



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103103175 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 15

(21) 申请号 201210574276. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2003. 12. 15

C12N 9/88 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/60 (2006. 01)

368360/2002 2002. 12. 19 JP

C12N 15/63 (2006. 01)

379280/2003 2003. 11. 10 JP

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

C12P 13/02 (2006. 01)

200380106993. 0 2003. 12. 15

C12R 1/01 (2006. 01)

(71) 申请人 三井化学株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 八卷俊文 番场伸一 的石香

伊藤洁 小林英树 田中英司

及川利洋

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军 王大方

权利要求书5页 说明书133页

序列表31页 附图2页

(54) 发明名称

新型脲水合酶

(57) 摘要

本发明的目的为提供一种具有新型突变位点的脲水合酶的氨基酸序列及其基因的碱基序列,另外本发明的目的还在于提供一种对具有脲水合酶活性的酶进行修饰的方法。作为解决目前问题的方法,提供了在来源于嗜热假诺卡氏菌JCM3095、由2种异源亚单位构成的脲水合酶中引入新型突变而得到的突变体的氨基酸序列及其基因的碱基序列。而且,通过确定脲水合酶的立体结构/氨基酸序列中作为修饰对象的区域,并对与形成所述区域的氨基酸残基对应的氨基酸序列中的氨基酸进行置换、插入、缺失等改变从而修饰脲水合酶。通过本发明,能够比现有技术更高效率地将脲化合物转化为对应的酰胺化合物。

1. 一种脲水合酶突变体,是具有由序列表 1 的序列号 1 的氨基酸序列构成的 α 亚单位及由序列表 1 的序列号 2 的氨基酸序列构成的 β 亚单位的脲水合酶的至少一个以上的氨基酸置换为其它氨基酸而得到的脲水合酶突变体,其中

所述脲水合酶具有形成参与 2 聚体形成的 α 亚单位和 β 亚单位之间的结合界面、或参与 2 聚体之间结合的界面的区域,

所述脲水合酶突变体包含下述突变,所述突变是选自位于所述脲水合酶中所述结合界面或形成所述界面的区域中的、所述序列号 1 的氨基酸序列的第 71、148、188 及 204 位的氨基酸及所述序列号 2 的氨基酸序列的第 10、146、150、160、168、171、176、186、217 及 218 位氨基酸构成的组中的任一氨基酸置换为下述 (i) ~ (xv) 所示的其它氨基酸而得到的突变,

(i) 所述序列号 1 的氨基酸序列的第 71 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 His,

(ii) 所述序列号 1 的氨基酸序列的第 148 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Asp,

(iii) 所述序列号 1 的氨基酸序列的第 188 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Gly,

(iv) 所述序列号 1 的氨基酸序列的第 204 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Arg、Lys、Trp 或 Thr,

(v) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 10 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Asp、Glu、Trp、Gly、Tyr 或 Cys,

(vi) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 146 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Gly,

(vii) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 150 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Ser 或 Asn,

(viii) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 160 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Leu、Trp、Met 或 Cys,

(ix) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 168 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Glu,

(x) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 171 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Ala,

(xi) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 176 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Ala、Met、Cys 或 Thr,

(xii) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 186 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Glu、Asp、Lys、Arg、Asn、Ser 或 Gly,

(xiii) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 217 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Gly、Val、Leu、Met、Cys、Ser、Thr 或 His,

(xiv) 所述序列号 2 的氨基酸序列的第 218 位氨基酸置换为其它氨基酸时,置换为 Met 或 Ser。

2. 如权利要求 1 所述的脲水合酶突变体,其特征在于,

当包含所述 (ii) 及 (iv) 的突变时,包含所述序列号 1 的氨基酸序列第 148 位和第 204 位的氨基酸分别置换为 Asp 和 Arg 的所述 α 亚单位,或者

当包含所述 (viii) 及 (xii) 的突变时,包含所述序列号 2 的氨基酸序列第 160 位和第 186 位的氨基酸分别置换为 Trp 和 Arg 的所述 β 亚单位。

3. 如权利要求 1 所述的脲水合酶突变体,其特征在于,

当包含所述 (i) 的突变时,所述序列号 1 的氨基酸序列第 71 位氨基酸置换为 His 的所述 α 亚单位进一步包含在第 19 位和第 126 位氨基酸处分别成为 Val 和 Tyr 的置换,或者

当包含所述 (ii) 及 (iv) 的突变时,所述序列号 1 的氨基酸序列第 148 位和第 204 位氨基酸分别置换为 Asp 和 Arg 的所述 α 亚单位进一步包含在第 36 位氨基酸处成为 Met 的置换。

4. 如权利要求 1 所述的脲水合酶突变体,其特征在于,

当包含所述 (v) 的突变时,所述序列号 2 的氨基酸序列第 10 位氨基酸置换为 Asp 的所述 α 亚单位进一步包含在第 118 位和第 200 位氨基酸处分别成为 Val 和 Glu 的置换,或者

当包含所述 (vii) 及 (xii) 的突变时,所述序列号 2 的氨基酸序列第 160 位和第 186 位氨基酸分别置换为 Trp 和 Arg 的所述 β 亚单位进一步包含在第 127 位氨基酸处成为 Ser 的置换。

5. 如权利要求 1 所述的脲水合酶突变体,其特征在于:

当包含所述 (v) 时,所述突变体具有:包含在所述序列号 1 的氨基酸序列第 6、36 及 126 位氨基酸处分别成为 Thr、Met 和 Tyr 的置换的所述 α 亚单位,及包含在所述序列号 2 的氨基酸序列第 10、118 及 200 位氨基酸处分别成为 Asp、Val 和 Glu 的置换的所述 β 亚单位,或者

当包含所述 (ii) 及 (iv) 的突变时,所述突变体具有:包含在所述序列号 1 的氨基酸序列第 36、148 及 204 位氨基酸处分别成为 Met、Asp 和 Arg 的置换的所述 α 亚单位,且包含在所述 β 亚单位的序列号 2 的氨基酸序列第 41、51 及 108 位氨基酸处分别成为 Ile、Val 和 Asp 的置换的所述 β 亚单位,或者

当包含所述 (ii) 及 (iv) 的突变时,所述突变体具有:包含在所述序列号 1 的氨基酸序列第 148 及 204 位氨基酸处分别成为 Asp 和 Arg 的置换的所述 α 亚单位,且包含在所述 β 亚单位的序列号 2 的氨基酸序列第 108 及 200 位氨基酸处分别成为 Asp 和 Glu 的置换的所述 β 亚单位。

6. 如权利要求 1 所述的脲水合酶突变体,

当包含所述 (viii) 及 (xii) 的突变时,包含在所述 α 亚单位的所述序列号 1 的氨基酸序列第 6、19 和 126 位氨基酸处分别成为 Ala、Val 和 Tyr 的置换,且包含在所述 β 亚单位的所述序列号 2 的氨基酸序列第 127、160 和 186 位氨基酸处分别成为 Ser、Trp 和 Arg 的置换,或者

当包含所述 (i) 的突变时,包含在所述 α 亚单位的所述序列号 1 的氨基酸序列第 19、71 和 126 位氨基酸处分别成为 Val、His 和 Tyr 的置换,且包含在所述 β 亚单位的所述序列号 2 的氨基酸序列第 37、108 和 200 位氨基酸处分别成为 Leu、Asp 和 Glu 的置换,或者

当包含所述 (i) 的突变时,包含在所述 α 亚单位的所述序列号 1 的氨基酸序列第 19、71 和 126 位氨基酸处分别成为 Val、His 和 Tyr 的置换,且包含在所述 β 亚单位的所述序列号 2 的氨基酸序列第 37、108 和 200 位氨基酸处分别成为 Val、Asp 和 Glu 的置换。

7. 一种编码脲水合酶的基因,具有编码脲水合酶的 α 亚单位的氨基酸序列的基因与编码脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列的基因,其特征在于,编码如权利要求 1 或 2 所述的脲水合酶突变体。

8. 如权利要求 7 所述的基因,其特征在于,

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含下述置换的碱基序列：
序列表的序列号 3 的碱基序列中第 211 至 213 位碱基处成为 CAT 的置换，或
第 442 至 444 位成为 GAC 的置换，或
第 562 至 564 位成为 GGC 的置换，或
第 610 至 612 位成为 CGC、AAA、TGG 或 ACC 的置换，或

编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含下述置换的碱基序列：
序列表的序列号 4 的碱基序列中第 28 至第 30 位碱基处成为 GAC、GAA、TGG、GGC、TAC
或 TGC 的置换，或

第 436 至 438 位成为 GGG 的置换，或
第 448 至 450 位碱基处成为 TCG 或 AAT 的置换，或
第 478 至 480 位碱基处成为 CTG、TGG、ATG 或 TGT 的置换，或
第 502 至 504 位碱基处成为 GAG 的置换，或
第 511 至 513 位碱基处成为 GCG 的置换，或
第 526 至 528 位碱基处成为 GCC、ATG、TGC 或 ACC 的置换，或
第 556 至 558 位碱基处成为 GAG、GAT、AAG、CGG、AAC、TCG 或 GGG 的置换，或
第 649 至 651 位碱基处成为 GGC、GTC、CTC、ATG、TGT、AGC、ACC 或 CAC 的置换，或
第 652 至 654 位碱基处成为 ATG 或 TCC 的置换。

9. 如权利要求 7 所述的基因，其特征在于，

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含下述置换的碱基序列：序列表的序列号 3 的碱基序列中第 442 至 444 位和第 610 至 612 位碱基处分别成为 GAC 和 CGC 的置换，或者

编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含下述置换的碱基序列：序列表的序列号 4 的碱基序列中第 478 至 480 位和第 556 至 558 位碱基处分别成为 TGG 和 CGG 的置换。

10. 如权利要求 7 所述的基因，其特征在于，编码权利要求 3 所述的脲水合酶突变体。

11. 如权利要求 8 所述的基因，其特征在于，

具有所述序列号 3 的碱基序列中第 211 至 213 位碱基处置换为 CAT 的碱基序列的编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有进一步包含第 55 至 57 位和第 376 至 378 位碱基处成为 GTG 和 TAC 的置换的碱基序列，或者

具有所述序列号 3 的碱基序列中第 442 至 444 位碱基和第 610 至 612 位碱基处分别置换为 GAC 和 CGC 的碱基序列的编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有进一步包含第 106 至 108 位碱基处分别成为 ATG 的置换的碱基序列。

12. 如权利要求 7 所述的基因，其特征在于，编码权利要求 4 所述的脲水合酶突变体。

13. 如权利要求 8 所述的基因，其特征在于，

具有所述序列号 4 的碱基序列中第 28 至 30 位碱基处置换为 GAC 的碱基序列的编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有进一步包含第 352 至 354 位和第 598 至 600 位碱基处成为 GTC 和 GAA 的置换的碱基序列，或者

具有所述序列号 4 的碱基序列中第 478 至 480 位碱基和第 556 至 558 位碱基处分别置换为 TGG 和 CGG 的碱基序列的编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有进一步包含第 379 至 381 位碱基处分别成为 TCG 的置换的碱基序列。

14. 如权利要求 7 所述的基因,其特征在于,编码权利要求 5 所述的脲水合酶突变体。

15. 如权利要求 8 所述的基因,其特征在于,

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 3 的碱基序列中第 16 至 18 位、及第 106 至 108 位、及第 376 至 378 位碱基处分别成为 ACG、ATG 和 TAC 的置换的碱基序列,且编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 4 的碱基序列中第 28 至 30 位、第 352 至 354 位、及第 598 至 600 位碱基处分别成为 GAC、GTC 和 GAA 的置换的碱基序列,或者

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 3 的碱基序列中第 106 至 108 位、第 442 至 444 位及第 610 至 612 位碱基处分别成为 ATG、GAC 和 CGC 的置换的碱基序列,且编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 4 的碱基序列中第 121 至 123 位、第 151 至 153 位、及第 322 至 324 位碱基处分别成为 ATC、GTC 和 GAT 的置换的碱基序列,或者

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 3 的碱基序列中第 442 至 444 位及第 610 至 612 位碱基处分别成为 GAC 和 CGC 的置换的碱基序列,且编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 4 的碱基序列中第 322 至 324 位、及第 598 至 600 位碱基处分别成为 GAT 和 GAA 的置换的碱基序列。

16. 如权利要求 7 所述的基因,其特征在于,编码权利要求 6 所述的脲水合酶突变体。

17. 如权利要求 8 所述的基因,其特征在于,

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 3 的碱基序列中第 16 至 18 位、第 55 至 57 位、及第 376 至 378 位碱基处分别成为 GCG、GTG 和 TAC 的置换的碱基序列,且编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 4 的碱基序列中第 379 至 381 位、第 478 至 480 位、及第 556 至 558 位碱基处分别成为 TCG、TGG 和 CGG 的置换的碱基序列,或者

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 3 的碱基序列中第 55 至 57 位、第 211 至 213 位及第 376 至 378 位碱基处分别成为 GTG、CAT 和 TAC 的置换的碱基序列,且编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 4 的碱基序列中第 109 至 111 位、第 322 至 324 位、及第 598 至 600 位碱基处分别成为 CTC、GAT 和 GAC 的置换的碱基序列,或者

编码所述 α 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 3 的碱基序列中第 55 至 57 位、第 211 至 213 位及第 376 至 378 位碱基处分别成为 GTG、CAT 和 TAC 的置换的碱基序列,且编码所述 β 亚单位的氨基酸序列的基因具有包含在所述序列号 4 的碱基序列中第 109 至 111 位、第 322 至 324 位、及第 598 至 600 位碱基处分别成为 GTC、GAT 和 GAA 的置换的碱基序列。

18. 一种质粒,其特征在于,含有编码如权利要求 7~17 中任一项所述的脲水合酶突变体的基因。

19. 如权利要求 18 所述的质粒,其特征为,该质粒具有在宿主细胞内表达所述脲水合酶突变体所需的结构。

20. 一种转化子,是利用权利要求 19 所述的质粒转化宿主细胞而得到的转化子。

21. 一种生产脲水合酶的方法,其特征在于含有下述步骤,即将权利要求 20 所述的转

化子在培养基中培养,基于所述转化子中所述质粒具有的腈水合酶基因生产腈水合酶的步骤。

22. 如权利要求 21 所述的生产方法,其特征为,该方法进一步含有从所述培养后的转化子、培养液、及其处理物中回收腈水合酶的步骤。

23. 一种制备酰胺化合物的方法,是使腈化合物与腈水合酶接触而得到对应的酰胺化合物的制备方法,其特征为,所述腈水合酶为如权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的腈水合酶突变体。

新型脬水合酶

[0001] 本申请是申请日为 2003 年 12 月 15 日、申请号为 200380106993.0 (国际申请号为 PCT/JP2003/016014)、发明名称为“新型脬水合酶”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种新型脬水合酶及编码其的基因、含有该基因的质粒、经该质粒转化了的细胞株、及用所述细胞株生产脬水合酶的方法、以及利用培养所述细胞株得到的培养液、细胞、细胞处理物从脬化合物制备对应的酰胺化合物的方法。

[0003] 另外,本发明还涉及一种改变具有脬水合酶活性的酶的性质。此外,本发明还涉及一种改变了性质的酶及编码其的基因、含有所述基因的质粒、经所述质粒转化了的细胞株、用所述细胞株生产脬水合酶的方法,以及利用培养所述细胞株得到的培养液、细胞、细胞处理物从脬化合物制备对应的酰胺化合物的方法。本发明可有效用于利用生物催化剂的物质生产领域中。

背景技术

[0004] 已经发现了作为具有脬水合活性的酶的脬水合酶,该酶能够通过水合作用将各种化合物的脬基转换成酰胺基,并且公开了多种生产该酶的微生物株。为了在工业上利用脬水合酶从脬化合物制造酰胺化合物,降低该酶的制造成本在酰胺化合物的制造成本中所占的比例尤显重要。具体而言,必须提高每单位重量酶制备物中该酶的含量。因此为了利用所述酶的基因通过基因工程学方法大量表达所述酶,尝试对所述酶的基因进行克隆的方法。

[0005] 作为具有脬水合酶活性的微生物,有紫红红球菌 J-1 株(根据布达佩斯条约,保藏在茨城县筑波市东 1-1-1 号中央第 6 独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心,保藏编号为 FERMBP-1478)、嗜热假诺卡氏菌(本菌株保藏在理化学研究所微生物系统保存处(埼玉县和光市广泽 2-1),保藏编号为 JCM3095,任何人都可经申请获得;另外,根据布达佩斯条约,保藏在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心,保藏编号为 FERM BP-7379。)(参照专利文献 1 及 3)。

[0006] 另外,从上述菌株中分离出了脬水合酶,已经确认了该酶一般以称为 α 亚单位及 β 亚单位的 2 种多肽为构成要素。并且,从上述菌株中分离出了脬水合酶基因,确定了其氨基酸序列和碱基序列。进而,制备了可使上述脬水合酶在转化子内表达的质粒及经所述质粒转化了的细胞株(例如, TG1/pNHJ10H 及 MT-10822;根据布达佩斯条约,前者保藏在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心,保藏编号为 FERM BP-2777;后者于 1996 年 2 月 7 日保藏在茨城县筑波市东 1-1-1 号中央第 6 独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心,保藏编号为 FERM BP-5785)。除此之外,能够经上述细胞株生产脬水合酶、以及通过使所述细胞株或者由其制得的脬水合酶与脬化合物接触以制备对应的酰胺化合物(参照专利文献 2、4,非专利文献 1)。

[0007] 另外,也进行了分析脬水合酶的立体结构的尝试,分析结果以 PDB 编号 1AHJ、2AHJ、1IRE 被公开。已知所述酶的基本结构单位为 α 亚单位及 β 亚单位结合而成的 2 聚

体,该 2 聚体进一步结合形成 4 聚体、8 聚体、12 聚体(根据来源的生物种而不同)而发挥活性。另外,形成活性中心的区域、结构也已明确,活性中心并非表露于与反应溶剂直接接触的酶外侧的位置,而是包埋于酶的内部。也清楚发挥活性所必须的金属原子(钴原子或者铁原子:根据来源的生物种而不同)在活性中心的配位形态,并已知作为伴随金属原子配位发生的现象,形成活性中心区域的氨基酸序列中半胱氨酸残基在翻译后发生氧化。具体而言, α 亚单位的氨基酸序列中序列 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ (其中,C 表示半胱氨酸,X 表示丝氨酸或苏氨酸,L 表示亮氨酸, C_1 表示半胱亚磺酸(cysteine sulfinic acid、3-sulfinoalanine), S 表示丝氨酸, C_2 表示半胱次磺酸(cysteine sulfenic acid、S-hydroxy-cysteine), X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 表示任意氨基酸)表示的区域为构成金属原子在活性中心进行配位的区域(参照非专利文献 2~4)。

[0008] 但是,还没有任何发明公开关于在不影响脞水合酶自身活性的情况下,改变其活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性等性质的具体方法。特别是着眼于脞水合酶的立体结构、通过改变结构而改变上述性质的方法还未作任何尝试。

[0009] 另外,专利文献 5 中公开了使编码脞水合酶的基因在宿主细胞中表达而生产具有酶活性的脞水合酶时,存在一种参与激活所述酶的蛋白质。

[0010] 专利文献 1:特开平 2-470 号公报

[0011] 专利文献 2:特开平 4-211379 号公报

[0012] 专利文献 3:特开平 8-56684 号公报

[0013] 专利文献 4:特开平 9-275978 号公报

[0014] 专利文献 5:特开平 11-253168 号公报

[0015] 非专利文献 1:Kobayashi M, Nishiyama M, Nagasawa T, Horinouchi S, Beppu T, Yamada H. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Dec 2;1129(1):23-33.

[0016] 非专利文献 2:Huang W, Jia J, Cummings J, Nelson M, Schneider G, Lindqvist Y. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. *Structure*. 1997 May 15;5(5):691-9.

[0017] 非专利文献 3:Nagashima S, Nakasako M, Dohmae N, Tsujimura M, Takio K, Odaka M, Yohda M, Kamiya N, Endo I. Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. *Nat Struct Biol*. 1998 May;5(5):347-51.

[0018] 非专利文献 4:Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K., and Wakagi, T. Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. *Biochem. Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov 16;288(5):1169-74.

发明内容

[0019] 本发明的目的在于提供一种具有新型置换突变位点但功能无实质变化的脞水合酶的氨基酸序列和该基因的碱基序列,还提供一种含有所述基因的质粒、经所述质粒转化了的细胞株、及用所述细胞株生产所述酶的方法,以及利用培养所述细胞株得到的培养液、细胞、细胞处理物从脞化合物制备对应的酰胺化合物的方法。

[0020] 本发明的其它目的在于提供一种在不损害脲水合酶自身活性的情况下,改变其活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性等性质中的一种或一种以上的具体方法。具体而言,提供一种通过在脲水合酶基因中引入导致脲水合酶立体结构发生变化的突变而改变上述性质的方法,进而,提供一种经修饰方法得到的脲水合酶、编码所述脲水合酶的基因、含有所述基因的质粒、经所述基因或所述质粒转化了的细胞株、用所述细胞株生产所述脲水合酶的方法、以及利用培养所述细胞株得到的培养液、细胞、细胞处理物从脲化合物制备对应的酰胺化合物的方法。

[0021] 本发明人等基于上述情况,在特开平 9-275978 号公报(专利文献 4)中公开的脲水合酶基因中引入了未在该文献中公开的新型置换突变位点,并确定了导入所述突变后所述基因的碱基序列。进而制备出了含有所述基因的质粒、经所述质粒转化了的细胞株。另外,通过反复深入地研究了利用所述细胞株生产所述酶、或利用培养所述细胞株得到的培养液、细胞、细胞处理物从脲化合物制备出对应的酰胺化合物,从而完成了本发明。

[0022] 本发明的脲水合酶的 α 亚单位的特征为,其氨基酸序列具有下述突变,即,在序列号 1 表示的 α 亚单位的氨基酸序列中第 36、71、148、及 204 位氨基酸中的任何一个或一个以上氨基酸被置换为其它氨基酸。

[0023] 本发明的脲水合酶的 β 亚单位的特征为,其氨基酸序列具有下述突变,即,在序列表的序列号 2 表示的 β 亚单位的氨基酸序列中第 10、32、37、41、46、48、51、72、118、127、146、160、186、及 217 位氨基酸中的任何一个或一个以上氨基酸被置换为其它氨基酸。

[0024] 本发明的脲水合酶的特征为,具有 α 亚单位和 β 亚单位,上述亚单位中至少一方存在上述突变。

[0025] 编码本发明脲水合酶的 α 亚单位的基因的特征为,其负责编码存在于上述 α 亚单位中的突变的氨基酸序列;编码本发明脲水合酶的 β 亚单位的基因的特征为,其负责编码存在于上述 β 亚单位中的突变的氨基酸序列。

[0026] 编码本发明脲水合酶的基因的特征为,包含编码 α 亚单位的基因和编码 β 亚单位的基因,上述亚单位中至少一方存在上述突变。

[0027] 本发明的质粒的特征为,具有上述的任一种基因。

[0028] 本发明的转化子的特征为,通过利用上述质粒转化宿主细胞而得到。

[0029] 本发明中脲水合酶的制备方法特征为,其包含从上述转化子、上述转化子的培养液、或者上述转化子或上述培养液的处理物中回收脲水合酶的步骤。

[0030] 本发明的酰胺化合物的制备方法的特征为包含下述步骤:在水性介质中使脲化合物与上述脲水合酶接触,从而将所述脲化合物转化为对应的酰胺化合物的步骤。

[0031] 另外,本发明人等鉴于上述情况,以专利文献 2、专利文献 4 中公开的脲水合酶基因为例,基于新观点规定了作为突变对象的区域,并实施对脲水合酶进行修饰的方法,即对形成该区域的氨基酸残基所对应的氨基酸序列中的氨基酸进行置换、插入、或缺失等改变而修饰脲水合酶。具体而言,参照非专利文献 2、3、4、及以 PDB 号:1AHJ、2AHJ、1IRE 中公开的脲水合酶的立体结构,经深入分析研究,确定了符合要求的修饰对象区域。更具体而言,通过解析立体结构,确定了形成孔穴的区域、以及形成界面的区域,所述孔穴是底物从酶外部进入活性中心时、或产物从活性中心移至酶外部时通过的孔穴,所述界面为参与 2 聚体形成的 α 亚单位和 β 亚单位之间结合的界面及参与 2 聚体之间相互结合的界面。对氨基

酸序列进行置换、插入、缺失等修饰的方法没有特别的限制,可以举出例如采用基因重组手段引入突变的方法。

[0032] 进一步确定了经所述修饰后该基因的碱基序列,制备了含有所述基因的质粒、经所述基因或质粒转化了的细胞株,用所述细胞株生产所述酶或利用培养所述细胞株得到的培养液、细胞、细胞处理物从胍化合物制备对应的酰胺化合物,从而观察了修饰方法对胍水合酶的性质造成了何种改变。经过反复深入研究构成作为修饰对象的胍水合酶的氨基酸序列中各位点的改变及由此得到的各种修饰酶,从而完成了本发明。

[0033] 即,除了上述特征,本发明还涉及下述 [1] ~ [22] 中所述内容。

[0034] [1]. 一种具有胍水合酶活性的酶的修饰方法,该方法通过以下步骤确定特定的氨基酸残基,并对特定的氨基酸残基中 1 个或 1 个以上的位点进行置换、插入或缺失处理从而改变该酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中的任何 1 种或 1 种以上的性质,这些步骤为:

[0035] (a) 将修饰前的具有胍水合酶活性的酶的氨基酸序列与序列表中序列号 98 记载的氨基酸序列及序列表中序列号 99 记载的氨基酸序列进行对比;

[0036] (b) 根据对比的结果确定与下述区域对应的氨基酸残基,所述区域为,序列表中序列号 98 记载的氨基酸序列中从第 36 位的苏氨酸到第 48 位的天冬酰胺的区域、序列表中序列号 99 记载的氨基酸序列中从第 31 位的赖氨酸到第 51 位的苯丙氨酸的区域、以及从第 112 位的赖氨酸到第 127 位的亮氨酸的区域;

[0037] (c) 对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理。

[0038] [2]. 一种具有胍水合酶活性的酶的修饰方法,该方法通过以下步骤确定特定的氨基酸残基,并对特定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上的位点进行置换、插入或缺失处理从而改变所述酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中任何 1 种或 1 种以上性质,这些步骤为:

[0039] (d) 将修饰前的具有胍水合酶活性的酶的氨基酸序列与序列表中序列号 98 记载的氨基酸序列及序列表中序列号 99 记载的氨基酸序列进行对比;

[0040] (e) 根据对比的结果确定与序列表中序列号 98 记载的氨基酸序列中第 36、48、71、148、188、204 位对应的氨基酸残基、与序列表中序列号 99 记载的氨基酸序列中第 10、32、33、37、40、41、46、48、51、61、72、112、118、127、146、150、160、168、171、176、186、217、218 位对应的氨基酸残基;

[0041] (f) 对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理。

[0042] [3]. 一种具有胍水合酶活性的酶的修饰方法,该方法通过以下步骤确定特定的氨基酸残基,并对特定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上的位点进行置换、插入或缺失处理从而改变所述酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中任何 1 种或 1 种以上性质,

[0043] (g) 基于 PDB (Protein Data Bank) 号:1IRE 记载的胍水合酶的立体结构和与氨基酸序列进行对比的结果推定修饰前的具有胍水合酶活性的酶的立体结构;

[0044] (h) 根据推定的立体结构确定与 PDB 号:1IRE 记载的胍水合酶立体结构的 A 链 (Chain 1IRE :A) 中从 N 末端算起的第 2 个螺旋对应的区域的氨基酸残基;以及与 B 链 (Chain 1IRE :B) 中从 N 末端算起的第 1 个螺旋、第 2 个螺旋、及夹在其间的环状部分、和从

C 末端算起的第 3 个螺旋对应的区域的氨基酸残基；

[0045] (i) 对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理。

[0046] [4]. 一种具有脲水合酶活性的酶的修饰方法,该方法经以下步骤确定特定的氨基酸残基,并对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上的位点进行置换、插入或缺失处理从而改变所述酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中任何 1 种或 1 种以上性质,

[0047] (j) 基于 PDB 号 :1IRE 记载的脲水合酶的立体结构和与氨基酸序列进行对比的结果推定修饰前的具有脲水合酶活性的酶的立体结构；

[0048] (k) 根据推定的立体结构确定与 PDB 号 :1IRE 记载的脲水合酶立体结构的 A 链中从 N 末端算起作为第 89 位氨基酸残基的谷氨酰胺、作为第 165 位氨基酸残基的谷氨酸、以及从 B 链 N 末端算起作为第 37 位氨基酸残基的苯丙氨酸、作为第 48 位氨基酸的亮氨酸对应的 4 个氨基酸残基；

[0049] (l) 确定下述氨基酸残基,所述氨基酸残基的侧链前端重原子位于立体结构中半径为 $5\text{\AA}$ 的范围内,该立体结构分别以上述确定的 4 个氨基酸残基的侧链前端重原子为其中心点；

[0050] (m) 对上述 l 中确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理。

[0051] [5]. 一种具有脲水合酶活性的酶的修饰方法,该方法经以下步骤确定特定的氨基酸残基,并对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上的位点进行置换、插入或缺失处理从而改变所述酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中任 1 种或 1 种以上的性质,

[0052] (n) 基于 PDB 号 :1IRE 记载的脲水合酶的立体结构和氨基酸序列进行对比,根据对比结果来推定修饰前的具有脲水合酶活性的酶的立体结构；

[0053] (o) 根据推定的立体结构确定形成下述孔穴的区域,所述孔穴是底物从酶外部进入活性中心时、或产物从活性中心移至酶外部时通过的孔穴；

[0054] (p) 在构成确定的区域的氨基酸残基中确定如下的氨基酸残基,这些氨基酸残基的改变使孔穴尺寸发生变化,进而可控制底物 / 产物通过的难易程度；

[0055] (q) 对上述 p 中确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理。

[0056] [6]. 一种具有脲水合酶活性的酶的修饰方法,该方法经以下步骤确定特定的氨基酸残基,并对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上的位点进行置换、插入或缺失处理从而改变所述酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中任 1 种或 1 种以上性质,

[0057] (r) 基于 PDB 号 :1IRE 记载的脲水合酶的立体结构和氨基酸序列进行对比,根据对比结果来推定修饰前的具有脲水合酶活性的酶的立体结构；

[0058] (s) 根据推定的立体结构确定以下共计 4 个氨基酸残基,该氨基酸残基为与 PDB 号 :1IRE 记载的脲水合酶立体结构中从 A 链的 N 末端算起第 89 位氨基酸的谷氨酰胺 (A89Q)、第 165 位氨基酸的谷氨酸 (A165E) 对应的氨基酸残基,以及与从 B 链的 N 末端算起第 37 位氨基酸的苯丙氨酸 (B37F)、作为第 48 位氨基酸的亮氨酸 (B48L) 对应的氨基酸残

基；

[0059] (t) 规定对应于 A165E 的氨基酸残基和对应于 B48L 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d1, 对应于 A89Q 的氨基酸残基和对应于 B48L 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d2, 对应于 B37F 的氨基酸残基和对应于 B48L 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d3, 确定使 d1 ~ d3 中的 1 项或 1 项以上发生变化的氨基酸残基；

[0060] (u) 对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理。

[0061] [7]. 在 [6] 记载的修饰方法中, (t) 的步骤如下述 (t') 所述,

[0062] (t') 规定对应于 A165E 的氨基酸残基和对应于 B48L 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d1, 对应于 A89Q 的氨基酸残基和对应于 B48L 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d2, 对应于 B37F 的氨基酸残基和对应于 B48L 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d3, 对应于 A165E 的氨基酸残基和对应于 B37F 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d4, 对应于 A89Q 的氨基酸残基与对应于 B37F 的氨基酸残基之间的最短重原子间距为 d5, 确定使 d1 ~ d5 中的 1 项或 1 项以上发生变化的氨基酸残基。

[0063] [8]. 如 [1] ~ [7] 中任一项所述的修饰方法, 其特征为, 修饰前的具有腈水合酶活性的酶含有下述 [A] 和 [B] 所述的 2 种多肽：

[0064] [A] 由与序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列有 40% 或 40% 以上同源性的氨基酸序列形成的多肽；

[0065] [B] 由与序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列有 25% 或 25% 以上同源性的氨基酸序列形成的多肽。

[0066] [9]. 如 [8] 所述的修饰方法, 其特征为, [A] 所述的多肽为下述 [C] 所述的多肽, [B] 所述的多肽为下述 [D] 所述的多肽,

[0067] [C] 由下述任一种氨基酸序列形成的多肽, 所述氨基酸序列为序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列；对序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中的至少 1 个位点进行置换、插入、或缺失处理而得到的氨基酸序列；将序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中的第 6、19、38、77、90、102、106、126、130、142、146、187、194、203 位氨基酸中的至少 1 个氨基酸置换为其它氨基酸而得到的氨基酸序列。

[0068] [D] 由下述任一种氨基酸序列形成的多肽, 所述氨基酸序列为序列表中序列号 99 记载的氨基酸序列；对序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中的至少 1 个位点进行置换、插入、或缺失处理而得到的氨基酸序列；将序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中的第 20、21、108、200、212 位氨基酸中的至少 1 个氨基酸置换为其它氨基酸而得到的氨基酸序列。

[0069] [10]. 如 [8] 所述的修饰方法, 其特征为, [A] 所述的多肽为下述 [E] 所述的多肽, [B] 所述的多肽为下述 [F] 所述的多肽。

[0070] [E] 由与下述氨基酸序列相同的氨基酸序列形成的多肽, 所述氨基酸序列为序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 704 位到第 1315 位碱基形成的 ORF (Open Reading Frame, 开放读码框) 所编码的氨基酸序列。

[0071] [F] 由与下述氨基酸序列相同的氨基酸序列形成的多肽, 所述氨基酸序列为序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 位到第 680 位碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列。

[0072] [11]. 一种修饰前具有脲水合酶活性的酶的修饰方法,该方法经以下步骤确定特定的氨基酸残基,并对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理从而改变所述酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中的任何 1 种或 1 种以上性质,其特征为,所述修饰前具有脲水合酶活性的酶中作为构成要素含有的 2 种多肽中,一种为 [10] 中的 [E] 记载的多肽,另一种为 [10] 中的 [F] 记载的多肽,

[0073] (d') 将修饰前的具有脲水合酶活性的酶的氨基酸序列与序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列进行对比,

[0074] (e') 根据对比的结果确定与序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中第 48、51 位对应的氨基酸残基,

[0075] (f') 对确定的氨基酸残基中的 1 个或 1 个以上位点进行置换、插入或缺失处理。

[0076] [12]. 如 [8] 所述的修饰方法,其特征为, [A] 所述的多肽为下述 [G] 所述的多肽,

[0077] [G] 含有氨基酸序列为 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ 的区域的多肽 (其中, C 表示半胱氨酸, X 表示丝氨酸或苏氨酸, L 表示亮氨酸, C_1 表示半胱亚磺酸 (cysteine sulfinic acid、3-sulfinoalanine), S 表示丝氨酸, C_2 表示半胱次磺酸 (cysteine sulfenic acid、S-hydroxy-cysteine), X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 表示任意氨基酸)。

[0078] [13]. 如 [12] 所述的修饰方法,其特征为,所述序列中 X_1 表示缬氨酸, X_4 表示色氨酸, X_5 表示脯氨酸。

[0079] [14]. 如 [13] 所述的修饰方法,其特征为,所述序列中 X_2 表示酪氨酸, X_3 表示脯氨酸。

[0080] [15]. 如 [12] ~ [14] 中任一项所述的修饰方法,其特征为,通过 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ 序列表示的区域与金属原子结合。

[0081] [16]. 如 [15] 所述的修饰方法,其特征为,所述金属原子为钴原子。

[0082] [17]. 一种修饰酶,其特征为,所述酶是利用 [1] ~ [16] 中任一项所述的修饰方法而得到的。

[0083] [18]. 一种基因,其特征为,所述基因是编码 [17] 所述修饰酶的基因。

[0084] [19]. 一种质粒,其特征为,所述质粒含有 [18] 所述的基因。

[0085] [20]. 一种转化子,其特征为,所述转化子是利用 [18] 所述基因或 [19] 所述质粒转化微生物而得到的。

[0086] [21]. 一种制备修饰酶的方法,其特征为,所述方法包含从培养 [20] 所述的转化子而得到的培养液、细胞、或其处理物中回收修饰酶的步骤。

[0087] [22]. 一种制备酰胺化合物的方法,其特征为,所述方法包含以下步骤:在溶剂中,使培养 [20] 所述的转化子而得到的培养液、细胞、或其处理物、或者经 [21] 所述的制备方法得到的修饰酶与脲化合物接触,从而将该脲化合物转化为对应的酰胺化合物。

[0088] 本发明提供一种脲水合酶的氨基酸序列及所述基因的碱基序列,所述脲水合酶来源于嗜热假诺卡氏菌,具有新型突变位点,但其本质功能未发生变化。本发明进一步提供一种含有所述基因的质粒、含有所述质粒的转化子、用所述转化子生产所述酶的方法、以及利用所述转化子从脲化合物制备对应的酰胺化合物的方法。

[0089] 本发明还提供一种酶的修饰方法,其采用以改变具有脲水合酶活性的酶的立体结构为特征的方法来修饰在修饰前具有脲水合酶活性的酶。作为采用上述方法的修饰方法可

获得的效果的特征可以举出,能够改变活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性等性质中的 1 种或 1 种以上性质。另外本发明提供一种具有新型突变位点的脬水合酶、及编码构成所述酶的多肽链的基因。还可以提供一种含有所述基因的质粒、含有所述基因或所述质粒的转化子、利用所述转化子生产所述酶的方法,以及利用所述转化子从脬化合物制备对应的酰胺化合物的方法。

附图说明

[0090] 图 1 表示从 MT10822 提取的质粒 pPT-DB1 的限制性核酸内切酶的酶切图。(参考例 1、实施例 1、83)

[0091] 图 2 表示用于表达具有活性的来源于紫红红球菌 J-1 株的脬水合酶而构建的质粒 pJ1H-DB1 的限制性核酸内切酶的酶切图。(实施例 84)

[0092] 图 1 及图 2 中使用的省略符号的含义如下:

[0093] bla 表示编码 β -内酰胺酶的 ORF。

[0094] Col E1-ori 表示 Col E1 系统的复制起始位点。

[0095] lacZ 表示来源于 pUC 18 的乳糖操纵子中的启动子和操纵基因区域。

[0096] NH α 表示编码来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶的 α 亚单位的 ORF。

[0097] NH β 表示编码来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶的 β 亚单位的 ORF。

[0098] P16 表示编码下述蛋白质的 ORF,所述蛋白质的特征为,其参与来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶的激活。

[0099] nhhA 表示编码来源于紫红红球菌 J-1 株的脬水合酶的 α 亚单位的 ORF。

[0100] nhhB 表示编码来源于紫红红球菌 J-1 株的脬水合酶的 β 亚单位的 ORF。

具体实施方式

[0101] 下面更详细地说明本发明。

[0102] 本发明的脬水合酶是在具有脬水合酶活性的酶中引入突变而得到的,例如,在来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶中引入突变而得到。具体而言,其基本上可通过序列表的序列号 1 及 2 表示的氨基酸序列中至少 1 个或 1 个以上特定位置的氨基酸经其它氨基酸置换而构成。即,本发明包含以下脬水合酶:以序列表的序列号 1 中的 205 个氨基酸的序列所表示的 α 亚单位内至少 1 个或 1 个以上氨基酸被其它氨基酸置换而得到的序列为构成要素的脬水合酶、以序列表的序列号 2 中的 233 个氨基酸的序列所表示的 β 亚单位中至少 1 个或 1 个以上氨基酸被其它氨基酸置换而得到的序列为构成要素的脬水合酶、以及同时以上述两种序列为构成要素的脬水合酶。

[0103] 本发明中在来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶中引入突变而得到的脬水合酶中所使用的具体氨基酸序列中包括以下序列:

[0104] (a-0) 序列号 1 表示的 α 亚单位的氨基酸序列,

[0105] (a-1) 具有突变的氨基酸序列,即,序列号 1 表示的 α 亚单位的氨基酸序列中第 36、71、148、204 位氨基酸中的任一个或一个以上氨基酸被置换为其它氨基酸。

[0106] (a-2) 具有突变的氨基酸序列,即,序列表中序列号 1 表示的 α 亚单位的氨基酸序列中第 6、19、38、77、90、102、106、126、130、142、146、187、194、203 位氨基酸中的任一个或

一个以上氨基酸被置换为其它氨基酸。

[0107] (b-0) 序列表中序列号 2 表示的 β 亚单位的氨基酸序列，

[0108] (b-1) 具有突变的氨基酸序列，即，序列表的序列号 2 表示的 β 亚单位的氨基酸序列中第 10、32、37、41、46、48、51、72、118、127、146、160、186、217 位氨基酸中的任一个或一个以上氨基酸被置换为其它氨基酸。

[0109] (b-2) 具有突变的氨基酸序列，即，序列表的序列号 2 表示的 β 亚单位的氨基酸序列中第 20、21、108、200、212 位氨基酸中任一个或一个以上氨基酸被置换为其它氨基酸。

[0110] 上述各突变至少能够维持突变前的脬水合酶的活性。

[0111] 本发明在来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶中引入突变而得到的脬水合酶由以下构成要素形成，所述构成要素具有选自上述 (a-0) ~ (b-2) 的氨基酸序列。

[0112] (A-1) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0113] (A-2) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 和 (a-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0114] (B-1) 脬水合酶的 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0115] (B-2) 脬水合酶的 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 和 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0116] (A-3) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有上述 (b-0) 所述氨基酸序列。

[0117] (A-4) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0118] (A-5) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0119] (A-6) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 和 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0120] (A-7) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 和 (a-2) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有上述 (b-0) 所述氨基酸序列。

[0121] (A-8) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 和 (a-2) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0122] (A-9) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 和 (a-2) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0123] (A-10) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-1) 和 (a-2) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 和 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0124] (B-3) 脬水合酶的 α 亚单位具有上述 (a-0) 所述氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 的突变的氨基酸序列。

[0125] (B-4) 脬水合酶的 α 亚单位具有上述 (a-0) 所述氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 和 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0126] (B-5) 脬水合酶的 α 亚单位具有包含上述 (a-2) 所述突变的氨基酸序列、且 β 亚单位具有包含上述 (b-1) 和 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0127] 另外，对于上述确定的突变位点以外的氨基酸，只要在不损害经上述特定定位点突

变而得到的目标脬水合酶活性的范围内,也可以进行氨基酸的置换、插入、缺失处理。

[0128] 本发明在来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶中引入突变而得到的脬水合酶基因包括编码脬水合酶的 α 亚单位的基因和编码脬水合酶的 β 亚单位的基因。

[0129] 作为本发明所述基因的一族,可以举出在来源于嗜热假诺卡氏菌的脬水合酶基因中实施引入突变处理而得到的基因,其中包括编码 α 亚单位的氨基酸序列的基因、编码 β 亚单位的基因、以及同时含有编码 α 亚单位的基因和编码 β 亚单位的基因的脬水合酶基因。

[0130] 具体可以举出以下基因。

[0131] (G-1) 具有下述碱基序列的基因,所述碱基序列编码具有上述 (a-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0132] (G-2) 具有下述碱基序列的基因,所述碱基序列编码具有上述 (a-1) 和 (a-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0133] (G-3) 具有下述碱基序列的基因,所述碱基序列编码具有上述 (b-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0134] (G-4) 具有下述碱基序列的基因,所述碱基序列编码具有上述 (b-1) 和 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0135] (G-5) 具有下述碱基序列的基因,所述碱基序列编码上述 (A-1) ~ (B-4) 所述的任一脬水合酶。

[0136] 编码作为上述突变基础的序列号 1 所述的 α 亚单位的氨基酸序列的碱基序列优选为序列号 3 所述的碱基序列。编码作为上述突变基础的序列号 2 所述的 β 亚单位的氨基酸序列的碱基序列优选为序列号 4 所述的碱基序列。

[0137] 例如,以序列号 3 为基础时,上述 (a-1) 所述突变可通过将序列号 3 的碱基序列中的下述任何 1 个或 1 个以上碱基序列置换为其它碱基序列而得到:第 106 到第 108 位、从第 211 到第 213 位、从第 442 到第 444 位、及从第 610 到第 612 位。

[0138] 另外,以序列号 3 为基础时,上述 (a-2) 所述突变可通过将序列号 3 的碱基序列中的下述任何 1 个或 1 个以上碱基序列置换为其它碱基序列而得到:第 16 到第 18 位、从第 55 到第 57 位、从第 112 到第 114 位、从第 229 到第 231 位、从第 268 到第 270 位、从第 304 到第 306 位、从第 316 到第 318 位、从第 376 到第 378 位、从第 388 到第 390 位、从第 424 到第 426 位、从第 436 到第 438 位、从第 559 到第 561 位、从第 580 到第 582 位、从第 607 到第 609 位。

[0139] 以序列号 4 为基础时,上述 (b-1) 所述突变可通过将序列号 4 的碱基序列中的下述任何 1 个或 1 个以上碱基序列置换为其它碱基序列而得到:第 28 到第 30 位、从第 94 到第 96 位、从第 109 到第 111 位、从第 121 到第 123 位、从第 136 到第 138 位、从第 142 到第 144 位、从第 151 到第 153 位、从第 214 到第 216 位、从第 352 到第 354 位、从第 379 到第 381 位、从第 436 到第 438 位、从第 478 到第 480 位、从第 556 到第 558 位、从第 649 到第 651 位。

[0140] 另外,以序列号 4 为基础时,上述 (b-2) 所述突变可通过将序列号 4 的碱基序列中的下述任何 1 个或 1 个以上碱基序列置换为其它碱基序列而得到:第 58 到第 60 位、从第 61 到第 63 位、从第 322 到第 324 位、从第 598 到第 600 位、以及从第 634 到第 636 位。

[0141] 上述置换在将脬水合酶的活性保持置换前的状态、或者较之有所提高的范围内进

行,所述脬水合酶中具有由各基因编码的 α 及 β 亚单位中的至少其一。另外,引入突变的方式没有特别的限制。

[0142] 对于本发明的脬水合酶基因中 (a-1)、(a-2)、(b-1)、及 (b-2) 所述突变位点之外的位点,在能够作为具有脬水合酶活性的蛋白质模型而发挥功能的范围内,也可具有经碱基的置换、插入、或缺失处理产生的附加突变。

[0143] 上述附加突变可以举出以下例子。即使在以具有某种特定的碱基序列的基因作为模板进行转录、翻译时,因其导入的宿主细胞的种类、或培养时使用的培养基的成分或组成、或培养时的温度、pH 等因素的不同,在经基因表达后宿主细胞内酶的修饰后,在保留所期望的酶活性的情况下,仍可能出现以下的突变体,即在酶的序列表中 N- 末端附近的 1 个、2 个或 2 个以上氨基酸发生缺失、或在 N- 末端插入 1 个、2 个或 2 个以上氨基酸而得到的突变体。因此此类突变的脬水合酶也包含在本发明的范围之内。

[0144] 本发明的脬水合酶生产用质粒可以利用上述脬水合酶基因进行制备,可以举出以下具体例。

[0145] (P-1) 具有下述碱基序列的质粒,所述碱基序列编码具有上述 (a-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0146] (P-2) 具有下述碱基序列的质粒,所述碱基序列编码具有上述 (a-1) 和 (a-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0147] (P-3) 具有下述碱基序列的质粒,所述碱基序列编码具有上述 (b-1) 所述突变的氨基酸序列。

[0148] (P-4) 具有下述碱基序列的质粒,所述碱基序列编码具有上述 (b-1) 和 (b-2) 所述突变的氨基酸序列。

[0149] (P-5) 具有下述碱基序列的质粒,所述碱基序列编码上述 (A-1) ~ (B-4) 中所述的任一脬水合酶。

[0150] 本发明的转化子或细胞株是利用上述质粒转化任意宿主细胞而得到的。本发明的脬水合酶的生产方法包括培养上述转化子、细胞株以生产脬水合酶的步骤。另外,本发明的酰胺化化合物的制备方法包括下述步骤:使培养用于生产上述脬水合酶的转化子、细胞株而得到的培养液、细胞或细胞处理物在溶媒中与脬化合物接触而制备对应的酰胺化合物。

[0151] 下面对本发明中具有脬水合酶活性的酶的修饰方法进行详细说明。

[0152] 本发明的脬水合酶活性是指将脬化合物水合成为对应的酰胺化化合物的水合活性。一般而言,具有所述活性的酶的特征为,以称为 α 亚单位、 β 亚单位的 2 种多肽链作为构成要素,脬水合酶基因是指以形成上述两种多肽链为特征的两个氨基酸序列,或构成下述两个 ORF (开放读码框) 的碱基序列,所述 ORF 的特征为编码上述两个氨基酸序列。

[0153] 以来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脬水合酶 (参照序列表的序列号 98 及 99、专利文献 3、非专利文献 4、PDB 号:1IRE) 为例进行具体说明,由序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列形成的多肽及 PDB 号:1IRE 记载的脬水合酶立体结构中的 A 链为 α 亚单位;由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列形成的多肽及 PDB 号:1IRE 记载的脬水合酶立体结构中的 B 链为 β 亚单位。而由序列表的序列号 100 记载的碱基序列形成的 ORF 和由序列表的序列号 101 记载的碱基序列形成的 ORF 称为脬水合酶基因。

[0154] 另外,对于来源于紫红红球菌 J-1 株的脬水合酶 (参照序列表中序列号 104、专利

文献 2、非专利文献 1) 而言,由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 704 位到第 1315 位形成的 ORF 编码的氨基酸序列形成的多肽为 α 亚单位;由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 位到第 690 位形成的 ORF 编码的氨基酸序列形成的多肽为 β 亚单位。另外,序列表的序列号 104 记载的碱基序列编码的两个 ORF 称为胍水合酶基因。

[0155] 本发明的修饰方法是指,改变修饰前具有胍水合酶活性的酶的立体结构的方法,其目的为在不损害胍水合酶本来的活性的前提下,改变该酶的活性、底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物稳定性、产物稳定性中任何一种或一种以上的性质,该方法的特征为包括以下步骤:通过解析立体结构,确定形成下述孔穴的区域和/或形成下述界面的区域,并对与该区域中存在的氨基酸残基对应的氨基酸序列中的氨基酸中的任一或一个以上位点进行置换、插入、缺失等修饰;上述孔穴指底物从酶外部进入活性中心时、或产物从活性中心移至酶外部时通过的孔穴,上述界面为参与 2 聚体形成的 α 亚单位和 β 亚单位之间的结合界面、或参与 2 聚体之间结合的界面;

[0156] 以来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的胍水合酶(参照序列表的序列号 98 及 99、专利文献 3、非专利文献 4、PDB 号:1IRE)为例进行具体说明,与形成底物从酶外部进入活性中心时、或产物从活性中心移至酶外部时通过的孔穴的区域中存在的氨基酸残基对应的氨基酸残基可以举出,形成对应于 PDB 号 1IRE 记载的胍水合酶立体结构中的 B 链从 N 末端算起第 1 个螺旋、第 2 个螺旋、以及夹在其间的环状部分的区域的氨基酸残基;侧链前端重原子位于以下述 4 个氨基酸残基的侧链前端重原子为各自中心点的立体结构中半径 $5\text{\AA}$ 的区域以内的氨基酸残基,上述 4 个氨基酸残基为, PDB 号 1IRE 记载的胍水合酶立体结构中的从 A 链 N 末端算起第 89 位氨基酸残基的谷氨酰胺、第 165 位氨基酸残基的谷氨酸、以及从 B 链 N 末端算起第 37 位氨基酸残基的苯丙氨酸、第 48 位氨基酸的亮氨酸所对应的 4 个氨基酸残基;序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中从第 36 位的苏氨酸到第 48 位的天冬酰胺的区域、序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中从第 31 位的赖氨酸到第 51 位的苯丙氨酸的区域、以及从第 112 位的赖氨酸到第 127 位的亮氨酸的区域所对应的氨基酸残基;序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中第 37、40、41、46、48、51、61、72、112、118、127 位所对应的氨基酸残基等。

[0157] 另外,作为存在于参与 2 聚体形成的 α 亚单位和 β 亚单位之间的结合界面、或参与 2 聚体之间结合的界面的区域中的氨基酸残基所对应的氨基酸残基,可以举出对应于下述区域的氨基酸残基,所述区域为 PDB 号 1IRE 记载的胍水合酶立体结构中从 A 链 N 末端算起第 2 个螺旋、从 B 链 N 末端算起第 2 个螺旋、序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中从第 36 位的苏氨酸到第 48 位的天冬酰胺的区域、序列表的序列号 99 记载的从第 112 位的赖氨酸到第 127 位的亮氨酸的区域;以及与序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中第 36、71、148、188、204 位、与序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中第 10、32、33、112、118、127、146、150、160、168、171、176、186、217、218 位对应的氨基酸残基等。

[0158] 在构成底物从酶外部进入活性中心、或产物从活性中心移至酶外部时通过的孔穴的形成区域的氨基酸残基中,对通过修饰可改变孔穴的大小从而控制底物/产物通过的难易程度的氨基酸残基加以确定的方法可以举出,确定 PDB 号 1IRE 记载的胍水合酶立体结构中从 A 链 N 末端算起第 89 位氨基酸的谷氨酰胺(A89Q)、第 165 位氨基酸的谷氨酸(A165E)对应的氨基酸残基,以及从 B 链 N 末端算起第 37 位氨基酸的苯丙氨酸(B37F)、第 48 位氨

氨酸的亮氨酸 (B48L) 所对应的 4 个氨基酸残基, 规定 A165E 和 B48L 之间的最短重原子间距为 d_1 , A89Q 和 B48L 之间的最短重原子间距为 d_2 , B37F 和 B48L 之间的最短重原子间距为 d_3 , A165E 和 B37F 之间的最短重原子间距为 d_4 , A89Q 和 B37F 之间的最短重原子间距为 d_5 , 确定使 $d_1 \sim d_5$ 中的 1 项或 1 项以上发生变化的氨基酸残基, 或确定使 $d_1 \sim d_3$ 中的 1 项或 1 项以上发生变化的氨基酸残基。

[0159] 因此, 由下述步骤构成的修饰方法也包含在本发明的范围之内, 即, 对于作为对象的天水合酶 (以来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的天水合酶为代表例) 中与上述确定的任何一种或一种以上氨基酸残基对应的氨基酸序列中的氨基酸进行置换、插入、或缺失等修饰的步骤。

[0160] 另外, 本发明也包含下述修饰方法, 即, 将来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 以外的生物种的天水合酶 (例如, 来源于紫红红球菌 J-1 株的天水合酶) 与来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的天水合酶的立体结构、氨基酸序列进行对比, 从而找出与上述氨基酸残基对应的氨基酸残基, 并修饰对应的氨基酸序列中的氨基酸。

[0161] 实施上述例举的修饰方法时, 在基于立体结构或氨基酸序列进行的对比中使用的装置没有特别的限制, 作为氨基酸序列的对比装置可以举出日立 Soft 社制的 DNASIS、Free-Soft 的 CLUSTALW 或 BLAST 等基因序列分析软件; 而作为基于氨基酸序列的对比结果的立体结构模拟装置可以举出 Accelrys 社制的 Modeler 或 Homology 等蛋白质立体结构预测软件。

[0162] 举一例而言, 对于来源于紫红红球菌 J-1 株的天水合酶 (参照序列表的序列号 104、专利文献 2、非专利文献 1), 对比的结果为, 对应于序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中第 48 位的氨基酸残基 Leu 的氨基酸残基为 Trp, 该 Trp 与由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 个到第 690 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列中第 48 位对应; 对应于序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中第 51 位的氨基酸残基 Phe 的氨基酸残基为 Ser, 该 Ser 与由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 个到第 690 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列中第 51 位对应。上述结果与基于氨基酸序列的对比和基于立体结构的对比结果相一致。本发明也包含改变上述两个氨基酸残基所对应的氨基酸序列的氨基酸中的任一方或双方的修饰方法。

[0163] 需要说明的是, 在实施上述修饰方法时, 用于改变氨基酸残基所对应的氨基酸序列中氨基酸的引入突变的方法没有特别的限制, 可以举出利用基因重组技术将氨基酸序列中的氨基酸置换为其它氨基酸的突变引入法。

[0164] 另外, 对于计划引入的突变之外的附加引入的突变所引起的氨基酸序列或碱基序列的变化而言, 在不影响计划突变引入得到的目标天水合酶的活性的范围内, 也可发生氨基酸或碱基的置换、插入或缺失。

[0165] 上述附加导入的突变可以举例如下: 即使使用特定碱基序列的基因作为模板进行转录、翻译时, 根据导入其的宿主细胞的种类、培养时使用的培养基的成分或组成、培养时的温度、或 pH 等因素的不同, 经基因表达后宿主细胞内酶的修饰等作用, 在保留最初酶活性的情况下, 仍可能出现以下突变体, 即序列表中 N-末端附近的氨基酸中的 1 个、2 个或 2 个以上发生缺失、或 N-末端中插入 1 个、2 个或 2 个以上氨基酸。因此产生上述突变的天水合酶修饰方法也包含在本发明的范围之内。

[0166] 作为本发明修饰方法的对象的修饰前的脲水合酶,可以举出例如来源于紫红红球菌 J-1 株的脲水合酶和来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶。具体可以举出下述两种脲水合酶,其中一种为,以下述两个多肽链为构成要素的脲水合酶,所述的两个多肽链分别由与下述两个氨基酸序列相同的氨基酸序列形成,即由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 个到第 690 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列和由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 704 个到第 1315 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列;另一种脲水合酶以下述两个多肽链为构成要素,即,以由序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列形成的多肽链和由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列形成的多肽链为构成要素。

[0167] 作为本发明修饰方法的对象的修饰前的脲水合酶,也包括以下述两种多肽为构成要素的脲水合酶,所述两种多肽的其中一种为,与序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列有 40%或 40%以上同源性的氨基酸序列形成的多肽,另一种为与序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列有 25%或 25%以上同源性的氨基酸序列形成的多肽。

[0168] 作为与序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列有 40%或 40%以上同源性的氨基酸序列形成的多肽,可以举出序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列形成的多肽、对序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中至少一个位点实施置换、插入或缺失的任一种修饰后得到的氨基酸序列形成的多肽、序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中第 6、19、38、77、90、102、106、126、130、142、146、187、194、203 位氨基酸中至少一个氨基酸被其它氨基酸置换后得到的氨基酸序列形成的多肽、与序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 704 到第 1315 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列相同的氨基酸序列形成的多肽等。

[0169] 另外,由与序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列有 40%或 40%以上同源性的氨基酸序列形成的多肽可以具有如下特征,即,其序列中含有 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ (其中,C 表示半胱氨酸,X 表示丝氨酸或苏氨酸,L 表示亮氨酸, C_1 表示半胱亚磺酸 (cysteine sulfinic acid、3-sulfinoalanine),S 表示丝氨酸, C_2 表示半胱次磺酸 (cysteine sulfenic acid、S-hydroxy-cysteine), X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 表示任意氨基酸) 结构的区域。除此之外,其还可以具有下述特征,即,上述区域中 X_1 为缬氨酸, X_4 为色氨酸, X_5 为脯氨酸。另外,其也可以具有下述特征,即,上述区域中 X_2 为酪氨酸, X_3 为脯氨酸。

[0170] 在上述情况下,其特征也可以为通过 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ 结构的区域与金属原子结合。另外,其特征还可为所述金属为钴。

[0171] 作为由与序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列有 25%或 25%以上同源性的氨基酸序列形成的多肽,可以举出由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列形成的多肽;由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中至少一个位点经置换、插入或缺失的任一修饰后得到的氨基酸序列形成的多肽;由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中第 20、21、108、200、212 位氨基酸中至少一个氨基酸被其它氨基酸置换后得到的氨基酸序列形成的多肽;由与序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 到第 690 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列相同的氨基酸序列形成的多肽等。

[0172] 举例而言,来源于紫红红球菌 J-1 株的脲水合酶以下述多肽为构成要素,所述多肽为由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 704 到第 1315 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列形成的多肽和由序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 到第 690 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列形成的多肽,因此,本发明中作为修饰方法的对象

的修饰前的脧水合酶中包括上述脧水合酶。

[0173] 另外,来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脧水合酶以由序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列形成的多肽和由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列形成的多肽为构成要素,因此,其也包含在本发明中作为修饰方法的对象的修改前的脧水合酶的范围內。

[0174] 另外,作为从来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脧水合酶衍生出的脧水合酶,可以举出满足下述两种条件中任一方或双方的脧水合酶。第一种条件为,在来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脧水合酶的构成要素中,由序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列形成的多肽被下述两种多肽之一置换而得到的酶,所述两种多肽为,由对序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列中至少一个位点实施置换、插入或缺失的任一修饰后得到的氨基酸序列形成的多肽,或者由序列表的序列号 98 记载的氨基酸序列的第 6、19、38、77、90、102、106、126、130、142、146、187、194、203 位氨基酸中至少一个氨基酸被置换为其它氨基酸而得到的氨基酸序列形成的多肽;第二种条件为,在来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脧水合酶的构成要素中,由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列形成的多肽被下述两种多肽之一置换而得到的酶,所述两种多肽为,由对序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列中至少一个位点实施置换、插入或缺失的任一修饰后得到的氨基酸序列形成的多肽,或者由序列表的序列号 99 记载的氨基酸序列的第 20、21、108、200、212 位氨基酸中至少一个氨基酸被置换为其它氨基酸后的氨基酸序列形成的多肽。

[0175] 作为本发明修饰方法的对象的修改前的脧水合酶也包括由来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脧水合酶衍生出的脧水合酶。

[0176] 本发明中修饰酶是指,以具有脧水合酶活性的酶为对象进行修饰后得到的脧水合酶。例如可以举出具有如下特征的修饰酶,即,该修饰酶是采用上述修饰方法改变修饰前的脧水合酶的特性而得到的。

[0177] 与修饰前的脧水合酶相比较,作为特性的改变可以举出底物特异性、 V_{max} 、 K_m 、热稳定性、底物(可以举出例如以该酶作为催化剂时,能够转化为对应的酰胺化合物的任意脧化合物)稳定性、产物(可以举出例如以该酶作为催化剂时,转化任意脧化合物而得到的对应酰胺化合物)稳定性等性质中的任一种或一种以上性质发生的改变。具体可以举出以下 8 种改变等,

[0178] 1) 相对而言,空间体积更大的脧化合物容易成为底物。

[0179] 2) 相对而言,空间体积更小的脧化合物容易成为底物。

[0180] 3) 以任意脧化合物作为底物时, V_{max} 增大。

[0181] 4) 以任意脧化合物作为底物时, K_m 减小。

[0182] 5) 将酶暴露于任意热量中时,其不可逆失活率降低。

[0183] 6) 将酶暴露于任意浓度的底物中时,其不可逆失活率降低。

[0184] 7) 因反应中存在任意浓度产物所引起的反应抑制率降低。

[0185] 8) 将酶暴露于任意浓度的产物中时,其不可逆失活率降低。

[0186] 作为本发明中以修饰前的脧水合酶为对象的修饰方法所产生的特性改变的指标,可以以底物特异性的变化作为其代表例之一。当经本发明的修饰方法得到的修饰酶为改变了底物特异性的酶时,该修饰酶也包含在本发明的修饰酶的范围中。

[0187] 作为得到的修饰酶的底物特异性变化的观察方法,可以举出如下方法:以空间体

积不同的多种腈化合物作为底物进行反应,测定生成的对应酰胺化合物的量的差异。例如,比较以丙烯腈为底物反应生成的丙烯酰胺与以甲基丙烯腈为底物反应生成的甲基丙烯酰胺的摩尔比的方法。此时,与修饰前的对象相比较,可以认为 $[\text{生成的甲基丙烯酰胺的摩尔量}] \div [\text{生成的丙烯酰胺的摩尔量}]$ 的值向增大的方向变化的修饰酶表现出使空间体积更大的腈化合物容易成为底物的特性变化;上述值向减小的方向变化的修饰酶表现出使空间体积更小的腈化合物容易成为底物的特性变化。

[0188] 以来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的腈水合酶、以及从来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的腈水合酶衍生出的腈水合酶为对象的例子中,实施包括下述步骤的修饰方法时,与修饰前的对象比较,得到了以丙烯腈为底物反应生成的丙烯酰胺与以甲基丙烯腈为底物反应生成的甲基丙烯酰胺的摩尔比发生变化的修饰酶,该步骤为:通过解析立体结构,确定形成下述孔穴的区域和/或形成下述界面的区域,所述孔穴是底物从酶外部进入活性中心时、或产物从活性中心移至酶外部时通过的孔穴,所述界面为参与 2 聚体形成的 α 亚单位和 β 亚单位之间的结合界面、或参与 2 聚体之间结合的界面;并对与所述区域中存在的氨基酸残基对应的氨基酸序列中的氨基酸的任一或一个以上位点进行置换、插入、缺失等修饰的步骤。上述性质可称为底物特异性,即,特性改变的产物,因此得到的修饰酶包含在本发明的修饰酶范围内。

[0189] 在以来源于紫红红球菌 J-1 株的腈水合酶为对象的例子中,序列表的序列号 104 记载的碱基序列中从第 1 个到第 690 个碱基形成的 ORF 所编码的氨基酸序列的第 48 位所对应的氨基酸残基 Trp 被变更为其它氨基酸残基,采用上述修饰方法时,与修饰前的对象相比较,显示出空间体积更大的腈化合物易作为底物的特性变化。因此,获得的表现出特性改变的蛋白质也包含在本发明的修饰酶范围内。

[0190] 另外,容易推测,通过组合得到的修饰酶的突变位点,可获得附加的特性改变。因此,上述经突变位点组合而得到的修饰酶也包含在本发明的修饰酶范围之内。

[0191] 本发明中编码修饰酶的基因是指,以形成构成修饰酶的 2 种多肽链为特征的 2 个氨基酸序列,或形成以编码上述 2 个氨基酸序列为特征的 2 个 ORF 的碱基序列。

[0192] 本发明中以含有基因为特征的质粒是指具有下述特征的质粒,即,该质粒的序列中含有形成下述 2 个 ORF 的碱基序列,所述 2 个 ORF 的特征为编码下述 2 个氨基酸序列,而所述 2 个氨基酸序列的特征为形成构成修饰酶的 2 种多肽链。

[0193] 上述质粒除本发明的基因之外,还可具有能够通过转化任意宿主细胞得到的转化子或细胞株生产修饰酶的所需的结构,如各基因表达中必需的控制区域及自我复制的必需区域等。此处所谓任意的宿主细胞,例如为下述实施例中举出的大肠杆菌,但并不限于此,也可以使用枯草芽孢杆菌等芽孢杆菌属菌、酵母菌或链霉菌属等其它微生物。

[0194] 作为表达中必需的控制区域,可以举出启动子序列(含有控制转录的操纵基因序列)、核糖体结合序列(SD 序列)、转录终止序列等。

[0195] 具体的启动子序列,可以举出来源于大肠杆菌的色氨酸操纵子的 Trp 启动子、乳糖操纵子的 Lac 启动子、来源于 λ 噬菌体的 PL 启动子和 PR 启动子;以及来源于枯草芽孢杆菌的葡糖醛酸合成酶启动子(gnt)、碱性蛋白酶启动子(apr)、中性蛋白酶启动子(npr)和 α -淀粉酶启动子(amy)等。另外也可以利用人为设计、改良的序列,如 tac 启动子或 trc 启动子。

[0196] 作为核糖体结合序列可以举出来源于大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的序列或红球菌属 / 假诺卡氏菌属固有的序列, 只要是能在诸如大肠杆菌或枯草芽胞杆菌等所希望的宿主细胞中起作用的序列即可, 没有特别的限制。例如, 可以利用由 DNA 合成制备的下述共有序列, 所述共有序列由 4 个或 4 个以上连续碱基组成, 并可与 16S 核糖体 RNA 的 3'-末端区互补。转录终止序列不是必须的, 然而, 可以利用 ρ -因子非依赖性序列, 例如, 脂蛋白终止子或 trp 操纵子终止子等。上述控制区域在质粒上的序列顺序优选为, 启动子序列和核糖体结合序列位于靠近 5'-末端侧本发明基因的上游位置, 转录终止序列位于靠近 3'-末端侧本发明基因的下游的位置。编码构成本发明基因的各种 ORF 的碱基序列可以通过上述控制区域以各自独立的顺反子形式进行表达, 也可以通过共同的控制区域以多顺反子形式进行表达。

[0197] 作为满足上述要求的质粒载体实例, 可以举出在大肠杆菌中具有可自我复制的区域的 pBR322、pUC18、pBluescript、pKK223-3、pSC101; 在枯草芽胞杆菌中具有可自我复制的区域的 pUB110、pTZ4、pC194、 ρ 11、 ϕ 1、 ϕ 105 等。另外, 作为可在 2 种或 2 种以上宿主细胞中进行自我复制的质粒载体实例可以举出, pHV14、TRp7、YEpl7 和 pBS7。

[0198] 本发明中表达基因以生产具有所期望的活性的脲水合酶时, 有时需要参与脲水合酶激活的蛋白质。

[0199] 参与脲水合酶激活的蛋白质是具有下述性质的蛋白质, 即, 所述蛋白质表达与否直接影响脲水合酶的激活, 可以举出专利文献 4 中记载的参与来源于嗜热假诺卡氏菌的脲水合酶激活的蛋白质 (脲水合酶激活蛋白质)。具体而言, 作为脲水合酶激活蛋白质可以举出由序列号 102 的氨基酸序列所表示的 144 个氨基酸的序列构成的蛋白质。另外, 将序列号 102 的氨基酸序列的一部分氨基酸置换、插入或缺失等得到的突变蛋白质只要参与脲水合酶的激活, 则也包含在脲水合酶激活蛋白质的范畴内。作为上述突变蛋白质, 可以举出具有对序列号 102 的氨基酸序列中一个或一个以上氨基酸进行置换、插入或缺失等处理而得到的突变并保持参与脲水合酶激活的性质的蛋白质。

[0200] 作为编码脲水合酶激活蛋白质的基因, 只要是编码脲水合酶激活蛋白质的基因即可, 并无特别的限制。作为上述基因, 可以举出具有编码上述序列号 102 的氨基酸序列的碱基序列的基因、及编码上述突变蛋白质的基因。另外, 作为编码上述脲水合酶激活蛋白质的基因的优选例, 可以举出具有序列号 103 的碱基序列的基因。编码脲水合酶激活蛋白质的基因中, 即使是对序列号 103 记载的碱基序列中的 1 个、2 个或 2 个以上碱基进行置换、插入、缺失而得到的序列, 只要其能够作为编码脲水合酶激活蛋白质的基因而发挥作用, 则也包含在编码脲水合酶激活蛋白质的基因的范围之内。

[0201] 在使用编码脲水合酶激活蛋白质的基因时, 可以举出例如将其 ORF 与本发明中形成基因的 2 个 ORF 共同包含在本发明的质粒中。此时, 上述 ORF 在质粒上的顺序没有特别的限制, 另外, 可以是 3 个 ORF 被同一个控制区域控制; 也可以是 2 个 ORF 被同一个控制区域控制、而剩余 1 个 ORF 被不同于前 2 个 ORF 的控制区域的控制区域控制; 还可以是 3 个 ORF 各自被不同的控制区域控制。

[0202] 如上所述, 将本发明的基因与本发明中修饰酶的活性表达所必需的区域一同插入上述质粒载体中, 从而构建本发明的质粒的方法、或利用所述质粒将所希望的宿主细胞转化的方法、以及在上述转化子内生产脲水合酶的方法, 可以利用例如“《分子克隆第三版》

(J. Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) ”等记载的分子生物学、生物化学和基因工程领域中公知的普通方法和宿主细胞。

[0203] 本发明中以通过转化而获得为特征的转化子中, 包含利用本发明的基因或质粒转化宿主细胞而得到的转化子。作为培养所述转化子的例子, 可以举出以下述步骤特征的方法: 将其接种到培养基中之后, 在适当的培养温度(一般而言为 20℃~50℃) 下进行培养。

[0204] 需要说明的是, 当宿主细胞为微生物时, 一般使用 LB 培养基或 M9 培养基等作为培养上述转化子的培养基, 但也可以在上述培养基成分中添加金属离子。作为添加的金属离子可以举出 Fe 离子及 Co 离子。添加量例如为 0.1 μg/mL 或 0.1 μg/mL 以上。

[0205] 本发明中修饰酶的制备方法以下述步骤为特征: 从培养转化子得到的培养液、细胞、或其处理物中回收修饰酶, 可以举出具有如下特征的方法, 即, 该方法包含从上述转化子、所述转化子的培养液、或者所述转化子或培养液的处理物中回收活性腈水合酶的步骤。

[0206] 本发明中以包含将腈化合物转化为对应酰胺化合物的步骤为特征的酰胺化合物制备方法, 可以举出以含有下述转化步骤为特征的方法, 所述步骤为使用上述转化子、所述转化子的培养液、或所述转化子或所述培养液的处理物、或经上述制备方法回收的活性腈水合酶作为催化剂, 从而将腈化合物转化为对应的酰胺化合物的步骤。

[0207] 本发明中作为利用修饰酶或具有该酶活性的转化子从腈化合物制备对应的酰胺化合物的例子, 可以举出包含下述步骤的方法, 即, 将所希望的腈化合物与所述酶的精制物或酶的粗产物、本发明中转化子的培养液、从培养液得到的转化子、或者转化子的处理物在溶剂中接触的步骤。此处所谓处理物包括从所述转化子得到的提取物、粉碎物; 分离上述提取物或粉碎物中腈水合酶活性成分而得到的酶粗产物; 进一步精制而得到的酶精制物等后分离物; 以及将所述转化子或所述转化子的提取物、粉碎物或后分离物用适当的方法固定化而得到的固定化物。接触温度没有特别的限制, 优选在所述腈水合酶不失活的温度范围内, 更优选为凝固点或凝固点以上, 60℃或 60℃以下。

[0208] 作为腈化合物, 只要是能够作为本发明的改良酶的底物发挥作用的化合物即可, 可以举出碳原子为 2~4 的腈化合物, 例如, 乙腈、丙腈、丙烯腈、甲基丙烯腈、正丁腈、异丁腈、丁烯腈和 α-羟基异丁腈等。所述腈化合物在溶剂中的浓度没有特别的限定, 另外, 反应温度也无特别的限定, 但优选在所述腈水合酶不失活的温度范围内, 更优选为凝固点或凝固点以上, 50℃或 50℃以下。

[0209] 下面通过实施例对本发明进行更加详细地说明, 但本发明并不受到下述实施例的任何限定。应予说明, 各实施例及比较例中的 HPLC 分析使用日本分光制的 Finepak SIL C18-5 (250×4.6 φmm) 作为色谱柱, 并以含有 4 体积% 乙腈的 10mM 磷酸水溶液为流动相。利用 210nm 处的吸光度检测丙烯酰胺、丙烯腈、丙烯酸、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯腈、甲基丙烯酸。

[0210] [参考例 1] 保持了腈水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (1)

[0211] 为了将 α 亚单位中的第 6 位的 Leu 置换为 Met, 使用宝酒造社制的 “LA PCR in vitro mutagenesis Kit” 引入位点特异性突变。下文中 “LA PCR in vitro mutagenesis Kit” 简称为试剂盒。在以下参考例中基本按照试剂盒的原理和操作方法来进行。

[0212] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并通过高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使其最终浓度为 100 μg/ml 后, 使用铂金

接菌环将 MT-10822 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法由该菌体制备质粒 pPT-DB1。

[0213] 分别以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过下述步骤完成:在分别含有 50pmol 序列表的序列号 7 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过下述步骤完成:在分别含有 50pmol MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认存在扩增 DNA 产物。使用 Microcon 100(宝酒造社制)从各 PCR 最终反应液中除去过量的引物和 dNTP 后,加入 TE 分别配制成 50 μl 的溶液。配制总计 47.5 μl 的分别含 0.5 μl 上述 TE 溶液的退火溶液(组成遵照试剂盒中记载的条件),实施 10 分钟热变性处理 (98℃) 后,经 60 分钟以恒定的速度冷却至 37℃,接着在 37℃ 下保持 15 分钟进行退火处理。将 0.5 μl TaKaRa LA Taq 加入至退火处理液中,并在 72℃ 下加热处理 3 分钟,由此形成了异源双链。使其进行 PCR 反应 No. 3,即,向其中加入 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)及 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol,使总量达到 50 μl 后,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。取 5 μl PCR 反应 No. 3 的最终反应液进行琼脂糖凝胶电泳(使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.8 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认存在约 2kbp 的扩增 DNA 产物。接着从琼脂糖凝胶中仅切出约 2kbp 的 DNA 片段,将该琼脂糖片(约 0.1g)微细地粉碎并混悬在 1ml 的 TE 溶液中,在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对所得熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μl 的 TE 中。用限制性核酸内切酶 EcoRI 及 HindIII 切割上述纯化后的约 2kbp 的扩增 DNA 片段,然后对该限制性核酸内切酶处理液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段,最终使其溶于 10 μl 的 TE 中。同样用 EcoRI 及 HindIII 切割 pPT-DB1 后,进行琼脂糖凝胶电泳(使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.7%),仅将约 2.7kbp 的 DNA 片段从琼脂糖凝胶中切下。将切下的琼脂糖凝胶(约 0.1g)微细地粉碎并混悬在 1ml TE 溶液中,将其在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀,从而纯化该 DNA 片段,使该片段最终溶于 10 μl 的 TE 中。用 DNA ligation 试剂盒(宝酒造社制)将上述得到的约 2kbp 及约 2.7kbp 的 DNA 片段进行连接后,转化大肠杆菌 HB 101 感受态细胞(东洋纺绩社制),得到转化子 No. 1。

[0214] 利用下述方法求出用得到的转化子制备酰胺化合物时的转化率和选择率。

[0215] 在 500ml 装有挡板的三角烧瓶中配制含有 40 μg/ml 硫酸铁·七水合物和 10 μg/ml 氯化钴·二水合物的 LB 液体培养基 100ml,并通过高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向该培养基中加入氨苄青霉素使其最终浓度为 100 μg/ml。然后使用铂金接菌环将转化子 No. 1 接种在培养基上,并在 37℃、130rpm 下培养约 20 小时。通过离心分离

(5000G×15 分钟) 从该最终培养液中分离出菌体,接着将上述分离后的菌体重悬在 50ml 的生理盐水中,并再次离心分离 (5000G×15 分钟) 出菌体。将 0.1g 该菌体混悬在 20ml、50mM 的磷酸钾水溶液 (pH7.0) 中,向其中加入 1ml 丙烯腈或甲基丙烯腈,并在 10℃ 下边缓慢地搅拌边使其反应 1 小时。反应结束后,用 HPLC 分析反应液,结果确认了在反应液中仅存在与反应液中添加的腈化合物 (丙烯腈或甲基丙烯腈) 相当摩尔量的酰胺化合物 (丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺),而不存在腈化合物 (丙烯腈或甲基丙烯腈) 及对应的有机酸 (丙烯酸或甲基丙烯酸)。即,转化率和选择率都是 100%。

[0216] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了腈水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 1 所示的克隆中腈水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Met。

[0217] 表 1

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
		置换前	置换后	置换前	置换后
No.1	α -第 6 位	Leu	Met	CTG	ATG

[0219] [参考例 2] 保持了腈水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (2)

[0220] 为了将 α 亚单位中的第 6 位的 Leu 置换为 Thr,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0221] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过下述步骤而完成:在含有序列中序列号 11 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (以试剂盒中记载的条件组合) 中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过下述步骤而完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。使用 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确认存在扩增 DNA 产物。然后,通过进行与包含 PCR 反应 No. 2 的参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 2。

[0222] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果为 100%。

[0223] 然后,利用碱性 SDS 提取法由上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了腈水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 2 所示的克隆中腈水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Thr。

[0224] 表 2

[0225]	克隆号	突变位点	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
		(α 亚单位内)	置换前	置换后	置换前	置换后
	No.2	α -第 6 位	Leu	Thr	CTG	ACG

[0226] [参考例 3] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (3)

[0227] 为了将 α 亚单位中的第 6 位的 Leu 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0228] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过下述步骤完成: 在含有序列表中序列号 12 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过下述步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 3。

[0229] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0230] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为, 表 3 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Ala。

[0231] 表 3

[0232]	克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		(α 亚单位内)	置换前	置换后	置换前	置换后
	No.3	α -第 6 位	Leu	Ala	CTG	GCG

[0233] [参考例 4] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (4)

[0234] 为了将 α 亚单位中的第 6 位的 Leu 置换为 Val, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作引入位点特异性突变。

[0235] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 13 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂

糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 4。

[0236] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0237] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为，表 4 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Val。

[0238] 表 4

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		置换前	置换后	置换前	置换后
No.4	α -第 6 位	Leu	Val	CTG	GTG

[0240] [参考例 5] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (5)

[0241] 为了将 α 亚单位中的第 19 位的 Ala 置换为 Val，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0242] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 14 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ L 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述各反应重复进行 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ L 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 5。

[0243] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0244] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为，表 5 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val。

[0245] 表 5

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		置换前	置换后	置换前	置换后
No.5	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG

[0247] [参考例 6] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (6)

[0248] 为了将 α 亚单位中的第 38 位的 Met 置换为 Leu，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0249] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 15 记载的引物和 M13 引物 M4（序

列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 6。

[0250] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0251] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 6 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 38 位的 Met 被置换为 Leu。

[0252] 表 6

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		置换前	置换后	置换前	置换后
No.6	α -第 38 位	Met	Leu	ATG	TTG

[0254] [参考例 7] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得(7)

[0255] 为了将 α 亚单位中第 77 位的 Thr 置换为 Ser,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0256] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 16 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 7。

[0257] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0258] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 7 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 77 位的 Thr 被置换为 Ser。

[0259] 表 7

[0260]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.7	α -第 77 位	Thr	Ser	ACC	TCC

[0261] [参考例 8] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (8)

[0262] 为了将 α 亚单位中第 90 位的 Gly 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0263] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 17 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 8。

[0264] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0265] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为, 表 8 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 90 位的 Gly 被置换为 Ala。

[0266] 表 8

[0267]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.8	α -第 90 位	Gly	Ala	GGC	GCC

[0268] [参考例 9] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (9)

[0269] 为了将 α 亚单位中第 102 位的 Val 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0270] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 18 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物

的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 9。

[0271] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0272] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 9 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 102 位的 Val 被置换为 Ala。

[0273] 表 9

[0274]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.9	α -第 102 位	Val	Ala	GTC	GCC

[0275] [参考例 10] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (10)

[0276] 为了将 α 亚单位中第 106 位的 Val 置换为 Ile,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0277] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过在含有序列中序列号 19 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 10。

[0278] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0279] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 10 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 106 位的 Val 被置换为 Ile。

[0280] 表 10

[0281]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 10	α -第 106 位	Val	Ile	GTC	ATC

[0282] [参考例 11] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (11)

[0283] 为了将 α 亚单位中第 126 位的 Phe 置换为 Tyr,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0284] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 20 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒

中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 11。

[0285] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0286] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 11 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0287] 表 11

[0288]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 11	α-第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0289] [参考例 12] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (12)

[0290] 为了将 α 亚单位中第 130 位的 Gln 置换为 Glu,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0291] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 21 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 12。

[0292] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0293] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 12 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 130 位的 Gln 被置换为 Glu。

[0294] 表 12

[0295]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 12	α-第 130 位	Gln	Glu	CAG	GAG

[0296] [参考例 13] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (13)

[0297] 为了将 α 亚单位中第 142 位的 Leu 置换为 Val, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0298] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 22 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98°C) 15 秒、退火 (55°C) 30 秒、链延长反应 (72°C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 13。

[0299] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0300] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为, 表 13 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 142 位的 Leu 被置换为 Val。

[0301] 表 13

[0302]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 13	α -第 142 位	Leu	Val	CTG	GTG

[0303] [参考例 14] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (14)

[0304] 为了将 α 亚单位中第 146 位的 Glu 置换为 Asp, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0305] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 23 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98°C) 15 秒、退火 (55°C) 30 秒、链延长反应 (72°C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 14。

[0306] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0307] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果为,表 14 所示的克隆中腓水合酶的 α 亚单位中第 146 位的 Glu 被置换为 Asp。

[0308] 表 14

[0309]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 14	α -第 146 位	Glu	Asp	GAG	GAC

[0310] [参考例 15] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (15)

[0311] 为了将 α 亚单位中第 187 位的 Ala 置换为 Thr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0312] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 24 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 15。

[0313] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0314] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了腓水合酶基因部分的碱基序列。结果为, 表 15 所示的克隆中腓水合酶的 α 亚单位中第 187 位的 Ala 被置换为 Thr。

[0315] 表 15

[0316]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 15	α -第 187 位	Ala	Thr	GCC	ACC

[0317] [参考例 16] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (16)

[0318] 为了将 α 亚单位中第 194 位的 Ser 置换为 Leu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0319] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 25 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 以下步骤完成: 通过在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进

行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 16。

[0320] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0321] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为，表 16 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 194 位的 Ser 被置换为 Leu。

[0322] 表 16

[0323]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 16	α -第 194 位	Ser	Leu	TCG	TTG

[0324] [参考例 17] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (17)

[0325] 为了将 α 亚单位中第 203 位的 Ala 置换为 Glu，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0326] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 26 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述各反应重复进行 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 17。

[0327] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0328] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为，表 17 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 203 位的 Ala 被置换为 Glu。

[0329] 表 17

[0330]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 17	α -第 203 位	Ala	Glu	GCG	GAG

[0331] [参考例 18] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (18)

[0332] 为了将 β 亚单位中第 20 位的 Ala 置换为 Val，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0333] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。

PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 27 记载的引物和 M13 引物 M4（序列列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述各反应重复进行 25 次循环而完成，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 以下步骤完成：通过在含有 MUT4 引物（序列列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作而完成。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 18。

[0334] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0335] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为，表 18 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 20 位的 Ala 被置换为 Val。

[0336] 表 18

[0337]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 18	β - 第 20 位	Ala	Val	GCG	GTG

[0338] [参考例 19] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (19)

[0339] 为了将 β 亚单位中第 21 位的 Asp 置换为 Asn，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0340] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 28 记载的引物和 M13 引物 M4（序列列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述各反应重复进行 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 19。

[0341] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0342] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为，表 19 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 21 位的 Asp 被置换为 Asn。

[0343] 表 19

[0344]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 19	β -第 21 位	Asp	Asn	GAC	AAC

[0345] [参考例 20] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (20)

[0346] 为了将 β 亚单位中第 108 位的 Glu 置换为 Asp, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0347] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 29 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作而完成。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 20。

[0348] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0349] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为, 表 20 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp。

[0350] 表 20

[0351]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.20	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT

[0352] [参考例 21] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (21)

[0353] 为了将 β 亚单位中第 108 位的 Glu 置换为 Pro, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0354] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 30 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物

的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 21。

[0355] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0356] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 21 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Pro。

[0357] 表 21

[0358]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 21	β -第 108 位	Glu	Pro	GAG	CCG

[0359] [参考例 22] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (22)

[0360] 为了将 β 亚单位中第 108 位的 Glu 置换为 Ser,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0361] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 31 记载的引物和 M13 引物 M4(序列列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 22。

[0362] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0363] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 22 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Ser。

[0364] 表 22

[0365]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 22	β -第 108 位	Glu	Ser	GAG	TCG

[0366] [参考例 23] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (23)

[0367] 为了将 β 亚单位中第 108 位的 Glu 置换为 Arg,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0368] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 32 记载的引物和 M13 引物 M4(序

列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 23。

[0369] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0370] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 23 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Arg。

[0371] 表 23

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		置换前	置换后	置换前	置换后
No. 23	β -第 108 位	Glu	Arg	GAG	CGG

[0373] [参考例 24] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (24)

[0374] 为了将 β 亚单位中第 108 位的 Glu 置换为 Cys,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0375] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 33 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 24。

[0376] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0377] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 24 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Cys。

[0378] 表 24

[0379]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 24	β -第 108 位	Glu	Cys	GAG	TGC

[0380] [参考例 25] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (25)

[0381] 为了将 β 亚单位中第 108 位的 Glu 置换为 Leu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0382] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 34 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 25。

[0383] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0384] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为, 表 25 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Leu。

[0385] 表 25

[0386]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 25	β -第 108 位	Glu	Leu	GAG	CTG

[0387] [参考例 26] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (26)

[0388] 为了将 β 亚单位中第 108 位的 Glu 置换为 Thr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0389] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 35 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物

的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 26。

[0390] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0391] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 26 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Thr。

[0392] 表 26

[0393]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 26	β - 第 108 位	Glu	Thr	GAG	ACG

[0394] [参考例 27] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (27)

[0395] 为了将 β 亚单位中第 200 位的 Ala 置换为 Asp,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0396] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 36 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 27。

[0397] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0398] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 27 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Asp。

[0399] 表 27

[0400]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 27	β - 第 200 位	Ala	Asp	GCC	GAC

[0401] [参考例 28] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (28)

[0402] 为了将 β 亚单位中第 200 位的 Ala 置换为 Ile,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0403] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 37 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒

中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 28。

[0404] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0405] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 28 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Ile。

[0406] 表 28

[0407]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 28	β - 第 200 位	Ala	Ile	GCC	ATC

[0408] [参考例 29] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (29)

[0409] 为了将 β 亚单位中第 200 位的 Ala 置换为 Val,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0410] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 38 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 29。

[0411] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0412] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为,表 29 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Val。

[0413] 表 29

[0414]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 29	β - 第 200 位	Ala	Val	GCC	GTC

[0415] [参考例 30] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (30)

[0416] 为了将 β 亚单位中第 200 位的 Ala 置换为 Glu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0417] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 39 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98°C) 15 秒、退火 (55°C) 30 秒、链延长反应 (72°C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 30。

[0418] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0419] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果为, 表 30 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[0420] 表 30

[0421]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 30	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAG

[0422] [参考例 31] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (31)

[0423] 为了将 β 亚单位中第 212 位的 Ser 置换为 Tyr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与参考例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0424] 分别以 10ng 参考例 1 制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 40 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述各反应重复进行 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98°C) 15 秒、退火 (55°C) 30 秒、链延长反应 (72°C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 31。

[0425] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0426] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果为,表 31 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[0427] 表 31

[0428]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No. 31	β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[0429] [参考例 32] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (32)

[0430] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 5 的氨基酸突变 (α 亚单位中第 19 位的 Ala 变为 Val) 和克隆 No. 11 的氨基酸突变 (α 亚单位中第 126 位的 Phe 变为 Tyr)。

[0431] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 11 得到的克隆 No. 11 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备克隆 No. 11 的质粒 DNA。

[0432] 以 1 μ g 克隆 No. 11 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 14 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 32。

[0433] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0434] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 32 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0435] 表 32

[0436]

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 32	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0437] [参考例 33] 保持了胍水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (33)

[0438] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有胍水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 1 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 6 位的 Leu 变为 Met) 和克隆 No. 32 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 19 位的 Ala 变为 Val、 α 亚单位的第 126 位的 Phe 变为 Tyr)。

[0439] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 32 得到的克隆 No. 32 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备克隆 No. 32 的质粒 DNA。

[0440] 以 1 μ g 克隆 No. 32 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 7 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 33。

[0441] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0442] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了胍水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 33 所示,野生型的胍水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Met、 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0443] 表 33

[0444]

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 33	α -第 6 位	Leu	Met	CTG	ATG
	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0445] [参考例 34] 保持了胍水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (34)

[0446] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有胍水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 2 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 6 位的 Leu 变为 Thr) 和克隆 No. 32 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 19 位的 Ala 变为 Val、 α 亚单位的第 126 位的 Phe 变为 Tyr)。

[0447] 以 1 μ g 参考例 33 中制备的克隆 No. 33 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 11 记载的引物和 M13 引物

M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 34。

[0448] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0449] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 34 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Thr、 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0450] 表 34

[0451]

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 34	α -第 6 位	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0452] [参考例 35] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (35)

[0453] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 3 的氨基酸突变(α 亚单位的第 6 位的 Leu 变为 Ala)和克隆 No. 32 的氨基酸突变(α 亚单位的第 19 位的 Ala 变为 Val、 α 亚单位的第 126 位的 Phe 变为 Tyr)。

[0454] 以 1 μ g 参考例 33 中制备的克隆 No. 33 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 12 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作而完成。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 35。

[0455] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0456] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果如表 35 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Ala、 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0457] 表 35

[0458]

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 35	α -第 6 位	Leu	Ala	CTG	GCG
	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0459] [参考例 36] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (36)

[0460] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 20 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 108 位的 Glu 变为 Asp) 和克隆 No. 31 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 212 位的 Ser 变为 Tyr)。

[0461] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 31 得到的克隆 No. 31 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm×5 分钟) 该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备克隆 No. 31 的质粒 DNA。

[0462] 以 1 μ g 克隆 No. 31 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 29 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 36。

[0463] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0464] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 36 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[0465] 表 36

[0466]

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 36	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT
	β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[0467] [参考例 37] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (37)

[0468] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 23 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 108 位的 Glu 变为 Arg) 和克隆 No. 31 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 212 位的 Ser 变为 Tyr)。

[0469] 以 $1\mu\text{g}$ 参考例 36 中制备的克隆 No. 36 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 32 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 $50\mu\text{l}$ 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性 (98°C) 15 秒、退火 (55°C) 30 秒、链延长反应 (72°C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 $50\mu\text{l}$ 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 $5\mu\text{l}$ 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 37。

[0470] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0471] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 37 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Arg、 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[0472] 表 37

[0473]

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 37	β -第 108 位	Glu	Arg	GAG	CGG
	β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[0474] [参考例 38] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (38)

[0475] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 27 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 200 位的 Ala 变为 Asp) 和克隆 No. 31 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 212 位的 Ser 变为 Tyr)。

[0476] 以 $1\mu\text{g}$ 参考例 36 中制备的克隆 No. 36 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 36 记载的引物和 M13 引物

M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 38。

[0477] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0478] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 38 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[0479] 表 38

[0480]

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 38	β -第 200 位	Ala	Asp	GCC	GAC
	β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[0481] [参考例 39] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (39)

[0482] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 30 的氨基酸突变(β 亚单位的第 200 位的 Ala 变为 Glu)和克隆 No. 31 的氨基酸突变(β 亚单位的第 212 位的 Ser 变为 Tyr)。

[0483] 以 1 μ g 参考例 36 中制备的克隆 No. 36 的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 39 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作而完成。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与参考例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 39。

[0484] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0485] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 39 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu、 β 亚单位

中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[0486] 表 39

[0487]

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 39	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAG
	β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[0488] [实施例 1] 保持了胍水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (40)

[0489] 为了将 α 亚单位中第 36 位的 Thr 置换为 Met, 使用宝酒造社制的“LA PCR in vitro mutagenesis Kit”引入位点特异性突变。下文中“LAPCR in vitro mutagenesis Kit”简称为试剂盒。在以下实施例中基本按照试剂盒的原理和操作方法来进行。

[0490] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml。使用铂金及菌环将 MT-10822 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着, 以碱性 SDS 提取法利用该菌体制备质粒 pPT-DB1。

[0491] 分别以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 41 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。使用 Microcon 100 (宝酒造社制) 从各种 PCR 最终反应液中除去过量的引物和 dNTP 后, 加入 TE 分别配制成 50 μ l 的溶液。配制总计 47.5 μ l 的分别含 0.5 μ l 上述 TE 溶液的退火溶液 (组成遵照试剂盒中记载的条件), 实施 10 分钟热变性处理 (98℃) 后, 以恒定的速度经 60 分钟冷却至 37℃, 接着在 37℃ 下保持 15 分钟进行退火处理。将 0.5 μ l TaKaRa LA Taq 加入至退火处理液中, 并在 72℃ 下加热处理 3 分钟, 由此完成了异源双链的形成。通过以下步骤进行 PCR 反应 No. 3, 即, 向其中加入 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 及 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 使总量达到 50 μ l 后, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。用 5 μ l PCR 反应 No. 3 的最终反应液进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖的浓度为 0.8 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认存在约 2kbp 的扩增 DNA 产物。接着从琼脂糖凝胶中仅切出约 2kbp 的 DNA 片段, 将该琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并混悬在 1ml 的 TE 溶液中, 在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将所得熔化液进

行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μ l 的 TE 中。用限制性核酸内切酶 EcoRI 及 HindIII 切割上述纯化后的约 2kbp 的扩增 DNA 片段,然后对该限制性核酸内切酶处理液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μ l TE 中。同样用限制性核酸内切酶 EcoRI 及 HindIII 切割 pPT-DB1 后,进行琼脂糖凝胶电泳(使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.7%),仅将约 2.7kbp 的 DNA 片段从琼脂糖凝胶中切下。将切下的琼脂糖凝胶(约 0.1g)微细地粉碎并混悬在 1ml TE 溶液中,将其在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀,从而纯化该 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μ l 的 TE 中。用 DNA ligation 试剂盒(宝酒造社制)将上述得到的约 2kbp 及约 2.7kbp 的 DNA 片段进行连接后,对大肠杆菌 HB101 感受态细胞(东洋纺绩社制)进行转化,得到转化子 No. 40。

[0492] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0493] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了胍水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 40 所示的克隆中胍水合酶的 α 亚单位中第 36 位的 Thr 被置换为 Met。

[0494] 表 40

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
		置换前	置换后	置换前	置换后
No.40	α -第 36 位	Thr	Met	ACG	ATG

[0496] [实施例 2] 保持了胍水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (41)

[0497] 为了将 α 亚单位中第 71 位的 Arg 置换为 His,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0498] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 42 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 41。

[0499] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0500] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了胍水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 41 所示的克隆中胍水合酶的 α 亚单位中第 71 位的 Arg 被置换为 His。

[0501] 表 41

[0502]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.41	α -第 71 位	Arg	His	CGT	CAT

[0503] [实施例 3] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (42)

[0504] 为了将 α 亚单位中第 148 位的 Gly 置换为 Asp, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0505] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 43 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 42。

[0506] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0507] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 42 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 148 位的 Gly 被置换为 Asp。

[0508] 表 42

[0509]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.42	α -第 148 位	Gly	Asp	GGC	GAC

[0510] [实施例 4] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (43)

[0511] 为了将 α 亚单位中第 204 位的 Val 置换为 Arg, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0512] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 44 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的

存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 43。

[0513] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0514] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 43 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Arg。

[0515] 表 43

[0516]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.43	α -第 204 位	Val	Arg	GTC	CGC

[0517] [实施例 5] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (44)

[0518] 为了将 α 亚单位中第 204 位的 Val 置换为 Lys,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0519] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 45 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 44。

[0520] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0521] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 44 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Lys。

[0522] 表 44

[0523]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.44	α -第 204 位	Val	Lys	GTC	AAA

[0524] [实施例 6] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (45)

[0525] 为了将 α 亚单位中第 204 位的 Val 置换为 Trp,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0526] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 46 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试

剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 45。

[0527] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0528] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 45 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Trp。

[0529] 表 45

[0530]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.45	α-第 204 位	Val	Trp	GTC	TGG

[0531] [实施例 7] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (46)

[0532] 为了将 α 亚单位中第 204 位的 Val 置换为 Thr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0533] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 47 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 46。

[0534] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0535] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 46 所示的克隆中脲水合酶的 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Thr。

[0536] 表 46

[0537]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.46	α-第 204 位	Val	Thr	GTC	ACC

[0538] [实施例 8] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (47)

[0539] 为了将 β 亚单位中第 10 位的 Thr 置换为 Asp, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0540] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 48 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 47。

[0541] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0542] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 47 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Asp。

[0543] 表 47

[0544]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.47	β -第 10 位	Thr	Asp	ACC	GAC

[0545] [实施例 9] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (48)

[0546] 为了将 β 亚单位中第 10 位的 Thr 置换为 Glu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0547] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 49 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列、) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 48。

[0548] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0549] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果确认了表 48 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Glu。

[0550] 表 48

[0551]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.48	β -第 10 位	Thr	Glu	ACC	GAA

[0552] [实施例 10] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (49)

[0553] 为了将 β 亚单位中第 10 位的 Thr 置换为 Trp, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0554] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 50 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 49。

[0555] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0556] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了腓水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 49 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Trp。

[0557] 表 49

[0558]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.49	β -第 10 位	Thr	Trp	ACC	TGG

[0559] [实施例 11] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (50)

[0560] 为了将 β 亚单位中第 10 位的 Thr 置换为 Gly, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0561] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 51 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与

PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 50。

[0562] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0563] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 50 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Gly。

[0564] 表 50

[0565]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.50	β -第 10 位	Thr	Gly	ACC	GGC

[0566] [实施例 12] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (51)

[0567] 为了将 β 亚单位中第 10 位的 Thr 置换为 Tyr，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0568] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列中序列号 52 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 51。

[0569] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0570] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 51 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Tyr。

[0571] 表 51

[0572]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.51	β -第 10 位	Thr	Tyr	ACC	TAC

[0573] [实施例 13] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (52)

[0574] 为了将 β 亚单位中第 10 位的 Thr 置换为 Cys，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0575] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反

应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 53 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 52。

[0576] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0577] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 52 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Cys。

[0578] 表 52

[0579]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.52	β -第 10 位	Thr	Cys	ACC	TGC

[0580] [实施例 14] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得(53)

[0581] 为了将 β 亚单位中第 32 位的 Val 置换为 Gly,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0582] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 54 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 53。

[0583] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0584] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 53 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 32 位的 Val 被置换为 Gly。

[0585] 表 53

[0586]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.53	β -第 32 位	Val	Gly	GTC	GGC

[0587] [实施例 15] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (54)

[0588] 为了将 β 亚单位中第 37 位的 Phe 置换为 Thr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0589] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 55 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 54。

[0590] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0591] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 54 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Thr。

[0592] 表 54

[0593]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.54	β -第 37 位	Phe	Thr	TTC	ACC

[0594] [实施例 16] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (55)

[0595] 为了将 β 亚单位中第 37 位的 Phe 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0596] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 56 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的

存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 55。

[0597] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0598] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 55 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Ala。

[0599] 表 55

[0600]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.55	β -第 37 位	Phe	Ala	TTC	GCC

[0601] [实施例 17] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (56)

[0602] 为了将 β 亚单位中第 37 位的 Phe 置换为 Leu,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0603] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 57 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环而完成,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 56。

[0604] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0605] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 56 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Leu。

[0606] 表 56

[0607]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.56	β -第 37 位	Phe	Leu	TTC	CTC

[0608] [实施例 18] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (57)

[0609] 为了将 β 亚单位中第 37 位的 Phe 置换为 Ile,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0610] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 58 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试

剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环而完成,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 57。

[0611] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0612] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 57 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Ile。

[0613] 表 57

[0614]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.57	β -第 37 位	Phe	Ile	TTC	ATC

[0615] [实施例 19] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (58)

[0616] 为了将 β 亚单位中第 37 位的 Phe 置换为 Val,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0617] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 59 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 58。

[0618] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0619] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 58 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Val。

[0620] 表 58

[0621]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.58	β -第 37 位	Phe	Val	TTC	GTC

[0622] [实施例 20] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (59)

[0623] 为了将 β 亚单位中第 41 位的 Phe 置换为 Glu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0624] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 60 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 59。

[0625] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0626] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 59 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Glu。

[0627] 表 59

[0628]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.59	β -第 41 位	Phe	Glu	TTC	GAA

[0629] [实施例 21] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (60)

[0630] 为了将 β 亚单位中第 41 位的 Phe 置换为 Thr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0631] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 61 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 60。

[0632] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0633] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果确认了表 60 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Thr。

[0634] 表 60

[0635]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.60	β -第 41 位	Phe	Thr	TTC	ACC

[0636] [实施例 22] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (61)

[0637] 为了将 β 亚单位中第 41 位的 Phe 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0638] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 62 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环而完成, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 61。

[0639] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0640] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了腓水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 61 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Ala。

[0641] 表 61

[0642]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.61	β -第 41 位	Phe	Ala	TTC	GCC

[0643] [实施例 23] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (62)

[0644] 为了将 β 亚单位中第 41 位的 Phe 置换为 Leu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0645] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 63 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与

PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 62。

[0646] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0647] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 62 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Leu。

[0648] 表 62

[0649]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.62	β -第 41 位	Phe	Leu	TTC	CTC

[0650] [实施例 24] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (63)

[0651] 为了将 β 亚单位中第 41 位的 Phe 置换为 Ile，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0652] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列中序列号 64 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 63。

[0653] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0654] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 63 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Ile。

[0655] 表 63

[0656]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.63	β -第 41 位	Phe	Ile	TTC	ATC

[0657] [实施例 25] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (64)

[0658] 为了将 β 亚单位中第 41 位的 Phe 置换为 Val，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0659] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反

应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 65 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 64。

[0660] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0661] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 64 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Val。

[0662] 表 64

[0663]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.64	β -第 41 位	Phe	Val	TTC	GTC

[0664] [实施例 26] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (65)

[0665] 为了将 β 亚单位中第 46 位的 Met 置换为 Gly,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0666] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 66 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 65。

[0667] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0668] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 65 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 46 位的 Met 被置换为 Gly。

[0669] 表 65

[0670]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.65	β -第 46 位	Met	Gly	ATG	GGG

[0671] [实施例 27] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (66)

[0672] 为了将 β 亚单位中第 46 位的 Met 置换为 Tyr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0673] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 67 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 66。

[0674] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0675] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 66 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 46 位的 Met 被置换为 Tyr。

[0676] 表 66

[0677]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.66	β -第 46 位	Met	Tyr	ATG	TAT

[0678] [实施例 28] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (67)

[0679] 为了将 β 亚单位中第 46 位的 Met 置换为 Leu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0680] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 68 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的

存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 67。

[0681] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0682] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 67 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 46 位的 Met 被置换为 Leu。

[0683] 表 67

[0684]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.67	β -第 46 位	Met	Leu	ATG	CTG

[0685] [实施例 29] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (68)

[0686] 为了将 β 亚单位中第 46 位的 Met 置换为 Lys,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0687] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 69 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol MUT4 引物的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 68。

[0688] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0689] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 68 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 46 位的 Met 被置换为 Lys。

[0690] 表 68

[0691]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.68	β -第 46 位	Met	Lys	ATG	AAG

[0692] [实施例 30] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (69)

[0693] 为了将 β 亚单位中第 46 位的 Met 置换为 Asp,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0694] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 70 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试

剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 69。

[0695] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0696] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 69 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 46 位的 Met 被置换为 Asp。

[0697] 表 69

[0698]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.69	β -第 46 位	Met	Asp	ATG	GAT

[0699] [实施例 31] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (70)

[0700] 为了将 β 亚单位中第 48 位的 Leu 置换为 Gly,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0701] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 71 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 70。

[0702] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0703] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 70 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Gly。

[0704] 表 70

[0705]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.70	β -第 48 位	Leu	Gly	CTG	GGG

[0706] [实施例 32] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (71)

[0707] 为了将 β 亚单位中第 48 位的 Leu 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0708] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 72 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列、) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 71。

[0709] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0710] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 71 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Ala。

[0711] 表 71

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
		置换前	置换后	置换前	置换后
No.71	β -第 48 位	Leu	Ala	CTG	GCG

[0713] [实施例 33] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (72)

[0714] 为了将 β 亚单位中第 48 位的 Leu 置换为 Val, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0715] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 73 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 72。

[0716] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0717] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果确认了表 72 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Val。

[0718] 表 72

[0719]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.72	β -第 48 位	Leu	Val	CTG	GTG

[0720] [实施例 34] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (73)

[0721] 为了将 β 亚单位中第 48 位的 Leu 置换为 Ser, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0722] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 74 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列、) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 73。

[0723] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0724] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了腓水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 73 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Ser。

[0725] 表 73

[0726]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.73	β -第 48 位	Leu	Ser	CTG	TCG

[0727] [实施例 35] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (74)

[0728] 为了将 β 亚单位中第 48 位的 Leu 置换为 Thr, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0729] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 75 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列、) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行

与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 74。

[0730] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0731] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 74 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Thr。

[0732] 表 74

[0733]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.74	β -第 48 位	Leu	Thr	CTG	ACG

[0734] [实施例 36] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (75)

[0735] 为了将 β 亚单位中第 48 位的 Leu 置换为 Arg，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0736] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 76 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 10 中记载有其序列、）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 75。

[0737] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0738] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 75 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Arg。

[0739] 表 75

[0740]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.75	β -第 48 位	Leu	Arg	CTG	CGG

[0741] [实施例 37] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (76)

[0742] 为了将 β 亚单位中第 51 位的 Phe 置换为 Ala，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0743] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反

应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 77 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 76。

[0744] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0745] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 76 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 51 位的 Phe 被置换为 Ala。

[0746] 表 76

[0747]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.76	β -第 51 位	Phe	Ala	TTC	GCC

[0748] [实施例 38] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得(77)

[0749] 为了将 β 亚单位中第 51 位的 Phe 置换为 Val,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0750] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 78 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 77。

[0751] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0752] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 77 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 51 位的 Phe 被置换为 Val。

[0753] 表 77

[0754]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.77	β -第 51 位	Phe	Val	TTC	GTC

[0755] [实施例 39] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (78)

[0756] 为了将 β 亚单位中第 72 位的 Trp 置换为 Phe, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0757] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 79 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 78。

[0758] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0759] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 78 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 72 位的 Trp 被置换为 Phe。

[0760] 表 78

[0761]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.78	β -第 72 位	Trp	Phe	TGG	TTT

[0762] [实施例 40] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (79)

[0763] 为了将 β 亚单位中第 118 位的 Phe 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0764] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 80 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的

存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 79。

[0765] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0766] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 79 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 118 位的 Phe 被置换为 Ala。

[0767] 表 79

[0768]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.79	β -第 118 位	Phe	Ala	TTC	GCC

[0769] [实施例 41] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (80)

[0770] 为了将 β 亚单位中第 118 位的 Phe 置换为 Leu,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0771] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 81 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 80。

[0772] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0773] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 80 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 118 位的 Phe 被置换为 Leu。

[0774] 表 80

[0775]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.80	β -第 118 位	Phe	Leu	TTC	CTC

[0776] [实施例 42] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (81)

[0777] 为了将 β 亚单位中第 118 位的 Phe 置换为 Ile,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0778] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 82 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试

剂盒中记载的条件)中,将下述反应进行25次循环,所述反应为,热变性(98℃)15秒、退火(55℃)30秒、链延长反应(72℃)120秒。PCR反应No.2通过以下步骤完成:在含有MUT4引物(序列表的序列号9中记载有其序列)和M13引物RV(序列表的序列号10中记载有其序列)各50pmol的总计50μl的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与PCR反应No.1同样的操作。取PCR反应No.1及No.2的最终反应液各5μl进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为1.0重量%)以分析DNA扩增产物时,可以确认扩增DNA产物的存在。然后,通过进行与实施例1完全相同的操作而得到转化子No.81。

[0779] 利用与参考例1相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为100%。

[0780] 然后,利用碱性SDS提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用ABI社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪373A的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表81所示的克隆中脲水合酶的β亚单位中第118位的Phe被置换为Ile。

[0781] 表81

[0782]	克隆号	突变位点 (β亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.81	β-第118位	Phe	Ile	TTC	ATC

[0783] [实施例43]保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得(82)

[0784] 为了将β亚单位中第118位的Phe置换为Val,以pPT-DB1质粒DNA为模板,通过进行与实施例1相同的操作而引入位点特异性突变。

[0785] 分别以10ng实施例1中制备的pPT-DB1质粒DNA为模板进行两种类型的PCR反应,PCR反应No.1通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号83记载的引物和M13引物M4(序列表的序列号8中记载有其序列)各50pmol的总计50μl的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复25次循环,所述反应为,热变性(98℃)15秒、退火(55℃)30秒、链延长反应(72℃)120秒。PCR反应No.2通过以下步骤完成:在含有MUT4引物(序列表的序列号9中记载有其序列)和M13引物RV(序列表的序列号10中记载有其序列)各50pmol的总计50μl的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与PCR反应No.1同样的操作。取PCR反应No.1及No.2的最终反应液各5μl进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为1.0重量%)以分析DNA扩增产物时,可以确认扩增DNA产物的存在。然后,通过进行与实施例1完全相同的操作而得到转化子No.82。

[0786] 利用与参考例1相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为100%。

[0787] 然后,利用碱性SDS提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用ABI社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪373A的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表82所示的克隆中脲水合酶的β亚单位中第118位的Phe被置换为Val。

[0788] 表82

[0789]	克隆号	突变位点 (β亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.82	β-第118位	Phe	Val	TTC	GTC

[0790] [实施例 44] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (83)

[0791] 为了将 β 亚单位中第 127 位的 Leu 置换为 Ala, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0792] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 84 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 83。

[0793] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0794] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 83 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 127 位的 Leu 被置换为 Ala。

[0795] 表 83

[0796]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.83	β -第 127 位	Leu	Ala	CTG	GCG

[0797] [实施例 45] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (84)

[0798] 为了将 β 亚单位中第 127 位的 Leu 置换为 Val, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0799] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 85 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 84。

[0800] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0801] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果确认了表 84 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 127 位的 Leu 被置换为 Val。

[0802] 表 84

[0803]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.84	β -第 127 位	Leu	Val	CTG	GTG

[0804] [实施例 46] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (85)

[0805] 为了将 β 亚单位中第 127 位的 Leu 置换为 Ser, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0806] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 86 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 85。

[0807] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0808] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了腓水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 85 所示的克隆中腓水合酶的 β 亚单位中第 127 位的 Leu 被置换为 Ser。

[0809] 表 85

[0810]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.85	β -第 127 位	Leu	Ser	CTG	TCG

[0811] [实施例 47] 保持了腓水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (86)

[0812] 为了将 β 亚单位中第 146 位的 Arg 置换为 Gly, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0813] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 87 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与

PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 86。

[0814] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0815] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 86 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 146 位的 Arg 被置换为 Gly。

[0816] 表 86

[0817]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.86	β - 第 146 位	Arg	Gly	CGG	GGG

[0818] [实施例 48] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (87)

[0819] 为了将 β 亚单位中第 160 位的 Arg 置换为 Leu，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0820] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 88 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 87。

[0821] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0822] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 87 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 160 位的 Arg 被置换为 Leu。

[0823] 表 87

[0824]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.87	β - 第 160 位	Arg	Leu	CGG	CTG

[0825] [实施例 49] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (88)

[0826] 为了将 β 亚单位中第 160 位的 Arg 置换为 Trp，以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板，通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0827] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反

应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 89 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 88。

[0828] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0829] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 88 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 160 位的 Arg 被置换为 Trp。

[0830] 表 88

[0831]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.88	β - 第 160 位	Arg	Trp	CGG	TGG

[0832] [实施例 50] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (89)

[0833] 为了将 β 亚单位中第 186 位的 Leu 置换为 Glu, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0834] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 90 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 89。

[0835] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0836] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 89 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Glu。

[0837] 表 89

[0838]	克隆号	突变位点	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
		(β 亚单位内)	置换前	置换后	置换前	置换后
	No.89	β -第 186 位	Leu	Glu	CTG	GAG

[0839] [实施例 51] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (90)

[0840] 为了将 β 亚单位中第 186 位的 Leu 置换为 Asp, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0841] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 91 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 90。

[0842] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0843] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 90 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Asp。

[0844] 表 90

[0845]	克隆号	突变位点	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
		(β 亚单位内)	置换前	置换后	置换前	置换后
	No.90	β -第 186 位	Leu	Asp	CTG	GAT

[0846] [实施例 52] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (91)

[0847] 为了将 β 亚单位中第 186 位的 Leu 置换为 Lys, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0848] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 92 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的

存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 91。

[0849] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0850] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 91 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Lys。

[0851] 表 91

[0852]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.91	β -第 186 位	Leu	Lys	CTG	AAG

[0853] [实施例 53] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (92)

[0854] 为了将 β 亚单位中第 186 位的 Leu 置换为 Arg,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0855] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 93 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 92。

[0856] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0857] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 92 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Arg。

[0858] 表 92

[0859]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.92	β -第 186 位	Leu	Arg	CTG	CGG

[0860] [实施例 54] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (93)

[0861] 为了将 β 亚单位中第 186 位的 Leu 置换为 Asn,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0862] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 94 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试

剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 93。

[0863] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0864] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 93 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Asn。

[0865] 表 93

[0866]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.93	β -第 186 位	Leu	Asn	CTG	AAC

[0867] [实施例 55] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (94)

[0868] 为了将 β 亚单位中第 186 位的 Leu 置换为 Ser,以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板,通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0869] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 95 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 94。

[0870] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0871] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 94 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Ser。

[0872] 表 94

[0873]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.94	β -第 186 位	Leu	Ser	CTG	TCG

[0874] [实施例 56] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (95)

[0875] 为了将 β 亚单位中第 186 位的 Leu 置换为 Gly, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0876] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 96 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 95。

[0877] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0878] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果确认了表 95 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Gly。

[0879] 表 95

[0880]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.95	β - 第 186 位	Leu	Gly	CTG	GGG

[0881] [实施例 57] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (96)

[0882] 为了将 β 亚单位中第 217 位的 Asp 置换为 Gly, 以 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板, 通过进行与实施例 1 相同的操作而引入位点特异性突变。

[0883] 分别以 10ng 实施例 1 中制备的 pPT-DB1 质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成: 在含有序列表中序列号 97 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。取 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖的浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时, 可以确认扩增 DNA 产物的存在。然后, 通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 96。

[0884] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[0885] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果确认了表 96 所示的克隆中脲水合酶的 β 亚单位中第 217 位的 Asp 被置换为 Gly。

[0886] 表 96

[0887]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的改变		碱基序列的改变	
			置换前	置换后	置换前	置换后
	No.96	β -第 217 位	Asp	Gly	GAC	GGC

[0888] [实施例 58] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (97)

[0889] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 40 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 36 位的 Thr 变为 Met) 和克隆 No. 11 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 126 位的 Phe 变为 Tyr)。

[0890] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 11 得到的克隆 No. 11 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0891] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 41 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 97。

[0892] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0893] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 97 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 36 位的 Thr 被置换为 Met、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0894] 表 97

[0895]

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 97	α -第 36 位	Thr	Met	ACG	ATG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0896] [实施例 59] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (98)

[0897] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 42 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 148 位的 Gly 变为 Asp) 和克隆 No. 43 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 204 位的 Val 变为 Arg)。

[0898] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后将一白金环实施例 4 得到的克隆 No. 43 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0899] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 43 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 98。

[0900] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0901] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 98 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 148 位的 Gly 被置换为 Asp、 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Arg。

[0902] 表 98

[0903]

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 98	α -第 148 位	Gly	Asp	GGC	GAC
	α -第 204 位	Val	Arg	GTC	CGC

[0904] [实施例 60] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (99)

[0905] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 77 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 51 位的 Phe 变为 Val) 和克隆 No. 20 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 108 位的 Glu 变为 Asp)。

[0906] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 20 得到的克隆 No. 20 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小

时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离(15000rpm×5 分钟)出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0907] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 78 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 99。

[0908] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0909] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 99 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 51 位的 Phe 被置换为 Val、β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp。

[0910] 表 99

[0911]

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 99	β -第 51 位	Phe	Val	TTC	GTC
	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT

[0912] [参考例 40] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得(100)

[0913] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 20 的氨基酸突变(β 亚单位的第 108 位的 Glu 变为 Asp)和克隆 No. 30 的氨基酸突变(β 亚单位的第 200 位的 Ala 变为 Glu)。

[0914] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 30 得到的克隆 No. 30 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离(15000rpm×5 分钟)出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0915] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 29 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序

列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 100。

[0916] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0917] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 100 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[0918] 表 100

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 100	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT
	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[0920] [实施例 61] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得(101)

[0921] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 82 的氨基酸突变(β 亚单位的第 118 位的 Phe 变为 Val) 和克隆 No. 30 的氨基酸突变(β 亚单位的第 200 位的 Ala 变为 Glu)。

[0922] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 30 得到的克隆 No. 30 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离(15000rpm $\times$ 5 分钟)出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0923] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 83 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 101。

[0924] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0925] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果如表 101 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 118 位的 Phe 被置换为 Val、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[0926] 表 101

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 101	β -第 118 位	Phe	Val	TTC	GTC
	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[0928] [实施例 62] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (102)

[0929] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 88 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 160 位的 Arg 变为 Trp) 和克隆 No. 92 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 186 位的 Leu 变为 Arg)。

[0930] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将实施例 53 得到的克隆 No. 92 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0931] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 89 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 102。

[0932] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0933] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 102 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 160 位的 Arg 被置换为 Trp、 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Arg。

[0934] 表 102

[0935]	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
	No. 102	β -第 160 位	Arg	Trp	CGG	TGG
		β -第 186 位	Leu	Arg	CTG	CGG

[0936] [实施例 63] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (103)

[0937] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 2 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 6 位的 Leu 变为 Thr) 和克隆 No. 97 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 36 位的 Thr 变为 Met、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 变为 Tyr)。

[0938] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金灭菌环将实施例 58 得到的克隆 No. 97 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0939] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 11 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 103。

[0940] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0941] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 103 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Thr、 α 亚单位中第 36 位的 Thr 被置换为 Met、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0942] 表 103

[0943]	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
	No. 103	α -第 6 位	Leu	Thr	CTG	ACG
		α -第 36 位	Thr	Met	ACG	ATG
		α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0944] [实施例 64] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (104)

[0945] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 41 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 71 位的 Arg 变为 His) 和克隆 No. 32 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 19 位的 Ala 变为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 变为 Tyr)。

[0946] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金灭菌环将参考例 32 得到的克隆 No. 32 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0947] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 42 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 104。

[0948] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0949] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 104 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 71 位的 Arg 被置换为 His、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr。

[0950] 表 104

	克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
[0951]	No. 104	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
		α -第 71 位	Arg	His	CGT	CAT
		α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC

[0952] [实施例 65] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (105)

[0953] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 40 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 36 位的 Thr 变为 Met) 和克隆 No. 98 的氨基酸突变 (α 亚单位的第 148 位的 Gly 变为 Asp、 α 亚单位中第 204 位的 Val 变为 Arg)。

[0954] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将实施例 59 得到的克隆 No. 98 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出该菌体。

接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0955] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 41 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 105。

[0956] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0957] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 105 所示,野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 36 位的 Thr 被置换为 Met、 α 亚单位中第 148 位的 Gly 被置换为 Asp、 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Arg。

[0958] 表 105

克隆号	突变位点 (α 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
[0959] No. 105	α -第 36 位	Thr	Met	ACG	ATG
	α -第 148 位	Gly	Asp	GGC	GAC
	α -第 204 位	Val	Arg	GTC	CGC

[0960] [实施例 66] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得(106)

[0961] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 47 的氨基酸突变(β 亚单位的第 10 位的 Thr 变为 Asp)和克隆 No. 101 的氨基酸突变(β 亚单位的第 118 位的 Phe 变为 Val、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 变为 Glu)。

[0962] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金灭菌环将实施例 61 得到的克隆 No. 101 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离(15000rpm $\times$ 5 分钟)出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0963] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 48 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 8 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 9 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 10 中记载有其序列)各 50pmol

的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 106。

[0964] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0965] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 106 所示，野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 118 位的 Phe 被置换为 Val、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[0966] 表 106

克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
[0967] No. 106	β -第 10 位	Thr	Asp	ACC	GAC
	β -第 118 位	Phe	Val	TTC	GTC
	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[0968] [实施例 67] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (107)

[0969] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性，所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 56 的氨基酸突变（ β 亚单位的第 37 位的 Phe 变为 Leu）和克隆 No. 100 的氨基酸突变（ β 亚单位的第 108 位的 Glu 变为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 变为 Glu）。

[0970] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基，并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml，然后使用铂金灭菌环将参考例 40 得到的克隆 No. 100 接种在培养基上，并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中，离心分离（15000rpm×5 分钟）出该菌体。接着，利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0971] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 57 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 8 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述各反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 9 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 10 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后，通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 107。

[0972] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率，结果转化率和选择率为 100%。

[0973] 然后，利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结

果如表 107 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Leu、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[0974] 表 107

	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
[0975]	No. 107	β - 第 37 位	Phe	Leu	TTC	CTC
		β - 第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT
		β - 第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[0976] [实施例 68] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (108)

[0977] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 58 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 37 位的 Phe 变为 Val) 和克隆 No. 100 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 108 位的 Glu 变为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 变为 Glu)。

[0978] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 40 得到的克隆 No. 100 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0979] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 59 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 108。

[0980] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0981] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 108 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Val、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[0982] 表 108

	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
[0983]	No. 108	β -第 37 位	Phe	Val	TTC	GTC
		β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT
		β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[0984] [实施例 69] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (109)

[0985] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 63 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 41 位的 Phe 变为 Ile) 和克隆 No. 99 的氨基酸突变 (β 亚单位中第 51 位的 Phe 变为 Val、 β 亚单位的第 108 位的 Glu 变为 Asp)。

[0986] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将实施例 60 得到的克隆 No. 99 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0987] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 64 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 109。

[0988] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0989] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 109 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Ile、 β 亚单位中第 51 位的 Phe 被置换为 Val、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp。

[0990] 表 109

	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
[0991]	No. 109	β -第 41 位	Phe	Ile	TTC	ATC
		β -第 51 位	Phe	Val	TTC	GTC
		β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT

[0992] [实施例 70] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (110)

[0993] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 68 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 46 位的 Met 变为 Lys) 和克隆 No. 37 的氨基酸突变 (β 亚单位中第 108 位的 Glu 变为 Arg、 β 亚单位的第 212 位的 Ser 变为 Tyr)。

[0994] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将参考例 37 得到的克隆 No. 37 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[0995] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 69 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 110。

[0996] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[0997] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 110 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 46 位的 Met 被置换为 Lys、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Arg、 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[0998] 表 110

	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
[0999]	No. 110	β -第 46 位	Met	Lys	ATG	AAG
		β -第 108 位	Glu	Arg	GAG	CGG
		β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[1000] [实施例 71] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (111)

[1001] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 72 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 48 位的 Leu 变为 Val) 和克隆 No. 37 的氨基酸突变 (β 亚单位中第 108 位的 Glu 变为 Arg、 β 亚单位的第 212 位的 Ser 变为 Tyr)。

[1002] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金灭菌环将参考例 37 得到的克隆 No. 37 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[1003] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 73 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 111。

[1004] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[1005] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 111 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Val、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Arg、 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[1006] 表 111

	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
[1007]	No. 111	β -第 48 位	Leu	Val	CTG	GTG
		β -第 108 位	Glu	Arg	GAG	CGG
		β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[1008] [实施例 72] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (112)

[1009] 确认了在下述氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性,所述氨基酸置换体同时具有克隆 No. 85 的氨基酸突变 (β 亚单位的第 127 位的 Leu 变为 Ser) 和克隆 No. 102 的氨基酸突变 (β 亚单位中第 160 位的 Arg 变为 Trp、 β 亚单位的第 186 位的 Leu 变为 Arg)。

[1010] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml,然后使用铂金接菌环将实施例 62 得到的克隆 No. 102 接种在培养基上,并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中,离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出该菌体。接着,利用碱性 SDS 提取法以该菌体制备质粒 DNA。

[1011] 分别以 10ng 制备的质粒 DNA 为模板进行两种类型的 PCR 反应。PCR 反应 No. 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 86 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 8 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,将下述各反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃) 15 秒、退火 (55℃) 30 秒、链延长反应 (72℃) 120 秒。PCR 反应 No. 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 9 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 10 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中,进行与 PCR 反应 No. 1 同样的操作。以 PCR 反应 No. 1 及 No. 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳 (琼脂糖浓度为 1.0 重量%) 以分析 DNA 扩增产物时,可以确定扩增 DNA 产物的存在。然后,通过进行与实施例 1 完全相同的操作而得到转化子 No. 112。

[1012] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率,结果转化率和选择率为 100%。

[1013] 然后,利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 112 所示,野生型的脲水合酶的 β 亚单位中第 127 位的 Leu 被置换为 Ser、 β 亚单位中第 160 位的 Arg 被置换为 Trp、 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Arg。

[1014] 表 112

	克隆号	突变位点 (β 亚单位内)	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			野生型	突变体	野生型	突变体
[1015]	No. 112	β -第 127 位	Leu	Ser	CTG	TCG
		β -第 160 位	Arg	Trp	CGG	TGG
		β -第 186 位	Leu	Arg	CTG	CGG

[1016] [实施例 73] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (113)

[1017] 确认了同时具有克隆 No. 34 的氨基酸突变和克隆 No. 110 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性。

[1018] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金接菌环将参考例 34 得到的克隆 No. 34 和实施例 70 得到的克隆 No. 110 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以该菌体分别制备克隆 No. 34 和克隆 No. 110 的质粒 DNA。

[1019] 将克隆 No. 110 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 34 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1020] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 110 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 34 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒转化大肠杆菌 HB101 的感受态细胞 (东洋纺绩社制), 得到转化子 No. 113。

[1021] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1022] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 113 所示, 野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Thr、 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr、 β 亚单位中第 46 位的 Met 被置换为 Lys、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Arg、 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[1023] [表 113]

[1024]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 113	α -第 6 位	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -第 46 位	Met	Lys	ATG	AAG
	β -第 108 位	Glu	Arg	GAG	CGG
	β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[1025] [实施例 74] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (114)

[1026] 确认了同时具有克隆 No. 34 的氨基酸突变和克隆 No. 111 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性。

[1027] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金接菌环将参考例 34 得到的克隆 No. 34 和实施例 71 得到的克隆 No. 111 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以所述菌体分别制备克隆 No. 34 和克隆 No. 111 的质粒 DNA。

[1028] 将克隆 No. 111 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 34 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1029] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 111 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 34 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒对大肠杆菌 HB 101 的感受态细胞 (东洋纺绩社制) 进行转化, 得到转化子 No. 114。

[1030] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1031] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 114 所示, 野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Thr、 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr、 β 亚单位中第 48 位的 Leu 被置换为 Val、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Arg、 β 亚单位中第 212 位的 Ser 被置换为 Tyr。

[1032] 表 114

[1033]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 114	α -第 6 位	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -第 48 位	Leu	Val	CTG	GTG
	β -第 108 位	Glu	Arg	GAG	CGG
	β -第 212 位	Ser	Tyr	TCC	TAC

[1034] [实施例 75] 保持了胍水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (115)

[1035] 确认了同时具有克隆 No. 35 的氨基酸突变和克隆 No. 112 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有胍水合酶活性。

[1036] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金接菌环将一白金环参考例 35 得到的克隆 No. 35 和实施例 72 得到的克隆 No. 112 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以该菌体分别制备克隆 No. 35 和克隆 No. 112 的质粒 DNA。

[1037] 将克隆 No. 112 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 35 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1038] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 112 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 35 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒对大肠杆菌 HB101 感受态细胞 (东洋纺绩社制) 进行转化, 得到转化子 No. 115。

[1039] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1040] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了胍水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 115 所示, 野生型的胍水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Ala、 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr、 β 亚单位中第 127 位的 Leu 被置换为 Ser、 β 亚单位中第 160 位的 Arg 被置换为 Trp、 β 亚单位中第 186 位的 Leu 被置换为 Arg。

[1041] [表 115]

[1042]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 115	α -第 6 位	Leu	Ala	CTG	GCG
	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -第 127 位	Leu	Ser	CTG	TCG
	β -第 160 位	Arg	Trp	CGG	TGG
	β -第 186 位	Leu	Arg	CTG	CGG

[1043] [实施例 76] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (116)

[1044] 确认了同时具有克隆 No. 103 的氨基酸突变和克隆 No. 106 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性。

[1045] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金接菌环将实施例 63 得到的克隆 No. 103 和实施例 66 得到的克隆 No. 106 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以该菌体分别制备克隆 No. 103 和克隆 No. 106 的质粒 DNA。

[1046] 将克隆 No. 106 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 103 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1047] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 106 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 103 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒对大肠杆菌 HB 101 感受态细胞 (东洋纺绩社制) 进行转化, 得到转化子 No. 116。

[1048] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1049] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 116 所示, 野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 6 位的 Leu 被置换为 Thr、 α 亚单位中第 36 位的 Thr 被置换为 Met、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr、 β 亚单位中第 10 位的 Thr 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 118 位的 Phe 被置换为 Val、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[1050] 表 116

[1051]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 116	α -第 6 位	Leu	Thr	CTG	ACG
	α -第 36 位	Thr	Met	ACG	ATG
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -第 10 位	Thr	Asp	ACC	GAC
	β -第 118 位	Phe	Val	TTC	GTC
	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[1052] [实施例 77] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (117)

[1053] 确认了同时具有克隆 No. 104 的氨基酸突变和克隆 No. 107 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性。

[1054] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金灭菌环将实施例 64 得到的克隆 No. 104 和实施例 67 得到的克隆 No. 107 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm×5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以该菌体分别制备克隆 No. 104 和克隆 No. 107 的质粒 DNA。

[1055] 将克隆 No. 107 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 104 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1056] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 107 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 104 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒对大肠杆菌 HB 101 感受态细胞 (东洋纺绩社制) 进行转化, 得到转化子 No. 117。

[1057] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1058] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 117 所示, 野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 71 位的 Arg 被置换为 His、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr、 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Leu、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[1059] 表 117

[1060]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 117	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 71 位	Arg	His	CGT	CAT
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -第 37 位	Phe	Leu	TTC	CTC
	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT
	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[1061] [实施例 78] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (118)

[1062] 确认了同时具有克隆 No. 104 的氨基酸突变和克隆 No. 108 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性。

[1063] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金接菌环将实施例 64 得到的克隆 No. 104 和实施例 68 得到的克隆 No. 108 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以该菌体分别制备克隆 No. 104 和克隆 No. 108 的质粒 DNA。

[1064] 将克隆 No. 108 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 104 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1065] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 108 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 104 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒对大肠杆菌 HB 101 感受态细胞 (东洋纺绩社制) 进行转化, 得到转化子 No. 118。

[1066] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1067] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 118 所示, 野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 19 位的 Ala 被置换为 Val、 α 亚单位中第 71 位的 Arg 被置换为 His、 α 亚单位中第 126 位的 Phe 被置换为 Tyr、 β 亚单位中第 37 位的 Phe 被置换为 Val、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[1068] 表 118

[1069]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 118	α -第 19 位	Ala	Val	GCG	GTG
	α -第 71 位	Arg	His	CGT	CAT
	α -第 126 位	Phe	Tyr	TTC	TAC
	β -第 37 位	Phe	Val	TTC	GTC
	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT
	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[1070] [实施例 79] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (119)

[1071] 确认了同时具有克隆 No. 105 的氨基酸突变和克隆 No. 109 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性。

[1072] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金接菌环将实施例 65 得到的克隆 No. 105 和实施例 69 得到的克隆 No. 109 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以该菌体分别制备克隆 No. 105 和克隆 No. 109 的质粒 DNA。

[1073] 将克隆 No. 109 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 105 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1074] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 109 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 105 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒对大肠杆菌 HB101 感受态细胞 (东洋纺绩社制) 进行转化, 得到转化子 No. 119。

[1075] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1076] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 119 所示, 野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 36 位的 Thr 被置换为 Met、 α 亚单位中第 148 位的 Gly 被置换为 Asp、 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Arg、 β 亚单位中第 41 位的 Phe 被置换为 Ile、 β 亚单位中第 51 位的 Phe 被置换为 Val、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp。

[1077] 表 119

[1078]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 119	α -第 36 位	Thr	Met	ACG	ATG
	α -第 148 位	Gly	Asp	GGC	GAC
	α -第 204 位	Val	Arg	GTC	CGC
	β -第 41 位	Phe	Ile	TTC	ATC
	β -第 51 位	Phe	Val	TTC	GTC
	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT

[1079] [实施例 80] 保持了脲水合酶活性的氨基酸置换体的获得 (120)

[1080] 确认了同时具有克隆 No. 98 的氨基酸突变和克隆 No. 100 的氨基酸突变的氨基酸置换体中也保持有脲水合酶活性。

[1081] 在 30ml 试管中装入 10ml 的 LB 液体培养基, 并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml, 然后使用铂金接菌环将实施例 59 得到的克隆 No. 98 和参考例 40 得到的克隆 No. 100 接种在培养基上, 并在 37℃、300rpm 下培养约 20 小时。取出 1ml 上述培养液放入适合的离心管中, 离心分离 (15000rpm $\times$ 5 分钟) 出各菌体。接着, 利用碱性 SDS 提取法以该菌体分别制备克隆 No. 98 和克隆 No. 100 的质粒 DNA。

[1082] 将克隆 No. 100 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 1.0%), 从琼脂糖凝胶中切下约 770bp 的 DNA 片段。同样将克隆 No. 98 的质粒 DNA 用 EcoRI 和 NotI 切割后, 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖, 琼脂糖浓度为 0.7%), 从琼脂糖凝胶中切下约 3.8kbp 的 DNA 片段。将切下的 2 份琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并分别混悬在 1ml TE 溶液中, 然后在 55℃下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。对该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀, 从而纯化各 DNA 片段。最后溶于 10 μ l TE 中。

[1083] 用 DNA ligation 试剂盒 (宝酒造社制) 将上述得到的来源于克隆 No. 100 的约 770bp 的 DNA 片段和来源于克隆 No. 98 的约 3.8kbp 的 DNA 片段进行连接以构建质粒, 用该质粒对大肠杆菌 HB101 感受态细胞 (东洋纺绩社制) 进行转化, 得到转化子 No. 120。

[1084] 利用与参考例 1 相同的方法求出添加率和选择率, 结果转化率和选择率为 100%。

[1085] 然后, 利用碱性 SDS 提取法从上述菌体制备质粒。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了脲水合酶基因部分的碱基序列。结果如表 120 所示, 野生型的脲水合酶的 α 亚单位中第 148 位的 Gly 被置换为 Asp、 α 亚单位中第 204 位的 Val 被置换为 Arg、 β 亚单位中第 108 位的 Glu 被置换为 Asp、 β 亚单位中第 200 位的 Ala 被置换为 Glu。

[1086] 表 120

[1087]

克隆号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		野生型	突变体	野生型	突变体
No. 120	α -第 148 位	Gly	Asp	GGC	GAC
	α -第 204 位	Val	Arg	GTC	CGC
	β -第 108 位	Glu	Asp	GAG	GAT
	β -第 200 位	Ala	Glu	GCC	GAC

[1088] [实施例 81] 从紫红红球菌 J-1 株制备基因组 DNA

[1089] 在 500ml 装有挡板的三角烧瓶中配制下述组成的培养基 100ml, 并进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。

[1090] 培养基的组成:

[1091] 葡萄糖:10.0g/L、磷酸二氢钾:0.5g/L、磷酸氢二钾:0.5g/L、硫酸镁·七水合物:0.5g/L、酵母提取物:1.0g/L、蛋白胨:7.5g/L、尿素:7.5g/L、氯化钴·六水合物:10.0mg/L, pH7.2。

[1092] 使用铂金接菌环将专利文献 1 记载的紫红红球菌 J-1 株(基于微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约, 通过专利手续保藏在上述的保藏机构, 保藏编号为 FERM BP-1478, 经申请任何人都可获得)接种在上述培养基上, 并在 30℃、130rpm 下培养约 72 小时。通过离心分离(15000G×15 分钟)仅将菌体从培养液中分离出来, 接着将该菌体重悬在 50ml 的生理盐水中后, 再次离心分离而得到湿菌体。

[1093] 向上述得到的 2g 湿菌体中加入 40ml 含有 0.15M NaCl 的 50mMEDTA·2Na 的水溶液(pH8.0)使菌体混悬, 在 90℃下进行 10 分钟煮沸处理。将该处理液冷却至 37℃, 向其中加入 100mg 蛋白溶菌酶并在 37℃下保温 1 小时。接着向其中加入 30mg、20000U/mg 的酶解酶(zymolyase), 并在 37℃下保温 1 小时。然后向其中加入 5mg、20U/mg 的蛋白酶 K, 并在 37℃下保温 1 小时。进一步向其中加入 2ml 的 10% SDS 溶液并在 65℃下保温 1 小时后, 立即进行苯酚/氯仿萃取。首先, 加入 42ml 用 TE(含有 1mM EDTA·2Na 的 10mM Tris-HCl 水溶液;pH8.0)饱和的苯酚液并缓慢搅拌。进行离心(3000rpm、10 分钟)以分离水相和有机相, 并仅收集水相。向所得水相中加入 21ml 上述 TE 饱和的苯酚液和 21ml 氯仿, 并再次进行缓慢搅拌。然后, 再次进行离心(3000rpm、10 分钟)以分离水相和有机相, 并再次仅收集水相。向所得水相中加入 42ml 氯仿并再次进行缓慢搅拌, 然后, 再次进行离心(3000rpm、10 分钟)以分离水相和有机相, 仅收集水相。向该水相中加入 4ml 含有 1.1M NaCl 的 TE 溶液和 92ml 乙醇并在室温下放置一段时间后, 用玻璃棒卷取析出的丝状 DNA。以 70%、80%、90% 的乙醇水溶液依次脱水后, 将自然干燥的该 DNA 再次溶于 40ml TE 溶液中。向其中加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃下保温 1 小时。接着以限制性核酸内切酶 BamHI 进行部分切割。通过苯酚/氯仿萃取及乙醇沉淀将部分切割的该 DNA 再次纯化, 并溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ml。

[1094] [实施例 82] 利用 PCR 从紫红红球菌 J-1 株基因组 DNA 制备脲水合酶基因

[1095] 基于专利文献 2 及非专利文献 1 中公开的脲水合酶基因的碱基序列合成了序列表的序列号 105 及 106 记载的引物。以 3 μ g 实施例 81 中制备的部分切割的染色体 DNA 为模

板进行 PCR。PCR 反应为：在分别含有 200ng 各引物和 1U KOD 聚合酶（东洋纺绩社制）的总计 50 μ l 的反应系统中，将下述循环重复 40 次：热变性（98℃）15 秒、退火（58℃）15 秒、链延长反应（68℃）2 分钟。将 PCR 反应的最终反应液进行琼脂糖凝胶电泳（使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖，琼脂糖的浓度为 0.8 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认存在约 1.3kbp 的扩增 DNA 产物。

[1096] 接着从琼脂糖凝胶中仅切出约 1.3kbp 的 DNA 片段，将该琼脂糖凝胶（约 0.1g）微细地粉碎并混悬在 1ml 的 TE 溶液中，在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将所得熔化液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀。首先，加入 1ml 用 TE（含有 1mM EDTA · 2Na 的 10mM Tris-HCl 水溶液；pH8.0）饱和的苯酚液并缓慢搅拌。进行离心（3000rpm、10 分钟）以分离水相和有机相，并仅收集水相。将上述操作重复 3 次后，向得到的水相中加入 0.4ml 上述 TE 饱和的苯酚液和 0.4ml 氯仿，并再次进行缓慢搅拌。然后，再次进行离心（3000rpm、10 分钟）以分离水相和有机相，并再次仅收集水相。向所得水相中加入 0.8ml 氯仿并再次进行缓慢搅拌，然后，再次进行离心（3000rpm、10 分钟）以分离水相和有机相，仅收集水相。向该水相中加入 80 μ l 含有 1.1M NaCl 的 TE 溶液和 1.7ml 乙醇并在 -80℃ 下放置 30 分钟后，离心分离（15000rpm、20 分钟、4℃）以回收 DNA 片段的沉淀。将该 DNA 片段风干后溶于 10 μ l 的 TE 中。

[1097] 将纯化的约 1.3kbp 的扩增 DNA 片段用限制性核酸内切酶 EcoRI 和 ScaI 进行切割后，以琼脂糖凝胶电泳（使用 Sigma 社制的 VII 型低熔点琼脂糖，琼脂糖的浓度为 0.8 重量%）分析 DNA 扩增产物时，可以确认存在约 1.3kbp 的 DNA。从琼脂糖凝胶中切下上述约 1.3kbp 的 DNA 片段。将切下的琼脂糖凝胶（约 0.1g）微细地粉碎并混悬在 1ml TE 溶液中，将其在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将该熔化液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀。首先，加入 1ml 用 TE（含有 1mMEDTA · 2Na 的 10mM Tris-HCl 水溶液；pH8.0）饱和的苯酚液并缓慢搅拌。进行离心（3000rpm、10 分钟）以分离水相和有机相，并仅收集水相。将上述操作重复 3 次后，向得到的水相中加入 0.4ml 上述 TE 饱和的苯酚液和 0.4ml 氯仿，并再次进行缓慢搅拌。然后，再次进行离心（3000rpm、10 分钟）以分离水相和有机相，并再次仅收集水相。向所得水相中加入 0.8ml 氯仿并再次进行缓慢搅拌后，再次进行离心（3000rpm、10 分钟）以分离水相和有机相，仅收集水相。向该水相中加入 80 μ l 含有 1.1M NaCl 的 TE 溶液和 1.7ml 乙醇并在 -80℃ 下放置 30 分钟后，离心分离（15000rpm、20 分钟、4℃）以回收 DNA 片段的沉淀。将该 DNA 片段风干后溶于 10 μ l 的 TE 中。

[1098] [实施例 83] 使来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶基因得以表达的质粒载体的制备

[1099] 在 500ml 装有挡板的三角烧瓶中配制 100ml 含有 40 μ g/ml 硫酸铁 · 七水合物和 10 μ g/ml 氯化钴 · 六水合物的下述组成的 LB 液体培养基，并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。

[1100] 培养基的组成：

[1101] 酵母提取物：5.0g/L、聚蛋白胍：10.0g/L、NaCl：5.0g/L、氯化钴 · 六水合物：10.0mg/L、硫酸铁 · 七水合物：40.0mg/L，pH7.5。

[1102] 向上述培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μ g/ml 后，使用铂金接菌环将专利文献 3 记载的 MT10822 (FERM BP-5785) 接种在上述培养基上，并在 37℃、130rpm 下培

养 16 小时。通过离心分离 (15000G×15 分钟) 仅将菌体从培养液中分离出来,接着将该菌体重悬在 50ml 的生理盐水中后,再次离心分离而得到湿菌体。利用碱性 SDS 提取法从该湿菌体制备 pPT-DB1 (图 1) 的质粒,加入 30 μg 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μg/μl。

[1103] 将 1 μg 纯化的质粒用限制性核酸内切酶 EcoRI 和 Eco47III 进行切割后,以琼脂糖凝胶电泳 (使用 Sigma 社制的 VII 型低熔点琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.8 重量%) 分析 DNA 扩增产物时,可以确认存在约 3.3kbp 和约 1.3kbp 的 DNA。从琼脂糖凝胶中仅切下约 3.3kbp 的 DNA 片段。将切下的琼脂糖凝胶 (约 0.1g) 微细地粉碎并混悬在 1ml TE 溶液中后,将其在 55℃ 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将该熔化液进行苯酚 / 氯仿萃取和乙醇沉淀。首先,加入 1ml 用 TE (含有 1mMEDTA·2Na 的 10mM Tris-HCl 水溶液;pH8.0) 饱和的苯酚液并缓慢搅拌。进行离心 (3000rpm、10 分钟) 以分离水相和有机相,仅收集水相。将上述操作重复 3 次后,向得到的水相中加入 0.4ml 上述 TE 饱和的苯酚液和 0.4ml 氯仿后再次进行缓慢搅拌。然后,再次进行离心 (3000rpm、10 分钟) 以分离水相和有机相,并再次仅收集水相。向所得水相中加入 0.8ml 氯仿并再次进行缓慢搅拌后,再次进行离心 (3000rpm、10 分钟) 以分离水相和有机相,仅收集水相。向该水相中加入 80 μl 含有 1.1M NaCl 的 TE 溶液和 1.7ml 乙醇并在 -80℃ 下放置 30 分钟后,离心分离 (15000rpm、20 分钟、4℃) 以回收 DNA 片段的沉淀。将该 DNA 片段风干后溶于 10 μl 的 TE 中。

[1104] [实施例 84] 使来源于紫红红球菌 J-1 株的脲水合酶活性得以表现的转化子的构建

[1105] 将实施例 82 中制备的经 EcoRI 和 ScaI 切割的约 1.3kbp 的 DNA 片段和实施例 83 中制备的经 EcoRI 和 Eco47III 切割的约 3.3kbp 的 DNA 片段混合,进行 DNA 连接反应。用反应产物转化大肠杆菌 HB101 的感受态细胞 (东洋纺绩社制),得到转化子 No. 200。

[1106] 在 500ml 装有挡板的三角烧瓶中配制 100ml 含有 40 μg/ml 硫酸铁·七水合物和 10 μg/ml 氯化钴·六水合物的 LB 液体培养基,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向该培养基中加入氨苄青霉素使最终浓度为 100 μg/ml 后,使用铂金接菌环将转化子 No. 200 接种在上述培养基上,并在 37℃、130rpm 下培养约 20 小时。通过离心分离 (5000G×15 分钟) 将该转化子从该最终培养液中分离出来,接着将分离的该转化子重悬在 50ml 的生理盐水中后,再次离心分离 (5000G×15 分钟) 而分离该转化子。

[1107] 将 0.1g 分离的该转化子混悬在 20ml、50mM 的磷酸钾水溶液 (pH7.0) 中,向其中加入 0.5ml 丙烯腈或甲基丙烯腈,并在 30℃ 下边缓慢地搅拌边使其反应 1 小时。反应结束后,用 HPLC 分析最终反应液,结果确认了在最终反应液中仅存在与添加的脲化合物 (丙烯腈或甲基丙烯腈) 相当摩尔量的酰胺化合物 (丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺),而不存在脲化合物 (丙烯腈或甲基丙烯腈) 及对应的有机酸 (丙烯酸或甲基丙烯酸)。即,转化率和选择率为 100%。

[1108] 利用碱性 SDS 提取法从分离的该转化子制备质粒,加入 30 μg RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μg/μl。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。结果确认了该质粒的序列中含有序列表的序列号 103 记载的编码脲水合酶激活蛋白质的 ORF 和序列列表的序列号 104 记载的编码来源于紫红红球菌 J-1

株的胍水合酶的 ORF。该质粒取名为 pJ1H-DB1 (图 2)。

[1109] [实施例 85] 从修饰前的胍水合酶中提取将要引入突变的目标 (1)

[1110] 作为修饰方法的对象,以来源于紫红红球菌 J-1 株的胍水合酶作为例子。以权利要求 56 ~ 62 记载的确定作为将要引入突变的目标的氨基酸残基的方法为例,进行目标的提取。权利要求 56、57 记载的确定方法中的氨基酸序列对比使用日立 SOFT 社制的 DNASIS。权利要求 58 ~ 62 记载的确定方法中基于氨基酸序列对比的立体结构模拟使用 Accelrys 社制的 Modeler 或 Homology。

[1111] 结果,采用任一方法提取的氨基酸残基中均含有作为构成该胍水合酶的两种多肽之一的 β 亚单位的氨基酸序列中第 48 位的 Trp。因此,用来源于紫红红球菌 J-1 株的胍水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 48 位的 Trp 为例来作为引入突变的目标。

[1112] [实施例 86] 从修饰前的胍水合酶中提取将要引入突变的目标 (2)

[1113] 作为修饰方法的对象,以来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的胍水合酶作为例子。以权利要求 56 ~ 62 记载的确定作为将要引入突变的目标的氨基酸残基的方法为例,进行目标的提取。权利要求 56、57 记载的确定方法中的氨基酸序列对比使用日立 SOFT 社制的 DNASIS。权利要求 58 ~ 62 记载的确定方法中基于氨基酸序列对比的立体结构模拟使用 Accelrys 社制的 Modeler 或 Homology。

[1114] 结果,作为在形成下述孔穴的区域中存在而被提取的氨基酸残基中,以如下氨基酸残基作为各引入突变的目标的代表例,即,作为构成该胍水合酶的两种多肽之一的 α 亚单位的氨基酸序列中第 36 位的 Thr、第 48 位的 Asn、以及作为另一种多肽的 β 亚单位的氨基酸序列中第 32 位的 Val、第 33 位的 Ala、第 37 位的 Phe、第 40 位的 Thr、第 41 位的 Phe、第 46 位的 Met、第 48 位的 Leu、第 51 位的 Phe、第 61 位的 Ala、第 72 位的 Trp、第 112 位的 Lys、第 118 位的 Phe、第 127 位的 Leu;上述孔穴是底物从酶外部进入活性中心时、或产物从活性中心移至酶外部时通过的孔穴。

[1115] [实施例 87] 从修饰前的胍水合酶中提取将要引入突变的目标 (3)

[1116] 作为修饰方法的对象,以来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的胍水合酶作为例子。以权利要求 56 ~ 62 记载的确定作为引入突变的目标的氨基酸残基的方法为例,进行目标的提取。权利要求 56、57 记载的确定方法中的氨基酸序列对比使用日立 SOFT 社制的 DNASIS。权利要求 58 ~ 62 记载的确定方法中基于氨基酸序列对比的立体结构模拟使用 Accelrys 社制的 Modeler 或 Homology。

[1117] 结果,作为在形成下述界面的区域中存在的氨基酸残基被提取的氨基酸残基中,以下述氨基酸残基作为各引入突变的目标的代表例,即,作为构成该胍水合酶的两种多肽之一的 α 亚单位的氨基酸序列中第 36 位的 Thr、第 148 位的 Gly、第 188 位的 Thr、第 204 位的 Val、以及作为另一多肽的 β 亚单位的氨基酸序列中第 10 位的 Thr、第 32 位的 Val、第 33 位的 Ala、第 112 位的 Lys、第 118 位的 Phe、第 127 位的 Leu、第 146 位的 Arg、第 150 位的 Ala、第 160 位的 Arg、第 168 位的 Thr、第 171 位的 Lys、第 176 位的 Tyr、第 186 位的 Leu、第 217 位的 Asp、第 218 位的 Cys;上述界面为参与 2 聚体形成的 α 亚单位和 β 亚单位之间的结合界面、或参与 2 聚体之间结合的界面。

[1118] [实施例 88] 用于获得修饰酶的突变引入 (1)

[1119] 为了将突变引入构成胍水合酶的多肽的氨基酸序列中,使用宝酒造社制的“LA

PCR in vitro mutagenesis Kit”进行位点特异性突变的引入。下文中“LA PCR in vitro mutagenesis Kit”简称为试剂盒。在以下实施例中基本按照试剂盒的原理和操作方法来进行。

[1120] 在实施例 84 中构建的、含有编码来源于紫红红球菌 J-1 株的脲水合酶的 ORF 的质粒 pJ1H-DB1 中,实施下述突变引入处理,即,将实施例 85 中提取的、作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 48 位的 Trp 转换成其它氨基酸。

[1121] 以 10ng pJ1H-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 110 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的反应。

[1122] 以 PCR 反应 1 及 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖的浓度为 1.0 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认均存在扩增 DNA 产物。使用 Microcon 100(宝酒造社制)从各 PCR 最终反应液中除去过剩的引物和 dNTP 后,加入 TE 分别配制成 50 μ l 的溶液。分别配制总计 47.5 μ l 的含 0.5 μ l 上述 TE 溶液的退火溶液(组成遵照试剂盒中记载的条件),实施 10 分钟热变性处理(98 $^{\circ}$ C)后,用 60 分钟以恒定的速度冷却至 37 $^{\circ}$ C,接着在 37 $^{\circ}$ C 下保持 15 分钟进行退火处理。

[1123] 将 0.5 μ l TaKaRa LA Taq 加入至退火处理液中,并在 72 $^{\circ}$ C 下加热处理 3 分钟,由此完成了异源双链的形成。接着对其进行 PCR 反应 3,即,向其中加入 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)及 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 使总量达到 50 μ l 后,将下述反应重复进行 25 次循环,所述反应为,热变性(98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火(55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应(72 $^{\circ}$ C)2 分钟。

[1124] 用 5 μ l PCR 反应 3 的最终反应液进行琼脂糖凝胶电泳(使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.8 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认存在约 1.9kbp 的扩增 DNA 产物。接着从琼脂糖凝胶中仅切出约 1.9kbp 的 DNA 片段,将该琼脂糖凝胶(约 0.1g)微细地粉碎并混悬在 1ml 的 TE 溶液中后,在 55 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将所得熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μ l 的 TE 中。

[1125] 用限制性核酸内切酶 EcoRI 及 HindIII 切割上述纯化的约 1.9kbp 的扩增 DNA 片段,然后对该限制性核酸内切酶处理液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段。最后,将该片段溶解于 10 μ l TE 中。同样用限制性核酸内切酶 EcoRI 及 HindIII 切割 pJ1H-DB1 后,进行琼脂糖凝胶电泳(使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.7%),仅将约 2.7kbp 的 DNA 片段从琼脂糖凝胶中切下。将切下的琼脂糖凝胶(约 0.1g)微细地粉碎并混悬在 1ml TE 溶液中,在 55 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀,从而纯化该 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μ l 的 TE 中。

[1126] 将由此得到的约 1.9kbp 及约 2.7kbp 的 DNA 片段进行 DNA 连接反应后,对大肠杆

菌 HB101 感受态细胞（东洋纺绩社制）进行转化，得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1127] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pJ1H-DB1 相比较，编码来源于紫红红球菌 J-1 株的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 48 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列，变化为编码除 Trp 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1128] 以下（表 121）示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1129] 表 121

[1130]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 201	β -第 48 位	Trp	Tyr	tgg	tat
No. 202	β -第 48 位	Trp	Val	tgg	gtg
No. 203	β -第 48 位	Trp	Ala	tgg	gcg
No. 204	β -第 48 位	Trp	Gly	tgg	ggg

[1131] [实施例 89] 用于获得修饰酶的突变引入 (2)

[1132] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理，所述突变为，将实施例 86 或 87 中作为引入突变的目标提取的 α 亚单位的氨基酸序列中第 36 位的 Thr 转变为其它氨基酸。

[1133] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 1 通过以下步骤完成：在含有序列列表中序列号 111 记载的引物和 M13 引物 M4（序列列表的序列号 107 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列列表的序列号 108 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列列表的序列号 109 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1134] 以 PCR 反应 1 及 2 的最终反应液各 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖的浓度为 1.0 重量%）以分析 DNA 扩增产物时，可以确认均存在扩增 DNA 产物。使用 Microcon 100（宝酒造社制）从各 PCR 最终反应液中除去过剩的引物和 dNTP 后，加入 TE 分别配制成 50 μ l 的溶液。配制总计 47.5 μ l 的分别含 0.5 μ l 上述 TE 溶液的退火溶液（组成遵照试剂盒中记载的条件），实施 10 分钟热变性处理（98℃）后，用 60 分钟以恒定的速度冷却至 37℃，接着在 37℃ 下保持 15 分钟进行退火处理。

[1135] 将 0.5 μ l TaKaRa LA Taq 加入至退火处理液中，并在 72℃ 下加热处理 3 分钟，由此完成了异源双链的形成。接着对其进行 PCR 反应 3，即，向其中加入 M13 引物 M4（序列列表

的序列号 107 中记载有其序列) 及 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列) 各 50pmol 使总量达到 50 μ l 后,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。

[1136] 用 5 μ l PCR 反应 3 的最终反应液进行琼脂糖凝胶电泳(使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.8 重量%)以分析 DNA 扩增产物时,可以确认存在约 1.9kbp 的扩增 DNA 产物。接着从琼脂糖凝胶中仅切出约 1.9kbp 的 DNA 片段,将该琼脂糖凝胶(约 0.1g)微细地粉碎并混悬在 1ml 的 TE 溶液中后,在 55 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μ l 的 TE 中。

[1137] 用限制性核酸内切酶 EcoRI 及 HindIII 切割上述纯化的约 1.9kbp 的扩增 DNA 片段,然后对该限制性核酸内切酶处理液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀以纯化所述 DNA 片段。最后,将该片段溶解于 10 μ l TE 中。同样用限制性核酸内切酶 EcoRI 及 HindIII 切割 pPT-DB1 后,进行琼脂糖凝胶电泳(使用 Sigma 社制 VII 型低熔点的琼脂糖,琼脂糖的浓度为 0.7%),仅将约 2.7kbp 的 DNA 片段从琼脂糖凝胶中切下。将切下的琼脂糖凝胶(约 0.1g)微细地粉碎并混悬在 1ml TE 溶液中,在 55 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时使琼脂糖完全熔化。将该熔化液进行苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀从而纯化该 DNA 片段。最后,将该片段溶于 10 μ l 的 TE 中。

[1138] 将由此得到的约 1.9kbp 及约 2.7kbp 的 DNA 片段进行 DNA 连接反应后,对大肠杆菌 HB101 感受态细胞(东洋纺绩社制)进行转化,得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1139] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 α 亚单位的氨基酸序列中第 36 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Thr 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1140] 以下(表 122)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1141] 表 122

[1142]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 40	α -第 36 位	Thr	Met	acg	atg
No. 40a	α -第 36 位	Thr	Ser	acg	tcg
No. 40b	α -第 36 位	Thr	Ala	acg	gcg
No. 40c	α -第 36 位	Thr	Gly	acg	ggg
No. 40d	α -第 36 位	Thr	Trp	acg	tgg

[1143] [实施例 90] 用于获得修饰酶的突变引入 (3)

[1144] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 α 亚单位的氨基酸序列中第 48 位的 Asn 转变为其它氨基酸。

[1145] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 112 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1146] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1147] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 α 亚单位的氨基酸序列中第 48 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Asn 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1148] 以下(表 123)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1149] 表 123

[1150]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 40e	α -第 48 位	Asn	Gln	aac	caa
No. 40f	α -第 48 位	Asn	Glu	aac	gaa

[1151] [实施例 91] 用于获得修饰酶的突变引入 (4)

[1152] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 α 亚单位的氨基酸序列中第 71 位的 Arg 转变为其它氨基酸。

[1153] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 113 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中

记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1154] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1155] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 α 亚单位的氨基酸序列中第 71 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Arg 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1156] 以下(表 124)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1157] 表 124

[1158]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 41	α -第 71 位	Arg	His	cgt	cat

[1159] [实施例 92] 用于获得修饰酶的突变引入 (5)

[1160] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 α 亚单位的氨基酸序列中第 148 位的 Gly 转变为其它氨基酸。

[1161] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 114 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1162] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1163] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 α 亚单位的氨基酸序列中第 148 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Gly 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1164] 以下(表 125)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1165] 表 125

[1166]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 42	α -第 148 位	Gly	Asp	ggc	gac

[1167] [实施例 93] 用于获得修饰酶的突变引入 (6)

[1168] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 α 亚单位的氨基酸序列中第 188 位的 Thr 转变为其它氨基酸。

[1169] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 115 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1170] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1171] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 α 亚单位的氨基酸序列中第 188 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为与编码除 Thr 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1172] 以下(表 126)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1173] 表 126

[1174]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 42a	α -第 188 位	Thr	Gly	acc	ggc

[1175] [实施例 94] 用于获得修饰酶的突变引入 (7)

[1176] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 α 亚单位的氨基酸序列中第 204 位的 Val 转变为其它氨基酸。

[1177] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完

成：在含有序列表中序列号 116 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 107 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 108 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 109 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1178] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g / μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1179] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较，编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 α 亚单位的氨基酸序列中第 204 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列，转变为编码除 Val 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1180] 以下（表 127）示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1181] 表 127

[1182]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 43	α -第 204 位	Val	Arg	gtc	cgc
No. 44	α -第 204 位	Val	Lys	gtc	aaa
No. 45	α -第 204 位	Val	Trp	gtc	tgg
No. 46	α -第 204 位	Val	Thr	gtc	acc

[1183] [实施例 95] 用于获得修饰酶的突变引入 (8)

[1184] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理，所述突变为，将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 10 位的 Thr 转变为其它氨基酸。

[1185] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 117 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 107 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 108 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 109 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1186] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该

DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1187] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 10 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Thr 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1188] 以下(表 128)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1189] 表 128

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 47	β -第 10 位	Thr	Asp	acc	gac
No. 48	β -第 10 位	Thr	Glu	acc	gaa
No. 49	β -第 10 位	Thr	Trp	acc	tgg
No. 50	β -第 10 位	Thr	Gly	acc	ggc
No. 51	β -第 10 位	Thr	Tyr	acc	tac
No. 52	β -第 10 位	Thr	Cys	acc	tgc

[1191] [实施例 96] 用于获得修饰酶的突变引入 (9)

[1192] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述突变引入的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 32 位的 Val 转变为其它氨基酸。

[1193] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 118 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 $50 \mu\text{l}$ 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98°C) 15 秒、退火 (55°C) 30 秒、链延长反应 (72°C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 $50 \mu\text{l}$ 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1194] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 $30 \mu\text{g}$ 的 RNaseA 并在 37°C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1195] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 32 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Val 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1196] 以下(表 129)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、

碱基序列的变化。

[1197] 表 129

[1198]	编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
	No. 53	β-第 32 位	Val	Gly	gtc	ggc

[1199] [实施例 97] 用于获得修饰酶的突变引入 (10)

[1200] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 33 位的 Ala 转变为其它氨基酸。

[1201] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 119 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1202] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1203] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 33 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Ala 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1204] 以下(表 130)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1205] 表 130

[1206]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 53a	β-第 33 位	Ala	Val	gcg	gtg
No. 53b	β-第 33 位	Ala	Met	gcg	atg

[1207] [实施例 98] 用于获得修饰酶的突变引入 (11)

[1208] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87

中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 37 位的 Phe 转变为其它氨基酸。

[1209] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 120 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1210] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1211] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 37 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Phe 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1212] 以下(表 131)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1213] 表 131

[1214]	编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
	No. 54	β -第 37 位	Phe	Thr	ttc	acc
	No. 55	β -第 37 位	Phe	Ala	ttc	gcc
	No. 56	β -第 37 位	Phe	Leu	ttc	ctc
	No. 57	β -第 37 位	Phe	Ile	ttc	atc
No. 58	β -第 37 位	Phe	Val	ttc	gtc	

[1215] [实施例 99] 用于获得修饰酶的突变引入 (12)

[1216] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 40 位的 Thr 转变为其它氨基酸。

[1217] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 121 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中

记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1218] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1219] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 40 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Thr 以外氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1220] 以下(表 132)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1221] 表 132

[1222]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 58a	β -第 40 位	Thr	Val	acg	gtg
No. 58b	β -第 40 位	Thr	Leu	acg	ctg
No. 58c	β -第 40 位	Thr	Ile	acg	att

[1223] [实施例 100] 用于获得修饰酶的突变引入 (13)

[1224] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 41 位的 Phe 转变为其它氨基酸。

[1225] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 122 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性(98℃)15 秒、退火(55℃)30 秒、链延长反应(72℃)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1226] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1227] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 41 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Phe 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1228] 以下(表 133)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1229] 表 133

[1230]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 59	β -第 41 位	Phe	Glu	ttc	gaa
No. 60	β -第 41 位	Phe	Thr	ttc	acc
No. 61	β -第 41 位	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 62	β -第 41 位	Phe	Leu	ttc	ctc
No. 63	β -第 41 位	Phe	Ile	ttc	atc
No. 64	β -第 41 位	Phe	Val	ttc	gtc

[1231] [实施例 101] 用于获得修饰酶的突变引入 (14)

[1232] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 46 位的 Met 转变为其它氨基酸。

[1233] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列号 123 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1234] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1235] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 46 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Met 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1236] 以下(表 134)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1237] 表 134

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 65	β -第 46 位	Met	Gly	atg	ggg
No. 66	β -第 46 位	Met	Tyr	atg	tat
No. 67	β -第 46 位	Met	Leu	atg	ctg
No. 68	β -第 46 位	Met	Lys	atg	aag
No. 69	β -第 46 位	Met	Asp	atg	gat

[1239] [实施例 102] 用于获得修饰酶的突变引入 (15)

[1240] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 48 位的 Leu 转变为其它氨基酸。

[1241] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 124 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1242] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1243] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 48 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Leu 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1244] 以下(表 135)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1245] 表 135

[1246]	编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
			引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
	No. 70	β -第 48 位	Leu	Gly	ctg	ggg
	No. 71	β -第 48 位	Leu	Ala	ctg	gcg
	No. 72	β -第 48 位	Leu	Val	ctg	gtg
	No. 73	β -第 48 位	Leu	Ser	ctg	tcg
	No. 74	β -第 48 位	Leu	Thr	ctg	acg
No. 75	β -第 48 位	Leu	Arg	ctg	cgg	

[1247] [实施例 103] 用于获得修饰酶的突变引入 (16)

[1248] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理, 所述突变为, 将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 51 位的 Phe 转变为其它氨基酸。

[1249] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应, PCR 反应 1 通过以下步骤完成: 在含有序列中序列号 125 记载的引物和 M13 引物 M4 (序列表的序列号 107 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 将下述反应重复 25 次循环, 所述反应为, 热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成: 在含有 MUT4 引物 (序列表的序列号 108 中记载有其序列) 和 M13 引物 RV (序列表的序列号 109 中记载有其序列) 各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统 (组成遵照试剂盒中记载的条件) 中, 进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1250] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒, 加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后, 利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化, 溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g / μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1251] 结果证明, 得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较, 编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 51 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列, 转变为编码除 Phe 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1252] 以下 (表 136) 示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1253] 表 136

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		突变导入前	突变导入后	突变导入前	突变导入后
No. 76	β -第 51 位	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 77	β -第 51 位	Phe	Val	ttc	gtc

[1255] [实施例 104] 用于获得修饰酶的突变引入 (17)

[1256] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 61 位的 Ala 转变为其它氨基酸。

[1257] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列号 126 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1258] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1259] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 61 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Ala 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1260] 以下(表 137)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1261] 表 137

[1262]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 77a	β -第 61 位	Ala	Val	gcc	gtc
No. 77b	β -第 61 位	Ala	Leu	gcc	ctc
No. 77c	β -第 61 位	Ala	Gly	gcc	ggc
No. 77d	β -第 61 位	Ala	Ser	gcc	tcg
No. 77e	β -第 61 位	Ala	Thr	gcc	acg
No. 77f	β -第 61 位	Ala	Trp	gcc	tgg

[1263] [实施例 105] 用于获得修饰酶的突变引入 (18)

[1264] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 72 位的 Trp 转变为其它氨基酸。

[1265] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 127 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1266] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1267] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 72 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Trp 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1268] 以下(表 138)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1269] [表 138]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 78	β -第 72 位	Trp	Phe	tgg	ttt

[1271] [实施例 106] 用于获得修饰酶的突变引入 (19)

[1272] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 112 位的 Lys 转变为其它氨基酸。

[1273] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列列表中序列号 128 记载的引物和 M13 引物 M4(序列列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1274] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1275] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,与编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 112 位氨基酸的密码子对应的碱基序列转变为与编码 Lys 以外氨基酸的密码子对应的碱基序列。

[1276] 以下(表 139)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1277] [表 139]

[1278]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 78a	β -第 112 位	Lys	Val	aag	gtg
No. 78b	β -第 112 位	Lys	Ile	aag	att

[1279] [实施例 107] 用于获得修饰酶的突变引入 (20)

[1280] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 118 位的 Phe 转变为其它氨基酸。

[1281] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列列表中序列号 129 记载的引物和 M13 引物 M4(序列列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计

50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1282] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g / μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1283] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较，编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 118 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列，转变为编码除 Phe 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1284] 以下（表 140）示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1285] [表 140]

[1286]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 79	β - 第 118 位	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 80	β - 第 118 位	Phe	Leu	ttc	ctc
No. 81	β - 第 118 位	Phe	Ile	ttc	atc
No. 82	β - 第 118 位	Phe	Val	ttc	gtc

[1287] [实施例 108] 用于获得修饰酶的突变引入 (21)

[1288] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理，所述突变为，将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 127 位的 Leu 转变为其它氨基酸。

[1289] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 130 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 107 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 108 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 109 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作而。

[1290] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g / μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1291] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较，编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 127 位氨基酸的密码子对应的碱

基序列,转变为编码除 Leu 以外氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1292] 以下(表 141)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1293] 表 141

[1294]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 83	β -第 127 位	Leu	Ala	ctg	gcg
No. 84	β -第 127 位	Leu	Val	ctg	gtg
No. 85	β -第 127 位	Leu	Ser	ctg	tcg

[1295] [实施例 109] 用于获得修饰酶的突变引入 (22)

[1296] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 146 位的 Arg 转变为其它氨基酸。

[1297] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 131 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1298] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1299] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 146 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Arg 以外氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1300] 以下(表 142)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1301] 表 142

[1302]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 86	β -第 146 位	Arg	Gly	cgg	ggg

[1303] [实施例 110] 用于获得修饰酶的突变引入 (23)

[1304] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 150 位的 Ala 转变为其它氨基酸。

[1305] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 132 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1306] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1307] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 150 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Ala 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1308] 以下(表 143)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1309] 表 143

[1310]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 86a	β -第 150 位	Ala	Ser	gcg	tcg
No. 86b	β -第 150 位	Ala	Asn	gcg	aat

[1311] [实施例 111] 用于获得修饰酶的突变引入 (24)

[1312] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 160 位的 Arg 转变为其它氨基酸。

[1313] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 133 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1314] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1315] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 160 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Arg 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1316] 以下(表 144)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1317] 表 144

[1318]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 87	β -第 160 位	Arg	Leu	cgg	ctg
No. 88	β -第 160 位	Arg	Trp	cgg	tgg
No. 88a	β -第 160 位	Arg	Met	cgg	atg
No. 88b	β -第 160 位	Arg	Cys	cgg	tgt

[1319] [实施例 112] 用于获得修饰酶的突变引入 (25)

[1320] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 168 位的 Thr 转变为其它氨基酸。

[1321] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 134 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98℃)15 秒、退火 (55℃)30 秒、链延长反应 (72℃)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1322] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1323] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较，编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 168 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列，转变为编码除 Thr 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1324] 以下（表 145）示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1325] 表 145

[1326]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 88c	β -第 168 位	Thr	Glu	acg	gag

[1327] [实施例 113] 用于获得修饰酶的突变引入 (26)

[1328] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述突变的导入处理，所述突变为，将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 171 位的 Lys 转变为其它氨基酸。

[1329] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 135 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 107 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 108 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 109 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1330] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1331] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较，编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 171 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列，转变为编码除 Lys 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1332] 以下（表 146）示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1333] 表 146

[1334]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 88d	β -第 171 位	Lys	Ala	aag	gcg

[1335] [实施例 114] 用于获得修饰酶的突变引入 (27)

[1336] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 176 位的 Tyr 转变为其它氨基酸。

[1337] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列表中序列号 136 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1338] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1339] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 176 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Tyr 以外氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1340] 以下(表 147)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1341] 表 147

[1342]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 88e	β -第 176 位	Tyr	Ala	tac	gcc
No. 88f	β -第 176 位	Tyr	Met	tac	atg
No. 88g	β -第 176 位	Tyr	Cys	tac	tgc
No. 88h	β -第 176 位	Tyr	Thr	tac	acc

[1343] [实施例 115] 用于获得修饰酶的突变引入 (28)

[1344] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87

中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 186 位的 Leu 转变为其它氨基酸。

[1345] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完成:在含有序列中序列号 137 记载的引物和 M13 引物 M4(序列表的序列号 107 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,将下述反应重复 25 次循环,所述反应为,热变性 (98 $^{\circ}$ C)15 秒、退火 (55 $^{\circ}$ C)30 秒、链延长反应 (72 $^{\circ}$ C)2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成:在含有 MUT4 引物(序列表的序列号 108 中记载有其序列)和 M13 引物 RV(序列表的序列号 109 中记载有其序列)各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统(组成遵照试剂盒中记载的条件)中,进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1346] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒,加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时后,利用苯酚萃取/氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化,溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g/ μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1347] 结果证明,得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较,编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 186 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列,转变为编码除 Leu 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1348] 以下(表 148)示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1349] 表 148

[1350]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 89	β -第 186 位	Leu	Glu	ctg	gag
No. 90	β -第 186 位	Leu	Asp	ctg	gat
No. 91	β -第 186 位	Leu	Lys	ctg	aag
No. 92	β -第 186 位	Leu	Arg	ctg	cgg
No. 93	β -第 186 位	Leu	Asn	ctg	aac
No. 94	β -第 186 位	Leu	Ser	ctg	tcg
No. 95	β -第 186 位	Leu	Gly	ctg	ggg

[1351] [实施例 116] 用于获得修饰酶的突变引入 (29)

[1352] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理,所述突变为,将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 217 位的 Asp 转变为其它氨基酸。

[1353] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应,PCR 反应 1 通过以下步骤完

成：在含有序列表中序列号 138 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 107 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应（72℃）2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 108 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 109 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1354] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μ g 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μ g / μ l。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1355] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较，编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 217 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列，转变为编码除 Asp 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1356] 以述（表 149）示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1357] 表 149

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 96	β -第 217 位	Asp	Gly	gac	ggc
No. 96a	β -第 217 位	Asp	Val	gac	gtc
No. 96b	β -第 217 位	Asp	Leu	gac	ctc
No. 96c	β -第 217 位	Asp	Met	gac	atg
No. 96d	β -第 217 位	Asp	Cys	gac	tgt
No. 96e	β -第 217 位	Asp	Ser	gac	agc
No. 96f	β -第 217 位	Asp	Thr	gac	acc
No. 96g	β -第 217 位	Asp	His	gac	cac

[1359] [实施例 117] 用于获得修饰酶的突变引入 (30)

[1360] 在实施例 83 中以 MT10822 制备的含有编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脞水合酶的 ORF 的质粒 pPT-DB1 中实施下述引入突变的处理，所述突变为，将实施例 86 或 87 中提取的作为引入突变的目标的 β 亚单位的氨基酸序列中第 218 位的 Cys 转变为其它氨基酸。

[1361] 以 10ng 的 pPT-DB1 为模板进行两种类型的 PCR 反应，PCR 反应 1 通过以下步骤完成：在含有序列表中序列号 139 记载的引物和 M13 引物 M4（序列表的序列号 107 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μ l 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，将下述反应重复 25 次循环，所述反应为，热变性（98℃）15 秒、退火（55℃）30 秒、链延长反应

(72℃) 2 分钟。PCR 反应 2 通过以下步骤完成：在含有 MUT4 引物（序列表的序列号 108 中记载有其序列）和 M13 引物 RV（序列表的序列号 109 中记载有其序列）各 50pmol 的总计 50 μl 的反应系统（组成遵照试剂盒中记载的条件）中，进行与 PCR 反应 1 同样的操作。

[1362] 然后进行与实施例 89 相同的操作而得到多个转化子。从所述转化子制备各质粒，加入 30 μg 的 RNaseA 并在 37℃ 下保温 1 小时后，利用苯酚萃取 / 氯仿萃取及乙醇沉淀将该 DNA 纯化，溶解于 TE 溶液中使最终浓度为 1.0 μg/μl。接着利用使用 ABI 社制的测序试剂盒和核酸自动测序仪 373A 的双脱氧链终止法测定了碱基序列。

[1363] 结果证明，得到的转化子含有的质粒与 pPT-DB1 相比较，编码来源于嗜热假诺卡氏菌 JCM3095 的脲水合酶的 β 亚单位的氨基酸序列中第 218 位氨基酸的密码子所对应的碱基序列，转变为编码除 Cys 以外的氨基酸的密码子所对应的碱基序列。

[1364] 以下（表 150）示出得到的转化子的编号与相应的突变位点、氨基酸序列的变化、碱基序列的变化。

[1365] 表 150

[1366]

编号	突变位点	氨基酸序列的变化		碱基序列的变化	
		引入突变前	引入突变后	引入突变前	引入突变后
No. 96h	β-第 218 位	Cys	Met	tgc	atg
No. 96i	β-第 218 位	Cys	Ser	tgc	tcc

[1367] [实施例 118] 修饰前的脲水合酶和修饰后的修饰酶的特性比较 (1)

[1368] 在装有挡板的 500ml 三角烧瓶中配制含有 40 μg/ml 硫酸铁·七水合物和 10 μg/ml 氯化钴·六水合物的 100ml LB 液体培养基，共配制 5 份，并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向各培养基中加入氨苄青霉素使其最终浓度为 100 μg/ml。

[1369] 使用铂金接菌环，分别在 5 份培养基中接种实施例 84 得到的转化子 No. 200、实施例 88 中得到的转化子 No. 201 ~ 204 共计 5 种转化子中的一种，在 37℃、130rpm 下培养约 20 小时后，通过离心分离（5000G×15 分钟）从各最终培养液中分离出各转化子，接着将上述分离后的转化子分别重悬在 50ml 的生理盐水中后，再次离心分离（5000G×15 分钟）出各转化子。

[1370] 将 0.1g 各转化子分别混悬在 20ml、50mM 的磷酸钾水溶液（pH7.0）中之后，分成 10ml×2 份。从而准备了每种转化子各 2 份、共计 10 份悬浊液。在各转化子的其中 1 份悬浊液中加入 1ml 丙烯腈、在另一份中加入甲基丙烯腈，在 30℃ 下边缓慢搅拌边使其反应 10 分钟。

[1371] 反应结束后，用 HPLC 分析各最终反应液，结果表明各液中存在有未反应完的作为底物的脲化合物（丙烯腈或甲基丙烯腈）和反应生成的作为产物的对应的酰胺化合物（丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺）。需要说明的是，确认了并不存在对应的有机酸（丙烯酸或甲基丙烯酸）。

[1372] 对于每种转化子，比较以丙烯腈为底物反应生成的丙烯酰胺和以甲基丙烯腈为底物反应生成的甲基丙烯酰胺的摩尔比，结果观察出以下（表 151）所示的差异。丙烯腈与甲

基丙烯腈相比,甲基丙烯腈为空间体积较大的腈化合物,因此上述结果说明得到的修饰酶更易于水合空间体积较大的底物。

[1373] 表 151

编号	β -第 48 位氨基酸 (碱基序列)	水合活性比 (相对比)
		[以甲基丙烯腈为底物] $\div$ [以丙烯腈为底物]
No. 200	Trp (tgg)	0.41 (100%)
No. 201	Tyr (tat)	0.87 (211%)
No. 202	Val (gtg)	0.79 (192%)
No. 203	Ala (gcg)	0.67 (163%)
No. 204	Gly (ggg)	0.82 (198%)

[1375] [实施例 119] 修饰前的腈水合酶和修饰后的修饰酶的特性比较 (2)

[1376] 在装有挡板的 500ml 三角烧瓶中配制含有 40 μ g/ml 硫酸铁·七水合物和 10 μ g/ml 氯化钴·六水合物的 100ml LB 液体培养基,共配制 57 份,并使用高压灭菌锅进行 121℃、20 分钟的高压灭菌处理。向各培养基中加入氨苄青霉素使其最终浓度为 100 μ g/ml。

[1377] 使用铂金接菌环,分别在各培养基中按顺序接种一种下述转化子,即,以 pPT-DB1 转化 HB101 而得到的 No. 0 和实施例 89 ~ 117 中得到的转化子中的共计下述 56 种转化子: No. 40、No. 40e、No. 40f、No. 42、No. 42a、No. 43、No. 44、No. 45、No. 46、No. 47、No. 48、No. 49、No. 50、No. 51、No. 52、No. 54、No. 55、No. 56、No. 57、No. 58、No. 59、No. 60、No. 61、No. 62、No. 63、No. 64、No. 65、No. 66、No. 67、No. 68、No. 69、No. 70、No. 71、No. 72、No. 73、No. 74、No. 75、No. 76、No. 77、No. 78、No. 79、No. 80、No. 81、No. 82、No. 83、No. 84、No. 85、No. 87、No. 88、No. 89、No. 90、No. 91、No. 92、No. 93、No. 94、No. 95。在 37℃、130rpm 下培养约 20 小时后,通过离心分离 (5000G $\times$ 15 分钟) 从各最终培养液中分离出各转化子,接着将上述分离的转化子分别重悬在 50ml 的生理盐水中后,再次离心分离 (5000G $\times$ 15 分钟) 出各转化子。

[1378] 将 0.1g 各转化子分别混悬在 20ml、50mM 的磷酸钾水溶液 (pH7.0) 中之后,分成 10ml $\times$ 2 份。由此准备了每种转化子各 2 份、共计 114 份悬浊液。在各转化子悬浊液的其中 1 份中加入 1ml 丙烯腈、在另一份中加入甲基丙烯腈,在 20℃ 下边缓慢搅拌边使其反应 10 分钟。

[1379] 反应结束后,用 HPLC 分析各最终反应液,结果表明各液中存在有未反应完的作为底物的腈化合物 (丙烯腈或甲基丙烯腈) 和反应生成的作为产物的对应酰胺化合物 (丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺)。需要说明的是,确认了并不存在对应的有机酸 (丙烯酸或甲基丙烯酸)。

[1380] 对于每种转化子,比较以丙烯腈为底物反应生成的丙烯酰胺和以甲基丙烯腈为底物反应生成的甲基丙烯酰胺的摩尔比,结果观察出以下 (表 152) (表 153) (表 154) 所示的多样性。丙烯腈与甲基丙烯腈的空间体积相比,甲基丙烯腈为空间体积较大的腈化合物,上述结果示出,与修饰前的腈水合酶相比较,获得了底物特异性改变了的修饰酶。

[1381] 表 152

[1382]

编号	水合活性比 (相对比)	水合活性比 (相对比)
	[甲基丙烯腈为底物] ÷[丙烯腈为底物]	[丙烯腈为底物] ÷ [甲基丙烯腈为底物]
No. 0	0.189 (100%)	5.29 (100%)
No. 40	0.219 (116%)	4.55 (86%)
No. 40e	0.211 (112%)	4.71 (89%)
No. 40f	0.206 (109%)	4.87 (92%)
No. 42	0.200 (106%)	4.97 (94%)
No. 42a	0.202 (107%)	4.92 (93%)
No. 43	0.185 (98%)	5.40 (102%)
No. 44	0.185 (98%)	5.40 (102%)
No. 45	0.187 (99%)	5.34 (101%)
No. 46	0.185 (98%)	5.40 (102%)
No. 47	0.181 (96%)	5.50 (104%)
No. 48	0.187 (99%)	5.34 (101%)
No. 49	0.208 (110%)	4.81 (91%)
No. 50	0.198 (105%)	5.03 (95%)
No. 51	0.187 (99%)	5.34 (101%)
No. 52	0.202 (107%)	4.92 (93%)
No. 54	0.153 (81%)	6.51 (123%)
No. 55	0.159 (84%)	6.30 (119%)
No. 56	0.204 (108%)	4.92 (93%)
No. 57	0.168 (89%)	5.92 (112%)

[1383] 表 153

[1384]

编号	水合活性比 (相对比)	水合活性比 (相对比)
	[甲基丙烯腈为底物] ÷[丙烯腈为底物]	[丙烯腈为底物] ÷ [甲基丙烯腈为底物]
No. 58	0.159 (84%)	6.30 (119%)
No. 59	0.183 (97%)	5.45 (103%)
No. 60	0.160 (85%)	6.24 (118%)
No. 61	0.195 (103%)	5.13 (97%)
No. 62	0.210 (111%)	4.76 (90%)
No. 63	0.198 (105%)	5.03 (95%)
No. 64	0.155 (82%)	6.45 (122%)
No. 65	0.206 (109%)	4.87 (92%)
No. 66	0.180 (95%)	5.55 (105%)
No. 67	0.172 (91%)	5.82 (110%)
No. 68	0.399 (211%)	2.49 (47%)
No. 69	0.259 (137%)	3.86 (73%)
No. 70	0.212 (112%)	4.71 (89%)
No. 71	0.223 (118%)	4.50 (85%)
No. 72	0.206 (109%)	4.87 (92%)
No. 73	0.229 (121%)	4.39 (83%)
No. 74	0.233 (123%)	4.28 (81%)
No. 75	0.204 (108%)	4.92 (93%)
No. 76	0.191 (101%)	5.24 (99%)
No. 77	0.271 (142%)	3.70 (70%)

[1385] 表 154

[1386]

编号	水合活性比 (相对比)	水合活性比 (相对比)
	[甲基丙烯腈为底物] ÷[丙烯腈为底物]	[丙烯腈为底物] ÷ [甲基丙烯腈为底物]
No. 78	0.268 (137%)	3.86 (73%)
No. 79	0.170 (90%)	5.87 (111%)
No. 80	0.183 (97%)	5.45 (103%)
No. 81	0.180 (95%)	5.56 (105%)
No. 82	0.164 (87%)	6.08 (115%)
No. 83	0.174 (92%)	5.77 (109%)
No. 84	0.208 (110%)	4.81 (91%)
No. 85	0.164 (87%)	6.08 (115%)
No. 87	0.176 (93%)	5.71 (108%)
No. 88	0.166 (88%)	6.03 (114%)
No. 89	0.191 (101%)	5.24 (99%)
No. 90	0.197 (104%)	5.08 (96%)
No. 91	0.187 (99%)	5.34 (101%)
No. 92	0.185 (98%)	5.40 (102%)
No. 93	0.187 (99%)	5.34 (101%)
No. 94	0.193 (102%)	5.18 (98%)
No. 95	0.187 (99%)	5.34 (101%)

[1387] 产业实用性

[1388] 本发明可有效用于使用生物催化剂的物质生产领域中。例如,以称为腈水合酶的酶或表达该酶活性的生物体作为催化剂,使腈化合物经水合而转变为对应的酰胺化合物的物质生产过程。

[0001]

序列表

<110> 三井化学株式会社

<120> 新型腈水合酶

<130> F000286

<160> 139

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>

<221> 来源

<222> 1..205

<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..205

<223> /基因="腈水合酶 α 亚单位"
/产物="腈水合酶 α 亚单位"

<400> 1

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

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>

<221> 来源

<222> 1..233

<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"

[0002]

/菌株="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..233

<223> /基因="脲水合酶β亚单位"

/产物="脲水合酶β亚单位"

<400> 2

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile
5 10 15Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val
20 25 30Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu
35 40 45Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu
50 55 60Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly
65 70 75 80Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln
85 90 95Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys
100 105 110Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro
115 120 125Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val
130 135 140Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg
145 150 155 160Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr
165 170 175Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His
180 185 190Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly
195 200 205Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu
210 215 220Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala
225 230 233

<210> 3

<211> 618

<212> DNA

<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>

<221> 来源

<222> 1..618

<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"

/菌株="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..618

<223> /基因="脲水合酶α亚单位"

/产物="脲水合酶α亚单位"

<400> 3

atgaccgaga acatcctgcg caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcg 60

gtcaaggccc tggagtcgat gctcatcgaa cagggcaccc tcaccacgtc gatgatcgac 120

[0003]

cggaatggccg agatctacga gaacgaggtc ggcccgcacc tcggcgcgaa ggctcgtcgtg 180
aaggcctgga ccgaccgga gttcaagaag cgtctgctcg ccgacggcac cgaggcctgc 240
aaggagctcg gcacggcgg cctgcagggc gaggacatga tgtgggtgga gaacaccgac 300
gaggtccacc acgtcgtcgt gtgcacgtc tgcctcgtct acccgtggcc ggtgctgggg 360
ctgcgcgccga actggttcaa ggagccgcag taccgctccc gcgtgggtcg tgagccccgg 420
cagctgtca aggaggagtt cggcttcgag gtcccgcga gcaaggagat caaggtcttg 480
gactccagct ccgagatgcg ctctcgtcgc ctcccgcag ccccgcggg caccgacggg 540
tgagcgcagg aggagctcgc caccctcgtc acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600
gcgaaggcgg tcgcgtga 618

<210> 4
<211> 702
<212> DNA
<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..702
<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>
<221> CDS
<222> 1..702
<223> /基因="脲水合酶β亚单位"
/产物="脲水合酶β亚单位"

<400> 4
atgaacggcg tgtacgacgt cggcggcacc gatgggctgg gcccgatcaa ccgccccgcg 60
gacgaaccgg tcttcgcgc cgagtgggag aaggtcgcgt tcgcgatgtt cccggcgacg 120
ttccgggccc gcttcattgg cctggacgag ttccggttcg gcacgagca gatgaaccg 180
gccgagtacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240
gtccgcaccg gcaagatcga tctcaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccgggag 300
aaccgccgac ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttgatcga gttcgtcaac 360
caggcgtct acggcgggct gccgcgaagc cgggaggtcg accgaccgcc caagttcaag 420
gagggcgacg tgggtcgggt ctccaccgc agcccgaagg gccacgccg gcgcgcgcgg 480
tacgtgcgcg gcaagaccgg gacggtggtc aagcaccacg gcgcgtacat ctaccggac 540
accgccgca acggcctgg cgagtgcgcc gagcactct acaccgtccg cttcacggcc 600
caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg ttactacga ctgctgggag 660
ccctacatcg agctcgtcga cacgaaggcg gcccgggcat ga 702

<210> 5
<211> 144
<212> PRT
<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..144
<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>
<221> CDS

[0004]

<222> 1..144
<223> /基因="编码参与脲水合酶激活的蛋白质的基因"
/产物="参与脲水合酶激活的蛋白质"

<220>
<221> 已知序列以起始密码子甲硫氨酸开始 (INT#MET)
<222> 1

<400> 5
Met Ser Ala Glu Ala Lys Val Arg Leu Lys His Cys Pro Thr Ala Glu
1 5 10 15
Asp Arg Ala Ala Ala Asp Ala Leu Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gly Asp
20 25 30
Arg Ala Leu Asp Arg Gly Phe Asp Glu Pro Trp Gln Leu Arg Ala Phe
35 40 45
Ala Leu Ala Val Ala Ala Cys Arg Ala Gly Arg Phe Glu Trp Lys Gln
50 55 60
Leu Gln Gln Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Glu Trp Glu Arg Thr His
65 70 75 80
Asp Leu Asp Asp Pro Ser Trp Ser Tyr Tyr Glu His Phe Val Ala Ala
85 90 95
Leu Glu Ser Val Leu Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu Pro Glu Ala Leu
100 105 110
Asp Glu Arg Thr Ala Glu Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Lys Asp His
115 120 125
His Gly Pro His Leu Glu Pro Val Ala Val His Pro Ala Val Arg Ser
130 135 140

<210> 6
<211> 435
<212> DNA
<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..435
<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>
<221> CDS
<222> 1..435
<223> /基因="编码参与脲水合酶激活的蛋白质的基因"
/产物="参与脲水合酶激活的蛋白质"

<220>
<221> 已知序列以密码子开始 (int#codon)
<222> 1..3

<400> 6
gtgagcgccg aggcgaaggt ccgctgaag cactgcccc aaggccgagga ccggcgcgcg 60
gccgacgcgc tgctcgcgca gctgcccggc ggcgaccgcg cgctcgaccg cggtctcgac 120
gagccgtggc agctgcgggc gttcgcgctg gcggctgcgg cgtgcagggc gggccgggtc 180
gagtgaagc agctgcagca ggcgctgac tcctcgatcg gggagtggga gcgcacccac 240
gatctcgacg atccgagctg gtcctactac gagcattcg tcgcccgcgt ggaatccgtg 300
ctcggcgagg aaggatcgt cgagccggag gcgctggacg agcgcaccgc ggaggtcttg 360
gcccaaccgc cgaacaagga tcacatgga ccgcatctgg agcccgtcgc ggtccaccgc 420
gccgtgcggt cctga 435

[0005]

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物

<400> 7
aacatcatgc gcaagtcg 18

<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物

<400> 8
gttttcccag tcacgac 17

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物

<400> 9
ggccaglgcc tagcttacat 20

<210> 10
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物

<400> 10
caggaaacag ctatgac 17

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物

<400> 11
aacatcacgc gcaagtcg 18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物

<400> 12
aacatcgcgc gcaagtcg 18

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

[0006]

<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 13	
aacatcgtgc gcaagtcg	18
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 14	
atcacggtgc gggtaag	18
<210> 15	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 15	
acgtcgttga tcgaccgg	18
<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 16	
gacggctccg aggcctgc	18
<210> 17	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 17	
ctgcaggccg aggacatg	18
<210> 18	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 18	
gacgaggccc accacgtc	18
<210> 19	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	

[0007]

<400> 19 cacgtcatcg tgtgcacg	18
<210> 20 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 20 aactggtaca aggagccg	18
<210> 21 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 21 gagccggagt accgctcc	18
<210> 22 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 22 cggcaggtgc tcaaggag	18
<210> 23 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 23 aaggaggact tcggcttc	18
<210> 24 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 24 gagtcacca cctcgtc	18
<210> 25 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 25 cgcgagttga tgatcggc	18

[0008]

<210> 26	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 26	
gcgaaggagg tcgctga	18
<210> 27	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 27	
cggcccgtag acgaaccg	18
<210> 28	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 28	
cccgcaacg aaccgtc	18
<210> 29	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 29	
ctgcccgatc acgagcag	18
<210> 30	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 30	
ctgccccgc acgagcag	18
<210> 31	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 31	
ctgccctgc acgagcag	18
<210> 32	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0009]

<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	32	
	ctgccccggc acgagcag	18
<210>	33	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	33	
	ctgccctgcc acgagcag	18
<210>	34	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	34	
	ctgcccctgc acgagcag	18
<210>	35	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	35	
	ctgcccacgc acgagcag	18
<210>	36	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	36	
	ttcacggacc aggagctg	18
<210>	37	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	37	
	ttcacgatcc aggagctg	18
<210>	38	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	

[0010]

<400> 38 ttcacggtcc aggagctg	18
<210> 39 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 39 ttcacggagc aggagctg	18
<210> 40 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 40 ccgaactaca gcgtctac	18
<210> 41 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 41 ctcaccatgt cgatgatc	18
<210> 42 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 42 aagaagcatc tgctcgcc	18
<210> 43 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 43 gagttcgact tcgaggtc	18
<210> 44 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 44 aaggcgcgcg cgtgagcg	18

[0011]

<210> 45	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 45	
aaggcgaaag cgtgagcg	18
<210> 46	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 46	
aaggcgtaggg cgtgagcg	18
<210> 47	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 47	
aaggcgaccg cgtgagcg	18
<210> 48	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 48	
ggcggcgacg atgggctg	18
<210> 49	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 49	
ggcggcgaag atgggctg	18
<210> 50	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 50	
ggcggctggg atgggctg	18
<210> 51	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0012]

<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 51	
ggcggcggcg atgggctg	18
<210> 52	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 52	
ggcggctacg atgggctg	18
<210> 53	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 53	
ggcggctgcg atgggctg	18
<210> 54	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 54	
gagaagggcg cgttcgcg	18
<210> 55	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 55	
gcgatgacct cggcgacg	18
<210> 56	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 56	
gcgatggccc cggcgacg	18
<210> 57	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	

[0013]

<400> 57 gcgatgctcc cggcgacg	18
<210> 58 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 58 gcgatgatcc cggcgacg	18
<210> 59 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 59 gcgatggtcc cggcgacg	18
<210> 60 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 60 gcgacggaac gggccggc	18
<210> 61 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 61 gcgacgaccc gggccggc	18
<210> 62 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 62 gcgacggccc gggccggc	18
<210> 63 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 63 gcgacgctcc gggccggc	18

[0014]

<210> 64	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 64	
gcgacgatcc gggccggc	18
<210> 65	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 65	
gcgacggtcc gggccggc	18
<210> 66	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 66	
ggcttcgggg gcctggac	18
<210> 67	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 67	
ggcttctatg gcctggac	18
<210> 68	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 68	
ggcttcctgg gcctggac	18
<210> 69	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 69	
ggcttcaagg gcctggac	18
<210> 70	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0015]

<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	70	
	ggcttcgatg gcctggac	18
<210>	71	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	71	
	atgggcgggg acgagttc	18
<210>	72	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	72	
	atgggcgcgg acgagttc	18
<210>	73	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	73	
	atgggcgtgg acgagttc	18
<210>	74	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	74	
	atgggctcgg acgagttc	18
<210>	75	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	75	
	atgggcacgg acgagttc	18
<210>	76	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	

[0016]

<400> 76 atgggccggg acgagttc	18
<210> 77 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 77 gacgaggccc ggttcggc	18
<210> 78 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 78 gacgagtccc ggttcggc	18
<210> 79 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 79 tggcacttta tccgcacc	18
<210> 80 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 80 atcgaggccg tcaaccag	18
<210> 81 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 81 atcgagctcg tcaaccag	18
<210> 82 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 82 atcgagctcg tcaaccag	18

[0017]

<210> 83	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 83	
atcgaggtcg tcaaccag	18
<210> 84	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 84	
ggcggggcgc ccgcaagc	18
<210> 85	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 85	
ggcgggggtgc ccgcaagc	18
<210> 86	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 86	
ggcgggtcgc ccgcaagc	18
<210> 87	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 87	
gtggtggggt tctccacc	18
<210> 88	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 88	
cgcgcgtgt acgtgcgc	18
<210> 89	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0018]

<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	89	
	cgcgctggt acgtgcgc	18
<210>	90	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	90	
	aacggcgagg gcgagtgc	18
<210>	91	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	91	
	aacggcgatg gcgagtgc	18
<210>	92	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	92	
	aacggcaagg gcgagtgc	18
<210>	93	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	93	
	aacggccggg gcgagtgc	18
<210>	94	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	
<400>	94	
	aacggcaacg gcgagtgc	18
<210>	95	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚核苷酸作为PCR引物	

[0019]

<400> 95 aacggctcgg gcgagtgc	18
<210> 96 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 96 aacggcgggg gcgagtgc	18
<210> 97 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 97 tactacggct gctgggag	18
<210> 98 <211> 205 <212> PRT <213> 嗜热假诺卡氏菌	
<220> <221> 来源 <222> 1..205 <223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌" /菌株="JCM3095"	
<220> <221> CDS <222> 1..205 <223> /基因="脞水合酶 α 亚单位" /产物="脞水合酶 α 亚单位"	
<400> 98 Met Thr Glu Asn Ile Leu Arg Lys Ser Asp Glu Glu Ile Gln Lys Glu 5 10 15 Ile Thr Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Leu Ile Glu Gln Gly 20 25 30 Ile Leu Thr Thr Ser Met Ile Asp Arg Met Ala Glu Ile Tyr Glu Asn 35 40 45 Glu Val Gly Pro His Leu Gly Ala Lys Val Val Val Lys Ala Trp Thr 50 55 60 Asp Pro Glu Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Cys 65 70 75 80 Lys Glu Leu Gly Ile Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Met Trp Val 85 90 95 Glu Asn Thr Asp Glu Val His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser 100 105 110 Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Phe Lys Glu 115 120 125 Pro Gln Tyr Arg Ser Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Gln Leu Leu Lys 130 135 140 Glu Glu Phe Gly Phe Glu Val Pro Pro Ser Lys Glu Ile Lys Val Trp 145 150 155 160	

[0020]

Asp Ser Ser Ser Glu Met Arg Phe Val Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala
 165 170 175
 Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Leu Ala Thr Leu Val Thr Arg
 180 185 190
 Glu Ser Met Ile Gly Val Glu Pro Ala Lys Ala Val Ala
 195 200 205

<210> 99
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
 <221> 来源
 <222> 1., 223
 <223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
 /菌株="JCM3095"
 <220>
 <221> CDS
 <222> 1., 223
 <223> /基因="腓水合酶 β 亚单位"
 /产物="腓水合酶 β 亚单位"

<400> 99

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile
 5 10 15
 Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val
 20 25 30
 Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu
 35 40 45
 Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu
 50 55 60
 Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly
 65 70 75 80
 Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys
 100 105 110
 Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro
 115 120 125
 Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val
 130 135 140
 Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg
 145 150 155 160
 Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr
 165 170 175
 Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His
 180 185 190
 Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly
 195 200 205
 Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu
 210 215 220
 Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala
 225 230 233

<210> 100
 <211> 618

[0021]

<212> DNA
<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..618
<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>
<221> CDS
<222> 1..618
<223> /基因="脲水合酶 α 亚单位"
/产物="脲水合酶 α 亚单位"

<400> 100
atgaccgaga acatcctgcg caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcg 60
gtcaaggccc tggagtcgat gtcacgaa cagggeatcc tcaccacgtc gatgatcgac 120
cggatggcgg agatctacga gaacgaggtc ggcccgcacc tcggcgcgaa ggtcgtcgtg 180
aaggcctgga ccgaccgga gttcaagaag cgtctgctcg ccgacggcac cgaggcctgc 240
aaggagctcg gcatcgcgcg cctgcagggc gaggacatga tgtgggtgga gaacaccgac 300
gaggtccacc acgtcgtcgt gtgcacgtc tgcctcgtct acccgtggcc ggtcgtgggg 360
ctgccgccga actggttcaa ggagccgag taccgctccc gcgtggtgcg tgagccccgg 420
cagctgctca aggaggagtt cggttcgag gtcccgccga gcaaggagat caaggtctgg 480
gactccagct ccgagatgcg ctctcgtc ctcgccgagc gcccgcggg caccgacggg 540
tggagcgagg aggagctcgc caccctcgtc acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600
gcgaaggcgg tcgctga 618

<210> 101
<211> 702
<212> DNA
<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..702
<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>
<221> CDS
<222> 1..702
<223> /基因="脲水合酶 β 亚单位"
/产物="脲水合酶 β 亚单位"

<400> 101
atgaacggcg tgtacgacgt cggcgccacc gatgggctgg gcccgatcaa ccggcccgcg 60
gacgaaccgg tcttcgcgc cgagtgggag aaggtcgcgt tcgcgatgtt cccggcgacg 120
ttccgggccc gcttcattggg cctggacgag ttccggttcg gcatcgagca gatgaacccg 180
gccgagtacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240
gtccgcaccg gcaagatcga tctcgaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccgggag 300
aaccgccgac ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttagatga gttegtcaac 360
caggccgtct acggcgggct gcccgcaagc cgggaggtcg accgaccgcc caagttcaag 420
gagggcgacg tgggtcggtt ctccaccgag agcccgaagg gccacgccc gcgcgcggcg 480
tacgtgcgag gcaagaccgg gacggtggtc aagcaccacg gcgcgtacat ctaccgggac 540
accgccggca accgcctggg cgagtgcgcc gagcacctct acaccgtccg cttcacggcc 600

[0022]

caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg tctactacga ctgctgggag 660

ccctacatcg agctcgtcga cacgaaggcg gccgcggcat ga 702

<210> 102
<211> 144
<212> PRT
<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..144
<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>
<221> CDS
<222> 1..144
<223> /基因="编码参与脲水合酶激活的蛋白质的基因"
/产物="参与脲水合酶激活的蛋白质"

<220>
<221> 已知序列以起始密码子甲硫氨酸开始 (INT#MET)
<222> 1

<400> 102

Met Ser Ala Glu Ala Lys Val Arg Leu Lys His Cys Pro Thr Ala Glu
1 5 10 15

Asp Arg Ala Ala Asp Ala Leu Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gly Asp
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Arg Gly Phe Asp Glu Pro Trp Gln Leu Arg Ala Phe
35 40 45

Ala Leu Ala Val Ala Ala Cys Arg Ala Gly Arg Phe Glu Trp Lys Gln
50 55 60

Leu Gln Gln Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Glu Trp Glu Arg Thr His
65 70 75 80

Asp Leu Asp Asp Pro Ser Trp Ser Tyr Tyr Glu His Phe Val Ala Ala
85 90 95

Leu Glu Ser Val Leu Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu Pro Glu Ala Leu
100 105 110

Asp Glu Arg Thr Ala Glu Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Lys Asp His
115 120 125

His Gly Pro His Leu Glu Pro Val Ala Val His Pro Ala Val Arg Ser
130 135 140

<210> 103
<211> 435
<212> DNA
<213> 嗜热假诺卡氏菌

<220>
<221> 来源
<222> 1..435
<223> /微生物="嗜热假诺卡氏菌"
/菌株="JCM3095"

<220>
<221> CDS
<222> 1..435
<223> /基因="编码参与脲水合酶激活的蛋白质的基因"
/产物="参与脲水合酶激活的蛋白质"

<220>
<221> 已知序列以密码子开始 (init_codon)

[0023]

<222> 1..3
 <220>
 <221> g or a
 <222> 1..1

 <400> 103
 rtgagcgccg aggcgaaggt ccgectgaag cactgcccc a cggccgagga ccgggcggcg 60
 gccgacgcgc tgctcgcgca gctgcccggc ggcgaccgcg cgctcgaccg cggcttcgac 120
 gagccgtggc agctgcgggc gttcgcgctg gcggtcgcgg cgtgcagggc gggccgggtc 180
 gagtggaaag agctgcagca ggcgctgac tcctcgatcg gggagtggga gcgcacccac 240
 gatctcgacg atccgagctg gtcctactac gagcacttcg tcgccgcgct ggaatccgtg 300
 ctccggcagg aagggatcgt cgagccggag gcgctggacg agcgcaccgc ggaggtcttg 360
 gccaacccgc cgaacaagga tcacatgga ccgcactcgg agcccgctcg ggtccacccg 420
 gccgtgcggt cctga 435

 <210> 104
 <211> 1315
 <212> DNA
 <213> 紫红红球菌

 <220>
 <221> 来源
 <222> 1.. 1315
 <223> /微生物="紫红红球菌"
 /菌株="J1(FERM BP-1478)"

 <220>
 <221> CDS
 <222> 1.. 690
 <223> /基因="脲水合酶β亚单位"
 /产物="脲水合酶β亚单位"

 <220>
 <221> CDS
 <222> 704.. 1315
 <223> /基因="脲水合酶α亚单位"
 /产物="脲水合酶α亚单位"

 <400> 104
 atg gat ggt atc cac gac aca ggc ggc atg acc gga tac gga ccg gtc 48
 Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val
 1 5 10 15
 ccc tat cag aag gac gag ccc ttc ttc cac tac gag tgg gag ggt cgg 96
 Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg
 20 25 30
 acc ctg tca att ctg act tgg atg cat ctc aag ggc ata tcg tgg tgg 144
 Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Ile Ser Trp Trp
 35 40 45
 gac aag tcg cgg ttc ttc cgg gag tcg atg ggg aac gaa aac tac gtc 192
 Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val
 50 55 60
 aac gag att cgc aac tcg tac tac acc cac tgg ctg agt gcg gca gaa 240
 Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 cgt atc ctc gtc gcc gac aag atc atc acc gaa gaa gag cga aag cac 288
 Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His
 85 90 95
 cgt gtg caa gag atc ctt gag ggt cgg tac acg gac agg aag ccg tcg 336
 Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Lys Pro Ser
 100 105 110
 cgg aag ttc gat ccg gcc cag atc gag aag gcg atc gaa cgg ctt cac 384

[0024]

Arg	Lys	Phe	Asp	Pro	Ala	Gln	Ile	Glu	Lys	Ala	Ile	Glu	Arg	Leu	His	
		115					120					125				
gag	ccc	cac	tcc	cta	gcg	ctt	cca	gga	gcg	gag	ccg	agt	ttc	tct	ctc	432
Glu	Pro	His	Ser	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala	Glu	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	
		130				135					140					
ggg	gac	aag	atc	aaa	gtg	aag	agt	atg	aac	ccg	ctg	gga	cac	aca	cgg	480
Gly	Asp	Lys	Ile	Lys	Val	Lys	Ser	Met	Asn	Pro	Leu	Gly	His	Thr	Arg	
		145			150				155						160	
tgc	ccg	aaa	tat	gtg	cgg	aac	aag	atc	ggg	gaa	atc	gtc	gcc	tac	cac	528
Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Arg	Asn	Lys	Ile	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Tyr	His	
			165					170						175		
ggc	tgc	cag	atc	tat	ccc	gag	agc	agc	tcc	gcc	ggc	ctc	ggc	gac	gat	576
Gly	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Glu	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Asp	Asp	
			180					185					190			
cct	cgc	ccg	ctc	tac	acg	gtc	gcg	ttt	tcc	gcc	cag	gaa	ctg	tgg	ggc	624
Pro	Arg	Pro	Leu	Tyr	Thr	Val	Ala	Phe	Ser	Ala	Gln	Glu	Leu	Trp	Gly	
		195				200						205				
gac	gac	gga	aac	ggg	aaa	gac	gta	gtg	tgc	gtc	gat	ctc	tgg	gaa	ccg	672
Asp	Asp	Gly	Asn	Gly	Lys	Asp	Val	Val	Cys	Val	Asp	Leu	Trp	Glu	Pro	
		210			215						220					
tac	ctg	atc	tct	gcg	tga	aaggaatac	ata	gtg	agc	gag	cac	gtc	aat			720
Tyr	Leu	Ile	Ser	Ala	***				Met	Ser	Glu	His	Val	Asn		
		225		229				1				5				
aag	tac	acg	gag	tac	gag	gca	cgt	acc	aag	gcg	atc	gaa	acc	ttg	ctg	768
Lys	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Glu	Ala	Arg	Thr	Lys	Ala	Ile	Glu	Thr	Leu	Leu	
			10					15					20			
tac	gag	cga	ggg	ctc	atc	acg	ccc	gcc	gcg	gtc	gac	cga	gtc	gtt	tcg	816
Tyr	Glu	Arg	Gly	Leu	Ile	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Asp	Arg	Val	Val	Ser	
		25				30						35				
tac	tac	gag	aac	gag	atc	ggc	ccg	atg	ggc	ggg	gcc	aag	gtc	gtg	gcc	864
Tyr	Tyr	Glu	Asn	Glu	Ile	Gly	Pro	Met	Gly	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Ala	
		40			45						50					
aag	tcc	tgg	gtg	gac	cct	gag	tac	cgc	aag	tgg	ctc	gaa	gag	gac	gcg	912
Lys	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Glu	Tyr	Arg	Lys	Trp	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala	
		55		60						65				70		
acg	gcc	gcg	atg	gcg	tca	ttg	ggc	tat	gcc	ggg	gag	cag	gca	cac	caa	960
Thr	Ala	Ala	Met	Ala	Ser	Leu	Gly	Tyr	Ala	Gly	Glu	Gln	Ala	His	Gln	
			75					80					85			
att	tcg	gcg	gtc	ttc	aac	gac	tcc	caa	acg	cat	cac	gtg	gtg	gtg	tgc	1008
Ile	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Asp	Ser	Gln	Thr	His	His	Val	Val	Val	Cys	
			90				95						100			
act	ctg	tgt	tcg	tgc	tat	ccg	tgg	ccg	gtg	ctt	ggg	ctc	ccg	ccc	gcc	1056
Thr	Leu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Trp	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	
		105				110						115				
tgg	tac	aag	agc	atg	gag	tac	cgg	tcc	cga	gtg	gta	gcg	gac	cct	cgt	1104
Trp	Tyr	Lys	Ser	Met	Glu	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Val	Ala	Asp	Pro	Arg	
		120				125					130					
gga	gtg	ctc	aag	cgc	gat	ttc	ggg	ttc	gac	atc	ccc	gat	gag	gtg	gag	1152
Gly	Val	Leu	Lys	Arg	Asp	Phe	Gly	Phe	Asp	Ile	Pro	Asp	Glu	Val	Glu	
		135			140				145					150		
gtc	agg	gtt	tgg	gac	agc	agc	tcc	gaa	atc	cgc	tac	atc	gtc	atc	ccg	1200
Val	Arg	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Glu	Ile	Arg	Tyr	Ile	Val	Ile	Pro	
			155					160					165			
gaa	cgg	ccg	gcc	ggc	acc	gac	ggg	tgg	tcc	gag	gag	gag	ctg	acg	aag	1248
Glu	Arg	Pro	Ala	Gly	Thr	Asp	Gly	Trp	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	
			170				175						180			
ctg	gtg	agc	cgg	gac	tcg	atg	atc	ggg	gtc	agt	aat	gcg	ctc	aca	ccg	1296

[0025]

Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro	
185 190 195	
cag gaa gtg atc gta tga	1315
Gln Glu Val Ile Val ***	
200 203	
<210> 105	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 105	
ccggaattcg aaaggaatga ggaaatgga	29
<210> 106	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 106	
aaaaagtact catacgatca cticcctgc	28
<210> 107	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 107	
gttttcccag tcacgac	17
<210> 108	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 108	
ggccagtgcc tagcttaca	20
<210> 109	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 109	
caggaaacag ctatgac	17
<210> 110	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 14..16	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	

[0026]

<400> 110 gggcatatcg tggnnngaca agtcgcggt	29
<210> 111 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 111 ctcacennnt cgatgac	18
<210> 112 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 112 tacgagnnng aggtcggc	18
<210> 113 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 113 aagaagnnnc tgctcgcc	18
<210> 114 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 114 gagttcnnnt tcgagtc	18
<210> 115 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 115 ctcgccnnnc tcgtcact	18
<210> 116	

[0027]

<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 116	
aagcggnng cgtgagcg	18
<210> 117	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 117	
ggcggnng atgggctg	18
<210> 118	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 118	
gagaagnng cgttcgcg	18
<210> 119	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 119	
aagtcnnnt tcgcatg	18
<210> 120	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 120	
gcgatgnnnc cggcgacg	18
<210> 121	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	

[0028]

<222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 121 ccggcgnnnt tccgggcc	18
<210> 122 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 122 gcgacgnnnc gggccggc	18
<210> 123 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 123 ggcttcnnng gcctggac	18
<210> 124 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 124 atgggcnnng acgagttc	18
<210> 125 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 125 gacgagnnnc ggttcggc	18
<210> 126 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 126 aaccggnng agtacctc	18

[0029]

<210> 127	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 127	
tggcacnnna tccgcacc	18
<210> 128	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 128	
gagcagnnnc cggagttg	18
<210> 129	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 129	
atcgagnnng tcaaccag	18
<210> 130	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 130	
ggcgggnnnc ccgcaagc	18
<210> 131	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 131	
gtggtgnnnt tetccacc	18
<210> 132	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0030]

<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 132 tccaccnnna gcccgaa	18
<210> 133 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 133 cgcgcnntt acgtgcgc	18
<210> 134 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 134 accgggnng tggtaag	18
<210> 135 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 135 gtggtcnnnc accacgc	18
<210> 136 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 136 ggcgcnna tctaccgc	18
<210> 137 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 任意 <222> 7..9 <223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 137	

[0031]

aacggcnng gcgagtgc	18
<210> 138	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 138	
tactacnnt gctgggag	18
<210> 139	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 任意	
<222> 7..9	
<223> 低聚核苷酸作为PCR引物	
<400> 139	
tacgacnnt gggagccc	18

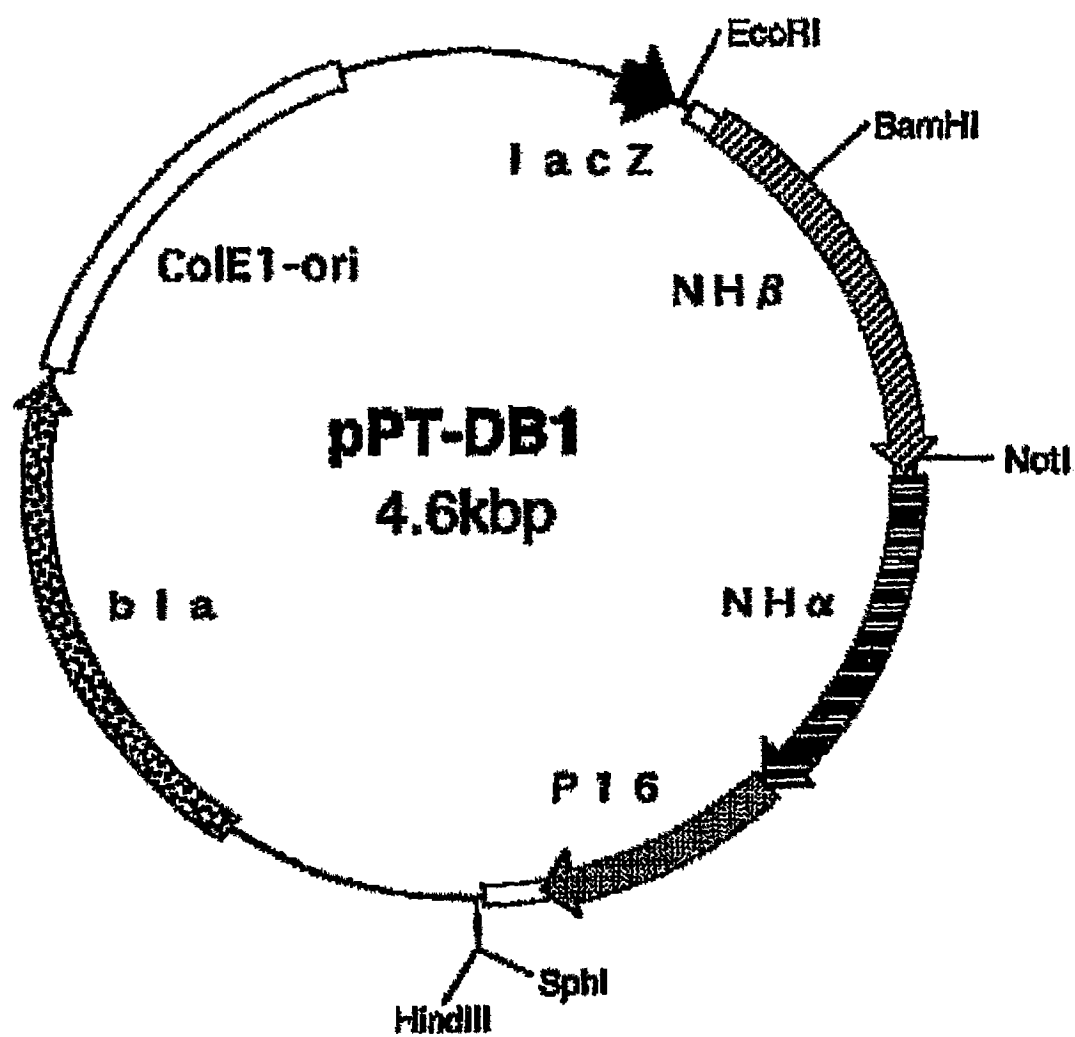


图 1

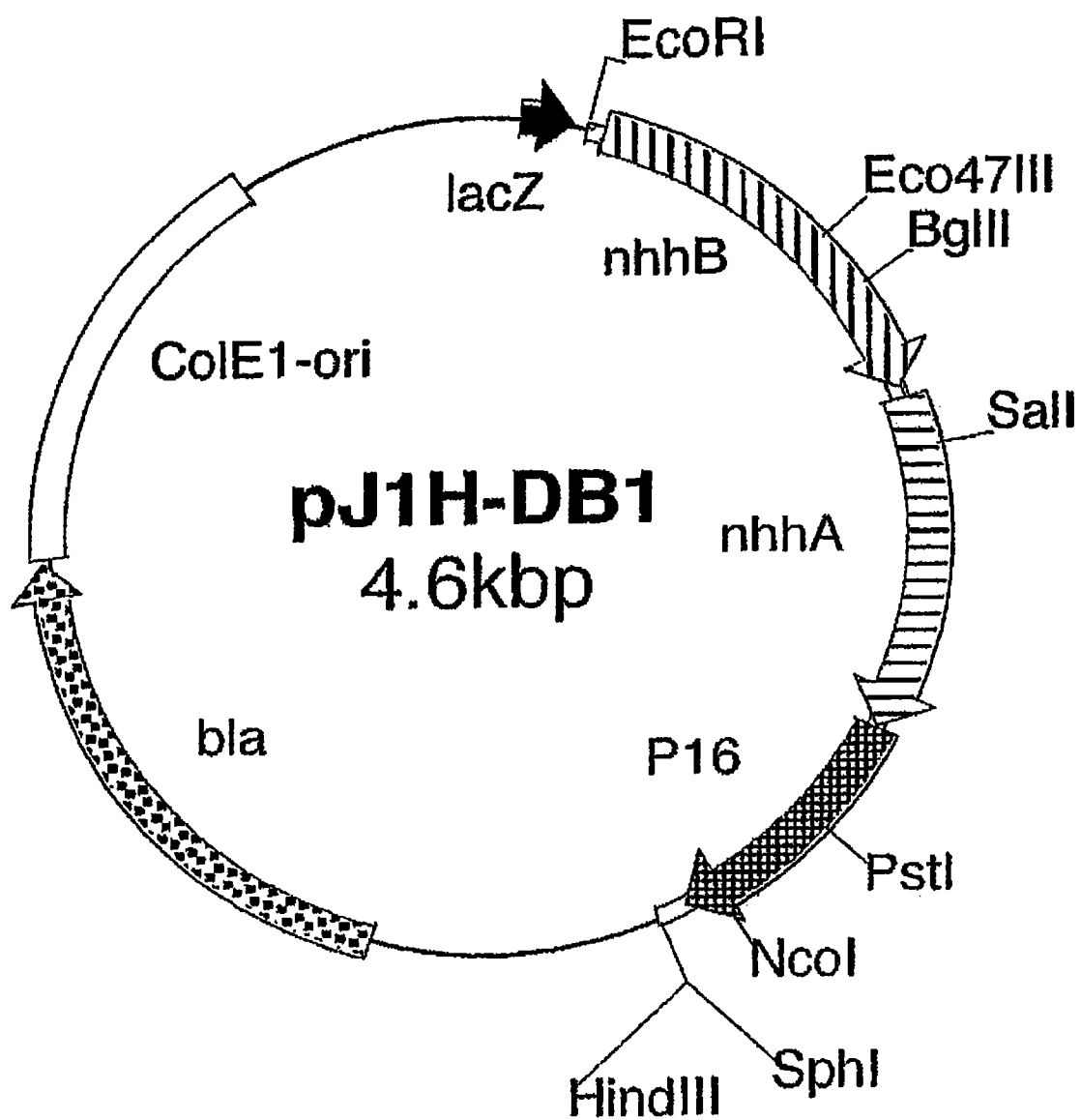


图 2