

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年11月4日 (04.11.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/217773 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/10 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/093528

(22) 国际申请日: 2020年5月29日 (29.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010353069.8 2020年4月29日 (29.04.2020) CN

(71) 申请人: 凯莱英医药集团(天津)股份有限公司 (ASYMCHEM LABORATORIES (TIANJIN) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国天津市经济技术开发区洞庭三街6号, Tianjin 300457 (CN)。

(72) 发明人: 洪浩 (HONG, Hao); 美国北卡罗莱纳州莫里斯威尔机场大道600号, North Carolina 27560 (US)。詹姆斯·盖吉 (JAMES, Gage); 美国北卡罗莱纳州莫里斯威尔机场大道600号, North Carolina 27560 (US)。肖毅 (XIAO, Yi); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。张娜 (ZHANG, Na); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。焦学成 (JIAO, Xuecheng); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。马玉磊 (MA, Yulei); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。牟慧艳 (MOU, Huiyan); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。曹珊 (CAO, Shan); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。

(74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P. C.); 中国北京

市海淀区知春路甲48号盈都大厦A座16层, Beijing 100098 (CN)。

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

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

本国际公布:

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

(54) Title: TRANSAMINASE MUTANT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 转氨酶突变体及其应用

(57) Abstract: Provided in the present invention are a transaminase mutant and use thereof. Compared with an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1, an amino acid sequence of the transaminase mutant comprises at least one of the following mutation sites: L166, K149, K146, A168, H73, F133, H82, E24, V194, T294, A295, G235 and F236. The mutant of the present invention has an improved catalytic activity for a transamination reaction of ketone substrates, and is suitable for industrial production of chiral amines.

(57) 摘要: 本发明提供了一种转氨酶突变体及其应用。其中, 该转氨酶突变体与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相比, 该转氨酶突变体的氨基酸序列包括如下至少一种突变位点: L166、K149、K146、A168、H73、F133、H82、E24、V194、T294、A295、G235及F236。本发明的突变体, 对酮类底物进行转氨反应的催化活性得到提高, 适用于手性胺的工业化生产。



WO 2021/217773 A1

转氨酶突变体及其应用

技术领域

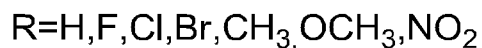
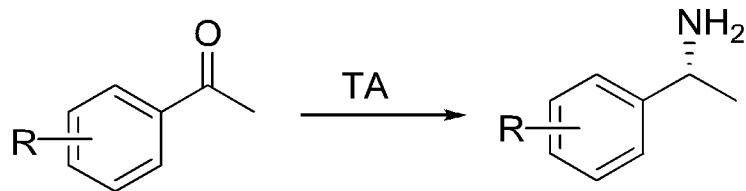
本发明涉及酶生产领域，具体而言，涉及一种转氨酶突变体及其应用。

背景技术

手性胺是许多重要生物活性分子的结构单元，是合成很多手性药物的关键中间体。有许多重要的神经类药物、心血管药物、抗高血压药物、抗感染药物等都是以手性胺作为中间体来进行合成的。手性胺的制备主要通过化学还原的方法实现，反应中存在反应条件苛刻、使用有毒的过渡态金属催化剂、产品立体选择性低等缺点。当前，在制药产业中利用生物催化法制备手性化合物应用广泛，具有广阔前景。

ω -转氨酶能够催化酮类底物，通过立体选择性地转氨基作用，高效制备手性胺。因其具有高选择性、高转化率及温和的反应条件等优点，受到研究人员的广泛关注。但在工业化应用时，大多数的野生转氨酶存在催化效率低、立体选择性差、稳定性弱等缺点，使得真正能够被应用的转氨酶并不多。

申请公开号为 CN107828751A 的发明专利申请公开了一种来源于 *Actinobacteria sp.* 的 ω -转氨酶突变体 L107I，该突变体可以高选择性的催化苯乙酮类化合物得到手性胺产品，反应如下：



但是其初始活性小于 10%，活性较低，反应时添加的酶量较多，后处理困难。

发明内容

本发明的主要目的在于提供一种转氨酶突变体及其应用，以解决现有的转氨酶不适合工业化生产的问题。

为了实现上述目的，根据本发明的一个方面，提供了一种转氨酶突变体，与 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列相比，该转氨酶突变体的氨基酸序列包括如下至少一个突变位点：L166、K149、K146、A168、H73、F133、H82、E24、V194、T294、A295、G235 及 F236。

进一步地，转氨酶突变体的氨基酸序列包括如下至少一个突变位点：L166I/V、K149Q/V/C/I/W/M/Y/H/L/F/R、K146R/M/A/P、A168M/V/I/S/P/F、H73T/N/C/Q/R/W/M/K/S、F133S/Q/M/R/A/D、H82S/Q/E/T/Y、E24V/S/A/F、V194I/S/A/H/N、T294Q/W/V/A/E/R/Y/F、A295S/Y/I/M/G、G235Y/H及F236I/T/P/M/V/D/S、Y9N、S132K、R145K/P/S/M/Y、L151R/M/A、T178M，“/”表示“或”；或者转氨酶突变体包括上述突变位点，且与具有突变位点的氨基酸序列有80%以上，优选90%以上，更优选95%以上同一性的氨基酸序列。

进一步地，转氨酶突变体的氨基酸序列具有如下表中的任一组合的突变位点：

L166I+A168I ^Δ	L166I+K146R+F133M ^Δ
L166I+A168V ^Δ	L166I+K146R+F133Q ^Δ
L166I+A168M ^Δ	L166I+K146R+F133D ^Δ
L166I+K149V ^Δ	L166I+K149Y+A168I+H73N ^Δ
L166I+K149C ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H ^Δ
L166V+A168M ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149L ^Δ
L166V+A168I ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149I ^Δ
L166V+A168V ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149V ^Δ
L166V+K149V ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149F ^Δ
L166V+K149C ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149M ^Δ
L166I+F133S+K149Q ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149Y ^Δ
L166I+F133S ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73T ^Δ
L166I+K146R ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73S ^Δ
L166I+K146M ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73N ^Δ
L166I+K146A ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73M ^Δ
L166I+K146R+A168I ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73Q ^Δ
L166I+K146R+A168S ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H ^Δ
L166I+K146R+A168P ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K ^Δ
L166I+K146R+A168F ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145S ^Δ
L166I+A168I+K149H ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145M ^Δ
L166I+A168I+K149Y ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145P ^Δ
L166I+A168I+H73N ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145Y ^Δ
L166I+A168I+K149H+R145K ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294A ^Δ
L166I+A168I+K149H+K146P ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294E ^Δ
L166I+K146R+F133S ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294R ^Δ
L166I+K146R+F133R ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294Y ^Δ
L166I+K146R+F133A ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294F ^Δ
L166I+K146R+F133S+K149Q ^Δ	

L166I+K146R+F133S+K149R
L166I+K146R+F133S+K149L
L166I+K146R+F133S+K149M
L166I+K146R+F133S+K149Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73Q
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73K
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73T
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73W
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194H
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194N
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Q
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82E
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82T
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24F
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151R
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295I
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295G
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294R
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294Q
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294W
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+G235Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+G235H
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236I
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236T
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236P
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236D

L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236S
L166I+K146P+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+Y9N
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+S132K
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+T178M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24V

为了实现上述目的，根据本发明的第二个方面，提供了一种 DNA 分子，该 DNA 分子编码上述任一种转氨酶突变体。

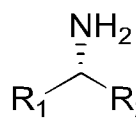
为了实现上述目的，根据本发明的第三个方面，提供了一种重组质粒，重组质粒连接有上述任一种 DNA 分子。

为了实现上述目的，根据本发明的第四个方面，提供了一种宿主细胞，宿主细胞含有上述任一种重组质粒。

进一步地，宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选原核细胞为大肠杆菌。

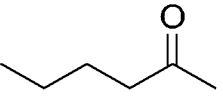
为了实现上述目的，根据本发明的第五个方面，提供了一种生产手性胺的方法，方法包

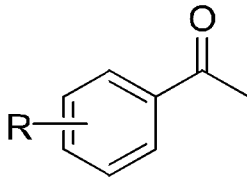
括：采用上述任一种转氨酶突变体催化酮类化合物 $\text{R}_1\text{C}(=\text{O})\text{R}_2$ 进行转氨反应，生成产物

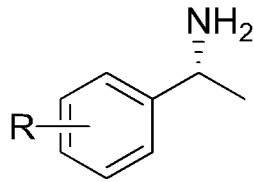


，其中， R_1 和 R_2 分别独立的表示任选取代或未被取代的烷基、任选取代或未被取代的芳烷基、或任选取代或未被取代的芳基， R_1 和 R_2 可单独或两者互相结合形成取代或未被取代的环。

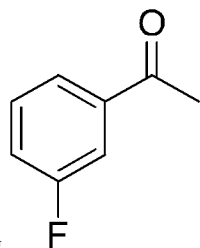
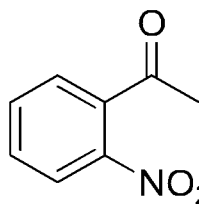
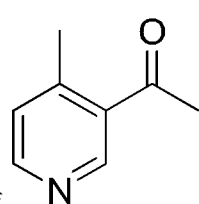
进一步地， R_1 和 R_2 为碳原子数为 1-20 的任选取代或未被取代的烷基、任选取代或未被取代的芳烷基、或任选取代或未被取代的芳基；优选的， R_1 和 R_2 为碳原子数 1-10 的任选取代或未被取代的烷基、任选取代或未被取代的芳烷基、或任选取代或未被取代的芳基；优选的，取代是指被卤素原子、氮原子、硫原子、羟基、硝基、氰基、甲氧基、乙氧基、羧基、羧甲基、羧乙基或亚甲二氧基取代。

进一步地，酮类化合物为 ，或者酮类化合物为苯环上任意位置被取代或

未被取代的苯乙酮类化合物，转氨酶突变体催化  进行转氨反应，生成产物



，R 表示苯环上任意位置被卤素、硝基、甲基或甲氧基取代；优选的，卤素为氟原子；更优选氟原子在苯环的间位取代； 优选的，硝基在苯环的邻位取代；优选的，

苯乙酮类化合物为 、 或 。

应用本发明的技术方案，本发明的突变体，对酮类底物进行转氨反应的催化活性得到提高，适用于手性胺的工业化生产。

具体实施方式

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

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

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

“序列同一性的百分比”是指多核苷酸序列或氨基酸序列之间的对比，并且通过跨比较窗比较两条最佳比对的序列来确定，其中，多核苷酸序列或氨基酸序列在比较窗中的部分与参考序列相比可以包括添加或缺失（即，空位），以用于两个序列的最佳比对。百分比可以如

下计算：通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目，以产生匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数目，并将结果乘以 100 以得到序列同一性的百分比。可选地，百分比可以如下计算：通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基或者核酸碱基或氨基酸残基与空位对齐的位置的数目，以产生匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数目，并将结果乘以 100 以得到序列同一性的百分比。其中，“参考序列”指用作序列比较的基础的指定序列。参考序列可以是更大序列的子集，例如，全长基因或多肽序列的区段。

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

酶的定向进化是一种蛋白质的非理性设计，人为创造特殊的进化条件，模拟自然进化机制，在体外改造基因，应用易错 PCR、DNA 改组（DNA shuffling）等技术，结合高效筛选系统获得具有预期特性的新酶。

为提高现有技术中的转氨酶的酶活性，减少酶的使用量，降低后处理的难度，本申请通过酶进化的方法对来源于 *Actinobacteria sp.* 的 ω -转氨酶突变体 L107I (SEQ ID NO:1) 进行进化。

来源于 *Actinobacteria sp.* 的 ω -转氨酶突变体 L107I (SEQ ID NO:1) 的序列如下：

MTISKDIDYSTSNLVSVPGAIREPTPAGSVIQYSDYELDESSPFAGGAAWIEGEYVPAA
EARISLFDTGFGHSDLTYTVAHVWHGNIFRLKDHIDRVFDGAQKLRIQSPLTKAEVEDITKR
CVSLSQLRESFVNITITRGYGARKGEKDLKLSQIYIYAIPYLWAFPPEEQIFGTSAIVPRHV
RRAGRNTVDPTVKNYQWGDLTAAASFEAKDRGARTAILLDADNCVAEGPGFNVMVKDGGK
LSSPSRNALPGITRLTVMEMADEMGIEFTLRDITSRELYEADELIAVTTAGGITPITSLDGEPL
GDGTPGPVTVAIRDRFWAMMDEPSSLVEAIEY。

以来源于 *Actinobacteria sp.* 的 ω -转氨酶突变体 L107I 为模板，设计了 17 对饱和突变引物（F133、L166、A295、A168、V80、T293、W167、G235、W203、F236、T294、K149、H73、Y78、K146、V194、R145），利用饱和突变手段，以 pET22b (+) 为表达载体，获得突变质粒。

饱和突变是通过对目的蛋白的编码基因进行改造，短时间内获取靶位点氨基酸分别被其它 19 种氨基酸替代的突变体的一种方法。此方法不仅是蛋白质定向改造的强有力工具，而且是蛋白质结构—功能关系研究的重要手段。饱和突变往往能获得比单点突变更为理想的进化体。而对于定点突变方法不能解决的这些问题，恰恰是饱和突变方法所擅长的独特之处。

在饱和突变获得活性提高的突变体基础上，可对有益的氨基酸位点进行组合，以获得性状更优的突变体。组合突变中双点突变的构建方法和单点突变的构建方法一样，采用全质粒 PCR 法构建。同时突变 2 个及以上位点的多点突变通过采用重叠延伸 PCR 扩增进行，获得含

多点突变的突变基因，两端经限制性内切酶酶切后，连接到表达载体上，转化至大肠杆菌细胞内，涂布于含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养皿中，37 $^{\circ}$ C 培养过夜，获得组合突变体，测序鉴定。

经饱和突变和组合突变获得的突变质粒转化至大肠杆菌细胞内，在大肠杆菌中表达。然后通过超声破碎细胞的方法获得粗酶液。转氨酶诱导表达的最佳条件：25 $^{\circ}$ C，0.2 mM IPTG 过夜诱导。

获得活性大幅提高的转氨酶突变体后，使用易错 PCR 的方法对其进行随机突变，构建高质量的突变体库，开发合适的高通量筛选方法，对文库进行筛选，获得活性进一步提高的突变体。

易错 PCR：意为易错条件下的 PCR，即容易使复制出的 DNA 序列出现错误的 PCR 技术，又称错配 PCR 或倾向错误 PCR。具体是指通过利用低保真度 TaqDNA 聚合酶和改变 PCR 反应条件，降低 DNA 复制的保真度，在新 DNA 链合成过程中增加碱基错配，从而使扩增产物出现较多点突变的一种体外诱导 DNA 序列变异的方法。

易错 PCR 是目前最简单、有效的基因体外随机诱变技术，其原理是：碱基的异构为错配提供了可能，组成 DNA 的 4 种碱基都有互变异构体存在，其中鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T）3 种含氧碱基有酮式和烯醇式两种互变异构体。腺嘌呤（A）和胸腺嘧啶两种含氮碱基，有胺式、亚胺式两种互变异构体。G、C 和 T 主要以酮式结构存在，烯醇式结构的比率极低，A 和 T 两种含氮碱基上的氮原子主要以氨基（NH₂）状态存在，以亚胺基（NH）状态存在的比率极低。不同同分异构体之间氢原子位置的不同及同一位置电子云偏离方向的不同，可使得碱基的配对形式发生改变，这样在复制后的子链上就可能出现错配。例如当胸腺嘧啶以酮式结构存在时，与腺嘌呤配对，而以烯醇式结构存在时，与鸟嘌呤配对，这样就出现了 A 能配上 C，T 能配上 G 的不稳定碱基对，从而造成错配。

在已知的几种耐热 DNA 聚合酶中，TaqDNA 聚合酶的错配率最高。Taq DNA 聚合酶是发现的耐热 DNA 聚合酶中活性最高的一种，具有 5'-3' 外切酶活性，不具 3'-5' 外切酶活性，因此在合成中对某些单核苷酸错配没有校正功能，所以比有 3'-5' 校对活性的 DNA 聚合酶发生错配的概率较高。DNA 聚合酶的保真性可以通过多种方法来降低，包括使用 4 种浓度不同 dNTP、添加 Mn²⁺、提高 Mg²⁺ 浓度等。几种诱变方法导致扩增 DNA 链碱基变异的机理各不相同。MnCl₂ 是 DNA 聚合酶的诱变因子，加入 Mn²⁺ 可以降低聚合酶对模板的特异性，提高错配率；4 种 dNTPs 浓度的不平衡可以提高碱基错误掺入的概率，实现错配；Mg²⁺ 具有激活 Taq 酶的作用，增加 Mg²⁺ 浓度，使之超过正常用量，能稳定非互补的碱基对；提高 Taq DNA 聚合酶用量、增加每个循环延伸时间，可以增加错配终端延伸的概率；降低起始模板浓度，会使后面 PCR 循环的变异模板比例增加。

因此，在上述研究结果的基础上，申请人提出了本申请的技术方案。在本申请一种典型的实施方式中，提供了一种转氨酶突变体，与 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列相比，该转氨

酶突变体的氨基酸序列包括如下至少一种突变位点：L166、K149、K146、A168、H73、F133、H82、E24、V194、T294、A295、G235 及 F236。本发明的突变体，对酮类底物进行转氨反应的催化活性得到提高，适用于手性胺的工业化生产。

在一种优选的实施例中，转氨酶突变体的氨基酸序列还包括如下突变位点之一：L166I/V、K149Q/V/C/I/W/M/Y/H/L/F/R、K146R/M/A/P、A168M/V/I/S/P/F、H73T/N/C/Q/R/W/M/K/S、F133S/Q/M/R/A/D、H82S/Q/E/T/Y、E24V/S/A/F、V194I/S/A/H/N、T294Q/W/V/A/E/R/Y/F、A295S/Y/I/M/G、G235Y/H 及 F236I/T/P/M/V/D/S、Y9N、S132K、R145K/P/S/M/Y、L151R/M/A、T178M，“/”表示“或”；或者所述转氨酶突变体含有上述突变位点，且与具有上述突变位点的氨基酸序列有 80%以上，优选 90%以上，更优选 95%以上同一性的氨基酸序列。上述转氨酶突变体可以进一步提高转氨反应的催化活性。

在一种更优选的实施例中，转氨酶突变体的氨基酸序列具有前述表中任一组合的突变位点。

在本申请第二种典型的实施方式中，提供了一种 DNA 分子，该 DNA 分子编码上述任一种转氨酶突变体。该 DNA 分子编码的上述转氨酶突变体对酮类底物具有很好的转氨基催化活性。

本发明的上述 DNA 分子还可以以“表达盒”的形式存在。“表达盒”是指线性或环状的核酸分子，涵盖了能够指导特定核苷酸序列在恰当宿主细胞中表达的 DNA 和 RNA 序列。一般而言，包括与目标核苷酸有效连接的启动子，其任选的是与终止信号和/或其他调控元件有效连接的。表达盒还可以包括核苷酸序列正确翻译所需的序列。编码区通常编码目标蛋白，但在正义或反义方向也编码目标功能 RNA，例如反义 RNA 或非翻译的 RNA。包含目标多核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的，意指至少一个其组分与其至少一个其他组分是异源的。表达盒还可以是天然存在的，但以用于异源表达的有效重组形成获得的。

在本申请第三种典型的实施方式中，提供一种重组质粒，该重组质粒含有上述任一种 DNA 分子。上述重组质粒中的 DNA 分子置于重组质粒的适当位置，使得上述 DNA 分子能够正确地、顺利地复制、转录或表达。

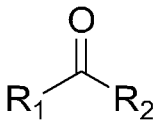
虽然本发明在限定上述 DNA 分子时所用限定语为“含有”，但其并不意味着可以在 DNA 序列的两端任意加入与其功能不相关的其他序列。本领域技术人员知晓，为了满足重组操作的要求，需要在 DNA 序列的两端添加合适的限制性内切酶的酶切位点，或者额外增加启动密码子、终止密码子等，因此，如果用封闭式的表述来限定将不能真实地覆盖这些情形。

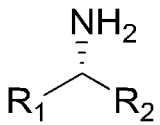
本发明中所使用的术语“质粒”包括双链或单链线状或环状形式的任何质粒、粘粒、噬菌体或农杆菌二元核酸分子，优选为重组表达质粒，可以是原核表达质粒也可以是真核表达质粒，但优选原核表达质粒，在某些实施方案中，重组质粒选自 pET-22a (+)、pET-22b (+)、pET-3a (+)、pET-3d (+)、pET-11a (+)、pET-12a (+)、pET-14b (+)、pET-15b (+)、pET-16b (+)、pET-17b (+)、pET-19b (+)、pET-20b (+)、pET-21a (+)、pET-23a (+)、pET-23b (+)、pET-24a

(+)、pET-25b (+)、pET-26b (+)、pET-27b (+)、pET-28a (+)、pET-29a (+)、pET-30a (+)、pET-31b (+)、pET-32a (+)、pET-35b (+)、pET-38b (+)、pET-39b (+)、pET-40b (+)、pET-41a (+)、pET-41b (+)、pET-42a (+)、pET-43a (+)、pET-43b (+)、pET-44a (+)、pET-49b (+)、pQE2、pQE9、pQE30、pQE31、pQE32、pQE40、pQE70、pQE80、pRSET-A、pRSET-B、pRSET-C、pGEX-5X-1、pGEX-6p-1、pGEX-6p-2、pBV220、pBV221、pBV222、pTrc99A、pTwin1、pEZZ18、pKK232-18、pUC-18 或 pUC-19。更优选，上述重组质粒是 pET-22b (+)。

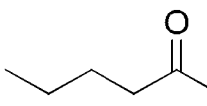
在本申请第四种典型的实施方式中，提供了一种宿主细胞，该宿主细胞含有上述任一种重组质粒。适用于本发明的宿主细胞包括但不限于原核细胞、酵母或真核细胞。优选原核细胞为真细菌，例如革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌。更优选原核细胞为大肠杆菌 BL21 细胞或大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

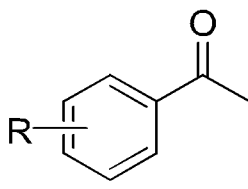
在本申请第五种典型的实施方式中，提供一种生产手性胺的方法，该方法包括：采用上

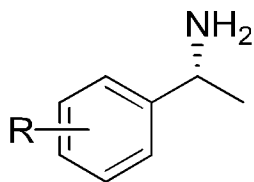
述任一种转氨酶突变体催化酮类化合物  进行转氨反应，生成手性胺化合物

，其中，R₁ 和 R₂ 分别独立的表示任选取代或未被取代的烷基、任选取代或未被取代的芳烷基、或任选取代或未被取代的芳基，R₁ 和 R₂ 可单独或两者互相结合形成取代或未被取代的环。

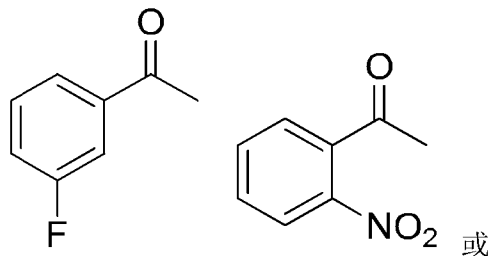
在一种优选的实施例中，R₁ 和 R₂ 为碳原子数为 1-20 的任选取代或未被取代的烷基、任选取代或未被取代的芳烷基、或任选取代或未被取代的芳基；优选的，R₁ 和 R₂ 为碳原子数 1-10 的任选取代或未被取代的烷基、任选取代或未被取代的芳烷基、或任选取代或未被取代的芳基；优选的，取代是指被卤素原子、氮原子、硫原子、羟基、硝基、氰基、甲氧基、乙氧基、羧基、羧甲基、羧乙基或亚甲二氧基取代。

在一种更优选的实施例中，酮类化合物为为 ，或者为苯环上任意位置被

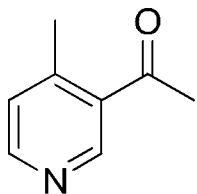
取代或未被取代的苯乙酮类化合物，转氨酶突变体催化  进行转氨反应，生



成产物，R 表示苯环上任意位置被卤素、硝基、甲基或甲氧基取代；优选的，卤素为氟原子；更优选氟原子在苯环的间位取代；优选的，硝基在苯环的邻位取代；



在一种更优选的实施例中，苯乙酮类化合物为

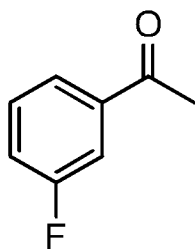


，本申请的转氨酶突变体对上述两种苯乙酮类化合物的催化活性最高。

下面将结合具体的实施例来进一步说明本申请的有益效果。

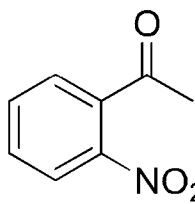
下述实施例提到的原料为：

原料 1：



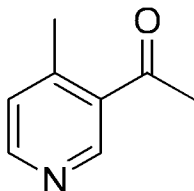
3'-氟苯乙酮 3'-Fluoroacetophenone: CasNo:455-36-7。

原料 2：



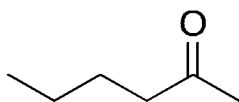
邻硝基苯乙酮 2'-Nitroacetophenone CasNo:577-59-3。

原料 3：



3-乙酰基-4-甲基吡 3-Acetyl-4-methylpyridine CasNo: 51227-30-6。

原料 4:



2-己酮 2-Hexanone CasNo: 591-78-6

实施例 1

5 mL 的反应瓶中分别加入 30 mg 原料 1、原料 2、原料 3 和原料 4，加入 pH 8.5 的 Tris-Cl (0.1 M)，181 μ L 的异丙胺盐酸盐 (6 M)，0.9 mg 的 PLP，加入转氨酶 300mg (具体见表 1)，混匀，总体积 1500 μ L，于 30 $^{\circ}$ C，200 rpm 摇床反应 16h。反应结束后，向反应体系中加 2 倍体积的甲醇，混匀，12000 rpm，离心 3 min，取上清，HPLC 检测，波长 210nm。部分突变体反应特性如下：

表 1:

突变体	活性			
	原料 1	原料 2	原料 3	原料 4
母本	-	-	-	-
L166I	+	+	+	+
L166V	+	+	+	+
K149Q	+	+	+	+
K149V	+	+	+	+
K149C	+	+	+	+
K149I	+	+	+	+
K149W	+	+	+	+
K146R	+	+	+	+
K146M	+	+	+	+
K146A	+	+	+	+
A168M	+	+	+	+
A168V	+	+	+	+
A168I	+	+	+	+
H73T	+	+	+	+
H73N	+	+	+	+
H73C	+	+	+	+
H73Q	+	+	+	+
F133S	+	+	+	+
F133Q	+	+	+	+
F133M	+	+	+	+

上表中，母本为突变体 SEQ ID NO:1；酶对底物转化率的高低用活性来表示，-表示母本的初始活性，活性提高的倍数用+表示，+表示提高 1-5 倍，++表示提高 5-10 倍。

由表 1 的结果可以看出，单点突变体的转化效果较母本有所提高，但并未达到最理想的效果。对有益突变位点进行组合，可进一步提高突变体活性。

实施例 2:

5 mL 的反应瓶中分别加入 30 mg 原料 1、原料 2、原料 3 和原料 4，加入 pH 8.5 的 Tris-Cl (0.1 M)，181 μ L 的异丙胺盐酸盐 (6 M)，0.9 mg 的 PLP，加入转氨酶 210mg (具体见表 2)，混匀，总体积 1500 μ L，于 30 $^{\circ}$ C，200 rpm 摇床反应 16h。反应结束后，向反应体系中加 2 倍体积的甲醇，混匀，12000 rpm，离心 3 min，取上清，HPLC 检测，波长 210nm。部分突变体反应特性如下：

表 2:

突变体	活性			
	原料 1	原料 2	原料 3	原料 4
母本	-	-	-	-
L166I+A168I	++	++	+	++
L166I+A168V	+	+	+	++
L166I+A168M	++	+	++	+
L166I+K149V	+	+	+	++
L166I+K149C	++	++	+	++
L166V+A168M	+	+	++	++
L166V+A168I	+	++	+	+
L166V+A168V	+	+	++	+
L166V+K149V	++	+	++	++
L166V+K149C	+	++	++	++
L166I+F133S+K149Q	++	++	++	++
L166I+F133S	+	+	++	+
L166I+K146R	++	+	++	++
L166I+K146M	+	+	+	++
L166I+K146A	++	++	+	+

上述母本为突变体 SEQ ID NO:1; 酶对底物转化率的高低用活性来表示, -表示母本的初始活性, 活性提高的倍数用+表示, +表示提高 1-5 倍, ++表示提高 5-10 倍。

由表 2 结果可以看出, 突变体活性进一步提高, 但仍未达到最佳的效果。可通过迭代饱和和突变的进化方法, 叠加活性提高的突变位点, 避免进化过程中, 进化结果只限于局部最高点而不能到达全局最高点, 获得活性提高的突变体。

实施例 3

5 mL 的反应瓶中分别加入 30 mg 原料 1、原料 2、原料 3 和原料 4, 加入 pH 8.5 的 Tris-Cl (0.1 M), 181 μ L 的异丙胺盐酸盐 (6 M), 0.9 mg 的 PLP, 加入转氨酶 60mg (具体见表 3), 混匀, 总体积 900 μ L, 于 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm 摇床反应 16h。反应结束后, 向反应体系中加 2 倍体积的甲醇, 混匀, 12000 rpm, 离心 3 min, 取上清, HPLC 检测, 波长 210nm。部分突变体反应特性如下:

表 3:

突变体	活性			
	原料 1	原料 2	原料 3	原料 4
母本	-	-	-	-
L166I+K146R+A168I	++	+++	+++	++++
L166I+K146R+A168S	+++	++	++	++++
L166I+K146R+A168P	+++	+++	++	++++
L166I+K146R+A168F	+++	++	+++	++
L166I+A168I+K149H	+++	++	+++	++
L166I+A168I+K149Y	+++	++	+++	++
L166I+A168I+H73N	+++	++	+++	++
L166I+A168I+K149H+R145K	++++	++++	++++	+++
L166I+A168I+K149H+K146P	+++	+++	++++	++++
L166I+A168I+K149Y+H73N	++++	++++	++++	+++
L166I+K146R+A168I+K149H	+++	+++	++++	++
L166I+K146R+A168I+K149L	++++	+++	+++	++++
L166I+K146R+A168I+K149I	+++	++++	++++	+++
L166I+K146R+A168I+K149V	+++	+++	++++	++++
L166I+K146R+A168I+K149F	++	+++	+++	++++
L166I+K146R+A168I+K149M	+++	++	++++	+++
L166I+K146R+A168I+K149Y	++++	++++	+++	+++
L166I+K146R+A168I+H73T	++	+++	+++	++++
L166I+K146R+A168I+H73S	+++	+++	++++	+++
L166I+K146R+A168I+H73N	+++	+++	++	++++
L166I+K146R+A168I+H73M	+++	+++	++++	+++
L166I+K146R+A168I+H73Q	++++	+++	+++	++++
L166I+K146R+A168I+K149H	++++	+++	+++	++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145K	++++	++++	+++	+++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145S	+++	+++	++++	++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145M	+++	+++	++	+++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145P	+++	+++	++++	++++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145Y	++++	+++	+++	++++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294A	++++	+++	+++	+++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294E	++++	++++	++++	+++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294R	++	+++	++++	++++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294Y	+++	++	+++	++++
L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294F	++	++	++++	+++

上述母本为突变体 SEQ ID NO:1；酶对底物转化率的高低用活性来表示，-表示母本的初始活性，活性提高的倍数用+表示，+表示提高 1-5 倍，++表示提高 5-10 倍，+++表示提高 10-20 倍，++++表示提高 20-30 倍。

实施例 4

5 mL 的反应瓶分别中加入 30 mg 原料 1、原料 2、原料 3 和原料 4，加入 pH 8.5 的 Tris-Cl (0.1 M)，181 μ L 的异丙胺盐酸盐 (6 M)，0.9 mg 的 PLP，加入转氨酶 60mg (具体见表 4)，混匀，总体积 900 μ L，于 30 $^{\circ}$ C，200 rpm 摇床反应 16h。反应结束后，向反应体系中加 2 倍体积的甲醇，混匀，12000 rpm，离心 3 min，取上清，HPLC 检测，波长 210nm。部分突变体反应特性如下：

表 4：

突变体	活性			
	原料 1	原料 2	原料 3	原料 4
母本	-	-	-	-
L166I+K146R+F133S	+++	++	+++	++
L166I+K146R+F133R	++	++	++	+++
L166I+K146R+F133A	++	+++	++	++
L166I+K146R+F133M	++	++	+++	+++
L166I+K146R+F133Q	++	+++	+++	+++
L166I+K146R+F133D	+++	++	+++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q	++++	++++	++++	+++
L166I+K146R+F133S+K149R	++	++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149L	++	++	++	++
L166I+K146R+F133S+K149M	++	++	++	++
L166I+K146R+F133S+K149Y	+++	++	+++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R	++++	++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73Q	++++	++	++++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73K	+++	+++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73T	+++	+++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73S	++	+++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73W	+++	++	++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I	++	++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194S	++++	++++	++++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194A	++	++	+++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194H	+++	+++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194N	+++	+++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S	++++	++++	++++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Q	+++	++	+++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82E	+++	++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82T	+++	++	+++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Y	+++	++	+++	++

L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V	+++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24S	+++	++	++++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24A	+++	++	++++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24F	+++	++	++++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151R	+++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151M	+++	++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151A	+++	+++	++++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295S	+++	++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295Y	++++	++++	++++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295I	++++	++	++++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295M	+++	+++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295G	+++	++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294A	+++	++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294R	+++	++	++++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294Q	+++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294W	+++	++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294V	+++	+++	+++	+++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+G235Y	+++	++	+++	++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+G235H	+++	++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236I	++++	++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236T	+++++	+++	++++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236P	+++	+++	++++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236M	++++	+++++	+++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236V	++++	++++	++++	++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236D	++++	++++	++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236S	++++	++++	++++	++++

上述母本为突变体 SEQ ID NO:1；酶对底物转化率的高低用活性来表示，-表示母本的初始活性，活性提高的倍数用+表示，+表示提高 1-5 倍，++表示提高 5-10 倍，+++表示提高 10-20 倍，++++表示提高 20-30 倍，+++++表示提高 30-50 倍，++++++表示提高大于 50 倍。

由表 4 结果可以看出，运用迭代饱和突变使得突变体活性大幅提高。下一步可继续通过随机突变（易错 PCR），进一步提高突变体活性，得到可用于工业生产的最终突变体。

实施例 5

5 mL 的反应瓶中分别加入 30 mg 原料 1、原料 2、原料 3 和原料 4，加入 pH 8.5 的 Tris-Cl (0.1 M)，181 μ L 的异丙胺盐酸盐 (6 M)，0.9 mg 的 PLP，加入转氨酶 30mg（具体见表 5），混匀，总体积 900 μ L，于 30 $^{\circ}$ C，200 rpm 摇床反应 16h。反应结束后，向反应体系中加 2 倍体积的甲醇，混匀，12000 rpm，离心 3 min，取上清，HPLC 检测，波长 210nm。部分突变体反应特性如下：

表 5：

突变体	活性			
	原料 1	原料 2	原料 3	原料 4
母本	-	-	-	-
L166I+K146P+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S	+++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+Y9N	+++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24V	+++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+S132K	++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+T178M	+++++	+++++	+++++	+++++
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24A	+++++	+++++	+++++	+++++

上述母本为突变体 SEQ ID NO:1；酶对底物转化率的高低用活性来表示，-表示母本的初始活性，活性提高的倍数用+表示，+表示提高 1-5 倍，++表示提高 5-10 倍，+++表示提高 10-20 倍，++++表示提高 20-30 倍，+++++表示提高 30-50 倍，++++++表示提高大于 50 倍。

实施例 6

5 mL 的反应瓶中分别加入 30 mg 原料 1、原料 2、原料 3 和原料 4，加入 pH 8.5 的 Tris-Cl (0.1 M)，181 μ L 的异丙胺盐酸盐 (6 M)，0.9 mg 的 PLP，加入转氨酶 30mg (具体见表 6)，混匀，总体积 900 μ L，于 30 $^{\circ}$ C，200 rpm 摇床反应 16h。反应结束后，向反应体系中加入 2 mL 乙酸乙酯，12000 rpm，离心 3 min，进行萃取，取上清，HPLC 检测 ee 值。突变体反应特性如下：

表 6:

突变体	ee (%)			
	原料 1	原料 2	原料 3	原料 4
L166I+K146R+F133S	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+A168I+K149H	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73Q	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73K	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73T	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151R	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Q	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24V	>99.5	>99.5	>99.5	>99.5

实施例 7

2 L 的反应瓶中分别加入 20 g 原料 1 和原料 2, 加入 pH 8.5 的 Tris-Cl (0.1 M), 120 mL 的异丙胺盐酸盐 (6 M), 0.6 g 的 PLP, 加入转氨酶 20 g (具体见表 6), 混匀, 总体积 600 mL, 于 30°C, 200 rpm 摇床反应 16h。反应结束后, 向反应体系中加入 600 mL 乙酸乙酯, 12000 rpm, 离心 3 min, 进行萃取。样品经过后处理, HPLC 检测, 测定收率、纯度及 ee 值。

表 7:

突变体	原料 1			原料 2		
	收率 (%)	纯度 (%)	ee (%)	收率 (%)	纯度 (%)	ee (%)
L166I+K146R+F133S	>70	>99	>99.5	>70	>99	>99.5
L166I+K146R+A168I+K149H	>80	>99	>99.5	>80	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q	>70	>99	>99.5	>70	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R	>70	>99	>99.5	>70	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73Q	>70	>99	>99.5	>70	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73K	>70	>99	>99.5	>70	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73T	>70	>99	>99.5	>70	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I	>70	>99	>99.5	>70	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S	>90	>99	>99.5	>90	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151R	>90	>99	>99.5	>90	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Q	>90	>99	>99.5	>90	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V	>90	>99	>99.5	>90	>99	>99.5
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24V	>90	>99	>99.5	>90	>99	>99.5

从以上的描述中, 可以看出, 本发明上述的实施例实现了如下技术效果: 本申请通过理性设计和随机突变相结合的方法对已有的还原酶突变体的蛋白进行理性改造, 并对获得的突变体使用本申请的底物酮进行催化活力和立体选择性筛选, 最终获得了高选择性和高活力的突变体菌株, 将含有这些突变体的菌株应用于本申请所述的酮类底物的催化还原反应中, 能够提高其相应的手性醇类化合物的生成效率。

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

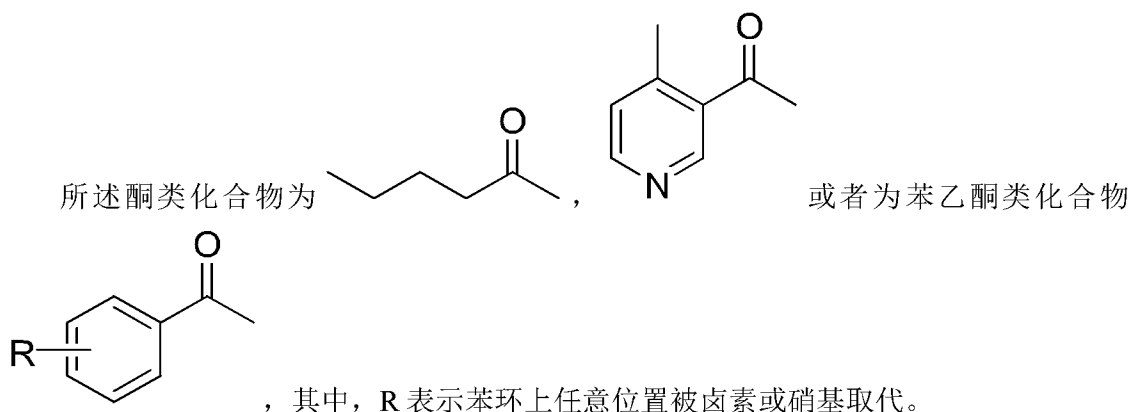
1. 一种转氨酶突变体，其特征在于，所述转氨酶突变体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列相比，在如下任一个位点发生突变：L166I/V、K149Q/V/C/I/W、K146R/M/A、A168M/V/I、H73T/N/C/Q、F133S/Q/M，“/”表示“或”；或者在如下任一组合位点发生突变：

L166I+A168I ^Δ	L166I+K146R+F133M ^Δ
L166I+A168V ^Δ	L166I+K146R+F133Q ^Δ
L166I+A168M ^Δ	L166I+K146R+F133D ^Δ
L166I+K149V ^Δ	L166I+K149Y+A168I+H73N ^Δ
L166I+K149C ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H ^Δ
L166V+A168M ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149L ^Δ
L166V+A168I ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149I ^Δ
L166V+A168V ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149V ^Δ
L166V+K149V ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149F ^Δ
L166V+K149C ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149M ^Δ
L166I+F133S+K149Q ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149Y ^Δ
L166I+F133S ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73T ^Δ
L166I+K146R ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73S ^Δ
L166I+K146M ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73N ^Δ
L166I+K146A ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73M ^Δ
L166I+K146R+A168I ^Δ	L166I+K146R+A168I+H73Q ^Δ
L166I+K146R+A168S ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H ^Δ
L166I+K146R+A168P ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K ^Δ
L166I+K146R+A168F ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145S ^Δ
L166I+A168I+K149H ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145M ^Δ
L166I+A168I+K149Y ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145P ^Δ
L166I+A168I+H73N ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145Y ^Δ
L166I+A168I+K149H+R145K ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294A ^Δ
L166I+A168I+K149H+K146P ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294E ^Δ
L166I+K146R+F133S ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294R ^Δ
L166I+K146R+F133R ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294Y ^Δ
L166I+K146R+F133A ^Δ	L166I+K146R+A168I+K149H+R145K+T294F ^Δ
L166I+K146R+F133S+K149Q ^Δ	

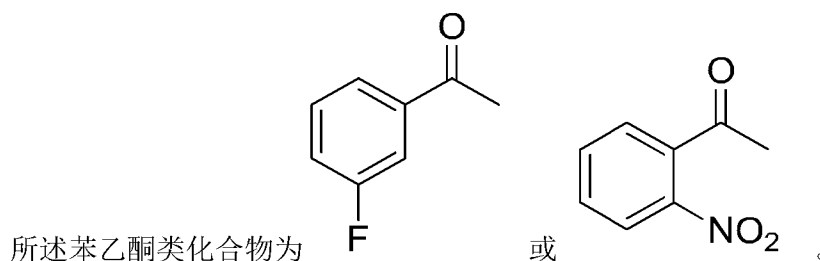
L166I+K146R+F133S+K149R
L166I+K146R+F133S+K149L
L166I+K146R+F133S+K149M
L166I+K146R+F133S+K149Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73Q
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73K
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73T
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73W
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194H
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194N
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Q
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82E
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82T
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24F
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151R
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+L151A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295I
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+A295G
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294R
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294Q
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294W
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+T294V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+G235Y
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+G235H
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236I
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236T
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236P
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236D

L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+E24V+F236S
L166I+K146P+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+Y9N
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24V
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+S132K
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+T178M
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24A
L166I+K146R+F133S+K149Q+H73R+V194I+H82S+E24V

2. 一种 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子编码权利要求 1 所述的转氨酶突变体。
3. 一种重组质粒，其特征在于，所述重组质粒连接有权利要求 2 所述的 DNA 分子。
4. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求 3 所述的重组质粒。
5. 根据权利要求 4 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；所述原核细胞为大肠杆菌。
6. 一种生产手性胺的方法，其特征在于，所述方法包括：采用权利要求 1 所述的转氨酶突变体催化酮类化合物进行转氨反应生成产物，



7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，
所述卤素为氟原子。
8. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/093528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; EPTXT; USTXT; WEB OF SCIENCE; PUBMED; CNKI; 百度学术搜索; BAIDU XUESHU SEARCH; 转氨酶, 氨基转移酶, 放线菌, 突变体, 手性胺, transaminase, aminotransferase, Actinobacteria, mutant, variant, chiral amine, Leu166, L166I, L166V, 发明人等; inventors etc.; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统; GenBank+EMBL+CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM; 对SEQ ID NO: 1及其基础上发生L166I/V突变的序列检索. Sequence search on SEQ ID NO: 1 and the L166I/V mutation occurring on the basis thereof.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107828751 A (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD.) 23 March 2018 (2018-03-23) see the abstract, description, page 3, paragraphs 18-22, embodiment 2, and figures 1-3	1-8 (in part)
A	CN 107805648 A (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD.) 16 March 2018 (2018-03-16) see the abstract, embodiments 4 and 5, and SEQ ID NOs: 7 and 8	1-8 (in part)
A	CN 108823179 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 16 November 2018 (2018-11-16) see the abstract, embodiments 1 and 2, figure 1, and SEQ ID NO:2	1-8 (in part)
A	TANG, X. L. et al. "Efficient Biosynthesis of (R)-3-amino-1-butanol by a Novel (R)-selective Transaminase from Actinobacteria sp." <i>Journal of Biotechnology</i> , Vol. 295, 10 April 2019 (2019-04-10), ISSN: 0168-1656, pp. 49-54, see entire document	1-8 (in part)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 January 2021		Date of mailing of the international search report 03 February 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

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

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: Claims 1-8 (in part), set forth a transaminase mutant and related subject matter, said transaminase mutant being relative to SEQ ID NO: L166I/V mutations in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1, or mutations in other loci listed in the table in claim 1 in combination with mutations in that locus.
- [2] Invention 2: Claims 1-8 (in part), set forth a transaminase mutant and related subject matter, said transaminase mutant being relative to SEQ ID NO: K149Q/V/C/I/W mutations in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1, or mutations in other loci listed in the table in claim 1 in combination with mutations in that locus.
- [3] Invention 3: Claims 1-8 (in part), set forth a transaminase mutant and related subject matter, said transaminase mutant being relative to SEQ ID NO: K146R/M/A mutations in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1, or mutations in other loci listed in the table in claim 1 in combination with mutations in that locus.
- [4] Invention 4: Claims 1-8 (in part), set forth a transaminase mutant and related subject matter, said transaminase mutant being relative to SEQ ID NO: A168M/V/I mutations in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1, or mutations in other loci listed in the table in claim 1 in combination with mutations in that locus.
- [5] Invention 5: Claims 1-8 (in part), set forth a transaminase mutant and related subject matter, said transaminase mutant being relative to SEQ ID NO: H73T/N/C/Q mutations in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1, or mutations in other loci listed in the table in claim 1 in combination with mutations in that locus.
- [6] Invention 6: Claims 1-8 (in part), set forth a transaminase mutant and related subject matter, said transaminase mutant being relative to SEQ ID NO: F133S/Q/M mutations in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1, or mutations in other loci listed in the table in claim 1 in combination with mutations in that locus.
- [7] The same or corresponding technical feature among inventions 1-6 is that the transaminase mutants on which they are based are those described in SEQ ID NO: The amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 is based on a locus mutation and thus has improved transaminase activity, however the prior art document (CN107828751A (23.03.2018), see specification page 3, paragraphs 18-22, embodiment 2, tables 1-3, SEQ ID NO: (3) discloses the sequence relative to the present application SEQ ID NO: 1 There exists a transaminase mutant with the A295G mutation, which also has increased transaminase activity. Therefore, the same or corresponding technical feature among the above six inventions does not make a contribution over the prior art and cannot be considered as specific technical features in the sense of PCT Rule 13.2, and therefore this application does not comply with PCT Rule 13.1.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-8 (in part), relate to transaminase mutants in which the L166I/V mutation occurs and related subject matter.**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/093528

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107828751	A	23 March 2018	None			
CN	107805648	A	16 March 2018	None			
CN	108823179	A	16 November 2018	CN	108823179	B	09 October 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/093528

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;VEN;WOTXT;EPTXT;USTXT;WEB OF SCIENCE;PUBMED;CNKI;百度学术搜索:转氨酶, 氨基转移酶, 放线菌, 突变体, 手性胺, transaminase, aminotransferase, Actinobacteria, mutant, variant, chiral amine, Leu166, L166I, L166V, 发明人等; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NO:1及其基础上发生L166I/V突变的序列检索。</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 107828751 A (凯莱英生命科学技术天津有限公司) 2018年 3月 23日 (2018 - 03 - 23) 参见摘要, 说明书第3页第18-22段, 实施例2和表1-3</td> <td>1-8 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107805648 A (凯莱英生命科学技术天津有限公司) 2018年 3月 16日 (2018 - 03 - 16) 参见摘要, 实施例4-5, SEQ ID NOs:7-8</td> <td>1-8 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108823179 A (浙江工业大学) 2018年 11月 16日 (2018 - 11 - 16) 参见摘要, 实施例1-2, 附图1, SEQ ID NO:2</td> <td>1-8 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>TANG, X.L. 等. "efficient biosynthesis of (R)-3-amino-1-butanol by a novel (R)-selective transaminase from Actinobacteria sp." Journal of Biotechnology, 第295卷, 2019年 4月 10日 (2019 - 04 - 10), ISSN: 0168-1656, 第49-54页, 参见全文</td> <td>1-8 (部分)</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 107828751 A (凯莱英生命科学技术天津有限公司) 2018年 3月 23日 (2018 - 03 - 23) 参见摘要, 说明书第3页第18-22段, 实施例2和表1-3	1-8 (部分)	A	CN 107805648 A (凯莱英生命科学技术天津有限公司) 2018年 3月 16日 (2018 - 03 - 16) 参见摘要, 实施例4-5, SEQ ID NOs:7-8	1-8 (部分)	A	CN 108823179 A (浙江工业大学) 2018年 11月 16日 (2018 - 11 - 16) 参见摘要, 实施例1-2, 附图1, SEQ ID NO:2	1-8 (部分)	A	TANG, X.L. 等. "efficient biosynthesis of (R)-3-amino-1-butanol by a novel (R)-selective transaminase from Actinobacteria sp." Journal of Biotechnology, 第295卷, 2019年 4月 10日 (2019 - 04 - 10), ISSN: 0168-1656, 第49-54页, 参见全文	1-8 (部分)
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 107828751 A (凯莱英生命科学技术天津有限公司) 2018年 3月 23日 (2018 - 03 - 23) 参见摘要, 说明书第3页第18-22段, 实施例2和表1-3	1-8 (部分)															
A	CN 107805648 A (凯莱英生命科学技术天津有限公司) 2018年 3月 16日 (2018 - 03 - 16) 参见摘要, 实施例4-5, SEQ ID NOs:7-8	1-8 (部分)															
A	CN 108823179 A (浙江工业大学) 2018年 11月 16日 (2018 - 11 - 16) 参见摘要, 实施例1-2, 附图1, SEQ ID NO:2	1-8 (部分)															
A	TANG, X.L. 等. "efficient biosynthesis of (R)-3-amino-1-butanol by a novel (R)-selective transaminase from Actinobacteria sp." Journal of Biotechnology, 第295卷, 2019年 4月 10日 (2019 - 04 - 10), ISSN: 0168-1656, 第49-54页, 参见全文	1-8 (部分)															
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。															
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>		<p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>															
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 1月 26日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 2月 3日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>周霞</p> <p>电话号码 86-10-62411098</p>															

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 发明1: 权利要求1-8(部分), 请求保护一种转氨酶突变体及相关主题, 所述转氨酶突变体相对于SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列发生L166I/V突变, 或者在该位点突变基础上还组合了权利要求1中表格所列其它位点的突变;
- [2] 发明2: 权利要求1-8(部分), 请求保护一种转氨酶突变体及相关主题, 所述转氨酶突变体相对于SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列发生K149Q/V/C/I/W突变, 或者在该位点突变基础上还组合了权利要求1中表格所列其它位点的突变;
- [3] 发明3: 权利要求1-8(部分), 请求保护一种转氨酶突变体及相关主题, 所述转氨酶突变体相对于SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列发生K146R/M/A突变, 或者在该位点突变基础上还组合了权利要求1中表格所列其它位点的突变;
- [4] 发明4: 权利要求1-8(部分), 请求保护一种转氨酶突变体及相关主题, 所述转氨酶突变体相对于SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列发生A168M/V/I突变, 或者在该位点突变基础上还组合了权利要求1中表格所列其它位点的突变;
- [5] 发明5: 权利要求1-8(部分), 请求保护一种转氨酶突变体及相关主题, 所述转氨酶突变体相对于SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列发生H73T/N/C/Q突变, 或者在该位点突变基础上还组合了权利要求1中表格所列其它位点的突变;
- [6] 发明6: 权利要求1-8(部分), 请求保护一种转氨酶突变体及相关主题, 所述转氨酶突变体相对于SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列发生F133S/Q/M突变, 或者在该位点突变基础上还组合了权利要求1中表格所列其它位点的突变。
- [7] 发明1-6之间相同或相应的技术特征在于所基于的转氨酶突变体是在SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的基础上发生了位点突变, 从而具有提高的转氨酶活性, 然而现有技术文件(CN107828751A(23.03.2018), 参见说明书第3页第18-22段, 实施例2, 表1-3, SEQ ID NO: 3)公开了序列相对于本申请SEQ ID NO: 1存在A295G突变的转氨酶突变体, 该突变体也具有提高的转氨酶活性, 因此, 上述6项发明之间相同或相应的技术特征没有对现有技术作出贡献, 不能被看作是PCT实施细则13.2意义上的特定技术特征, 因此本申请不符合PCT实施细则13.1的规定。

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是: 权利要求1-8(部分), 涉及发生L166I/V突变的转氨酶突变体及相关主题。

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/093528

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	107828751	A	2018年 3月 23日	无	
CN	107805648	A	2018年 3月 16日	无	
CN	108823179	A	2018年 11月 16日	CN	108823179 B 2020年 10月 9日