



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102453702 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201110404251. 2

期), 174-176.

(22) 申请日 2011. 10. 27

审查员 冯娟

(30) 优先权数据

2010-240426 2010. 10. 27 JP

(73) 专利权人 爱科来株式会社

地址 日本京都府

专利权人 生物工程实验室有限责任公司

(72) 发明人 早出广司 小岛胜博

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 李剑

(51) Int. Cl.

C12N 9/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1671839 A, 2005. 09. 21, 全文.

CN 1973036 A, 2007. 05. 30, 全文.

CN 101107353 A, 2008. 01. 16, 全文.

周丽萍. 葡萄糖脱氢酶的研究进展. 《江
苏大学学报(医学版)》. 2004, 第 14 卷 (第 2

权利要求书1页 说明书27页
序列表46页 附图4页

(54) 发明名称

变异葡萄糖脱氢酶

(57) 摘要

本发明提供了一种变异葡萄糖脱氢酶, 其具有和序列号 3 有至少 80% 的同一性的氨基酸序列, 并且具有葡萄糖脱氢酶活性, 其特征在于, 所述氨基酸序列的相应于 326 位、365 位及 472 位的氨基酸残基分别被谷氨酰胺、酪氨酸及酪氨酸取代, 对葡萄糖的底物特异性提高, 对二糖类的反应性降低。

1. 变异葡萄糖脱氢酶,其由序列号 3、序列号 7、序列号 8、序列号 9 或序列号 10 所示氨基酸序列构成,并且具有葡萄糖脱氢酶活性,其特征在于:

所述氨基酸序列的相应于序列号 3 的 326 位、365 位及 472 位的氨基酸残基分别被谷氨酰胺、酪氨酸及酪氨酸取代;

对葡萄糖的底物特异性提高,对麦芽糖的反应性降低。

2. 变异葡萄糖脱氢酶,由序列号 3、序列号 7 或序列号 8 的氨基酸序列构成,并且具有葡萄糖脱氢酶活性,其特征在于,

相应于序列号 3 的氨基酸序列的 326 位、365 位和 472 位的氨基酸残基分别被谷氨酰胺、酪氨酸及酪氨酸取代,

对葡萄糖的底物特异性提高,对麦芽糖的反应性降低。

3. 变异葡萄糖脱氢酶,由序列号 9 或序列号 10 的氨基酸序列构成,并且具有葡萄糖脱氢酶活性,其特征在于,

相应于序列号 3 的氨基酸序列的 326 位、365 位和 472 位的氨基酸残基分别被谷氨酰胺、酪氨酸及酪氨酸取代,

对葡萄糖的底物特异性提高,对麦芽糖的反应性降低。

4. 如权利要求 1~3 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶,其特征在于,与所述氨基酸序列中相应于序列号 3 的 326 位及 365 位的氨基酸残基分别被谷氨酰胺及酪氨酸取代但相应于序列号 3 的 472 位的氨基酸残基未被取代的葡萄糖脱氢酶相比较,对葡萄糖的底物特异性提高,对麦芽糖的反应性降低。

5. 变异葡萄糖脱氢酶复合体,其至少包含权利要求 1~4 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶和电子传递亚单位。

6. 如权利要求 5 所述的葡萄糖脱氢酶复合体,其特征在于,电子传递亚单位为细胞色素 C。

7. 编码权利要求 1~4 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶的 DNA。

8. 微生物,其保持权利要求 7 所述的 DNA,产生权利要求 1~4 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶或者权利要求 5 或 6 所述的变异葡萄糖脱氢酶复合体。

9. 葡萄糖检测试剂盒,其包含权利要求 1~4 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶、权利要求 5 或 6 所述的变异葡萄糖脱氢酶复合体、或者权利要求 8 所述的微生物。

10. 葡萄糖传感器,其包含权利要求 1~4 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶、权利要求 5 或 6 所述的变异葡萄糖脱氢酶复合体、或者权利要求 8 所述的微生物。

变异葡萄糖脱氢酶

技术领域

[0001] 本发明涉及底物特异性提高的变异葡萄糖脱氢酶。具体而言,本发明涉及包含下述变异型 α 亚单位的葡萄糖脱氢酶及其基因,所述变异型 α 亚单位是在构成包含细胞色素 C 的葡萄糖脱氢酶(下文中也称为 CyGDH)的 α 亚单位氨基酸残基中引入变异的。本发明的葡萄糖脱氢酶可以适用于葡萄糖传感器及葡萄糖检测试剂盒等,在生物化学领域、临床领域等中有用。

背景技术

[0002] 目前,野生型的 CyGDH 及以吡咯并喹啉苯醌为辅酶的 PQQGDH 用于血糖自测传感器。野生型的 CyGDH 及 PQQGDH 有如下缺点:由于其不仅与葡萄糖反应而且还与麦芽糖反应,因此在患者的血中麦芽糖浓度高的情况下,不能测定准确的血糖值。特别是在日本和英国,使用麦芽糖作为输液中的能量物质,实际上,利用腹膜透析等施用输液的低血糖患者,还会发生因用 PQQGDH 型的血糖传感器而被误认为高血糖的事故。

[0003] 野生型 CyGDH 对麦芽糖的反应性比对葡萄糖的反应性高,在葡萄糖浓度为 50mg/dL 时,麦芽糖浓度为 100mg/dL 时的血糖值测量结果显示出 170% 的高值。

[0004] 鉴于如上所述的情况,发明了 CyGDH 的变异体酶(在 α 亚单位的氨基酸残基的 326 位和 365 位上引入变异,分别取代成谷氨酰胺(Q)、酪氨酸(Y)的变异葡萄糖脱氢酶(以下也可称为 CyGDH(QY) 或者简称为 QY、QYA))(国际公开号 2006/137283),在葡萄糖浓度为 50mg/dL 时,麦芽糖浓度为 100mg/dL 时的血糖值测量结果能够被控制到 36% 的高值。但是,还不能说是规避麦芽糖影响的效果彻底的物质。

发明内容

[0005] 本发明的课题在于,提供与 CyGDH(QY) 相比对葡萄糖的底物特异性提高的 CyGDH。

[0006] 本发明人为了解决上述课题进行了潜心研究,结果发现,通过分别用谷氨酰胺及酪氨酸取代构成 CyGDH 的 α 亚单位的氨基酸残基中相应于 326 位和 365 位的位点,并且进一步用酪氨酸取代相应于 472 位的位点,与 CyGDH(QY) 相比,底物特异性进一步提高,而且,即使将 GDH 的同源物中的相应于 326 位、365 位及 472 位的位点分别用谷氨酰胺、酪氨酸及酪氨酸取代也可带来同样的效果,从而完成了本发明。

[0007] 即,本发明为以下的内容。

[0008] (1) 变异葡萄糖脱氢酶,其具有和序列号 3 有至少 80% 的同一性的氨基酸序列,并且具有葡萄糖脱氢酶活性,其特征在于:

[0009] 所述氨基酸序列的相应于 326 位、365 位及 472 位的氨基酸残基分别被谷氨酰胺、酪氨酸及酪氨酸取代;

[0010] 对葡萄糖的底物特异性提高,对二糖类的反应性降低。

[0011] (2) 如(1)所述的变异葡萄糖脱氢酶,其具有和序列号 3 有至少 90% 的同一性的氨基酸序列。

[0012] (3) 如 (1) 或 (2) 所述的变异葡萄糖脱氢酶, 其中, 相应于 326 位、365 位及 472 位的位置以外具有序列号 3 所示的氨基酸序列。

[0013] (4) 如 (1) 或 (2) 所述的变异葡萄糖脱氢酶, 其中, 相应于 326 位、365 位及 472 位的位置以外具有序列号 7 所示的氨基酸序列。

[0014] (5) 如 (1) 或 (2) 所述的变异葡萄糖脱氢酶, 其中, 相应于 326 位、365 位及 472 位的位置以外具有序列号 8 所示的氨基酸序列。

[0015] (6) 如 (1) 或 (2) 所述的变异葡萄糖脱氢酶, 其中, 相应于 326 位、365 位及 472 位的位置以外具有序列号 9 所示的氨基酸序列。

[0016] (7) 如 (1) 或 (2) 所述的变异葡萄糖脱氢酶, 其中, 相应于 326 位、365 位及 472 位的位置以外具有序列号 10 所示的氨基酸序列。

[0017] (8) 如 (1) ~ (7) 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶, 其特征在于, 与所述氨基酸序列中相应于 326 位和 365 位的氨基酸残基分别被谷氨酰胺及酪氨酸取代但 472 位未被取代的葡萄糖脱氢酶相比较, 对葡萄糖的底物特异性提高, 对二糖类的反应性降低。

[0018] (9) 如 (1) ~ (8) 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶, 其特征在于, 二糖类为麦芽糖。

[0019] (10) 变异葡萄糖脱氢酶复合体, 其至少包含 (1) ~ (9) 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶和电子传递亚单位。

[0020] (11) 如 (10) 所述的葡萄糖脱氢酶复合体, 其特征在于, 电子传递亚单位为细胞色素 C。

[0021] (12) 编码 (1) ~ (9) 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶的 DNA。

[0022] (13) 微生物, 其保持 (12) 所述的 DNA, 产生 (1) ~ (9) 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶或者 (10) 或 (11) 所述的变异葡萄糖脱氢酶复合体。

[0023] (14) 葡萄糖检测试剂盒, 其包含 (1) ~ (9) 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶、(10) 或 (11) 所述的变异葡萄糖脱氢酶复合体、或者 (13) 所述的微生物。

[0024] (15) 葡萄糖传感器, 其包含 (1) ~ (9) 中任一项所述的变异葡萄糖脱氢酶、(10) 或 (11) 所述的变异葡萄糖脱氢酶复合体、或者 (13) 所述的微生物。

附图说明

[0025] 图 1 是表示葡萄糖传感器的结构的图。

[0026] 图 2 是表示葡萄糖传感器的各试剂部的图。

[0027] 图 3 是表示使用比色式传感器的血糖测定中的葡萄糖浓度 50mg/dL 时的麦芽糖浓度 (100mg/dL、200mg/dL、300mg/dL) 对血糖值的影响的图。

[0028] 图 4 是表示使用电极式传感器的血糖测定中的葡萄糖浓度 50mg/dL 时的麦芽糖浓度 (100mg/dL、200mg/dL、300mg/dL) 对血糖值的影响的图。

[0029] 图 5 是表示电极式葡萄糖传感器的结构的图。

具体实施方式

[0030] 下面, 详细地说明本发明。

[0031] 本发明的变异 GDH 可以通过将特定的变异引入野生型 GDH 的 α 亚单位来制造。野

生型 GDH 可例如是洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*) 产生的 GDH。洋葱伯克霍尔德菌的 GDH, 例如是洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株、JCM2800 株或 JCM2801 株产生的 GDH。KS1 株在 2000 年 9 月 25 日以保藏号码为第 FERM BP-7306 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 (〒305-8566 日本茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)。

[0032] 包含 KS1 株的 GDH α 亚单位基因及 β 亚单位基因的一部分的染色体 DNA 片段的碱基序列如序列号 1 所示 (美国专利申请公开第 2004/0023330 号)。该碱基序列中存在 3 个开放阅读框 (ORF), 从 5' 末端侧开始第 2 及第 3 个 ORF 分别编码 α 亚单位 (序列号 3) 及 β 亚单位 (序列号 4)。另外, 推测第 1 个 ORF 编码 γ 亚单位 (序列号 2)。另外, 序列号 5 中示出含有 β 亚单位基因全长的片段的碱基序列。而且, β 亚单位的氨基酸序列示于序列号 6 中 (欧洲专利申请公开第 1498484 号)。推测序列号 6 中氨基酸号码 1 ~ 22 为信号肽。

[0033] 另外, 除此之外, 作为洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的 GDH 的同源物, 新洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cenocepacia*) J2315 株的假定的氧化还原酶 (putative oxidoreductase) (序列号 7)、*Burkholderia thailandensis* TXDOH 株的假定蛋白 BthaT-07876 (序列号 8)、皮氏罗尔斯顿氏菌 (*Ralstonia pickettii*) 12D 株的 FAD 依赖型氧化还原酶 (FAD dependent oxidoreductase) (序列号 9)、茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) IP01609 株的跨膜脱氢酶 (transmembrane dehydrogenase) (序列号 10) 及 *Burkholderia phytofirmans* PsJN 株的葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶 (glucose-methanol-choline oxidoreductase) (序列号 11) 的各 α 亚单位也可以和洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的 GDH 同样使用。

[0034] 此外, 关于序列号 7 ~ 11 所示的氨基酸序列, 均在美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的数据库中登录。各自的登录号码分别为: 序列号 7 为 YP-002234347、序列号 8 为 ZP-02370914、序列号 9 为 YP-002980762、序列号 10 为 YP-002260434、序列号 11 为 YP-001890482。

[0035] 另外, 新洋葱伯克霍尔德菌 J2315 株以 LMG16656、ATCCBAA-245、CCM4899、CCUG48434、NCTC13227 保藏。*Burkholderia phytofirmans* PsJN 株以 LMG22487、CCUG49060 保藏。

[0036] 另外, 作为和洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株同属的洋葱伯克霍尔德菌株, 来自例如 JCM2800、JCM2801、JCM5506、JCM5507、IF014595 的各 GDH 的 α 亚单位 (序列号 12 ~ 16) 也可以和洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的 GDH 同样地使用。此外, JCM2800、JCM2801、JCM5506 及 JCM5507 保存于日本独立行政法人理化学研究所微生物菌种保藏中心 (Japan Collection of Microorganisms, JCM)。IF014595 保存于日本财团法人发酵研究所 (IFO)。

[0037] 本发明的变异 GDH 可以仅为 α 亚单位, 也可以为 α 亚单位和 β 亚单位的复合体, α 亚单位和 γ 亚单位的复合体, 或包括 α 亚单位、 β 亚单位及 γ 亚单位的复合体。在本说明书中, 将含有 β 亚单位的 GDH 复合体称为 CyGDH, 将不含 β 亚单位的 GDH 复合体称为 GDH。对于本发明的变异 GDH 而言, 在任何情况下, 在 α 亚单位中均引入特定的变异 (326 位、365 位及 472 位中的变异, 或对应于这些位点的位置中的变异), 但是除该特定的变异之外, 也可以具有保守变异 (保存的变异)。另外, 其它的亚单位可以为野生型, 也可以具有保守的变异。需要说明的是, 所谓“保守的变异”是指对 GDH 活性没有实质影响的变异。

[0038] 本发明的变异型 α 亚单位优选除上述特定的变异以外具有序列号 3、7～11 所示的氨基酸序列。另外,对于变异型 α 亚单位而言,只要具有 GDH 活性,也可以具有如上所述的保守的变异。即,可以是具有如下氨基酸序列的蛋白质,所述氨基酸序列为序列号 3、7～11 的氨基酸序列中,除了具有上述特定的变异之外,还取代、缺失、插入或添加了一个或多个氨基酸残基。此外,在序列号 3 中示出了可利用序列号 1 的碱基序列编码的氨基酸序列,但是 N 末端的甲硫氨酸残基有可能会在翻译后脱落。上述所谓的“一个或多个”优选为 1～10 个、更优选为 1～5 个、特别优选为 1～3 个。此外,本发明的变异型 α 亚单位相对于序列号 3 中所示的氨基酸序列而言,具有至少 80%、优选 85%、更优选 90% 的氨基酸同一性。

[0039] 另外, β 亚单位典型地具有序列号 6 的氨基酸序列。但是,只要可以作为 CyGDH 的 β 亚单位起作用,也可以为具有在包括序列号 6 的氨基酸号码 23～425 的氨基酸序列中取代、缺失、插入或添加了一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列的蛋白质。另外,只要可以作为 CyGDH 的 β 亚单位起作用,也可以为具有 KS1 株以外的 β 亚单位及该 β 亚单位的氨基酸序列中取代、缺失、插入或添加了一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列的蛋白质。上述所谓的“一个或多个”优选 1～20 个、更优选为 1～10 个、特别优选为 1～5 个。

[0040] 此外,所谓的作为 CyGDH 的 β 亚单位起作用,是指在和 α 亚单位一起形成复合体时作为不损害该复合体的 GDH 活性的电子传递亚单位、即细胞色素 C 起作用。

[0041] 作为野生型 α 亚单位基因,具体可例如包含包括序列号 1 的碱基号码 764～2380 的碱基序列的 DNA。另外, α 亚单位基因也可以为具有包括序列号 1 中的碱基序列的碱基号码 764～2380 的碱基序列的 DNA,或者为与可由该序列制备的探针在严谨条件下杂交、并且编码具有 GDH 活性的蛋白质的 DNA。

[0042] 另外,作为 β 亚单位基因,具体可例如包含包括序列号 5 的碱基号码 187～1398 的碱基序列的 DNA。另外, β 亚单位基因也可以为具有包括序列号 5 的碱基号码 187～1398 的碱基序列的 DNA,或者为与可由该序列制备的探针在严谨条件下杂交、并且编码可作为 β 亚单位起作用的蛋白质的 DNA。

[0043] 上述严谨条件可例如是具有优选 80%、更优选 90% 以上、特别优选 95% 以上的同源性的 DNA 之间杂交的条件,具体可例如是 0.1×SSC、0.1% SDS、60℃。

[0044] α 亚单位基因及 β 亚单位基因例如可以利用以洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的染色体 DNA 为模板进行 PCR 来获取。PCR 用引物可以基于上述的碱基序列通过化学合成来制备。另外,还可以利用以基于上述序列制备的寡核苷酸为探针的杂交,由洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的染色体 DNA 来获取。此外,也可以使用 KS1 株以外的新洋葱伯克霍尔德菌 J2315 株、Burkholderia thailandensis TXDOH 株、皮氏罗尔斯顿氏菌 12D 株、茄科雷尔氏菌 IP01609 株及 Burkholderia phytofirmans PsJN 株。

[0045] 对本发明的变异 GDH 而言,通过使如上所述的野生型 GDH 或具有保守的变异的 GDH 具有特定的变异,对葡萄糖的底物特异性提高。所谓“对葡萄糖的底物特异性提高”包含如下含义:在实质上保持对葡萄糖的反应性的情况下,对其它单糖类、二糖类或低聚糖等糖类例如麦芽糖、半乳糖、木糖等的反应性下降;或对葡萄糖的反应性与对其它糖类的反应性相比提高了。例如,即使对葡萄糖的反应性下降,但对其它糖类的反应性也下降更多的话,则对葡萄糖的底物特异性是提高的。另外,即使对其它糖类的反应性升高,但对葡萄糖的底物特异性升高更多的话,则对葡萄糖的底物特异性提高。具体而言,例如,如果变异型酶相对

野生型酶的底物特异性（对葡萄糖的比活性和对其它糖类例如麦芽糖的比活性之比）的提高（用下述式表示）为 10% 以上、优选 20% 以上、更优选 40% 以上，则对葡萄糖的底物特异性提高。例如，底物特异性在使用野生型酶为 60%、使用变异型 GDH 时为 40% 的情况下，对葡萄糖的底物特异性升高了 33%。

[0046] 底物特异性 = (对葡萄糖以外的糖类的比活性 / 对葡萄糖的比活性) × 100

[0047] 底物特异性的提高 = (A-B) × 100/A

[0048] A : 野生型酶的底物特异性

[0049] B : 变异型酶的底物特异性

[0050] 另外，变异型 GDH 对麦芽糖的反应性（比活性）为对葡萄糖的反应性（比活性）的 1% 以下、优选 0.5% 以下。

[0051] 较之优选在序列号 3 所示的氨基酸序列的相应于 326 位及 365 位的氨基酸残基分别用谷氨酰胺及酪氨酸取代而 472 位未被取代的葡萄糖脱氢酶相比，本发明的变异型 GDH 对葡萄糖的底物特异性提高，对二糖类的反应性下降。

[0052] 本发明中的所谓变异，具体而言如下所述。

[0053] (1) 序列号 3 所示的氨基酸序列的相应于 326 位的丝氨酸残基被谷氨酰胺取代。

[0054] (2) 序列号 3 所示的氨基酸序列的相应于 365 位的丝氨酸残基被酪氨酸取代。

[0055] (3) 序列号 3 所示的氨基酸序列的相应于 472 位的丙氨酸残基被酪氨酸取代。

[0056] 上述氨基酸取代变异的位置为序列号 3（即洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的野生型 GDH α 亚单位）的氨基酸序列中的位置，但是在序列号 3 的氨基酸序列中除上述特定的变异以外还具有取代、缺失、插入或添加了一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列的 GDH α 亚单位的同源物或变体中，在和序列号 3 的氨基酸序列的比对中，表示相当于上述氨基酸取代的位置的位置。例如，在 1 ~ 364 位的区域中具有 1 个氨基酸残基缺失的 GDH α 亚单位的保守变体中，所谓 365 位表示上述变体的 364 位。

[0057] 在序列号 7 中，相应于序列号 3 的 326 位、365 位及 472 位的残基分别为同样的 326 位、365 位及 472 位。

[0058] 在序列号 8 中，相应于序列号 3 的 326 位、365 位及 472 位的残基分别为 324 位、363 位及 470 位。

[0059] 在序列号 9 中，相应于序列号 3 的 326 位、365 位及 472 位的残基分别为 327 位、366 位及 473 位。

[0060] 在序列号 10 中，相应于序列号 3 的 326 位、365 位及 472 位的残基分别为 327 位、366 位及 473 位。

[0061] 在序列号 11 中，相应于序列号 3 的 326 位、365 位及 472 位的残基分别为 322 位、361 位及 466 位。

[0062] 此外，对于序列号 3 所示的氨基酸序列而言，相对于序列号 7 ~ 11，分别具有 96%、93%、82%、82%、63% 的氨基酸序列同一性。

[0063] 在以下的表 1 中，示出了序列号 3、7 ~ 11 的氨基酸序列比对。

[0064] [表 1-1]

[0065]

序列号 3	1	MADTDT--QKADV VVGSGVAGAI VAHQLAMAGKAVILLEAGPRMPRWEI	48
序列号 7	1	MADTDT--QKADV VVGSGVAGAI VAHQLAMAGKSVILLEAGPRMPRWEI	48
序列号 8	1	MAET----QQADV VVGSGVAGAI VAHQLAMAGKSVILLEAGPRMPRWEI	46
序列号 9	1	MAQSEQTRQQADIV VVGSGVAGALVAYELARAGKSVLMLEAGPRLPRWEI	50
序列号 10	1	MADTRR-ADQADIV VVGSGVAGALVAYELARAGKSVLMLEAGPRLPRWEI	49
序列号 11	1	MANKNS----ADIV VVGSGVAGGLVAHQMALAGASVILLEAGPRIPRWQI	46
序列号 3	49	VERFRNQPDKMDFMAYPSSPWAPHPEYGP-PNDYLILKGEHKFNSQYIR	97
序列号 7	49	VERFRNQPDKTDFMAYPSSPWAPHPEYGP-PNDYLILKGEHKFNSQYIR	97
序列号 8	47	VERFRNQPDKMDFMAYPSSAWAPHPEYAP-PNDYLVKGEHKFNSQYIR	95
序列号 9	51	VERFRNQADKMDFMAYPSTAWAPHPEYGP-PNNYLVKGEHQFNSQYIR	99
序列号 10	50	VERFRNQADKMDFMAYPSTPWAPHPEYGPSPNDYLVKGEHKFDSQYIR	99
序列号 11	47	VENFRNSPVKSDFATPYPTPYAPHPEYAP-ANNYL I QKGDYPYSSQYLR	95
序列号 3	98	AVGGTTWHWAASAWRFIPNDFKMKSVYGVGRDWP I QYDDLEPYQRAEEE	147
序列号 7	98	AVGGTTWHWAASAWRFIPNDFKMKTVYGVARDWP I QYDDLEHWYQRAEEE	147
序列号 8	96	AVGGTTWHWAASAWRFIPNDFKMKTVYGVGRDWP I QYDDLEHFYQRAEEE	145
序列号 9	100	AVGGTTWHWAASTWRFLPNDFKLSVYGIARDWP I QYQDLERYYG LAEEA	149
序列号 10	100	AVGGTTWHWAASTWRFLPNDFKLSVYGIARDWPLQYDDLERDYGRAEAA	149
序列号 11	96	LVGGTTWHWAAAARLLPSDFQLHKLYGVGRDWPYPYETLEPWYSAAEVQ	145
序列号 3	148	LGVWGPGEEDLYSPRKQYPMPPLPLSFNEQT IKTALNNYDPKFHV VTE	197
序列号 7	148	LGVWGPGEEDLYSPRKQAYMPPLPLSFNEQT IKSALNGYDPKFHV VTE	197
序列号 8	146	LGVWGPGEEDLLSPRKAPYMPPLPLSYNERT IKTALNNHDPKYHV VTE	195
序列号 9	150	LGVWGPN-DEDLGSPRSQYPMTPLPLSFNERT I KEALNAHDASFHV VTE	198
序列号 10	150	LGVWGPN-DEDLGSPRSQYPMAPLPLSFNERT I KEALNAHDPAFHV VTE	198
序列号 11	146	LGVSGPGNSIDLGSPRSKPYMNPLPLSYMDQRFSDVLNAQG--FKVVPE	193
序列号 3	198	PVARNSRPYDGRPTCCGNNNCMP I CPI GAMYNG I VHVEKAERAGAKL I EN	247
序列号 7	198	PVARNSRPYDGRPTCCGNNNCMP I CPI GAMYNG I VHVEKAEQAGAKL I DS	247
序列号 8	196	PVARNSRPYDGRPTCCGNNNCMP I CPI GAMYNG I VHVEKAEQAGAKL I EN	245
序列号 9	199	PVARNSRPYDGRPTCCGNNNCMP I CPI GAMYNG I VHVEKAEQAGARL I EN	248
序列号 10	199	PVARNSRPYDGRPTCCGNNNCMP I CPI GAMYNG I VHVEKAEQAGARL I EN	248
序列号 11	194	PVARNSRPYDARPTCCGNNNCMP I CPI AAMYNGVVAEKAQAGAKL I PE	243
序列号 3	248	AVVYKLETGPKR I VAALYKDKTGAHRVEGKYFVLAANG IETPKILLMS	297
序列号 7	248	AVVYKLETGPKR I VAAIYKDKTGADHRVEGKYFVLAANG IETPKILLMS	297
序列号 8	246	AVVHKLEVGPQKK I VAALYKDKPGAHRVEGKYFVLAANG IETPKMLMS	295
序列号 9	249	AVVFKLEVGPKNR I VAARYKDSKGAHRVEGKWFVLAANG IETPKMLMS	298
序列号 10	249	AVVYKLEVAGARR I VAHYKDPKGVDRVEGKWFVLAANG IETPKMLMS	298
序列号 11	242	AVVYRVEADNKGL I TAVHYKDPNGNSTRVTGKLFVLAANG IETPKMLMS	293

[0066] [表 1-2]

[0067]

序列号 3	298	ANRDFPNGVANSSDMVGRNLMHPGTGVSFYASEKLWPGRGPQEMTSLIG	347
序列号 7	298	ANRDFPNGVANSSDMVGRNLMHPGTGVSFYANEKLWPGRGPQEMTSLIG	347
序列号 8	296	TSHDFPNGVGNSSDMVGRNLMHPGTGVSFYASEKLWPGRGPQEMTSLIG	345
序列号 9	299	TSQDFPKGNGSSDMVGRNLMHPGTGVSFYADRKLWPGRGPQEMTSLIG	348
序列号 10	299	TSEAFPRGVGNSSDMVGRNLMHPGTGVSFYADRKLWPGRGPQEMTSLIG	348
序列号 11	294	TSKDFPHGVGNSSDQVGRNLMHPGTGVTFLANEALWPGRGPMEMTSIVN	343
序列号 3	348	FRDGPFRATEAAKKIHLSNLSRIDQETQKIFKAGKLMKPDELDAQIRDERS	397
序列号 7	348	FRDGPFRATEAAKKIHLSNMSRINQETQKIFKAGKLMKHEELDAQIRDERS	397
序列号 8	346	FRDGPFRATEAAKKIHLSNLSRIDQETQKIFKAGKLLKPAELDAQIRDERS	395
序列号 9	349	FRDGPFRATQAGKKLHLSNISRIEQETQRIKKEGKLIKPADLDARIRDQA	398
序列号 10	349	FRDGPFRAMQAGKKLHLSNISRIEQETARIFKAGKLLKPAELDARIRDQA	398
序列号 11	344	FRDGAFRSDYAAKKLHLSNGVPTMSVTADLLKKG—LTGAELDRQIRDRA	391
序列号 3	398	ARYVQFDCFHEILPQPENRIVPSKTATDAIGIPRPEITYAIDDYVKRGAA	447
序列号 7	398	ARYVQFDCFHEILPQPENRIVPSKTATDAIGIPRPEITYAIDDYVKRGAV	447
序列号 8	396	ARYVQFDCFHEILPQPENRIVPSKTATDAIGIPRPEITYAIDDYVKRGAA	445
序列号 9	399	ARYVQFDSFHEILPLPENRIVPSATEVDAIGIPRPEITYHIDDYVKRSAV	448
序列号 10	399	ARYVQFDSFHEILPLPENRIVPSATETDALGIPRPEITYRIDDYVKRSAV	448
序列号 11	392	ARTLNINSFHEHLAEPQNRVVPADHKDSLGIQPEIYYSINDYVKKSA	441
序列号 3	448	HTREYVYATAAKVLGGTDVVFNDEFAPNNHITGSTIMGADARDSVVDKDCR	497
序列号 7	448	HTREYVYATAAKVLGGTDVVFNDEFAPNNHITGATIMGADARDSVVDKDCR	497
序列号 8	446	HTREYVYASAAQVLGGTDVVFNDEFAPNNHITGATIMGADPRDSVVDKDCR	495
序列号 9	449	HTREYVYATAAQVMGGTNVEFHDDFAPNNHITGATIMGADPKDSVVDKDCR	498
序列号 10	449	HTREYVYATAAKVLGATDVQFHDDFAPNNHITGATSMGADPKDSVVDKDCR	498
序列号 11	442	NTHELYAQIAALFGGAEVTFDDTFAPNNHIMGTTIMGSDPADSVVDADCR	491
序列号 3	498	TFDHPNLFISSSATMPTVGTNVNLTIAALALRMSDTLKKEV	539
序列号 7	498	TFDHPNLFISSSTMPTVGTNVNLTIAALALRMSDTLKKEV	539
序列号 8	496	TFDHPNLFISSSATMPTVGTNVNLTIAALALRISDQLKKEI	537
序列号 9	499	TFDHPNLFISSSTMPTVGTNVNLTIAALALRIADQLKQEA	540
序列号 10	499	TFDHPNLFISSSATMPTVGTNVNLTIAALALRIADRLKKEA	540
序列号 11	492	THDHSNLFIASSGVMPAASVNCTLTIAALSLKLADKLKREI	533

[0068] 为了较之变异体葡萄糖脱氢酶 (CyGDH(QY)) 而言增加对葡萄糖的底物特异性, 本发明人使用遗传算法, 对最佳的 326 位、365 位及 472 位的组合进行了研究。其结果发现了可以提高底物特异性的组合。

[0069] 以下示出了本发明的变异型 GDH 的优选变异方式。

[0070] (数字表示氨基酸序列中的位置, 氨基酸残基表示上述位置中的取代后的氨基酸残基, “+”表示同时具有 2 个氨基酸取代。)

[0071] 326Gln+365Tyr+472Tyr

[0072] 具有期望的变异的 GDH α 亚单位可通过如下方法来获取, 利用位点特异性变异法, 在编码 GDH α 亚单位的 DNA (α 亚单位基因) 上, 引入对应于期望的氨基酸变异的核苷酸变异, 将获得的变异 DNA 用适当的表达体系来表达。另外, 通过将编码变异 GDH α 亚单位的 DNA、与编码 β 亚单位的 DNA (β 亚单位基因) 或 β 亚单位基因和编码 γ 亚单位的 DNA (γ 亚单位基因) 一起表达, 可以获得变异 CyGDH 复合体。此外, 向编码 GDH α 亚单位的 DNA 引入变异, 也可以使用将 γ 亚单位、 α 亚单位及 β 亚单位依次编码的多顺反子 DNA 片段。

[0073] 可以通过如下方法来确定引入了变异的 GDH α 亚单位或 CyGDH 复合体的底物特异性,即,利用实施例记载的方法,研究对各种糖类的反应性,并和野生型 GDH α 亚单位或野生型 CyGDH 复合体的反应性相比较。

[0074] 对于将 γ 亚单位、 α 亚单位及 β 亚单位依次编码的多顺反子 DNA 片段,可以利用例如以洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的染色体 DNA 为模板、将具有序列号 19、20 的碱基序列的寡核苷酸作为引物的 PCR 来获取(参照后述实施例)。

[0075] 作为用于获取 GDH 的各亚单位的基因、引入变异、表达基因等的载体,可举出例如通过 Escherichia 属细菌起作用的载体,具体可例如:pTrc99A、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pACYC184、pBBR122 等。作为用于基因表达的启动子,可例如 lac、trp、tac、trc、 P_L 、tet、PhoA 等。另外,通过在包含启动子的表达载体的适当位点插入 α 亚单位基因或其它亚单位基因,由此可以在同一步骤中进行向这些基因的载体的插入和启动子的连接。作为如上所述的表达载体,可例如:pTrc99A、pBlucscript、pKK223-3 等。

[0076] 另外, α 亚单位基因或其它亚单位基因可以以能够表达的方式整合进宿主微生物的染色体 DNA 中。

[0077] 在使用重组载体转化微生物时,可例如利用钙处理的感受态细胞法、原生质粒法或电穿孔法等。

[0078] 宿主微生物可例如是:枯草芽孢杆菌等芽孢杆菌属细菌、酿酒酵母等酵母、黑曲霉等丝状真菌,但是不限于这些,只要是适合生产异源蛋白质的宿主微生物就可以使用。

[0079] 本发明的变异 α 亚单位或变异 CyGDH 复合体或者对其进行表达的微生物,可以作为葡萄糖传感器的酶电极、或葡萄糖的检测试剂盒的构成要素来使用。使用洋葱伯克霍尔德菌的野生型 GDH 的葡萄糖传感器及葡萄糖检测试剂盒在美国专利公开第 2004/0023330A1 中有记载。本发明的变异 GDH 也可以同样操作来使用。

[0080] 实施例

[0081] 下面,举出实施例进一步具体地说明本发明,但是本发明不限于这些实施例。

[0082] 实施例 1 表达洋葱伯克霍尔德菌的 GDH 或 CyGDH 的质粒

[0083] 准备表达 GDH 的 α 亚单位及 γ 亚单位的质粒作为表达洋葱伯克霍尔德菌的 GDH 的质粒,并且,准备表达 α 亚单位、 β 亚单位及 γ 亚单位的质粒作为表达 CyGDH 的质粒。

[0084] <1> 表达 GDH 的 α 亚单位及 γ 亚单位的质粒

[0085] 使用了 W002/036779(对应于 EP1331272A1、US2004023330A1、CN1484703A)中记载的质粒 pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ 作为表达 α 亚单位及 γ 亚单位的质粒。该质粒为将从洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株(FERM BP-7306)染色体 DNA 中分离的、连续包含 GDH γ 亚单位结构基因和 α 亚单位结构基因的 DNA 片段,插入作为载体 pTrc99A 的克隆位点的 NcoI/HindIII 中而形成的质粒。本质粒中的 GDH $\gamma + \alpha$ 基因利用 trc 启动子来控制。pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ 保持有氨苄青霉素抗性基因。

[0086] 利用上述质粒 pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ 为模板,以具有以下序列的寡核苷酸为引物进行 PCR,对包含在 GDH 的 α 亚单位 C 末端附加了 6 个组氨酸残基的 DNA 片段的整个质粒进行扩增。

[0087] [正向引物]

[0088] 5'-ACCACCACTGATAAGGAGGTCTGACCGTGCAGAAATCTAC-3'(序列号 17)

[0089] [反向引物]

[0090] 5'-AGCCTGTGCGACTTCTTCCTTCAGCGATCGGTGGTGGTGG-3' (序列号 18)

[0091] 将扩增得到的片段两端进行平末端化后,将 5' 末端磷酸化,利用连接反应进行环状化。用获得的重组载体转化大肠杆菌 DH5 α ,采集在包含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 琼脂培养基中产生的菌落。将获得的转化体用液体 LB 培养基培养并提取质粒,分析该插入 DNA 片段,确认了约 2.1kb 的插入片段。本质粒中 GDH 的各结构基因利用 trc 启动子来控制。本质粒保持有氨苄青霉素抗性基因。

[0092] <2> 表达 CyGDH 的 α 亚单位、 β 亚单位及 γ 亚单位的质粒

[0093] 按如下操作来制备表达 CyGDH 的 α 亚单位、 β 亚单位及 γ 亚单位的质粒。

[0094] (1) 来自洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的染色体 DNA 的制备

[0095] 依照通常方法,由洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株来制备染色体基因。即,使用 TL 液体培养基(聚蛋白胨 10g、酵母提取液 1g、NaCl 5g、KH₂PO₄2g、葡萄糖 5g;1L、pH 7.2),将该菌株在 34℃ 下振荡一晚。通过离心分离回收增殖的菌体。将该菌体悬浮在包含 10mM 的 NaCl、20mM 的 Tris-HCl (pH 8.0)、1mM 的 EDTA、0.5% 的 SDS、100 μ g/ml 的蛋白酶 K 的溶液中,在 50℃ 处理 6 小时。在其中添加等量的苯酚-氯仿并在室温下搅拌 10 分钟,然后通过离心分离回收上清液。向其中添加醋酸钠,使最终浓度达到 0.3M,用 2 倍量的乙醇进行分层,使染色体 DNA 在中间层析出。将其用玻璃棒捞出,用 70% 的乙醇洗涤后,使其溶解在适量的 TE 缓冲剂中,制成染色体 DNA 溶液。

[0096] (2) 编码 CyGDH 的 γ 亚单位、 α 亚单位及 β 亚单位的 DNA 片段的制备

[0097] 利用以上述染色体 DNA 为模板、以具有以下序列的寡核苷酸为引物进行 PCR,扩增编码 CyGDH 的 γ 亚单位、 α 亚单位及 β 亚单位的 DNA 片段。

[0098] [正向引物]

[0099] 5'-CATGCCATGGCACACAACGACAACAC-3' (序列号 19)

[0100] [反向引物]

[0101] 5'-GTCGACGATCTTCTTCCAGCCGAACATCAC-3' (序列号 20)

[0102] 将扩增得到的片段的 C 末端侧进行平末端化后,用 NcoI 对 N 末端侧进行消化,在经同样处理的 pTrc99A 上进行连接。用获得的重组载体转化大肠杆菌 DH5 α ,采集在包含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 琼脂培养基中产生的菌落。将获得的转化体用液体 LB 培养基培养并提取质粒,分析该插入 DNA 片段,确认了约 3.8kb 的插入片段。将本质粒命名为 pTrc99A γ α β 。本质粒中的 CyGDH 的各结构基因利用 trc 启动子来控制。pTrc99A γ α β 保持有氨苄青霉素抗性基因及卡那霉素抗性基因。

[0103] 实施例 2 通过向 CyGDH α 亚单位基因引入变异对底物相互作用位点的探索

[0104] (1) 向 326 位、365 位及 472 位引入变异

[0105] 在实施例 1 中获得的 pTrc99A γ α β 所含有的 GDH α 亚单位基因上,以使编码该基因的 α 亚单位的 326 位的丝氨酸残基、365 位的丝氨酸残基、及 472 位的丙氨酸残基被取代为其它氨基酸残基的方式引入变异。

[0106] 具体而言,使用市售的位点特异性变异引入试剂盒(Stratagene 公司,QuikChangeII Site-Directed Mutagenesis Kit),将实施例 1 记载的质粒 pTrc99A/ γ + α 及 pTrc99A γ α β 中含有的 GDH α 亚单位基因的 326 位的丝氨酸的密码子(TCG)、365 位的

丝氨酸的密码子 (TCG)、及 472 位的丙氨酸的密码子 (GCG) 取代成其它氨基酸的密码子。

[0107] 用于上述氨基酸残基取代的正向引物及反向引物的序列示于下表 2。另外,用于制备 3 个变异的反向引物示于表 3。

[0108] 此外,在表示变异的表述中,数字表示氨基酸序列中的位置,数字前的字母表示氨基酸取代前的氨基酸残基,数字后的字母表示氨基酸取代后的氨基酸残基。例如, R53F 表示 53 位由精氨酸向苯基丙氨酸的取代。

[0109] 对于 PCR 反应而言,使用下文中的反应组成,在 95℃、30 秒后,重复 15 次 95℃、30 秒 ;55℃、1 分钟 ;68℃、8 分钟的循环,在 68℃ 进行 30 分钟的反应后,在 4℃ 下保持。

[0110] [反应液组成]

[0111]

模板 DNA (5ng/μl)	2μl
(3 变异引入 pTrc99A/γ+α 及 pTrc99Aγαβ)	
10×反应缓冲液	5μl
正向引物 (100ng/μl)	1.25μl
反向引物 (100ng/μl)	1.25μl
dNTP	1μl
蒸馏水	38.5μl
DNA 聚合酶	1μl
合计	50μl

[0112] PCR 反应后,在反应液中添加 0.5 μ l 的 DpnI,在 37℃ 下孵育 1 小时,使模板质粒分解。

[0113] 使用获得的反应液转化大肠杆菌 DH5 α (supE44, Δ lacU169 (Φ80lacZ Δ M15), hsdR17, recAi, endA1, gyrA96, thi-1, relA1) 的感受态细胞。由数个在包含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 及卡那霉素 (30 μ g/ml) 的 LB 琼脂培养基 (细菌用胰蛋白胨 1%、酶提取液 0.5%、NaCl 1%、琼脂 1.5%) 上生长的菌落制备质粒 DNA,进行序列分析,确认了在 GDH α 亚单位基因中引入了目标变异。

[0114] [表 2]

[0115]

S326 用正向引物

氨基酸取代	引物名称	序列	序列号
S326E	CGDH326ED	5' GAATTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 21
S326F	CGDH326FD	5' TTCTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 22
S326I	CGDH326ID	5' ATCTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 23
S326K	CGDH326KD	5' AAATTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 24
S326L	CGDH326LD	5' CTGTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 25
S326N	CGDH326ND	5' AACTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 26
S326Q	CGDH326QD	5' CAGTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 27
S326R	CGDH326RD	5' CGCTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 28
S326T	CGDH326TD	5' ACCTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3'	序列号 29

[0116]

- S326V CGDH326VD 5' GTTTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3' 序列号 30
- S326W CGDH326WD 5' TGGTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3' 序列号 31
- S326Y CGDH326YD 5' TACTTCTATGCGAGCGAGAAGCTGTGGCCG 3' 序列号 32

S326 用反向引物

- | 引物名称 | 序列 | 序列号 |
|----------------|-----------------------------------|--------|
| CGDH326RSma 5' | CACGCCGGTCCCGGGATGGTCCATCAGGTT 3' | 序列号 33 |
| CGDH326U 5' | CACGCCGGTCCCGGGATGGTCCATCAGGTT 3' | 序列号 34 |

S365 用正向引物

- | 氨基酸取代 | 引物名称 | 序列 | 序列号 |
|-------|--------------|-----------------------------------|--------|
| S365D | CGDH365DD 5' | GACAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 35 |
| S365F | CGDH365FD 5' | TTCAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 36 |
| S365I | CGDH365ID 5' | ATCAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 37 |
| S365K | CGDH365KD 5' | AAAAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 38 |
| S365Q | CGDH365QD 5' | CAGAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 39 |
| S365R | CGDH365RD 5' | CGTAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 40 |
| S365T | CGDH365TD 5' | ACCAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 41 |
| S365Y | CGDH365YD 5' | TACAACCTGTCGCGCATCGACCAGGAGACG 3' | 序列号 42 |

S365 用反向引物

- | 引物名称 | 序列 | 序列号 |
|-------------|-----------------------------------|--------|
| CGDH365U 5' | CAGGTGGATCTTCTTCGCCGCTTCGGTCGC 3' | 序列号 43 |

A472 用正向引物

- | 氨基酸取代 | 引物名称 | 序列 | 序列号 |
|-------|--------------|-----------------------------------|--------|
| A472A | CGDH472AD 5' | GCGCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3' | 序列号 44 |
| A472D | CGDH472DD 5' | GACCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3' | 序列号 45 |
| A472E | CGDH472ED 5' | GAACCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3' | 序列号 46 |
| A472F | CGDH472FD 5' | TTCCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3' | 序列号 47 |

[0117]

A472H	CGDH472HD 5'	CATCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 48
A472I	CGDH472ID 5'	ATCCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 49
A472K	CGDH472KD 5'	AAACCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 50
A472N	CGDH472ND 5'	AACCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 51
A472R	CGDH472RD 5'	CGTCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 52
A472S	CGDH472SD 5'	AGTCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 53
A472T	CGDH472TD 5'	ACTCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 54
A472Y	CGDH472YD 5'	TACCCGAACAATCACATCACGGGCTCGACG 3'	序列号 55

A472 用反向引物

引物名称	序列	序列号
CGDH472U	5' GAATTCGTCGTTGAACACGACGTCCGTGCC 3'	序列号 56
CGDH472UdE1	5' GAACTCGTCGTTGAACACGACGTCCGTGCC 3'	序列号 57

[0118] [表 3]

[0119]

用于 3 变异的反向引物一览表

	S326 用反向	S365 用反向	A472 用反向
TTS	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472UdE1
TDF	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
YKY	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
YQE	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
QII	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472U
QDN	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472U
ERY	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472UdE1
EFE	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472UdE1
IKD	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
QYR	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
LTN	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
RYK	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
KYT	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472U
RRI	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
KYI	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472U
YYS	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
IFK	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
IFR	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
FRY	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
FRA	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
EYT	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472UdE1
FRE	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
RKA	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472U
RRY	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U

[0120]

KYR	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
KYS	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472UdE1
WFK	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
IRY	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
IYT	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
IYH	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
EFK	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472UdE1
FRH	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
NRF	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
NRT	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
VRK	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472UdE1
KYH	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472UdE1
LYF	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472U
QRY	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
QYY	CGDH326U	CGDH365U	CGDH472U
KRH	CGDH326RSma	CGDH365U	CGDH472U

[0121] 实施例 3 变异 GDH 的底物特异性的分析

[0122] 使用实施例 2 获得的变异 GDH 表达质粒,制造变异 GDH,研究底物特异性。

[0123] (1) 培养

[0124] 对于引入了变异的大肠杆菌 DH5 α 株,使用各 2ml 的 LB 培养基(含有氨苄青霉素 50 μ g/ml 及卡那霉素 30 μ g/ml),用 L 形管在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养一晚上。将这些培养液接种在含有 150ml 的 LB 培养基(含有氨苄青霉素 50 μ g/ml 及卡那霉素 30 μ g/ml)的 500ml 的斜口烧瓶中,在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养。培养开始 3 小时后,添加 IPTG(异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)使最终浓度达到 0.1mM,再培养 2 小时。

[0125] (2) 粗制酶样品的制备

[0126] 从上述培养的培养液中收集菌体,洗涤后,将菌体悬浮在相对每 0.3mg 湿菌体而言 1ml 的含有 0.2% Triton X100 的 10mM 的磷酸钾缓冲剂 (PPB) (pH 7.0) 中,进行超声波粉碎。将该悬浮液进行离心分离 (10000r. p. m. 10 分钟、4 $^{\circ}$ C) 并除去残渣后,对上清液进行超离心分离 (50,000r. p. m. 60 分钟,4 $^{\circ}$ C),将获得的上清液(水溶性级分)作为粗制酶样品。另外,将该样品利用通常的疏水性色谱法(色谱柱名:辛基琼脂糖 (Amersham Biosciences 公司制))及离子交换色谱法(Q-琼脂糖 (Amersham Biosciences 公司制))进行精制,获得精制酶样品。以 GDH 活性为指标来进行目标酶级分的确定。

[0127] 此外,如下操作来精制具有 Histag 的蛋白质。

[0128] 从上述经培养的培养液中收集菌体,洗涤后,将菌体悬浮于相对于每 0.3mg 湿菌体而言 1ml 的含有 0.5M 氯化钠、20mM 咪唑的 20mM 磷酸钠缓冲剂 (pH 7.5) 中,进行超声波粉碎。将该悬浮液进行离心分离 (10000r. p. m. 10 分钟,4 $^{\circ}$ C) 并除去残渣后,对上清液进行超离心分离 (50,000r. p. m. 60 分钟,4 $^{\circ}$ C),将获得的上清液(水溶性级分)作为粗制酶样品。将该样品添加在经包含 0.5M 氯化钠、20mM 咪唑的 20mM 磷酸钠缓冲剂 (pH 7.5) 平衡的 HistrapFF 柱 (Amersham Biosciences 公司制) 中,用包含 0.5M 氯化钠、60mM 咪唑的 20mM 磷酸钠缓冲剂 (pH 7.5) 洗涤后,使用包含 0.5M 氯化钠、150mM 咪唑的 20mM 磷酸钠缓冲剂 (pH7.5) 进行洗提,获得精制酶试样。以 GDH 活性为指标来进行目标酶级分的确定。

[0129] (3) GDH 活性的测定

[0130] 在上述粗制酶样品 8 μ l 中添加 8 μ l 的活性测定用试剂(在 12 μ l 的 600mM 的吩嗪硫酸甲酯 (PMS)、120 μ l 的 6mM 的 2,6-二氯酚 (2,6-dichlorophenol indophenol)

(DCIP) 中添加 0.2(w/v)% Triton X100 的 10mM 的 PPB, 制成总量 480 μ l 的溶液)。使用铝块恒温槽, 将其在各反应温度下孵育 1 分钟后, 迅速添加 8 μ l 各浓度的底物 (葡萄糖或麦芽糖) 或蒸馏水并搅拌, 使用分光光度计测定来自 DCIP 的吸收波长 600nm 的吸光度。各试剂的最终浓度为: DCIP :0.06mM、PMS :0.6mM。底物的最终浓度为 10mM 或 5mM。

[0131] 结果示于表 4。在 10mM 或 5mM 的底物浓度时, 野生型 GDH 的反应比分别为 23.32% 及 18.88%。

[0132] [表 4]

[0133]

U/mg 粗制	10mM			5mM		
蛋白质	Glu	Mal	Mal/Glu (%)	Glu	Mal	Mal/Glu (%)
WT	4.69	1.09	23.32	3.99	0.75	18.88
QYA	0.68	0.0065	0.96	0.43	0.0038	0.88
TTS	1.40	0.23	16.18	1.22	0.19	15.25
TDF	0.37	0.17	45.16	0.23	0.12	52.63
YKY	0.14	0.07	51.72	0.10	0.05	50.00
YQE	0.06	0.01	9.52	0.04	0.00	8.46

[0134]

QII	0.40	0.06	15.00	0.24	0.03	13.89
QDN	0.17	0.08	47.42	0.11	0.05	48.44
ERY	0.29	0.002	0.79	0.17	0.001	0.78
EFE	0.05	0.001	2.74	0.03	0.001	2.75
IKD	0.01	0.029	236.36	0.01	0.019	188.89
QYR	1.90	0.0180	0.97	1.21	0.0112	0.93
LTN	0.07	0.0140	18.95	0.05	0.0105	19.44
RYK	1.08	0.2400	22.09	0.75	0.1348	17.90
KYT	1.135	0.0082	0.721	0.669	0.0048	0.714
RRI	0.08	0.0048	6.32	0.06	0.0037	5.70
KYI	0.12	0.0022	1.80	0.07	0.0018	2.53
YYS	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IFK	1.27	0.0380	2.99	0.81	0.0243	3.00
IFR	0.28	0.0094	3.38	0.18	0.0060	3.36
FRY	0.34	0.0060	1.76	0.26	0.0037	1.42
FRA	0.14	0.0086	6.09	0.13	0.0065	5.08
YET	0.13	0.0026	1.94	0.09	0.0024	2.79
FRE	nd	nd	nd	nd	nd	nd
RKA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
RRY	0.49	0.0050	1.01	0.38	0.0034	0.88
KYR	1.67	1.61E-02	0.97	1.09	8.68E-03	0.80
KYS	0.47	3.64E-03	0.78	0.29	1.82E-03	0.63
WFK	0.61	2.47E-02	4.03	0.43	1.38E-02	3.22
IRY	0.24	5.01E-02	21.2	0.18	4.75E-02	26.54
IYT	0.21	-	-	0.13	-	-
IYH	0.16	-	-	0.09	-	-
EFK	0.18	5.74E-03	3.20	0.10	3.23E-03	3.21
FRH	0.05	-	-	0.47	-	-
NRF	0.19	-	-	0.13	-	-
NRT	0.26	1.13E-02	4.31	0.23	5.85E-03	2.55
VRK	0.09	4.74E-03	5.42	0.08	2.55E-03	3.18
KYH	0.04	-	-	0.02	-	-
LYF	0.15	-	-	0.09	-	-
QRY	0.35	7.64E-02	21.8	0.26	0.0531	20.5
QYY	0.55	1.91E-03	0.35	0.31	0.00143	0.46
KRH	nd	nd	nd	nd	nd	nd

[0135] 表中, QYA 表示相当于 326 位及 365 位的氨基酸残基分别用谷氨酰胺及酪氨酸取代,但是 472 位未被取代(即依然为丙氨酸残基)的变异葡萄糖脱氢酶(即, GDH(QY))。

[0136] 其结果表明, 326Glu+365Arg+472Tyr、326Gln+365Tyr+472Arg、326Lys+365Tyr+472Thr、326Ile+365Phe+472Lys、326Arg+365Arg+472Tyr、326Lys+365Tyr+472Arg、326Lys+365Tyr+472Ser、326Gln+365Tyr+472Tyr, 是在维持对葡萄糖的反应性的同时还降低了与麦芽糖的反应性的、效果显著的变异。

[0137] 即, 在 326 位、365 位及 472 位的 3 个位点的变异组合中的几个组合中, 确认到和变异 GDH(QY) 同等或其以上的协同效果。

[0138] 实施例 4 精制酶的制备 (α 亚单位及 γ 亚单位的复合体)

[0139] 对实施例 3 中已发现了底物特异性改善的 8 种变异 GDH 进行精制。方法如实施例 3 所述。将各精制酶对葡萄糖及麦芽糖的比活性 (U/mg)、反应比(对麦芽糖的比活性/对葡萄糖的比活性)、对葡萄糖的 K_m 值及 V_{max} 示于表 5。

[0140] 其结果, QYA 和麦芽糖的反应比在 10mM 及 5mM 中分别为 1% 左右, 相对于此, ERY

及 KYT 的反应比下降到了 1% 以下, QYY 和麦芽糖的反应比下降至 0.3% 左右。

[0141] [表 5]

	10mM			5mM			葡萄糖			
	Glu (U/mg)			Glu (U/mg)			Glucose			
	Glu (U/mg)	Mal (U/mg)	Mal/Glu(%)	Glu (U/mg)	Mal (U/mg)	Mal/Glu(%)	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Vmax/Km	Mal/Glu (%)
WT his	90.2	23.7	26.3	77.6	15.8	20.4	1.35	100	74.1	10.9
QYA his	55.3	0.56	1.02	32.8	0.41	1.25	4.32	62.9	14.6	2.08
RYT his	5.18	0.05	1.03	2.89	0.03	1.05	27.5	19.1	0.69	1.32
KYK his	5.27	0.09	1.67	3.51	0.05	1.54	10.5	10.9	1.04	1.37
ERY his	9.53	0.08	0.89	6.07	0.05	0.75	22.9	33.4	1.46	2.26
QYR his	41.3	0.44	1.07	25.1	0.37	1.47	5.34	55.6	10.4	1.90
KYT his	33.3	0.21	0.63	19.6	0.16	0.81	8.13	52.1	6.41	3.26
IFK his	5.08	0.23	4.49	3.39	0.13	3.85	6.52	7.70	1.18	2.90
RRY his	2.64	0.04	1.67	2.15	0.03	1.36	3.82	3.82	1.00	2.40
QYY his	32.2	0.09	0.29	20.2	0.07	0.34	13.8	76.3	5.53	計測不可

[0143] DCIP 0.6mM ;PMS 6mM, 室温

[0144] 实施例 5 精制酶的制备 (α 亚单位、 β 亚单位及 γ 亚单位的复合体)

[0145] 对实施例 3 中已发现底物特异性改善的变异 CyGDH(QYY) 进行精制。方法如实施例 3 所述。各精制酶对葡萄糖的比活性 (U/mg) 示于表 6。

[0146] 其结果, 在 α 亚单位、 β 亚单位及 γ 亚单位的复合体的方式中, 与 QYA(326Gln+365Tyr) 相比, QYY(326Gln+365Tyr+472Tyr) 和麦芽糖的反应性降低至约 1/2 ~ 1/3。

[0147] [表 6]

[0148]

葡萄糖 Glucose (mM)	0.1	0.5	1	2	5	7	10	15	20
QYA (U/mg 蛋白质)	1.37	24.7	60.4	131	250	350	420	513	551
QYY (U/mg 蛋白质)	0.80	9.66	35.4	62.7	139	202	233	324	409
WT (U/mg 蛋白质)	5.28	45.2	108	263	421	485	584	631	651
葡萄糖 Glucose (mM)	0.1	0.5	1	2	5	7	10	15	20
QYA (U/mg 蛋白质)	0.009	0.047	0.17	0.14	0.66	0.66	1.38	3.13	3.44
QYY (U/mg 蛋白质)	0.005	0.015	0.03	0.07	0.11	0.31	0.45	0.59	0.99
WT (U/mg 蛋白质)	1.41	5.41	13.9	23.5	42.7	48.7	65.6	80.7	83.4
Mal/Glu	0.1	0.5	1	2	5	7	10	15	20
QYA	0.69%	0.19%	0.28%	0.11%	0.27%	0.19%	0.33%	0.61%	0.62%
QYY	0.62%	0.16%	0.08%	0.12%	0.08%	0.16%	0.19%	0.18%	0.24%
WT	26.7%	12.0%	12.9%	8.95%	10.1%	10.0%	11.2%	12.8%	12.8%

[0149] 实施例 6 对变异酶 (QYX 变异) 的底物特异性的分析

[0150] 和实施例 2 同样操作, 在 pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ 中所含的 GDH α 亚单位基因中, 以使编码该基因的 α 亚单位的 326 位的丝氨酸残基及 365 位的丝氨酸残基分别取代为谷氨酰胺及酪氨酸、且使 472 位的丙氨酸残基取代为其它氨基酸残基的方式引入变异。使用获得的变异酶表达质粒, 和实施例 3 同样操作, 制造变异酶, 研究底物特异性。结果示于下表 7 中。

[0151] [表 7]

[0152]

U/mL 样品	葡萄糖			麦芽糖			5mM	50mM	50mM
	5mM	50mM	5mM / 50mM	5mM	50mM	5mM / 50mM	Mal / 5mM Glc	Mal / 50mM Glc	Mal / 5mM Glc
QYA(野生型)	5.68	14.60	38.9%	0.07	0.36	18.2%	1.1%	2.5%	6.3%
QYC	0.46	0.90	51.7%	0.00	0.05	0.0%	0.0%	5.6%	10.9%
QYD	3.31	12.69	26.1%	0.08	0.28	27.2%	2.3%	2.2%	8.4%
QYE	2.44	11.96	20.4%	0.00	0.16	0.0%	0.0%	1.4%	6.7%
QYF	0.46	8.48	5.5%	0.01	0.05	16.1%	1.8%	0.6%	11.0%
QYG	3.27	9.58	34.2%	0.05	0.12	44.7%	1.7%	1.3%	3.7%
QYH	0.85	6.30	13.5%	0.00	0.07	0.0%	0.0%	1.1%	8.3%
QYI	2.64	10.72	24.7%	0.00	0.18	0.0%	0.0%	1.7%	6.8%
QYK	3.06	9.08	33.8%	0.03	0.34	7.7%	0.9%	3.8%	11.2%
QYL	7.48	20.86	35.8%	0.04	0.27	16.5%	0.6%	1.3%	3.6%
QYM	2.10	11.42	18.4%	0.01	0.29	1.8%	0.3%	2.5%	13.8%
QYN	1.88	14.77	12.7%	0.05	0.23	22.3%	2.7%	1.6%	12.3%
QYP	1.88	7.47	25.2%	0.01	0.06	24.7%	0.7%	0.7%	3.0%
QYQ	4.75	15.41	30.8%	0.06	0.34	17.6%	1.3%	2.2%	7.2%
QYR	4.30	12.58	34.2%	0.06	0.33	19.8%	1.5%	2.6%	7.6%
QYS	2.19	12.00	18.2%	0.00	0.18	0.0%	0.0%	1.5%	8.1%
QYT	3.23	12.54	25.8%	0.06	0.20	32.5%	2.0%	1.6%	6.1%

[0153]

QYV	5.11	15.91	32.1%	0.05	0.31	15.0%	0.9%	1.9%	6.0%
QYW	0.80	9.35	8.6%	0.00	0.11	0.0%	0.0%	1.2%	13.5%
QYY	2.38	14.49	16.4%	0.01	0.09	8.9%	0.3%	0.6%	3.6%

[0154] 其结果,可看出 QYD、QYG、QYK、QYL、QYP、QYQ、QYR、QYT、QYV 及 QYY 是在维持对葡萄糖的反应性的同时对麦芽糖 (Maltose) 的反应性下降的变异。

[0155] 实施例 7 精制酶的制备 (α 亚单位及 γ 亚单位的复合体)

[0156] 对实施例 6 中已发现底物特异性改善的 10 种变异 GDH(QYD、QYG、QYK、QYL、QYP、QYQ、QYR、QYT、QYV 及 QYY) 进行精制。方法如实施例 3 所述。各精制酶对葡萄糖及麦芽糖的比活性 (U/mg)、反应比 (对麦芽糖的比活性 / 对葡萄糖的比活性)、对葡萄糖的 K_m 值及 V_{max} 示于表 8。

[0157] 其结果,不管是哪种变异 GDH,虽然和麦芽糖的反应比都低,但是除 QYY 以外酶活性都下降,这表明不适用于葡萄糖浓度的测定。即表明,在 QYX 所示的 10 种变异 GDH 中,QYY 最适于葡萄糖浓度的测定。

[0158] [表 8]

[0159]

QYY

Km (Glc.) = 30.1 mM

Vmax (Glc.) = 131.6 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	21.89 (100.0%)	28.69 (131.0%)	52.39 (239.3%)
麦芽糖	0.06 (0.3%)	0.13 (0.6%)	0.29 (1.3%)

QYA

Km (Glc.) = 16.1 mM

Vmax (Glc.) = 149.3 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	34.91 (100.0%)	56.61 (162.1%)	83.94 (240.5%)
麦芽糖	0.40 (1.1%)	0.64 (1.8%)	1.45 (4.1%)

QYR

Km (Glc.) = 11.2 mM

Vmax (Glc.) = 93.5 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	30.00 (100.0%)	42.68 (142.3%)	59.73 (199.1%)
麦芽糖	0.32 (1.1%)	0.59 (2.0%)	1.09 (3.6%)

QYD

Km (Glc.) = 24.9 mM

Vmax (Glc.) = 64.1 U/mg protein

QYP

Km (Glc.) = 35.5 mM

Vmax (Glc.) = 74.1 U/mg protein

[0160]

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	10.26 (100.0%)	18.78 (183.1%)	29.32 (285.8%)
麦芽糖	0.02 (0.2%)	0.18 (1.7%)	0.31 (3.0%)

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	9.53 (100.0%)	16.78 (176.0%)	25.23 (264.8%)
麦芽糖	0.09 (0.9%)	0.13 (1.4%)	0.15 (1.6%)

QYG

Km (Glc.) = 15.7 mM

Vmax (Glc.) = 59.2 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	12.92 (100.0%)	23.54 (182.2%)	31.56 (244.3%)
麦芽糖	0.18 (1.4%)	0.25 (1.9%)	0.38 (3.0%)

QYQ

Km (Glc.) = 15.7 mM

Vmax (Glc.) = 65.4 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	15.36 (100.0%)	24.94 (162.4%)	38.55 (251.0%)
麦芽糖	0.21 (1.4%)	0.42 (2.7%)	1.03 (6.7%)

QYK

Km (Glc.) = 10.8 mM

Vmax (Glc.) = 78.7 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	28.02 (100.0%)	33.68 (120.2%)	52.64 (187.8%)
麦芽糖	0.48 (1.7%)	0.65 (2.3%)	1.23 (4.4%)

QYT

Km (Glc.) = 36.3 mM

Vmax (Glc.) = 88.5 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	9.68 (100.0%)	20.44 (211.3%)	32.87 (339.7%)
麦芽糖	0.14 (1.5%)	0.21 (2.2%)	0.33 (3.4%)

QYL

Km (Glc.) = 13.4 mM

Vmax (Glc.) = 94.3 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	23.95 (100.0%)	37.28 (155.7%)	57.03 (238.1%)
麦芽糖	0.23 (1.0%)	0.34 (1.4%)	0.66 (2.8%)

QYV

Km (Glc.) = 18.3 mM

Vmax (Glc.) = 108.7 U/mg protein

U/mg	5mM	10mM	20mM
葡萄糖	27.25 (100.0%)	35.53 (130.4%)	54.04 (198.3%)
麦芽糖	0.15 (0.6%)	0.32 (1.2%)	0.80 (2.9%)

(DCIP f.c. 0.06mM, PMS f.c 6mM, 10Mm PPB pH7.0)

[0161] 实施例 8 使用变异 CyGDH 的血糖测定用比色式传感器的制作

[0162] 对于比活性最优异的 QYY, 使用实施例 5 获得的精制变异酶制作葡萄糖传感器。

[0163] 制作具有图 1 所示的基本结构的葡萄糖传感器。即, 上述葡萄糖传感器具有借助隔板 3 对透明基板 2 层叠透明罩 4 (材质 PET) 的形式, 利用各要素 2 ~ 4 来界定毛细管 5。毛细管 5 的尺寸为 1.3mm×9mm×50 μm (图 1)。透明基板 2 及透明罩 4 由厚度为 250 μm 的 PET 形成, 隔板 3 由黑色的双面胶带构成。

[0164] 葡萄糖传感器具有图 2 所示的第 1 试剂部 ~ 第 3 试剂部, 各自的成分及涂布量示于表 9。表中, “Ru”表示氯化钌六胺络合物 ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$), ACES 表示 N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸, WST-4 表示 2-苯并噻唑基-3-(4-羧基-2-甲氧苯基)-5-[4-(2-磺乙基氨基甲酰)苯基]-2H-四氮唑, SWN 表示硅酸钠镁锂 (Lithium Magnesium Sodium Silicate)。

[0165] [表 9]

[0166] 第 1 试剂部

[0167] 含有电子传递物质的试剂部用材料液（溶剂为水）

[0168]

Ru	涂布量
60mM	0.5 μ l

[0169] 第 2 试剂部

[0170] 含有酶的试剂部用材料（溶剂为水）

[0171]

酶浓度	棉籽糖	蔗糖单月桂酸酯	ACES (pH7.5)	涂布量
12KU/ml	1.0%	0.1%	100mM	0.2 μ l

[0172] 第 3 试剂部

[0173] 含有发色剂的试剂部用材料液（溶剂为水）

[0174]

WST-4	SWN	涂布量
约 50mM	0.16%	0.4 μ l

[0175] 将测定试料供给至上述葡萄糖传感器的毛细管，标绘从供给时刻起 5 秒后末端的吸光度。在每次的吸光度的测定中，对于第 3 试剂部，沿毛细管高度方向照射光，此时接收透过葡萄糖传感器的光。通过使用发光二极管照射 630nm 的光来进行光的照射。在光电二极管中接收透过光。

[0176] 关于麦芽糖的影响，在将麦芽糖添加到葡萄糖 50mg/dl 中的情况下，对于野生型而言，依赖于麦芽糖浓度吸光度大幅度增加，这表示和麦芽糖强烈反应。另一方面，对使用了变异 CyGDH(QY) 的传感器而言，发现与麦芽糖浓度相应的吸光度的增加受到抑制，麦芽糖的影响变小。进而，对使用了变异 CyGDH(QYY) 的传感器而言，发现与麦芽糖浓度相应的吸光度的增加进一步受到抑制，麦芽糖的影响变小。图 3 示出将这些数据换算成表观血糖上升值的结果。

[0177] 对使用野生型酶的传感器而言，低血糖（50mg/dl 葡萄糖）因混入麦芽糖而表观显示在正常范围以上的（174.8mg/dl 葡萄糖）（变化率为 300%）。另外，即使是使用了变异 CyGDH(QY) 的传感器，也因混入麦芽糖而表观显示为 64.8mg/dl 葡萄糖（变化率为 54%）。另一方面，对使用了变异 CyGDH(QYY) 的传感器而言，即使在混入麦芽糖最多达 300mg/dl 的情况下，表观血糖值最大也只上升到 46.1mg/dl，可以说影响受到了大幅度抑制（变化率为 14%）。作为结论，表示从对葡萄糖的反应性（线性）和麦芽糖影响的观点考虑，QYY 变异体最佳。

[0178] 由如上结果可知，对使用了变异 CyGDH(QYY) 的葡萄糖传感器而言，与使用了变异 CyGDH(QY) 的葡萄糖传感器相比，能大幅度降低和麦芽糖的反应性。如果用使用了该变异 CyGDH(QYY) 的葡萄糖传感器，则在通过医院等给药的血中麦芽糖浓度上限值即 200mg/dl

中,可以说没有正误差,即使在上限值以上的300mg/dl中,也不会将低血糖(50mg/dl以下)判定为正常值或高血糖,可以进行安全治疗。

[0179] 实施例 9 使用了变异 CyGDH 的电极式血糖传感器的制作

[0180] 对于比活性最优异的 QYY,使用实施例 5 获得的精制变异酶制作电极式葡萄糖传感器。

[0181] (制作步骤)

[0182] 参照图 5 将电极式葡萄糖传感器的制作方法示于下文中。准备 PET 制基板(长度 28mm、宽度 7mm、厚度 250 μ m)作为绝缘基板 1,在其一个表面上,通过碳素墨水的丝网印刷,形成由分别具有引线部 2 及 3 的作用极 4 及 5 构成的碳电极系。接着,制作绝缘性软膏,并将其丝网印刷在上述电极上制成绝缘层 6,将没有形成上述绝缘层的部分制成检测部及引线部。然后,将作为合成蒙脱石的商品名“Lucentite(ルーセントイト)SWN”(日本科普化工股份有限公司(コープケミカル株式会社)制)0.6g 悬浮在精制水 100mL 中并搅拌约 8~24 小时。在该合成蒙脱石悬浮液 10mL 中,依次添加 10%(w/v)CHAPS(同仁化学研究所制)水溶液 0.1mL、1.0M 的 ACES 缓冲液(pH 7.4:同仁化学研究所制)5.0mL、精制水 4.0mL,进而混合作为介质的 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (Aldrich 株式会社制)1.0g。将该混合液 1.0 μ L 分注于检测部。然后,使其在 30℃、相对湿度 10%的条件下干燥 10 分钟,形成试剂层 7。进而,在上述试剂层 7 上形成酶试剂层 8。酶试剂层 8 是将 2700U/mL 的本申请发明的葡萄糖脱氢酶水溶液 1.0 μ L 分注于检测部的试剂层上并在 30℃、相对湿度 10%的条件下干燥 10 分钟而形成的。最后,将具有缝隙 15 的隔板 11 配置在绝缘层上,进而,在上述隔板上配置具有形成通气孔 14 的贯通孔的罩 12,制成生物传感器。

[0183] 关于麦芽糖的影响,在将麦芽糖添加到葡萄糖 50mg/dl 中的情况下,对于野生型而言,依赖于麦芽糖浓度电流值大幅度增加,这表示和麦芽糖强烈反应。另一方面,对使用了变异 CyGDH(QY)的传感器而言,发现与麦芽糖浓度相应的电流值的增加受到抑制,麦芽糖的影响变小。对使用了变异 CyGDH(QYY)的传感器而言,发现与麦芽糖浓度相应的电流值的增加进一步受到抑制,麦芽糖的影响变小。图 4 示出了将这些数据换算成表观血糖上升值的结果。

[0184] 对使用野生型酶的传感器而言,低血糖(50mg/dl 葡萄糖)因混入麦芽糖而表观显示在正常范围以上的(288.2mg/dl 葡萄糖)(变化率为 549%)。另外,即使是使用了变异 CyGDH(QY)的传感器,也因混入麦芽糖而表观显示为 93.9mg/dl 葡萄糖(变化率为 114%)。另一方面,对使用了变异 CyGDH(QYY)的传感器而言,即使在混入麦芽糖最多为 300mg/dl 的情况下,表观血糖值最大也只上升到 60.0mg/dl,可以说影响受到了大幅度抑制(变化率为 37%)。作为结论,表示从对葡萄糖的反应性(线性)和麦芽糖影响的观点考虑, QYY 变异体最佳。

[0185] 由如上结果可知,对使用了变异 CyGDH(QYY)的葡萄糖传感器而言,与使用了变异 CyGDH(QY)的葡萄糖传感器相比,能大幅度降低和麦芽糖的反应性。如果用使用了该变异 CyGDH(QYY)的葡萄糖传感器,则在通过医院等给药的血中麦芽糖浓度上限值即 200mg/dl 中,可以说没有正误差,即使在上限值以上的 300mg/dl 中,也不会将低血糖(50mg/dl 以下)判定为正常值或高血糖,可以进行安全治疗。

[0186] 实施例 10 向 GDH 同系物引入变异

[0187] 和实施例 1 同样操作,准备表达新洋葱伯克霍尔德菌 J2315 株的假定的氧化还原酶、Burkholderia thailandensis TXD0H 株的假定蛋白 BthaT-07876、皮氏罗尔斯顿氏菌 12D 株的 FAD 依赖型氧化还原酶、茄科雷尔氏菌 IP01609 株的跨膜脱氢酶及 Burkholderia phytofirmans PsJN 株的葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶的各 α 亚单位及 γ 亚单位的质粒。

[0188] 这些表达质粒为连续包含 γ 亚单位结构基因和 α 亚单位结构基因的 DNA 片段插入作为载体 pET30c(+) (Novagen 株式会社) 的克隆位点的 NdeI/HindIII 中而形成的质粒。本质粒中的 $\gamma\alpha$ 基因通过 T7 启动子来控制。本质粒保持有卡那霉素抗性基因。

[0189] 对于上述质粒中含有的 α 亚单位基因,以使洋葱伯克霍尔德菌 KS1 株的野生型 GDH α 亚单位中的相应于 326 位、365 位及 472 位的残基分别取代成谷氨酰胺、酪氨酸及酪氨酸的方式,使用市场上出售的位点特异性变异引入试剂盒 (Stratagene 株式会社、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit) 引入变异。

[0190] 将用于上述氨基酸残基取代的正向引物的序列示于以下。反向引物的序列形成正向引物的完全互补链。

[0191] 此外,在表示变异的表述中,数字表示氨基酸序列中的位置,数字前的字母表示氨基酸取代前的氨基酸残基,数字后的字母表示氨基酸取代后的氨基酸残基。例如, R53F 表示 53 位的由精氨酸向苯基丙氨酸的取代。

[0192] 对于 PCR 反应而言,用以下的反应组成,在 95℃、30 秒后,重复 15 次 95℃、30 秒; 55℃、1 分钟; 68℃、8 分钟的循环,在 68℃ 进行 30 分钟的反应后,在 4℃ 下保持。

[0193] [反应液组成]

[0194]

模板 DNA (5ng/ μ l)	2 μ l
(3 变异引入 pTrc99A/ γ + α 及 pTrc99A $\gamma\alpha\beta$)	
10 $\times$ 反应缓冲液	5 μ l
正向引物 (100ng/ μ l)	1.25 μ l
反向引物 (100ng/ μ l)	1.25 μ l

[0195]

dNTP	1 μ l
蒸馏水	38.5 μ l
DNA 聚合酶	1 μ l
合计	50 μ l

[0196] PCR 反应后,在反应液中添加 0.5 μ l 的 DpnI,在 37℃ 下孵育 1 小时,使模板质粒分解。

[0197] 使用获得的反应液转化大肠杆菌 DH5 α (supE44, Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1) 的感受态细胞。由数个在包含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 及卡那霉素 (30 μ g/ml) 的 LB 琼脂培养基 (细菌用胰蛋白胨 1%、酶提取液 0.5%、NaCl 1%、琼脂 1.5%) 上生长的菌落制备质粒 DNA,进行序列分析,确认了在各 α

亚单位基因中引入了目标变异。

[0198] [表 10]

[0199]

新洋葱伯克霍尔德菌 J2315 株假定的氧化还原酶变异引入用正向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S326Q	5' GGGCACCGGCGTGCAAGTTCTATGCGAACGAG 3'	序列号 58
S365Y	5' GAAGAAGATCCACCTGTACAACATGTCGCGCATCAAC 3'	序列号 59
A472Y	5' GTCGTGTTCAACGACGAATTCTACCCGAACAATCACATCACGGG 3'	序列号 60

新洋葱伯克霍尔德菌 J2315 株假定的氧化还原酶变异引入用反向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S326Q	5' CTCGTTGCGATAGAACTGCACGCCGGTGCCC 3'	序列号 61
S365Y	5' GTTGATGCGCGACATGTTGTACAGGTGGATCTTCTTC 3'	序列号 62
A472Y	5' CCCGTGATGTGATTGTTCCGGGTAGAATTCGTCGTTGAACACGAC 3'	序列号 63

Burkholderia thailandensis TXDOH 株假定蛋白 BthaT-07876 变异引入用正向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S324Q	5' GGGCACCGGCGTGCAAGTTCTATGCGAGCGAG 3'	序列号 64
S363Y	5' GAAGAAGATCCACCTGTACAACCTGTCGCGCATCGAC 3'	序列号 65
A470Y	5' GTCGTGTTCAACGACGAATTCTACCCGAACAATCACATCACGGG 3'	序列号 60

[0200]

Burkholderia thailandensis TXDOH 株假定蛋白 BthaT-07876 变异引入用反向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S324Q	5' CTCGCTCGCATAGAACTGCACGCCGGTGCCC 3'	序列号 66
S363Y	5' GTCGATGCGCGACAGGTTGTACAGGTGGATCTTCTTC 3'	序列号 67
A470Y	5' CCCGTGATGTGATTGTTCCGGGTAGAATTCGTGTTGAACACGAC 3'	序列号 63

皮氏罗尔斯顿氏菌 12D 株 FAD 依赖型氧化还原酶变异引入用正向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S327Q	5' GGGCACCGGCGTGCAGTTCTATGCGGACCGC 3'	序列号 68
S366Y	5' CAAGAAGCTGCACCTGTACAACATCTCGCGCATCGAG 3'	序列号 69
A473Y	5' GTCGAGTTCACGACGACTTCTACCCGAACAATCACATCACGGG 3'	序列号 70

皮氏罗尔斯顿氏菌 12D 株 FAD 依赖型氧化还原酶变异引入用反向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S327Q	5' GCGGTCCGCATAGAACTGCACGCCGGTGCCC 3'	序列号 71
S366Y	5' CTCGATGCGCGAGATGTTGTACAGGTGCAGCTTCTTG 3'	序列号 72
A473Y	5' CCCGTGATGTGATTGTTCCGGGTAGAAGTCGTGGAACTCGAC 3'	序列号 73

茄科雷尔氏菌 IPO1609 株跨膜脱氢酶变异引入用正向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S327Q	5' GGGCACCGGCGTGCAGTTCTATGCGGACCGC 3'	序列号 68
S366Y	5' CAAGAAGCTGCACCTGTACAACATCTCGCGCATCGAG 3'	序列号 69
A473Y	5' GTCCAGTTCACGACGACTTCTACCCGAACAATCACATCACGGG 3'	序列号 74

茄科雷尔氏菌 IPO1609 株跨膜脱氢酶变异引入用反向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S327Q	5' GCGGTCCGCATAGAACTGCACGCCGGTGCCC 3'	序列号 71
S366Y	5' CTCGATGCGCGAGATGTTGTACAGGTGCAGCTTCTTG 3'	序列号 72
A473Y	5' CCCGTGATGTGATTGTTCCGGGTAGAAGTCGTGGAACGGAC 3'	序列号 75

Burkholderia phytofirmans PsJN 株葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶变异引入用正向引物

[0201]

氨基酸取代	序列	序列号
S322Q	5' GGGCACC GCGTGCAGTTCCTGGCGAACGAG 3'	序列号 76
S361Y	5' GAAGAAGCTGCACCTGTACAACGGCGTCCCGACGATG 3'	序列号 77
A466Y	5' GTCACGTTGACGACACGTTCTACCGAACAAATCACATCATGGG 3'	序列号 78

Burkholderia phytofirmans PsJN 株葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶变异引入用反向引物

氨基酸取代	序列	序列号
S322Q	5' CTCGTTGCGCCAGGAAGTGCACGCCGGTGCCC 3'	序列号 79
S361Y	5' CATCGTCGGGACGCCGTTGTACAGGTGCAGCTTCTTC 3'	序列号 80
A466Y	5' CCCATGATGTGATTGTTCCGGGTAGAACGTGTCGTCGAACGTGAC 3'	序列号 81

[0202] 实施例 11 变异酶的底物特异性的分析

[0203] 使用实施例 10 获得的变异酶表达质粒,制造变异酶,研究底物特异性

[0204] (1) 培养

[0205] 用变异酶表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) (F⁻, dcm, ompT, hsdS (rB-mB⁻), gal, λ (DE3)) 的感受态细胞。将获得的转化体使用各 3ml 的 LB 培养基 (含有卡那霉素 25 μg/ml)、用 L 形管在 37℃ 下振荡培养一晚。将这些培养液接种在含有 100ml 的 LB 培养基 (含有 0.5% 的甘油、0.05% 的葡萄糖、0.2% 的乳糖、100mM 的 PO₄³⁻、25mM 的 SO₄²⁻、50mM 的 NH₄⁺、100mM 的 Na⁺、50mM 的 K⁺、1mM 的 MgSO₄ 及卡那霉素 25 μg/ml) 的 500ml 的斜口烧瓶中,在 20℃ 下振荡培养 24 小时。

[0206] (2) 粗制酶样品的制备

[0207] 从上述培养的培养液中收集菌体,洗涤后,将菌体悬浮在相对每 0.1g 湿菌体而言 1ml 的 10mM 的磷酸钾缓冲剂 (PPB) (pH 7.0) 中,进行超声波粉碎。将该悬浮液进行离心分离 (10000r. p. m、10 分钟、4℃) 除去残渣,然后将上清液进行超离心分离 (50,000r. p. m. 60 分钟、4℃),将获得的上清液 (水溶性级分) 作为粗制酶样品。

[0208] (3) GDH 活性的测定

[0209] 在上述粗制酶试样 10 μl 中添加 170 μl 活性测定用试剂 (在 94 μl 的 600mM 吩嗪硫酸甲酯 (PMS)、9.4 μl 的 6mM 的 2,6-二氯靛酚 (DCIP) 中添加 10mM 的 PPB,制成总量 8ml 的溶液)。在其中添加 20 μl 的各浓度的底物 (葡萄糖或麦芽糖) 或蒸馏水并搅拌,使用分光光度计测定来自 DCIP 的吸收波长 600nm 的吸光度。各试剂的最终浓度为 :DCIP :0.06mM、PMS :0.6mM。

[0210] 结果示于表 11。可以确认,无论哪种变异酶,与变异引入前的野生型酶相比,均呈现为与麦芽糖的反应性降低、对葡萄糖的底物特异性提高。

[0211] [表 11]

[0212]

		10mM			5mM			Glc			Mal		
		Glc (μ /mL)	Mal (μ /mL)	Mal/Glc	Glc (μ /mL)	Mal (μ /mL)	Mal/Glc	K _m (mM)	V _{max} (μ /mL)	V _{max} /K _m	K _m (mM)	V _{max} (μ /mL)	V _{max} /K _m
<i>B.cenocepacia</i> J2315	WT	2.02	1.64	80.8%	2.02	1.48	72.9%	0.11	2.05	18.6	1.3	1.87	1.44
假定的氧化还原酶	QYY	11.4	0.31	2.7%	7.59	0.15	2.0%	20.3	39.2	1.93	>100	-	-
<i>B.thailandensis</i> TXD0H	WT	20.1	12.0	59.8%	19.6	9.58	49.0%	0.31	20.7	66.8	2.67	15.5	5.81
假定的蛋白 BthaT_07876	QYY	20.7	0.22	1.1%	13.6	0.13	1.0%	13.6	48.9	3.75	>100	-	-
<i>R.pirkettii</i> 12D	WT	0.94	0.78	82.5%	0.89	0.68	76.6%	0.36	1.03	2.86	2.02	0.94	0.47
FAD 依赖性氧化还原酶	QYY	0.73	0.09	3.7%	0.50	0.02	3.0%	11.9	1.62	0.15	>100	-	-
<i>R.solanacearum</i> P01609	WT	0.13	0.11	83.6%	0.12	0.09	74.7%	0.59	0.14	0.24	2.64	0.14	0.05
跨膜脱氢酶	QYY	0.58	0.01	2.4%	0.40	0.01	2.2%	13.9	1.86	0.11	>100	-	-

[0213] 以上结果表明,即使在洋葱伯克霍尔德菌以外的 GDH 同源物中, QYY 变异也有效。

[0214] 产业上的可应用性

[0215] 本发明的变异 GDH 对葡萄糖的底物特异性提高,因此可以适用于使用葡萄糖传感器等的葡萄糖测定。

[0001]

序列表

<110> 爱科来株式会社
生物工程实验室有限责任公司

<120> 变异葡萄糖脱氢酶

<130> OP-11239

<150> JP2010-240426

<151> 2010-10-27

<160> 57

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2467

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (258).. (761)

<220>

<221> CDS

<222> (764).. (2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386).. (2466)

<400> 1

```

aagctttctg tttgattgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120
tacgaatgga tgacacattg aatggactat aaaaccattg tccgttccgg aatgtgcgcg 180
tacatttcag gtccgcgcgg atllttgaga aatatcaagc gtggttttcc cgaatccggt 240
gttcgagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tcg cgt cgc 290
Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg
      1          5          10
cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa 338
His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln
      15          20          25
ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg 386
Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu
      30          35          40
cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg 434
Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met
      45          50          55
acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc 482
Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile
      60          65          70          75
ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc 530
Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala
      80          85          90
gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg 578
Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr
      95          100          105

```

[0002]

cct gaa cag gaa tgc ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc	626
Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu	
110 115 120	
ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc	674
Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe	
125 130 135	
ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tgc tat tgc ccc aac aaa	722
Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys	
140 145 150 155	
ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc	769
Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala	
160 165 170	
gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tgc ggt gtc	817
Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val	
175 180 185	
gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg	865
Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val	
190 195 200	
atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag	913
Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu	
205 210 215	
cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg	961
Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro	
220 225 230	
tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac	1009
Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr	
235 240 245 250	
ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg	1057
Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala	
255 260 265	
gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att	1105
Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile	
270 275 280	
ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg	1153
Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp	
285 290 295	
ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa	1201
Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu	
300 305 310	
gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg	1249
Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro	
315 320 325 330	
cgc aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag	1297
Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu	
335 340 345	
cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc	1345
Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val	
350 355 360	
gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc cgc ccg	1393
Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro	
365 370 375	
act tgt tgc ggc aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg	1441
Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala	
380 385 390	
atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg	1489
Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala	
395 400 405 410	
aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac	1537

[0003]

Lys	Leu	Ile	Glu	Asn	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Thr	Gly	Pro	Asp	
				415					420					425		
aag	cgc	atc	gtc	gcg	gcg	ctc	tac	aag	gac	aag	acg	ggc	gcc	gag	cat	1585
Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Ala	Leu	Tyr	Lys	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	Glu	His	
			430					435				440				
cgc	gtc	gaa	ggc	aag	tat	ttc	gtg	ctc	gcc	gcg	aac	ggc	atc	gag	acg	1633
Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Ile	Glu	Thr	
		445					450					455				
ccg	aag	atc	ctg	ctg	atg	tcc	gcg	aac	cgc	gat	ttc	ccg	aac	ggc	gtc	1681
Pro	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Ser	Ala	Asn	Arg	Asp	Phe	Pro	Asn	Gly	Val	
	460					465					470					
gcg	aac	agc	tcg	gac	atg	gtc	ggc	cgc	aac	ctg	atg	gac	cat	ccg	ggc	1729
Ala	Asn	Ser	Ser	Asp	Met	Val	Gly	Arg	Asn	Leu	Met	Asp	His	Pro	Gly	
475				480				485				490				
acc	ggc	gtg	tcg	ttc	tat	gcg	agc	gag	aag	ctg	tgg	ccg	ggc	cgc	ggc	1777
Thr	Gly	Val	Ser	Phe	Tyr	Ala	Ser	Glu	Lys	Leu	Trp	Pro	Gly	Arg	Gly	
			495					500				505				
ccg	cag	gag	atg	acg	tcg	ctg	atc	ggc	ttc	cgc	gac	ggc	ttc	cgc		1825
Pro	Gln	Glu	Met	Thr	Ser	Leu	Ile	Gly	Phe	Arg	Asp	Gly	Pro	Phe	Arg	
		510					515					520				
gcg	acc	gaa	gcg	gcg	aag	aag	atc	cac	ctg	tcg	aac	ctg	tcg	cgc	atc	1873
Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Ile	His	Leu	Ser	Asn	Leu	Ser	Arg	Ile	
	525					530						535				
gac	cag	gag	acg	cag	aag	atc	ttc	aag	gcc	ggc	aag	ctg	atg	aag	ccc	1921
Asp	Gln	Glu	Thr	Gln	Lys	Ile	Phe	Lys	Ala	Gly	Lys	Leu	Met	Lys	Pro	
	540					545					550					
gac	gag	ctc	gac	gcg	cag	atc	cgc	gac	cgl	tcc	gca	cgc	tac	gtg	cag	1969
Asp	Glu	Leu	Asp	Ala	Gln	Ile	Arg	Asp	Arg	Ser	Ala	Arg	Tyr	Val	Gln	
555				560				565				570				
ttc	gac	tgc	ttc	cac	gaa	atc	ctg	ccg	caa	ccc	gag	aac	cgc	atc	gtg	2017
Phe	Asp	Cys	Phe	His	Glu	Ile	Leu	Pro	Gln	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Val	
			575					580				585				
ccg	agc	aag	acg	gcg	acc	gat	gcg	atc	ggc	att	ccg	cgc	ccc	gag	atc	2065
Pro	Ser	Lys	Thr	Ala	Thr	Asp	Ala	Ile	Gly	Ile	Pro	Arg	Pro	Glu	Ile	
		590					595					600				
acg	tat	gcg	atc	gac	gac	tac	gtg	aag	cgc	ggc	gcc	gcg	cat	acg	cgc	2113
Thr	Tyr	Ala	Ile	Asp	Asp	Tyr	Val	Lys	Arg	Gly	Ala	Ala	His	Thr	Arg	
	605					610						615				
gag	gtc	tac	gcg	acc	gcc	gcg	aag	gtg	ctc	ggc	ggc	acg	gac	gtc	gtg	2161
Glu	Val	Tyr	Ala	Thr	Ala	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Gly	Thr	Asp	Val	Val	
	620					625						630				
ttc	aac	gac	gaa	ttc	gcg	ccg	aac	aat	cac	atc	acg	ggc	tcg	acg	atc	2209
Phe	Asn	Asp	Glu	Phe	Ala	Pro	Asn	Asn	His	Ile	Thr	Gly	Ser	Thr	Ile	
635				640				645				650				
atg	ggc	gcc	gat	gcg	cgc	gac	tcc	gtc	gtc	gac	aag	gac	tgc	cgc	acg	2257
Met	Gly	Ala	Asp	Ala	Arg	Asp	Ser	Val	Val	Asp	Lys	Asp	Cys	Arg	Thr	
			655					660				665				
ttc	gac	cat	ccg	aac	ctg	ttc	att	tcg	agc	agc	gcg	acg	atg	ccg	acc	2305
Phe	Asp	His	Pro	Asn	Leu	Phe	Ile	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Met	Pro	Thr	
		670					675					680				
gtc	ggc	acc	gta	aac	gtg	acg	ctg	acg	atc	gcc	gcg	ctc	gcg	ctg	cgg	2353
Val	Gly	Thr	Val	Asn	Val	Thr	Leu	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	
		685				690						695				
atg	tcg	gac	acg	ctg	aag	aag	gaa	gtc	tgacc	gtg	cgg	aaa	tct	act	ctc	2403
Met	Ser	Asp	Thr	Leu	Lys	Lys	Glu	Val		Val	Arg	Lys	Ser	Thr	Leu	
	700					705						710				
act	ttc	ctc	atc	gcc	ggc	tgc	ctc	gcg	ttg	ccg	ggc	ttc	gcg	cgc	gcg	2451
Thr	Phe	Leu	Ile	Ala	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Phe	Ala	Arg	Ala	

[0004]

```

      715      720      725
gcc gat gcg gcc gat c
Ala Asp Ala Ala Asp
730

<210> 2
<211> 168
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 2
Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala
 1          5          10          15
Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu
      20          25          30
Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp
      35          40          45
Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser
      50          55          60
Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu
      65          70          75          80
Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln
      85          90          95
Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser
      100          105          110
Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn
      115          120          125
Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp
      130          135          140
Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala
      145          150          155          160
Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala
      165

<210> 3
<211> 539
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 3
Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1          5          10          15
Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
      20          25          30
Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
      35          40          45
Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
      50          55          60
Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
      65          70          75          80
Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
      85          90          95
Arg Ala Val Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
      100          105          110
Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
      115          120          125
Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
      130          135          140

```

[0005]

Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175
 Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190
 His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
 195 200 205
 Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
 210 215 220
 Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
 245 250 255
 Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
 260 265 270
 Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
 275 280 285
 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
 290 295 300
 Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
 305 310 315 320
 Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly
 325 330 335
 Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
 340 345 350
 Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser
 355 360 365
 Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met
 370 375 380
 Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr
 385 390 395 400
 Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg
 405 410 415
 Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro
 420 425 430
 Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His
 435 440 445
 Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp
 450 455 460
 Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser
 465 470 475 480
 Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
 485 490 495
 Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met
 500 505 510
 Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
 515 520 525
 Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
 530 535

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu

[0006]

```

      1           5           10           15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp

      20           25

<210> 5
<211> 1441
<212> DNA
<213> Burkholderia cepacia

<220>
<221> CDS
<222> (121).. (1398)

<400> 5
tccgaacctg ttcatttcga gcagcgcgac gatgccgacc gtcggtaccg taaacgtgac 60
gttgacgata gccgcgctcg cgtcgcggat gtcggacacg ctgaagaagg aagtctgacc 120
gtg cgg aaa tct act ctc act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg 168
Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
      1           5           10           15
cgg ggc ttc gcg cgc gcc gat gcg gcc gat ccg gcg ctg gtc aag 216
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
      20           25           30
cgc ggc gaa tac ctc gcg acc gcc ggc gac tgc atg gcc tgc cac acc 264
Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Gly Asp Cys Met Ala Cys His Thr
      35           40           45
gtg aag ggc ggc aag ccg tac gcg ggc ggc ctt ggc atg ccg gta ccg 312
Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly Met Pro Val Pro
      50           55           60
atg ctc ggc aag atc tac acg agc aac atc acg ccc gat ccc gat acg 360
Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr
      65           70           75           80
ggc atc ggc aaa tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg gtg cgg cac 408
Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
      85           90           95
ggc gtg tcg aag aac ggc gac aac ctg tat ccg gcg atg ccg tac gtg 456
Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
      100           105           110
tcg tac gcg aag atc acg gac gac gac gta cgc gcg ctg tac gcc tac 504
Ser Tyr Ala Lys Ile Thr Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
      115           120           125
ttc atg cac ggc gtc gag ccg gtc aag cag gcg ccg ccg aag aac gag 552
Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
      130           135           140
att ccc gcg ctg ctc agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg 600
Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
      145           150           155           160
ctg ttc ctg aag gac ggc ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc 648
Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala
      165           170           175
gaa tgg aat cgc ggc gcg tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc 696
Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
      180           185           190
acg tgc cac acg ccg cgc gcc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac 744
Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
      195           200           205
gaa acc ggc ggc agc ttc ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac 792
Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
      210           215           220

```

[0007]

```

ggc tac aac atc acg tcg gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg 840
Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr
225                230                235                240
cag cag cag ctc gtg cag tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc 888
Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val
245                250                255
ggc cag gcg gcc ggg ccg atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg 936
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser
260                265                270
aag atg acc gaa gcg gac atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg 984
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr
275                280                285
gtg ccg gcc gtt gcc gac agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg 1032
Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp
290                295                300
ggc aag ccg gcc gag gac ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg 1080
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
305                310                315                320
tcg tcg ggc atc gat ccg gcg ccg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg 1128
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
325                330                335
tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tcg 1176
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser
340                345                350
ctg ttc cac aac tcc acc gtc ggc gcg tcg aat ccg tcg aac ctc gtg 1224
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val
355                360                365
cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc 1272
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
370                375                380
ggg atg ccc gct ttc cgc tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg 1320
Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
385                390                395                400
ctg acg aac tac gtg acc gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg 1368
Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
405                410                415
acg gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga catagtcggg cgcgccgaca 1418
Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
420                425
cggcgcaacc gataggacag gag 1441

```

<210> 6

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 6

```

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
1          5          10          15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
20        25        30
Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Gly Asp Cys Met Ala Cys His Thr
35        40        45
Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly Met Pro Val Pro
50        55        60
Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr
65        70        75        80
Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His

```

[0008]

				85						90					95				
Gly	Val	Ser	Lys	Asn	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Pro	Ala	Met	Pro	Tyr	Val				
			100					105					110						
Ser	Tyr	Ala	Lys	Ile	Thr	Asp	Asp	Asp	Val	Arg	Ala	Leu	Tyr	Ala	Tyr				
		115					120					125							
Phe	Met	His	Gly	Val	Glu	Pro	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Lys	Asn	Glu				
	130					135					140								
Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Ser	Met	Arg	Trp	Pro	Leu	Lys	Ile	Trp	Asn	Trp				
145					150					155					160				
Leu	Phe	Leu	Lys	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gln	Pro	Lys	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala				
			165					170					175						
Glu	Trp	Asn	Arg	Gly	Ala	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Leu	Ala	His	Cys	Ser				
		180						185					190						
Thr	Cys	His	Thr	Pro	Arg	Gly	Ile	Ala	Met	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Asp				
	195					200						205							
Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Ala	Gly	Trp	Asp				
	210					215				220									
Gly	Tyr	Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Pro	Asn	Ala	Gly	Ile	Gly	Ser	Trp	Thr				
225					230				235						240				
Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Gln	Tyr	Leu	Arg	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Gly	Val				
			245					250					255						
Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Pro	Met	Ala	Glu	Ala	Val	Glu	His	Ser	Phe	Ser				
		260						265					270						
Lys	Met	Thr	Glu	Ala	Asp	Ile	Gly	Ala	Ile	Ala	Thr	Tyr	Val	Arg	Thr				
	275					280						285							
Val	Pro	Ala	Val	Ala	Asp	Ser	Asn	Ala	Lys	Gln	Pro	Arg	Ser	Ser	Trp				
	290					295					300								
Gly	Lys	Pro	Ala	Glu	Asp	Gly	Leu	Lys	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Leu	Ala				
305					310					315					320				
Ser	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala	Arg	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asn	Cys	Ala	Thr				
			325						330				335						
Cys	His	Gln	Met	Gln	Gly	Lys	Gly	Thr	Pro	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Ser				
		340						345					350						
Leu	Phe	His	Asn	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Asn	Leu	Val				
	355						360					365							
Gln	Val	Ile	Leu	Asn	Gly	Val	Gln	Arg	Lys	Ile	Gly	Ser	Glu	Asp	Ile				
	370					375					380								
Gly	Met	Pro	Ala	Phe	Arg	Tyr	Asp	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Ala				
385					390					395					400				
Leu	Thr	Asn	Tyr	Val	Thr	Ala	Gln	Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Val				
			405					410					415						
Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Lys	Leu	Arg											
			420					425											

<210> 7
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cenocepacia

<400> 7

Met	Ala	Asp	Thr	Asp	Thr	Gln	Lys	Ala	Asp	Val	Val	Val	Val	Gly	Ser
1				5					10					15	

Gly	Val	Ala	Gly	Ala	Ile	Val	Ala	His	Gln	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Lys
		20					25						30		

[0009]

Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
35 40 45

Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
50 55 60

Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
65 70 75 80

Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
85 90 95

Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
100 105 110

Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Ala Arg
115 120 125

Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu His Trp Tyr Gln Arg Ala
130 135 140

Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Pro Arg Lys Gln Ala Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
165 170 175

Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe
180 185 190

His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
195 200 205

Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
210 215 220

Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln Ala
225 230 235 240

Gly Ala Lys Leu Ile Asp Ser Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
245 250 255

[0010]

Pro	Asp	Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Lys	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	260	265	270	
Asp	His	Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Ile	275	280	285	
Glu	Thr	Pro	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Ser	Ala	Asn	Arg	Asp	Phe	Pro	Asn	290	295	300	
Gly	Val	Ala	Asn	Ser	Ser	Asp	Met	Val	Gly	Arg	Asn	Leu	Met	Asp	His	305	310	315	320
Pro	Gly	Thr	Gly	Val	Ser	Phe	Tyr	Ala	Asn	Glu	Lys	Leu	Trp	Pro	Gly	325	330	335	
Arg	Gly	Pro	Gln	Glu	Met	Thr	Ser	Leu	Ile	Gly	Phe	Arg	Asp	Gly	Pro	340	345	350	
Phe	Arg	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Ile	His	Leu	Ser	Asn	Met	Ser	355	360	365	
Arg	Ile	Asn	Gln	Glu	Thr	Gln	Lys	Ile	Phe	Lys	Ala	Gly	Lys	Leu	Met	370	375	380	
Lys	His	Glu	Glu	Leu	Asp	Ala	Gln	Ile	Arg	Asp	Arg	Ser	Ala	Arg	Tyr	385	390	395	400
Val	Gln	Phe	Asp	Cys	Phe	His	Glu	Ile	Leu	Pro	Gln	Pro	Glu	Asn	Arg	405	410	415	
Ile	Val	Pro	Ser	Lys	Thr	Ala	Thr	Asp	Ala	Ile	Gly	Ile	Pro	Arg	Pro	420	425	430	
Glu	Ile	Thr	Tyr	Ala	Ile	Asp	Asp	Tyr	Val	Lys	Arg	Gly	Ala	Val	His	435	440	445	
Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Ala	Thr	Ala	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Gly	Thr	Asp	450	455	460	
Val	Val	Phe	Asn	Asp	Glu	Phe	Ala	Pro	Asn	Asn	His	Ile	Thr	Gly	Ala	465	470	475	480
Thr	Ile	Met	Gly	Ala	Asp	Ala	Arg	Asp	Ser	Val	Val	Asp	Lys	Asp	Cys	485	490	495	

[0011]

Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met
500 505 510

Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
515 520 525

Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
530 535

<210> 8
<211> 537
<212> PRT
<213> Burkholderia thailandensis

<400> 8

Met Ala Glu Thr Gln Gln Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val
1 5 10 15

Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ser Val
20 25 30

Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu
35 40 45

Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro
50 55 60

Ser Ser Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Ala Pro Pro Asn Asp Tyr
65 70 75 80

Leu Val Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala
85 90 95

Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile
100 105 110

Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp
115 120 125

Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu His Phe Tyr Gln Arg Ala Glu Glu
130 135 140

Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Ala Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro

[0012]

145	150	155	160
Arg Lys Ala Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Tyr Asn Glu	165	170	175
Arg Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn His Asp Pro Lys Tyr His Val	180	185	190
Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro	195	200	205
Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala	210	215	220
Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln Ala Gly Ala	225	230	235 240
Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val His Lys Leu Glu Val Gly Pro Gln	245	250	255
Lys Lys Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Pro Lys Gly Ala Glu His	260	265	270
Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr	275	280	285
Pro Lys Leu Met Leu Met Ser Thr Ser His Asp Phe Pro Asn Gly Val	290	295	300
Gly Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly	305	310	315 320
Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly	325	330	335
Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg	340	345	350
Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile	355	360	365
Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Leu Lys Pro	370	375	380

[0013]

Ala Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln
385 390 395 400

Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val
405 410 415

Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile
420 425 430

Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg
435 440 445

Glu Val Tyr Ala Ser Ala Ala Gln Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val
450 455 460

Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala Thr Ile
465 470 475 480

Met Gly Ala Asp Pro Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr
485 490 495

Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr
500 505 510

Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg
515 520 525

Ile Ser Asp Gln Leu Lys Lys Glu Ile
530 535

<210> 9

<211> 540

<212> PRT

<213> *Ralstonia pickettii*

<400> 9

Met Ala Gln Ser Glu Gln Thr Arg Gln Gln Ala Asp Ile Val Val Val
1 5 10 15

Gly Ser Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Tyr Glu Leu Ala Arg Ala
20 25 30

Gly Lys Ser Val Leu Met Leu Glu Ala Gly Pro Arg Leu Pro Arg Trp
35 40 45

[0014]

Glu Ile Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Ala Asp Lys Met Asp Phe Met
50 55 60

Ala Pro Tyr Pro Ser Thr Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro
65 70 75 80

Pro Asn Asn Tyr Leu Val Leu Lys Gly Glu His Gln Phe Asn Ser Gln
85 90 95

Tyr Ile Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Thr
100 105 110

Trp Arg Phe Leu Pro Asn Asp Phe Lys Leu Arg Ser Val Tyr Gly Ile
115 120 125

Ala Arg Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Gln Asp Leu Glu Arg Tyr Tyr Gly
130 135 140

Leu Ala Glu Glu Ala Leu Gly Val Trp Gly Pro Asn Asp Glu Asp Leu
145 150 155 160

Gly Ser Pro Arg Ser Gln Pro Tyr Pro Met Thr Pro Leu Pro Leu Ser
165 170 175

Phe Asn Glu Arg Thr Ile Lys Glu Ala Leu Asn Ala His Asp Ala Ser
180 185 190

Phe His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp
195 200 205

Gly Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro
210 215 220

Ile Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln
225 230 235 240

Ala Gly Ala Arg Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Phe Lys Leu Glu Val
245 250 255

Gly Pro Asn Lys Arg Ile Val Ala Ala Arg Tyr Lys Asp Ser Lys Gly
260 265 270

[0015]

Ala Glu His Arg Val Glu Gly Lys Trp Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly
275 280 285

Ile Glu Thr Pro Lys Leu Met Leu Met Ser Thr Ser Gln Asp Phe Pro
290 295 300

Lys Gly Val Gly Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp
305 310 315 320

His Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asp Arg Lys Leu Trp Pro
325 330 335

Gly Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly
340 345 350

Pro Phe Arg Ala Thr Gln Ala Gly Lys Lys Leu His Leu Ser Asn Ile
355 360 365

Ser Arg Ile Glu Gln Glu Thr Gln Arg Ile Phe Lys Glu Gly Lys Leu
370 375 380

Ile Lys Pro Ala Asp Leu Asp Ala Arg Ile Arg Asp Gln Ala Ala Arg
385 390 395 400

Tyr Val Gln Phe Asp Ser Phe His Glu Ile Leu Pro Leu Pro Glu Asn
405 410 415

Arg Ile Val Pro Ser Ala Thr Glu Val Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg
420 425 430

Pro Glu Ile Thr Tyr His Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Ser Ala Val
435 440 445

His Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Gln Val Met Gly Gly Thr
450 455 460

Asn Val Glu Phe His Asp Asp Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly
465 470 475 480

Ala Thr Ile Met Gly Ala Asp Pro Lys Asp Ser Val Val Asp Lys Asp
485 490 495

Cys Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr
500 505 510

[0016]

Met Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu
515 520 525

Ala Leu Arg Ile Ala Asp Gln Leu Lys Gln Glu Ala
530 535 540

<210> 10
<211> 540
<212> PRT
<213> *Ralstonia solanacearum*

<400> 10

Met Ala Asp Thr Arg Arg Ala Asp Gln Ala Asp Ile Val Val Val Gly
1 5 10 15

Ser Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Tyr Glu Leu Ala Arg Ala Gly
20 25 30

Lys Ser Val Leu Met Leu Glu Ala Gly Pro Arg Leu Pro Arg Trp Glu
35 40 45

Ile Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Ala Asp Lys Met Asp Phe Met Ala
50 55 60

Pro Tyr Pro Ser Thr Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Ser
65 70 75 80

Pro Asn Asp Tyr Leu Val Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asp Ser Gln
85 90 95

Tyr Ile Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Thr
100 105 110

Trp Arg Phe Leu Pro Asn Asp Phe Lys Leu Arg Ser Val Tyr Gly Ile
115 120 125

Ala Arg Asp Trp Pro Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Arg Asp Tyr Gly
130 135 140

Arg Ala Glu Ala Ala Leu Gly Val Trp Gly Pro Asn Asp Glu Asp Leu
145 150 155 160

Gly Ser Pro Arg Ser Gln Pro Tyr Pro Met Ala Pro Leu Pro Leu Ser

[0017]

165	170	175
Phe Asn Glu Arg Thr Ile Lys Glu Ala Leu Asn Ala His Asp Pro Ala 180 185 190		
Phe His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp 195 200 205		
Gly Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro 210 215 220		
Ile Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln 225 230 235 240		
Ala Gly Ala Arg Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Val 245 250 255		
Gly Ala Gly Arg Arg Ile Val Ala Ala His Tyr Lys Asp Pro Lys Gly 260 265 270		
Val Asp His Arg Val Glu Gly Lys Trp Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly 275 280 285		
Ile Glu Thr Pro Lys Leu Met Leu Met Ser Thr Ser Glu Ala Phe Pro 290 295 300		
Arg Gly Val Gly Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp 305 310 315 320		
His Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asp Arg Lys Leu Trp Pro 325 330 335		
Gly Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly 340 345 350		
Pro Phe Arg Ala Met Gln Ala Gly Lys Lys Leu His Leu Ser Asn Ile 355 360 365		
Ser Arg Ile Glu Gln Glu Thr Ala Arg Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu 370 375 380		
Leu Lys Pro Ala Glu Leu Asp Ala Arg Ile Arg Asp Gln Ala Ala Arg 385 390 395 400		

[0018]

Tyr Val Gln Phe Asp Ser Phe His Glu Ile Leu Pro Leu Pro Glu Asn
405 410 415

Arg Ile Val Pro Ser Ala Thr Glu Thr Asp Ala Leu Gly Ile Pro Arg
420 425 430

Pro Glu Ile Thr Tyr Arg Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Ser Ala Val
435 440 445

His Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Ala Thr
450 455 460

Asp Val Gln Phe His Asp Asp Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly
465 470 475 480

Ala Thr Ser Met Gly Ala Asp Pro Lys Asp Ser Val Val Asp Lys Asp
485 490 495

Cys Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr
500 505 510

Met Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu
515 520 525

Ala Leu Arg Ile Ala Asp Arg Leu Lys Lys Glu Ala
530 535 540

<210> 11
<211> 533
<212> PRT
<213> Burkholderia phytofirmans

<400> 11

Met Ala Asn Lys Asn Ser Ala Asp Ile Val Val Val Gly Ser Gly Val
1 5 10 15

Ala Gly Gly Leu Val Ala His Gln Met Ala Leu Ala Gly Ala Ser Val
20 25 30

Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Ile Pro Arg Trp Gln Ile Val Glu
35 40 45

Asn Phe Arg Asn Ser Pro Val Lys Ser Asp Phe Ala Thr Pro Tyr Pro
50 55 60

[0019]

Ser	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro	His	Pro	Glu	Tyr	Ala	Pro	Ala	Asn	Asn	Tyr	65	70	75	80
Leu	Ile	Gln	Lys	Gly	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Ser	Ser	Gln	Tyr	Leu	Arg	Leu	85	90	95	
Val	Gly	Gly	Thr	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ala	Ala	Ala	Trp	Arg	Leu	Leu	100	105	110	
Pro	Ser	Asp	Phe	Gln	Leu	His	Lys	Leu	Tyr	Gly	Val	Gly	Arg	Asp	Trp	115	120	125	
Pro	Tyr	Pro	Tyr	Glu	Thr	Leu	Glu	Pro	Trp	Tyr	Ser	Ala	Ala	Glu	Val	130	135	140	
Gln	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Pro	Gly	Asn	Ser	Ile	Asp	Leu	Gly	Ser	Pro	145	150	155	160
Arg	Ser	Lys	Pro	Tyr	Pro	Met	Asn	Pro	Leu	Pro	Leu	Ser	Tyr	Met	Asp	165	170	175	
Gln	Arg	Phe	Ser	Asp	Val	Leu	Asn	Ala	Gln	Gly	Phe	Lys	Val	Val	Pro	180	185	190	
Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Asn	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asp	Ala	Arg	Pro	Thr	Cys	195	200	205	
Cys	Gly	Asn	Asn	Asn	Cys	Met	Pro	Ile	Cys	Pro	Ile	Ala	Ala	Met	Tyr	210	215	220	
Asn	Gly	Val	Val	His	Ala	Glu	Lys	Ala	Glu	Gln	Ala	Gly	Ala	Lys	Leu	225	230	235	240
Ile	Pro	Glu	Ala	Val	Val	Tyr	Arg	Val	Glu	Ala	Asp	Asn	Lys	Gly	Leu	245	250	255	
Ile	Thr	Ala	Val	His	Tyr	Lys	Asp	Pro	Asn	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Val	260	265	270	
Thr	Gly	Lys	Leu	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Ile	Glu	Thr	Pro	Lys	275	280	285	

[0020]

Leu	Met	Leu	Met	Ser	Thr	Ser	Asp	Lys	Phe	Pro	His	Gly	Val	Gly	Asn	
290						295					300					
Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Arg	Asn	Leu	Met	Asp	His	Pro	Gly	Thr	Gly	
305					310					315					320	
Val	Thr	Phe	Leu	Ala	Asn	Glu	Ala	Leu	Trp	Pro	Gly	Arg	Gly	Pro	Met	
				325					330					335		
Glu	Met	Thr	Ser	Ile	Val	Asn	Phe	Arg	Asp	Gly	Ala	Phe	Arg	Ser	Asp	
			340					345					350			
Tyr	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	His	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Pro	Thr	Met	Ser	
		355					360						365			
Val	Thr	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	
	370					375					380					
Arg	Gln	Ile	Arg	Asp	Arg	Ala	Ala	Arg	Thr	Leu	Asn	Ile	Asn	Ser	Phe	
385					390					395					400	
His	Glu	His	Leu	Ala	Glu	Pro	Gln	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Ser	Ala	Asp	
				405					410					415		
His	Lys	Asp	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Gln	Pro	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Ile	
			420					425					430			
Asn	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Ser	Ala	Ala	Asn	Thr	His	Glu	Leu	Tyr	Ala	
		435					440					445				
Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Ala	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Asp	Thr	
	450					455					460					
Phe	Ala	Pro	Asn	Asn	His	Ile	Met	Gly	Thr	Thr	Ile	Met	Gly	Ser	Asp	
465					470					475					480	
Pro	Ala	Asp	Ser	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Cys	Arg	Thr	His	Asp	His	Ser	
				485					490					495		
Asn	Leu	Phe	Ile	Ala	Ser	Ser	Gly	Val	Met	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Val	
			500					505					510			
Asn	Cys	Thr	Leu	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Ala	Asp	Lys	
		515				520						525				

[0021]

Leu Lys Arg Glu Ile
530

<210> 12
<211> 539
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 12

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
1 5 10 15

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
20 25 30

Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
35 40 45

Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Val Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
50 55 60

Tyr Pro Ser Ser Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
65 70 75 80

Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
85 90 95

Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
100 105 110

Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Gly Arg
115 120 125

Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Ile Glu His Tyr Tyr Gln Arg Ala
130 135 140

Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Pro Arg Lys Glu Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
165 170 175

Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe

[0022]

180	185	190
His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly 195 200 205		
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile 210 215 220		
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln Ala 225 230 235 240		
Gly Ala Lys Leu Ile Asp Ser Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly 245 250 255		
Pro Asp Lys Arg Ile Thr Ala Ala Val Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala 260 265 270		
Asp His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Ile Ala Ala Asn Gly Ile 275 280 285		
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn 290 295 300		
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His 305 310 315 320		
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly 325 330 335		
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro 340 345 350		
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser 355 360 365		
Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met 370 375 380		
Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr 385 390 395 400		
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg 405 410 415		

[0023]

Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro
420 425 430

Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His
435 440 445

Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Glu
450 455 460

Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala
465 470 475 480

Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
485 490 495

Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met
500 505 510

Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
515 520 525

Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
530 535

<210> 13
<211> 539
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 13

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
1 5 10 15

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
20 25 30

Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
35 40 45

Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Val Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
50 55 60

Tyr Pro Ser Ser Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
65 70 75 80

[0024]

Asp	Tyr	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Glu	His	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Tyr	Ile	85	90	95	
Arg	Ala	Val	Gly	Gly	Thr	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Ala	Trp	Arg	100	105	110	
Phe	Ile	Pro	Asn	Asp	Phe	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Tyr	Gly	Val	Gly	Arg	115	120	125	
Asp	Trp	Pro	Ile	Gln	Tyr	Asp	Asp	Ile	Glu	His	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Ala	130	135	140	
Glu	Glu	Glu	Leu	Gly	Val	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Glu	Asp	Leu	Tyr	145	150	155	160
Ser	Pro	Arg	Lys	Glu	Pro	Tyr	Pro	Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Ser	Phe	165	170	175	
Asn	Glu	Gln	Thr	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Asn	Gly	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	180	185	190	
His	Val	Val	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Asn	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	195	200	205	
Arg	Pro	Thr	Cys	Cys	Gly	Asn	Asn	Asn	Cys	Met	Pro	Ile	Cys	Pro	Ile	210	215	220	
Gly	Ala	Met	Tyr	Asn	Gly	Ile	Val	His	Val	Glu	Lys	Ala	Glu	Gln	Ala	225	230	235	240
Gly	Ala	Lys	Leu	Ile	Asp	Ser	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Thr	Gly	245	250	255	
Pro	Asp	Lys	Arg	Ile	Thr	Ala	Ala	Val	Tyr	Lys	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	260	265	270	
Asp	His	Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Ile	Ala	Ala	Asn	Gly	Ile	275	280	285	
Glu	Thr	Pro	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Ser	Ala	Asn	Arg	Asp	Phe	Pro	Asn	290	295	300	

[0025]

Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His	
305	310 315 320
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly	
	325 330 335
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro	
	340 345 350
Phe Arg Ala Asn Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser	
	355 360 365
Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Gly Gly Lys Leu Met	
	370 375 380
Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Phe	
	385 390 395 400
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg	
	405 410 415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Val Gly Ile Pro Arg Pro	
	420 425 430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His	
	435 440 445
Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Glu	
	450 455 460
Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala	
	465 470 475 480
Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys	
	485 490 495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met	
	500 505 510
Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala	
	515 520 525
Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val	
	530 535

[0026]

<210> 14
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 14

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30

Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45

Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Thr Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60

Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80

Asp Tyr Leu Val Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95

Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110

Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125

Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu His Tyr Tyr Gln Arg Ala
 130 135 140

Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160

Ser Pro Arg Arg Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175

Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190

His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly

[0027]

195	200	205
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile 210	215	220
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln Ala 225	230	235 240
Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly 245	250	255
Pro Asn Lys Arg Ile Val Ala Ala Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Gly Ala 260	265	270
Asp His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Val Ala Ala Asn Gly Ile 275	280	285
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn 290	295	300
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His 305	310	315 320
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly 325	330	335
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro 340	345	350
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser 355	360	365
Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Gly Gly Lys Leu Met 370	375	380
Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr 385	390	395 400
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg 405	410	415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro 420	425	430

[0028]

Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His
435 440 445

Thr Cys Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Glu
450 455 460

Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala
465 470 475 480

Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
485 490 495

Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met
500 505 510

Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
515 520 525

Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
530 535

<210> 15

<211> 539

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 15

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Ile Val Val Val Gly Ser
1 5 10 15

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
20 25 30

Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
35 40 45

Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
50 55 60

Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
65 70 75 80

Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
85 90 95

[0029]

Arg	Ala	Val	Gly	Gly	Thr	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Ala	Trp	Arg	100	105	110	
Phe	Ile	Pro	Asn	Asp	Phe	Lys	Met	Lys	Thr	Val	Tyr	Gly	Val	Ala	Arg	115	120	125	
Asp	Trp	Pro	Ile	Gln	Tyr	Asp	Asp	Leu	Glu	His	Trp	Tyr	Gln	Arg	Ala	130	135	140	
Glu	Glu	Glu	Leu	Gly	Val	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Glu	Asp	Leu	Tyr	145	150	155	160
Ser	Pro	Arg	Lys	Gln	Ala	Tyr	Pro	Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Ser	Phe	165	170	175	
Asn	Glu	Gln	Thr	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Asn	Gly	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	180	185	190	
His	Val	Val	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Asn	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	195	200	205	
Arg	Pro	Thr	Cys	Cys	Gly	Asn	Asn	Asn	Cys	Met	Pro	Ile	Cys	Pro	Ile	210	215	220	
Gly	Ala	Met	Tyr	Asn	Gly	Ile	Val	His	Val	Glu	Lys	Ala	Glu	Gln	Ala	225	230	235	240
Gly	Ala	Lys	Leu	Ile	Asp	Ser	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Thr	Gly	245	250	255	
Pro	Asp	Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Lys	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	260	265	270	
Asp	His	Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Ile	275	280	285	
Glu	Thr	Pro	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Ser	Ala	Asn	Arg	Asp	Phe	Pro	Asn	290	295	300	
Gly	Val	Ala	Asn	Ser	Ser	Asp	Met	Val	Gly	Arg	Asn	Leu	Met	Asp	His	305	310	315	320

[0030]

Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly
325 330 335

Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
340 345 350

Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser
355 360 365

Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met
370 375 380

Lys His Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr
385 390 395 400

Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg
405 410 415

Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro
420 425 430

Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His
435 440 445

Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp
450 455 460

Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala
465 470 475 480

Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
485 490 495

Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met
500 505 510

Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
515 520 525

Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
530 535

<210> 16
<211> 539

[0031]

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 16

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Ile Val Val Val Gly Ser
1 5 10 15

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
20 25 30

Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
35 40 45

Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
50 55 60

Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
65 70 75 80

Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
85 90 95

Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
100 105 110

Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Ala Arg
115 120 125

Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu His Trp Tyr Gln Arg Ala
130 135 140

Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Pro Arg Lys Gln Ala Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
165 170 175

Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe
180 185 190

His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
195 200 205

Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile

[0032]

210	215	220
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln Ala 225	230	235 240
Gly Ala Lys Leu Ile Asp Ser Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly 245	250	255
Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Ile Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala 260	265	270
Asp His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile 275	280	285
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn 290	295	300
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His 305	310	315 320
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly 325	330	335
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro 340	345	350
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser 355	360	365
Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met 370	375	380
Lys His Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr 385	390	395 400
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg 405	410	415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro 420	425	430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His 435	440	445

[0033]

Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp
450 455 460

Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala
465 470 475 480

Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
485 490 495

Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met
500 505 510

Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
515 520 525

Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
530 535

<210> 17
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 17
accaccactg ataaggaggt ctgaccgtgc ggaaatctac

40

<210> 18
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 18
agcctgtgcg acttccttct tcagegatcg gtggtggtgg

40

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 19

[0034]

catgccatgg cacacaacga caacac	26
<210> 20	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 20	
gtcgacgatac ttcttccagc cgaacatcac	30
<210> 21	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 21	
gaattctatg cgagcgagaa gctgtggccg	30
<210> 22	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 22	
ttcttctatg cgagcgagaa gctgtggccg	30
<210> 23	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 23	
atcttctatg cgagcgagaa gctgtggccg	30
<210> 24	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	

[0035]

<400> 24
aaattctatg cgagcgagaa gctgtggccg 30

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 25
ctgttctatg cgagcgagaa gctgtggccg 30

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 26
aacttctatg cgagcgagaa gctgtggccg 30

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 27
cagttctatg cgagcgagaa gctgtggccg 30

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 28
cgcttctatg cgagcgagaa gctgtggccg 30

<210> 29
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

[0036]

<220>		
<223>	引物	
<400>	29	
accttctatg cgagcgagaa gctgtggccg		30
<210>	30	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	30	
gttttctatg cgagcgagaa gctgtggccg		30
<210>	31	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	31	
tggttctatg cgagcgagaa gctgtggccg		30
<210>	32	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	32	
tacttctatg cgagcgagaa gctgtggccg		30
<210>	33	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	33	
cacgccggtc ccgggatggt ccatcaggtt		30
<210>	34	
<211>	30	
<212>	DNA	

[0037]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	34	
cacgccggtg cccggatggt ccatcaggtt		30
<210>	35	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	35	
gacaacctgt cgcgcacga ccaggagacg		30
<210>	36	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	36	
ttcaacctgt cgcgcacga ccaggagacg		30
<210>	37	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	37	
atcaacctgt cgcgcacga ccaggagacg		30
<210>	38	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	38	
aaaaacctgt cgcgcacga ccaggagacg		30
<210>	39	

[0038]

<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	39	
	cagaacctgt cgcgcacga ccaggagacg	30
<210>	40	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	40	
	cgtaacctgt cgcgcacga ccaggagacg	30
<210>	41	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	41	
	accaacctgt cgcgcacga ccaggagacg	30
<210>	42	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	42	
	tacaacctgt cgcgcacga ccaggagacg	30
<210>	43	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	43	
	caggtggatc ttcttcgccg cttcggtcgc	30

[0039]

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 44
gcgccgaaca atcacatcac gggtctgacg 30

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 45
gacccgaaca atcacatcac gggtctgacg 30

<210> 46
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 46
gaaccgaaca atcacatcac gggtctgacg 30

<210> 47
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 47
ttcccgaaca atcacatcac gggtctgacg 30

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 48

[0040]

catccgaaca atcacatcac gggctcgacg	30
<210> 49	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 49	
atcccgaaaca atcacatcac gggctcgacg	30
<210> 50	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 50	
aaaccgaaca atcacatcac gggctcgacg	30
<210> 51	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 51	
aaccggaaca atcacatcac gggctcgacg	30
<210> 52	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 52	
cgtcggaaca atcacatcac gggctcgacg	30
<210> 53	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	

[0041]

<400> 53
agtccgaaca atcacatcac gggctcgacg 30

<210> 54
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 54
actccgaaca atcacatcac gggctcgacg 30

<210> 55
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 55
taccgaaca atcacatcac gggctcgacg 30

<210> 56
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 56
gaattcgtcg ttgaacacga cgtccgtgcc 30

<210> 57
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 57
gaactcgtcg ttgaacacga cgtccgtgcc 30

<210> 58
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

[0042]

<220>		
<223>	引物	
<400>	58	
gggcaccggc	gtgcagttct atgcgaacga g	31
<210>	59	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	59	
gaagaagatc	cacctgtaca acatgtegcg catcaac	37
<210>	60	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	60	
gtcgtgttca	acgacgaatt ctacccgaac aatcacatca cggg	44
<210>	61	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	61	
ctcgttcgca	tagaactgca cgccggtgcc c	31
<210>	62	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	62	
gttgatgcgc	gacatgttgt acaggtggat cttcttc	37
<210>	63	
<211>	44	
<212>	DNA	

[0043]

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 63

cccgtgatgt gattgttcgg gtagaattcg tcgttgaaca cgac

44

<210> 64

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 64

gggcaccggc gtgcagttct atgcgagcga g

31

<210> 65

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 65

gaagaagatc cacctgtaca acctgtcgcg catcgac

37

<210> 66

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 66

ctcgtcgca tagaactgca cgccggtgcc c

31

<210> 67

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 67

gtcgatgcgc gacaggttgt acaggtggat cttcttc

37

<210> 68

[0044]

<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	68	
	gggcaccggc gtgcagttct atgcggaccg c	31
<210>	69	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	69	
	caagaagctg cacctgtaca acatctcgcg catcgag	37
<210>	70	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	70	
	gtcgagttcc acgacgactt ctaccggaac aatcacatca cggg	44
<210>	71	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	71	
	gcggtcgca tagaactgca cgccggtgcc c	31
<210>	72	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	72	
	ctcgatgcgc gagatgttgt acaggtgcag cttcttg	37

[0045]

<210>	73	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	73	
	cccgtgatgt gattgttcgg gtagaagtcg tcgtggaact cgac	44
<210>	74	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	74	
	gtccagttcc acgacgacit ctacccgaac aatcacatca cggg	44
<210>	75	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	75	
	cccgtgatgt gattgttcgg gtagaagtcg tcgtggaact ggac	44
<210>	76	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	76	
	gggcaccggc gtgcagttcc tggcgaacga g	31
<210>	77	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	77	

[0046]

gaagaagctg cacctgtaca acggcgtccc gacgatg 37

<210> 78
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 78
gtcacgttcg acgacacgtt ctacccgaac aatcacatca tggg 44

<210> 79
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 79
ctcgttcgcc aggaactgca cgccggtgcc c 31

<210> 80
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 80
catcgtcggg acgccgttgt acaggtgcag cttcttc 37

<210> 81
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 81
cccatgatgt gattgttcgg gtagaacgtg tcgtcgaacg tgac 44

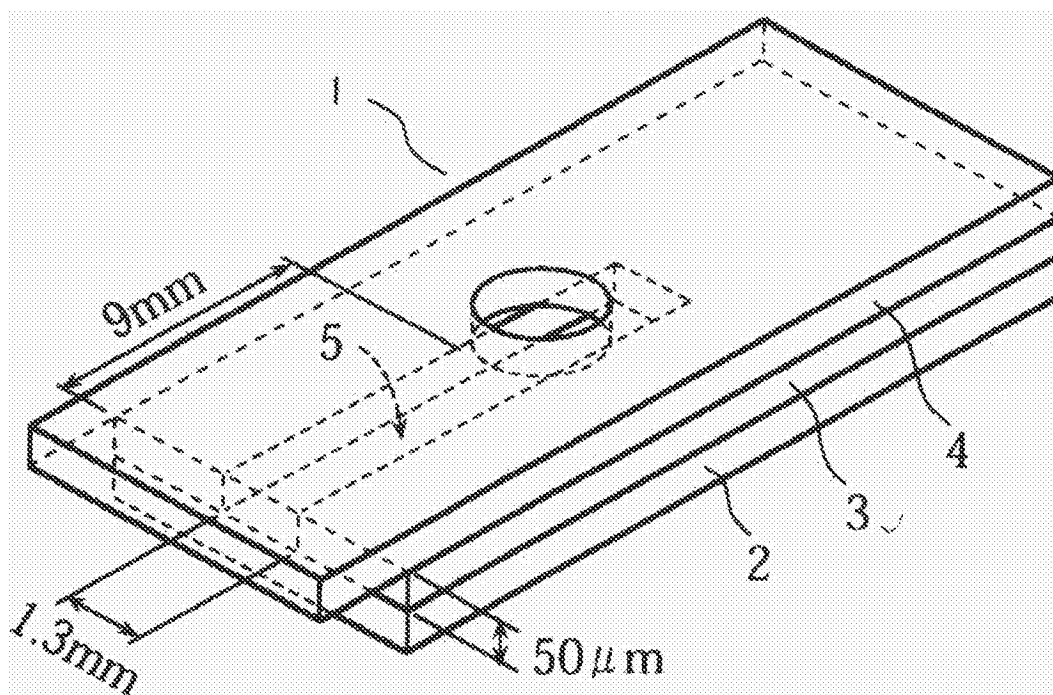


图 1

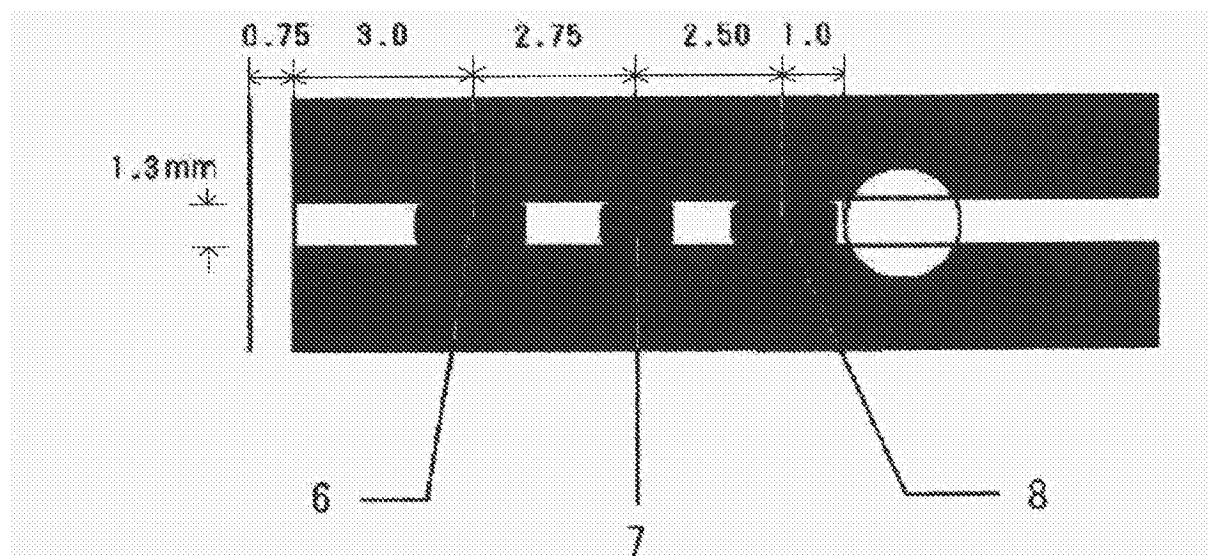


图 2

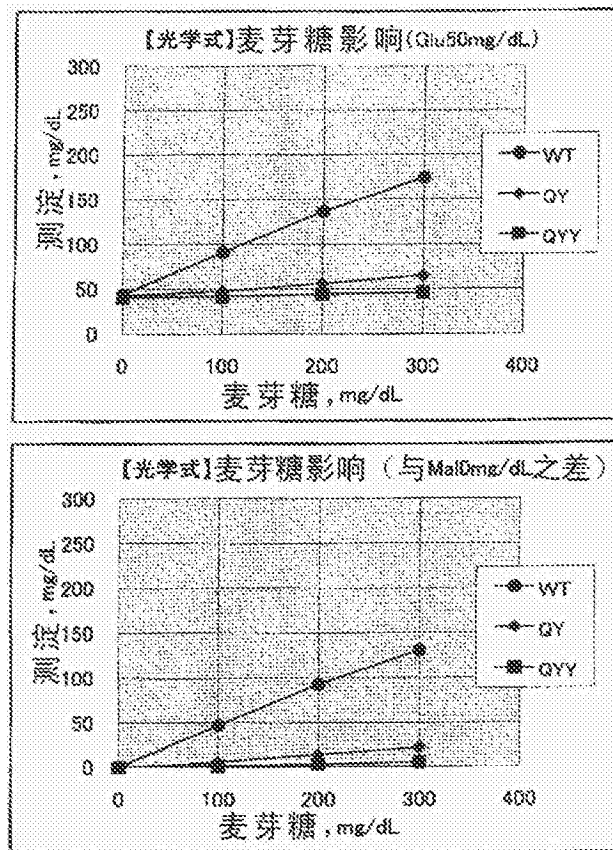


图 3

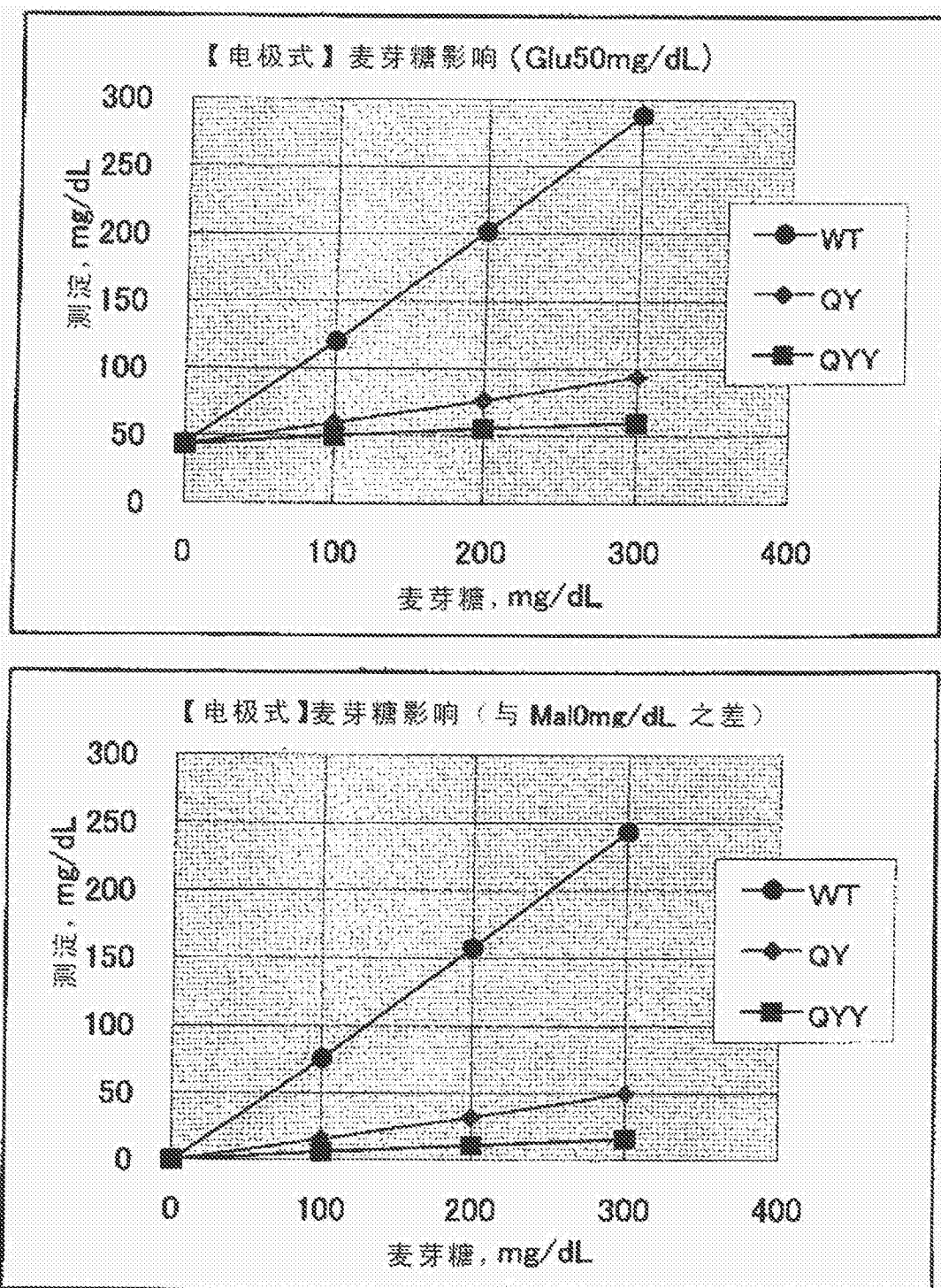


图 4

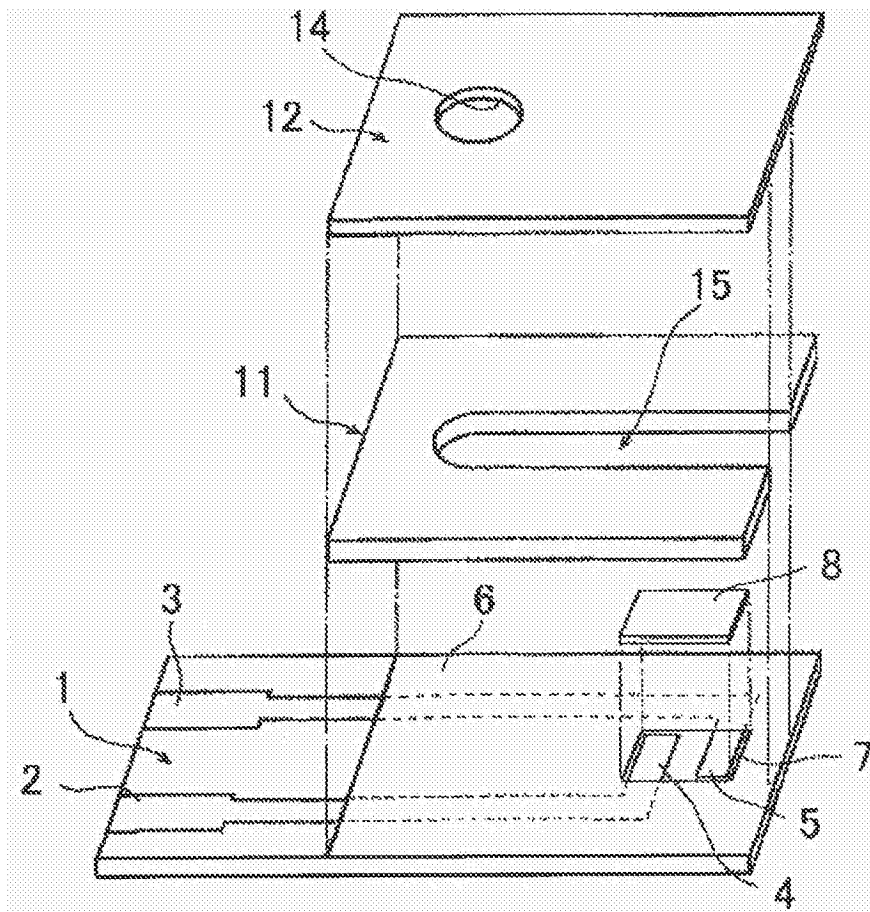


图 5