

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410030842.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100342014C

[22] 申请日 2004.4.8

[21] 申请号 200410030842.8

[73] 专利权人 百瑞全球有限公司

地址 英国英属维尔京群岛托托拉岛

[72] 发明人 王骏 萧游龙 叶康坚 曾实现

曾伟基 游明翰 吕旭新

[56] 参考文献

US6635458 B2 2003.10.21

Role of Arginine 285 in the Active Site of Rhodotorula gracilis D - Amino Acid Oxidase Gianluca Molla, Davide Porrini, et al, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 275 No. 32 2000

Substitution of the critical methionine residues in *trigonopsisvariabilis* D - amino acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide. Ju SS, Lin LL, Chien HR, Hsu WH, FEMS Microbiol Lett, Vol. 186 No. 2 2000

审查员 邢云龙

[74] 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司

代理人 张天舒

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 3 页

[54] 发明名称

重组 D - 氨基酸氧化酶

[57] 摘要

本发明提供一种其催化头孢菌素 C 的活力比亲本 D - 氨基酸氧化酶所具有的催化活力至少高出 25% 的重组 D - 氨基酸氧化酶及其编码 DNA 序列。

1. 一种编码重组 D-氨基酸氧化酶的 DNA 序列，其特征在于所述重组 D-氨基酸氧化酶的基因与序列表中的序列 1 相比，编码第 53 位的苏氨酸的核苷酸密码子突变为编码丝氨酸或脯氨酸的密码子。

2. 权利要求 1 所述的 DNA 序列，其特征在于所述重组 D-氨基酸氧化酶的基因编码序列 4 所述的氨基酸序列。

3. 权利要求 2 所述的 DNA 序列，其特征在于它包含序列 3 所示的核苷酸序列。

4. 权利要求 1 所述的 DNA 序列，其特征在于所述重组 D-氨基酸氧化酶的基因编码序列 6 所述的氨基酸序列。

5. 权利要求 5 所述的 DNA 序列，其特征在于它包含序列 5 所示的核苷酸序列。

6. 一种多肽，其氨基酸序列与由权利要求 1 所述的 DNA 编码的氨基酸序列一致。

7. 权利要求 6 所述的多肽，其特征在于，以序列表中的序列 2 为参考序列，对应于序列 2 中第 53 位苏氨酸的氨基酸为脯氨酸。

8. 权利要求 7 所述的多肽，其氨基酸序列如序列 4 所示。

9. 权利要求 6 所述的多肽，其特征在于，以序列表中的序列 2 为参考序列，对应于序列 2 中第 53 位苏氨酸的氨基酸为丝氨酸。

10. 权利要求 9 所述的多肽，其氨基酸序列如序列 6 所示。

11. 一种质粒，其含有权利要求 1-5 中任一项所述的 DNA 序列。

重组 D-氨基酸氧化酶

技术领域

本发明涉及生物工程技术领域，特别是，涉及新的 D-氨基酸氧化酶的制备和应用。本发明提供的二枚高酶活的重组 D-氨基酸氧化酶，可用于将头孢菌素 C(cephalosporin C) 转化成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸 (glutaryl-7-aminocephalosporanic acid)。

背景技术

半合成头孢菌素的母核 7-氨基头孢霉烷酸 (7-aminocephalosporanic acid) 可由化学法裂解头孢菌素 C 而成。但化学法使用大量有毒化学试剂，污染环境，且反应步骤繁复，得率较低。近年来，酶法成为制备 7-氨基头孢霉烷酸的另一主要工艺。酶法转化头孢菌素 C 包括两个步骤：(1) D-氨基酸氧化酶氧化头孢菌素 C (cephalosporin C) 生成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸 (glutaryl-7-aminocephalosporanic acid)；(2) 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰基酶水解戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸产生 7-氨基头孢霉烷酸。目前，工业上采用的 D-氨基酸氧化酶主要来自红冬孢酵母(*Rhodotorula gracilis*)或三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*)。但是该两种酶催化头孢菌素 C 的比活均较低(Simonetta, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 914: 136-142 (1987); U.S. Pat. No. 5,453,374; U.S. Pat. No. 5,208,155)。因而，在现有技术中，仍然存在对高催化活性的 D-氨基酸氧化酶的需求，可从而降低酶法制备 7-氨基头孢霉烷酸的成本。

发明内容

本发明的目的在于提供具有高催化头孢菌素 C 活力的重组 D-氨基酸氧化酶。本发明的目的还在于提供使用本发明的高催化活性重组 D-氨基酸氧化酶生产戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸。

本发明将三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)FA10 的 D-氨基酸氧化酶基因(Li, W. et al., *Acta Microbiologica Sinica* 31:251-253, 1991)克隆至适当的载体上, 采用定点突变方法进行基因改进。具体而言, 对第 53 位氨基酸的编码核苷酸进行定点突变, 从而获得高催化活性的重组 D-氨基酸氧化酶。

一方面, 本发明提供一种编码重组 D-氨基酸氧化酶的 DNA 序列, 其特征在于所述重组 D-氨基酸氧化酶的基因与序列表中的序列 1 相比, 在编码第 53 位氨基酸的核苷酸密码子中存在导致其编码的苏氨酸被其他氨基酸取代的至少一个核苷酸的差异, 且其编码蛋白质所具有的 D-氨基酸氧化酶催化头孢菌素 C 的活力比具有序列 2 所示氨基酸序列的亲本 D-氨基酸氧化酶所具有的催化头孢菌素 C 的活力至少高出 25%, 优选高出 35%, 更优选高出 50%, 最优选高出 100%。

优选的是, 本发明的 DNA 序列含有编码序列表中序列 4 或 6 所示氨基酸序列的核苷酸序列, 更优选该 DNA 序列包含序列 3 或 5 所示的核苷酸序列。

另一方面, 本发明提供一种多肽, 其特征在于以序列表中的序列 2 为参考序列, 对应于序列 2 中第 53 位苏氨酸的氨基酸被其他氨基酸替代, 且其所具有的 D-氨基酸氧化酶催化头孢菌素 C 的活力比具有序列 2 所示氨基酸序列的亲本 D-氨基酸氧化酶所具有的 D-氨基酸氧化酶催化活力至少高出 25%, 优选高出 35%, 更优选高出 50%, 最优选高出 100%。

优选的是, 本发明的多肽, 其特征在于, 以序列表中的序列 2 为参考序列, 对应于序列 2 中第 53 位苏氨酸的氨基酸为丝氨酸或脯氨酸。在本发明的实施例中, 具体举出了两个新的重组 D-氨基酸氧化酶, 重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 和重组 D-氨基酸氧化酶 GHB。重组 D-氨

氨基酸氧化酶 GHA 具有序列 4 所示的氨基酸序列，其催化头孢菌素 C 的比活较亲本高 105%；重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 具有序列 6 所示的氨基酸序列，其催化头孢菌素 C 的比活较亲本高 35%。本发明中亲本基因系指来自三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)FA10 的 D-氨基酸氧化酶基因 (Li, W. et al., *Acta Microbiologica Sinica* 31:251-253, 1991)，其核苷酸序列如序列 1 所示，氨基酸序列如序列 2 所示。

本发明的重组 D-氨基酸氧化酶还包括，对 GHA 或 GHB 的氨基酸序列进行一个或多个氨基酸的保守替代的形式，增加或减少一个或多个氨基酸的衍生物的形式。

本发明制备重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 或重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 的方法中，适用的载体包括但不限于原核表达载体 pRSET-A 和 pET；包括但不限于真核表达载体 pYD1 和 pYES2；包括但不限于克隆载体 pGEM[®]-T Easy、pUC18、pUC19 和 pBluescript[®]-SK(+/-)。

本发明制备重组 D-氨基酸氧化酶的方法中，宿主细胞可以是原核细胞也可以是真核细胞。适用的原核微生物包括但不限于大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)和链霉菌(*Streptomyces*)；适用的真核微生物包括但不限于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、红冬孢酵母、三角酵母、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和毕赤巴斯德酵母(*Pichia pastoris*)。

本发明制备重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 和重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 的方法中，采用本领域已知的适当方法，所述重组 D-氨基酸氧化酶可在原核细胞或真核细胞胞内或胞外表达。可通过将上述本发明的 DNA 序列通过本领域已知的任何方法导入适当的微生物宿主细胞例如大肠杆菌或酵母细胞中，进行多肽的表达。

如果表达的重组 D-氨基酸氧化酶是胞外酶，可以从细胞产物中通过常规技术如硫酸铵分离和丙酮沉淀等，获得部分纯化的重组 D-氨基酸氧化酶，或通过常规纯化技术如离子交换亲和层析等从细胞产物中完全纯化。因此，在使用时，本发明的重组 D-氨基酸氧化酶可以是未经提纯的粗酶；也可以是部分纯化的酶；也可以是纯化的酶。

如果重组 D-氨基酸氧化酶是胞内酶，则可先将宿主细胞破碎，然后例如通过离心去除细胞碎片，接着再通过分级分离，分离纯化重组的 D-氨基酸氧化酶。

此外，为了方便在工业上的各种应用，可根据本领域中已知的任何适当的方法将本发明的重组 D-氨基酸氧化酶制成固相细胞。为制备所述的固相细胞，可以将含有本发明重组 D-氨基酸氧化酶的转化细胞按照本领域已知的方法与固相载体连接起来，制成包含所述 D-氨基酸氧化酶的固相细胞。在本发明中，还可以用常规方法将未经纯化的粗酶、部分纯化的酶或纯化的重组 D-氨基酸氧化酶本身固定在载体上。可通过将本发明的重组 D-氨基酸氧化酶吸附到离子交换树脂以制备固定化的固相酶。

此外，可根据例如 Miyake Y., Aki K., Hashimoto S., and Yamano T. (1965) Crystallization and some properties of D-Amino Acid Oxidase Apoenzyme, *Biochemica et Biophysica Acta*, 105:86-99 来制备结晶酶。很显然，这些固相酶或结晶酶及其应用也在本发明的范围之内。

附图说明

图 1 质粒 pRSET-kan 图谱。

图 2 质粒 pRSET-kan 序列。

图 3 重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 和重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 的 SDS-PAGE 电泳图。1, 蛋白质分子量标记 BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), 单位是 KDa; 2, 3 和 4 分别是纯化的亲本三角酵母 D-氨基酸氧化酶、重组 D-氨基酸氧化酶 GHA, 以及重组 D-氨基酸氧化酶 GHB。

具体实施方式

下列实施例仅用于说明而不应视为限定本发明的范围。实施实例中未注明具体条件者，按常规条件或制造商建议的条件进行。

实例 1 D-氨基酸氧化酶基因重组质粒 pRSET-A-DAO 的构建

根据已知三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因 5'和 3'端序列(Gonzalez, F.J., Montes, J., Martin, F., Lopez, M.C., Ferminan, E., Catalan, J., Galan, M.A. Dominguez, A. Molecular cloning of TvDAO1, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 13: 1399-1408; 1997)设计引物如下：

5'-NdeI (引入 NdeI 酶切位点)：

5'-TAGGGCTGACATATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGTGC-3'

(序列 7)

3'-BglIII (引入 BglIII 酶切位点)：

5'-TAGGGCTGAAGATCTCTAAAGGTTTGGACGAGTAAGAGC-

3' (序列 8)

以质粒 pJL (杨蕴刘等, 中国专利申请公开号: CN 1371999A) 为模板, 用以上两个引物, 在 Pfu DNA 聚合酶(Promega)的作用下, 合成三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因。pJL 携带有三角酵母 FA10 D-氨基酸氧化酶基因(Li, W. et al., *Acta Microbiologica Sinica* 31:251-253, 1991)。PCR 反应条件为: 40 ng pJL, 0.4 μ M 5'-NdeI, 0.4 μ M 3'-BglIII, 50 μ M dATP, 50 μ M dTTP, 50 μ M dCTP, 50 μ M dGTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 2.5 U Pfu DNA 聚合酶, 用无菌水调反应体积至 50 μ l。PCR 扩增反应程序为:

94°C, 60 sec 循环 10 次 94°C, 60 sec 循环 25 次

94°C, 5 min \rightarrow 50°C, 60 sec \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow 60°C, 60 sec \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow 72°C, 10 min

72°C, 120 sec

72°C, 120 sec

得 1,098 bp 长 PCR 产物, 其 5' 和 3' 端分别具有 NdeI 和 BglII 限制性酶切位点。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳提纯, NdeI 及 BglII 酶切后, 与经 NdeI 及 BglII 酶切质粒 pRSET-A(Invitrogen) 得到的 2.9Kb 的片段连接, 得连接产物 pRSET-A-DAO。将 pRSET-A-DAO 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS (Novagen), 在氨苄青霉素 LB 平板上 37°C 培养, 按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual, ed. By J. Sambrook, et. al., 1989, CSHL Press 描述的方法提取质粒, 经 DNA 测序, 确定三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因核苷酸序列如序列 1, 其推测出的氨基酸序列如序列 2 所示。

实例 2 pRSET-kan 载体的构建

为从 pRSET-A 去除氨苄青霉素抗性基因, 根据载体 pRSET-A 的序列设计引物如下:

VET-F: 5'-CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAG-3'
(序列 9)

VET-R: 5'-ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGC-3' (序列 10)

为从载体 pET-28b(Novogen) 扩增出卡那霉素抗性基因, 根据载体 pET-28b(Novogen) 的序列设计引物如下:

KAN-F: 5'-ATGAGTCATATTCAACGGGAAAC-3' (序列 11)

KAN-R: 5'-TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATG-3' (序列 12)

扩增去除氨苄青霉素抗性基因的 pRSET-A 片段的 PCR 条件为: 50 ng pRSET-A, 0.4 μM VET-F, 0.4 μM VET-R, 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 2.5 U Pfu DNA 聚合酶, 用无菌水调反应体积至 50 μl。扩增 pET-28b 卡那霉素抗性基因的 PCR 条件为: 50 ng pET-28b, 0.4 μM KAN-F, 0.4 μM KAN-R, 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 2.5 U Pfu DNA 聚合酶, 用无菌水调反应体积至 50 μl。PCR 扩增反应

程序均为：

94°C, 60 sec 循环 35 次

94°C, 5 min →→ 50°C, 60 sec →→→→→ 72°C, 10 min 72°C, 4 min

72°C, 4 min

1% 琼脂糖电泳并提纯 PCR 产物(去除氨苄青霉素抗性基因的 pRSET-A 片段长度为 2036 bp, 卡那霉素抗性基因为 816 bp), 连接该两个片断得连接产物 pRSET-kan(图 1)。将 pRSET-kan 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS, 在卡那霉素 LB 平板上 37°C 培养, 提取质粒, 经 DNA 测序确定核苷酸序列如图 2 和序列 13 所示。

实例 3 重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 的构建

重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 由定点突变构建。定点突变技术主要参考 PCR Protocols (编者: John M.S.Bartlett and David Stirling. Totowa, N.J.: Humana Press, 2003.)一书之描述。

根据实例 1 克隆的三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因之序列(序列 1), 设计引物如下:

引物 A : 5'-TAGGGCTGACATATGGCTAAAATCGTTGTT
ATTG-3' (序列 14)

引物 B : 5'-TAGGGCTGAAGATCTCTAAAGGTTTGGACGAG
-3' (序列 15)

引物 C1: 5'- GCAGGTGCCAACTGGCTCCCGTTTTACGATGG
AGGCAAG-3' (序列 16)

引物 D : 5'-GAGCCAGTTGGCACCTGCCCAAGG-3' (序列 17)

引物 A 和 B 是一对外引物。引物 A 包含 NdeI 酶切位点, 并有部份碱基与 D-氨基酸氧化酶基因 5' 端序列交迭; 引物 B 包含 BglII 酶切位点, 并有部份碱基与 D-氨基酸氧化酶基因 3' 端序列交迭。引物 C1 和 D 是内引物。引物 C1 将亲本 D-氨基酸氧化酶基因 53 位之苏氨酸转变成脯氨酸。引物 D 部份碱基与引物 C1 的序列交迭。

利用聚合酶链式反应，以 pRSET-A-DAO 为模板，用引物对 A 和 D 扩增模板片段 1；用引物对 B 和 C1 扩增模板片段 2。扩增反应条件为：20 ng pRSET-A-DAO, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.4 μM 引物 A 和 0.4 μM 引物 D (扩增模板片段 1) 或 0.4 μM 引物 B 和 0.4 μM 引物 C1 (扩增模板片段 2), 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 1.5 U Pfu DNA 聚合酶，用无菌水调反应体积至 50 μl。聚合酶链式反应扩增程序为：

94°C, 60 sec 循环 30 次

94°C, 2 min → 53°C, 60 sec → → → → → 72°C, 10 min

72°C, 60 sec

扩增得到的模板片段 1 和模板片段 2，经 1%琼脂糖凝胶电泳分离纯化后，用以扩增全长基因。扩增全长基因的反应条件为：20 ng 模板片段 1, 20 ng 模板片段 2, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.4 μM 引物 A 和 0.4 μM 引物 B, 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 1.5 U Pfu DNA 聚合酶，用无菌水调反应体积至 50 μl。聚合酶链式反应扩增程序为：

94°C, 60 sec 循环 35 次

94°C, 2 min → 53°C, 60 sec → → → → → → 72°C, 10 min

72°C, 120 sec

全长扩增反应得到重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 基因，经 NdeI 及 BglII 酶切后连接到 pRSET-kan 得连接产物 pRSET-kan-DAOGHA，将 pRSET-kan-DAOGHA 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS，卡那霉素 LB 平板 37°C 培养，提取质粒，经 DNA 测序确定引入的突变无误，确定重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 核苷酸序列如序列 3 所示，其推测的氨基酸序列如序列 4 所示。

实例 4 重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 的构建

重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 由定点突变构建。定点突变技术主要参考 PCR Protocols (编者: John M.S.Bartlett and David Stirling. Totowa, N.J.: Humana Press, 2003.)一书之描述。

根据实例 1 克隆的三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因之序列(序列 1), 设计引物如下:

引物 A : 5'-TAGGGCTGACATATGGCTAAAATCGTTGTATTG-3' (序列 14)

引物 B : 5'-TAGGGCTGAAGATCTCTAAAGGTTTGGACGAG-3' (序列 15)

引物 C2: 5'-GCAGGTGCCAACTGGCTCAGCTTTTACGATGGAGGCAAG-3' (序列 18)

引物 D : 5'-GAGCCAGTTGGCACCTGCCCAAGG-3' (序列 17)

以上引物 A、B 和 D 与实例 3 所述相同。引物 C2 是内引物, 将亲本 D-氨基酸氧化酶基因 53 位之苏氨酸转变成丝氨酸。引物 D 部份碱基与引物 C2 的序列交迭。模板片段 1 之扩增如实例 3。利用聚合酶链式反应, 以 pRSET-A-DAO DNA 为模板, 用引物对 B 和 C2 扩增模板片段 3。扩增反应条件为: 20 ng pRSET-A-DAO, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.4 μM 引物 B 和 0.4 μM 引物 C2, 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 1.5 U Pfu DNA 聚合酶, 用无菌水调反应体积至 50 μl。聚合酶链式反应扩增程序为:

94°C, 60 sec 循环 30 次

94°C, 2 min → 53°C, 60 sec → → → → → → 72°C, 10 min

72°C, 60 sec

扩增得到模板片段 3, 经 1%琼脂糖凝胶电泳分离纯化后, 用以扩增全长基因。扩增全长基因的反应条件为: 20 ng 模板片段 1, 20 ng 模板片段 3, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄,

2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.4 μM 引物 A 和 0.4 μM 引物 B, 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 1.5U Pfu DNA 聚合酶, 用无菌水调反应体积至 50 μl。聚合酶链式反应扩增程序为:

94°C, 60 sec 循环 35 次

94°C, 2 min → 53°C, 60 sec → → → → → → → 72°C, 10 min

72°C, 120 sec

全长扩增反应得到重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 基因, 经 NdeI 及 BglII 酶切后连接到 pRSET-kan 上, 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS, 卡那霉素 LB 平板 37°C 培养, 提取质粒, 经 DNA 测序确定引入的突变无误, 确定重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 核苷酸序列如序列 5 所示, 其推测的氨基酸序列如序列 6 所示。

实例 5 D-氨基酸氧化酶的纯化

D-氨基酸氧化酶的纯化基本按 Alonso, J., Barredo, J.L., Diez, B., Mellado, E., Salto, F., Garcia, J.L., Cortes, E. (D-amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* [*Rhodospiridium toruloides*] ATCC 26217. *Microbiology* 144:1095-1101; 1998) 所述。取单菌落 pRSET-kan-DAOGHA 转化之大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 细胞(实例 3)在 200 ml 卡那霉素 LB 培养液 37°C, 250 rpm 培养 12 小时, 然后加入 1 mM IPTG 诱导细胞 6 小时。离心收集细胞, 洗涤并溶于 20 ml 缓冲液 A [20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 8.0) 含 20% 甘油, 5 mM 2-巯基乙醇, 1 mM PMSF 和 2 mM EDTA], 用超声波裂解细胞。离心(4 °C, 13,000 g, 20 分钟) 去除细胞碎片, 取上清液上柱 DEAE-纤维素柱 (Sigma 公司, 6 x 2.5 cm), 用缓冲液 A 洗脱活性成份, 得部分纯化的重组 D-氨基酸氧化酶 GHA。部分纯化的重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 可继续由下列方法纯化: 上缓冲液 A 平衡之 Cibacron Blue 3GA-琼脂糖柱 (Pharmacia LKB Biotechnology, 4 x 1 cm), 用 30 ml 1 M 磷酸钠 (pH 8.0) 冲洗, 然后用 10 ml 缓冲液 A + 50 μM FAD 洗脱活性部分。用 SDS-PAGE 检测蛋白质的纯度(图 3)。三角酵母 D-氨基酸氧化酶和重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 的纯化也依照上述步骤实行(图 3)。

实例 6 D-氨基酸氧化酶活性的测定

参照 Isogai, T., Ono, H., Ishitani, Y., Kojo, H., Ueda, Y., Kohsaka, M. (Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*. J Biochem [Tokyo]. 108:1063-1069, 1990) 所述, 具体步骤有变更。取三毫升反应液含磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 7.5)、75 mM 头孢菌素 C 钠盐以及三毫升如实例 5 所述、部分纯化的三角酵母 D-氨基酸氧化酶, 加氧在 22°C 振荡反应 60 分钟。反应开始后在不同时间 (1、5、10、30、60 分钟) 抽取 100 μ l 反应液与 10 μ l 3% 过氧化氢混匀, 再加入 50 μ l 10% 三氯醋酸, 混匀以终止反应。将终止反应液离心(10,000 g, 3 分钟), 取 10 μ l 上清液和 990 μ l HPLC 流动相混合, 上 HPLC 柱检测。HPLC 色谱柱: Diamonsil™ C18, 250 x 4.6 mm (迪马公司, 北京); 流动相: 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7.0), 5% 乙腈; 柱温度: 30°C; 流速: 1 ml/min; 检测: 260 nm UV。一单位酶活性定义为在上述条件每分钟转化一微摩尔头孢菌素 C 为戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸的酶量。重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 和重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 活性的测定也如上述。测得重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 的比活是亲本三角酵母 D-氨基酸氧化酶比活的 205%; 重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 的比活是亲本 D-氨基酸氧化酶比活的 135%。

实例 7 D-氨基酸氧化酶 固相酶的制备

酶的提取和纯化按实例 5 所述。D-氨基酸氧化酶固定化酶的制备参照德国 Röhm 公司(Darmstadt, Germany)的说明进行。量取 50 mL 200mg 总蛋白、部分纯化的重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 酶溶液, 加入 K_2HPO_4 与 KH_2PO_4 使溶液的磷酸盐浓度至 0.5 M, pH 值为 7.5。加入 Eupergit C™ (Röhm GmbH, Darmstadt, Germany) 干载体 5g, 室温(17°C - 23°C)75 rpm 搅拌 72 小时, 过滤除去上清液, 用蒸馏水反复冲洗, 抽滤后, 得固定化酶 19.4g。酶比活的测定方法基本与实例 6 所述相同, 惟所用反应液体积为 1,000 ml, 加入重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 固

相酶 19.4 g。测得重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 的比活为 65 单位/克湿载体。

本发明不受上述具体文字描述的限制。本发明可在权利要求书所概括的范围内做各种改变。这些改变均在本发明的范围之内。

<110> Bioright
 <120> 工程 D-氨基酸氧化酶
 <130> SPI020563-09
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> *Trigonopsis variabilis*
 <400> 1

atggctaaaa tcgtgttat tggcgccggt gttgccggtt taactacagc tcttcaact 60
 cttcgtaaag gacatgaggt tacaattgtg tccgagtta cgcccgggtga tcttagtata 120
 ggatatacct cgccttgggc aggtgccaac tggtcacat ttacgatgg aggcaagtta 180
 gccgactacg atgccgtctc ttatctatc ttgcgagagc tggtcgaag cagccccgag 240
 gctggaattc gactcatcaa ccaacgtcc catgttctca agcgtgatct tctaaactg 300
 gaaggtgcca tgtcggccat ctgtcaacgc aaccctggt tcaaaaacac agtcgattct 360
 ttcgagatta tcgaggacag gtccaggatt gtccacgatg atgtggctta tctagtcgaa 420
 ttgtctccg ttgtatcca caccggagtc tactgaact ggctgatgtc ccaatgctta 480
 tcgctcggcg ccacgggtgt taaacgtcga gtgaaccata tcaaggatgc caatttcta 540
 cactcctcag gatcacgcc cgacgtgatt gtcaactgta ttggtctct tgcccggttc 600
 ttgggaggcg tcgaggacaa gaagatgtac cctattcgag gacaagtcgt cctgttcga 660
 aactctctc ttttatggc ctctttcc agcactcctg aaaaagaaa tgaagacgaa 720
 gctctatata tcatgaccg atcgtatgtt acttctatca ttggcggttg ttccaatcc 780
 aacaactggt catccgaacc cgatcctct ctcaccatc gaatcctgtc tagagccctc 840
 gaccgattcc cggaactgac caaagatggc cctcttgaca ttgtgcgca atgcgttggc 900
 caccgtcctg gtagagaggg cgggtccccga gtagaattag agaagatccc cggcgttggc 960
 tttgtgtcc ataactatgg tgcccgccgt gctggttacc agtctctta cggcatggct 1020
 gatgaagctg tttctacgt cgaagagct cttactcgtc caaacctta g 1071

<210> 2
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> *Trigonopsis variabilis*
 <400> 2

Met Ala Lys Ile Val Val Ile Gly Ala Gly Val Ala Gly Leu Thr Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Leu Leu Arg Lys Gly His Glu Val Thr Ile Val Ser Glu
 20 25 30

Phe Thr Pro Gly Asp Leu Ser Ile Gly Tyr Thr Ser Pro Trp Ala Gly
 35 40 45

Ala Asn Trp Leu Thr Phe Tyr Asp Gly Gly Lys Leu Ala Asp Tyr Asp
 50 55 60

Ala Val Ser Tyr Pro Ile Leu Arg Glu Leu Ala Arg Ser Ser Pro Glu
 65 70 75 80

Ala Gly Ile Arg Leu Ile Asn Gln Arg Ser His Val Leu Lys Arg Asp
 85 90 95

Leu Pro Lys Leu Glu Gly Ala Met Ser Ala Ile Cys Gln Arg Asn Pro
 100 105 110

Trp Phe Lys Asn Thr Val Asp Ser Phe Glu Ile Ile Glu Asp Arg Ser
 115 120 125

Arg Ile Val His Asp Asp Val Ala Tyr Leu Val Glu Phe Ala Ser Val
 130 135 140

Cys Ile His Thr Gly Val Tyr Leu Asn Trp Leu Met Ser Gln Cys Leu
 145 150 155 160

Ser Leu Gly Ala Thr Val Val Lys Arg Arg Val Asn His Ile Lys Asp
 165 170 175

Ala Asn Phe Leu His Ser Ser Gly Ser Arg Pro Asp Val Ile Val Asn
 180 185 190

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

Met Tyr Pro Ile Arg Gly Gln Val Val Leu Val Arg Asn Ser Leu Pro
 210 215 220

Phe Met Ala Ser Phe Ser Ser Thr Pro Glu Lys Glu Asn Glu Asp Glu
225 230 235 240

Ala Leu Tyr Ile Met Thr Arg Phe Asp Gly Thr Ser Ile Ile Gly Gly
245 250 255

Cys Phe Gln Ser Asn Asn Trp Ser Ser Glu Pro Asp Pro Ser Leu Thr
260 265 270

His Arg Ile Leu Ser Arg Ala Leu Asp Arg Phe Pro Glu Leu Thr Lys
275 280 285

Asp Gly Pro Leu Asp Ile Val Arg Glu Cys Val Gly His Arg Pro Gly
290 295 300

Arg Glu Gly Gly Pro Arg Val Glu Leu Glu Lys Ile Pro Gly Val Gly
305 310 315 320

Phe Val Val His Asn Tyr Gly Ala Ala Gly Ala Gly Tyr Gln Ser Ser
325 330 335

Tyr Gly Met Ala Asp Glu Ala Val Ser Tyr Val Glu Arg Ala Leu Thr
340 345 350

Arg Pro Asn Leu
355

<210> 3

<211> 1071

<212> DNA

<213> *Trigonopsis variabilis*

<400> 3

atggctaaaa tcgtgttat tggcgccgt gttgccggt taactacagc tcttcaact 60

cttcgtaaag gacatgaggt tacaatttg tccgagttta cgcccggatg tcttagtate 120

ggatatacct cgccttgggc aggtgccaac tggctcccgt tttacgatgg aggcaagtta 180

gccgactacg atgccgtctc ttatctate ttgcgagagc tggctcgaag cagccccgag 240

gctggaatc gactcatcaa ccaacgetcc catgttctca agcgtgatct tctaaactg 300

gaaggtgcca tgtcggccat ctgtcaacgc aaccctggt tcaaaaacac agtcgattct 360

ttcgagatta tcgaggacag gtccaggatt gtccacgatg atgtggctta tctagtcaa 420

ttgcttccg ttgtatcca caccggagtc tacttgaact ggetgatgct ccaatgctta 480

tcgctcggcg ccacgggtgt taaacgtcga gtgaaccata tcaaggatgc caatttcta 540
 cactcctcag gatcacgccc cgacgtgait gtcaactgta gtggtctctt tgcccgggtc 600
 ttgggaggcg tcgaggacaa gaagatgtac cctattcgag gacaagtcgt cctgttcca 660
 aactctcttc cttttatggc ctcctttcc agcactcctg aaaaagaaaa tgaagacgaa 720
 gctctatata tcatgaccgg attcgatggt acttctatca ttggcgggtg ttccaatcc 780
 aacaactggt catccgaacc cgatccttct ctcaccatc gaatcctgtc tagagccctc 840
 gaccgattcc cggaactgac caaagatggc cctcttgaca ttgtgcgca atgcgttggc 900
 caccgtcctg gtagagaggg cgggtccccga gtagaattag agaagatccc cggcgttggc 960
 tttgtgtcc ataactatgg tgccgccggt gctggttacc agtcctctta cggcatggct 1020
 gatgaagctg tttcttactg cgaagagct cttactcgtc caaacctta g 1071

<210> 4
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> *Trigonopsis variabilis*
 <400> 4

Met Ala Lys Ile Val Val Ile Gly Ala Gly Val Ala Gly Leu Thr Thr
1 5 10 15

Ala Leu Gln Leu Leu Arg Lys Gly His Glu Val Thr Ile Val Ser Glu
20 25 30

Phe Thr Pro Gly Asp Leu Ser Ile Gly Tyr Thr Ser Pro Trp Ala Gly
35 40 45

Ala Asn Trp Leu Pro Phe Tyr Asp Gly Gly Lys Leu Ala Asp Tyr Asp
50 55 60

Ala Val Ser Tyr Pro Ile Leu Arg Glu Leu Ala Arg Ser Ser Pro Glu
65 70 75 80

Ala Gly Ile Arg Leu Ile Asn Gln Arg Ser His Val Leu Lys Arg Asp
85 90 95

Leu Pro Lys Leu Glu Gly Ala Met Ser Ala Ile Cys Gln Arg Asn Pro
100 105 110

Trp Phe Lys Asn Thr Val Asp Ser Phe Glu Ile Ile Glu Asp Arg Ser
 115 120 125

Arg Ile Val His Asp Asp Val Ala Tyr Leu Val Glu Phe Ala Ser Val
 130 135 140

Cys Ile His Thr Gly Val Tyr Leu Asn Trp Leu Met Ser Gln Cys Leu
 145 150 155 160

Ser Leu Gly Ala Thr Val Val Lys Arg Arg Val Asn His Ile Lys Asp
 165 170 175

Ala Asn Phe Leu His Ser Ser Gly Ser Arg Pro Asp Val Ile Val Asn
 180 185 190

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

Met Tyr Pro Ile Arg Gly Gln Val Val Leu Val Arg Asn Ser Leu Pro
 210 215 220

Phe Met Ala Ser Phe Ser Ser Thr Pro Glu Lys Glu Asn Glu Asp Glu
 225 230 235 240

Ala Leu Tyr Ile Met Thr Arg Phe Asp Gly Thr Ser Ile Ile Gly Gly
 245 250 255

Cys Phe Gln Ser Asn Asn Trp Ser Ser Glu Pro Asp Pro Ser Leu Thr
 260 265 270

His Arg Ile Leu Ser Arg Ala Leu Asp Arg Phe Pro Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

Asp Gly Pro Leu Asp Ile Val Arg Glu Cys Val Gly His Arg Pro Gly
 290 295 300

Arg Glu Gly Gly Pro Arg Val Glu Leu Glu Lys Ile Pro Gly Val Gly
 305 310 315 320

Phe Val Val His Asn Tyr Gly Ala Ala Gly Ala Gly Tyr Gln Ser Ser
 325 330 335

Tyr Gly Met Ala Asp Glu Ala Val Ser Tyr Val Glu Arg Ala Leu Thr
 340 345 350

Arg Pro Asn Leu
 355

<210> 5
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> *Trigonopsis variabilis*
 <400> 5
 atggctaaaa tcgtgttat tggcgccgt gttgccggt taactacagc tctcaact 60
 ctctgtaaag gacatgaggt tacaatttg tccgagtta cgtcccggtga tcttagtatac 120
 ggatatacct cgccctgggc aggtgccaac tggctcagct ttacgatgg aggcaagta 180
 gccgactacg atgccgtctc ttactctatc ttgcgagagc tggctcgaag cagccccgag 240
 gctggaattc gactcatcaa ccaacgctcc catgttctca agcgtgatct tctaaactg 300
 gaaggtgcca tgcggccat ctgtcaacgc aaccctggt tcaaaaacac agtcgattct 360
 ttcgagatta tcgaggacag gtccaggatt gtccacgatg atgtggctta tctagtcaa 420
 ttgcttccg ttgtatcca caccggagtc tactgaact ggctgatgc ccaatgctta 480
 tcgctcggcg ccacgggtgt taaacgtcga gtgaaccata tcaaggatgc caatttcta 540
 cactctcag gatcacgcc cgacgtgatt gtcaactgta tgggtctctt tgcccggctc 600
 ttgggaggcg tcgaggacaa gaagatgtac cctattcgag gacaagtcgt cctgttcga 660
 aactctcttc ctttatggc ctctttcc agcactctg aaaaagaaaa tgaagacgaa 720
 gctctatata tcatgaccg attcgatgtt acttctatca ttggcgggtg ttccaatcc 780
 aacaactggt catccgaacc cgatctctt ctacceatc gaatcctgtc tagagccctc 840
 gaccgatcc cggaactgac caaagatggc cctcttgaca ttgtgcgca atgcgttggc 900
 caccgtctg gtagagaggg cggccccga gtagaattag agaagatccc cggcgttggc 960
 ttgtgtcc ataactatgg tgccccggt gctggttacc agtcctcta cgcatggct 1020
 gatgaagctg ttcttacgt cgaagagct ctactcgtc caaacctta g 1071
 <210> 6
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> *Trigonopsis variabilis*
 <400> 6

Met Ala Lys Ile Val Val Ile Gly Ala Gly Val Ala Gly Leu Thr Thr
1 5 10 15

Ala Leu Gln Leu Leu Arg Lys Gly His Glu Val Thr Ile Val Ser Glu
 20 25 30

Phe Thr Pro Gly Asp Leu Ser Ile Gly Tyr Thr Ser Pro Trp Ala Gly
 35 40 45

Ala Asn Trp Leu Ser Phe Tyr Asp Gly Gly Lys Leu Ala Asp Tyr Asp
 50 55 60

Ala Val Ser Tyr Pro Ile Leu Arg Glu Leu Ala Arg Ser Ser Pro Glu
65 70 75 80

Ala Gly Ile Arg Leu Ile Asn Gln Arg Ser His Val Leu Lys Arg Asp
 85 90 95

Leu Pro Lys Leu Glu Gly Ala Met Ser Ala Ile Cys Gln Arg Asn Pro
 100 105 110

Trp Phe Lys Asn Thr Val Asp Ser Phe Glu Ile Ile Glu Asp Arg Ser
 115 120 125

Arg Ile Val His Asp Asp Val Ala Tyr Leu Val Glu Phe Ala Ser Val
 130 135 140

Cys Ile His Thr Gly Val Tyr Leu Asn Trp Leu Met Ser Gln Cys Leu
145 150 155 160

Ser Leu Gly Ala Thr Val Val Lys Arg Arg Val Asn His Ile Lys Asp
 165 170 175

Ala Asn Phe Leu His Ser Ser Gly Ser Arg Pro Asp Val Ile Val Asn
 180 185 190

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

Met Tyr Pro Ile Arg Gly Gln Val Val Leu Val Arg Asn Ser Leu Pro
 210 215 220

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 正向引物 (forward primer for removing Amp^r gene from pRSET-A)

 <400> 9
 ctgtcagacc aagttactc atatatactt tag 33

<210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 反向引物 (reverse primer for removing Amp^r gene from pRSET-A)

 <400> 10
 actcttcctt ttcaatatt attgaagc 28

<210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 正向引物(forward primer for amplifying Kan^r gene from pET-28b)

 <400> 11
 atgagtcata ttcaacggga aac 23

<210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 反向引物 (reverse primer for amplifying Kan^r gene from pET-28b)

 <400> 12
 ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatg 27

<210> 13
 <211> 2852
 <212> DNA
 <213> Trigonopsis variabilis
 <400> 13
 gatctgatc ccgcgaaatt aatcagactc actatagga gaccacaacg gttccctct 60
 agaaataatt ttgttaact ttaagaagga gatatacata tgcggggttc tcatcatcat 120
 catcatcatg gtatggctag catgactggt ggacagcaaa tgggtcggga tctgtacgac 180

gatgacgata aggatcgatg gggatccgag ctcgagatct gcagctggta ccatggaatt 240
cgaagcttga tccggctgct aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg 300
ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggtttttgc 360
tgaaaggagg aactatatcc ggatctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc 420
ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atgggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag 480
cgcggcgggt gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca ctgccagcg ccctagcgcc 540
cgctccttc gctttctcc ctctcttct cgccacgttc gccggcttc cccgtaagc 600
tctaaatcgg gggctccctt tagggctccg atttagtct taccggcacc tcgaccccaa 660
aaaacttgat tagggatgag gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggttttcg 720
cccttgacg ttggagtcca cgttcttaa tagtggaactc ttgtccaaa ctggaacaac 780
actcaaccct atcgcggctc attctttga ttataaggg atttgcca ttcggccta 840
ttggtfaaaa aatgagctga ttaacaaat attaacgcg aatttaaca aaatattaac 900
gctfacaatt taggtggcac tttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatt 960
ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgctcaa 1020
taatattgaa aaaggaagag tatgagctat attcaacggg aaacgtctg ctctaggccg 1080
cgattaaatt ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc 1140
gggcaatcag gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatcgccc agagtgttt 1200
ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaac 1260
tggctgacgg aatttatgcc tctccgacc atcaagcatt ttatccgtac tctgatgat 1320
gcatggttac tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat 1380
cctgaltcag gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtgt tctgcgccc gttgcatcg 1440
attcctgttt gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc tcaggcgcaa 1500
tcacgaatga ataacggtt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg 1560
cctgttgaac aagtctggaa agaaatgcat aaactttgc cattctcacc ggattcagtc 1620
gtcactcatg gtgatttctc acttgataac cttattttg acgaggggaa attaataggt 1680
tgtattgatg ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg 1740
aactgcctcg gtgagtttc tcttcatta cagaaacggc ttttcaaaa atatggtatt 1800
gataatcctg atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaactg 1860

tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcatt ttaatttaa 1920
 aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt 1980
 tcgtccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 2040
 tttctgcgcg taactctgtg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 2100
 ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag 2160
 ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accactcaa gaactctgta 2220
 gcaccgccta catacctcgc tctgctaafc ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat 2280
 aagtcgtgtc ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg 2340
 ggctgaacgg ggggtctgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg 2400
 agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgctc ccgaaggag aaaggcggac 2460
 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgcga cgagggagct tccaggggga 2520
 aacgcctggt atcttiatag tctgtcggg ttcgccacc tctgacttga gcgtcgatt 2580
 ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta 2640
 cggttcttgg gcttttctg gccttttct cacatgttct ttctgcggtt atcccctgat 2700
 tctgtggata accgtattac gcctttgag tgagctgata ccgctcggc cagccgaacg 2760
 accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct 2820
 ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc ag 2852

<210> 14
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 外引物 (outer primer for amplifying a gene encoding D-amino acid oxidase)

<400> 14
 tagggctgac atatggctaa aatcgttgtt attg 34

<210> 15
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 外引物(outer primer for amplifying a gene encoding D-amino acid oxidase)

<400> 15
 tagggctgaa gatctctaaa ggtttgacg ag 32

<210> 16
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 正向内引物(inner forward primer for introducing a mutant of amino acid residue from Thr to Pro at position 53 of SEQ ID NO:2)

<400> 16
 gcaggtgccactggctcccgtttacgatggaggcaag 39

<210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 反向内引物(inner reverse primer)

<400> 17
 gagccagttgacacctgcccaagg 24

<210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 内引物 (inner forward primer for introducing a mutant of amino acid residue from Thr to Ser at position 53 of SEQ ID NO:2)

<400> 18
 gcaggtgccactggctcagctttacgatggaggcaag 39

图1 质粒 pRSET-kan 图谱

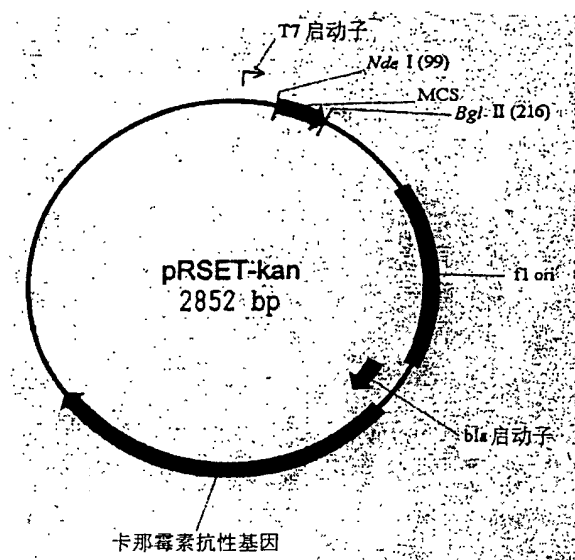


图2 质粒 pRSET-kan 序列

GATCTCGATCCC CGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAA
 ATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCATCATCATCATCATCAT
 GGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAG
 GATCGATGGGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGC
 TGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATA
 ACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGA
 TCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG
 CGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
 GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCA
 CGTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCT
 TTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGCTGATTAGGGTGTATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCT
 GATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTCCAA
 ACTGGAACAACACTCAACCCTATCGCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTGCCGATTTT
 GGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAATATTTAACGCGAATTTAACAAAATATTA
 ACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTT
 TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATT
 GAAAAAGGAAGAGTATGAGTCATATCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATT
 CCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGC
 GACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGT
 AGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTC
 TTCGACCATCAAGCATTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCC
 GGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGC
 TGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCTGTTTGTAAATGTCCTTTAACAGCGATCGC
 GTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTG
 ATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATT
 CTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTATTTTTGACGAGGGGA
 AATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTGCCAT
 CCTATGAACTGCCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTA
 TTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAACTGTCA
 GACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTA
 GGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAG
 CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTG
 CTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCA
 ACTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGT
 AGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAAT
 CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGA
 TAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTG
 GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTT
 CCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAC
 GAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGA
 CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC
 GCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCC
 CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAA
 CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCT
 CTCGCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG

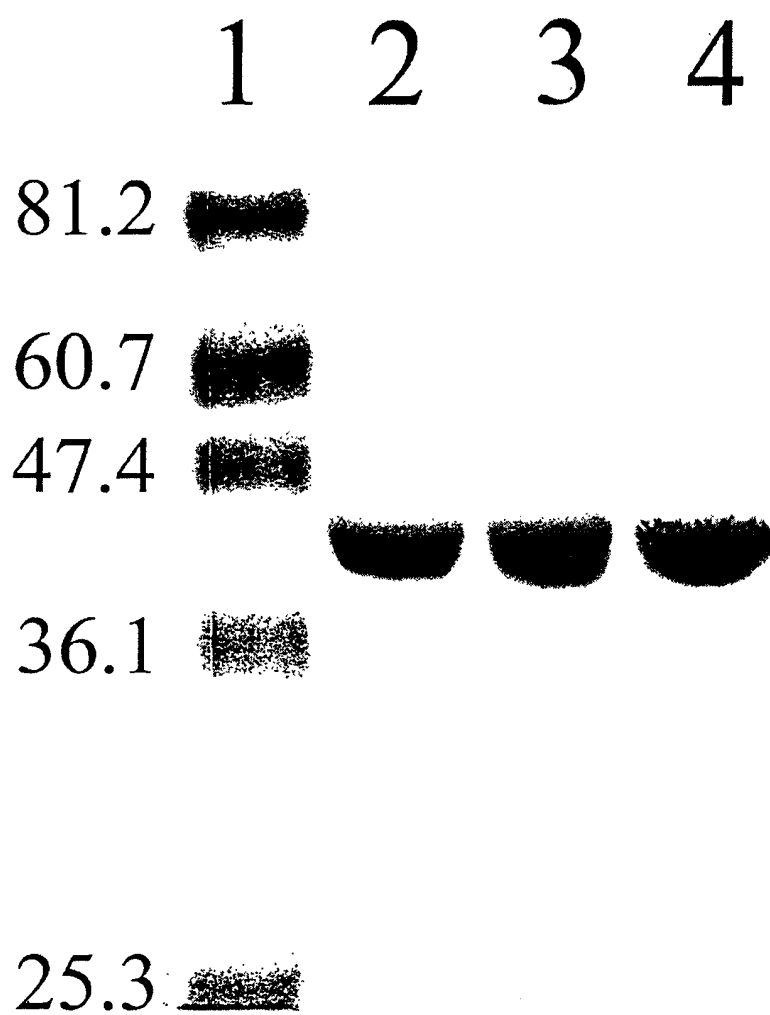


图3 重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 和重组 D-氨基酸氧化酶 GHB 的 SDS-PAGE 电泳图。