

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2007 年 2 月 15 日 (15.02.2007)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2007/016861 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/06 (2006.01) C12N 15/72 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12P 35/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2006/001940

(22) 国际申请日: 2006 年 8 月 2 日 (02.08.2006)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

200510089965.3

2005 年 8 月 8 日 (08.08.2005) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 百瑞全球有限公司(BIORIGHT WORLDWIDE COMPANY LIMITED); 英属维尔京群岛托托拉岛, Tortola (VG)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王骏(WANG, Jun)

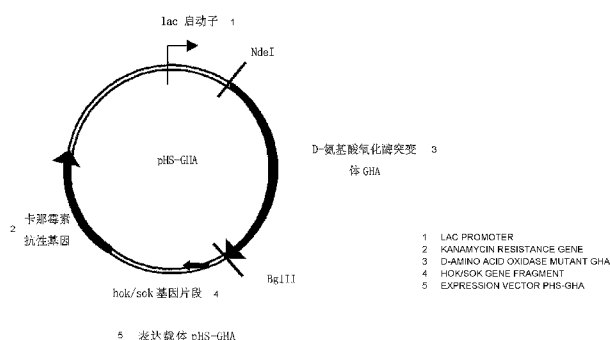
[CN/CN]; 中国香港特别行政区新界火炭骏景园新五座 23D, Hong Kong (CN)。曾伟基(TSANG, Waikui) [CN/CN]; 中国香港特别行政区新界大埔明雅苑明昌 2101 室, Hong Kong (CN)。叶康坚(YAP, Hongkin) [CN/CN]; 中国香港特别行政区新界大埔元岭村 81B, Hong Kong (CN)。陈军明(CHEN, Junmin) [CN/CN]; 中国深圳福田区福莲花园 4 栋 501 室, Guangdong (CN)。肖游龙(SIU, Yaulung) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙黄大仙环凤街 17 号凤祥楼 16 楼 G 室, Hong Kong (CN)。曾实现(TSANG, Supyin) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙土瓜湾美景街 68 号安泰大厦 7 楼 D 室, Hong Kong (CN)。

(74) 代理人: 北京天昊联合知识产权代理有限公司(TEE & HOWE INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEY); 中国北京市西城区西长安街 88 号首都时代广场 7 层 718 室丁业平, Beijing 100031 (CN)。

[续页]

(54) Title: TWO-STEPS ENZYME METHOD FOR PREPARING 7-AMINOCEPHALOSPORANIC ACID

(54) 发明名称: 一种用于制备 7-氨基头孢霉烷酸的两步酶法



(57) Abstract: The present invention discloses a two-steps enzyme method for preparing 7-aminocephalosporanic acid from cephalosporin C, wherein D-amino acid oxidase used is D-amino acid oxidase mutant of purified yeast *Trigonopsis Variabilis*, which having a specific activity more than 105% higher than that of parent D-amino acid oxidase. The method has no need of addition of hydrogen peroxide, β -lactamase inhibitor, catalase inhibitor, catalase and the like commonly used in the prior art. The productivity of the method can reach more than 93%.

(57) 摘要:

本发明公开了一种从头孢菌素 C 制备 7-氨基头孢霉烷酸的两步酶法, 其中所用的 D-氨基酸氧化酶为一种经纯化的三角酵母 D-氨基酸氧化酶突变体, 其所具有的比活比亲本 D-氨基酸氧化酶高 105%。本发明的方法不需要添加过氧化氢、 β -内酰胺酶抑制剂、过氧化氢酶抑制剂、过氧化氢酶等现有技术方法中常用的试剂, 而本发明方法的产率可以达到 93% 以上。

WO 2007/016861 A1



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

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

一种用于制备 7-氨基头孢霉烷酸的两步酶法

技术领域

本发明涉及生物工程技术领域，具体而言涉及一种用于制备 7-氨基头孢霉烷酸（7-aminocephalosporanic acid）的两步酶法。

背景技术

半合成头孢菌素母核 7-氨基头孢霉烷酸可由化学法从头孢菌素 C（cephalosporin C）制备而得。但是化学法需使用大量有毒制剂，污染环境，而且产率低、成本高。应用酶法制备精细化学品为近年来的新兴工艺，它避免使用有毒制剂，并且产率较高。酶法制备 7-氨基头孢霉烷酸包括两个步骤（见图 1）：（1）D-氨基酸氧化酶氧化头孢菌素 C 生成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸（glutaryl-7-aminocephalosporanic acid）；（2）戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶水解戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸产生 7-氨基头孢霉烷酸。

目前限制大规模酶法制备 7-氨基头孢霉烷酸的因素之一为 D-氨基酸氧化酶和戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的产率低、成本高。目前报导的 D-氨基酸氧化酶表达水平较低（Pollegioni, L. et al., 1997, J. Biotechnol. 58, 115-123: 800 酶单位每升发酵液；Molla, G. et al., 1998, Protein Exp. Purif. 14, 289-294: 2,300 酶单位每升发酵液）。目前报导的戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶表达水平也低（Ishiye, M. 和 Niwa, M., 1992, Biochim. Biophys. Acta 1132, 233-239: 129 酶单位每升发酵液；杨蕴刘等, 2001, 中国专利申请公开号 CN 1301813A: 253 酶单位每升发酵液；许岗和朱敏, 2003, 中国专利申请公开号 CN 1428424A: 2,500 酶单位每升发酵液）。因此，低成本、大量制备该两个酶是工业化生产 7-氨基头孢霉烷酸之关键。

目前限制大规模酶法制备 7-氨基头孢霉烷酸的另一因素在于现有的操作工艺复杂，成本较高。例如，目前工业界使用的 Roche

Diagnostics 公司所生产的有关产品及其工艺 (CC2 Twin Enzyme Process: D-AOD, 产品号: 1462865; Gl-Ac, 产品号: 1464213, Roche Diagnostics) 操作步骤较复杂 (见图 1); 除上述的氧化酶和酰化酶外, 尚需下列额外步骤: (1) 由于 Roche Diagnostics 公司之 D-氨基酸氧化酶不纯, 故在氧化反应结束后, 仍有较大量 α -酮己二酸单酰-7-氨基头孢霉烷酸 (α -ketoadipyl-7-ACA) 不能转成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸, 因此需外加过氧化氢将之转化成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸; (2) 但由于过氧化氢一方面会使酶活性丧失, 另方面会氧化头孢菌素 C 和戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸, 令最终 7-氨基头孢霉烷酸的产率降低, 所以需再外加过氧化氢酶去降解残留之过氧化氢。

此外, 中国专利申请公开号为 CN1104255 的专利文献也公开了一种制备 7-氨基头孢霉烷酸的方法, 在该现有技术的方法中, 因使用了含氨苄青霉素抗性基因的表达载体, 其发酵产物含 β -内酰胺酶, 会大大降低 7-氨基头孢霉烷酸的产率, 因此还需在制备 7-氨基头孢霉烷酸的过程中添加 β -内酰胺酶抑制剂; 并且, 其所使用的细胞体系还产生能分解过氧化氢的过氧化氢酶, 因此在制备过程中不仅要加入过氧化氢还要加入过氧化氢酶抑制剂。这些使得其操作步骤较复杂、成本较高。

发明内容

本发明的目的在于提供一种步骤简单、成本低、产率高的用于制备 7-氨基头孢霉烷酸的两步酶法。

为实现上述目的, 本发明的技术方案提供了一种从头孢菌素 C 制备 7-氨基头孢霉烷酸的方法, 包括用 D-氨基酸氧化酶催化头孢菌素 C 至戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸的第一步反应和用戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶催化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸至 7-氨基头孢霉烷酸的第二步反应, 其特征在于, 所述 D-氨基酸氧化酶为经纯化的、具有序列号 2 所示氨基酸序列的三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) D-氨基酸氧化酶突变体。

在上述技术方案中, 优选的是, 在所述第一步反应中不添加过

氧化氢，进一步优选的是，所述 D-氨基酸氧化酶是由具有序列号 3 所示 DNA 序列的表达载体 pHS-GHA 表达的，D-氨基酸氧化酶的纯化步骤包括依次通过 DEAE-纤维素离子交换树脂纯化以及通过硫酸铵沉淀纯化。更优选的是，在所述第一步反应和第二步反应中，不添加选自抗坏血酸、3-氨基-1, 2, 3-三唑、过硼酸钠和叠氮化钠的 β -内酰胺酶抑制剂，在所述第一步反应中不添加选自舒巴坦钠、棒酸、硼酸及其衍生物的过氧化氢酶抑制剂，在所述第二步反应中不添加过氧化氢酶。

优选的是，所述 D-氨基酸氧化酶是固相化的，或所述戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶是固相化的，或者 D-氨基酸氧化酶和戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶都是固相化的。

更优选的是，所述戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶为假单孢菌 (*Pseudomonas* sp.) SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶，所述假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶是由具有序列号 4 所示 DNA 序列的表达载体 pT7-kan-ACY 表达的

本发明的优点在于：(1) 本发明方法中的经纯化的、具有序列号 2 所示氨基酸序列的三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) D-氨基酸氧化酶突变体，其比活比亲本 D-氨基酸氧化酶高 105%；(2) 本发明方法中的大肠杆菌载体 pHS-GHA 和 pT7-kan-ACY，其发酵产物中不含有 β -内酰胺酶，因而不需外加 β -内酰胺酶抑制剂，减低了生产成本和简化了工序；(3) 本发明方法中的 D-氨基酸氧化酶几乎不含过氧化氢酶，因此不需外加过氧化氢酶抑制剂，并且在反应过程中 α -酮己二酸单酰-7-氨基头孢霉烷酸的生成量很低，因而不需外加过氧化氢和过氧化氢酶，减低了生产成本和简化了工序；(4) 使用本发明的两步固相酶法转化头孢菌素 C 至 7-氨基头孢霉烷酸，克分子转化率可达 93% 以上，较 Roche Diagnostics 公司之产品 (克分子转化率为 82%) 高约 12%。

附图说明

图 1 为现行头孢菌素 C 转化成 7-氨基头孢霉烷酸的反应流程。

图 2 为表达载体 pHS-GHA。

图 3 为表达载体 pT7-kan-ACY。

图 4 为表达载体 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan。

图 5 为 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 的 SDS-PAGE 电泳图。其中，1 代表：蛋白质分子量标记（BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen)），单位是 KDa；2 代表：粗纯 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA；3 代表：纯化的 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA。

图 6 为 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 转化头孢菌素 C 至戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸的 HPLC 图谱。

图 7 为假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的 SDS-PAGE 电泳图。其中，1 代表：蛋白质分子量标记（BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen)），单位是 KDa；2 代表：粗纯假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶。

图 8 为假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶转化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸至 7-氨基头孢霉烷酸的 HPLC 图谱。

图 9 为两步固相酶转化头孢菌素 C 至 7-氨基头孢霉烷酸的 HPLC 图谱。

具体实施方式

实施例 1：表达载体 pRSET-kan 的构建

根据 pRSET-A（可购自 Invitrogen）的序列设计 PCR 引物，具体为：

上游引物 VET-F：5' -CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAG-3'；

下游引物 VET-R：5' -ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGC-3'。

根据 pET28b（可购自 Novagen）的序列设计 PCR 引物，具体为

上游引物 KAN-F：5' -ATGAGCCATATTCAACGGGAAAC-3'；

下游引物 KAN-R：5' -TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATG-3'。

扩增去除氨苄青霉素抗性基因的 pRSET-A 片段的 PCR 条件为：50 ng pRSET-A（Invitrogen），0.4 μM VET-F，0.4 μM VET-R，50 μM dATP，50 μM dTTP，50 μM dCTP，50 μM dGTP，20 mM Tris-HCl（pH 8.8），10 mM KCl，10 mM (NH₄)₂SO₄，2 mM MgSO₄，0.1% Triton X-100，

2.5U Pfu DNA 聚合酶 (Promega)，用无菌水调反应体积至 50 μ L。PCR 扩增反应程序为：94°C，5 分钟；94°C，1 分钟，50°C，1 分钟，72°C，4 分钟，循环 35 次；72°C，10 分钟。

扩增卡那霉素抗性基因的 PCR 条件为：50 ng pET28b(Novagen)，0.4 μ M KAN-F，0.4 μ M KAN-R，50 μ M dATP，50 μ M dTTP，50 μ M dCTP，50 μ M dGTP，20 mM Tris-HCl (pH 8.8)，10 mM KCl，10 mM (NH₄)₂SO₄，2 mM MgSO₄，0.1% Triton X-100，2.5 U Pfu DNA 聚合酶 (Promega)，用无菌水调反应体积至 50 μ L。PCR 扩增反应程序为：94°C，5 分钟；94°C，1 分钟，50°C，1 分钟，72°C，4 分钟，循环 35 次；72°C，10 分钟。

用 0.8%琼脂糖电泳提纯 PCR 产物（去除氨苄青霉素抗性基因的 pRSET-A 片段的 PCR 产物长 2,036 bp；卡那霉素抗性基因的 PCR 产物长 816 bp），连接该两片段得 pRSET-kan。将 pRSET-kan 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS (Novagen)，在卡那霉素（50 μ g/mL）LB（1%氯化钠，1%蛋白胨，0.5%酵母浸膏）平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press) 描述的方法提取质粒。

实施例 2：载体 pRSET-lac-kan 的构建

根据 pGEMT-Easy(Promega)的序列设计 PCR 引物，具体为：

上游引物 RBS-NdeI：5' -CATATGTATATCTCCTTCTTGTGTGAAATTG-3'

（NdeI 酶切位点以下划线表示，外加的核蛋白体结合位点以下间虚线表示）；

下游引物 RBS-AlwNI：5' -CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC-3'

（AlwNI 酶切位点以下划线表示）。

以 pGEMT-Easy(Promega) 为模板，用上述引物进行 PCR，扩增得到一 755bp 产物。PCR 条件为：50 ng pGEMT-Easy(Promega)，0.4 μ M RBS-NdeI，0.4 μ M RBS-AlwNI，50 μ M dATP，50 μ M dTTP，50 μ M dCTP，50 μ M dGTP，20 mM Tris-HCl (pH 8.8)，10 mM KCl，10 mM (NH₄)₂SO₄，2 mM MgSO₄，0.1% Triton X-100，2.5 U Pfu DNA 聚合酶(Promega)，用无菌水调反应体积至 50 μ L。PCR 扩增反应程序为：94°C，5 分钟；94°C，

1 分钟, 50°C, 1 分钟, 72°C, 4 分钟, 循环 35 次; 72°C, 10 分钟。

该 PCR 产物(755bp)在 5' 端含有 NdeI 酶切位点和核蛋白体结合位点及在 3' 端含有 AlwNI 酶切位点。用 0.8%琼脂糖电泳提纯, NdeI 和 AlwNI 酶切后, 与经 NdeI 和 AlwNI 酶切的 pRSETA(Invitrogen)连接, 得 pRSET-lac。将 pRSET-lac 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS(Novagen), 在氨苄青霉素(100 µg/mL)LB(1%氯化钠, 1%蛋白胨, 0.5%酵母浸膏)平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press)描述的方法提取质粒。

用 AlwNI 和 EcoRI 酶切 pRSET-lac 和 pRSET-kan, 用 0.8%琼脂糖电泳提纯各 DNA 片段并连接, 得 pRSET-lac-kan。将 pRSET-lac-kan 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS(Novagen), 在卡那霉素(50 µg/mL) LB 琼脂平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press)描述的方法提取质粒。

实施例 3: 载体 pGEMT-Easy-GI 的构建

根据已知的 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* glucose isomerase DNA 序列(GenBank L09699), 设计 PCR 引物, 具体为:

上游引物(GI-NdeI):

5' -CATATGAATAAATATTTTGAGAACGTATCTAAAATA-3'

(NdeI 酶切位点以下划线表示);

下游引物(GI-EcoRI): 5' -GATATCTTAAGGCGCGCCTTATTCTGCAAAC-3'

(EcoRI 酶切位点以下划线表示, AscI 酶切位点以双下划线表示)。

以 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (购自 ATCC, USA) DNA 为模板, 用上述引物进行 PCR, 扩增得到一 1,336bp 产物。PCR 条件为: 50 ng *T. saccharolyticum* DNA, 0.4 µM GI-NdeI, 0.4 µM GI-EcoRI, 50 µM dATP, 50 µM dTTP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 2.5 U Platinum Taq High Fidelity DNA 聚合酶(Invitrogen), 用无菌水调反应体积至 50 µL。PCR 扩增反应程序为: 95°C, 5 分钟; 94°C,

1 分钟, 50°C, 1 分钟, 72°C, 3 分钟, 循环 35 次; 72°C, 10 分钟。

该 PCR 产物(1, 336bp)在 5' 和 3' 端分别含有 NdeI 和 EcoRI 酶切位点。PCR 产物经 0.8%琼脂糖电泳提纯, 利用 TA 克隆方法, 与 pGEMT-Easy(Promega)连接, 得 pGEMT-Easy-GI。将 pGEMT-Easy-GI 转化感受态大肠杆菌 DH5 α (Invitrogen), 在氨苄青霉素(100 μ g/mL) LB 琼脂平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press)描述的方法提取质粒。

实施例 4: 载体 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan (见图 4) 的构建

用 NdeI 和 EcoRI 酶切 pGEMT-Easy-GI, 经 0.8%琼脂糖电泳提纯, 与经 NdeI 和 EcoRI 酶切的 pRSET-lac-kan 连接, 得 pRSET-lac-GI-kan。将 pRSET-lac-GI-kan 转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS (Novagen), 在卡那霉素(50 μ g/mL) LB 琼脂平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press)描述的方法提取质粒。

根据已知 hok/sok 基因片段序列(GenBank X05813)设计 10 条引物(见表 1)。PCR 基因构造根据 Kikuchi, M. et al., 1999, Gene 236:159-167 所述, 唯具体步骤有变更。PCR 条件为: 20 ng 各个引物, 50 μ M dATP, 50 μ M dTTP, 50 μ M dCTP, 50 μ M dGTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 2.5U Pfu DNA 聚合酶(Promega), 用无菌水调反应体积至 50 μ L。

PCR 扩增反应程序为: 95°C, 4 分钟; 94°C, 1.5 分钟, 50°C, 1.5 分钟, 72°C, 5 分钟, 循环 30 次; 72°C, 10 分钟, 得一 PCR 产物长 580 bp, 在其 5' 和 3' 端分别含有 AscI 及 EcoRI 酶切位点。PCR 产物经 0.8%琼脂糖电泳提纯, AscI 及 EcoRI 酶切后, 与经 AscI 及 EcoRI 酶切的 pRSET-lac-GI-kan 连接, 得 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan。将 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan 转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS (Novagen), 在卡那霉素(50 μ g/mL) LB 琼脂平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press)描述的方法提取质粒, 测定其 DNA 序列如序列号 7 所示。其中数个核苷酸有改动: 1368(C->G);

1513(缺失了 T); 1804(A→T); 1826(C→T); 2479(G→T); 2555(T→A);
3860(C→T)。

表 1

序号	引物序列
1	5' -ttggcgcgccttaagatatcaacaaactccgggaggcagc gtgatgcggcaacaatcacacggatttcccgtgaa-3'
2	5' -catatacctgcacgctgaccacactcactttccctgaaaa taatccgctcattcagaccgttcacgggaaatccgtgtga-3'
3	5' -ggtcagcgtgcaggtatatgggctatgatgtgcccggcgc ttgaggctttctgcctcatgacgtgaaggtggtttgttgc-3'
4	5' -cgtggtggttaatgaaaattaacttactacggggctatct tctttctgccacacaacacggcaacaaccaccttcacgt-3'
5	5' -aattttcattaaccaccacgaggcatccctatgtctagtc cacatcaggatagcctcttaccgcgctttgcgcaaggaga-3'
6	5' -tgagacacacgatcaacacacaccagacaagggaacttcg tggtagtttcatggccttcttctccttgcgcaaagcgcg-3'
7	5' -tgtgttgatcgtgtgtctcacactgttgatattcacttat ctgacacgaaaatcgctgtgcgagattcgttacagagacg-3'
8	5' -cgcctccaggttgctacttaccggattcgtaagccatgaa agccgccacctccctgtgtccgtctctgtaacgaatctcg-3'
9	5' -taagtagcaacctggaggcgggcgcaggcccgcttttca ggactgatgctggtctgactactgaagcgctttataaag-3'
10	5' -cggaattcacaacatcagcaaggagaaaggggctaccggc gaaccagcagccctttataaaggcgcttcagt-3'

实施例 5: 含有 D-氨基酸氧化酶基因重组质粒 pRSET-A-DAO 的构建

根据已知三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因 5' 和 3' 端序列
(Gonzalez, F.J., Montes, J., Martin, F., Lopez, M.C., Ferminan,

E., Catalan, J., Galan, M.A. Dominguez, A. Molecular cloning of TvDA01, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 13: 1399-1408; 1997) 设计引物如下:

5' -NdeI (引入 NdeI 酶切位点):

5' -TAGGGCTGACATATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGTGC-3' ;

3' -BglIII (引入 BglIII 酶切位点):

5' -TAGGGCTGAAGATCTCTAAAGGTTTGGACGAGTAAGAGC-3' 。

以质粒 pJL (杨蕴刘等, 中国专利申请公开号: CN 1371999A) 为模板, 用以上两个引物, 在 Pfu DNA 聚合酶 (Promega) 的作用下, 合成三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因。pJL 携带有三角酵母 FA10 D-氨基酸氧化酶基因 (Li, W. et al., *Acta Microbiologica Sinica* 31:251-253, 1991)。PCR 反应条件为: 40 ng pJL, 0.4 μ M 5' -NdeI, 0.4 μ M 3' -BglIII, 50 μ M dATP, 50 μ M dTTP, 50 μ M dCTP, 50 μ M dGTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 2.5 U Pfu DNA 聚合酶, 用无菌水调反应体积至 50 μ l。PCR 扩增反应程序为: 94°C, 5 分钟; 94°C, 1 分钟, 50°C, 1 分钟, 72°C, 2 分钟, 循环 10 次; 94°C, 1 分钟, 60°C, 1 分钟, 72°C, 2 分钟, 循环 25 次; 72°C, 10 分钟。

得 1,098 bp 长 PCR 产物, 其 5' 和 3' 端分别具有 NdeI 和 BglIII 限制性酶切位点。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳提纯, NdeI 及 BglIII 酶切后, 与经 NdeI 及 BglIII 酶切质粒 pRSET-A (Invitrogen) 得到的 2.9 Kb 的片段连接, 得连接产物 pRSET-A-DAO。将 pRSET-A-DAO 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS (Novagen), 在氨苄青霉素 LB 平板上 37°C 培养, 按照 *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, ed. By J. Sambrook, et. al., 1989, CSHL Press) 描述的方法提取质粒, 经 DNA 测序, 确定三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因 DNA 序列如序列号 5 所示, 其推测出的氨基酸序列如序列号 6 所示。

实施例 6：含有 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 的表达载体的构建

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

根据实施例 5 克隆的三角酵母 D-氨基酸氧化酶基因之序列 (序列号 5), 设计引物如下:

引物 A: 5' -TAGGGCTGACATATGGCTAAAATCGTTGTTATTG -3' ;

引物 B: 5' -TAGGGCTGAAGATCTCTAAAGGTTTGGACGAG -3' ;

引物 C1: 5' -GCAGGTGCCAACTGGCTCCCGTTTTACGATGGAGGCAAG-3' ;

引物 D: 5' -GAGCCAGTTGGCACCTGCCCAAGG-3' 。

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

利用聚合酶链式反应, 以 pRSET-A-DAO 为模板, 用引物对 A 和 D 扩增模板片段 1; 用引物对 B 和 C1 扩增模板片段 2。扩增反应条件为: 20 ng pRSET-A-DAO, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.4 μM 引物 A 和 0.4 μM 引物 D (扩增模板片段 1) 或 0.4 μM 引物 B 和 0.4 μM 引物 C1 (扩增模板片段 2), 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 1.5 U Pfu DNA 聚合酶, 用无菌水调反应体积至 50 μl。聚合酶链式反应扩增程序为: 94°C, 2 分钟; 94°C, 1 分钟, 53°C, 1 分钟, 72°C, 1 分钟, 循环 30 次; 72°C, 10 分钟。

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

反应扩增程序为：94°C，2 分钟；94°C，1 分钟，53°C，1 分钟，72°C，2 分钟，循环 35 次；72°C，10 分钟。

全长扩增反应得到 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 基因，经 NdeI 及 BglIII 酶切后连接到 pRSET-kan 得连接产物 pRSET-kan-DAOGHA，将 pRSET-kan-DAOGHA 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS，卡那霉素 LB 平板 37°C 培养，提取质粒，经 DNA 测序确定引入的突变无误，确定 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 的 DNA 序列如序列号 1 所示，其推测出的氨基酸序列如序列 2 所示。

实施例 7：载体 pHS-GHA（见图 2）的构建

用 NdeI 和 BglIII 酶切质粒 pRSET-kan-DAOGHA，得一 1,074bp 基因片段（内含 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 基因），经 0.8%琼脂糖电泳提纯，与经 NdeI 和 BglIII 酶切的 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan 得到的长片断连接，得 pHS-GHA。将 pHS-GHA 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS (Novagen)，得菌株 BL-HS-GHA，在卡那霉素（50 µg/mL）LB 琼脂平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press) 描述的方法提取质粒，测定其 DNA 序列如序列号 3 所示。其中数个核苷酸有改动：1390(C→G)；1535(缺失了 T)；1826(A→T)；1848(C→T)；2501(G→T)；2577(T→A)；3882(C→T)。

实施例 8：载体 pT7-kan-ACY（见图 3）的构建

根据已知的假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶 DNA 序列 (Matsuda, A. et al., 1987, J. Bacteriol. 169, 5821-5826)，设计 PCR 引物如下：

上游引物(NdeI-ACY)：5' -CATATGAACGCTCCCGTCCCCGTCCC-3'，NdeI 酶切位点以下划线表示；

下游引物(BglIII-ACY)：5' -AGATCTTCAGATGGTGAAGCGGGCAC-3'，BglIII 酶切位点以下划线表示。

以假单孢菌 SE83 DNA 为模板，用上述引物进行 PCR，扩增得到

— 1,676bp 产物。PCR 条件为：50 ng 假单孢菌 SE83 DNA, 0.4 μ M NdeI-ACY, 0.4 μ M BglII-ACY, 50 μ M dATP, 50 μ M dTTP, 50 μ M dCTP, 50 μ M dGTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 2.5 U Pfu DNA 聚合酶 (Promega), 用无菌水调反应体积至 50 μ L。

PCR 扩增反应程序为：95°C, 5 分钟；94°C, 1 分钟, 50°C, 1 分钟, 72°C, 3 分钟, 循环 35 次；72°C, 10 分钟。

该 PCR 产物 (1,676bp) 在 5' 和 3' 端分别含有 NdeI 和 BglII 酶切位点。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳提纯, NdeI 和 BglII 酶切后, 与经 NdeI 和 BglII 酶切的 pRSET-kan 连接, 得 pT7-kan-ACY。将 pT7-kan-ACY 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS (Novagen), 得菌株 BL-T7K-ACY, 在卡那霉素 (50 μ g/mL) LB 琼脂平板上于 37°C 培养过夜。按照 Molecular Cloning-A Laboratory Manual (Sambrook, J. et al., 1989, CSHL Press) 描述的方法提取质粒, 测定其 DNA 序列如序列号 4 所示。其中四个核苷酸有改动：2260(G→T)；2336(T→A)；3641(C→T)；4117(G→C)。

实施例 9：D-氨基酸氧化酶突变体 GH A 之发酵培养基及发酵工艺

从卡那霉素 (50 μ g/mL) LB 琼脂平板上挑取单菌落大肠杆菌 BL-HS-GHA (见实施例 7), 接种到 2×5 mL 含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的液体 LB 培养基, 在 37°C 培养 8 小时 (摇床转速为 250 转每分钟), 再接种至 2×50 mL 种子培养基含卡那霉素 (100 g/mL) 和氯霉素 (40 μ g/mL), 在 30°C 培养 16 小时 (摇床转速为 400 转每分钟)。

玉米浆 1 之制备：

将 300 g 玉米浆 (购自华北制药康欣有限公司) 溶于 300 mL 蒸馏水, 搅拌后离心 (5,000 g, 8 分钟), 上清液即为玉米浆 1。沉淀物留用。

玉米浆 2 之制备：

将上述沉淀物再溶于 600 mL 蒸馏水, 搅拌后离心 (5,000 g, 8 分钟), 上清液即为玉米浆 2。

50 mL 种子培养基中各成分重量如下：

玉米浆 1	4 mL
玉米浆 2	4 mL
酵母浸膏	0.2 g
硫酸铵	0.075 g
磷酸氢二钠	0.25 g
磷酸二氢钾	0.04 g
氯化钠	0.075 g

将各成分溶于 50 mL 蒸馏水，以 10 N 氢氧化钠调 pH 值至 7.15，高温消毒。

种子过夜发酵后，将全部 100 mL 之种子接种至 2 L 发酵罐（BIOENGINEERING, Benchtop Fermentor, KLF2000）含卡那霉素（50 $\mu\text{g/mL}$ ）。

2L 发酵培养基中各成分重量如下：

玉米浆 1	160 mL
玉米浆 2	160 mL
酵母浸膏	8 g
硫酸铵	3 g
磷酸氢二钠	10 g
磷酸二氢钾	1 g
氯化钠	3 g

将各成分溶于 1.9 L 蒸馏水，以 10 N 氢氧化钠调 pH 值至 7.15，于 2 L 发酵罐（BIOENGINEERING, Benchtop Fermentor, KLF2000）高温消毒。

将 12.5 g 葡萄糖溶于 50 mL 蒸馏水，高温消毒；将 1.25 g 硫酸镁溶于 50 mL 蒸馏水，高温消毒。

发酵前把已消毒的葡萄糖和硫酸镁放进 2 L 发酵罐。

补料之制备：

将 250 mL 玉米浆 1 和 250 mL 玉米浆 2 混合，以 10 N 氢氧化钠调 pH 值至 7.25，高温消毒。

将 2.25 g 硫酸铵，7.56 g 磷酸氢二钠，1.2 g 磷酸二氢钾，2.25 g 氯化钠溶于 60 mL 蒸馏水，高温消毒。

将 15 g 酵母浸膏溶于 100 mL 蒸馏水，高温消毒。

将 70 g 葡萄糖溶于 140 mL 蒸馏水，高温消毒。

将 30 mL 甘油混合 10 mL 蒸馏水，高温消毒。

将 20 g 硫酸镁溶于 30 mL 蒸馏水，高温消毒。

将所有溶液混合，加入卡那霉素至浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，加入 2 mL 消泡剂。

在 35°C 生长，在初始的 6 小时，pH 值由 6.9 自然上升至 7.2，开始补料（50 mL/小时）。在平衡条件下（以 5 N 氢氧化钾将 pH 值维持在 7.2，溶氧水平 pO_2 不大于 0.5%），继续生长 26 小时。

实施例 10：粗纯 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 之提取

按实施例 9 发酵后，细菌在 4°C 经离心机分离（5,000 g，8 分钟），弃上清液，得 220 g 细菌（湿重），将细菌重悬于 600 mL 磷酸钠缓冲液（50 mM，pH7.5）。用珠磨法裂解细菌，以 50 mL 每分钟之速度把细菌重悬液送进珠磨机（DYNO-MILL TYP KDL，0.2 mm 直径玻璃珠，WA Bachofen）内，最后再以 800 mL 磷酸钠缓冲液（50 mM，pH7.5）把细菌残留冲洗出来。将细菌裂解液放在 55°C 水浴中浸泡 30 分钟，以高速离心（10,000 g，30 分钟），取上清液，即为粗纯之 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA。取样并采用 SDS-PAGE 检测目标蛋白的纯度和含量（见图 5）。如图所示，粗纯之 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 约占总可溶蛋白 40%。

实施例 11：D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 之提纯

取按实施例 10 提取之粗纯 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA，加入甘油至最终浓度为 10%，用 5N 氢氧化钠调 pH 值至 8，离心（13,000 g，30 分钟），取上清液。按产品供应商所述产品制备法配备 DEAE-纤维素离子交换树脂（Sigma，D-0909）。按每 1mL 粗纯酶混合 0.5mL DEAE-纤维素离子交换树脂，在 4°C 搅拌 5 小时（100 转每分钟），用滤斗

(Buchner filter funnel, 120 mm P1) 将酶液滤去。以 3 份 DEAE-纤维素离子交换树脂体积之 40 mM 磷酸二氢钠缓冲液 (含 10%甘油) 冲洗 DEAE-纤维素离子交换树脂, 再用 2 份 DEAE-纤维素离子交换树脂体积之 400 mM 磷酸二氢钠缓冲液将 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 洗脱出来。按每 1L 洗脱之 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA, 加入 262 g 硫酸铵, 在室温搅拌 15 分钟 (100 转每分钟)。离心 (13,000 g, 15 分钟), 弃上清液, 保留沉淀物。将沉淀物溶于 10 mM 磷酸二氢钠缓冲液 (pH7.5)。取样并采用 SDS-PAGE 检测目标蛋白的纯度和含量 (见图 5)。如图所示, 提取之 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 约占总可溶蛋白 90%。

实施例 12: D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 活性的检测

检测基本按 Isogai, T. et al., 1990, J. Biochem. [Tokyo] 108, 1063-1069 所述之方法, 其中具体步骤有变更。将按实施例 11 纯化的 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 用磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH7.5) 稀释 10 倍, 取 2 mL, 与相同体积之 150 mM 头孢菌素 C 钠盐混合, 在 37°C 下反应, 反应中保持搅拌 (搅拌速度为 450 转每分钟), 并用 5N 氢氧化钠将 pH 值保持在 7.5。反应开始后在不同时间 (0, 15, 30, 45 分钟, 见图 6) 抽取 100 μ L 样本, 与 10 μ L 3%过氧化氢混匀, 再加入 50 μ L 10%三氯醋酸, 混匀以终止反应。离心 (10,000g, 3 分钟), 取 10 μ L 上清液混合 990 μ L HPLC 流动相 (50 mM 磷酸钾, pH7; 5%乙腈)。用 HPLC 检测酶反应, 条件如下:

HPLC 色谱柱: Diamonsil™ C18, 250 $\times$ 4.6 mm (迪马公司, 北京)

柱温度: 30°C

流速: 1 mL 每分钟

检测: 260 nm

一单位 D-氨基酸氧化酶活性定义为在上述条件每分钟转化一微摩尔头孢菌素 C 钠盐至戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸的酶量。

获得之 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 总活性为 95,607 单位, 即每升发酵液含 35,410 单位。

实施例 13：固相 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 之制备

按实施例 11 所述纯化 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA。固相 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 之制备参照载体供应商意大利 Resindion S. R. L. 的说明进行，其中具体步骤有变更。

载体活化：取 10g Sepabeads HA 湿载体，加入 30 mL 磷酸二氢钾缓冲液（100 mM，pH8），在室温下搅拌（300 转，15 分钟）后，用 5 N 氢氧化钠调 pH 值至 8，静置。将载体过滤，用 40 mL 磷酸钾缓冲液（20 mM，pH8）搅拌洗涤 5 分钟，再过滤并抽干。将载体加入 40 mL 2%戊二醛溶液，在室温下搅拌（300 转，60 分钟），静置。将载体过滤，用 40 mL 磷酸钾缓冲液（20 mM，pH8）搅拌洗涤 5 分钟，再过滤并抽干。重复此洗涤步骤 5 次，为活化湿载体。

酶固相化：按比例混合活化湿载体和纯化 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA（每 10 g 活化湿载体混合 100 mL 纯化 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA），在室温下搅拌（300 转，1 分钟）后，用 1N 氢氧化钠调 pH 值至 8，再搅拌 18 小时，静置。将载体过滤，将固相产物用 40 mL 磷酸钾缓冲液（20 mM，pH8）搅拌洗涤 2 分钟，再过滤。将固相产物用 40 mL 氯化钠溶液（0.5 M 氯化钠溶于 20 mM 磷酸钾缓冲液，pH8）搅拌洗涤 20 分钟，过滤。重复此洗涤步骤直至洗涤液中蛋白量少于 0.1 mg/mL。将固相产物用 40 mL 磷酸钾缓冲液（20 mM，pH8）搅拌洗涤 2 分钟，过滤及抽干后，得 115 g 固相 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA。固相酶活性之检测基本上与实施例 12 所述相同，其中所用反应液体积为 200 mL 的 75 mM 头孢菌素 C 钠盐，加入 4g 固相 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA，测得活性为 77 单位/g 湿载体。

实施例 14：假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的发酵培养基及发酵工艺

从卡那霉素（50 μ g/mL）LB 琼脂平板上挑取单菌落大肠杆菌 BL-T7K-ACY（见实施例 8），接种到 2 $\times$ 5mL 含卡那霉素（50 μ g/mL）的液体 LB 培养基，在 37°C 培养 8 小时（摇床转速为 250 转每分钟），

再接种至 2×50 mL 种子培养基含卡那霉素 ($50 \mu\text{g/mL}$)，在 30°C 培养 16 小时（摇床转速为 400 转每分钟）。

50 mL 种子培养基中各成分重量如下：

酵母浸膏	0.35 g
磷酸氢二钠	0.35 g
磷酸二氢钾	0.35 g
磷酸氢二钾	0.48 g
硫酸铵	0.06 g
氯化铵	0.01 g
甘油	0.5 mL
氯化钙	0.00055 g

将各成分溶于 50mL 蒸馏水，高温消毒。

种子过夜发酵后，将全部 100mL 之种子接种至 2L 发酵罐（BIOENGINEERING, Benchtop Fermentor, KLF2000）含卡那霉素 ($50 \mu\text{g/mL}$)。

2L 发酵培养基中各成分重量如下：

酵母浸膏	14 g
磷酸氢二钠	14 g
磷酸二氢钾	14 g
磷酸氢二钾	19.2 g
硫酸铵	2.4 g
氯化铵	0.4 g
甘油	20 mL
氯化钙	0.022 g

将各成分溶于 2 L 蒸馏水，于 2 L 发酵罐（BIOENGINEERING, Benchtop Fermentor, KLF2000）高温消毒。

将 1 g 硫酸镁溶于 20 mL 蒸馏水，高温消毒；将 0.14 g 氯化锌溶于 20 mL 蒸馏水，高温消毒。

发酵前把已消毒的硫酸镁和氯化锌放进 2 L 发酵罐。

补料之制备：

酵母浸膏	14 g
磷酸氢二钠	4.9 g
磷酸二氢钾	4.9 g
磷酸氢二钾	6.4 g
硫酸铵	0.84 g
氯化铵	0.14 g
甘油	175 mL
氯化钙	0.008 g

将各成分溶于 700 mL 蒸馏水，高温消毒。

将 0.34 g 硫酸镁溶于 20 mL 蒸馏水，高温消毒后，加进已消毒之 700 mL 之补料。

进行补料前，将硫酸镁加入补料，加卡那霉素至最终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，放入 2 mL 消泡剂。

在 30°C 生长，在初始的 4 小时内，以 5 N 氢氧化钾将 pH 值由 6.9 缓慢调升至 7.2。当 OD_{600} 值达至 4 时，开始补料（60 mL/小时）。在之后的 4 小时内再用 5N 氢氧化钾将 pH 值调升至 7.4。当 OD_{600} 值达至 8 时，加入异丙基硫代半乳糖苷（IPTG, Sigma）至 0.1 mM。以 5 N 氢氧化钾将 pH 值维持在 7.4，溶氧水平 pO_2 维持在 30%，继续生长 26 小时。

实施例 15：假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶之提纯

按实施例 14 发酵后，细菌在 4°C 经离心机分离（5,000 g，8 分钟），弃上清液，得 130 g 细菌（湿重），将细菌重悬于 400 mL 磷酸钠缓冲液（50 mM，pH8）。用珠磨法裂解细菌，以 50 mL 每分钟之速度把细菌重悬液送进珠磨机（DYNO-MILL TYP KDL，0.2 mm 直径玻璃珠，WA Bachofen）内，最后再以 600 mL 磷酸钠缓冲液（50 mM，pH8）把细菌残留冲洗出来。将细菌裂解液放在 55°C 水浴中浸泡 15 分钟，以高速离心（10,000 g，30 分钟），取上清液，即为粗纯之假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶。取样并采用 SDS-PAGE 检测目标蛋白的纯度和含量（见图 7）。如图所示，粗纯之

假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶约占总可溶蛋白 40%。

实施例 16：假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶活性的检测

检测基本按 Binder, R. et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60, 1805-1809 所述之方法，其中具体步骤有变更。将按实施例 15 提取的假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶用磷酸钠缓冲液（50 mM, pH8）稀释 10 倍，与相同体积之 150 mM 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸（制备方法参见 Shibuya, Y. et al., 1981, Agric. Biol. Chem. 45, 1561-1567）混合，在 37°C 下反应，反应中保持搅拌（搅拌速度为 450 转每分钟），并用 5 N 氢氧化钠将 pH 值保持在 8。反应开始后在不同时间（0, 15, 30, 45 分钟，见图 8）抽取 60 μ L 样本，与 30 μ L 10%三氯醋酸混匀以终止反应。离心（10,000 g, 3 分钟），取 10 μ L 上清液混合 990 μ L HPLC 流动相（50 mM 磷酸钾，pH7；5%乙腈）。用 HPLC 检测酶反应，条件和实施例 12 相同。

一单位戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶活性定义为在上述条件每分钟转化一微摩尔戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸至 7-氨基头孢霉烷酸的酶量。

获得之假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶总活性为 24,882 单位，即每升发酵液含 9,570 酶单位。

实施例 17：固相假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶之制备

按实施例 15 所述制备假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶。固相假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶之制备参照载体供应商德国 Röhm 公司的说明进行，其中具体步骤有变更。取 10 g Eupergit C250L 湿载体混合 100 mL 假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶，在室温下搅拌（300 转，72 小时），静置。过滤，用 100 mL 蒸馏水在室温下搅拌洗涤（300 转，2 分钟），用 3

号砂芯漏斗抽干，重复此洗涤步骤直至过滤液中蛋白量少于 0.1 mg/mL，得 80 g 固相假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶。固相酶活性之检测基本上与实施例 16 所述相同，其中所用反应液体积为 200 mL 75 mM 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸，加入 6 g 固相假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶，测得活性为 50 单位/g 湿载体。

实施例 18：两步固相酶转化头孢菌素 C 至 7-氨基头孢霉烷酸

制备 1L 75mM 头孢菌素 C 钠盐水溶液，加入 40g 按实施例 13 制备之固相 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA，在室温搅拌（250 转每分钟，供氧量为 0.3m³ 每小时）1 小时，用 3M 氨水（NH₄OH）调 pH 值为 7.5。过滤反应液，加入 50g 按实施例 17 制备之固相假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶，在室温搅拌（250 转每分钟）1 小时，用 3M 氨水调 pH 值为 8。用 HPLC 检测反应产物 7-氨基头孢霉烷酸，条件和实施例 16 相同。HPLC 图谱见图 9。如图 9 所示，整个转化过程为 120 分钟，在反应开始 60 分钟后，绝大部分头孢菌素 C 被 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 转化成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸（见图 9，GL-7-ACA，60 分钟峰）。反应继续进行 60 分钟后，绝大部分戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸被假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶转化成 7-氨基头孢霉烷酸（见图 9，7-ACA，120 分钟峰）。根据 HPLC 数据计算，由头孢菌素 C 转化成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸之产率为 97.96%；由戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸转化成 7-氨基头孢霉烷酸之产率为 95.78%。由头孢菌素 C 经两步酶法转化成 7-氨基头孢霉烷酸之总产率为 93.83%。

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

权利要求书

1. 一种从头孢菌素 C 制备 7-氨基头孢霉烷酸的方法，包括用 D-氨基酸氧化酶催化头孢菌素 C 至戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸的第一步反应和用戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶催化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸至 7-氨基头孢霉烷酸的第二步反应，其特征在于，所述 D-氨基酸氧化酶为经纯化的、具有序列号 2 所示氨基酸序列的三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) D-氨基酸氧化酶突变体。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，所述第一步反应中不添加过氧化氢。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，所述 D-氨基酸氧化酶是由具有序列号 3 所示 DNA 序列的表达载体 pHs-GHA 表达的。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，所述 D-氨基酸氧化酶的纯化包括依次通过 DEAE-纤维素离子交换树脂纯化以及通过硫酸铵沉淀纯化。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，所述第一步反应和第二步反应都不添加选自抗坏血酸、3-氨基-1,2,3-三唑、过硼酸钠和叠氮化钠的 β -内酰胺酶抑制剂。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，所述第一步反应中不添加选自舒巴坦钠、棒酸、硼酸及其衍生物的过氧化氢酶抑制剂。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，所述第二步反应中不添加过氧化氢酶。
8. 根据权利要求 1-7 中任意一项所述的方法，所述 D-氨基酸氧

化酶是固相化的，或者所述戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶是固相化的。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，所述戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶为假单孢菌 (*Pseudomonas* sp.) SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，所述假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶是由具有序列号 4 所示 DNA 序列的表达载体 pT7-kan-ACY 表达的。

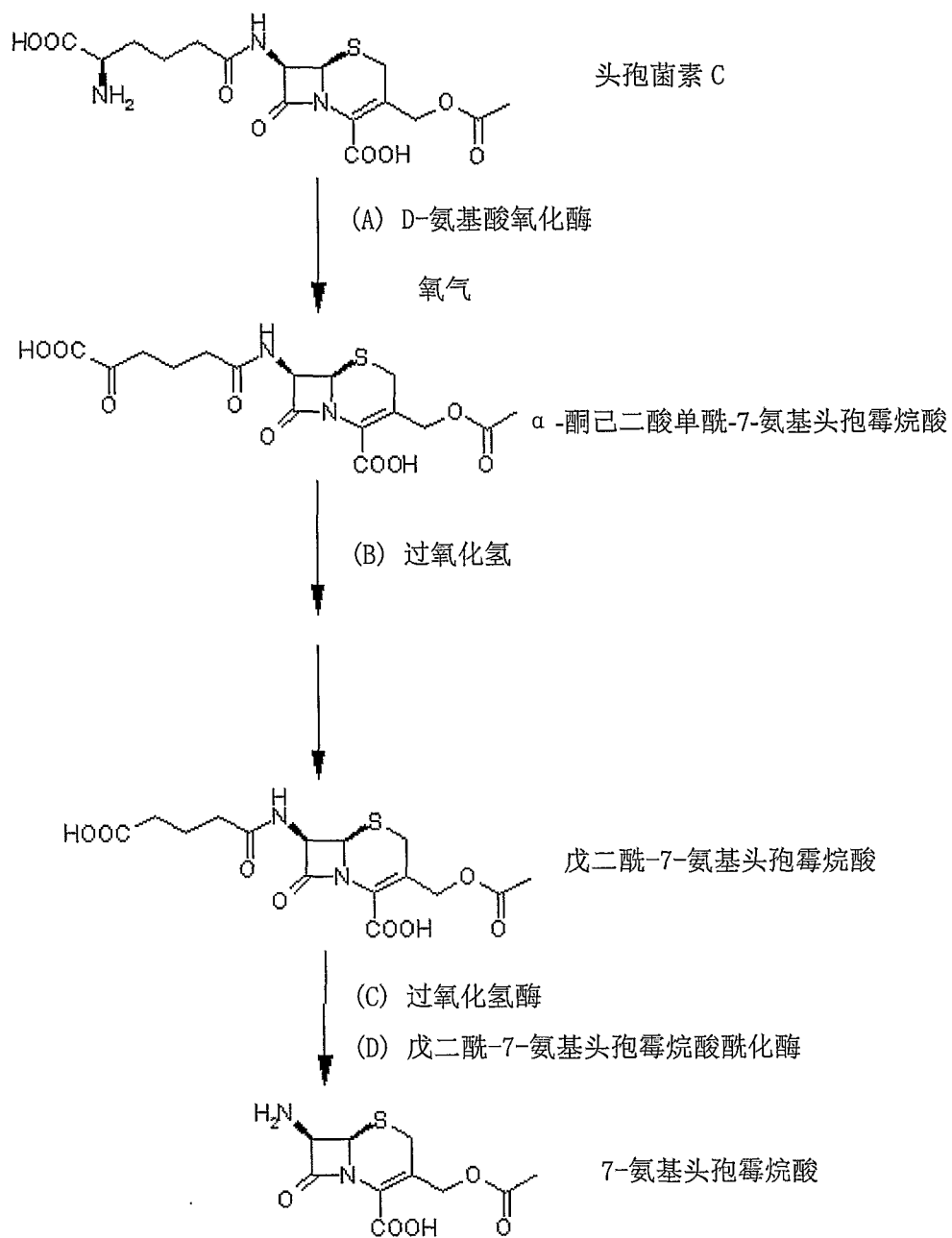


图 1: 现行头孢菌素 C 转化成 7-氨基头孢霉烷酸的反应流程

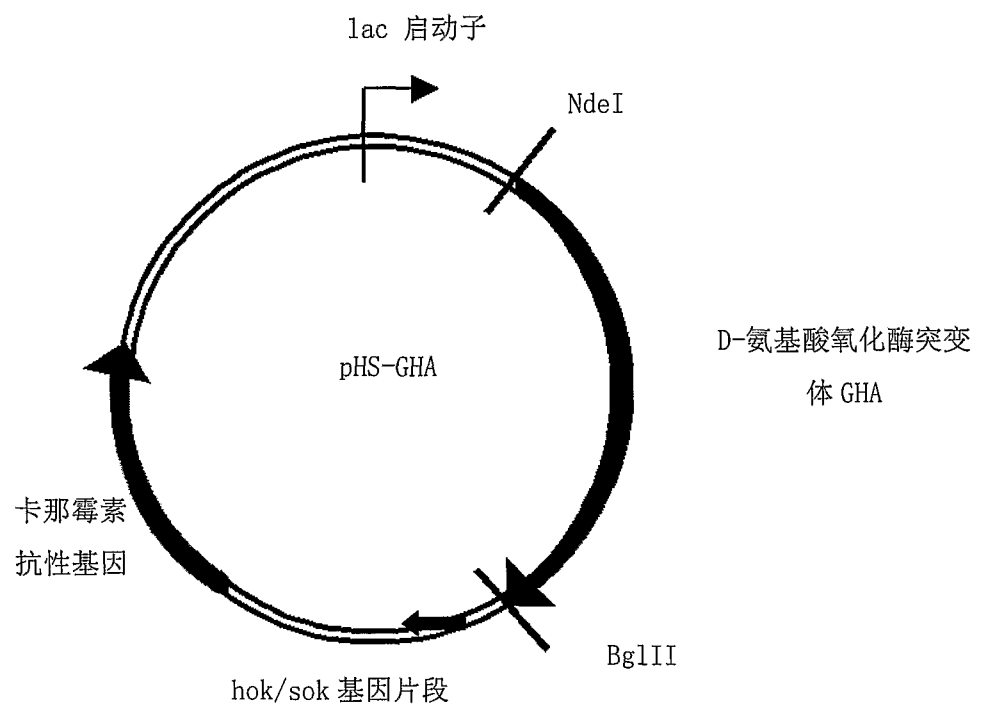


图 2: 表达载体 pHS-GHA

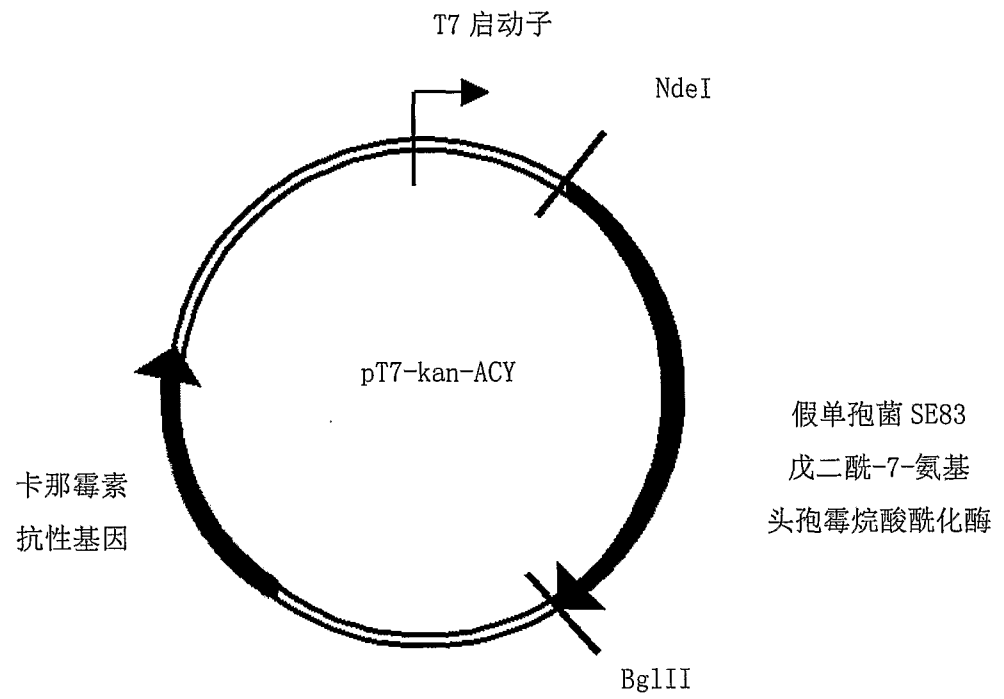


图 3: 表达载体 pT7-kan-ACY

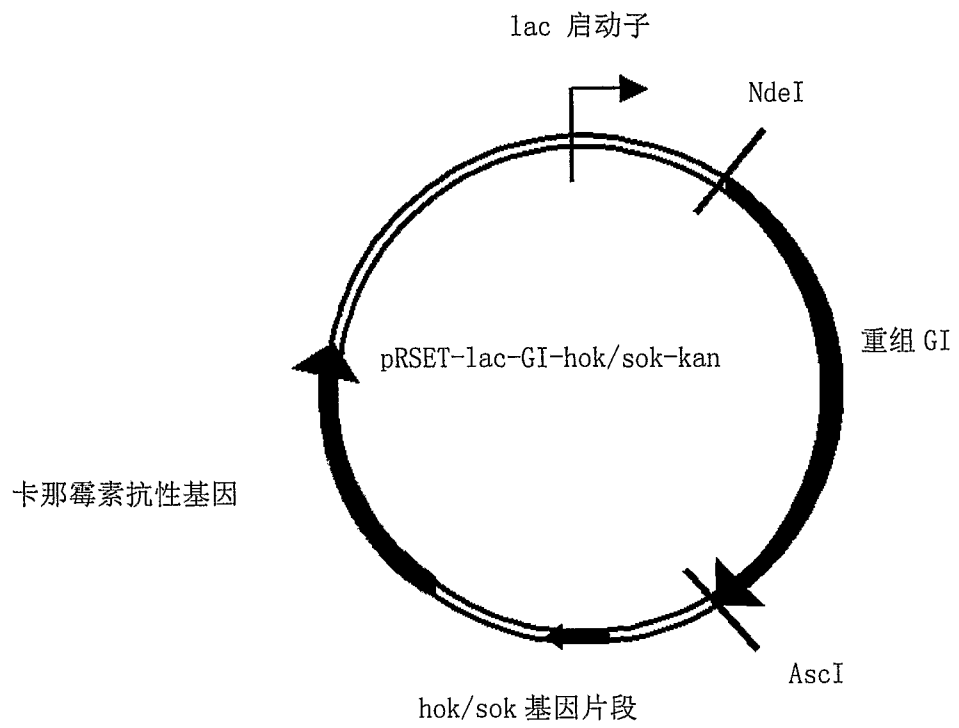


图 4: 表达载体 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan

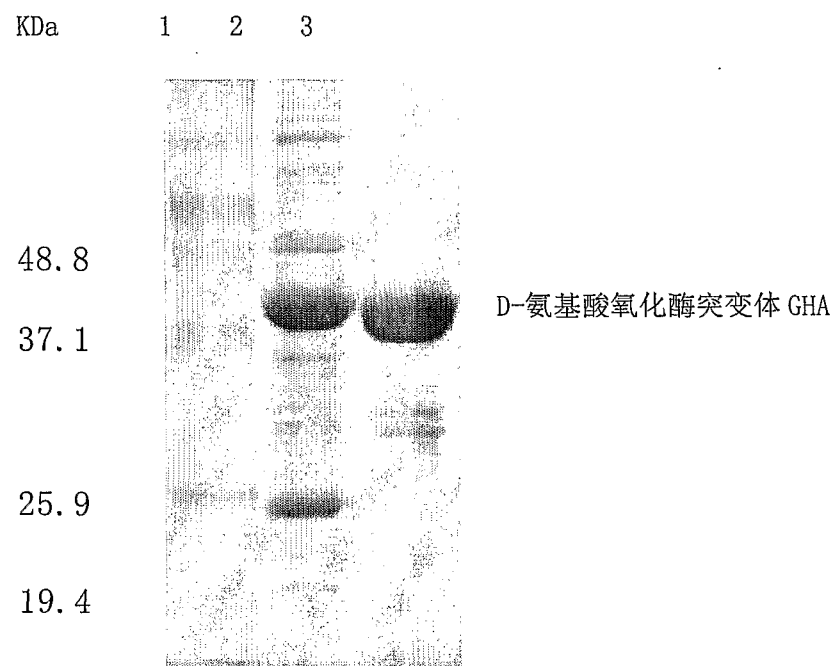


图 5: D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 的 SDS-PAGE 电泳图

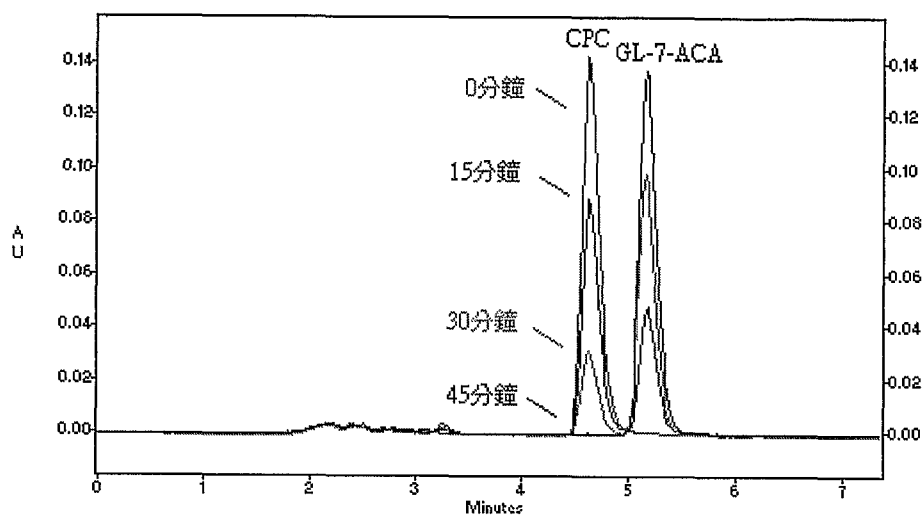


图 6: D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 转化头孢菌素 C 至戊二酰-7-氨基头
孢霉烷酸的 HPLC 图谱

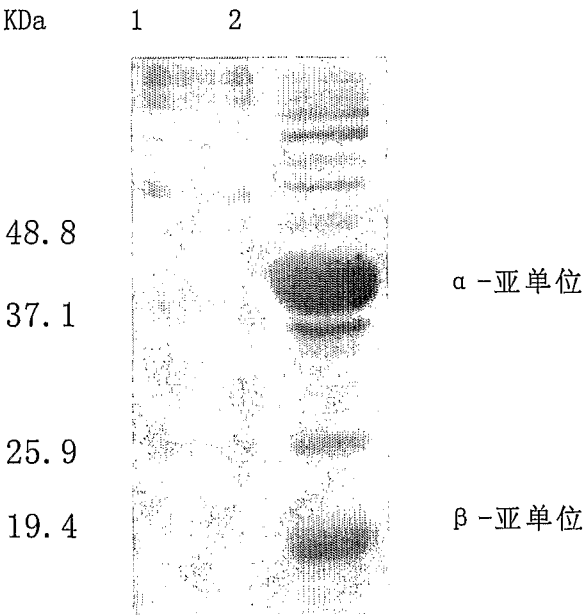


图 7：假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的 SDS-PAGE 电泳图

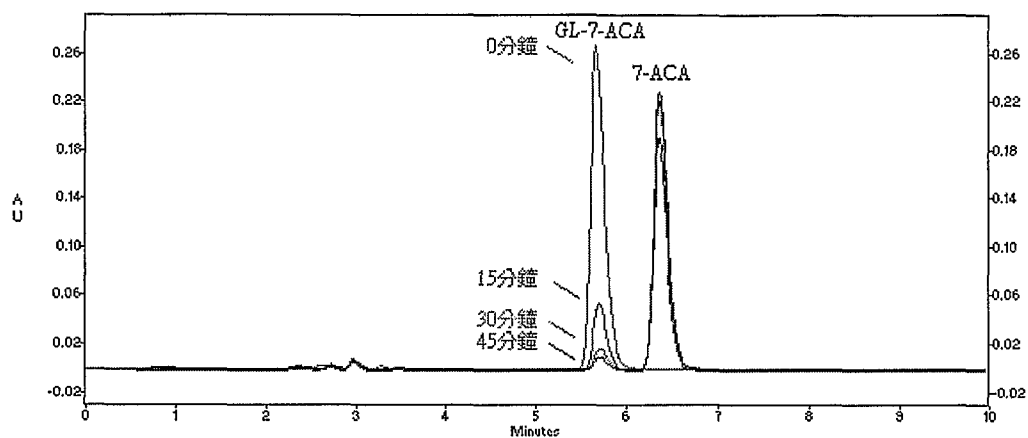


图 8：假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶转化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸至 7-氨基头孢霉烷酸的 HPLC 图谱

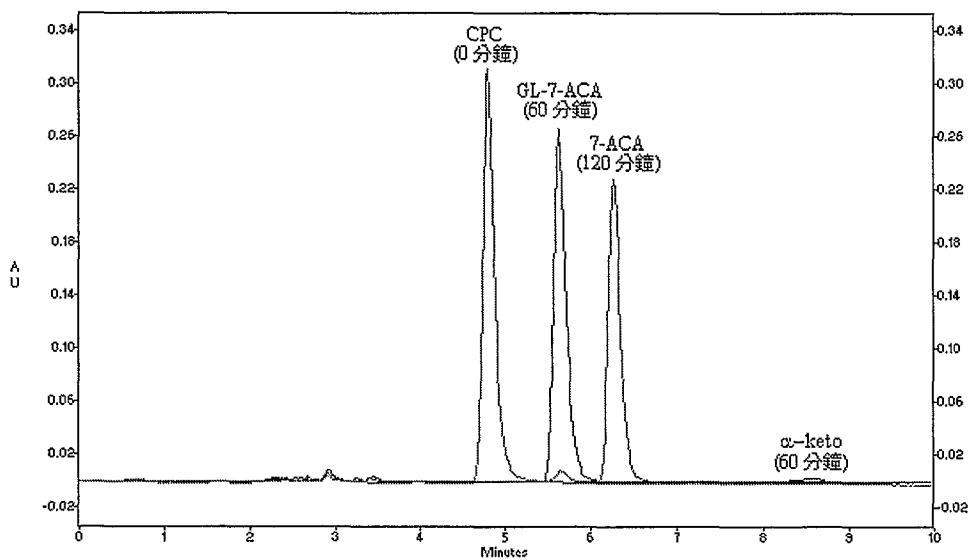


图 9：两步固相酶转化头孢菌素 C 至 7-氨基头孢霉烷酸的 HPLC 图谱

SEQUENCE LISTING

<110> 百瑞全球有限公司

王, 骏
肖, 游龙
叶, 康坚
曾, 实现
陈, 军明
曾, 伟基

<120> 一种用于制备7-氨基头孢霉烷酸的两步酶法

<130> UP-060649-59

<150> CN200510089965.3

<151> 2005-08-08

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1071

<212> DNA

<213> *Trigonopsis variabilis*

<400> 1

```

atggctaaaa tcgttggtat tgggtgccgt gttgccggtt taactacagc tcttcaactt    60
cttcgtaaag gacatgaggt tacaattgtg tccgagttta cgcccgggtga tcttagtata    120
ggatatacct cgccttgggc aggtgccaac tggtctccgt tttacgatgg aggcaagtta    180
gccgactacg atgccgtctc ttatcctata ttgcgagagc tggctcgaag cagccccgag    240
gctggaattc gactcatcaa ccaacgtcc catgttctca agcgtgatct tcctaaactg    300
gaaggtgcca tgtcgcccat ctgtcaacgc aaccctggt tcaaaaacac agtcgattct    360
ttcgagatta tcgaggacag gtccaggatt gtccacgatg atgtggctta tctagtcaa    420
tttgcttccg tttgtatcca caccggagtc tacttgaact ggctgatgtc ccaatgctta    480
tcgctcggcg ccacgggtgt taaacgtcga gtgaaccata tcaaggatgc caattttcta    540
cactcctcag gatcacgccc cgacgtgatt gtcaactgta gtggtctctt tgcccgggtc    600
ttgggaggcg tcgaggacaa gaagatgtac cctattcgag gacaagtcgt ccttggtcga    660
aactctcttc cttttatggc ctcttttcc agcactcctg aaaaagaaaa tgaagacgaa    720
gctctatata tcatgaccg attcgatggt acttctatca ttggcgggtg tttccaatcc    780
aacaactggt catccgaacc cgatccttct ctacccatc gaatcctgtc tagagccctc    840
gaccgattcc cggaactgac caaagatggc cctcttgaca ttgtgcgca atgcgttggc    900
caccgtcctg gtagagaggg cgggtcccca gtagaattag agaagatccc cggcgttggc    960
tttggtgtcc ataactatgg tgccgccgtt gctggttacc agtcctctta cggcatggct    1020
gatgaagctg tttcttacgt cgaaagagct cttactcgtc caaaccttta g            1071

```

<210> 2

<211> 356

<212> PRT

<213> *Trigonopsis variabilis*

<400> 2

```

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

```

```

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

```

Phe Thr Pro Gly Asp Leu Ser Ile Gly Tyr Thr Ser Pro Trp Ala Gly
 35 40 45
 Ala Asn Trp Leu Pro Phe Tyr Asp Gly Gly Lys Leu Ala Asp Tyr Asp
 50 55 60
 Ala Val Ser Tyr Pro Ile Leu Arg Glu Leu Ala Arg Ser Ser Pro Glu
 65 70 75 80
 Ala Gly Ile Arg Leu Ile Asn Gln Arg Ser His Val Leu Lys Arg Asp
 85 90 95
 Leu Pro Lys Leu Glu Gly Ala Met Ser Ala Ile Cys Gln Arg Asn Pro
 100 105 110
 Trp Phe Lys Asn Thr Val Asp Ser Phe Glu Ile Ile Glu Asp Arg Ser
 115 120 125
 Arg Ile Val His Asp Asp Val Ala Tyr Leu Val Glu Phe Ala Ser Val
 130 135 140
 Cys Ile His Thr Gly Val Tyr Leu Asn Trp Leu Met Ser Gln Cys Leu
 145 150 155 160
 Ser Leu Gly Ala Thr Val Val Lys Arg Arg Val Asn His Ile Lys Asp
 165 170 175
 Ala Asn Phe Leu His Ser Ser Gly Ser Arg Pro Asp Val Ile Val Asn
 180 185 190
 Cys Ser Gly Leu Phe Ala Arg Phe Leu Gly Gly Val Glu Asp Lys Lys
 195 200 205
 Met Tyr Pro Ile Arg Gly Gln Val Val Leu Val Arg Asn Ser Leu Pro
 210 215 220
 Phe Met Ala Ser Phe Ser Ser Thr Pro Glu Lys Glu Asn Glu Asp Glu
 225 230 235 240
 Ala Leu Tyr Ile Met Thr Arg Phe Asp Gly Thr Ser Ile Ile Gly Gly
 245 250 255
 Cys Phe Gln Ser Asn Asn Trp Ser Ser Glu Pro Asp Pro Ser Leu Thr
 260 265 270
 His Arg Ile Leu Ser Arg Ala Leu Asp Arg Phe Pro Glu Leu Thr Lys
 275 280 285
 Asp Gly Pro Leu Asp Ile Val Arg Glu Cys Val Gly His Arg Pro Gly
 290 295 300
 Arg Glu Gly Gly Pro Arg Val Glu Leu Glu Lys Ile Pro Gly Val Gly
 305 310 315 320
 Phe Val Val His Asn Tyr Gly Ala Ala Gly Ala Gly Tyr Gln Ser Ser
 325 330 335
 Tyr Gly Met Ala Asp Glu Ala Val Ser Tyr Val Glu Arg Ala Leu Thr
 340 345 350

Arg Pro Asn Leu
355

<210> 3
<211> 4723
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 表达载体pHS-GHA

<400> 3
catatggcta aaatcgttgt tatgtgtgcc ggtgttgccg gtttaactac agctcttcaa 60
cttcttcgta aaggacatga ggttacaatt gtgtccgagt ttacgcccgg tgatcttagt 120
atcggatata cctcgccttg ggcaggtgcc aactggctcc cgttttacga tggaggcaag 180
ttagccgact acgatgccgt ctcttatect atcttgcgag agctggctcg aagcagcccc 240
gaggctggaa ttcgactcat caaccaacgc tcccatgttc tcaagcgtga tcttcctaaa 300
ctggaagggtg ccatgtcggc catctgtcaa cgcaaccctt gtttcaaaaa cacagtcgat 360
tctttcgaga ttatcgagga cagggtccagg attgtccacg atgatgtggc ttatctagtc 420
gaatttgctt cgtttgtat ccacaccgga gtctacttga actggctgat gtcccaatgc 480
ttatcgtcgc gcgccacggt ggttaaacgt cgagtgaacc atatcaagga tgccaatttt 540
ctacactcct caggatcacg ccccgacgtg attgtcaact gtagtggctt ctttgcccgg 600
ttcttgggag gcgtcgagga caagaagat taccctattc gaggacaagt cgtccttggt 660
cgaaactctc ttccctttat ggctcctttt tccagcactc ctgaaaaaga aaatgaagac 720
gaagctctat atatcatgac ccgattcgat ggtactttcta tcattggcgg ttgtttccaa 780
tccaacaact ggtcatccga acccgatcct tctctcacc atcgaatcct gtctagagcc 840
ctcgaccgat tcccggaact gaccaaagat ggccctcttg acattgtgcg cgaatgcgtt 900
ggccaccgtc ctggtagaga gggcggtccc cgagtagaat tagagaagat ccccggcgtt 960
ggctttgttg tccataacta tgggtccgcc ggtgtgtgtt accagtcctc ttacggcatg 1020
gctgatgaag ctgtttctta cgtcgaaaga gctcttactc gtccaaacct ttagagatct 1080
tttcttaggt cacatagcag gaatggatgc ttttgcaaaa ggctttaaag ttgcttacia 1140
gcttgtgaaa gatggcgtat ttgacaagtt catcgaagaa agatacgcaa gctacaaaga 1200
aggcattggc gctgatattg taagcggtaa agctgacttc aagagccttg aaaagtatgc 1260
attagagcac agccagattg taaacaaatc aggcagacaa gagctattag aatcaatcct 1320
aaatcagtat ttgtttgcag aataaggcgc gccttaagat atcaacaaac tccgggaggc 1380
agcgtgatgg ggcaacaatc acacggattt cccgtgaacg gtctgaatga gcggattatt 1440
ttcagggaaa gtgagtgtgg tcagcgtgca ggtatatggg ctatgatgtg cccggcgtt 1500
gaggctttct gcctcatgac gtgaagggtg tttgtgccgt gttgtgtggc agaaagaaga 1560
tagccccgta gtaagttaat tttcattaac caccacgagg catccctatg tctagtccac 1620
atcaggatag cctcttaccg cgctttgcgc aaggagaaga aggccatgaa actaccacga 1680
agttcccttg tctggtgtgt gttgatcgtg tctctcacac tgttgatatt cacttatctg 1740
acacgaaaat cgctgtgcga gattcgttac agagacggac acagggaggt ggcggctttc 1800
atggcttacg aatccggtaa gtagctacct ggaggcgggc gcaggcctgc cttttcagga 1860
ctgatgctgg tctgactact gaagcgcctt tataaagggg ctgctggttc gccggtagcc 1920
cctttctcct tgctgatgtt gtgaattcga agcttgatcc ggctgctaac aaagcccga 1980

aggaagctga gttggctgct gccaccgctg agcaataact agcataaccc ctggggcct 2040
 cttaacgggt cttaggggtt tttttgctga aaggaggaac tataatccgga tctggcgtaa 2100
 tagcgaagag gccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2160
 ggacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 2220
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc 2280
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt 2340
 tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 2400
 gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttagcgttg gattccacgt tctttaatag 2460
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 2520
 ataagggtt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 2580
 taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaatttag gtggcacttt tcggggaaat 2640
 gtgcgcggaa cccctatttg tttattttt taaatacatt caaatatgta tccgtcatg 2700
 agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gattcatatt 2760
 caacgggaaa cgtcttgctc taggcgcgca ttaaattcca acatggatgc tgatttatat 2820
 gggataaat gggctcgcga taatgtcggg caatcaggtg cgacaatcta tcgattgtat 2880
 gggaagcccg atgcgccaga gttgtttctg aaacatggca aaggtagcgt tgccaatgat 2940
 gttacagatg agatggctag actaaactgg ctgacggaat ttatgcctct tccgaccatc 3000
 aagcatttta tccgtactcc tgatgatgca tggttactca ccactgcgat ccccgggaaa 3060
 acagcattcc aggtattaga agaatacctt gattcaggtg aaaatatgtt tgatgcgctg 3120
 gcagtgttcc tgcgcgggtt gcattcgatt cctgtttgta attgtccttt taacagcgat 3180
 cgcgtatttc gtctcgctca ggcgcaatca cgaatgaata acggtttggt tgatgcgagt 3240
 gattttgatg acgagcgtaa tggctggcct gttgaacaag tctggaaaga aatgcataaa 3300
 cttttgccat tctcaccgga tttagtcgtc actcatggtg atttctcact tgataacctt 3360
 atttttgacg aggggaaatt aataggttgt attgatgtt gacgagtcgg aatcgagac 3420
 cgataccagg atcttgccat cctatggaac tgcctcgggt agttttctcc ttcattacag 3480
 aaacggcttt ttcaaaaata tggatttgat aatcctgata tgaataaatt gcagtttcat 3540
 ttgatgctcg atgagttttt ctaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt 3600
 gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc 3660
 atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaaa 3720
 atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa 3780
 aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg 3840
 aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaataactg ttcttctagt gtagccgtag 3900
 ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt gctaactctg 3960
 ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga 4020
 tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 4080
 ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc 4140
 acgcttcccg aaggagagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 4200
 gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc tgtcgggttt 4260
 cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg 4320

aaaaacgcc gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttttgetcac 4380
 atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 4440
 gctgataacc ctcgcgcgag ccgaacgacc gagcgagcgc agtcagtgcg cgaggaagcg 4500
 gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc 4560
 tggcacgaca ggtttccga ctggaaagcg ggcagtgcgc gcaacgcaat taatgtgagt 4620
 tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt 4680
 ggaattgtga gcggataaca atttcacaca agaaggagat ata 4723

<210> 4
 <211> 4414
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 表达载体pT7-kan-ACY

<400> 4
 catatgaacg ctcccgctcc cgtcccgcg cgtcccgatt tcacctgcga gaagaagcct 60
 gcgagcggct cgcgcggcat ggtcgtcacc aaccacccgc tcgcctcggc agccggcgcg 120
 cagatcctgc tcgccggcgg caatgccatc gacgcggctg tcgcgtcgtc cttcgcgctg 180
 acggtggcgg agccgatgat ggtcggcatc ctcggcgggg gcctgagcca tatccggctc 240
 gccgacgggc gtcattgctg gatcgacaat ctctcgaccg cgcggggcaa ggcgacggcc 300
 gagatgtacg agtgcctgtc cgacgagatc ggcaagcagc gcgacacgcg cgaccgccag 360
 aacgtggtcg gagccaagcg ggtcgcgggt cccggcgcgc tcaagggctg gtgcgagcgc 420
 ctgcccgcgt tcggcacgct gccgctcgcc gaggttctcc agccggcgat cgggctggcg 480
 gagcgcggct tcgtggtcac gccctatctc tcgaactgca tcaccgacaa cgcggcgcat 540
 ctgcccgcg accccggcct cgcggcgatg ctgctgccgg gcggaaagcc gctccagccg 600
 ggcatgcggc tcgtccagtc cgactatgcc gcgagcctca aactgatcgc ggctgagggg 660
 ccggacgcgc tctatggcgg caagctcggc cgggcgctga ccgattacat ggcggccaat 720
 ggcggcctga tcgatcagcg cgacctcgcc aattaccgca tcgaactcgc cgagccgatt 780
 cgcggctcct atcgcggtc cgagatcatc ggcccgcgcg cgcctcgtc atcgggcgtg 840
 catatcacgc agatgctcaa cattctcgaa ggctatgata tcggctcgtc cggcttcggc 900
 tcgacggagc ctgtgcatct gctcgcgcaa gccctgaaga tcgccttcgc cgaccgcgcc 960
 gtggcgacag ccgatccggc cttcgtcaag gttccggctg cgcgattgat cgacaaggcc 1020
 tatgccgacg agcgcgcgcg gctcattgag atggagcagg cgaagagctg gacggccggg 1080
 ctctctggcg gcgaatccgc cgacaccact catgtcaccg tcgctgacgc catggggaat 1140
 gtcgtcagcg cgacgcagac gatcaacggg ctgttcggcg cctgcgtgca gattccgggc 1200
 accggcatga tcgccaacaa ctacatgtac aacttcgac cgcattccgg ccgggcgctc 1260
 tcgatcgcgc cgggaaagag ggtcttcacc tcgatggcgc cgatgatggc gttgaaggag 1320
 ggacggatcg cctttcgcgt cggcttgctt ggcgcgctcc gcatcttccc ctcggcgctg 1380
 caggcgatcg tcaacctgat cgaccaccgc atgagcctgc aggaggcggg cgaggcgcca 1440
 cgcgtctgga cggagggcgg cgtgctcgaa ctcgaggaag cgatccccga ggccgtggca 1500
 caagcgctga tcgcgcgcgg ccataaggtg gtgcgctcgc cccgcgtggc cgggtggcatg 1560
 aacgccatcg ccttcaatcc ggacgggtacc ttgaccgggt ccgcctgctg gcgcgccgac 1620
 ggcacaccgg tcgcatctc cggcgggctc gcccggtcgc gtgccgctt caccatctga 1680

agatctgcag ctggtacat ggaattcgaa gcttgatccg gctgctaaca aagcccga 1740
 ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc 1800
 taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact atatccgat ctggcgtaat 1860
 agcgaagagg ccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 1920
 gacgcgcct gtagcggcgc attaacgcgc gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 1980
 gctacacttg ccagcgcct agcgcgcct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc 2040
 acgttcgcgc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt 2100
 agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa ctgattagg gtgatgttc acgtagtggg 2160
 ccctgcgcct gatagacgtt ttttcgcct ttgacgttg agtccacgtt ctttaatatg 2220
 ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct cgtctattc ttttgattta 2280
 taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 2340
 aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg 2400
 tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 2460
 gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaag gaagagtatg agtcatattc 2520
 aacgggaaac gtcttgctct aggccgcgat taaattccaa catggatgct gatttatatg 2580
 ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg 2640
 ggaagcccga tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg 2700
 ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca 2760
 agcattttat ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgac cccgggaaaa 2820
 cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatatgtt gatgcgctgg 2880
 cagtgttctt cgcgcggtt cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc 2940
 gcgtatttct tctcgtcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg 3000
 attttgatga cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac 3060
 ttttgccatt ctaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta 3120
 tttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttg acgagtcgga atcgcagacc 3180
 gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct tcattacaga 3240
 aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt 3300
 tgatgctcga tgagtttttc taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg 3360
 atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 3420
 tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 3480
 tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttct tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa 3540
 aaccaccgct accagcgttg gtttggttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 3600
 aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt 3660
 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt 3720
 taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat 3780
 agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct 3840
 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 3900
 cgcttccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 3960
 agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttct 4020

gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga 4080
 aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca 4140
 tgttttttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag 4200
 ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgagcga gtcagtgagc gaggaagcgg 4260
 aagagcgcgc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagga 4320
 tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac tatagggaga ccacaacggt ttcctcttag 4380
 aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga tata 4414

<210> 5
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> *Trigonopsis variabilis*

<400> 5
 atggctaaaa tcgttgttat tggcgccggt gttgccggtt taactacagc tcttcaactt 60
 cttcgtaaag gacatgaggt tacaattgtg tccgagttta cggccggtga tcttagtata 120
 ggatatacct cgccttgggc aggtgccaac tggctcacat tttacgatgg aggcaagtta 180
 gccgactacg atgccgtctc ttatcctata ttgcgagagc tggctcgaag cagccccgag 240
 gctggaattc gactcatcaa ccaacgctcc catgtttctca agcgtgatct tcctaaactg 300
 gaaggtgcc a tgcggccat ctgtcaacgc aacccctggt tcaaaaacac agtcgattct 360
 ttcgagatta tcgaggacag gtccaggatt gtccacgatg atgtggctta tctagtcgaa 420
 tttgcttccg tttgtatcca caccggagtc tacttgaact ggctgatgtc ccaatgctta 480
 tcgctcggcg ccacgggtgt taaacgtcga gtgaaccata tcaaggatgc caattttcta 540
 cactcctcag gatcacgccc cgacgtgatt gtcaactgta gtggtctctt tgcccggttc 600
 ttgggaggcg tcgaggacaa gaagatgtac cctattcgag gacaagtcgt ccttgttcga 660
 aactctcttc cttttatggc ctctttttcc agcactcctg aaaaagaaaa tgaagacgaa 720
 gctctatata tcatgaccgg attcgatggt acttctatca ttggcggttg tttccaatcc 780
 aacaactggt catccgaacc cgatccttct ctaccaccatc gaatcctgtc tagagccctc 840
 gaccgatcc cggaactgac caaagatggc cctcttgaca ttgtgcgga atgcgttggc 900
 caccgtctg gtagagaggg cggctcccga gtagaattag agaagatccc cggcggttggc 960
 tttgttgtec ataactatgg tgccgcgggt gctggttacc agtcctctta cggcatgget 1020
 gatgaagctg tttcttacgt cgaaagagct cttactcgtc caaaccttta g 1071

<210> 6
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> *Trigonopsis variabilis*

<400> 6

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

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

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

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

Ala Val Ser Tyr Pro Ile Leu Arg Glu Leu Ala Arg Ser Ser Pro Glu
 65 70 75 80
 Ala Gly Ile Arg Leu Ile Asn Gln Arg Ser His Val Leu Lys Arg Asp
 85 90 95
 Leu Pro Lys Leu Glu Gly Ala Met Ser Ala Ile Cys Gln Arg Asn Pro
 100 105 110
 Trp Phe Lys Asn Thr Val Asp Ser Phe Glu Ile Ile Glu Asp Arg Ser
 115 120 125
 Arg Ile Val His Asp Asp Val Ala Tyr Leu Val Glu Phe Ala Ser Val
 130 135 140
 Cys Ile His Thr Gly Val Tyr Leu Asn Trp Leu Met Ser Gln Cys Leu
 145 150 155 160
 Ser Leu Gly Ala Thr Val Val Lys Arg Arg Val Asn His Ile Lys Asp
 165 170 175
 Ala Asn Phe Leu His Ser Ser Gly Ser Arg Pro Asp Val Ile Val Asn
 180 185 190
 Cys Ser Gly Leu Phe Ala Arg Phe Leu Gly Gly Val Glu Asp Lys Lys
 195 200 205
 Met Tyr Pro Ile Arg Gly Gln Val Val Leu Val Arg Asn Ser Leu Pro
 210 215 220
 Phe Met Ala Ser Phe Ser Ser Thr Pro Glu Lys Glu Asn Glu Asp Glu
 225 230 235 240
 Ala Leu Tyr Ile Met Thr Arg Phe Asp Gly Thr Ser Ile Ile Gly Gly
 245 250 255
 Cys Phe Gln Ser Asn Asn Trp Ser Ser Glu Pro Asp Pro Ser Leu Thr
 260 265 270
 His Arg Ile Leu Ser Arg Ala Leu Asp Arg Phe Pro Glu Leu Thr Lys
 275 280 285
 Asp Gly Pro Leu Asp Ile Val Arg Glu Cys Val Gly His Arg Pro Gly
 290 295 300
 Arg Glu Gly Gly Pro Arg Val Glu Leu Glu Lys Ile Pro Gly Val Gly
 305 310 315 320
 Phe Val Val His Asn Tyr Gly Ala Ala Gly Ala Gly Tyr Gln Ser Ser
 325 330 335
 Tyr Gly Met Ala Asp Glu Ala Val Ser Tyr Val Glu Arg Ala Leu Thr
 340 345 350
 Arg Pro Asn Leu
 355

<210> 7

<211> 4701
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 载体pRSET-lac-GI-hok/sok-kan

<400> 7
 catatgaata aatattttga gaacgtatct aaaataaaat atgaaggacc aaaatcaaat 60
 aatccttatt cctttaaatt ttacaatcca gaggaagtaa tcgatggcaa gacgatggag 120
 gagcatctcc gcttttctat agcttattgg cacactttta ctgctgatgg aacagatcaa 180
 tttggcaagg ctactatgca aagaccatgg aaccactaca cagatcctat ggatatagcg 240
 aaagcaaggg tagaagcagc atttgagttt ttgataaga taaatgcacc tttcttctgc 300
 ttccatgata gggatattgc ccctgaagga gatactctta gagagacaaa caaaaactta 360
 gatacaatag ttgctatgat aaaggattac ttaaagacca gcaagacaaa agttttgttt 420
 ggtaccgcaa atcttttctc caatccgaga ttgtacatg gtgcatcaac atcctgcaat 480
 gctgacgttt ttgcatattc tgcagcgcaa gtcaaaaaag cccttgagat tactaaggag 540
 cttggcccgg aaaactacgt attttggggt ggaagagaag ggtacgagac gtttctcaat 600
 acagatatgg agttagagct tgataacttt gcaagatttt tgcacatggc tgttgactat 660
 gcaaaggaaa tcggccttga aggtcagttc ttgattgagc cgaagccaaa ggagcctaca 720
 aaacatcaat acgactttga cgtggcaaat gtattggcat tcttgagaaa atacgacctt 780
 gacaaatatt tcaaagtaaa tatcgaagca aacatgcga cattggcatt ccacgacttc 840
 caacatgagc taagatacgc cagaataaac ggtgtattag gatcaattga cgcaaatcaa 900
 ggcgacatgc ttttgggatg ggatacggac cagttcccta cagatatagc catgacaacg 960
 cttgctatgt atgaagtcat aaagatgggt ggatttgaca aagggtggcct taactttgat 1020
 gcaaaagtaa gacgtgcttc atttgagcca gaagatcttt tcttaggtca catagcagga 1080
 atggatgctt ttgcaaaagg ctttaaagtt gcttacaagc ttgtgaaaga tggcgtattt 1140
 gacaagtica tcgaagaaag atacgcaagc tacaaagaag gcattggcgc tgatatgtga 1200
 agcggtaaag ctgacttcaa gagccttgaa aagtatgcat tagagcacag ccagattgta 1260
 aacaaatcag gcagacaaga gctattagaa tcaatcctaa atcagtattt gtttcagaa 1320
 taaggcgcgc cttaagatat caacaaactc cgggaggcag cgtgatgggg caacaatcac 1380
 acggatttcc cgtgaacggt ctgaatgagc ggattatitt cagggaaagt gagtgtggtc 1440
 agcgtgcagg tatatgggct atgatgtgcc cggcgctiga ggctttctgc ctcacgacgt 1500
 gaagggtggt tgtgccgtgt tgtgtggcag aaagaagata gccccgtagt aagttaattt 1560
 tcattaacca ccacgaggca tccctatgtc tagtccacat caggatagcc tcttaccgcg 1620
 ctttgcgcaa ggagaagaag gccatgaac taccacgaag ttcccttctg tgggtgtgtgt 1680
 tgatcgtgtg tctcacactg ttgatattca cttatctgac acgaaaatcg ctgtgcgaga 1740
 ttcgttacag agacggacac agggagggtg cggctttcat ggcttacgaa tccggttaagt 1800
 agctacctgg aggcggggcg aggcctgcct ttccaggact gatgctggtc tgactactga 1860
 agcgccctta taaaggggct gctggttcgc cggtagcccc tttctccttg ctgatgttgt 1920
 gaattcgaag cttgatccgg ctgctaaca agccccgaaag gaagctgagt tggctgctgc 1980
 caccgctgag caataactag cataaccctt tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt 2040
 tttgctgaaa ggaggaacta tatccggatc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat 2100
 cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggogaatggg acgcgccctg tagcggcgca 2160

ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta 2220
 gcgcccgtc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt 2280
 caagctctaa atcgggggct ccctttagggt ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac 2340
 cccaaaaaac ttgattagggt tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt 2400
 tttcgccctt tgacgttggg gtccacgttc tttaatagt gactcttgtt ccaaactgga 2460
 acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttcg 2520
 gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata 2580
 ttaacgctta caatttaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt 2640
 tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc 2700
 ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtcataattca acgggaaacg tcttgctcta 2760
 ggccgcgatt aaattccaac atggatgctg atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata 2820
 atgtcgggca atcaggtgcg acaatctatc gattgtatgg gaagcccgat gcgccagagt 2880
 tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgttg ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac 2940
 taaactggct gacggaattt atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg 3000
 atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc ccgggaaaac agcattccag gtattagaag 3060
 aatatcctga ttcaggtgaa aatattgttg atgcgctggc agtggttctg cgccggttgc 3120
 attcgattcc tgtttgtaat tgtcctttta acagcgatcg cgtatttctg ctcgctcagg 3180
 cgcaatcacg aatgaataac ggtttggttg atgcgagtga ttttgatgac gagcgtaatg 3240
 gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa tgcataaact tttgccattc tcaccggatt 3300
 cagtcgtcac tcatgggtgat ttctcacttg ataaccttat ttttgacgag gggaaattaa 3360
 taggttgtat tgatgttggg cgagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat cttgccatcc 3420
 tatggaactg cctcgggtgag tttctcctt cattacagaa acggcitttt caaaaatatg 3480
 gtattgataa tcttgatatg aataaattgc agtttcattt gatgctcgat gagtttttct 3540
 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt cttttttaat 3600
 ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg 3660
 agttttcgtt ccaactgagc tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 3720
 ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg 3780
 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 3840
 cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact 3900
 ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagt 3960
 gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 4020
 ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 4080
 aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttcccga gggagaaagg 4140
 cggacaggta tccggtgaag ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 4200
 ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcttg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc 4260
 gatttttgtg atgctcgtca gggggggcga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 4320
 ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc 4380
 ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc 4440
 gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgaaac 4500

cgccctctccc cgcgcggttg cgcattcatt aatgcagctg gcacgacagg ttccccgact 4560
ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc 4620
aggctttaca ctttatgctt ccggctcgtg tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 4680
ttcacacaag aaggagatat a 4701

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/001940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁸: C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI EPODOC PAJ CNPAT CA BA MEDLINE PUBMED "D" W AMINO W ACID W OXIDASE DAO OR DAAO etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO03076640 A2((BIOF-N) BIOFERMA MURCIA SA) 18.Sep.2003(18.09.2003) See the whole document	2-10
PX	CN1680558A((BRAY-N) BRAY WORLDWIDE LTD) 12.Oct.2005(12.10.2005) See examples 1-7; sequences 1-6 and figures 1-2	1,8-10
PY		2-7
PX	CN1680583A((BRAY-N) BRAY WORLDWIDE LTD) 12.Oct.2005(12.10.2005) See examples 1-7; sequences 1-7 and figures 1-2	1,8-10
PY		2-7
A	CN1246147A((ANTI) ANTIBIOTICOS SAU) 01.Mar.2000(01.03.2000) See the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25.Aug.2006(25.08.2006)

Date of mailing of the international search report

26 · OCT 2006 (26 · 10 · 2006)

Name and mailing address of the ISA/CN

The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

DING Huiping

Telephone No. (86-10)62085300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2006/001940

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO03076640 A2	2003.09.18	AU2003212351 A1	2003.09.22
		EP1344830 A1	2003.09.17
CN1680558A	12.10.2005	WO2005098000A	20.10.2005
CN1680583A	12.10.2005	none	
CN1246147A	2000.03.01	US6635458 B2	2003.10.21
		WO9915632 A1	1999.04.01
		ES2131018 A1	1999.07.01
		AU9162898 A	1999.04.12
		ZA9808754 A	1999.08.31
		CZ9901823 A3	1999.09.15
		EP0969088 A1	2000.01.05
		ES2131018 B1	2000.04.01
		SK9900648 A3	2000.05.16
		HU200000797 A2	2000.07.28
		MX9904513 A1	1999.12.01
		KR2000069110 A	2000.11.25
		JP2001506868T T	2001.05.29
		US2003119087 A1	2003.06.26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/001940

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/06 (2006.01) i

C12N9/14 (2006.01) i

C12N15/70 (2006.01) i

C12N15/72 (2006.01) i

C12P21/02 (2006.01) i

C12P35/06 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2006/001940

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁸: C12N C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CNKI

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI EPODOC PAJ CNPAT CA BA MEDLINE PUBMED

"D" W AMINO W ACID W OXIDASE DAO OR DAAO etc. 氨基酸氧化酶+DAO+DAAO 等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO03076640 A2((BIOF-N) BIOFERMA MURCIA SA) 18.9 月 2003(18.09.2003) 参见全文	2-10
PX	CN1680558A(百瑞全球有限公司) 12.10 月 2005(12.10.2005) 参见实施例 1-7、序列 1-6、图 1 和 2	1,8-10
PY		2-7
PX	CN1680583A(百瑞全球有限公司) 12.10 月 2005(12.10.2005) 参见实施例 1-7、序列 1-7、图 1 和 2	1,8-10
PY		2-7
A	CN1246147A(抗生素有限公司) 01.3 月 2000(01.03.2000) 参见全文	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

25.8 月 2006(25.08.2006)

国际检索报告邮寄日期

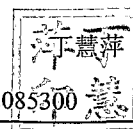
26.10 月 2006 (26.10.2006)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10)62085300

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/001940

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO03076640 A2	2003.09.18	AU2003212351 A1	2003.09.22
		EP1344830 A1	2003.09.17
CN1680558A	12.10.2005	WO2005098000A	20.10.2005
CN1680583A	12.10.2005	无	
CN1246147A	2000.03.01	US6635458 B2	2003.10.21
		WO9915632 A1	1999.04.01
		ES2131018 A1	1999.07.01
		AU9162898 A	1999.04.12
		ZA9808754 A	1999.08.31
		CZ9901823 A3	1999.09.15
		EP0969088 A1	2000.01.05
		ES2131018 B1	2000.04.01
		SK9900648 A3	2000.05.16
		HU200000797 A2	2000.07.28
		MX9904513 A1	1999.12.01
		KR2000069110 A	2000.11.25
		JP2001506868T T	2001.05.29
		US2003119087 A1	2003.06.26

主题的分类

C12N9/06 (2006.01)i

C12N9/14 (2006.01)i

C12N15/70 (2006.01)i

C12N15/72 (2006.01)i

C12P21/02 (2006.01)i

C12P35/06 (2006.01)i