

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00813733.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100497632C

[22] 申请日 2000.9.29 [21] 申请号 00813733.1

[30] 优先权

[32] 1999. 9. 30 [33] JP [31] 280098/99

[32] 2000. 6. 28 [33] JP [31] 194043/00

[86] 国际申请 PCT/JP2000/006780 2000.9.29

[87] 国际公布 WO2001/023591 日 2001.4.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.1

[73] 专利权人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 菊池庆实 伊达雅代 梅泽有希子
横山敬一 松井裕

[56] 参考文献

JP, A, 10 - 108675 1998.4.28

US, A, 4985361 1991.1.15

JP, A, 9 - 316095 1997.12.9

审查员 王慧梅

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 92 页

[54] 发明名称

转谷氨酰胺酶的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及在棒杆菌中分泌生产外源蛋白，特别是转谷氨酰胺酶的方法。本发明提供通过使工业生产上有用的外源蛋白，特别是转谷氨酰胺酶在棒杆菌中生成，并有效地释放到菌体外(分泌生产)来制备外源蛋白，特别是转谷氨酰胺酶的方法。使用编码源自棒杆菌的信号肽区的序列下游结合含有前体结构部分的目的外源蛋白质基因序列，特别是转谷氨酰胺酶原基因序列的表达重组体，将该表达型基因重组体导入棒杆菌，培养转化的棒杆菌，释放到菌体外的蛋白质通过用蛋白酶等进行处理切去前体结构部分，制备目的外源蛋白质，特别是转谷氨酰胺酶。

1. 一种转谷氨酰胺酶的制备方法，其包括，对携有基因表达重组体的棒杆菌进行培养，使上述转谷氨酰胺酶在上述棒杆菌中生成并分泌、然后从上述转谷氨酰胺酶中切除前体结构部分，其中在所述基因表达重组体中，在棒杆菌中发挥功能的启动子的下游连接编码源自棒杆菌的信号肽区的核酸序列，再在编码上述信号肽区的核酸序列的下游连接编码含有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的核酸序列。

2. 权利要求1所述的方法，其中，信号肽是源自棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号肽。

3. 权利要求1所述的方法，其中，信号肽是源自谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的细胞表面蛋白质的信号肽。

4. 权利要求3所述的方法，其中，信号肽由序列号1或29所示的氨基酸序列组成。

5. 权利要求1所述的方法，其中，信号肽是源自产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)的细胞表面蛋白质的信号肽。

6. 权利要求5所述的方法，其中，信号肽由序列号2所示的氨基酸序列组成。

7. 权利要求1~6任一项所述的方法，其中，前体结构部分为源自放线菌的转谷氨酰胺酶的前体结构部分。

8. 权利要求7所述的方法，其中，前体结构部分由序列号3或4所示的序列组成。

9. 权利要求7所述的方法，其中，前体结构部分的氨基酸序列为序列号30~38所示的氨基酸序列中任意一种。

10. 权利要求1所述的方法，其中，前体结构部分的切除是通过蛋白酶实施的。

11. 权利要求10所述的方法，其中，生成和分泌转谷氨酰胺酶的棒杆菌还生成所述蛋白酶。

12. 权利要求11所述的方法，其中，前体结构部分的切除是通过所述蛋白酶和肽酶实施的。

13. 权利要求12所述的方法，其中，生成和分泌转谷氨酰胺酶的棒杆菌还生成所述蛋白酶和所述肽酶。

14. 权利要求10或12所述的方法，其中，蛋白酶源自放线菌。

15. 权利要求 10 或 12 所述的方法, 其中, 蛋白酶源自白灰浅链霉菌(*Streptomyces albogriseolus*)。

16. 权利要求 12 所述的方法, 其中, 肽酶源自放线菌。

17. 权利要求 12 所述的方法, 其中, 肽酶源自茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraense*)。

18. 权利要求 1~9 任一项所述的方法, 其中, 转谷氨酰胺酶是源自放线菌的转谷氨酰胺酶。

19. 权利要求 18 所述的方法, 其中, 转谷氨酰胺酶是源自茂原链轮丝菌(*Streptoverticillium mobaraense*)的转谷氨酰胺酶。

20. 权利要求 19 所述的方法, 其中, 转谷氨酰胺酶由序列号 5 所示的氨基酸序列组成。

21. 权利要求 18 所述的方法, 其中, 转谷氨酰胺酶是源自肉桂链轮丝菌(*Streptoverticillium cinnamoneum*)的转谷氨酰胺酶。

22. 权利要求 21 所述的方法, 其中, 转谷氨酰胺酶由序列号 43 所示的氨基酸序列组成。

转谷氨酰胺酶的制备方法

发明的背景

本发明涉及在棒杆菌中分泌生产外源蛋白，特别是转谷氨酰胺酶的方法。用该方法分泌生产的外源蛋白质是产业上有用的酶或有生理活性的蛋白质等，转谷氨酰胺酶被广泛地应用于食品加工和制药领域等中。

到目前为止，对于外源蛋白质的分泌生产已有很多报道，如有关利用杆菌属细菌分泌生产外源蛋白质的综述[Microbiol.rev., 57, 109-137(1993)]，利用甲基营养酵母 *Pichia pastoris* 分泌生产外源蛋白的综述[Biotechnol., 11, 905-910(1993)]，以及利用曲霉菌属霉菌进行工业生产的报道[Biotechnol., 6, 1419-1422(1988); Biotechnol., 9, 976-981(1991)]等。

根据本发明的一个实施方式，分泌生产的转谷氨酰胺酶是催化位于蛋白质肽链内的 γ -羧酰胺基的酰基转移反应的酶。该酶作用于蛋白质时，可以通过形成 $\epsilon-(\gamma\text{-Glu})\text{-Lys}$ 桥及Gln脱酰胺化，产生Gln置换为Glu的反应。该转谷氨酰胺酶可用于果冻等胶状食品、酸奶酪、干酪、或胶状化妆品等的制造或改善肉类食品的肉质等（特开平 1-50382）。另外该酶也可用于制备热稳定微胶囊的材料、固定化酶的载体等，是工业上利用性高的酶。

到目前为止，已知有源于动物和源于微生物（微生物转谷氨酰胺酶，以下略作“MTG”）的转谷氨酰胺酶。源自动物的转谷氨酰胺酶是依赖于钙离子的酶，分布在动物的脏器、皮肤、血液等。例如，有豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶(K.Ikura et al. Biochemistry 27, 2898(1988))，人表皮角质细胞转谷氨酰胺酶(M.A.Phillips et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,9333(1990))、人凝血因子XIII(A.Ichinose et al. Biochemistry 25,6900(1990))。

源自微生物的转谷氨酰胺酶有在链轮丝菌(*Streptoverticillium*)属细菌中发现的钙非依赖性转谷氨酰胺酶。这样的细菌，例如灰肉色链轮丝菌(*Streptoverticillium griseocarneum*)IFO 12776、肉桂链轮丝菌肉桂亚种

(*Streptoverticillium cinnamoneum* sub sp. *cinnamoneum*) (以下略作 *S. cinnamoneum*) IF0 12852、茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*) (以下略作 *S. mobaraense*) IF0 13819 (特开昭 64-27471) 等。这些微生物产生的转谷氨酰胺酶的一级结构经肽谱以及基因结构解析, 结果表明与源自动物的转谷氨酰胺酶完全没有同源性(欧洲专利公开公报 0481 504 A1)。

源自微生物的转谷氨酰胺酶(MTG)由于是从上述菌类等的培养物经纯化操作制备的, 所以在供给量、效率等方面存在问题。因此也正在尝试通过基因工程技术来制备转谷氨酰胺酶。转谷氨酰胺酶及其基因, 例如在 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 82-87(1994)、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 88-92(1994)、*Biochimie*, 80, 313-319(1998)、*Eur. J. Biochem.*, 257, 570 - 576(1998)、W0 96/06931、W0 96/22366 等中已有报道, 其中有关于利用浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*)、*oryzae* 曲霉菌 (*Aspergillus oryzae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等宿主载体系统表达生产的报道。除此之外, 还有通过 *E. coli*、酵母等微生物分泌表达(特开平 5-199883)的方法, 以及通过大肠杆菌将 MTG 以非活性融合蛋白质包涵体表达后, 再用蛋白质变性剂溶解, 经去除变性剂使其复性来生成有活性的 MTG 的方法的报道(特开平 6-30771)。然而, 在 *E. coli*、酵母等微生物的分泌表达中存在着其表达量非常少的问题。

而为了利用棒杆菌有效分泌生产外源蛋白质的研究到目前为止已有一些报道, 如利用谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) (以下略作 *C. Glutamicum*) 分泌核酸酶 (nuclease) 或脂肪酶 [US4965197, *J. Bacteriol.*, 174, 1854-1861 (1992)] 以及枯草杆菌蛋白酶等蛋白酶 [Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613 (1995)] 的研究, 有关棒杆菌的细胞表面蛋白质的分泌的研究 [特表平 6-502548], 在以上研究基础上展开的纤连蛋白结合蛋白分泌的研究 [Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400 (1997)] 和利用变异型分泌手段提高蛋白质分泌的研究报道 [特开平 11-169182] 等, 但只是有关极其有限的蛋白质的极少数的报道。从蛋白蓄积量来看, 虽然有在 Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613 (1995) 文献中报道的利用源自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的枯草杆菌蛋

白酶基因 (aprE) 的启动子、核糖体结合位点以及信号肽的序列使源自节瘤偶蹄形菌 (*Dichelobacter nodosus*) 的碱性蛋白酶的基因在谷氨酸棒杆菌中表达, 确认蓄积了大约 2.5mg/ml 的该蛋白的例子, 但在 US4965197、特表平 6-502548、特开平 11-169182 的描述中都没有记载具体的分泌蓄积的蛋白量, 而在分泌纤连蛋白结合蛋白 [Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400 (1997)] 的报道中被确认的分泌蓄积量最大不过是约为 2.5 μ g/L 的非常少的量。所以使外源蛋白以实用水平有效地蓄积在培养基中的报道还未看到。

棒杆菌的基因操作技术是通过原生质体转染法的建立 [J. Bacteriol., 159, 306-311 (1984); J. Bacteriol., 161, 463-467 (1985)]、各种载体的开发 [Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984); J. Bacteriol., 159, 306-311 (1984); J. Gen. Microbiol., 130, 2237-246 (1984); Gene, 47, 301-306 (1986); Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 65-69 (1989)]、基因表达调控法的开发 [Bio/Technology, 6, 428-430 (1988)]、粘粒的开发 [Gene, 39, 281-286 (1985)] 等、以及利用质粒和嗜菌体系统发展起来的。另外有关源自棒杆菌的基因克隆也有报道 [Nucleic Acids Res., 14, 10113-1011 (1986); J. Bacteriol., 167, 695-702 (1986); Nucleic Acids Res., 15, 10587 (1987); Nucleic Acids Res., 15, 3922 (1987); Nucleic Acids Res., 16, 9859 (1988); Agric. Biol. Chem., 52, 525-531 (1988); Mol. Microbiol., 2, 63-72 (1988); Mol. Gen. Genet., 218, 330-339 (1989); Gene, 77, 237-251 (1989)]。

另外, 有关源自棒杆菌的转移因子也有报道 [W093/18151; EP0445385; 特开平 6-46867; Mol. Microbiol., 11, 739-764 (1994); Mol. Microbiol., 14, 571-581 (1994); Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994); FEMS Microbiol. Lett., 126, 1-6 (1995); 特开平 7-107976]。

所谓转移因子是在染色体上可转移的 DNA 片段, 存在于从原核生物到真核生物范围很广的生物中。开发利用转移因子的转座子 [W093/18151; 特开平 7-107976; Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994)、特开平 9-70291]、以及通过转座子使外源基因表达已成

为可能。

发明内容

本发明的目的在于，提供通过使棒杆菌生成产业上有用的外源蛋白、特别是转谷氨酰胺酶，并使之有效地分泌到菌体外（分泌生产），制备外源蛋白质、特别是转谷氨酰胺酶的方法。

本发明人着眼于无论是信号肽还是前体部分在放线菌等的分泌蛋白质分泌过程中都起着重要作用的事实，直至发明了有效分泌生产产业上有用的外源蛋白质，特别是转谷氨酰胺酶的方法。

就是说，本发明是有关外源分泌型蛋白质的制备方法的发明，其特征是使在源自棒杆菌的信号肽的下游连接含有前体结构部分的外源分泌型蛋白质的融合蛋白质在棒杆菌中生成和分泌，然后将前体结构部分切除来获得外源蛋白质。

更具体地说，本发明提供的方法是，将在编码源自棒杆菌的信号肽区，特别是细胞表面蛋白质的信号肽区的序列的下游结合了含有前体结构部分的目的蛋白质基因序列，特别是转谷氨酰胺酶原基因序列的表达重组体导入棒杆菌，对得到的转化棒杆菌进行培养，使生成的蛋白质有效地分泌到菌体外，用蛋白酶对释放到菌体外的蛋白质进行处理，切去前体结构部分，进而制备大量的目的外源蛋白质，特别是转谷氨酰胺酶。

另外，本发明还提供获得转谷氨酰胺酶的一种方法，即，对蛋白酶等也象转谷氨酰胺酶基因重组体那样构建这些蛋白酶等的表达型基因重组体，然后与含有转谷氨酰胺酶原基因的表达重组体都导入棒杆菌，对得到的转化棒杆菌进行培养，或导入到别的棒杆菌，对得到的转化棒杆菌与导入转谷氨酰胺酶原基因的细菌共同培养，通过使转谷氨酰胺酶原和这些蛋白酶分泌表达，可以得到切除了转谷氨酰胺酶原的前体结构部分的转谷氨酰胺酶。

另外在本说明书中，所谓蛋白质或肽被“分泌”是指蛋白质或肽分子被转移到菌体外（细胞外），最终这些蛋白质或肽分子完全游离在培养基中，当然也包括只有一部分存在于菌体外的情况以及存在于菌体表面的情况。

实施发明的最佳方式

依照本发明的方法，用棒杆菌作为宿主载体系统，构建在棒杆菌细胞表面蛋白质的信号肽的下游结合了含有分泌型的前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因的表达式重组体，然后将该重组体导入棒杆菌内，对被表达、分泌到菌体外的转谷氨酰胺酶原用蛋白酶等进行处理，切除前体结构部分，就可得到大量的切除了前体结构部分的转谷氨酰胺酶。

另外依照本发明的方法，对蛋白酶等也象转谷氨酰胺酶基因重组体那样构建这些蛋白酶等的表达式基因重组体，然后与转谷氨酰胺酶原基因重组体都导入棒杆菌，对得到的转化棒杆菌进行培养，或导入到别的棒杆菌，对得到的转化棒杆菌与导入转谷氨酰胺酶原基因的细菌共同培养，通过分泌表达，可以直接在菌体外得到切除了转谷氨酰胺酶原的前体结构部分的转谷氨酰胺酶。

分泌型蛋白质一般以前导肽或前导肽原形式被翻译，然后变成成熟型蛋白质。即一般以前导肽或前导肽原形式被翻译后，切除信号肽（“前导部分”）使之变成成熟肽或肽原，肽原再经蛋白酶处理，切除前体部分使之成为成熟肽。在本说明书中，所谓“信号序列”是指存在于分泌型蛋白质前体的 N 末端，且不存在于天然成熟蛋白质中的序列，所谓“信号肽”是指从该蛋白质前体中切除的肽。一般来说，信号序列随着蛋白质分泌到菌体外的同时，就被蛋白酶（通常称之为信号肽酶）切除了。这样的信号肽虽然在所有生物中都有某些共同的序列上的特征，但在某种生物中表现出分泌功能的信号肽在其他生物中未必发挥能分泌功能。

在本说明书中，有时将信号肽和前体部分都含有的蛋白质，即初次翻译产物称之为“前蛋白质原”，将不含信号肽而含有前体部分的蛋白质称之为“蛋白质原”。蛋白质原的前体部分有时也称之为“前体结构部分”或“前体结构”，在本说明书中蛋白质的“前体结构部分/前体结构”与蛋白质的“前体部分”之间可互换使用。在前蛋白原或前蛋白质中，其信号肽可以来自于不同的蛋白质，也可以是天然存在于目的蛋白质的信号肽，但最好是使用源自所用宿主的分泌型蛋白质。或者按照所用宿主的密码子使用频率将信号肽改造成具有最适密码子的信号肽。而可用于本发明的信号肽也可以含有信号肽来源的天

然的成熟蛋白质的 N 末端氨基酸序列的一部分。信号肽源自不同的蛋白质时,有时也将前蛋白原特别称之为“外源融合前蛋白原”。例如,蛋白质为转谷氨酰胺酶时,可分别称之为“前转谷氨酰胺酶原”、“转谷氨酰胺酶原”和“外源融合前转谷氨酰胺酶原”。所谓“切除前体部分的”蛋白质是指通过切断肽键,除去至少一个以上构成前体部分的氨基酸的蛋白质,包括该 N 末端区与天然成熟蛋白质的 N 末端区完全一致的蛋白质,以及只要具有该蛋白质活性,与天然蛋白质相比其 N 末端多出一个以上源自前体部分的氨基酸的蛋白质以及与天然成熟蛋白质相比氨基酸序列短的蛋白质也都包括在内。

到目前为止,利用棒杆菌将外源蛋白分泌到菌体外的例子如在阐述以往的技术时所描述的那样非常少,而且从技术上也没有完善。另外也没有棒杆菌通过自身将蛋白酶等蛋白质分泌到菌体外的例子,但内源性 DNase 的分泌[US4965197]和本发明使用的细胞表面蛋白[特表平 6-502548]从细胞表面剥落并出现在菌体外的事实是已经知道的例子。但是,就棒杆菌来说,对参与分泌的信号肽除了细胞表面蛋白质以外到现在还不清楚。到目前为止所了解的棒杆菌的细胞表面蛋白只是谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)的细胞表面蛋白 PS1 和 PS2 的基因[特表平 6-502548]以及产氨棒杆菌(以下略作 *C. ammoniagenes*)的细胞表面蛋白质 S1pA 的基因[特开平 10-108675]。在这些蛋白质内,虽然 PS1 和 S1pA 之间能看到有许多同源性(30%),但在其他蛋白质之间几乎看不到同源性,另外关于信号序列区域也看不到它们之间的同源性。作为信号序列的例子,如序列号 29 和 1 给出的谷氨酸棒杆菌的 PS1 和 PS2 的信号序列,以及序列号 2 给出的产氨棒杆菌的 S1pA 的信号序列。

本发明人从谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)(旧名称为乳发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)) ATCC13869 菌株克隆 PS2 蛋白质基因,测定其序列时,虽然没有看出在信号序列区与源自谷氨酸棒杆菌的已知蛋白质基因序列有什么差别,但在成熟型细胞表面蛋白质的 N 末端氨基酸的 38 位残基前的序列中确认有 2 个不同之处(序列号 7 给出的氨基酸序列中第 40 位氨基酸残基的 Thr 是 Asn,第 55 位的 Gly 是 Glu)。序列号 6 给出了含有编码其信号序列号 30 个氨基酸残基和成熟细胞表面蛋白质的 N 末端 38 个氨基酸残基的共 68 个残

基的碱基序列以及启动子区的其 5'-上游区序列, 序列号 7 给出了其氨基酸序列。

然后, 为了在棒杆菌中尝试使外源蛋白质大量分泌到菌体外是否可行, 本发明人利用含有细胞表面蛋白质的启动子区和信号肽区的序列进行了外源蛋白质的分泌研究。

已知源自放线菌的转谷氨酰胺酶基因 GC 含量高, 但棒杆菌与它相近, 另外密码子利用性也近似, 所以可直接利用放线菌基因。因此, 本发明人就能否可以直接利用放线菌转谷氨酰胺酶基因进行了研究, 结果表明源自放线菌的转谷氨酰胺酶的信号肽在棒杆菌中不起作用。但是, 编码与源自棒杆菌的细胞表面蛋白的信号肽融合的包含源自放线菌的前体结构部分的成熟蛋白的转谷氨酰胺酶基因可直接有效地发挥其功能, 并可作为含有前体结构部分的蛋白原有效地分泌到菌体外。另外, 使用多出了细胞表面蛋白质的信号肽 30 个氨基酸残基与成熟细胞表面蛋白质的 N 末端部分的 38 个氨基酸残基, 即, 使用融合了成熟细胞表面蛋白质的 N 末端部分的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因时, 转谷氨酰胺酶原向菌体外分泌的效率将进一步增大。

本发明中所说的棒杆菌是需氧的革兰氏阳性杆菌, 包括以前属于短杆菌属, 现在都合并到棒杆菌属的细菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)), 以及包括与棒杆菌属亲缘关系近的短杆菌属细菌。作为使用棒杆菌的优点, 与到目前为止适用于外源蛋白分泌的霉菌、酵母或枯草杆菌属细菌相比, 它本来分泌到菌体外的蛋白质就非常少, 所以分泌生产外源蛋白质时的纯化过程可以简化和省略, 另外在糖、氮和无机盐等简单培养基中能很好生长, 在培养基花费和培养方法、培养生产效率方面也都有优势。

本发明中作为宿主菌使用的棒杆菌有, 以 L-谷氨酸生成菌为代表的解糖短杆菌 (*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC14066、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、乳发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*, 又称为谷氨酸棒杆菌) ATCC13869、玫瑰色短杆菌 (*Brevibacterium roseum*) ATCC13825、黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*, 又称为谷氨酸棒杆菌) ATCC14067、嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870、谷氨酸棒杆菌 ATCC13032, 百合花棒

杆菌 (*Corynebacterium lilium*) ATCC15990、产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*, 又称为产氨棒杆菌) ATCC6871 等野生株, 以及由这些野生株诱变的变异株, 例如失去谷氨酸生成能力的变异株, 还包括生成赖氨酸的氨基酸生成变异株, 生成如肌苷等核酸那样的其他物质的变异株。

本发明使用的基因重组体, 一般都在适当位置中含有启动子、编码合适的信号肽的序列和编码目的蛋白的核酸片段、以及为了使目的蛋白基因在棒杆菌表达所必需的调控序列(起始因子和终止因子), 并能使它们发挥作用的基因重组体。目的蛋白也可以在 N 末端含有前体结构部分。用于该重组体的载体没有特别限制, 只要是在棒杆菌中能够发挥功能的就可以, 象质粒那样在染色体外自我增殖的, 还是插入细菌染色体的载体都可以, 最好是源自棒杆菌的质粒。其中包括诸如 pHM1519 (*Agric, Biol. Chem.*, 48, 2901-2903 (1984))、pAM330 (*Agric, Biol. Chem.*, 48, 2901-2903 (1984)) 以及将它们进行改造使之含有抗药性基因的质粒。另外人工转座子等也可以利用。使用转座子时, 通过同源重组或它们自身转移能力将目的基因导入染色体中。

本发明中使用的启动子没有特别限定, 只要是在棒杆菌中发挥功能的启动子一般都可以使用, 甚至源自外源的, 例如优选 tac 启动子等源自 *E. coli* 的启动子。其中更优选 tac 启动子等强力启动子。源自棒杆菌的启动子有, 细胞表面蛋白质的 PS1、PS2、S1pA 基因的启动子, 各种氨基酸合成系统, 例如谷氨酸合成系统的谷氨酸脱氢酶基因、谷氨酰胺合成系统的谷氨酰胺合成酶基因、赖氨酸生物合成系统的天冬氨酸激酶基因、苏氨酸生物合成系统的同型丝氨酸脱氢酶基因、异亮氨酸和缬氨酸生物合成系统的乙酰羟酸合成酶基因、亮氨酸生物合成系统的 2-异丙基苹果酸合成酶基因、脯氨酸和精氨酸生物合成系统的谷氨酸激酶基因、组氨酸生物合成系统的磷酸核糖-ATP 焦磷酸化酶基因、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸生物合成系统的脱氧阿拉伯庚糖醛磷酸 (DAHP) 合成酶基因、肌苷酸和鸟苷酸那样的核酸生物合成系统中的磷酸核糖焦磷酸 (PRPP) 氨基转移酶基因、肌苷酸脱氢酶基因和鸟苷酸合成酶基因的启动子。

本发明使用的信号肽是作为宿主的棒杆菌的分泌型蛋白质的信号

肽,最好是棒杆菌细胞表面蛋白质的信号肽。作为棒杆菌的细胞表面蛋白质有源自谷氨酸棒杆菌的 PS1 和 PS2 [特表平 6-502548]、以及产氨棒杆菌的 S1pA [特开平 10-108675]。序列号 29 给出了 PS1 的氨基酸序列,序列号 1 给出了 PS2 的氨基酸序列,序列号 2 给出了 S1pA 的氨基酸序列。另外按照美国专利 4965197 的描述,在源自棒杆菌的 DNase 中也包含有信号肽,那样的信号肽也可以用于本发明。

在信号肽中也可以加上信号肽来源的分泌型蛋白质的 N 末端氨基酸序列的一部分。信号序列在翻译产物分泌到菌体外时就被信号肽酶切去了。编码信号肽的基因可以直接使用天然型的基因,也可以根据使用宿主的密码子使用频率进行改变,使之具有最适密码子。

使用这些信号肽时,编码目的蛋白的基因接在编码信号肽的基因的 3'-末端一侧,并使它受到源自上述启动子的表达调控。

通过本发明分泌生产的有用的蛋白质实质上包括源自动植物或微生物的所有分泌型蛋白质,但并没有被特别限定。例如蛋白酶、氨肽酶、羧肽酶、胶原酶和几丁质酶等蛋白质都可以通过本发明进行分泌生产。通过本发明分泌生产的蛋白质优选天然且为分泌型蛋白质,更优选带有前体结构部分的蛋白质,特别优选将转谷氨酰胺酶作为通过本发明分泌生产的有用的蛋白质。作为本发明可利用的转谷氨酰胺酶基因可以是放线菌,例如茂原链轮丝菌 IF013819、肉桂链轮丝菌 IF012852、灰色肉链轮丝菌 IF012776、利迪链霉菌 (*Streptomyces lydicus*) [W09606931] 等和 Oomycetes [W09622366] 等霉菌的分泌型转谷氨酰胺酶基因。编码这些蛋白质的基因按照使用的宿主以及为了获得所希望的活性可以进行改变,其中包括添加、缺失、置换一个以上的氨基酸等改变,可以根据需要变换成响应宿主密码子使用频率的最适密码子。

通过本发明分泌生产以天然的前肽原形式表达的蛋白质时,最好使用编码含有前体结构部分(前体部分)的蛋白原的基因片段。作为前体结构部分的例子有,序列号 3(源自茂原链轮丝菌)和序列号 4(源自肉桂链轮丝菌)给出的源自放线菌的转谷氨酰胺酶的前体结构部分的序列。蛋白质的前体结构部分可以通过适当的手段,例如利用蛋白酶切除,也可以用氨肽酶、在适当位置进行切割的内肽酶、或使用更特异的蛋白酶,但最好是使用能在特定位置切断,并能使生成的蛋白

质具有与天然蛋白质同样的或更高的活性的蛋白酶。或者是改变编码目的蛋白质或目的蛋白质的前体结构部分的基因序列,设计成能表达在所希望的位置含有特异的蛋白酶识别位点的蛋白质。包括上述那样的诱变技术、基因克隆技术、生成蛋白质的检测技术在内的常规分子生物学手法业内人士都很清楚。例如可以参照下列文献: Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、DNA cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985)、F. M. Ausubel et al. (eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc, (1994)、PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press 等。

作为改变了序列号 3 和 4 所示的前体结构部分的前体结构部分的例子,如具有序列号 30~38 所示的氨基酸序列的修饰前体结构部分。

<序列表说明>

序列号 30~37: 茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的修饰前体结构部分

序列号 38: 茂原链轮丝菌和肉桂链轮丝菌的转谷氨酰胺酶前体结构部分的嵌合

这些修饰前体结构部分具有以下特征:

序列号 30 = 缺失了源自茂原链轮丝菌的前体结构部分(45 个氨基酸残基)的 C 末端的 AP。

序列号 31 = 缺失了源自茂原链轮丝菌的前体结构部分(45 个氨基酸残基)的 C 末端的 FRAP。

序列号 32 = 缺失了源自茂原链轮丝菌的前体结构部分(45 个氨基酸残基)的 N 末端的 D。

序列号 33 = 缺失了源自茂原链轮丝菌的前体结构部分(45 个氨基酸残基)的 N 末端的 DNGAGE。

序列号 34 = 将源自茂原链轮丝菌的前体结构部分(45 个氨基酸残基)的 C 末端的 RAP 改变成了 GPX。

序列号 35 = 将源自茂原链轮丝菌的前体结构部分(45 个氨基酸残基)

的 C 末端的 RAP 改变成了 GPR。

序列号 36 = 将源自茂原链轮丝菌的前体结构部分 (45 个氨基酸残基) 的 C 末端的 GPSFRAP 改变成了 GPK (FRAP 缺失, C 末端的 S 改变成 R)。

序列号 37 = 将源自茂原链轮丝菌的前体结构部分 (45 个氨基酸残基) 的 C 末端的 GPSFRAP 改变成了 GPR (FRAP 缺失, C 末端的 S 改变成 R)。

序列号 38 = 由源自茂原链轮丝菌的前体结构部分一部分 (15 个氨基酸残基) 和源自肉桂链轮丝菌的前体结构部分 (41 个氨基酸残基) 的一部分构成的嵌合前体结构部分 (56 个氨基酸残基)。

这样, 只要在特定位置有了蛋白酶的特异识别位点, 就可以在前体结构部分置换、缺失、插入或添加一个以上的氨基酸。

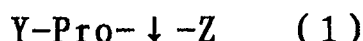
蛋白酶分解获得的蛋白质的 N 末端区未必与天然的蛋白质一样, 即使是多添加了 1~数个氨基酸, 或缺失了 1~数个氨基酸都可以。一般来说, 从蛋白质活性观点出发, 优选在与天然蛋白质几乎相同的位置切断, 更优选与天然产物一样的成熟肽。例如, 有关茂原链轮丝菌和肉桂链轮丝菌的成熟型转谷氨酰胺酶的序列分别是序列号 5 和 43 给出的序列。因此, 一般来说最优选能在生成与天然成熟蛋白质一样的蛋白质的位置切断肽原的特异性蛋白酶。然而, 为了特定目的, 与天然蛋白质相比, N 末端或多或少 1~数个氨基酸的肽有时具有更适合的活性。这样的蛋白酶中除了包括象分散酶 (Dispase) (Boeringer Mannheim 公司制) 那样可购买的酶以外, 也包括从微生物培养液、例如从放线菌的培养液获得的酶。这样的蛋白酶未经纯化就可使用, 也可根据需要纯化至适当的纯度后再使用。

其他适用的蛋白酶的例子有白灰浅链霉菌 (*Streptomyces albogriseolus*, 以下略作 *S. albogriseolus*) 生成的丝氨酸蛋白酶 SAMP45。而源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶原由于 SAMP45 优先切断序列号 3 的前体结构部分的第 41 位的 Ser 和 42 位的 Phe 之间肽键, 可生成在序列号 5 给出的天然型成熟转谷氨酰胺酶的 N 末端附加了前体结构部分的 C 末端的 Phe-Arg-Ala-Pro 4 个氨基酸结构的蛋白质。本发明人确认这样的蛋白质也具有转谷氨酰胺酶活性。另外 SAMP45 基因序列已经确定, 序列号 39 给出了附加了前体结构的蛋白质 (SAMP45 原) 的氨基酸序列 (J. Bacteriol, 179, 430-438 (1997))。SAMP45 以白灰浅链霉菌的培养液或白灰浅链霉菌菌体的形式作用于转谷氨酰

胺酶原时,可以切除前体结构的一部分,结果可以得到除去大部分前体结构的转谷氨酰胺酶。或者是将导入了前 SAMP45 原基因的棒杆菌与使转谷氨酰胺酶原分泌到菌体外的棒杆菌一起培养,同样可以得到除去大部分前体结构的转谷氨酰胺酶。另外,用同样的方法将 SAMP45 基因导入携有前转谷氨酰胺酶原基因的棒杆菌中,使 SAMP45 与前转谷氨酰胺酶原基因同时分泌到菌体表面或菌体外,可以更有效地通过切去前体结构部分使转谷氨酰胺酶活化。

另外,通过将本发明人发现的茂原链轮丝菌生成的脯氨酸特异性肽酶(svPEP)与 SAMP45 配合使用,也可以除去附加在 N 末端的 Phe-Arg-Ala-Pro 4 个氨基酸,得到与天然型一样的成熟的转谷氨酰胺酶。

该 svPEP 是能够在下述式(1)中↓处特异切断式(1)表示的肽或肽的类似物,即特异切断从 N 末端开始的第 3 或第 4 位脯氨酸羧基侧的肽键的酶。



(式中,Y是由2个或3个氨基酸残基构成的寡肽,Z代表氨基酸、肽、酰胺、或酯)。

更具体地说,该脯氨酸特异性肽酶是具有以下(1)~(8)性质的脯氨酸特异性肽酶。

(1) 可以在↓所示位置、即在脯氨酸的羧基侧切断以下至少一种含有脯氨酸的肽(pNA代表对硝基酰替苯胺)。

Ala-Ala-Pro-↓-pNA、Ala-Phe-Pro-↓-pNA、Phe-Arg-Ala-Pro-↓-pNA(与 Phe-Arg-Ala-Xaa(序列号 68)相同(式中 Xaa 代表 Pro-pNA, pNA 表示对硝基酰替苯胺))

(2) 最适 pH 为 6.0~6.5。

(3) pH4~9 时稳定。

(4) 最适温度为 25~30℃。

(5) 20℃以下时稳定。

(6) 活性可被苯基甲基磺酰氟化物、氨基乙基苯磺酰氟盐酸盐抑制。

(7) 等电点为 10.2。

(8) 分子量大约为 50000。

该 svPEP 可以按以下步骤制备。按照放线菌培养中通常用的方法

培养生成具有 svPEP 活性的肽酶的放线菌，例如放线菌茂原链轮丝菌 IF013819。培养放线菌 IF013819 的培养基用含有通常的碳源、氮源、无机离子等常用的培养基就可以。作为碳源可以使用葡萄糖、淀粉、蔗糖以及其他碳源。作为氮源根据需要可以适当选用蛋白胨、酵母提取液、肉汤、麦芽提取液、铵盐和其他的氮源。培养是在好氧条件下进行的，例如可以将条件控制在 pH5.0 到 8.5、温度从 15℃ 到 37℃ 的合适的范围内。培养时间虽然因温度、pH、培养基不同而不同，但通常为 1~10 天左右，一般来说，在 svPEP 的产率达到最大时停止培养最好。

经上述时间培养后，从培养物回收菌体，轻轻洗涤后，从菌体表面洗脱出含有 svPEP 的组分，通过配合使用 HPLC、FPLC 等通常蛋白质纯化中使用的业内人士熟悉的各种纯化手段进行纯化，可以获得纯化的 svPEP 标准品。从菌体表面洗脱 svPEP 组分，可以通过将菌体在例如 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 等缓冲液中，振荡一定时间、如 1~5 小时左右来洗脱。为了防止酶失活，此时的温度最好控制在 0℃~5℃ 范围内。也可以从培养上清液分离纯化出 svPEP，但此时杂蛋白质较多，因此还是从洗涤的菌体洗脱纯化为好。

另外，确认各个纯化阶段的活性组分可以通过测定各个组分中的酶活性来进行。酶活性的测定可以配合使用适当的底物和反应生成物的检测方法，例如以 Ala-Ala-Pro-pNA、Ala-Phe-Pro-pNA、Phe-Arg-Ala-Pro-pNA 为底物进行酶反应，通过算出游离的 pNA (对硝基酰替苯胺) 量，对活性进行定量测定。

根据需要，可以使用反相色谱等将上述纯化的 svPEP 进一步纯化，测定其部分氨基酸序列，通过设计合适的探针可以得到编码 svPEP 的基因。这样的操作过程业内人士是很熟悉的，例如可参照 Molecular Cloning 2nd edition [J.Sambrook E.F.Fritsch and T.Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31 (1989)]。序列号 41 和 42 分别给出了上述得到的 svPEP 的基因的碱基序列和它所编码的整个氨基酸序列，序列号 40 给出了 svPEP 成熟蛋白质的氨基酸序列。

使 SvPEP 以茂原链轮丝菌的培养液或茂原链轮丝菌菌体的形式与蛋白酶一起作用于转谷氨酰胺酶原时，可以完全除去前体结构部分，

结果可以得到前体结构部分完全切除的成熟型的转谷氨酰胺酶。或者是通过将导入了前 svPEP 原基因和蛋白酶基因的棒杆菌与将转谷氨酰胺酶原分泌到菌体外的棒杆菌共同培养,同样可以得到前体结构部分完全切除的成熟型的转谷氨酰胺酶。另外,通过在导入了前转谷氨酰胺酶原基因的棒杆菌中按照同样方法再导入 SAMP45 基因和 svPEP 基因两者,使得 svPEP 和转谷氨酰胺酶原以及 SAMP45 同时分泌到菌体表面或菌体外,可以有效地生成具有与天然结构一样的成熟型的转谷氨酰胺酶。

将本发明使用的基因重组体导入棒杆菌的方法没有特别限定,可以利用通常使用的方法,例如原生质体法 (Gene, 39, 281-286 (1985))、电穿孔法 (Bio/Technology, 7, 1067-1070 (1989)) 等方法。得到的导入了基因的转化体按照通常使用的方法和条件进行培养。例如,转化体可以用含有碳源、氮源和无机离子的常用的培养基进行培养。为了要获得高增殖,也可以根据需要添加维生素、氨基酸等有机微量营养素。

作为碳源可以使用象葡萄糖和蔗糖那样的碳水化合物,醋酸那样的有机酸、醇类以及其他碳源。作为氮源可以使用氨气、氨水、铵盐和其他氮源。作为无机离子根据需要可以适当使用钙离子、镁离子、磷酸根离子、钾离子、铁离子等。培养在 pH5.0~8.5、15℃~37℃ 等合适的范围内通氧条件下进行。培养 1~7 天左右。通过在这样的条件下培养转化体,目的蛋白质在菌体内大量生成并被有效地分泌到菌体外。就转谷氨酰胺酶来说,已知如果在微生物菌体内大量蓄积一般都会导致菌体死亡,但如果利用本发明,由于生成的转谷氨酰胺酶都释放到菌体外,菌体不会受到致死的影响,所以可以连续地生产转谷氨酰胺酶。

利用本发明分泌到培养基的蛋白质按照同行都熟悉的方法可以从培养后的培养基中分离纯化。例如,通过离心分离除去菌体后,再通过盐析、乙醇沉淀、超滤、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析、中高压液相层析,反相层析、疏水层析等已知的合适的方法、或配合使用进行分离纯化。利用本发明分泌到菌体表面的蛋白质也可使用同行都熟悉的方法,例如提高盐浓度、使用表面活性剂等使其溶解后,象分泌到培养基中的蛋白质那样进行分离纯化。有时分泌到菌体表面

的蛋白质不进行可溶化, 例如作为固定化酶使用。

结合以下实施例, 对本发明进一步进行具体说明, 但本发明并不限定于这些实施例。

实施例 1: 源自茂原链轮丝菌 IF013819 的前转谷氨酰胺酶原在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中的表达

(1) 源自茂原链轮丝菌 IF013819 的前转谷氨酰胺酶原基因的获得

源自茂原链轮丝菌 DSMZ 菌株的转谷氨酰胺酶基因的序列已经被确定 [Eur. J. Biochem., 257, 570-576 (1998)]。参考该序列, 合成如序列号 8 和 9 所示的引物, 利用 PCR 法从按照常规方法 (斋藤、三浦的方法 [Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)]) 制备的茂原链轮丝菌 IF013819 的染色体 DNA 中扩增编码成熟转谷氨酰胺酶序列的区域。在 PCR 反应中使用 Pyrobest DNA polymerase (宝酒造公司制), 反应条件参照厂家推荐的方案。

(序列号 8) 5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCC-3'

(序列号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

〈序列表说明〉

序列号 8、9: PCR 引物

然后对扩增的大约 1.0kb 的 DNA 片段用 Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (宝酒造公司制) 和 [α - ^{32} P]dCTP, 按照说明书附带的方案进行反应, 制备 DNA 探针。使用制备的探针和茂原链轮丝菌 IF013819 染色体 DNA, 按照 Molecular Cloning 2nd edition [J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9. 31 (1989)] 所述的方法进行 Southern blot 杂交, 便可确认在用限制酶 Sac I 酶切出的大约 4kb 的片段中存在着转谷氨酰胺酶基因。使用 EASYTRAP Ver.2 (宝酒造公司制) 通过琼脂糖凝胶电泳回收用 Sac I 切茂原链轮丝菌 IF013819 的染色体 DNA 得到的大约 4kb 的片段, 并插入 pUC18 (宝酒造公司制) 的 Sac I 位点后, 导入大肠杆菌 JM109 (宝酒造公司制) 的感受态细胞, 构建文库。

使用先前制备的转谷氨酰胺酶的 DNA 探针按照 Molecular Cloning 2nd edition [J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, pl.90 (1989)]所述的菌落杂交方法进行文库的筛选,获得含有转谷氨酰胺酶基因片段被克隆的质粒的菌株,从该菌株回收质粒,取名为 pUITG。测定克隆于 pUITG 的片段的碱基序列,可以确认茂原链轮丝菌 IF013819 转谷氨酰胺酶基因与茂原链轮丝菌 DSMZ 株的转谷氨酰胺酶基因具有同样的碱基序列。

碱基序列测定的结果表明,该 Sac I 的大约 4kb 的片段是缺了一部分信号序列(前导部分)的不完全的 DNA 片段。于是进行了启动子区和完整的信号序列区的克隆的尝试。克隆是利用 TAKARA LA PCR in vitro Cloning Kit(宝酒造公司制)和序列号 10 和 11 所示的引物,按照说明书附带的方案实施的。

(序列号 10) 5'-GTGACCCTGTCGTCGGAGTC-3'

(序列号 11) 5'-GGCATCCTGTCGAGCGGCTC-3'

〈序列表说明〉

序列号 10、11: 用于克隆茂原链轮丝菌的启动子区和信号序列的 PCR 引物。

结果表明,使用 Sal I 的试剂盒引物时得到大约 800bp 的 PCR 扩增片段,测定该片段的碱基序列,可确认该片段是含有转谷氨酰胺酶基因的启动子区和信号序列区的片段。通过将这个大约 800bp 的 PCR 扩增片段插入到特开平 9-070291 所述的 pVC7 的 SmaI 位点,得到 pVITGS5。然后通过用 Sal I 消化 pUITG,通过琼脂糖凝胶电泳回收含有转谷氨酰胺酶基因的约 4kb 片段,再将该片段插入 pVITGS5 的 Sac I 位点,构建含有全长的转谷氨酰胺酶基因的质粒 pVITGC。另外碱基序列的测定使用 Dye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems 公司制)和 DNA 测序仪(PE Applied Biosystems 公司制)。序列号 12 给出了前转谷氨酰胺酶原基因的序列,而 N 末端的 31 个氨基酸序列被认为是信号序列(前导部分)。前转谷氨酰胺酶原的氨基酸序列如序列号 13 所示。

(2) 转谷氨酰胺酶基因启动子区的转换

谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白 PS2 基因序列已经确定 [Mol.Microbiol., 9, 97-109 (1993)]。参考该序列合成序列号 14 和

序列号 15 所示的引物, 通过 PCR 法从常规方法制备的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 染色体 DNA 中扩增含有 PS2 蛋白质基因的起始密码 5'-上游区的启动子的区域。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 15) 5'-GAGCTCTCCGGCGTATGCGCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATA-3'

〈序列表说明〉

序列号 14、15: PCR 引物

以实施例 1 (1) 中测定的转谷氨酰胺酶基因序列为基础, 合成序列号 16 和 9 所示的引物, 利用 PCR 法从实施例 1 (1) 中得到的 pUITG 扩增前转谷氨酰胺酶原基因区。

(序列号 16) 5'-ATGCGCATACGCCGGAGAGCTCTCGTCTTC-3'

〈序列表说明〉

序列号 16: PCR 引物

接下来, 将扩增的含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 PS2 基因的启动子的区域与已扩增的转谷氨酰胺酶基因区的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板, 使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 (cross over) PCR, 扩增与含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白基因启动子的区域相连的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因。通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.8kb 的扩增片段。使用 EASYTRAP Ver. (宝酒造公司制) 从琼脂糖凝胶中回收该片段, 插入到特开平 9-070291 所述的 pVC7 的 SmaI 位点, 得到 pVKPTG0。按照上述方法测定插入片段的碱基序列, 确认构建了象预想那样的融合基因。

(3) 前转谷氨酰胺酶原基因在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中的表达

用实施例 1 (1) 构建的 pVITGC (启动子和前转谷氨酰胺酶原基因都源自茂原链轮丝菌) 或实施例 1 (2) 构建的 pVKPTG0 (启动子源自谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 基因, 前转谷氨酰胺酶原基因源自茂原链轮丝菌) 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 筛选在含有 5mg/l 的氯霉素的 CM2S 琼脂培养基 (将 10g 酵母提取物、10g 蛋白胨、5g 蔗糖、5g NaCl、15g 琼脂用水配成 1 升溶液) 中生长的菌株。然后将筛选出的携带 pVITGC 或 pVKPTG0 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/l 的氯霉素的 MM 液体培养基 (将葡萄糖 30g、硫酸镁 7 水合物 0.4g、硫

酸铵 30g、磷酸二氢钾 1g、硫酸铁 7 水合物 0.01g、硫酸锰 5 水合物 0.01g、硫胺素盐酸盐 200 μ g、生物素 500 μ g、DL-蛋氨酸 0.15g、碳酸钙 50g 用水配成 1L 溶液, pH 调节为 7.5) 分别于 30℃ 条件下培养 48 小时。培养结束后, 取上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE, 然后用 Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) 所述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法 (例如, J. Sambrook 等人 (1989) 所述的通常步骤) 进行 Western blot。

结果没有检测出转谷氨酰胺酶的分泌。从以上结果可以确认茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的信号序列在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中没有起作用。

实施例 2: 利用编码谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum* ATCC13869) 的细胞表面蛋白质的信号肽和源自茂原链轮丝菌 IF013819 的成熟转谷氨酰胺酶的融合基因进行转谷氨酰胺酶的分泌生产

(1) 具有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白质信号序列的转谷氨酰胺酶基因的构建

谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白 PS2 的基因序列已经确定了 [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)]。参考该序列合成序列号 14 和序列号 17 所示的引物, 利用 PCR 法从实施例 1 (2) 方法制备的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的染色体 DNA 中扩增含有编码相当于 PS2 蛋白质基因的 N 末端一侧的 44 氨基酸残基 (信号肽 30 个氨基酸残基和成熟细胞表面蛋白质的 14 个氨基酸残基) 区和启动子区的 5'-上游区。为了构建与转谷氨酰胺酶融合基因, 序列号 17 给出的引物含有编码成熟转谷氨酰胺酶的 N 末端一侧的氨基酸序列的碱基序列。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 17) 5'-GGGGTGACCCTGTCGTCGGAGTCGTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3'

<序列表说明>

序列号 17: PCR 引物

以实施例 1 (1) 中测定的转谷氨酰胺酶基因序列为基础, 合成序列号 8 和 9 所示的引物, 利用 PCR 法从实施例 1 (1) 中得到的 pUITG 扩增成熟的转谷氨酰胺酶基因区。

接下来, 将扩增的含有编码相当于谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的

PS2 蛋白质 N 末端一侧的 44 个氨基酸残基的区域和启动子区的 5'-上游区的 PCR 反应液 1 μ l 与已扩增的成熟的转谷氨酰胺酶基因区的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板, 使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 PCR, 扩增含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白基因的启动子区的 5'-上游区和编码 N 末端一侧 44 个氨基酸残基的区域相连的成熟转谷氨酰胺酶的融合基因。

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.7kb 的扩增片段。使用 EASYTRAP Ver. 2 (宝酒造公司制) 从琼脂糖凝胶中回收该片段, 插入到特开平 9-070291 所述的 pVC7 的 SmaI 位点, 得到 pVKTG3。按照上述方法测定插入片段的碱基序列, 确认构建了象预想那样的融合基因。

通过用 KpnI 和 XbaI 消化 pVKTG3, 切出大约 1.7kb 的含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白基因的启动子区的 5'-上游区和编码 N 末端一侧 44 氨基酸残基的区域相连的成熟转谷氨酰胺酶的融合基因, 通过琼脂糖凝胶电泳回收, 然后将该片段插入到特开平 9-322774 所述的 pPK4 的 KpnI-XbaI 位点, 构建 pPKTG3。

(2) 利用谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白质的信号序列进行成熟转谷氨酰胺酶的分泌

用构建的质粒 pVKTG3 或 pPKTG3 (两者中由启动子和信号肽以及 N 末端 14 个氨基酸残基构成的基因都源自谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 成熟转谷氨酰胺酶基因源自茂原链轮丝菌) 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 筛选在含有 5mg/l 的氯霉素或 25mg/l 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVKTG3 或 pPKTG3 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/l 的氯霉素或 25mg/l 的卡那霉素的上述 MM 液体培养基于 30℃ 培养 48 小时。培养结束后, 取上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE, 然后用 Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) 所述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法进行 Western blot。结果在两种菌株的培养上清中能够检测出少量的具有与成熟转谷氨酰胺酶大致相同分子量的分泌的转谷氨酰胺酶。

实施例 3: 利用与谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白质的信号肽相连的源自茂原链轮丝菌 IF013819 的转谷氨酰胺酶原的融合基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原基因) 进行转谷氨酰胺酶的分泌生产

(1) 具有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白质信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原基因) 的构建

参考谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白 PS2 的基因序列 [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)], 合成序列号 18、序列号 19、序列号 20 以及序列号 21 所示的引物。使用序列号 14 和序列号 18、或序列号 14 和序列号 19、或序列号 14 与序列号 20、或者序列号 14 与序列号 21 的组合通过 PCR 法从实施例 1(2) 方法制备的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的染色体 DNA 中扩增出分别编码相当于 PS2 蛋白质的 N 末端一侧的 30 个、31 个、44 个以及 68 个氨基酸残基的编码区域 (含有信号肽 30 个氨基酸残基) 和含有启动子的 5'-上游区。

为了构建与带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因, 序列号 18、19、20 和 21 给出的引物含有编码转谷氨酰胺酶的 N 末端一侧的氨基酸序列的碱基序列。

(序列号 18) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCAGCGAATGCTGGGATAGCAACGCC-3

(序列号 19) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCCTGAGCGAATGCTGGGATAGCTAC-3

(序列号 20) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCGTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3

(序列号 21) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCAGTCAGGTCGCGGAGGGTTTCCTC-3

〈序列表说明〉

序列号 18~21: PCR 引物

以实施例 1(1) 中测定的转谷氨酰胺酶基因序列为基础, 合成序列号 22 和 9 所示的引物, 利用 PCR 法从实施例 1(1) 中得到的 pUITG 中扩增转谷氨酰胺酶原基因区。

(序列号 22) 5'-GACAATGGCGCGGGGAAGAGACGAAGTCC-3'

〈序列表说明〉

序列号 22: PCR 引物

接下来,将扩增的含有相当于谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 蛋白质基因的启动子区的 5'-上游区和编码 N 末端一侧的 30 个、31 个、44 个以及 68 个氨基酸残基的碱基序列的 PCR 反应液各 1 μ l,与已扩增的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因区的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板,使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 PCR,分别扩增含有相当于谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 蛋白质基因的启动子区的 5'-上游区和编码 N 末端一侧的 30 个、31 个、44 个以及 68 个氨基酸残基的各个碱基序列区相连的转谷氨酰胺酶原的融合基因,即与谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 表面蛋白质基因的启动子结合的外源融合前转谷氨酰胺酶原基因片段。

通过琼脂糖凝胶电泳分别检测出从大约 1.8kb 到 1.9kb 的扩增片段。使用 EASYTRAP Ver. 2 (宝酒造公司制)从琼脂糖凝胶中回收这些片段,插入到特开平 9-070291 所述的 pVC7 的 SmaI 位点,分别得到 pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3 和 pVKPTG4。按照上述方法测定插入片段的碱基序列,确认构建了象预想那样的融合基因。

通过用 KpnI 和 XbaI 消化 pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3 和 pVKPTG4,切出从大约 1.8kb 到 1.9kb 的含有相当于谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白基因的启动子区的 5'-上游区和编码 N 末端一侧的 30 个、31 个、44 个以及 68 个氨基酸残基的各个序列区相连的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因,通过琼脂糖凝胶电泳回收,然后将该片段插入到特开平 9-322774 所述的 pPK4 的 KpnI - XbaI 位点,构建 pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3 和 pPKPTG4。

(2) 利用谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白质的信号序列分泌转谷氨酰胺酶原

用构建的质粒 pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3 或 pPKPTG4 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869,筛选在含有 5mg/1 的氯霉素或 25mg/1 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3 和 pPKPTG4 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/1 的氯霉素或 25mg/1 的卡那霉素的上述 MM 液体培养基于 30℃ 分别培养 48 小时。培养结束后,取上清液 10 μ l 进行 SDS - PAGE,然后用 Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87

(1994)所述的抗转谷氨酰胺酶抗体,按照常规方法进行 Western blot。结果可以确认无论 pVC7, 还是 pPK4 载体都有大致等量的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的分泌,但相当于 PS2 蛋白质的成熟蛋白质的 N 末端一侧氨基酸残基的长度不同,可看出相应的分泌量存在明显的差别。表 1 给出了有代表性的分泌量。

表 1. 利用谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白质的信号序列获得的转谷氨酰胺酶原的分泌生产量

质粒	转谷氨酰胺酶原 (mg/L)
pPKPTG1	78
pPKPTG4	210

(3) 通过分散酶消化来切断转谷氨酰胺酶原和检测活性

向携有 pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3 和 pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3 或 pPKPTG4 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 培养上清加入作为蛋白酶的分散酶 (Boeringer Mannheim 公司制),添加的比例为底物:酶 = 1:1, 于 pH7.5、37℃下反应 1 小时。分散酶消化反应后,通过 SDS - PAGE 确认转谷氨酰胺酶原被切情况,再经羟肟酸酯 (hydroxamate) 法 [J. Biol. chem., 241, 5518-5525 (1966)] 确认转谷氨酰胺酶活性,可确认具有大致与天然型一样的比活性 (约 20U/mg)。

实施例 4: 利用具有产氨棒杆菌 (C. ammoniagenes) 的细胞表面蛋白质的信号肽编码序列和源自茂原链轮丝菌 IF013819 的转谷氨酰胺酶编码序列的融合基因进行转谷氨酰胺酶原的分泌生产

(1) 具有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原) 的构建

参考产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 (S1pA) 的基因序列 [特开平 10 - 108675], 合成序列号 23 和序列号 24 所示的引物, 利用 PCR 法从常规方法制备的产氨棒杆菌的染色体 DNA 中扩增含有相当于细胞表面蛋白 (S1pA) 基因的启动子区的 5'-上游区和编码 N 末端一侧的 25 个氨基酸残基 (信号肽) 的区域。为了构建与转谷氨酰胺酶的融合基因,

序列号 24 给出的引物含有编码转谷氨酰胺酶原的 N 末端一侧的氨基酸序列的碱基序列。

(序列号 23) 5'-GCCCAGAAGCCCAAAATTGAGATTT-3'

(序列号 24) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCAGC-3

〈序列表说明〉

序列号 23、24: PCR 引物

接下来, 将扩增的含有相当于产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) 基因的启动子区的 5'-上游区与编码 N 末端一侧的 25 个氨基酸残基的区域的 PCR 反应液 1 μ l, 与在实施例 3 (1) 中扩增的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因区的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板, 使用序列号 23 和序列号 9 进行交叉 PCR, 扩增含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 (S1pA) 基因的启动子区的 5'-上游区和编码 N 末端一侧 25 氨基酸残基的区域相连的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原)。

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.7kb 的扩增片段。使用 EASYTRAP Ver. 2 (宝酒造公司制) 从琼脂糖凝胶中回收该片段, 插入到 pVC7 的 SmaI 位点, 得到 pVSPTG1。

(2) 启动子区域的转换; 与谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的细胞表面蛋白质基因的启动子的结合

参考谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白 PS2 的基因序列 [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)], 合成序列号 14、序列号 25 所示的引物。通过 PCR 法从实施例 1 (2) 制备的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的染色体 DNA 中扩增含有相当于 PS2 蛋白质基因的启动子区的 5'-上游区。为了构建与具有产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) 基因的信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因的融合基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原基因), 序列号 25 给出的引物含有编码产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列的 N 末端一侧的氨基酸序列的碱基序列。

(序列号 25) 5'-CGCAGCCAGCGATTTTCATGCGTTTCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATAGGT-3

〈序列表说明〉

序列号 25: PCR 引物

另外,以具有产氨棒杆菌细胞表面蛋白(S1pA)的信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因的融合基因序列为基础,合成序列号 26 和 9 所示的引物,利用 PCR 法从实施例 4(1)中得到的 pVSPTG1 中扩增具有产氨棒杆菌细胞表面蛋白(S1pA)的信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的基因区。

(序列号 26) 5'-ATGAAACGCATGAAATCGCTGGCTGCGGCG-3'

〈序列表说明〉

序列号 26: PCR 引物

接下来,将扩增的含有相当于谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 蛋白质基因的启动子区的 5'-上游区的 PCR 反应液 1 μ l,与已扩增的具有产氨棒杆菌细胞表面蛋白(S1pA)的信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的基因(外源融合前转谷氨酰胺酶原基因)区的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板,使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 PCR,扩增具有含有相当于谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 蛋白质基因的启动子区的 5'-上游区的、带有与编码产氨棒杆菌细胞表面蛋白(S1pA) N 末端一侧 25 个氨基酸残基的区域相连的前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因。

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.8kb 的扩增片段。使用 EASYTRAP Ver. 2(宝酒造公司制)从琼脂糖凝胶中回收该片段,插入到特开平 9-070291 所述的 pVC7 的 SmaI 位点,得到 pVKSPTG1。按照上述方法测定插入片段的碱基序列,确认构建了象预想那样的融合基因。

另外,通过用 KpnI 和 XbaI 消化 pVKSPTG1,切出大约 1.8kb 的具有含有相当于谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 细胞表面蛋白基因的启动子区的 5'-上游区的、带有与编码产氨棒杆菌细胞表面蛋白(S1pA) N 末端一侧 25 个氨基酸残基(信号肽)区域相连的前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因(外源融合前转谷氨酰胺酶原基因),通过琼

脂糖凝胶电泳回收。然后通过将该片段插入到特开平 9-322774 所述的 pPK4 的 KpnI-XbaI 位点, 构建 pPKSPTG1。质粒 pVKSPTG1 和 pPKSPTG1 都是由源自谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 基因的启动子、源自产氨棒杆菌的 S1pA 的信号肽和源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶原基因构成的。

(3) 转换为 E.coli 的 tac 启动子

参考 E.coli 的 tac 启动子被克隆的质粒 pKK223-3 (Amersham Pharmacia 公司制) 的序列, 合成序列号 27 和 28 所示的引物。通过 PCR 法从 pKK223-3 的 DNA 扩增相当于 tac 启动子的区域。为了构建具有产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶基因的融合基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原基因), 序列号 28 给出的引物含有编码产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列的 N 末端一侧的氨基酸序列的碱基序列。

(序列号 27) 5'-GGATCCGGAGCTTATCGACTGCACG-3'

(序列号 28) 5'-CGCAGCCAGCGATTTTCATGCGTTTCATAATTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT-3'

〈序列表说明〉

序列号 27、28: PCR 引物

接下来, 将扩增的相当于 tac 启动子区的 PCR 反应液 1 μ l, 和在实施例 4 (2) 扩增的具有产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的基因区的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板, 使用序列号 27 和序列号 9 进行交叉 PCR, 扩增具有 tac 启动子的、带有与编码产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) N 末端一侧的 25 个氨基酸残基的区域相连的前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原基因)。通过琼脂糖凝胶电泳分别检测出大约 1.5kb 的扩增片段。使用 EASYTRAP Ver. 2 (宝酒造公司制) 从琼脂糖凝胶中回收该片段, 插入到特开平 9-070291 所述的 pVC7 的 SmaI 位点, 得到 pVTSPTG1。按照上述方法测定插入片段的碱基序列, 确认构建了象预想那样的融合基因。

另外, 通过用 KpnI 和 XbaI 消化 pVTSPTG1, 切出大约 1.5kb 的具

有 tac 启动子的、带有与编码产氨棒杆菌细胞表面蛋白 (S1pA) N 末端一侧 25 个氨基酸残基的区域相连的前体结构部分的转谷氨酰胺酶的融合基因, 通过琼脂糖凝胶电泳回收。然后将该片段插入到特开平 9-322774 所述的 pPK4 的 KpnI-XbaI 位点, 构建 pPTSPTG1。质粒 pVTSPTG1 和 pPKSPTG1 都是由源自于 *E. coli* 的 tac 启动子, 源自于产氨棒杆菌的 S1pA 的信号肽, 源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶原基因构成的。

(4) 利用产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列分泌转谷氨酰胺酶原

用构建的质粒 pVKSPTG1、pVTSPTG1、pPKSPTG1 和 pPTSPTG1 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 筛选在含有 5mg/1 的氯霉素或 25mg/1 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVKSPTG1、pVTSPTG1、pPKSPTG1 和 pPTSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/1 的氯霉素或 25mg/1 的卡那霉素的上述 MM 液体培养基于 30℃ 下分别培养 48 小时。培养结束后, 取上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE, 然后用 Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) 所述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法进行 Western blot。结果无论 pVC7, 还是 pPK4 载体都可以确认有大致等量的转谷氨酰胺酶的分泌。表 2 给出了有代表性的分泌量。

表 2. 利用产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列获得的转谷氨酰胺酶原的分泌生产量

质粒	转谷氨酰胺酶原 (mg/L)
pPKSPTG1	102
pPTSPTG1	74

(5) 通过分散酶消化来切断转谷氨酰胺酶原和检测活性

向携有 pVKSPTG1、pVTSPTG1、pPKSPTG1 和 pPTSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 培养上清加入作为蛋白酶的分散酶 (Boeringer Mannheim 公司制), 添加的比例为底物: 酶 = 1:1, 于 pH7.5、37℃ 下反应 1 小时。分散酶消化反应后, 通过 SDS-PAGE 确认转谷氨酰胺酶原

被切情况，再经肟肟酸酯（hydroxamate）法确认转谷氨酰胺酶活性，可确认具有大致与天然型一样的比活性（约 20U/mg）。

实施例 5: 通过茂原链轮丝菌的培养液和菌体切断转谷氨酰胺酶原和检测活性

（1）通过茂原链轮丝菌 IF013819 株的培养液切断转谷氨酰胺酶原和检测活性

茂原链轮丝菌 IF013819 菌株用 ISP2 液体培养基（将酵母提取物 4g、麦芽提取物 10g、葡萄糖 4g 用水配成 1L 溶液，pH 调节为 7.3）于 30℃ 下培养 24 小时。向 10ml 该培养液中添加在实施例 4（5）中也应用过的蓄积了转谷氨酰胺酶原的携有 pVKSPGT1、pVTSPTG1、pPKSPGT1 或 pPTSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的经膜过滤器过滤的培养上清 10ml，于 30℃ 下保持 6 小时。然后进行 SDS-PAGE，确认带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶被切情况，再经肟肟酸酯法确认具有与天然型大致一样的比活性（约 20U/mg）的转谷氨酰胺酶活性。另外，在 SDS-PAGE 后，经半干转移将蛋白从胶上转移到聚偏（二）氟乙烯（Polyvinylidene-defluoride, PVDF）膜上（用于基因克隆的蛋白质结构解析，东京化学同人（1993））。蛋白转移后，可以用考马斯亮蓝对膜进行染色、脱色、风干。将成熟转谷氨酰胺酶的部分切下来，使用蛋白质序列仪（Model 476A, Perkin Elmer Co.Ltd 制）解析 N 末端氨基酸序列。解析结果可以确认具有与序列号 5 所示的天然型成熟转谷氨酰胺酶一样的 N 末端氨基酸序列。

（2）通过茂原链轮丝菌 IF013819 株的菌体切断带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶和检测活性

茂原链轮丝菌 IF013819 菌株用 ISP2 液体培养基于 30℃ 下培养 24 小时。将 10ml 该培养液经离心分离收集菌体，用生理盐水洗 2 次。将最后收集的菌体悬浮于 10ml 的生理盐水中，然后添加在实施例 4（5）中也应用过的蓄积了转谷氨酰胺酶原的携有 pVKSPGT1、pVTSPTG1、pPKSPGT1 或 pPTSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的经膜过滤器过滤的培养上清 10ml，于 30℃ 下保持 6 小时。然后进行 SDS-PAGE，确认带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶被切情况，再经肟肟酸酯法确认具有与天然型大致一样比活性（约 20U/mg）的转谷氨酰胺酶

活性。另外，在 SDS-PAGE 后，经半干转移将蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上（用于基因克隆的蛋白质结构解析，东京化学同人（1993））。蛋白转移后，可以用考马斯亮蓝对 PVDF 膜进行染色、脱色、风干。将成熟转谷氨酰胺酶的部分切下来，使用蛋白质序列仪解析 N 末端氨基酸序列。解析结果可以确认具有与序列号 5 所示的天然型成熟转谷氨酰胺酶一样的 N 末端氨基酸序列。

实施例 6：利用具有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列、以及源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶的编码序列的融合基因进行转谷氨酰胺酶原的分泌生产

（1）具有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列、以及源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶的编码序列的融合基因的构建

肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶基因序列已经确定（特原平 11-295649）。人们推定第 1 位到第 32 位的氨基酸序列为酶的前导（pre）部分的序列，而 33 到 86 位的氨基酸序列为前体（pro）部分的序列，而 87 到 416 位的氨基酸序列为成熟型转谷氨酰胺酶的序列。推定的前体结构和成熟蛋白质的氨基酸序列分别如序列号 4 和 43 所示。而用含有该基因的质粒 pUJ-MTG 转化的大肠杆菌 AJ13669 于 1999 年 10 月 14 日以 FERM P-17602 寄存于通商产业省工业技术院生命工程工业技术研究所（日本国〒305-8566 茨城县筑波市东 1 丁目 1-3），根据布达佩斯条约于 2000 年 8 月 28 日进行移交，寄存号为 FERM BP-7287。

首先用限制酶 BamHI 从 pUJ-MTG 中切出覆盖前转谷氨酰胺酶原基因的全长的约 3.5kb 片段的区域，然后将它插入 pUC19 的 BamHI 位点，制作 pUCSCTG。

以 pUCSCTG 为模板，合成序列号 44 和序列号 45 所示的引物，通过同样的 PCR 法使含有源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶原的基因区域扩增。

（序列号 44） 5'-GGC GAT GGG GAA GAG AAG GGG-3'

（序列号 45） 5'-GGC GGA TCC TCG CGT CGA GAG GCG TGG ACT GA-3'

〈序列表说明〉

序列号 44、45：PCR 引物

接下来,以实施例4(2)构建的 pPKSPTG1 为模板,通过序列号 46 和序列号 47 组合,利用 PCR 法使含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区域的 5'-上游区和含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质 S1pA 的信号序列的区域扩增。

为了构建与源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶的融合基因,序列号 47 给出的引物含有编码源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶原的 N 末端一侧的氨基酸的碱基序列。

(序列号 46) 5'-TAC GAA TTC GAG CTC GGT ACC-3'

(序列号 47) 5'-CCC CTT CTC TTC CCC ATC GCC TGC CGT TGC CAC AGG TGC GG C C-3'

〈序列表说明〉

序列号 46、47: PCR 引物

接下来,将扩增的编码含有源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶原的基因区域的 PCR 反应液 1 μ l,与扩增的含有 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和含有产氨棒杆菌细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列的区域的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板,使用序列号 46 和序列号 45 进行交叉 PCR,使含有 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和产氨棒杆菌细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列相连的外源融合前转谷氨酰胺酶原基因片段扩增。

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.8kb 的扩增片段。该片段用 EcoRI 和 BamHI 消化后,从琼脂糖凝胶中回收该片段,插入到 pUC19 的 EcoRI - BamHI 位点,得到 pUKSPTG2'。按照上述方法测定插入片段的碱基序列,确认构建了象预想那样的融合基因。用 EcoRI 消化该 pUKSPTG2',使用 Blunting kit (宝酒造公司制) 进行平端化,插入带有 5'-末端磷酸化的 5'-CTCTAGAG-3' 序列的 XbaI 接头 (宝酒造公司制),再环化构建 pUKSPTG2。通过用 XbaI 消化 pUKSPTG2,切出大约 1.8kb 的融合前转谷氨酰胺酶原基因(转谷氨酰胺酶原基因源自肉桂链轮丝菌 IF012852),通过琼脂糖凝胶电泳回收。然后通过将该片段插入到上述 pPK4 的 XbaI 位点,构建 pPKSPTG2。

然后构建带有前体结构部分的 N 末端的一部分被茂原链轮丝菌的前体结构部分替换的嵌合前体结构部分的前转谷氨酰胺酶原基因(成熟型转谷氨酰胺酶基因和前体结构部分的一部分源自肉桂链轮丝菌

IF012852)。

首先从实施例4(2)构建的质粒 pPKSPTG1 (用于表达茂原链轮丝菌 IF013819 的转谷氨酰胺酶原)切出 EcoRI-BamHI 的含有大约 1.8kb 的前转谷氨酰胺酶原基因的片段,然后插入到 pUC19 的 EcoRI-BamHI 位点(pUKSPTG1)。pUKSPTG1 用 AatII 消化,切出大约 1.2kb 的片段,同时 pUKSPTG2'也用 AatII 消化,制备除去大约 1.2kb 片段后的约 3.3kb 片段。将该约 3.3kb 片段与源自 pUKSPTG1 的约 1.2kb 片段连接,按照常规的基因操作法筛选插入了 AatII 片段的克隆。为了了解其中 AatII 片段插入的方向,依次进行测序,筛选按目的方向(编码前转谷氨酰胺酶原)插入的克隆(pUKSPTG3')。而对 pUKSPTG3'也要象对 pUKSPTG2'操作那样使其 EcoRI 位点平端化,插入 XbaI 接头,构建 pUKSPTG3。通过从 pUKSPTG3 切出 XbaI 的大约 1.8kb 片段,插入到 pPK4 的 XbaI 位点,构建 pPKSPTG3。

(2) 利用产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列分泌源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶原

用构建的质粒 pPKSPTG2 和 pPKSPTG3 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869,筛选在上述含有 25mg/l 的卡那霉素的 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pPKSPTG2 和 pPKSPTG3 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 分别用含有 25mg/l 的卡那霉素的 MMTG 液体培养基(将葡萄糖 60g、硫酸镁 7 水合物 0.4g、硫酸铵 30g、磷酸二氢钾 1g、硫酸铁 7 水合物 0.01g、硫酸锰 5 水合物 0.01g、硫胺素盐酸盐 450 μ g、生物素 450 μ g、DL-蛋氨酸 0.15g、碳酸钙 50g 用水配成 1L 溶液, pH 调节为 7.5)分别于 30℃ 条件下培养 3 天。培养结束后,取上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE,然后用上述抗转谷氨酰胺酶抗体,按照常规方法进行 Western blot 解析。该抗体虽然是抗源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的抗体,但对源自肉桂链轮丝菌的转谷氨酰胺酶也有反应性。结果可以确认,分泌了约 30~50mg/L 的带有前体结构部分的源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶。

实施例 7: 通过将源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶原的前体结构部分替换为源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的前体结构部分(制作杂化体)进

行转谷氨酰胺酶原的分泌生产

合成序列号 14 和序列号 48 所示的引物, 利用 PCR 法分别从 pPKSPTG2 或 pPKSPTG3 扩增含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和编码产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列以及源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶的前体结构部分序列的区域的碱基序列。

为了构建含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和具有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列、以及源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶的前体结构部分的成熟转谷氨酰胺酶基因 (源自茂原链轮丝菌 IF013819) 的融合基因 (外源融合前转谷氨酰胺酶原), 序列号 48 给出的引物含有编码源自茂原链轮丝菌 IF013819 的成熟转谷氨酰胺酶的 N 末端一侧氨基酸的碱基序列。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTAG-3'

(序列号 48) 5'-GGG GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG GGG GCC CGG GAG GGC GC
G CTG G-3'

<序列表说明>

序列号 48: PCR 引物

另外, 以实施例 1 (1) 测定的源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶基因序列为基础, 合成序列号 8 和序列号 9 所示的引物, 利用 PCR 法从实施例 1 (1) 中得到的 pUITG 扩增源自茂原链轮丝菌的成熟转谷氨酰胺酶基因区域。

(序列号 8) 5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCC-3'

(序列号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

<序列表说明>

序列号 8、9: PCR 引物

接下来, 将分别扩增的含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和编码产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列以及源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶的前体结

构部分序列的区域的 PCR 反应液 $1\mu\text{l}$ ，与已扩增的源自茂原链轮丝菌的成熟转谷氨酰胺酶基因编码区域的 PCR 反应液 $1\mu\text{l}$ 混合作为模板，使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 PCR，使含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和具有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 (S1pA) 的信号序列以及源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的转谷氨酰胺酶原的前体结构部分的成熟转谷氨酰胺酶基因 (源自茂原链轮丝菌 IF013819) 的融合基因片段扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.8kb 的扩增片段。使用 ScaI 和 Eco065I 消化该扩增片段，从琼脂糖凝胶中回收生成的约 800bp 的片段，通过与从实施例 4 (2) 构建的 pPKSPTG1 用 ScaI 和 Eco065I 切出的片段替换来构建 pPKSPTG4 和 pPKSPTG5。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

(2) 利用产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列和源自肉桂链轮丝菌 IF012852 的前体结构部分分泌源自茂原链轮丝菌 IF013819 的转谷氨酰胺酶

用构建的质粒 pPKSPTG4 和 pPKSPTG5 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869，筛选在上述含有 25mg/1 的卡那霉素的 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pPKSPTG4 和 pPKSPTG5 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 分别用含有 25mg/1 的卡那霉素的 MMTG 液体培养基于 30℃ 条件下培养 3 天。培养结束后，取上清液 $10\mu\text{l}$ 进行 SDS-PAGE，然后用上述抗转谷氨酰胺酶抗体，按照常规方法进行 Western blot 解析。结果可以确认带有源自肉桂链轮丝菌 IF012852 前体结构部分的源自茂原链轮丝菌 IF013819 的转谷氨酰胺酶的分泌。表 3 给出了转谷氨酰胺酶原的产量。用 pPKSPTG1 作对照，其基因构成上的特点是前体结构部分源自茂原链轮丝菌。pPKSPTG4 具有其前体结构部分源自肉桂链轮丝菌的基因结构上的特点。pPKSPTG5 具有其前体结构部分的 N 末端开始的 16 个氨基酸源自茂原链轮丝菌，而 C 末端的 40 个氨基酸源自肉桂链轮丝菌的嵌合前体结构的基因结构上的特点。除此之外，其他方面三者是共同的。结果可以看出由于前体结构的氨基酸序列的不同其分泌量存在着明显的差异。具有嵌合前体结构的分泌量最高。

表 3. 由于前体结构部分的不同对转谷氨酰胺酶原分泌产量的影响

质粒	转谷氨酰胺酶原 (mg/L)
pPKSPTG1	235
pPKSPTG4	130
pPKSPTG5	270

实施例 8: 丝氨酸蛋白酶 (SAMP45) 基因的克隆和表达质粒的构建评价

(1) 具有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质的信号序列的带有前体结构部分的丝氨酸蛋白酶 (SAMP45) 基因 (外源融合丝氨酸蛋白酶 (SAMP45) 基因) 的构建

作为白灰浅链霉菌产生的丝氨酸蛋白酶 SAMP45 的基因序列已经确定 [J. Bacteriol., 179, 430-438 (1997)]。参考该序列, 合成序列号 49 和序列号 50 所示的引物, 按照先前叙述的方法利用 PCR 法扩增含有 SAMP45 的 N 末端前体结构、成熟 SAMP45 以及 C 末端前体结构的基因区。

(序列号 49) 5'-AACGGGGAGAACAGCACGGCCGCCGG-3'

(序列号 50) 5'-GGCGAATTCTCCGGCGGGCCGTCACCGGT-3'

<序列表说明>

序列号 49、50: PCR 引物

接下来, 以实施例 4 (2) 构建的 pPKSPTG1 为模板, 通过序列号 51 和序列号 52 组合, 利用相同 PCR 法扩增含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区域的 5'-上游区和含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质 S1pA 基因的信号序列的区域。

为了构建带有前体结构部分的丝氨酸蛋白酶的融合基因, 序列号 52 含有编码丝氨酸蛋白酶原的 N 末端一侧的氨基酸的碱基序列。

(序列号 51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(序列号 52) 5'-CGGCCGTGCTGTTCTCCCCGTTTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCC-3'

<序列表说明>

序列号 51、52: 用于构建融合前丝氨酸蛋白酶原基因的 PCR 引物

接下来,将分别扩增的编码 SAMP45 的 N 末端前体结构、成熟 SAMP45 以及含有 C 末端前体结构的基因区域的 PCR 反应液各 $1\mu\text{l}$,与已扩增的含有 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区与含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 基因的信号序列的 PCR 反应液 $1\mu\text{l}$ 混合作为模板,用序列号 51 和 50 进行交叉 PCR,使含有 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列相连的外源融合前丝氨酸蛋白酶原基因片段扩增。

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 3.9kb 的扩增片段。使用 HindIII 和 EcoRI 消化 PCR 产物,进行琼脂糖凝胶电泳,从琼脂糖凝胶中回收约 3.9kb 的片段,通过插入到上述的 pVC7 的 HindIII-EcoRI 位点,分别得到 pVSS1。按照先前叙述的方法测定插入片段的碱基序列,可确认构建了预想那样的融合基因。

(2) 利用产氨棒杆菌的细胞表面蛋白的信号序列分泌丝氨酸蛋白酶

用构建的质粒 pVSS1 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869,筛选在含有 5mg/l 的氯霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVSS1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/l 的氯霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃ 下培养 70 小时。该培养液 1ml 经离心分离,将培养上清与菌体分离。菌体悬浮于 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 中。丝氨酸蛋白酶活性测定按如下步骤进行。向含有 0.25mM 的 Bz-Phe-Val-Arg-pNA (Bachem Co.Ltd. 制) 的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 中加入培养上清或菌体悬浮液 $50\mu\text{l}$,总溶液量为 0.6ml,于 30℃ 下反应 20 分钟后,加 0.4ml 的 50% 醋酸终止反应。测定 410nm 的吸光度,通过算出游离的 pNA (对硝基酰替苯胺) 的量确定活性。而一个酶单位为在一分钟内使 $1\mu\text{m}$ 的 pNA 游离所需的酶量。测定结果表明,在培养上清中没有检测出丝氨酸蛋白酶的活性,而在菌体悬浮液中可以检测到活性。通过从检测出的活性值和文献 [J. Bacteriol., 179, 430-438 (1997)] 中记载的比活值计算的结果,可以确认有约相当于 9mg/l 的丝氨酸蛋白酶分泌在菌体表面。

(3) 通过在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中分泌表达的丝氨酸蛋白酶切去带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的前体结构部分

用构建的质粒 pVSS1 转化携有实施例 4 (2) 所述的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的分泌表达质粒 pPKSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 筛选在含有 5mg/1 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVSS1、pPKSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/1 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃ 下培养 70 小时。取培养结束后的上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE, 然后用上述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法进行 Western blot 解析。结果表明 SAMP 正常分泌表达, 而且分泌的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的前体结构部分被切去, 并可确认分泌具有与天然的成熟转谷氨酰胺酶大致相同分子量的转谷氨酰胺酶。

对该培养上清用上述的氧肟酸酯法确认转谷氨酰胺酶活性时, 确认具有大致与天然型一样的比活性 (约 20U/mg)。

另外, 在 SDS-PAGE 后, 按照先前叙述的方法经半干转移将蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上。蛋白转移后, 用考马斯亮蓝对膜进行染色、脱色、风干。将成熟转谷氨酰胺酶的部分切下来, 使用蛋白质序列仪解析 N 末端氨基酸序列。解析结果可以确认, 序列号 5 所示的源自茂原链轮丝菌的天然型的成熟转谷氨酰胺酶带有前体结构部分的 C 末端一侧氨基酸的 Phe-Arg-Ala-Pro 4 个氨基酸的结构。

实施例 9: 脯氨酸特异性肽酶 (svPEP) 基因的克隆和表达质粒构建评价

(1) 茂原链轮丝菌生成的脯氨酸特异性肽酶 (svPEP) 的纯化

将 800ml 的 ISP2 液体培养基 (将酵母提取物 4g、麦芽提取物 10g、葡萄糖 4g 用水配成 1L 溶液, pH 调节为 7.3) 加到 5L 坂口烧瓶中, 将茂原链轮丝菌 IF013819 株从板上移植到培养基中, 于 30℃ 下, 以 120rpm 速度振荡培养 48 小时。

对培养液进行离心分离, 去除培养上清回收菌体。用含有 25mg/1 的卡那霉素的 20mM Tris-HCl 缓冲液洗净后, 将得到的菌体悬浮于含有 25mg/1 的卡那霉素的 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0)。于冰上振荡 4 小时后, 通过离心分离回收上清。用硝酸纤维素膜 (孔径 0.22 μ m, Satrius 公司制) 过滤灭菌后, 用 FPLC (Amersham Pharmacia 公司

制)通过用 1.5M 硫酸铵/50mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 平衡的丁基-琼脂糖 4FF (Amersham Pharmacia 公司制) 柱 (1.6 ϕ $\times$ 10cm), 用同一缓冲液中硫酸铵 1.5-0M 的线性浓度梯度进行洗脱。回收含有活性成分的组分, 再于相同的条件通过苯基-琼脂糖 HP 柱 (1ml, Amersham Pharmacia 公司制), 回收活性组分, 然后对 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 于 4℃ 下透析过夜。通过以上操作可获得部分纯化的酶液。

表 4 给出了上述各个阶段的总蛋白量、总活性、比活性、收率以及纯化程度。而各个阶段的酶活性的测定按照芳本等人的方法 (鹤·船津编; 生物化学实验法 31 蛋白质分解酶 II, 学会出版中心 (1993), p187) 按如下步骤进行。

向含有 0.25mM 的 Ala-Ala-Pro-pNA (Bachem 公司制) 的 20mM 磷酸钠缓冲液中加入酶溶液, 总溶液量为 0.6ml, 于 30℃ 下反应 5 分钟后, 加 0.4ml 的 50% 醋酸终止反应。测定 410nm 的吸光度, 通过算出游离的 pNA 的量确定活性。一个酶活性单位为在 1 分钟内使 1 μ mol 的 pNA 游离所需的酶量。

表 4. 茂原链轮丝菌生成的脯氨酸特异性肽酶 (svPEP) 的纯化

纯化步骤	体积 (ml)	总活性 (单位)	总蛋白量 (mg)	比活性 (单位/mg)	收率 (%)	纯化度 (倍)
粗酶提取液	550	308	385	0.80	100	1
丁基-琼脂糖 4FF	45.6	213	8.98	23.7	69	30
苯基-琼脂糖 HP	5.8	136	3.83	35.5	44	44

(2) 茂原链轮丝菌 IF013819 生成的脯氨酸特异性肽酶 (svPEP) 的 N 末端氨基酸序列的解析

部分纯化的酶液用反相柱色谱进一步纯化。反相柱色谱的条件如下。

HPLC 装置: 泵: HITACHI L-6300, 检测器: L-4000H

柱子: PROTEIN C4 214TP5410 (VYDAC 公司制)

洗脱条件: 24-40% 乙腈线性梯度/0.1%三氟乙酸 (20 分钟), 于室温

下进行洗脱

流速: 1.0ml/min

检测波长: 280nm

将上述条件下纯化的酶样品用 Membrane Cartridge (Perkin Elmer 公司制) 转移到聚偏(二)氟乙烯 (Polyvinylidene-defluoride, PVDF) 膜上, 利用气相蛋白测序仪 PPSQ-10 (岛津制作所制) 解析 N 末端氨基酸序列。结果可得到序列号 53 所示的 N 末端的 20 个氨基酸残基序列。

(序列号 53) Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile leu Lys Ile Pro

1 5 10

Gly Met Lys Phe Val Glu Glu Lys

15 20

(3) 茂原链轮丝菌 IF013819 生成的脯氨酸特异性肽酶 (svPEP) 的特性评价

就以下特性对茂原链轮丝菌 IF013819 生成的脯氨酸特异性肽酶进行了评价

(i) 底物特异性

(a) 以带有发色基团 pNA 的肽为底物时: 向含有附加了 pNA 的各种肽 (浓度都是 0.25mM) 的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH6.5) 加入纯化的酶溶液, 总溶液量为 0.6ml, 于 37℃ 下反应 5 分钟后, 加 0.4ml 的 50% 醋酸终止反应。测定 410nm 的吸光度, 求出酶切活性。

(b) 以带有发色基团 β NA (β -萘甲酰胺) 的肽为底物时: 向含有各种肽 (浓度都是 0.3mM) 的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH6.5) 加入纯化的酶溶液, 总溶液量为 1.0ml, 于 37℃ 下反应 5 分钟后, 加 0.4ml 的 Fast garnet GBC 溶液 (用 10% Triton X-100/1M 乙酸钠 (pH4.0) 溶解, 使浓度为 0.1%) 终止反应。测定 550nm 的吸光度, 求出酶切活性。

(c) 以肽为底物时: 以配成 1mg/ml 的肽溶液为底物, 加酶液, 于 30℃ 下反应 1 小时。通过以下条件的 HPLC 确认酶切活性。

柱子: YMC-PACK ODS-A $4.6 \times 150\text{mm}$ (YMC)

洗脱液: 0.1%三氟乙酸 (TFA) - 乙腈

流速: 1ml/min

检测波长: UV220nm

结果表明, 该酶是特异切断脯氨酸的羧基侧肽键的酶, 能很好地依次识别 Ala-Ala-Pro-pNA、Pro-Arg-Ala-Xaa (序列号 68) (式中 Xaa 代表 Pro-pNA, pNA 代表对硝基酰替苯胺)、Ala-Phe-Pro-pNA, 对含有从 N 末端开始的第 3 位或第 4 位脯氨酸的肽有很高的反应性。但对含有从 N 末端开始的第 2 位或第 5 位脯氨酸的肽没有作用(表 5)。

表 5. svPEP 的特异性 P52

肽底物	相对活性 (%)
P-pNA	0.04
DP-pNA	0.00
Z-GP- β NA	0.04
GP- β NA	0.40
AP-pNA	0.53
RP-pNA	0.94
Z-AGP- β NA	0.78
Z-GAP- β NA	1.2
Bz-FVR-pNA	0.002
AAF-pNA	4.1
AAA-pNA	8.5
AFP-pNA	26.3
AAP-pNA	100
AAPL-pNA	0.3
FRAP-pNA	49.0
Suc-AAPF-pNA	0.01
SFRAP-pNA	1.23
PSFRAP-pNA	0.2

PNA: 对硝基酰替苯胺, β NA: β -萘甲酰胺

<序列说明>

序列号 68: svPEP 用底物

(ii) 最适 pH

pH4 ~ 6: 20mM 乙酸钠缓冲液

pH5.5 ~ 8: 20mM 磷酸钠缓冲液

pH6.5 ~ 9.5: 20mM Tris-HCl 缓冲液

分别使用以上3种缓冲液,以Ala-Ala-Pro-pNA为底物,于30℃下反应5分钟。以20mM磷酸钠缓冲液pH6.5时的活性为100%,算出使用各种缓冲液时的相对活性。结果表明,最适pH为6~6.5。

(iii) pH 稳定性

使用pH3至10的0.15M GTA缓冲液(由3,3-二甲基戊二酸、三(羟甲基)氨基甲烷、2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇配成的缓冲液),向20μl纯化的酶液中加入各种pH的缓冲液40μl,于4℃下放置过夜后,将pH调到7.0,溶液量调到120μl。取出其中的50μl加入Ala-Ala-Pro-pNA,于30℃下反应5分钟。以pH为7.0、以及在与上述相同条件下保存时的活性为100%,各个pH下的相对底物分解量为残余活性。结果表明在pH4~9范围内稳定。

(iv) 最适温度

向50μl纯化的酶液中加入0.5ml的20mM磷酸钠缓冲液(pH6.5),然后加入Ala-Ala-Pro-pNA,使其终浓度为0.25mM,从20℃到60℃进行5分钟的分解反应。以25℃下的底物分解量为100%时的各个温度的相对分解量作为相对活性。结果表明最适温度为25~30℃。

(v) 温度稳定性

向50μl纯化的酶液中加入0.5ml的20mM磷酸钠缓冲液(pH6.5),于4℃或20℃到60℃处理15分钟,冰冷后加入Ala-Ala-Pro-pNA,使其终浓度为0.25mM,于30℃下反应5分钟。以上述4℃下处理时的活性为100%算出残余活性。结果表明20℃以下时稳定。

(vi) 抑制剂

向含有如表6所示浓度的各种化合物的20mM磷酸钠缓冲液(pH6.5)中加入纯化的酶溶液,于室温下放置10分钟。然后加入Ala-Ala-Pro-pNA,于30℃下反应5分钟。以对没有添加化合物时的Ala-Ala-Pro-pNA的活性为100%,以添加各种化合物时的相对底物分解量为相对活性。结果表明,虽然也受到作为SH酶抑制剂的对氯汞

苯甲酸等的一些抑制，但受到作为丝氨酸蛋白酶抑制剂的苯基甲基磺酰氟（Nakaraitesk 公司制）和氨基乙基苯磺酰氟盐酸盐（Boeringer Mannheim 公司制）的抑制作用比较强。

表 6. 抑制剂对茂原链轮丝菌 IF013819 生成的脯氨酸特异性肽酶活性的影响

化合物	浓度 (mM)	相对活性 (%)
不加抑制剂	0	100
丝氨酸酶抑制剂		
苯基甲基磺酰氟	1	39.7
氨基乙基苯磺酰氟盐酸盐	4	59.9
胰凝乳蛋白酶抑制剂	1	84.9
SH-酶抑制剂		
对氯汞苯甲酸	1	87.1
N-乙基马来酰亚胺	1	98.3
碘乙酰胺	1	87
亮抑酶肽	0.5	79.6
天冬酰胺酶抑制剂		
胃蛋白酶抑制剂	1	165.7
金属蛋白酶抑制剂		
EDTA	10	105.2
1,10-菲咯啉	1	92.5
氨肽酶抑制剂		
苯丁抑制素	1	97.6
还原剂		
二硫苏糖醇	10	102.5
脯氨酰内肽酶抑制剂		
Z-(S)Pro-(S)Prolinal	1	111.2
Z-Pro-(S)Prolinal	1	105.8
Z-Pro-Prolinal		99.7

(3) 源自茂原链轮丝菌 IF013819 的脯氨酸特异性肽酶 (svPEP) 基因的获得

在从测定的 svPEP 的 N 末端 20 个氨基酸序列中推定的碱基序列中选出简并少的部位 Lys-Ile-Pro-Gly-Met-Lys-Phe-Val-Glu-Glu-Lys, 制备序列号 54 所示的合成寡核苷酸。以该合成寡核苷酸为探针, 用识别 6 碱基序列的各种限制酶消化按照常规方法制备的茂原链轮丝菌 IF013819 的染色体 DNA, 通过 Southern blot 杂交进行解析, 可检测出经 SacI 剪切的约 6kb 的单一带。于是再用 SacI 消化按照前面方法制备的茂原链轮丝菌 IF013819 的染色体 DNA, 利用 EASYTRAP Ver. 2 (宝酒造公司制) 通过琼脂糖凝胶电泳回收约 6kb 片段。将回收的片段插入到 pUC18 的 SacI 位点后, 导入大肠杆菌 JM109 (宝酒造公司制) 的感受态细胞, 制备文库。通过用 ^{32}P 标记的序列号 54 所示的合成寡核苷酸作为探针, 对制备的文库用菌落杂交来进行文库的筛选, 筛选携带有 svPEP 基因片段被克隆的质粒的菌株, 获得目的基因。从该菌株回收的质粒命名为 pUMP1。

(序列号 54) 5'-AAGATCCCCGGGATGAAGTTCGTCGAGGAGAAG-3'

<序列表说明>

序列号 54: 用于筛选 svPEP 的探针

测定以 pUMP1 克隆的片段的碱基序列。序列号 41 给出了对应于 svPEP 的 svPEP 基因序列。推定该基因编码的氨基酸序列时, 发现了由先前纯化的酶蛋白测定的 N 末端部分氨基酸序列 (20 个残基), 进而确定了序列号 40 所示的成熟型 svPEP 的氨基酸一级序列。另外也确定了含有序列号 42 所示的 svPEP 的信号序列以及估计为前体结构的区域的整个氨基酸一级序列。

用 pUMP1 转化的大肠杆菌 AJ13691 以 FERM BP-7160 编号于 2000 年 5 月 15 日按照布达佩斯条约寄存于通商产业省工业技术院生命工程工业技术研究所 (日本国 〒305-8566 茨城县筑波市东 1 丁目 1-3)。

(4) 具有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白的信号序列的带有前体结构部分的脯氨酸特异性肽酶 (svPEP) 基因 (外源融合前脯氨酸特异性肽酶

(svPEP)原基因)的构建

以实施例9(3)测定的svPEP的序列为参考,以实施例9(3)构建的pUMP1为模板,合成序列号55和序列号56所示的引物,按照前面同样的方法利用PCR法扩增含有svPEP的前体结构以及成熟svPEP的基因区域。

(序列号55) 5'-GAGGCGGCGTCGATCACCGCCCC-3'

(序列号56) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCGGCACCCGG-3'

<序列表说明>

序列号55、56: PCR引物

接下来,用实施例4(2)中构建的pKSPTG1为模板,通过序列号51和序列号57的组合,利用PCR法扩增含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质PS2基因的启动子区域的5'-上游区和含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质S1pA基因的信号序列的区域。

为了构建与带有前体结构部分的svPEP的融合基因,序列号57所示的引物含有编码svPEP的N末端一侧的氨基酸的序列。

(序列号51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(序列号57) 5'-GGGGCGGTGATCGACGCCGCTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCA-3'

<序列表说明>

序列号57: PCR引物

接下来,将分别扩增的含有svPEP的前体结构以及成熟svPEP的基因区域的PCR反应液各1 μ l,与已扩增的含有PS2基因的启动子区的5'-上游区和含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白S1pA的信号序列的区域的PCR反应液1 μ l混合作为模板,使用序列号51和序列号56进行交叉PCR,使含有PS2基因的启动子区的5'-上游区和产氨棒杆菌的细胞表面蛋白S1pA的信号序列相连的外源融合前svPEP原基因片段扩增。

(序列号51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(序列号56) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCGGCACCCGG-3'

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 2.1kb 的扩增片段。使用 HindIII 消化 PCR 产物，进行琼脂糖凝胶电泳，从琼脂糖凝胶中回收约 2.1kb 的片段，通过插入到实施例 8 (1) 所述的 pVSS1 的 HindIII 位点，分别得到 pVSSSP1。按照常规方法测定插入片段的碱基序列，可确认构建了预想那样的融合基因。

(5) 利用产氨棒杆菌的细胞表面蛋白的信号序列分泌脯氨酸特异性肽酶

用构建的质粒 pVSSSP1 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869，筛选在含有 5mg/1 的氯霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVSSSP1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/1 的氯霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃ 下培养 70 小时。该培养液 1ml 经离心分离，将培养上清与菌体分离。菌体悬浮于 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0)。svPEP 的活性按下述步骤测定。向含有 0.25mM 的 Ala-Ala-Prp-pNA (Bachem Co.Ltd. 制) 的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 中加入培养上清或菌体悬浮液 50 μ l，总溶液量为 0.6ml，于 30℃ 下反应 20 分钟后，加 0.4ml 的 50% 醋酸终止反应。测定 410nm 的吸光度，通过算出游离的 pNA 的量确定活性。而一个酶单位为在一分钟内使 1 μ m 的 pNA 游离所需的酶量。测定结果表明，在培养上清中没有检测出 svPEP 的活性，而在菌体悬浮液中可以检测到活性。通过从检测出的活性值和实施例 9 (1) 的比活性值计算的结果可以确认有约相当于 50mg/1 的 svPEP 分泌在菌体表面。

(6) 利用在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中分泌表达的丝氨酸蛋白酶和脯氨酸特异性肽酶切去带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的前体结构部分

用构建的质粒 pVSSSP1 转化携有实施例 4 (2) 所述的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的分泌表达质粒 pPKSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869，筛选在含有 5mg/1 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVSSSP1、pPKSPTG1 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/1 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃ 下培养 70 小时。取

培养结束后的上清液 $10\mu\text{l}$ 进行 SDS-PAGE, 然后用上述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法进行 Western blot 解析。结果表明 SAMP45 和 svPEP 正常分泌表达, 而且分泌的带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的前体结构部分被切去, 能够确认与天然的成熟转谷氨酰胺酶具有大致相同分子量的转谷氨酰胺酶的分泌。

对该培养上清用上述的氧肟酸酯法确认转谷氨酰胺酶活性时, 确认具有大致与天然型一样的比活性 (约 20U/mg)。

另外, 在 SDS-PAGE 后, 按照先前叙述的方法经半干转移将蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上。蛋白转移后, 用考马斯亮蓝对膜进行染色、脱色、风干。将成熟转谷氨酰胺酶的部分切下来, 使用蛋白质序列仪解析 N 末端氨基酸序列。解析结果可以确认获得了与序列号 5 所示的源自茂原链轮丝菌的天然型成熟转谷氨酰胺酶一样的, N 末端的氨基酸为 Asp 的序列。

实施例 10: 源自茂原链轮丝菌 IF013819 的转谷氨酰胺酶原的前体结构部分的部分缺失体构建和转谷氨酰胺酶的分泌生产

(1) 前体结构部分的部分缺失型转谷氨酰胺酶基因的构建

首先为了构建前体结构部分的 C 末端一侧的氨基酸残基的部分缺失型, 以实施例 1 (1) 测定的转谷氨酰胺酶的基因序列为基础, 合成如序列号 8 和 9 所示的引物, 利用与前面相同的 PCR 法从实施例 1 (1) 中得到的 pUITG 中扩增成熟转谷氨酰胺酶的基因区域。

接下来, 用实施例 4 (2) 中构建的 pPKSPTG1 为模板, 通过序列号 14 和序列号 58 的组合, 或者序列号 14 与序列号 59 的组合, 利用 PCR 法使含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 的启动子区域的 5'-上游区和含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质 S1pA 的信号序列以及转谷氨酰胺酶的前体结构部分的基因区域扩增。

为了构建与成熟转谷氨酰胺酶的融合基因, 序列号 58 所示的引物含有缺失了转谷氨酰胺酶的前体结构部分的 C 末端 2 个氨基酸残基序列 Ala-Pro 的基因序列, 序列号 59 所示的引物具有缺失了转谷氨酰胺酶的前体结构部分的 C 末端 4 个氨基酸残基序列 Phe-Arg-Ala-Pro 的基因序列, 同时还都含有编码成熟转谷氨酰胺酶的 N 末端一侧的氨基酸的序列。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 58) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC CGG AAC GAC GGG CCG GCG C-3'

(序列号 59) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC GAC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

<序列表的说明>

序列号 58、59: PCR 引物

接下来, 将分别扩增的含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和编码含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列以及各个变异前体结构部分的区域的基因区域的 PCR 反应液各 1 μ l, 与已扩增的编码成熟转谷氨酰胺酶的区域 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板, 使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 PCR, 使含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列以及转谷氨酰胺酶的部分缺失型前体结构部分相连的成熟转谷氨酰胺酶基因片段分别扩增。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.8kb 的各个扩增片段。从琼脂糖凝胶中回收使用 ScaI 和 Eco065I 消化这些片段生成的约 800bp 的片段, 通过与从实施例 4(2) 构建的 pPKSPTG1 用 ScaI 和 Eco065I 切出的片段替换来构建 pPKSPTG1 Δ AP (Ala-Pro 缺失型) 和 pPKSPTG1 Δ FRAP (Phe-Arg-Ala-Pro 缺失型)。

为了构建前体结构部分的 N 末端一侧的氨基酸残基的部分缺失型, 以实施例 1(1) 测定的转谷氨酰胺酶的基因序列为基础, 合成如序列号 60 和 61 所示的引物, 通过序列号 60 和序列号 9 的组合, 或者序列号 61 和序列号 9 的组合, 利用 PCR 法从实施例 1(1) 中得到的 pUITG 中扩增转谷氨酰胺酶原的基因区域。

(序列号 60) 5'-AAT GGC GCG GGG GAA GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC T-3'

(序列号 61) 5'-GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC TAC CGC CTC ACG GCG G-3'

(序列号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

<序列表说明>

序列号 60、61: PCR 引物

接下来, 用实施例 4 (2) 中构建的 pPKSPTG1 为模板, 通过序列号 14 和序列号 62 的组合, 或者序列号 14 与序列号 63 的组合, 利用 PCR 法使含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区域的 5'-上游区和含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质 S1pA 的信号序列的区域扩增。

为了构建与产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质 S1pA 的信号序列的融合基因, 序列号 62 所示的引物具有缺失了转谷氨酰胺酶的前体结构部分的 N 末端 1 个氨基酸残基 Asp 的基因序列, 序列号 63 所示的引物具有缺失了转谷氨酰胺酶的前体结构部分的 N 末端 6 个氨基酸残基的序列 Asp-Asn-Gly-Ala-Gly-Glu 的基因序列, 同时还都含有编码产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质 S1pA 的信号序列的 C 末端一侧的氨基酸的序列。

(序列号 14) : 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 62) : 5'-GTC TCT TCC CCC GCG CCA TTT GCC GTT GCC ACA GGT GCG G- 3'

(序列号 63) : 5'-TCG GCG TAG GAC TTC GTC TCT GCC GTT GCC ACA GGT GCG G- 3'

<序列表说明>

序列号 62、63: PCR 引物

接下来, 将分别扩增的含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和编码含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列的区域的基因区域的 PCR 反应液各 1 μ l, 与已扩增的编码前体结构部分的 N 末端部分缺失的转谷氨酰胺酶原的区域的 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板, 使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 PCR, 使含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列以及转谷氨酰胺酶的部分缺失型前体结构部分相连的成熟转谷氨酰胺酶基因片段扩增。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

通过琼脂糖凝胶电泳分别检测出大约 1.8kb 的各个扩增片段。从琼脂糖凝胶中回收用 ScaI 和 Eco065I 消化这些片段生成的约 800bp 的片段, 通过与从实施例 4 (2) 构建的 pPKSPTG1 用 ScaI 和 Eco065I 切出的片段替换来构建 pPKSPTG1 Δ D (Asp 缺失型) 以及 pPKSPTG1 Δ

DNGAGE (Asp-Asn-Gly-Ala-Gly-Glu 缺失型)。

(2) 前体结构部分缺失型转谷氨酰胺酶的分泌

用构建的质粒 pPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ D 或 pPKSPTG1 Δ DNGAGE 转化的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 筛选在含有 25mg/1 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携带 pPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ D 或 pPKSPTG1 Δ DNGAGE 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 25mg/1 的卡那霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃ 下分别培养 48 小时。取培养结束后的上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE, 然后用上述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法进行 Western blot 解析。结果可以确认前体结构部分缺失的转谷氨酰胺酶的分泌。虽然带有 pPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ D 的重组体分别都表现出与天然型 (pPKSPTG1) 同等的分泌性, 但带有 pPKSPTG1 Δ DNGAGE 的重组体的分泌量只是天然型 (pPKSPTG1) 分泌量的一半。

(3) 利用在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中分泌表达的丝氨酸蛋白酶切去前体结构部分缺失型转谷氨酰胺酶原的前体结构部分

用实施例 8 (1) 构建的质粒 pVSSSP1 转化携带实施例 10 (2) 所述的前体结构部分缺失型转谷氨酰胺酶原的分泌表达质粒 pPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ D 或 pPKSPTG1 Δ DNGAGE 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 筛选在含有 5mg/1 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携带 pVSS1 和 pPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ D 或 pPKSPTG1 Δ DNGAGE 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/1 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃ 下分别培养 70 小时。取培养结束后的上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE, 然后用上述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法进行 Western blot 解析。

结果表明 SAMP45 正常分泌表达, 而且分泌的前体结构部分缺失型转谷氨酰胺酶原的前体结构部分被切去, 能够确认与天然的成熟转谷氨酰胺酶具有大致相同的分子量的转谷氨酰胺酶的分泌。

另外, 在 SDS-PAGE 后, 按照先前叙述的方法经半干转移将蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上。蛋白转移后, 用考马斯亮蓝对膜进行染色、脱色、风干。将成熟转谷氨酰胺酶的部分切下来, 使用蛋白质序列仪

解析 N 末端氨基酸序列。解析结果可以确认, 携有 pPKSPTG1 Δ AP 的重组体在序列号 5 所示的天然成熟型转谷氨酰胺酶的 N 末端附加了 Phe-Arg; 携有 pPKSPTG1 Δ FRAP 的重组体在成熟型转谷氨酰胺酶的 N 末端附加了 Ser-Ala-Gly-Pro-Ser; 携有 pPKSPTG1 Δ D 及 pPKSPTG1 Δ DNGAGE 重组体在成熟转谷氨酰胺酶中附加了 Phe-Arg-Ala-Pro。

实施例 11: 源自茂原链轮丝菌 IF013819 的转谷氨酰胺酶原的前体结构部分的变异体构建和转谷氨酰胺酶的分泌生产

(1) 前体结构部分变异型转谷氨酰胺酶原基因的构建

以实施例 1 (1) 测定的转谷氨酰胺酶的基因序列为基础, 合成如序列号 8 和 9 所示的引物, 利用 PCR 法从实施例 1 (1) 中得到的 pUITG 中扩增成熟转谷氨酰胺酶的基因区域。

接下来, 用实施例 4 (2) 中构建的 pPKSPTG1 为模板, 通过序列号 14 和序列号 64 的组合, 或者序列号 14 与序列号 65 的组合, 或者序列号 14 与序列号 66 的组合, 序列号 14 与序列号 67 的组合, 利用 PCR 法使含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区域的 5'-上游区和含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白质 S1pA 的信号序列以及转谷氨酰胺酶的前体结构部分的区域扩增。

序列号 64 所示的引物含有将转谷氨酰胺酶的前体结构部分的 C 末端 3 个氨基酸残基序列 Arg-Ala-Pro 转换为 Gly-Pro-Lys 的基因序列, 而序列号 65 所示的引物含有将转谷氨酰胺酶的前体结构部分的 C 末端 3 个氨基酸残基序列 Arg-Ala-Pro 转换为 Gly-Pro-Arg 的基因序列。序列号 66 所示的引物含有将前体结构部分的 C 末端 5 个氨基酸残基序列 Ser-Phe-Arg-Ala-Pro 仅转换为 Lys 的基因序列, 而序列号 67 所示的引物具有将 Ser-Phe-Arg-Ala-Pro 仅转换为 Arg 的基因序列。

为了构建与成熟转谷氨酰胺酶的融合基因, 还都含有编码成熟转谷氨酰胺酶的 N 末端一侧的氨基酸序列的序列。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 64) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC TTG GGG CCG AAC GAC GGG C-3'

(序列号 65) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG CGG GGG CCG AAC GAC GGG C-3'

(序列号 66) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC TTC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

(序列号 67) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG CGC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

<序列表说明>

序列号 64~67: PCR 引物

接下来,将分别扩增的含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和编码含有产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列以及变异型前体结构部分的区域的基因区域的 PCR 反应液各 1 μ l,与已扩增的编码成熟转谷氨酰胺酶的区域 PCR 反应液 1 μ l 混合作为模板,使用序列号 14 和序列号 9 进行交叉 PCR,使含有谷氨酸棒杆菌的细胞表面蛋白质 PS2 基因的启动子区的 5'-上游区和产氨棒杆菌的细胞表面蛋白 S1pA 的信号序列以及变异型转谷氨酰胺酶的前体结构部分相连的成熟转谷氨酰胺酶基因片段扩增。

(序列号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(序列号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

通过琼脂糖凝胶电泳检测出大约 1.8kb 的 0000 扩增片段。从琼脂糖凝胶中回收用 ScaI 和 Eco065I 消化该片段后生成的约 800bp 的片段,通过与从实施例 4(2)构建的 pPKSPTG1 用 ScaI 和 Eco065I 切出的片段替换来构建 pPKSPTG11 (Gly-Pro-Lys 变异型)和 pPKSPTG12 (Gly-Pro-Arg 变异型), pPKSPTG13 (缺失 Phe-Arg-Ala-Pro, Lys 插入变异型)和 pPKSPTG14 (缺失 Phe-Arg-Ala-Pro, Arg 插入变异型)。

(2) 前体结构部分变异型转谷氨酰胺酶的分泌

用构建的质粒 pPKSPTG11、pPKSPTG12、pPKSPTG13 或 pPKSPTG14 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13869,筛选在含有 25mg/l 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pPKSPTG11、pPKSPTG12、pPKSPTG13 或 pPKSPTG14 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 25mg/l 的卡那霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃下分别培养 48 小时。取培养结束后的上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE,然后用上述的抗转谷氨酰胺酶抗体,按照常规方法进行 Western blot 解析。结果可以确认带有前体结构部分的转谷氨酰胺酶的分泌。

(3) 利用在谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 中分泌表达的丝氨酸蛋白酶切去带有变异型前体结构部分的转谷氨酰胺酶的前体结构部分

用实施例 8 (1) 构建的质粒 pVSS1 转化携有实施例 11 (2) 所述的带有改造的前体结构部分转谷氨酰胺酶的分泌表达质粒 pPKSPTG11、pPKSPTG12、pPKSPTG13 或 pPKSPTG14 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869, 筛选在含有 5mg/1 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 CM2S 琼脂培养基中生长的菌株。然后将筛选出的携有 pVSS1 和 pPKSPTG11、pPKSPTG12、pPKSPTG13 或 pPKSPTG14 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 用含有 5mg/ml 的氯霉素和 25mg/1 的卡那霉素的上述 MMTG 液体培养基于 30℃ 下分别培养 70 小时。取培养结束后的上清液 10 μ l 进行 SDS-PAGE, 然后用上述的抗转谷氨酰胺酶抗体, 按照常规方法进行 Western blot 解析。结果表明 SAMP45 正常分泌表达, 而且分泌的带有变异型前体结构部分的转谷氨酰胺酶的变异型前体结构部分被切去, 能够确认与天然的成熟转谷氨酰胺酶具有大致相同分子量的转谷氨酰胺酶的分泌。

另外, 在 SDS-PAGE 后, 按照常规方法经半干转移将蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上。蛋白转移后, 用考马斯亮蓝对膜进行染色、脱色、风干。将成熟转谷氨酰胺酶的部分切下来, 使用蛋白质序列仪解析 N 末端氨基酸序列。解析结果可以确认携有 pVSS1 和 pPKSPTG11、或者 pVSS1 和 pPKSPTG12 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 分泌的转谷氨酰胺酶的序列是与序列号 5 所示的天然型成熟转谷氨酰胺酶一样的, N 末端为 Asp 的序列。另外携有 pVSS1 和 pPKSPTG13、或者 pVSS1 和 pPKSPTG14 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 分泌的转谷氨酰胺酶序列是在天然型成熟转谷氨酰胺酶附加了 Ser-Ala-Gly-Pro-Lys (序列号 69), 或者 Ser-Ala-Gly-Pro-Arg (序列号 70) 的序列。

前者具有与天然型转谷氨酰胺酶一样氨基酸序列的培养上清用羧肽酯法确认有转谷氨酰胺酶活性, 而且具有大致与天然型一样的比活性 (约 20U/mg)。

<序列表说明>

序列号 69、70: 附加在天然的转谷氨酰胺酶的序列

利用本发明可以通过棒杆菌属细菌使有用的外源蛋白、特别是转谷氨酰胺酶大量生成，并有效地分泌到菌体外。由于通过本发明生成的蛋白质可释放到培养基中，所以利用已知的适当的方法可以简便而且大规模地从培养基中直接回收蛋白质。

 序列表

<110> 味之素株式会社(Ajinomoto Co., Inc.)

<120> 转谷氨酰胺酶的制备方法

<130> Y1H0862

<140>

<141>

<150> JP 11-280098

<151> 1999-09-30

<150> JP 2000-194043

<151> 2000-06-28

<160> 70

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)

<400> 1

Met	Phe	Asn	Asn	Arg	Ile	Arg	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala
1				5				10					15		

Ile	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Ile	Pro	Ala	Phe	Ala
			20					25					30

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)

<400> 2

Met	Lys	Arg	Met	Lys	Ser	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Gly	Ala
1				5				10					15		

Met	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

<210> 3

<211> 45

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*)

<400> 3

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
 20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro
 35 40 45

<210> 4

<211> 54

<212> PRT

<213> 肉桂链轮丝菌 (*Streptoverticillium cinnamoneum*)

<400> 4

Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr
 20 25 30

Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser
 35 40 45

Ala Pro Ser Arg Ala Pro
 50

<210> 5

<211> 331

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*)

<400> 5

Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met
1 5 10 15

Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn
20 25 30

Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg
35 40 45

Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys
50 55 60

Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu
65 70 75 80

Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn
85 90 95

Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val
100 105 110

Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu
115 120 125

Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser
130 135 140

Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala
145 150 155 160

Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn
165 170 175

Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg
180 185 190

Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg
195 200 205

Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg
210 215 220

Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile
225 230 235 240

Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr
245 250 255

Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp
260 265 270

Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met
275 280 285

His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp
290 295 300

Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn
305 310 315 320

Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
325 330

<210> 6

<211> 782

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌 (Corynebacterium glutamicum)

<220>

<221> CDS

<222> (579)..(782)

<400> 6

aaattcctgt gaattagctg atttagtact ttccggaggt gtctattcct accaaatcgt 60

caagttgtgg gtagagtcac ctgaatatta attgcaccgc acgggtgata tatgcttatt 120

tgctcaagta gtccgaggtt aagtgtatct taggtgaaca aatttcagct tcgggtagaa 180

gactttcgat gcgcttcaga gcttctattg ggaaatctga caccacttga ttaaatagcc 240

tacccccgaa ttgggggatt ggtcattttt tgctgtgaag gtagttttga tgcatatgac 300

ctgcgtttat aaagaaatgt aaacgtgac agatcgatat aaaagaaaca gtttgtactc 360

aggtttgaag cattttctcc gattcgctg gcaaaaatct caattgtcgc ttacagtttt 420

tctcaacgac aggctgctaa gctgctagtt cgggtggccta gtgagtggcg tttacttgga 480

taaaagtaat cccatgtcgt gatcagccat tttgggttgt ttccatagca atccaaaggt 540

ttcgtctttc gatacctatt caaggagcct tcgectct atg ttt aac aac cgt atc 596

Met Phe Asn Asn Arg Ile

1

5

cgc act gca gct ctc gct ggt gca atc gca atc tcc acc gca gct tcc 644

Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser

10

15

20

ggc gta gct atc cca gca ttc gct cag gag acc aac cca acc ttc aac 692

Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe Asn

25

30

35

atc aac aac ggc ttc aac gat gct gat gga tcc acc atc cag cca gtt 740

Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr Ile Gln Pro Val

40

45

50

gag cca gtt aac cac acc gag gaa acc ctc cgc gac ctg act 782

Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu Arg Asp Leu Thr

55

60

65

<210> 7

<211> 68

<212> PRT

<213> 谷氨酸棒杆菌 (Corynebacterium glutamicum)

<400> 7

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

1

5

10

15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu

20

25

30

Thr Asn Pro Thr Phe Asn Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly

35

40

45

Ser Thr Ile Gln Pro Val Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu

50

55

60

Arg Asp Leu Thr

65

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 8

gactcgcacg acagggtcac ccctcccgcc

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 9

cgctcacatc acggccagcc ctgctttacc

30

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 10

gtgacctgt cgtcggagtc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 11

ggcatcctgt cgagcggtc

20

<210> 12

<211> 1809

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<220>

<221> CDS

<222> (578).. (1798)

<400> 12

gtcgacgcgg gcggggaggg ggtgcggcgg cgccttcgg ctgtgtggac gaagcgtcgg 60

gtcggagggg cggccggata tcgtccttgg ggcggggtgg ccggaattgc cgccatggtg 120

ttgcggggga atcgaccga agacatgata acttctcgta tccaccgat cagtatccg 180

ggagtgcaga agtgttacgc cgtgcccctg tccgcgtcct caccctgtc gccgtgacag 240

cgaccgcgt tcttcactc gcacggacgg cccacagga ctttcggcc cgggctcgcc 300

ccgcgcctc ggtgacggc tccgaataac gcggccgcg gggcctcgcc cggttgaccg 360

atcgggtca cgcgccccgc cgggcgggcg gccacgtcgg gtctcgccc gcccgacatc 420

ggctgcgact gccttcgtc gaacttcttc ccgcctccg gccgcgtttt tccgcgcgcg 480

aagtgcggc gacgcgtacc gaatccccct tcatogcgac gtgcttcgc acggcgcgt 540

tcaacgatgt tccacgacaa aggagttgca ggtttcc atg cgc ata cgc cgg aga 595

Met Arg Ile Arg Arg Arg

1

5

gct ctc gtc ttc gcc act atg agt gcg gtg tta tgc acc gcc gga ttc	643
Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe	
10 15 20	
atg ccg tcg gcc ggc gag gcc gcc gcc gac aat ggc gcg ggg gaa gag	691
Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu	
25 30 35	
acg aag tcc tac gcc gaa acc tac cgc ctc acg gcg gat gac gtc gcg	739
Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala	
40 45 50	
aac atc aac gcg ctc aac gaa agc gct ccg gcc gct tcg agc gcc ggc	787
Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly	
55 60 65 70	
ccg tcg ttc cgg gcc ccc gac tcc gac gac agg gtc acc cct ccc gcc	835
Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala	
75 80 85	
gag ccg ctc gac agg atg ccc gac ccg tac cgt ccc tcg tac ggc agg	883
Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg	
90 95 100	
gcc gag acg gtc gtc aac aac tac ata cgc aag tgg cag cag gtc tac	931
Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr	
105 110 115	
agc cac cgc gac ggc agg aag cag cag atg acc gag gag cag cgg gag	979
Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu	
120 125 130	
tgg ctg tcc tac ggc tgc gtc ggt gtc acc tgg gtc aat tcg ggt cag	1027
Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln	
135 140 145 150	
tac ccg acg aac aga ctg gcc ttc gcg tcc ttc gac gag gac agg ttc	1075
Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe	
155 160 165	
aag aac gag ctg aag aac ggc agg ccc cgg tcc ggc gag acg cgg gcg	1123
Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala	
170 175 180	

gag ttc gag ggc cgc gtc gcg aag gag agc ttc gac gag gag aag ggc	1171
Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly	
185 190 195	
ttc cag cgg gcg cgt gag gtg gcg tcc gtc atg aac agg gcc ctg gag	1219
Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu	
200 205 210	
aac gcc cac gac gag agc gct tac ctc gac aac ctc aag aag gaa ctg	1267
Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu	
215 220 225 230	
gcg aac ggc aac gac gcc ctg cgc aac gag gac gcc cgt tcc ccg ttc	1315
Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe	
235 240 245	
tac teg gcg ctg cgg aac acg ccg tcc ttc aag gag cgg aac gga ggc	1363
Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly	
250 255 260	
aat cac gac ccg tcc agg atg aag gcc gtc atc tac teg aag cac ttc	1411
Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe	
265 270 275	
tgg agc ggc cag gac cgg teg agt teg gcc gac aag agg aag tac ggc	1459
Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly	
280 285 290	
gac ccg gac gcc ttc cgc ccc gcc ccg ggc acc ggc ctg gtc gac atg	1507
Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met	
295 300 305 310	
teg agg gac agg aac att ccg cgc agc ccc acc agc ccc ggt gag gga	1555
Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly	
315 320 325	
ttc gtc aat ttc gac tac ggc tgg ttc ggc gcc cag acg gaa gcg gac	1603
Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp	
330 335 340	
gcc gac aag acc gtc tgg acc cac gga aat cac tat cac gcg ccc aat	1651
Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn	
345 350 355	

ggc agc ctg ggt gcc atg cat gtc tac gag agc aag ttc cgc aac tgg 1699
 Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp
 360 365 370

tcc gag ggt tac tcg gac ttc gac cgc gga gcc tat gtg atc acc ttc 1747
 Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe
 375 380 385 390

atc ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc gac aag gta aag cag ggc tgg 1795
 Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp
 395 400 405

cgc tgatgtgagc g 1809
 Pro

<210> 13

<211> 407

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 13

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val
 1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp
 20 25 30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu
 35 40 45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro
 50 55 60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp
 65 70 75 80

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr
 85 90 95

Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg
 100 105 110

Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met
115 120 125

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr
130 135 140

Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser
145 150 155 160

Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg
165 170 175

Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser
180 185 190

Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val
195 200 205

Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp
210 215 220

Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu
225 230 235 240

Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe
245 250 255

Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val
260 265 270

Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala
275 280 285

Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly
290 295 300

Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro
305 310 315 320

Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly
325 330 335

Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn
340 345 350

His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu
355 360 365

Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly
370 375 380

Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp
385 390 395 400

Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
405

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 14

aaattcctgt gaattagctg atttag

26

<210> 15

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 15

gagctctccg gcgtatgcgc atagaggcga aggctccttg aata

44

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 16

atgcgcatac gccggagagc tctcgtcttc

30

<210> 17

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 17

ggggtgaccc tgtcgtcgga gtctgtgaag ccgttggtga tgttgaa

47

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 18

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagc gaatgctggg atagcaacgc c

51

<210> 19

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 19

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcctg agcgaatgct gggatagcta c

51

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 20

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcgtt gaagccgtt ttgatgttga a 51

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 21

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagt caggtgcgg agggtttcct c 51

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 22

gacaatggcg cgggggaaga gacgaagtcc 30

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 23

gcccagaagc ccaaaattga gattt

25

<210> 24

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 24

cttcgtctct tccccgcgc cattgtctgc cgttgccaca ggtgoggcca gc

52

<210> 25

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 25

cgcagccagc gatttcatgc gtttcataga ggccaagget ccttgaatag gt

52

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 26

atgaaacgca tgaaatcgct ggctgoggcg

30

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 27

ggatccggag cttatcgact gcacg

25

<210> 28

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 28

cgccagccagc gatttcacgc gtttcataat tctgtttcct gtgtgaaatt gt

52

<210> 29

<211> 43

<212> PRT

<213> 谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)

<400> 29

Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys Ala Gln Ala Lys

1

5

10

15

Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala

20

25

30

Leu Thr Met Ser Leu Ala Pro Met Ala Ser Ala

35

40

<210> 30

<211> 43

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*)

<400> 30

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1

5

10

15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg
35 40

<210> 31

<211> 41

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptovercillium mobaraense*)

<400> 31

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser
35 40

<210> 32

<211> 44

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptovercillium mobaraense*)

<400> 32

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu
1 5 10 15

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro
20 25 30

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro
35 40

<210> 33

<211> 39

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptovercillium mobaraense*)

<400> 33

Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val
1 5 10 15

Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala
20 25 30

Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro
35

<210> 34

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的修饰前体结构部分

<400> 34

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Gly Pro Lys
35 40 45

<210> 35

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的修饰前体结构部分

<400> 35

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Gly Pro Arg
35 40 45

<210> 36

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的修饰前体结构部分

<400> 36

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Lys
35 40

<210> 37

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：源自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的修饰前体结构部分

<400> 37

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Arg
35 40

<210> 38

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：源自茂原链轮丝菌和肉桂链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的嵌合前体结构部分

<400> 38

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala
20 25 30

Leu Thr Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser
35 40 45

Ala Ser Ala Pro Ser Arg Ala Pro
50 55

<210> 39

<211> 1079

<212> PRT

<213> 白灰浅链霉菌 (*Streptomyces albogriseolus*)

<400> 39

Asn Gly Glu Asn Ser Thr Ala Ala Gly Ser Ser Ala Ser Ala Thr Ala
1 5 10 15

Leu Lys Gly Lys His Arg Val Thr Leu Ile Thr Gly Asp Arg Val Ala
20 25 30

Leu Asp Ala Lys Gly Arg Val Val Gly Leu Glu Pro Ala Glu Gly Arg
35 40 45

Glu His Ile Pro Val Gln Ile Arg Arg Ser Asp Gly His Thr Leu Val
50 55 60

Val Pro Ala Asp Ala Ala Arg Leu Val Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asp Val Thr Glu Leu Asn Lys Ala Ala Thr Arg Thr Ala

85	90	95
His Arg Gly Gly Leu Lys Val Ile Val Gly Tyr Arg Gly Ala Ala Lys		
100	105	110
Ala Ala Lys Ala Asp Val Arg Asp Ala Gly Thr Val Arg Arg Thr Leu		
115	120	125
Thr Ser Leu Asn Ala Asp Ala Val Gln Thr Pro Gln Glu Ala Gly Ala		
130	135	140
Glu Leu Trp Glu Ala Val Thr Asp Gly Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val		
145	150	155
Ala Arg Val Trp Leu Asp Gly Val Arg Lys Ala Ser Leu Asp Thr Ser		
165	170	175
Val Gly Gln Ile Gly Thr Pro Lys Ala Trp Glu Ala Gly Tyr Asp Gly		
180	185	190
Lys Gly Val Lys Ile Ala Val Leu Asp Thr Gly Val Asp Ala Thr His		
195	200	205
Pro Asp Leu Lys Gly Gln Val Thr Ala Ser Lys Asn Phe Thr Ser Ala		
210	215	220
Pro Thr Thr Gly Asp Val Val Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile		
225	230	235
Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gln Ser Lys Gly Thr Tyr Lys Gly Val Ala		
245	250	255
Pro Gly Ala Lys Ile Leu Asn Gly Lys Val Leu Asp Asp Ala Gly Phe		
260	265	270
Gly Asp Asp Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Glu Trp Ala Ala Ala Gln		
275	280	285
Gly Ala Asp Ile Val Asn Met Ser Leu Gly Gly Met Asp Thr Pro Glu		
290	295	300
Thr Asp Pro Leu Glu Ala Ala Val Asp Lys Leu Ser Ala Glu Lys Gly		
305	310	315
		320

Ile Leu Phe Ala Ile Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gln Ser Ile Gly
 325 330 335

Ser Pro Gly Ser Ala Asp Ser Ala Leu Thr Val Gly Ala Val Asp Asp
 340 345 350

Lys Asp Lys Leu Ala Asp Phe Ser Ser Thr Gly Pro Arg Leu Gly Asp
 355 360 365

Gly Ala Val Lys Pro Asp Leu Thr Ala Pro Gly Val Asp Ile Thr Ala
 370 375 380

Ala Ser Ala Lys Gly Asn Asp Ile Ala Lys Glu Val Gly Glu Lys Pro
 385 390 395 400

Ala Gly Tyr Met Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val
 405 410 415

Ala Gly Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gln Gln His Pro Glu Trp Lys Tyr
 420 425 430

Ala Glu Leu Lys Gly Ala Leu Thr Ala Ser Thr Lys Asp Gly Lys Tyr
 435 440 445

Thr Pro Phe Glu Gln Gly Ser Gly Arg Val Gln Val Asp Lys Ala Ile
 450 455 460

Thr Gln Thr Val Ile Ala Glu Pro Val Ser Leu Ser Phe Gly Val Gln
 465 470 475 480

Gln Trp Pro His Ala Asp Asp Lys Pro Val Thr Lys Lys Leu Thr Tyr
 485 490 495

Arg Asn Leu Gly Thr Glu Asp Val Thr Leu Lys Leu Thr Ser Thr Ala
 500 505 510

Thr Gly Pro Lys Gly Lys Ala Ala Pro Ala Gly Phe Phe Thr Leu Gly
 515 520 525

Ala Ser Thr Leu Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Ala Ser Val Asp Val
 530 535 540

Thr Ala Asp Thr Arg Leu Gly Gly Ala Val Asp Gly Thr Tyr Ser Ala
 545 550 555 560

Tyr Val Val Ala Thr Gly Ala Gly Gln Ser Val Arg Thr Ala Ala Ala
 565 570 575

Val Glu Arg Glu Val Glu Ser Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Leu Asp
 580 585 590

Arg Ser Gly Lys Ala Thr Ala Asn Tyr Met Ala Tyr Leu Ser Gly Leu
 595 600 605

Thr Gly Leu Gly Lys Asp Arg Ser Tyr Ala Pro Tyr Glu Ala Asp Gly
 610 615 620

Ala Val Ser Val Arg Val Pro Lys Gly Gly Tyr Val Leu Asp Ala Ser
 625 630 635 640

Val Leu Val Gly Ala Asp Pro Glu Thr Trp Arg Gly Ala Asp Trp Leu
 645 650 655

Ala Gln Pro Lys Leu Asp Val Thr Arg Asn Thr Thr Val Thr Val Asp
 660 665 670

Ala Arg Lys Ala Lys Pro Val Lys Val Thr Val Pro Gly Lys Ala Ala
 675 680 685

Lys Ala Gln Phe Ala Ser Ala Asp Tyr Thr Ile Glu Thr Asn Asp Ser
 690 695 700

Ala Val Ser Tyr Gly Trp Trp Leu Glu Asn Tyr Ser Gly Phe Arg Ser
 705 710 715 720

Ala His Leu Gly Pro Gln Ile Thr Asn Gly Thr Leu Ser Gln Gln Trp
 725 730 735

Asn Thr His Phe Ser Asn Gly Ala Lys Ala Gln Tyr Thr Ala Ile Ser
 740 745 750

Gly Gly Lys Val Lys Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Thr Arg Ala Phe Lys
 755 760 765

Ala Lys Glu Phe Ala Thr Val Gln Val Gly Met Gly Ala Ala Ala Ser
 770 775 780

Gly Lys Lys Gly Ala Val Thr Ala Phe Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser

785	790	795	800
Gly Ala Ser Gly Phe Ser Gln Glu Gln Lys Leu Pro Ser Thr Arg Thr			
	805	810	815
Leu Tyr Leu Ser Thr Val Asn Gly Val Thr Trp Asp Leu Asp Phe Glu			
	820	825	830
Gln Leu Gly Gly Val Asp Asn Glu Gly Trp Pro Ile Tyr Asp Ala Val			
	835	840	845
Tyr Thr Ile Gly Val Gly Lys Thr Tyr Lys Gly Gly Lys Thr Tyr Lys			
	850	855	860
Glu Thr Val Asn Thr Ala Val Phe Gly Pro Arg Leu Thr Ser Ser Tyr			
865	870	875	880
Gly Val Phe Arg Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Gly Val Ile Pro Leu Phe			
	885	890	895
Ala Asp Gly Lys Gly His Ala Gly Ser Ser Glu Phe Ser Ser Ala Val			
	900	905	910
Thr Thr Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Lys Val Gly Ser Asn Asn Asp Pro			
	915	920	925
Leu Phe Gly Glu Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Gly Asp Ala Ala Tyr			
	930	935	940
Arg Leu Thr Thr Ser Val Lys Arg Ser Ala Lys Val Ala Ala Ala Ser			
945	950	955	960
Thr Arg Ile Asp Ala Ser Trp Thr Phe Arg Ser Lys Lys Thr Ser Gly			
	965	970	975
Glu Lys Gln Leu Pro Val Ser Ser Ala Arg Phe Ala Ala Val Thr Gly			
	980	985	990
Leu Asp Ser Lys Val Ala Ala Gly Lys Lys Ala Thr Phe Pro Val Val			
	995	1000	1005
Val Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Asn Leu Lys Ser Leu Ala Val Tyr			
1010	1015	1020	

Val Ser Tyr Asn Gly Gly Lys Thr Trp Lys Lys Thr Thr Val Thr Lys
1025 1030 1035 1040

Gly Lys Ile Thr Val Lys Asn Pro Ala Lys Gly Lys Ala Ile Ser Phe
 1045 1050 1055

Arg Ala Lys Ile Thr Asp Lys Lys Gly Asn Ala Ser Leu Ile Thr Ile
 1060 1065 1070

His Asn Ala Tyr Tyr Gly Lys
 1075

<210> 40

<211> 444

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*)

<400> 40

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe
1 5 10 15

Val Glu Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr
 20 25 30

Arg Gln Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln
 35 40 45

Arg Phe Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe
50 55 60

Thr Ser Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr
65 70 75 80

Arg Ile Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe Thr
 85 90 95

Pro Ser Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp Gln
100 105 110

Ala Ala Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val Tyr
115 120 125

Gly Lys Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr Ala

130	135	140			
Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val Ala					
145	150	155		160	
Tyr Val Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr Asp					
	165	170		175	
Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu Asn					
	180	185		190	
Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala Arg					
	195	200		205	
Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly					
210	215	220			
Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser					
225	230	235		240	
Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr					
	245	250		255	
Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly					
	260	265		270	
Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr					
	275	280		285	
Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His					
290	295	300			
Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr					
305	310	315		320	
Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp					
	325	330		335	
Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr					
	340	345		350	
Gly Gln Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly					
	355	360		365	

Ala Ala Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His
370 375 380

Gly Ser Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr
385 390 395 400

Ala Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys
405 410 415

Asp Glu Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp
420 425 430

Arg Val Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro
435 440

<210> 41
<211> 1751
<212> DNA
<213> 茂原链轮丝菌 (Streptoverticillium mobaraense)

<220>
<221> CDS
<222> (229)..(1659)

<400> 41
gctcctatga gcatcgacgc cgccagcagc gatcggttcg gtctgaccgt cgacgccgac 60

ggcgagcgcg tgtggtgga cgagcccggt cggcccggtgc cgtcgtgctg gccgtgaaag 120

gcccgaagaa agcccaagcc gtgtgaactg cgaggacaaa ggggtctggcg caacgcattg 180

caccacagat aagttcgccg cgacctttgc gaaccacagg gagggcgc atg cgc aag 237
Met Arg Lys
1

gct ctc aga tcg ctg ctg gcg gcg tcg atg ctc ata gga gcg atc gcc 285
Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly Ala Ile Gly
5 10 15

gcc ggc agc gcc acg gcg gag gcg gcg tcg atc acc gcc ccg cag gcc 333
Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala Pro Gln Ala
20 25 30 35

gac atc aag gac cgc atc ctg aag att ccc ggg atg aag ttc gtc gag	381
Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe Val Glu	
40 45 50	
gag aag ccc tac cag ggc tac cgc tac ctc gtg atg acg tac cgg cag	429
Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr Arg Gln	
55 60 65	
cgc gtg gac cac cgc aat ccc ggc aag ggg acc ttc gag cag cgc ttc	477
Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln Arg Phe	
70 75 80	
acc ctg ctc cac aag gac acc gac cgg ccg acc gtg ttc ttc acg tcc	525
Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Thr Ser	
85 90 95	
ggc tac aac gtc tcc acc aac ccc agc cgc agc gag ccc acg cgc atc	573
Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr Arg Ile	
100 105 110 115	
gtg gac ggc aac cag gtg tcg atg gag tac cgg ttc ttc acg ccg tcc	621
Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe Thr Pro Ser	
120 125 130	
cgg ccg cag ccc gcc gac tgg tcc aag ctg gac atc tgg cag gcg gcg	669
Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp Gln Ala Ala	
135 140 145	
agt gac cag cac cgc ctg tac cag gcg ctg aag ccg gtc tac ggg aag	717
Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val Tyr Gly Lys	
150 155 160	
aac tgg ctg gcc acg ggc ggc agc aag ggc ggc atg acg gcc acc tac	765
Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr Ala Thr Tyr	
165 170 175	
ttc cgc cgc ttc tac ccg aac gac atg aac ggc acg gtc gcc tac gtc	813
Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val Ala Tyr Val	
180 185 190 195	
gcg ccc aac gac gtg aac gac aag gaa gac tcg gcg tac gac aag ttc	861
Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr Asp Lys Phe	
200 205 210	

ttc cag aac gtc ggc gac aag gcg tgc cgc acg cag ctc aac tcg gtg	909
Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu Asn Ser Val	
215 220 225	
cag cgc gag gcg ctc gtc cgc cgc gac gag atc gtc gcc cgc tac gag	957
Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala Arg Tyr Glu	
230 235 240	
aag tgg gct aag gag aac ggc aag acg ttc aag gtc gtc ggc agc gcc	1005
Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly Ser Ala	
245 250 255	
gac aag gcg tac gag aac gtc gtc ctc gac ctg gtc tgg tcc ttc tgg	1053
Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser Phe Trp	
260 265 270 275	
cag tac cac ctg cag agc gac tgc gcc tcc gtc ccc gcc acc aag gcg	1101
Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr Lys Ala	
280 285 290	
tcc acc gac gag ctg tac aag ttc atc gac gac atc tcg ggc ttc gac	1149
Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly Phe Asp	
295 300 305	
ggc tac acc gac cag ggc ctg gag cgc ttc acc ccg tac tac tac cag	1197
Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr Tyr Gln	
310 315 320	
gcg ggc acc cag ctc ggc gcc cct acg gtg aag aac ccg cac ctc aag	1245
Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His Leu Lys	
325 330 335	
ggc gtg ctg cgg tac ccc ggc atc aac cag ccg cgc tcg tac gtc ccc	1293
Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr Val Pro	
340 345 350 355	
cgc gac atc ccg atg acc ttc cgc ccc ggc gcg atg gcg gac gtc gac	1341
Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp Val Asp	
360 365 370	
cgc tgg gtg cgc gag gac agc cgg aac atg ctc ttc gtg tac ggg cag	1389
Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr Gly Gln	
375 380 385	

```

aac gac ccg tgg agc ggt gaa ccg ttc cgc ctg ggc aag ggc gcc gcc 1437
Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly Ala Ala
      390              395              400

gcc cgg cac gac tac cgc ttc tac gcc ccg ggc ggc aac cac ggt tcc 1485
Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His Gly Ser
      405              410              415

aac atc gcc cag ttg gtg gcc gac gag cgg gcc aag gcc acg gcc gag 1533
Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr Ala Glu
      420              425              430              435

gtc ctg aag tgg gcc ggt gtg gcg ccg cag gcc gtc cag aag gac gag 1581
Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys Asp Glu
      440              445              450

aag gcc gcc aag ccg ctc gcg ccg ttc gac gcc aag ctc gac cgc gtg 1629
Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp Arg Val
      455              460              465

aag aac gac aag cag agc gcg ctg cgt ccg tagggaccca gtgcgtaagg 1679
Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro
      470              475

cggcgggcgc tcccggcgag gggcgcgcgc cgtgcggttc cggaaggccc cgggtgcgcg 1739

cgccggtgct tc 1751

```

<210> 42

<211> 477

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*)

<400> 42

```

Met Arg Lys Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly
  1              5              10              15

Ala Ile Gly Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala
      20              25              30

Pro Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys
      35              40              45

```

Phe Val Glu Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr
 50 55 60

Tyr Arg Gln Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu
 65 70 75 80

Gln Arg Phe Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe
 85 90 95

Phe Thr Ser Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro
 100 105 110

Thr Arg Ile Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe
 115 120 125

Thr Pro Ser Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp
 130 135 140

Gln Ala Ala Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val
 145 150 155 160

Tyr Gly Lys Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr
 165 170 175

Ala Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val
 180 185 190

Ala Tyr Val Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr
 195 200 205

Asp Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu
 210 215 220

Asn Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala
 225 230 235 240

Arg Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val
 245 250 255

Gly Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp
 260 265 270

Ser Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala
 275 280 285

Thr Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser
290 295 300

Gly Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr
305 310 315 320

Tyr Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro
325 330 335

His Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser
340 345 350

Tyr Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala
355 360 365

Asp Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val
370 375 380

Tyr Gly Gln Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys
385 390 395 400

Gly Ala Ala Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn
405 410 415

His Gly Ser Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala
420 425 430

Thr Ala Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln
435 440 445

Lys Asp Glu Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu
450 455 460

Asp Arg Val Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro
465 470 475

<210> 43

<211> 330

<212> PRT

<213> 肉桂链轮丝菌 (*Streptoverticillium cinnamoneum*)

<400> 43

Ser Asp Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro
 1 5 10 15

Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn
 20 25 30

Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys
 35 40 45

Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val
 50 55 60

Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala
 65 70 75 80

Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr
 85 90 95

Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala
 100 105 110

Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val
 115 120 125

Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr
 130 135 140

Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asn Asp Ala Leu
 145 150 155 160

Leu Arg Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr
 165 170 175

Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met
 180 185 190

Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg
 195 200 205

Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro
 210 215 220

Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Lys Asp Arg Ser Ile Pro

225230235240

Arg Ser Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly

245250255

Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Thr Trp Thr

260265270

His Gly Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser Asp Leu Gly Pro Met His

275280285

Val His Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe

290295300

Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr

305310315320

Ala Pro Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro

325330

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 44

ggcgatgggg aagagaaggg g

21

<210> 45
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 45

ggcggatcct cgcgtcgaga ggcgtggact ga

32

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 46
tacgaattcg agctcggtac c 21

<210> 47
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 47
ccccctctct tcccctcg ctcgcgttgc cacaggtgcg gcc 43

<210> 48
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 48
ggggtgaccc tgcgtcgga gtcgggggcc cgggagggcg cgetgg 46

<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 49

aacggggaga acagcacggc cgccgg

26

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 50

ggcgaattct ccggcgggcc gtcaccgt

29

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 51

ggcaagctta aattcctgtg aattagctga

30

<210> 52

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 52

cggcggtgct gttctccccg ttgcccgtg ccacaggtgc ggcc

44

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> 茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*)

<400> 53

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe
1 5 10 15

Val Glu Glu Lys
20

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: svPEP 的探针

<400> 54

aagatccccg ggatgaagtt cgtcaggag aag 33

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 55

gagcgggcgt cgateccgc ccc 23

<210> 56

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 56

gccaaagttg aagcaccggc ggcggcacc gg 32

<210> 57
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 57
ggggcgggtga tcgacgccgc ctctgccgtt gccacaggtg eggcca 46

<210> 58
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 58
gtgacctgt cgtcggagtc cgggaacgac gggccggcgc 40

<210> 59
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 59
gtgacctgt cgtcggagtc cgacgggcgc gcgctcgaag 40

<210> 60
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 60

aatggcgagg gggaagagac gaagtcctac gccgaaacct 40

<210> 61

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 61

gagacgaagt cctacgcga aacctaccgc ctcacggcgg 40

<210> 62

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 62

gtctcttccc ccgcgccatt tgccgttgcc acaggtgcgg 40

<210> 63

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 63

tggcgtagg acttcgtctc tgccgttgcc acaggtgcgg 40

<210> 64

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 64

gtgaccctgt cgtcggagtc cttggggccg aacgacgggc

40

<210> 65

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 65

gtgaccctgt cgtcggagtc gcggggccg aacgacgggc

40

<210> 66

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 66

gtgaccctgt cgtcggagtc cttcgggccc gcgctcgaag

40

<210> 67

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR 引物

<400> 67

gtgaccctgt cgtcggagtc gcgcgggccc gcgctcgaag

40

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> Xaa 为 Pro-pNA, pNA 为对硝基酰替苯胺

<220>

<223> 人工序列的描述: svPEP 的底物

<400> 68

Phe Arg Ala Xaa

1

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 天然型转谷氨酰胺酶的附加序列

<400> 69

Ser Ala Gly Pro Lys

1

5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 天然型转谷氨酰胺酶的附加序列

<400> 70

Ser Ala Gly Pro Arg

1

5