核苷酸之间的对比，并且通过跨比较窗比较两条最佳比对的序列来确定，其中，多核苷酸序列在比较床中的部分与参考序列相比可以包括添加或缺失（即，空位），以用于两个序列的最佳比对。百分比可以如下计算：通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目，以产生匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数目，并将结果乘以 100 以得到序列同一性的百分比。可选地，百分比可以如下计算：通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基或者核酸碱基或氨基酸残基与空位对齐的位置的数目，以产生匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数目，并将结果乘以 100 以得到序列同一性的百分比。其中，“参考序列”指用作序列比较的基础的指定序列。参考序列可以是更大序列的子集，例如，全长基因或多肽序列的区段。

定点突变：是指通过聚合酶链式反应（PCR）等方法向目的 DNA 片段（可以是基因组，也可以是质粒）中引入所需变化（通常是表征有利方向的变化），包括碱基的添加、删除、点突变等。定点突变能迅速、高效的提高 DNA 所表达的目的蛋白的性状及表征，是基因研究工作中一种非常有效的手段。

来源于 *Acetobacter pasteurianus* 386B 的酮还原酶 KRED 突变体 E144A+L152Y+L198Q+E201G+G6S+L146M+147V+D42E+T199V（作为本发明的模板，具有 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。在本发明中，以“E144A”为例，表示“原氨基酸+位点+突变后的氨基酸”，即第 144 位的 E 为变为 A）可以催化目标底物得到产物，但是其稳定性有待进一步提高。本发明力图通过定向进化的方法提高 KRED 的稳定性。

SEQ ID NO: 1:

MARVASKVAIVSGAANGIGKATAQLLAKEGAKVVIGDLKEEEGQKAVAEIKAAGGEAA
FVKLNVTDEAAWKAAGQTLKLYGRLDIANNAGIAYSGSVESTSLEDWRRVQSINLDGVFL
GTQVAIEAMKKSGGGSIVNLSSIAGMVGDPMYAAYNASKGGVRLFTKSAALHCAKSGYKIR
VNSVHPGYIWTMPVAGQVKGDAARQKLVLDLHPIGHLGEPNDIAYGILYLASDESKFVTGS
ELVIDGGYTAQ

在本申请中，首先通过定点突变的方式在 KRED 上引入突变位点，对突变体进行活性检测，挑选活性提高的突变体。其中突变体 E144A+L152Y+L198Q+E201G+G6S+L146M+147V+D42E+T199V+K200H 相较于起始模板，稳定性提高 3 倍左右。后续，以 E144A+L152Y+L198Q+E201G+G6S+L146M+147V+D42E+T199V+K200H 为模板继续进行突变，以期得到稳定性提高更为显著的突变体。

利用全质粒 PCR 引入定点突变是简单有效，且目前使用较多的手段。其原理是：一对包含突变位点的引物（正、反向），和模版质粒退火后用聚合酶“循环延伸”，（所谓的循环延伸是指聚合酶按照模版延伸引物，一圈后回到引物 5'端终止，再经过反复加热退火延伸的循环，这个反应区别于滚环扩增，不会形成多个串联拷贝。正反向引物的延伸产物退火后配对成为带缺刻的开环质粒。Dpn I 酶切延伸产物，由于原来的模版质粒来源于常规大肠杆菌，是经 dam 甲基化修饰的，对 Dpn I 敏感而被切碎，而体外合成的带突变序列的质粒由于没有甲基化而不被切开，因此在随后的转化中得以成功转化，即可得到突变质粒的克隆。突变质粒转化至宿主细胞，诱导表达出目标蛋白，然后通过超声破碎细胞的方法获得粗酶。酮还原酶诱导表达最佳条件：25℃，0.1 mM IPTG 诱导 16 h。

在本发明一种典型的实施方式中，提供一种酮还原酶突变体。该酮还原酶突变体具有 SEQ ID NO: 1 所示序列发生氨基酸突变的序列，突变的位点包括 K200H。本发明突变得到的突变体，可以以酮类化合物为原料，通过立体选择性地还原作用，高效生产手性醇，并且稳定性得到极大的提高，适合推广用于手性醇的工业生产。

优选的，突变的位点还至少包括如下位点之一：A15、K28、G36、K39、G43、Q44、A46、V47、F59、K61、T65、K71、A94V、A144、M146、Y152、N156、I86、K208 和 K237；或

者酮还原酶突变体的氨基酸序列具有发生突变的氨基酸序列中的突变位点，且与发生突变的氨基酸序列具有 95% 以上同一性的氨基酸序列。上述位点的突变可以进一步提高酶的稳定性。更优选的，突变的位点还至少包括如下突变之一：A15C、K28A/E/M/Q/R/S、G36C、K39I/V、G43C/M、Q44R、A46C、V47C、F59C、K61E/H、T65A、K71R、A94V、A144T、M146I、Y152F、N156S、I86V、K208R 和 K237E。其中，“/”代表“或”。

在本发明一种典型的实施方式中，氨基酸突变包括如下任一种位点组合突变：

Q44R+N156S+K200H+G201D 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、 Q44R+N156S+K200H 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D 、 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M。

更优选的，发生氨基酸突变包括如下任一种位点组合突变：I86V+M146I+K200H、
 M146I+K200H 、 M146L+N156S+K200H 、 M146L+K200H 、 K200H+G201D 、
 Q44R+M146I+K200H、K61E+K200H+K237E、I86V+M146I+K200H、M146I+K200H+G201D、
 M146L+K200H+G201D 、 N156S+K200H+G201D 、 K200H+G201D+K237E 、
 K28E+M146I+K200H+G201D、K28E+M146L+K200H+G201D、K28E+N156S+K200H+G201D、
 Q44R+M146L+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D、I86V+M146I+K200H+K61H、
 I86V+M146I+K200H+K208R、I86V+M146I+K200H+G201D、I86V+M146L+K200H+G201D、
 Q44R+N156S+K200H+G201D 、 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+T65A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+T65A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+A94V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K208R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K39I 、

Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+T65A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+V47C+F59C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+G43C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28Q 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28S 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+I86V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C
 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+I39V、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K71R
 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+A144
 T 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+Y152
 F 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K28E
 、 和
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C
 。

根据本发明一种典型的实施方式，提供一种 DNA 分子。该 DNA 分子编码上述酮还原酶突变体。该 DNA 分子编码的上述酮还原酶具有很好的活力。

本发明的上述 DNA 分子还可以以“表达盒”的形式存在。“表达盒”是指线性或环状的核酸分子，涵盖了能够指导特定核苷酸序列在恰当宿主细胞中表达的 DNA 和 RNA 序列。一般而言，包括与目标核苷酸有效连接的启动子，其任选的是与终止信号和/或其他调控元件有效连接的。表达盒还可以包括核苷酸序列正确翻译所需的序列。编码区通常编码目标蛋白，但在

正义或反义方向也编码目标功能 RNA，例如反义 RNA 或非翻译的 RNA。包含目标多核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的，意指至少一个其组分与其至少一个其他组分是异源的。表达盒还可以是天然存在的，但以用于异源表达的有效重组形成获得的。

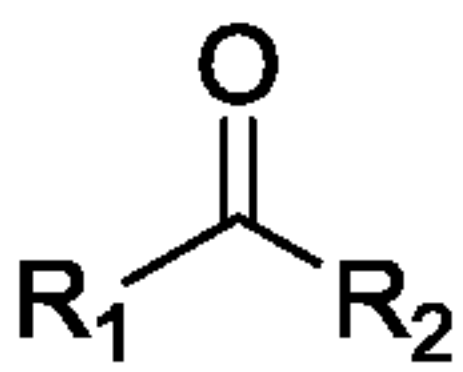
根据本发明一种典型的实施方式，提供一种重组质粒。该重组质粒含有上述任一种 DNA 分子。上述重组质粒中的 DNA 分子置于重组质粒的适当位置，使得上述 DNA 分子能够正确地、顺利地复制、转录或表达。

虽然本发明在限定上述 DNA 分子时所用限定语为“含有”，但其并不意味着可以在 DNA 序列的两端任意加入与其功能不相关的其他序列。本领域技术人员知晓，为了满足重组操作的要求，需要在 DNA 序列的两端添加合适的限制性内切酶的酶切位点，或者额外增加启动密码子、终止密码子等，因此，如果用封闭式的表述来限定将不能真实地覆盖这些情形。

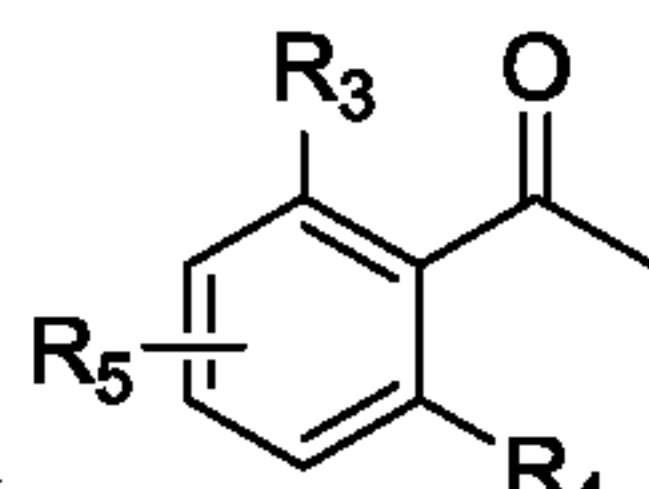
本发明中所使用的术语“质粒”包括双链或单链线状或环状形式的任何质粒、粘粒、噬菌体或农杆菌二元核酸分子，优选为重组表达质粒，可以是原核表达质粒也可以是真核表达质粒，但优选原核表达质粒，在某些实施方案中，重组质粒选自 pET-22a (+)、pET-22b (+)、pET-3a (+)、pET-3d (+)、pET-11a (+)、pET-12a (+)、pET-14b (+)、pET-15b (+)、pET-16b (+)、pET-17b (+)、pET-19b (+)、pET-20b (+)、pET-21a (+)、pET-23a (+)、pET-23b (+)、pET-24a (+)、pET-25b (+)、pET-26b (+)、pET-27b (+)、pET-28a (+)、pET-29a (+)、pET-30a (+)、pET-31b (+)、pET-32a (+)、pET-35b (+)、pET-38b (+)、pET-39b (+)、pET-40b (+)、pET-41a (+)、pET-41b (+)、pET-42a (+)、pET-43a (+)、pET-43b (+)、pET-44a (+)、pET-49b (+)、pQE2、pQE9、pQE30、pQE31、pQE32、pQE40、pQE70、pQE80、pRSET-A、pRSET-B、pRSET-C、pGEX-5X-1、pGEX-6p-1、pGEX-6p-2、pBV220、pBV221、pBV222、pTrc99A、pTwin1、pEZZ18、pKK232-18、pUC-18 或 pUC-19。更优选，上述重组质粒是 pET-22b (+)。

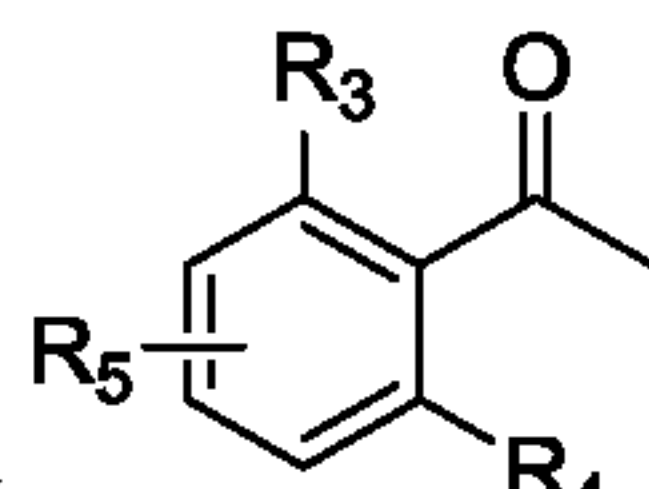
根据本发明一种典型的实施方式，提供一种宿主细胞，宿主细胞含有上述任一种重组质粒。适用于本发明的宿主细胞包括但不限于原核细胞、酵母或真核细胞。优选原核细胞为真细菌，例如革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌。更优选原核细胞为大肠杆菌 BL21 细胞或大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。

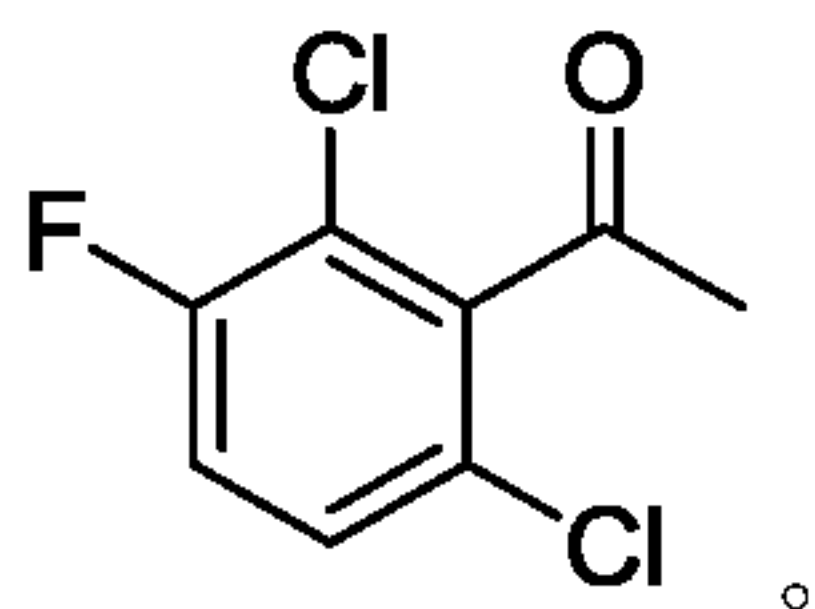
根据本发明一种典型的实施方式，提供一种生产手性醇的方法。该方法包括采用酮还原酶对手性酮类化合物进行还原反应生产手性醇的步骤，酮还原酶为上述任一种酮还原酶突变体。由于本发明的上述酮还原酶突变体具有很好的活力特性，因而利用本发明的酮还原酶突变体制备的手性醇可以提高反应速率，提高底物浓度，减少酶用量，降低后处理的难度。

在本申请中，手性酮类化合物包括但不限于具有如下结构式 ，其中 R₁ 和 R₂ 各自独立地为烷基、环烷基、芳基或杂芳基，或者 R₁ 和 R₂ 与羰基上的碳共同形成杂环基、碳环基或杂芳基，所述杂环基和杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种，所述芳基中的芳基、杂芳基中的杂芳基、碳环基中的碳环基或杂环基中的杂环基各自独立地未被

取代或被卤素、烷氧基或烷基中的至少一个基团所取代；优选的， R_1 和 R_2 各自独立地为 $C_1 \sim C_8$ 烷基、 $C_5 \sim C_{10}$ 环烷基、 $C_5 \sim C_{10}$ 芳基或 $C_5 \sim C_{10}$ 杂芳基，或者 R_1 和 R_2 与羰基上的碳共同形成 $C_5 \sim C_{10}$ 杂环基、 $C_5 \sim C_{10}$ 碳环基或 $C_5 \sim C_{10}$ 杂芳基， $C_5 \sim C_{10}$ 杂环基和 $C_5 \sim C_{10}$ 杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种， $C_5 \sim C_{10}$ 芳基中的芳基、 $C_5 \sim C_{10}$ 杂芳基中的杂芳基、 $C_5 \sim C_{10}$ 碳环基中的碳环基或 $C_5 \sim C_{10}$ 杂环基中的杂环基各自独立地未被取代或被卤素、烷氧基或烷基中的至少一个基团所取代；



优选地，酮类化合物的结构是为 ，其中， R_3 为 H、F、Cl、Br 或 CH_3 ， R_4 为 H、F、Cl、Br 或 CH_3 ， R_5 为 H、F、Cl、Br、 CH_3 、 OCH_3 或 CH_2CH_3 ；



更优选的，酮类化合物为 。

本申请前述宿主细胞可用于酮还原酶的表达和分离，或可选地，它们可直接用于将酮底物转化为手性醇产物。优选的，原核细胞为大肠杆菌。

以上阐述的还原反应一般需要辅因子，其通常为 NADH 或 NADPH，并且该还原反应可包括用于再生该辅因子的系统，例如 D-葡萄糖、辅酶 NAD^+ 和葡萄糖脱氢酶 GDH；甲酸根化合物、辅酶 NAD^+ 和甲酸根脱氢酶 FDH；或异丙醇、辅酶 NAD^+ 和醇脱氢酶 ADH。在使用纯化的酮还原酶的一些实施方式中，此类辅因子和任选地此类辅因子再生系统，通常将与底物和酮还原酶一起添加到反应介质中。与酮还原酶类似，包含辅因子再生系统的任何酶可以是此类细胞的提取物或溶解产物形式，或作为纯化的酶加入反应混合物中。在使用细胞提取物或细胞溶解产物的实施方案中，用于产生提取物或溶解产物的细胞可以是表达仅含有辅因子再生系统或含有辅因子再生系统和酮还原酶的酶。在使用全细胞的实施方案中，该细胞可以使表达含有辅因子再生系统和酮还原酶的酶。

不论用全细胞、细胞提取物或纯化的酮还原酶，可使用单一酮还原酶，或可选地，可使用两种或更多种酮还原酶的混合物。

采用酮还原酶对手性酮类化合物进行还原反应生产手性醇的反应体系中还包括辅酶、辅酶再生体系和缓冲液。

由于本发明的酮还原酶突变体催化活性较高，可以增加底物的浓度，提高生产效率，反应体系中手性酮类化合物的浓度为 $1g/L \sim 200g/L$ 。

反应体系的 pH 值为 $5 \sim 9$ ，反应体系的反应温度为 $4 \sim 60^\circ C$ ；缓冲液为磷酸盐缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液或柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

在本申请中，酶活检测方法如下：

1. 试剂配制：

底物(*R*)-1-(2,4-二氯苯乙酮)母液 60 mM：称取 56.7 mg 溶于 5 mL 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (PB) pH 7.0 buffer 中，放于 50°C 水浴锅中溶解；

NADH 母液 10 mM：称取 33.17 mg 的 NADH 溶于 5 mL 的 0.1 M PB pH 7.0 buffer 中。

2. 酶活体系：

首先加入酶，然后加入底物(*R*)-1-(2,4-二氯苯乙酮)，NADH 和 Buffer 的混合物，放入酶标仪中，在 30°C，340 nm 波长下检测酶活。

检测体系配制见表 1。

表 1

体系	加入量	终浓度
酶突变体	20 μ L	N/A
底物	50 μ L	10 mM
NADH	10 μ L	0.33 mM
0.1 M PB pH 7.0 缓冲液	220 μ L	N/A

稳定性表示为残余活性，即处理后的活性与处理前活性的百分比值。

酮还原酶 KRED 突变体 E144A+L152Y+L198Q+E201G+G6S+L146M+147V+D42E+T199V，在本发明中简称“模板”，所列突变位点为在该“模板”基础上进行的突变。

实施例 1

分别将“模板”和突变体在 45°C 和 53°C 进行保温 1 h，然后测定其活性，与不保温的进行对比，稳定性表示为其残余活性与初始活性的百分比。所有突变体的热稳定性在 53°C 进行测定，结果见表 2。

表 2

突变体	稳定性 (%)
模板	+++ (45°C)
模板	+ (53°C)
K200H	++
I86V+M146I+K200H	+++
M146I+K200H	+++

M146L+N156S+K200H	++++
M146L+K200H	+++
K200H+G201D	+++
Q44R+M146I+K200H	+++
K61E+K200H+K237E	++
I86V+M146I+K200H	+++
M146I+K200H+G201D	++++
M146L+K200H+G201D	+++
N156S+K200H+G201D	++++
K200H+G201D+K237E	+++
K28E+M146I+K200H+G201D	++++
K28E+M146L+K200H+G201D	+++
K28E+N156S+K200H+G201D	++++
Q44R+M146L+K200H+G201D	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D	++++
I86V+M146I+K200H+K61H	++++
I86V+M146I+K200H+K208R	++++
I86V+M146I+K200H+G201D	+++
I86V+M146L+K200H+G201D	+++

+代表稳定性, +残余活性 0-5%, ++残余活性 5-10%, +++残余活性 10-50%, ++++残余活性 50-95%。

实施例 2

组合饱和突变可以获得几个突变位点之间具有协同作用的突变体, 而且可以对其氨基酸的组成进行优化组合。以 Q44R+N156S+K200H+G201D 为模板, 进行突变点组合, 此时酶液处理条件为 65 °C 处理 1 h, 然后测定其活性, 与不保温的进行对比, 稳定性表示为其残余活性与初始活性的百分比。

高通量筛选中酶液的制备方法: 96 孔板离心去掉上清培养基, 每孔加入 200 μ L 酶解溶液 (溶菌酶 2 mg/mL, 多黏菌素 0.5 mg/mL, pH = 7.0), 37 °C 保温破碎 3 h。酶活检测方法: 首先加入酶, 然后加入底物(R)-1-(2,4-二氯苯乙酮), NADH 和 Buffer 的混合物, 放入酶标仪中, 在 30 °C, 340 nm 波长下检测酶活, 结果见表 3。

表 3

突变体	稳定性(%)
Q44R+N156S+K200H+G201D	+
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K28E	++++

Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+T65A	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K28E	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K39I	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+T65A	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+A94V	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K208R	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K28E	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K39I	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K28E	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+T65A	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+K28E	++++

+代表稳定性，+残余活性 0-5%，++残余活性 5-10%，+++残余活性 10-50%，++++残余活性 50-95%。

实施例 3

以 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 为模板继续进行突变。此时酶液处理条件为 71 °C 处理 1 h，然后测定其活性，与不保温的进行对比，稳定性表示为其残余活性与初始活性的百分比。

高通量筛选中酶液的制备方法：96 孔板离心去掉上清培养基，每孔加入 200 μ L 酶解溶液 (溶菌酶 2 mg/mL，多黏菌素 0.5 mg/mL，pH = 7.0)，37 °C 保温破碎 3 h。酶活检测方法：首先加入酶，然后加入底物(R)-1-(2,4-二氯苯乙酮)，NADH 和 Buffer 的混合物，放入酶标仪中，在 30 °C，340 nm 波长下检测酶活，结果见表 4。

表 4

突变体	稳定性 (%)
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I	+
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+V47C+F59C	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+G43C	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28E	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28R	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K2	+++

8Q	
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28M	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28A	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28S	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+I86V	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+I39V	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K71R	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+A144T	++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+Y152F	+++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K28E	++++
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C	++++

+代表稳定性，+残余活性 0-5%，++残余活性 5-10%，+++残余活性 10-50%，++++残余活性 50-95%。

实施例 4

在酶稳定性提高过程中，酶整体的刚性得到提高，因此稳定性提高的突变体同时表现出对化学物质如戊二醛，对有机溶剂如甲醇等的耐受性均有提高，这其实也是突变体整体刚性提高的外在表现。

对前文所述的突变体进行戊二醛耐受性和甲醇耐受性的测试。其中戊二醛耐受性在 1%的戊二醛进行保温 1 h，然后测定残余活性，醛耐受性表现为不保温和保温的活性的百分比。甲醇耐受性在 60%甲醇溶液中进行保温 1 h，然后测定残余活性，甲醇的耐受性表现为不保温和保温的活性的百分比，结果见表 5。

表 5

突变体	戊二醛耐受性 (%)	甲醇耐受性 (%)
模板	*	#
K200H	**	##
I86V+M146I+K200H	**	##
M146L+K200H	**	##
M146L+N156S+K200H	**	##
K200H+G201D	**	##
Q44R+M146I+K200H	**	##
K61E+K200H+K237E	**	##
I86V+M146I+K200H	**	##
M146I+K200H+G201D	**	##
M146L+K200H+G201D	**	##
N156S+K200H+G201D	**	##
K200H+G201D+K237E	**	##
K28E+M146I+K200H+G201D	**	##
K28E+M146L+K200H+G201D	**	##
K28E+N156S+K200H+G201D	***	###
Q44R+M146L+K200H+G201D	**	##
Q44R+N156S+K200H+G201D	**	##
I86V+M146I+K200H+K61H	**	##
I86V+M146I+K200H+K208R	**	##
I86V+M146I+K200H+G201D	**	##
I86V+M146L+K200H+G201D	**	##
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H	**	##
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K28E	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+T65A	**	##
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K28E	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K39I	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+T65A	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+A94V	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K208R	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K28E	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I	***	###

Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+T65A	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+K28E	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+V47C+F59C	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+G43C	***	###
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28E	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28R	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28Q	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28M	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28A	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+I86V	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+I39V	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K71R	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+A144T	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+Y152F	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+K28E	****	####
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C	****	####

*代表醛耐受性，*残余活性 0-5%，**残余活性 5-10%，***残余活性 10-50%，****残余活性 50-95%。

#代表甲醇耐受性，#残余活性 0-5%，##残余活性 5-10%，###残余活性 10-50%，####残余活性 50-95%。

实施例 5

使用突变体 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+G36C 进行不同底物反应验证，结果见表 6。

1) 25 mL 的反应瓶中加入底物 2-氯苯乙酮 2 g，加入 0.1 M 的 PB 7.0，2 g 异丙醇，20 mg 的 NAD⁺，0.05 g 酮还原酶突变体，混匀，总体积为 10 mL，于 50℃、200 转摇床，反应 16 小时；

2) 25 mL 的反应瓶中加入底物 3-氟苯乙酮 2 g，加入 0.1 M 的 PB 7.0，2 g 异丙醇，20 mg 的 NAD⁺，0.05 g 酮还原酶突变体，混匀，总体积为 10 mL，于 50℃、200 转摇床，反应 16 小时；

3) 25 mL 的反应瓶中加入底物 4-甲氧基苯乙酮 2 g，加入 0.1 M 的 PB 7.0，2 g 异丙醇，20 mg 的 NAD⁺，0.05 g 酮还原酶突变体，混匀，总体积为 10 mL，于 50℃、200 转摇床，反应 16 小时；

4) 25 mL 的反应瓶中加入底物乙酰乙酸乙酯 2 g，加入 0.1 M 的 PB 7.0，2 g 异丙醇，20 mg 的 NAD⁺，0.05 g 酮还原酶突变体，混匀，总体积为 10 mL，于 50℃、200 转摇床，反应 16 小时。

表 6

序号	底物	转化率(%)	ee
1	2-氯苯乙酮	99	>99%
2	3-氟苯乙酮	99	>99%
3	4-甲氧基苯乙酮	99	>99%
4	乙酰乙酸乙酯	99	>99%

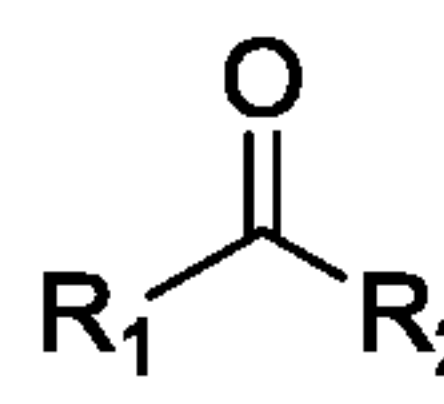
以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种酮还原酶突变体，其特征在于，所述酮还原酶突变体具有 SEQ ID NO: 1 所示序列发生氨基酸突变的序列，所述突变的位点包括 K200H。
2. 根据权利要求 1 所述的酮还原酶突变体，其特征在于，所述突变的位点还至少包括如下位点之一：A15、K28、G36、K39、G43、Q44、A46、V47、F59、K61、T65、K71、A94V、A144、M146、Y152、N156、I86、K208 和 K237；或者所述酮还原酶突变体的氨基酸序列具有发生突变的氨基酸序列中的突变位点，且与发生突变的氨基酸序列具有 95% 以上同一性的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 2 所述的酮还原酶突变体，其特征在于，所述突变的位点还至少包括如下突变之一：A15C、K28A/E/M/Q/R/S、G36C、K39I/V、G43C/M、Q44R、A46C、V47C、F59C、K61E/H、T65A、K71R、A94V、A144T、M146I、Y152F、N156S、I86V、K208R 和 K237E。
4. 根据权利要求 3 所述的酮还原酶突变体，其特征在于，所述氨基酸突变包括如下任一位点组合突变：Q44R+N156S+K200H、Q44R+N156S+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M。
5. 根据权利要求 1 所述的酮还原酶突变体，其特征在于，所述发生氨基酸突变包括如下任一位点组合突变：I86V+M146I+K200H、M146I+K200H、M146L+N156S+K200H、M146L+K200H、K200H+G201D、Q44R+M146I+K200H、K61E+K200H+K237E、I86V+M146I+K200H、M146I+K200H+G201D、M146L+K200H+G201D、N156S+K200H+G201D、K200H+G201D+K237E、K28E+M146I+K200H+G201D、K28E+M146L+K200H+G201D、K28E+N156S+K200H+G201D、Q44R+M146L+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D、I86V+M146I+K200H+K61H、I86V+M146I+K200H+K208R、I86V+M146I+K200H+G201D、I86V+M146L+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K28E、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+T65A、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R、Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K28E。

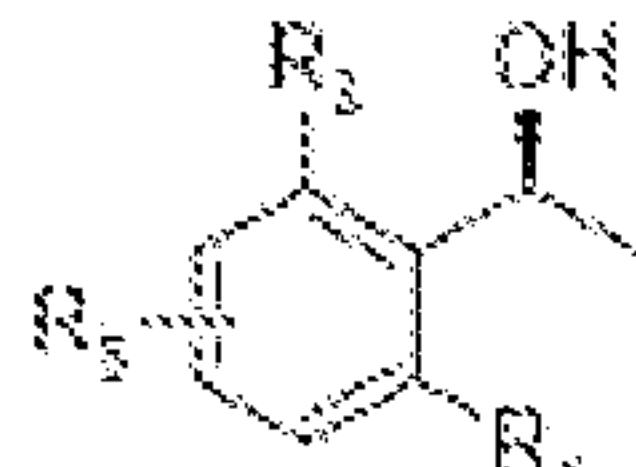
Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+T65A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+A94V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+I86V+K208R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+T65A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+V47C+F59C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+G43C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28E 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28Q 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28A 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+K28S 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+I86V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+
 G36C 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+I
 39V 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+
 K71R 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+
 A144T 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+
 Y152F 、
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+
 K28E 、 和
 Q44R+N156S+K200H+G201D+M146I+K61H+K208R+A94V+K39I+A15C+A46C+G43M+
 G36C。

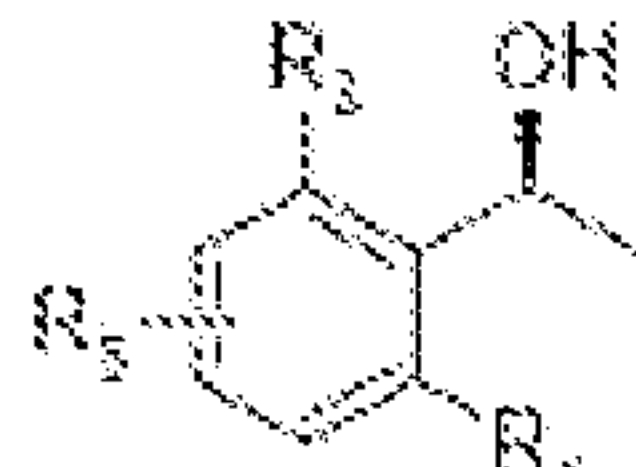
6. 一种 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子编码权利要求 1 至 5 中任一项所述的酮还原酶突变体。
7. 一种重组质粒，其特征在于，所述重组质粒连接有权利要求 6 所述的 DNA 分子。
8. 根据权利要求 7 所述的重组质粒，其特征在于，所述重组质粒为 pET-22a (+)、pET-22b (+)、pET-3a (+)、pET-3d (+)、pET-11a (+)、pET-12a (+)、pET-14b (+)、pET-15b (+)、pET-16b (+)、pET-17b (+)、pET-19b (+)、pET-20b (+)、pET-21a (+)、pET-23a (+)、pET-23b (+)、pET-24a (+)、pET-25b (+)、pET-26b (+)、pET-27b (+)、pET-28a (+)、pET-29a (+)、pET-30a (+)、pET-31b (+)、pET-32a (+)、pET-35b (+)、pET-38b (+)、pET-39b (+)、pET-40b (+)、pET-41a (+)、pET-41b (+)、pET-42a (+)、pET-43a (+)、pET-43b (+)、pET-44a (+)、pET-49b (+)、pQE2、pQE9、pQE30、pQE31、pQE32、pQE40、pQE70、pQE80、pRSET-A、pRSET-B、pRSET-C、pGEX-5X-1、pGEX-6p-1、pGEX-6p-2、pBV220、pBV221、pBV222、pTrec99A、pTwin1、pEZZ18、pKK232-18、pUC-18 或 pUC-19。
9. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求 7 或 8 所述的重组质粒。
10. 根据权利要求 9 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选所述原核细胞为大肠杆菌。
11. 一种生产手性醇的方法，包括采用酮还原酶催化潜手性酮类化合物进行还原反应生产手性醇的步骤，其特征在于，所述酮还原酶为权利要求 1 至 5 中任一项所述的酮还原酶突变体。
12. 根据权利要求 11 中所述的方法，其特征在于，所述手性酮类化合物具有如下结构式

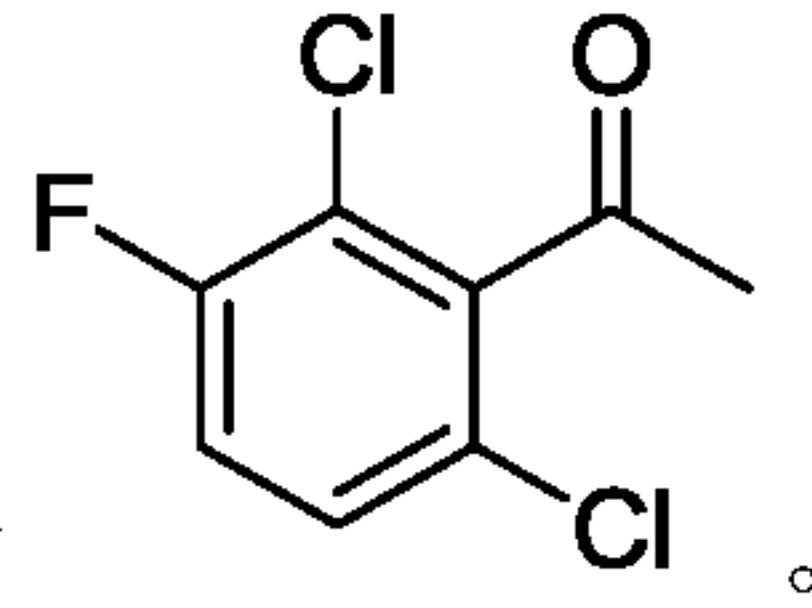


其中 R_1 和 R_2 各自独立地为烷基、环烷基、芳基或杂芳基，或者 R_1 和 R_2 与羰基上的碳共同形成杂环基、碳环基或杂芳基，所述杂环基和杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种，所述芳基中的芳基、杂芳基中的杂芳基、碳环基中的碳环基或杂环基中的杂环基各自独立地未被取代或被卤素、烷氧基或烷基中的至少一个基团所取代；

R_1 和 R_2 各自独立地为 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ 烷基、 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 环烷基、 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 芳基或 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 杂芳基，或者 R_1 和 R_2 与羰基上的碳共同形成 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 杂环基、 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 碳环基或 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 杂芳基，所述 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 杂环基和 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种，所述 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 芳基中的芳基、 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 杂芳基中的杂芳基、 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 碳环基中的碳环基或 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{10}$ 杂环基中的杂环基各自独立地未被取代或被卤素、烷氧基或烷基中的至少一个基团所取代；



优选地,所述酮类化合物的结构是为  ,其中, R₃ 为 H、F、Cl、Br 或 CH₃, R₄ 为 H、F、Cl、Br 或 CH₃, R₅ 为 H、F、Cl、Br、CH₃, OCH₃ 或 CH₂CH₃;



更优选的,所述酮类化合物为

13. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,采用酮还原酶对酮类化合物进行还原反应生产手性醇的反应体系中还包括辅酶、辅酶再生体系和缓冲液。
14. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述反应体系中所述酮类化合物的浓度为 1 g/L~200 g/L。
15. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述反应体系的 pH 值为 5~9,所述反应体系的反应温度为 4~60℃。
16. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述辅酶为 NADH。
17. 根据权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述辅酶再生体系包括:异丙醇、辅酶 NAD⁺ 和酮还原酶。
18. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液或柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/116360

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 9/04(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/22(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N; C07K; C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: 羧基还原酶, 酮还原酶, 醋酸杆菌, 变, reductase, Acetobacter, muta+, vari+, 本申请的SEQ ID NO: 1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110257351 A (ASYMCHEM LABORATORIES (TIANJIN) CO., LTD.) 20 September 2019 (2019-09-20) entire document, especially claims and the abstract	1-18
T	CN 110713992 A (ASYMCHEM LABORATORIES FUXIN CO., LTD.) 21 January 2020 (2020-01-21) entire document, particularly claims	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
02 June 2020		25 September 2020
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/116360

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	110257351	A	20 September 2019	None	
CN	110713992	A	21 January 2020	None	

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 9/04(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/22(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C07K; C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS、DWPI、SIPOABS、CNKI、NCBI、ISI Web of Science、GenBank、中国专利生物序列检索系统: 羰基还原酶, 酮还原酶, 醋酸杆菌, 变, reductase, Acetobacter, muta+, vari+, 本申请的SEQ ID NO: 1</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 110257351 A (凯莱英医药集团天津股份有限公司) 2019年 9月 20日 (2019 - 09 - 20) 全文, 尤其是权利要求书和摘要</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>T</td> <td>CN 110713992 A (凯莱英医药化学阜新技术有限公司) 2020年 1月 21日 (2020 - 01 - 21) 全文, 尤其是权利要求书</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 110257351 A (凯莱英医药集团天津股份有限公司) 2019年 9月 20日 (2019 - 09 - 20) 全文, 尤其是权利要求书和摘要	1-18	T	CN 110713992 A (凯莱英医药化学阜新技术有限公司) 2020年 1月 21日 (2020 - 01 - 21) 全文, 尤其是权利要求书	1-18
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
X	CN 110257351 A (凯莱英医药集团天津股份有限公司) 2019年 9月 20日 (2019 - 09 - 20) 全文, 尤其是权利要求书和摘要	1-18									
T	CN 110713992 A (凯莱英医药化学阜新技术有限公司) 2020年 1月 21日 (2020 - 01 - 21) 全文, 尤其是权利要求书	1-18									
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>											
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>											
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 6月 2日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 9月 25日</p>									
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>吴永庆</p> <p>电话号码 +86-10-62089161</p>									

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政法规第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/116360

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 110257351 A	2019年 9月 20日	无	
CN 110713992 A	2020年 1月 21日	无	