



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108251401 A

(43)申请公布日 2018.07.06

---

(21)申请号 201710115983.7 *C12N 15/70*(2006.01)  
(22)申请日 2017.03.01 *C12N 15/81*(2006.01)  
(66)本国优先权数据 *C12N 1/19*(2006.01)  
201611232848.2 2016.12.28 CN *C12N 1/21*(2006.01)  
*C12P 7/64*(2006.01)  
(71)申请人 丰益(上海)生物技术研发中心有限 *C12P 7/62*(2006.01)  
公司  
地址 200137 上海市浦东新区高东路118号  
(72)发明人 吴伟 戴小军 徐正军 曹海生  
牛其文  
(74)专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002  
代理人 王洁  
(51)Int.Cl.  
*C12N 9/20*(2006.01)  
*C12N 15/54*(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页  
序列表4页 附图4页

---

(54)发明名称

脂肪酶及其应用

(57)摘要

本发明涉及脂肪酶及其应用。具体而言,本发明提供一种多肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,或由SEQ ID NO:2和用于促进SEQ ID NO:2所示氨基酸序列表达和纯化的序列组成。本发明还提供所述多肽的编码序列,含有所述编码序列的核酸构建物,含有所述核酸构建物的宿主细胞,以及相关的用途。本发明的脂肪酶具有优异的酶活性,还能天然固定在菌体上,在工业生产中具有优势。

1. 一种多肽,选自:
  - (1) 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的多肽,和
  - (2) 由SEQ ID NO:2和用于促进SEQ ID NO:2所示氨基酸序列表达和纯化的序列组成的多肽。
2. 一种多核苷酸序列,选自:
  - (1) 编码权利要求1所述多肽的多核苷酸序列;
  - (2) 与(1)所述的多核苷酸序列互补的多核苷酸序列;和
  - (3) (1)或(2)所述的多核苷酸序列的长10-40个碱基的片段。
3. 如权利要求2所述的多核苷酸序列,其特征在于,所述多核苷酸序列具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,或由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列组成。
4. 一种核酸构建物,其特征在于,所述核酸构建物含有:
  - (a) 权利要求2第(1)或(2)项所述的多核苷酸序列;或
  - (b) 权利要求3所述的多核苷酸序列。
5. 如权利要求4所述的核酸构建物,其特征在于,所述核酸构建物是克隆载体或表达载体;

优选地,所述核酸构建物含有AOX1启动子, $\alpha$ -Factor信号肽,His4表达框和多克隆位点;更优选地,所述核酸构建物以pPIC9K质粒为骨架。
6. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有权利要求4或5所述的核酸构建物;

优选地,所述宿主细胞为微生物细胞,优选为毕赤酵母细胞或大肠杆菌细胞。
7. 一种组合物,其特征在于,所述组合物含有权利要求1所述的多肽或权利要求6所述的宿主细胞,还任选地含有辅料;优选的,所述辅料为选自活性炭、氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷、多孔玻璃的吸附材料。
8. 一种水解脂肪酸甲酯的方法,其特征在于,所述方法包括使含脂肪酸甲酯的成分与权利要求1所述的多肽或权利要求6所述的宿主细胞或权利要求7所述的组合物接触的步骤;

优选地,所述脂肪酸甲酯是辛癸酸甲酯;和/或

优选地,所述接触条件包括:
  - (A) 温度为20°C-60°C,优选为35 $\pm$ 2°C;和/或
  - (B) pH为5.5-9,优选6-9。
9. 一种水解反应混合物,其特征在于,所述水解反应混合物含有:

脂肪酸甲酯;

水;和

权利要求1所述的多肽;

优选地,所述脂肪酸甲酯是含有中短链脂肪酸的脂肪酸甲酯,更优选地所述脂肪酸甲酯是含有C4~C12链长脂肪酸的脂肪酸甲酯,最优选地所述脂肪酸甲酯是辛癸酸甲酯;和/或

优选地,每克所述脂肪酸甲酯所需所述多肽的用量为5U以上,优选地在5U~10U之间;和/或

优选地,水的用量为所述脂肪酸甲酯重量的90%以上,例如90%~200%之间;

酶活力单位U定义为在温度40℃,pH值8.0的条件下,酶水解底物4-硝基苯基丁酸酯,每分钟释放出1 $\mu$ mol对硝基苯酚(pNP)所需的酶量为1个酶活力单位(U)。

10. 权利要求1所述的多肽、权利要求2或3所述的多核苷酸序列、权利要求4或5所述的核酸构建物、权利要求6所述的宿主细胞、或权利要求7所述的组合物在油脂加工、油品化工、食品工业、医药卫生、化学化工中的应用,或在水解脂肪酸甲酯、水解辛癸酸甲酯中的应用。

## 脂肪酶及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及脂肪酶及其应用。

### 背景技术

[0002] 脂肪酶是一类具有多种催化能力的酶,可以催化三酰甘油酯水解为甘油和游离脂肪酸,还可以催化其他酯类的水解和转酯化以及酯类的合成反应,此外脂肪酶还表现对底物的对映选择性。以上特性赋予了脂肪酶在食品油脂加工、生物柴油、洗涤剂、酯键化合物的合成和手性药物合成等工业中的广泛应用(Abhishek Kumar Singh, Mausumi Mukhopadhyay, Overview of Fungal Lipase: A Review, 2012, 166 (2): 486-520)。

[0003] 脂肪酶广泛存在于动植物和微生物中,由于微生物不但种类多、繁殖快、易发生遗传变异,而且具有比动物更广泛的pH值、温度范围以及底物专一性,因此微生物脂肪酶是工业用脂肪酶的重要来源。据统计,产脂肪酶的微生物有65个属,主要集中在黑曲霉、假丝酵母、根霉、假单胞菌、链霉菌等(王自社、张继、马君义、史睿,《安徽农业科学》,2011, 39 (7): 3798-3800)。

[0004] 脂肪酶的应用分为食品工业、医药卫生、化学化工等。在化学化工中的应用包括在脂肪酸甲酯,例如辛癸酸甲酯,水解中的应用。

[0005] 目前应用在辛癸酸甲酯水解中的商业化脂肪酶最为广泛的是来源于米黑根毛霉的脂肪酶和来源于南极假丝酵母的脂肪酶,但由于高昂的价格,使得酶法的工业化应用受到限制。因此,开发一种高催化活性的可用于辛癸酸甲酯等脂肪酸甲酯水解的脂肪酶具有重要意义。

[0006] 因此,本发明旨在发现新颖脂肪酶,其具有水解辛癸酸甲酯等的酶活性,满足工业生产的需要。

### 发明内容

[0007] 本发明提供新型脂肪酶,其偏好水解中短链的脂肪酸酯,可以用于中短链的(例如C4-C12长度)脂肪酸甲酯例如辛癸酸甲酯的水解应用;该脂肪酶活性高;且能够固定于表达该脂肪酶的菌株(例如毕赤酵母)的菌体上。

[0008] 本发明提供一种多肽,所述多肽选自:

[0009] (1) 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的多肽,和

[0010] (2) 由SEQ ID NO:2和用于促进SEQ ID NO:2所示氨基酸序列表达和纯化的序列组成的多肽。

[0011] 本发明的多肽也包括在SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸,同时保留SEQ ID NO:2所具备的脂肪酶活性的由SEQ ID NO:2衍生的多肽。

[0012] 本发明的多肽还包括与SEQ ID NO:2所示的多肽具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%,更优选至少99%序列相同性的多肽。

- [0013] 本发明的多肽来源于裂壶藻。
- [0014] 本发明提供一种多核苷酸序列,选自:
- [0015] (1) 编码本发明多肽的多核苷酸序列;
- [0016] (2) (1) 所述序列的互补序列;和
- [0017] (3) (1) 或 (2) 所述多核苷酸序列的长10-40个碱基的片段,优选长15~30个碱基的片段。
- [0018] 在一个或多个实施方案中,该多核苷酸序列具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。
- [0019] 在一个或多个实施方案中,该多核苷酸序列由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列组成。
- [0020] 本发明还提供一种核酸构建物,该核酸构建物含有本发明的多核苷酸序列。
- [0021] 在一个或多个实施方案中,核酸构建物含有编码本发明多肽的多核苷酸序列或其互补序列。
- [0022] 在一个或多个实施方案中,核酸构建物含有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列或其互补序列。
- [0023] 在一个或多个实施方案中,核酸构建物是克隆载体或表达载体。
- [0024] 在一个或多个实施方案中,核酸构建物含有AOX1启动子, $\alpha$ -Factor信号肽,His4表达框和多克隆位点。
- [0025] 在一个或多个实施方案中,核酸构建物以pPIC9K质粒为骨架。
- [0026] 本发明还提供一种宿主细胞,该细胞含有本发明的核酸构建物。
- [0027] 在一个或多个实施方案中,该宿主细胞为植物细胞。
- [0028] 在一个或多个实施方案中,该宿主细胞为微生物细胞。
- [0029] 在一个或多个实施方案中,该宿主细胞是毕赤酵母细胞或大肠杆菌细胞。
- [0030] 本发明还提供本文所述多肽、其编码序列或该编码序列的互补序列、含所述编码序列或其互补序列的核酸构建物和含所述核酸构建物的宿主细胞在食品工业、医药卫生、化学化工中的应用。
- [0031] 本发明还提供本文所述多肽、其编码序列或该编码序列的互补序列在脂肪酸甲酯水解,例如辛癸酸甲酯水解中的应用。

#### 附图说明

- [0032] 图1: BMMY-三丁酸甘油酯平板上的比对图。其中左边菌落为没有转化p9K-SL4的GS115毕赤酵母菌落作为对照,右边菌落为SL4表达菌株;显示SL4表达菌株形成了明显的透明圈,具有脂肪酶活性。
- [0033] 图2: 表达SL4脂肪酶的毕赤酵母转化子的上清样品和菌体样品,以不含SL4基因的pPIC9K空载体的转化子为负对照。
- [0034] 图3: SL4脂肪酶的底物专一性。
- [0035] 图4: SL4脂肪酶的最适作用温度。
- [0036] 图5: SL4脂肪酶的最适作用pH。
- [0037] 图6: 金属离子对脂肪酶SL4活力的影响。
- [0038] 图7: SL4脂肪酶用于水解,并与商购的脂肪酶CALB和RML进行酶活比较。

[0039] 图8:pPIC9K质粒图谱。

### 具体实施方式

[0040] 本发明提供具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的脂肪酶。本发明还包括在SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的基础上用性能相近或相似的氨基酸进行保守性取代时所获得的多肽。这种保守性取代通常不会改变蛋白质或多肽的功能。“性能相近或相似的氨基酸”包括例如,具有相似侧链的氨基酸残基的家族,这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 $\beta$ -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,在本发明多肽中用来自同一侧链类的另一氨基酸残基替换一个或几个位点,将不会在实质上影响其活性。

[0041] 本发明因此包括在SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸,同时保留SEQ ID NO:2所具备的脂肪酶活性的由SEQ ID NO:2衍生的多肽。所述几个通常为10个以内,优选8个以内,更优选5个以内。

[0042] 在知晓SEQ ID NO:2的序列和生物学功能的情况下,本领域技术人员可采用常规的技术手段判断SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列中哪些氨基酸残基可被取代或删除。例如,通过比对来自不同种属、活性相同或类似或明显不同的序列,可以判断这些序列中哪些氨基酸残基是可以被取代或删除。可采用本领域常规的方法(包括本发明所公开的方法)验证这样的序列是否具备本发明的酶活。

[0043] 此外,本领域技术人员公知,在基因克隆操作中,常常需要设计合适的酶切位点,这势必在所表达的蛋白末端引入了一个或多个不相干的残基,而这并不影响目的蛋白的活性。又如为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化,常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内,例如,包括但不限于,适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白、蛋白A、或Xa因子或凝血酶或肠激酶的蛋白水解酶位点。本发明氨基酸序列的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段,作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本发明。例如,所述的标签可以是FLAG,HA,HA1,c-Myc,Poly-His,Poly-Arg,Strep-TagII,AU1,EE,T7,4A6, $\epsilon$ ,B,gE以及Ty1。这些标签可用于对蛋白进行纯化。使用的标签例子包括Poly-Arg,如RRRRR(SEQ ID NO:3);Poly-His 2-10个(通常6个),如HHHHHH(SEQ ID NO:4);FLAG,即DYKDDDDK(SEQ ID NO:5);Strep-TagII,即WSHPQFEK(SEQ ID NO:6);和C-myc,即WQKLISEEDL(SEQ ID NO:7)。应理解,这些氨基酸序列的存在不会影响到所得多肽的活性。因此,本发明也包括在本发明多肽的C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸所得的多肽,这些多肽仍具有本文所述的脂肪酶活性。

[0044] 因此,本发明也包括与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%,更优选至少99%序列相同性的氨基酸序列。在一些实施例中,此类氨基酸序列也同样来自裂壶藻(Schizochytrium),优选具有与本文SEQ ID NO:2相同或类似的脂肪酶酶活。

[0045] 可采用常规的手段计算比对的两条序列的序列相同性,例如,采用NCBI提供BLASTP,采用默认参数进行比对。在某些实施方案中,本发明的多肽是中性或碱性脂肪酶。在某些实施方案中,本发明的多肽作为脂肪酶具有底物专一性,对4-硝基苯基丁酸酯(pNPB)水解能力最强,对4-硝基苯基辛酸酯(pNPO)、4-硝基苯基月桂酸酯(pNPD)的水解能力其次,而对4-硝基苯基豆蔻酸酯(pNPM)、4-硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)、4-硝基苯基硬脂酸酯(pNPS)的水解能力较弱。在某些实施方案中,本发明多肽的最适作用温度在20-60℃之间,优选在35℃±2℃。在某些实施方案中,本发明多肽的最适作用pH在5.5-9之间,优选在6-9之间,更优选为6.1-7.5或8.5-9,最优选地是6或9。在某些实施方案中,本发明的多肽酶活受到ZnSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、NiSO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>的抑制,而NaCl、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>则可激活其酶活,尤其是NaCl、KCl。在某些实施方案中,本发明多肽与商品化酶比较水解活力相当。在某些实施方案中,本发明多肽用于脂肪酸甲酯的水解,例如含有4~12个碳原子的中短链脂肪酸残基的脂肪酸甲酯的水解,特别地用于辛癸酸甲酯水解。

[0046] 根据重组生产方案所用的宿主,本发明的多肽可以是糖基化的,或可以是非糖基化的。

[0047] 本发明的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。

[0048] 本申请包括本发明多肽的编码序列。SEQ ID NO:1显示了本发明多肽的编码序列之一。“编码序列”包括与SEQ ID NO:1高度同源的序列或在严格条件下与SEQ ID NO:1杂交的核苷酸序列或与上述分子高度同源的家庭基因分子。编码本发明多肽的序列可以与SEQ ID NO:1所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,但与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列有差别的核苷酸序列。

[0049] 编码本发明多肽的序列包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0050] 本发明的多肽的编码序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可先采用常规的技术手段从大肠杆菌中或者裂壶藻(Schizochytrium)中获取基因组DNA,然后再根据本发明所公开的核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,用于从该基因组DNA中扩增出脂肪酶基因。

[0051] 因此,本发明也包括本发明编码序列的片段,所述片段通常长10~40、优选15~30个碱基,能作为引物或探针使用。“片段”在本文中指全长序列的连续的一部分序列。

[0052] 本发明也涉及核酸构建物,该核酸构建物含有本发明的编码序列以及与该编码序列操作性连接并指导该编码序列在宿主细胞中在合适的条件下表达的一个或多个调控序列。编码本发明多肽的多核苷酸可以各种方式被操作,以保证该多肽的表达。在其插入载体之前该多核苷酸序列的操作可能根据该表达载体而是合乎需要或必需的。利用重组DNA方法来改变多核苷酸序列的技术是本领域已知的。

[0053] 调控序列可以是合适的启动子序列,为由用于表达编码本发明多肽的多核苷酸的宿主细胞识别的核苷酸序列。启动子序列可包含多肽表达的转录调控序列。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截短的和杂合启动子,并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。适用于本发

明的启动子序列例子包括AOX1启动子和GAP启动子等。

[0054] 调控序列也可以是合适的转录终止子序列,为由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的3'末端可操作连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

[0055] 调控序列也可以是合适的前导序列,对宿主细胞翻译重要的mRNA的非翻译区。签到序列与编码该多肽的核苷酸序列的5'末端可操作连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

[0056] 调控序列也可以是编码与多肽的氨基酸末端连接的氨基酸序列并且指导该编码的多肽进入细胞分泌途径的信号肽编码区。核苷酸序列编码序列的5'端可固地包含天然连接具有编码分泌多肽的编码区节段的翻译阅读框的信号肽编码区。备选地,编码序列的5'端可包含与该编码区外源的信号肽编码区。当编码序列非天然地包含信号肽编码区时,可能需要外来的信号肽编码区。备选地,外来的信号肽编码区可简单地替换天然的信号肽编码区以增强多肽的分泌。然而,指导表达的多肽进入选择的宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码区,即分泌进入培养基,都可用于本发明。

[0057] 本发明也涉及包括本发明多核苷酸的克隆载体或表达载体。这些载体可含有前文所述的各调控序列。

[0058] 表达载体可以是能够方便地经受重组DNA方法并且可导致感兴趣的核苷酸序列表达的任何载体(如质粒或病毒)。载体的选择一般取决于载体与其中被导入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是线性或闭合的环形质粒。

[0059] 载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在,其复制不依赖于染色体复制的载体,例如质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可包含用于保证自我复制的任何方式。备选地,载体可以是当被导入宿主细胞时,整合到基因组中并且与其已经被整合进入的染色体一起复制的载体。此外,可使用一起包含将被导入宿主细胞基因组的总DNA的单个载体或质粒或两个或多个载体或质粒,或转座子。

[0060] 本发明的载体优选包含一个或多个容许容易选择转化、转染、转导等细胞的可选择标记。可选择的标记是基因,其产物提供对抗生素或病毒的抗性、对重金属的抗性、原养型至营养缺陷型等。

[0061] 本发明的载体优选包含容许该载体整合进入宿主细胞基因组或该载体在细胞中独立于基因组自主复制的元件。

[0062] 一个以上拷贝的本发明的多核苷酸可被插入宿主细胞以增加该基因产物的产量。多核苷酸拷贝数的增加可通过将至少一个附加拷贝的序列整合进入宿主细胞基因组或通过包括可扩增的选择标记基因和该多核苷酸来获得,其中包含扩增拷贝的选择标记基因并且由此包含附加拷贝多核苷酸的细胞可通过在存在适当的选择剂时培养该细胞来筛选。

[0063] 本发明的载体优选包含人工合成的一段序列,含有多个限制内切酶识别位点,能为外源DNA提供多种可插入的位置或插入方案。本发明的表达载体更为优选包含有连续6个组氨酸序列的小肽,有利于蛋白质的提取和纯化。

[0064] 在某些实施方案中,本发明的载体用于在大肠杆菌中表达本发明的多肽。因此,在某些实施方案中,所述表达载体含有AOX1启动子, $\alpha$ -Factor信号肽,His4表达框和多克隆位点。优选地,所述核酸构建物以pPIC9K质粒为骨架。



[0065] 在某些实施方案中,本发明的载体用于在毕赤酵母中表达本发明的多肽。因此,在某些实施方案中,所述表达载体含有AOX1启动子, $\alpha$ -Factor信号肽,His4表达框、和多克隆位点。优选地,所述核酸构建物以pPIC9K质粒为骨架。

[0066] 本发明也涉及含有被用于重组生产多肽的本发明多核苷酸的重组宿主细胞。包括本发明多核苷酸的载体被导入宿主细胞以使得该载体如早先说明的作为染色体的组成部分或作为染色体外的自我复制载体来维持。宿主细胞的选择很大程度上取决于编码多肽的基因及其来源。

[0067] 宿主细胞可以是植物细胞或单细胞微生物或非单细胞微生物。单细胞微生物例如革兰氏阳性细菌,包括但不限于芽孢杆菌细胞,例如,嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌等;或链霉菌细胞,例如钱青紫链霉菌;或革兰氏阴性细菌,例如大肠杆菌和假单胞菌属。在优选的方面,细菌宿主是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和大肠杆菌细胞。

[0068] 宿主细胞也可以是真核生物,例如哺乳动物、昆虫、植物、酵母或真菌细胞。在优选的方面,宿主细胞是真菌细胞,如在此使用的“真菌”包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、接合菌门(Zygomycota)以及卵菌门等。

[0069] 在更优选的方面,宿主细胞是原核细胞。如在此使用的“原核细胞”包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)以及埃希氏菌属(*Escherichia*)的细菌。在更为优选的方面,宿主细胞是假单胞菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属以及埃希氏菌属的细胞。

[0070] 在更优选的方面,宿主细胞是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)等。在另外最优选方面,宿主细胞是大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞或毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞。

[0071] 可采用常规的转染方法将含本发明多核苷酸序列的核酸构建物转入宿主细胞中。转染通常分为瞬时转染和稳定转染。前者外源DNA/RNA不整合到宿主染色体中,因此一个宿主细胞中可存在多个拷贝数,产生高水平的表达,但通常只持续几天。稳定转染中,外源DNA既可以整合到宿主染色体中,也可能作为一种游离体存在。转染的技术手段包括化学转染和物理转染,前者如DEAE-葡聚糖法、磷酸钙法和人工脂质体法,后者如显微注射、电穿孔和基因枪等。

[0072] 本发明的多肽可用于食品工业、医药卫生、化学化工中。具体而言,本发明多肽可用于油脂水解;可应用在乳品中进行乳脂水解,可增强干酪、奶粉、奶油的风味,促进干酪的成熟,改善乳制品的品质;可应用于面食加工中,以使面食弹性提高,改善食感,提高面包的保鲜能力;可在化学化工中用于脂肪酸甲酯的水解,例如辛癸酸甲酯水解,以生产脂肪酸;可添加到洗涤剂中,用于除去油污,或用于餐具和衣物的清洗、漂白、干洗,皮革清洁,隐形眼睛清洗,化妆品和食品加工等工业废物的清理,排气管和抽水马桶有机废物的降解等。本发明尤其涉及本发明多肽在脂肪酸甲酯的水解,例如中短链脂肪酸甲酯的水解,特别是含有C4~C12链长脂肪酸的脂肪酸甲酯水解,最优选地在辛癸酸甲酯水解中的应用。可以本领域常规的用量将本发明的多肽用于上述各领域中。

[0073] 因此,本发明提供本发明所述的多肽、编码序列、核酸构建物和细胞在食品工业、医药卫生、化学化工中的应用。尤其是,本发明提供所述的多肽、编码序列、核酸构建物和细胞在脂肪酸酯的水解,例如中短链(C4~C12)脂肪酸甲酯的水解,特别是辛癸酸甲酯水解中的应用。

[0074] 本发明也提供一种组合物,其是一种反应混合物。其特征在于,所述反应混合物含有:脂肪酸甲酯、水、本发明的多肽或含有本发明的核苷酸的宿主细胞。优选地,该脂肪酸甲酯是辛癸酸甲酯。

[0075] 将酶活力单位U定义为在温度40℃,pH值8.0的条件下,酶水解底物4-硝基苯基丁酸酯,每分钟释放出1 $\mu$ mol对硝基苯酚(pNP)所需的酶量为1个酶活力单位(U)。优选地,本发明多肽的用量为每克脂肪酸甲酯5U以上,优选地在5U~10U之间;和/或优选地,水的用量为脂肪酸甲酯,例如辛癸酸甲酯重量的95%以上,例如95~100%之间或95~200%之间。

[0076] 本发明的多肽可以纯的酶制品的形式提供,也可以组合物的形式提供。组合物可以是粉末组合物,也可以是液体组合物,或糊状组合物。以组合物形式提供时,根据该含酶组合物的不同用途,该组合物可含有不同的辅料。可将本领域已知的辅料添加到本发明的组合物中,这类辅料包括但不限于山梨醇、山梨酸钾、苯甲酸甲酯、苯甲酸乙酯、蔗糖、甘露糖、海藻糖、淀粉、氯化钠、氯化钙等稳定剂或其他物质中的一种或多种。

[0077] 本发明也提供一种使用本发明多肽进行油脂精炼、油脂化工、改良饲料、食品制备、药品制备的方法,所述方法(以及本文中提及的使用本发明多肽的其它方法)优选在以下条件下进行:

[0078] (A) 温度为20℃-60℃,优选为35 $\pm$ 2℃;和/或

[0079] (B) pH为5.5-9,优选6-9,更优选为6.1-7.5或8.5-9,最优选为6或9。

[0080] 本发明方法中使用的本发明多肽的量可根据实际情况加以确定。

[0081] 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等,《分子克隆:实验室指南》(美国纽约州:冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),1989)所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件进行。对于试剂的用法和用量,除非另有说明,否则按照常规的用法和用量使用。如无特别说明,百分数指重量百分数。

[0082] 实验材料

[0083] 实验菌株和质粒

[0084] 菌株:毕赤酵母GS115(Invitrogen,货号C181-00),大肠杆菌DH5a(TAKARA:Catalog#.D9057A)。

[0085] 质粒:pPIC9K质粒(Invitrogen,货号V175-20)。

[0086] 2. 培养基和溶液

[0087] LB液体培养基:0.5%酵母提取物,1%胰化蛋白胨,1%NaCl,pH7.0。

[0088] LB固体培养基:在LB液体培养基中加入琼脂浓度1.5%。

[0089] YPD液体培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖。

[0090] YPD固体培养基:在LB液体培养基中加入琼脂浓度2%。

[0091] MGY5固体培养基:1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,1%甘油,1M山梨醇,4 $\times$ 10<sup>-5</sup>%D-生物素,2%琼脂。

[0092] 三丁酸甘油酯筛选培养基:1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,4×10<sup>-5</sup>%D-生物素,0.5%甲醇(灭菌后加入),2%三丁酸甘油酯乳化液,0.1M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液pH6.6,2%琼脂。

[0093] 2%大豆磷脂乳化液:2%三丁酸甘油酯,1%阿拉伯胶,100ml H<sub>2</sub>O,用高速匀浆机8000rpm匀浆1min。

[0094] BMGY液体培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,1%甘油,4×10<sup>-5</sup>%D-生物素,0.1M磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液pH6.0。

[0095] BMMY液体培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,1.34%酵母氮源碱(YNB)含硫酸铵不含氨基酸,0.3%ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.5%甲醇(灭菌后加入),4×10<sup>-5</sup>%D-生物素(灭菌后加入),0.1M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液pH6.6。

[0096] pNPB底物缓冲液:取5.3mL A液和94.7mL B液,混合后加入约280mL水,加入0.92g脱氧胆酸钠、0.44g阿拉伯树胶粉,搅拌溶解,用H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>或NaOH调节pH值至8.0,定容至400mL,4℃保存。

[0097] A液:0.2mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液,称取3.12g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>用蒸馏水溶解并定容至100mL

[0098] B液:0.2mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液,称取71.7g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O用蒸馏水溶解并定容至1000mL。

[0099] 底物pNPB溶液(3mg/L):称取4-硝基苯基丁酸酯(pNPB)0.030g,加入10mL异丙醇搅拌溶解,4℃保存。

[0100] 脂肪酶活力的测定方法

[0101] 采用比色法测定脂肪酶活力。以4-硝基苯基丁酸酯(pNPB)为底物,具体方法如下:预先配置底物和缓冲液,配制方法见实验材料。

[0102] 将底物和缓冲液以1:9(v/v)配成反应混合液。吸取25uL上清和菌体的样品加入600uL pNPB反应混合液中,40℃水浴15min,加入500uL无水乙醇终止反应,12000rpm离心5min,取上清在410nm波长下测定样品的吸光度。

[0103] 根据对硝基苯酚标准曲线,得出脂肪酶活力的计算公式:

[0104] 酶活力(U/mL) = (a × ΔOD + b) × 10 × n × 1/15

[0105] 公式中,ΔOD:A-A<sub>0</sub>(405nm处吸光值);a、b:pNP标准曲线公式中的系数;10:将酶液中的酶活折算为1mL的酶活力;n:酶液的稀释倍数;1/15:反应时间为15分钟,折算为1分钟的系数。

[0106] 酶活定义:在温度为40℃,pH值8.0的条件下,含酶样品水解底物4-硝基苯基丁酸酯,每分钟释放出1umol对硝基苯酚(pNP)所需的酶量为1个酶活力单位(U)。

[0107] 注:4-硝基苯基丁酸酯(pNPB)、4-硝基苯基辛酸酯(pNPO)、4-硝基苯基月桂酸酯(pNPD)、4-硝基苯基豆蔻酸酯(pNPM)、4-硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)、4-硝基苯基硬脂酸酯(pNPS)(均购至Sigma)配制方式如上述;限制性内切酶NotI,EcoRI,SaI(购自纽英伦生物技术(北京)有限公司);PCR酶:TaKaRa Taq,PrimeSTAR®HS DNA Polymerase(购自宝生物工程(大连)有限公司);T4DNA连接酶(购自富酶泰斯有限公司);辛癸酸甲酯(沙索丰益工业(连云港)有限公司);Ca1B脂肪酶是购自诺维信公司的Novozymes Lipozyme CALB L;RML脂肪酶是购自诺维信公司的Novozymes Palatase 20000L。

[0108] 实施例1:p9K-SL4载体构建

[0109] 委托生工生物工程(上海)股份有限公司将裂壶藻脂肪酶SL4(SEQ ID NO.:1)通过全基因组合成的方式获得,并通过限制性内切酶切位点NotI,EcoRI连接到pPIC9K质粒上,从而得到p9K-SL4重组质粒。

[0110] 实施例2:表达SL4脂肪酶的毕赤酵母菌株构建及筛选

[0111] 将p9K-SL4质粒用限制性内切酶SalI线性化,通过凝胶回收线性化片段。利用醋酸锂(LiAc)法制备毕赤酵母GS115菌株的感受态细胞,再通过电转化将500ng线性化的p9K-SL4转化至GS115感受态细胞。将转化物涂布于MGYS平板上,30℃培养3天。挑取平板上的单克隆,至BMMY-三丁酸甘油酯筛选平板上,选取透明圈大的克隆,从而获得表达SL4脂肪酶的毕赤酵母菌株。将没有转化p9K-SL4的GS115和表达SL4脂肪酶的毕赤酵母菌株涂平板,得到如图1所示的平板图,其中左边菌落为没有转化p9K-SL4的GS115(作为对照),右边菌落为SL4表达菌株,结果显示SL4表达菌株形成了明显的透明圈,具有脂肪酶活性。

[0112] 实施例3:表达SL4脂肪酶的毕赤酵母菌株的发酵及酶活分布检测

[0113] 取表达SL4脂肪酶的毕赤酵母菌株转化子,先在液体YPD中活化,然后接种于BMGY培养基中,在30℃下,220rpm振荡培养过夜。将培养物转至BMMY培养基中,初始OD600为6。用2%甲醇进行诱导,在24h和32h后各补加1%甲醇,48h和56h后各补加1%甲醇,72h取样,取1mL的发酵样品12000rpm离心5min,吸出发酵上清后用1mL的无菌水重悬沉淀菌体,从而获得发酵液上清样品和菌体样品,以不含SL4基因的pPIC9K空载体的转化子为负对照。

[0114] 计算得到发酵液上清样品和菌体样品的脂肪酶活力,结果见图2,可以发现99.3%的脂肪酶活性都在菌体样品中,而上清样品几乎没有脂肪酶活性,另外空载体转化子负对照显示菌体样品和上清样品都没有脂肪酶活性,而且如果SL4在胞内的话菌体必须破碎才能检测到脂肪酶活性,所以综上表明所表达的SL4脂肪酶99.3%都固定在毕赤酵母菌体上,形成了天然的固定化酶,而发酵液上清中基本没有脂肪酶酶活。

[0115] 实施例4:SL4脂肪酶的酶学性质检测

[0116] 1.底物专一性

[0117] 配制4-硝基苯基丁酸酯(pNPB)、4-硝基苯基辛酸酯(pNPO)、4-硝基苯基月桂酸酯(pNPD)、4-硝基苯基豆蔻酸酯(pNPM)、4-硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)、4-硝基苯基硬脂酸酯(pNPS)(异丙醇溶解),按照标准pNPB法(更换为相应底物)检测脂肪酶的活力,以酶活测定最高的底物所测得的酶活力为100%,计算其他底物下的相对酶活力。由图3可见,SL4脂肪酶水解pNPB能力最强,水解pNPO、pNPD能力其次,而对pNPM、pNPP、pNPS的水解能力非常差。

[0118] 2.最适作用温度

[0119] 在不同的温度(20-70℃)下按照pNPD法测定脂肪酶活力,以测定酶活最高时的酶活力为100%,计算其他温度下的相对酶活(%)。由图4可见,SL4的酶活最适作用温度为35℃,且在50℃时仍有60%的酶活,证明其可应用的温度范围较广。

[0120] 3.最适作用pH

[0121] 将悬浮菌体分别加在不同pH(3.0-11.0)的缓冲液中(pH3.0-6.0为乙酸-NaOH缓冲液、pH6.0-6.5为MES缓冲液、pH6.5-9为Tris-HCl缓冲液、pH9-11为甘氨酸-NaOH缓冲液),35℃下按pNPD法测定脂肪酶活力,以测定活力最高时的酶活力为100%,计算其他pH下酶的相对活力(%)。由图5可见,SL4脂肪酶在pH值6-9能表现较高的脂肪酶酶活。

[0122] 4.金属离子对脂肪酶活力的影响

[0123] 配制ZnSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaCl、NiSO<sub>4</sub>、和FeCl<sub>3</sub>等无机盐贮存液。按照pNPD方法,首先配制反应混合液,向每个反应管中分装600μL混合液,并添加终浓度为5mmol/L的无机盐贮存液,再按照标准方法测定活性。以添加水为对照酶活记为100%,计算其他各组的相对活力。如附图6所示,ZnSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、NiSO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>均对SL4脂肪酶有强抑制作用,但NaCl、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>则对SL4脂肪酶有明显的激活作用,尤其是NaCl、KCl,可能由于裂壶藻生长的海洋中,钠和钾离子的含量相对较高,所以对SL4脂肪酶有激活作用。

[0124] 实施例5:SL4脂肪酶的酶活与商品化酶的比较

[0125] 取50mL表达SL4脂肪酶的摇瓶发酵液,12000rpm离心5min,无菌水洗涤菌体2次后,重悬在5mL无菌水中,从而获得SL4脂肪酶成品。对照商品化酶制剂,是可水解中短链脂肪酸甲酯的脂肪酶南极假丝酵母脂肪酶B(Novozymes Lipozyme CALB L)和米黑根毛霉脂肪酶RML(Novozymes Palatase 20000L)。

[0126] 将SL4脂肪酶成品、Novozymes Lipozyme CALB L和Novozymes Palatase20000L,分别稀释1000倍后,吸取25μL样品加入600μL pNPB反应混合液中,35℃水浴15min,加入500μL无水乙醇终止反应,12000rpm离心5min,取上清在410nm波长下测定样品的吸光度。结果如图7所示,所添加的酶制品的酶活如下:SL4脂肪酶成品酶活为106U/mL、Novozymes Lipozyme CALB L酶活为116U/mL和Novozymes Palatase 20000L酶活为81U/mL;未经过优化的毕赤酵母表达的成品SL4脂肪酶,与诺维信购买的南极假丝酵母脂肪酶B和米黑根毛霉脂肪酶的酶活水平基本相当,证明SL4脂肪酶在酶活表现上具有应用于生产的可行性。

[0127] 实施例6:SL4脂肪酶应用于辛癸酸甲酯水解实验

[0128] 称取30g辛癸酸甲酯,加入30g水,在35℃搅拌均匀后加入1.5mL SL4成品菌液(5%,v/m,以mL计的SL4酶液体积数值与以g计的辛癸酸甲酯的数值之比),如上文实施例5中所述,该SL4酶液酶活为106U/mL,用隔膜泵设置体系真空度为56mbar,达到一定反应时间后,静置分层(若分层不明显,则通过离心的方式进行分离),上层取样测定AV,计算水解率。

$$[0129] \quad \text{水解率} = \frac{AV_t - AV_0}{AV_{\text{理论值}} - AV_0}$$

[0130] AV<sub>0</sub>指辛癸酸甲酯原料酸价,AV<sub>t</sub>指某时间间隔t取样酸价,AV<sub>理论值</sub>指辛癸酸甲酯完全水解时的酸价。本实验中,AV<sub>0</sub>为0,AV<sub>理论值</sub>为327.3mgKOH/g。

[0131] 结果如表1所示,结果显示,SL4对辛癸酸甲酯有理想的水解效果。

[0132] 表1 SL4脂肪酶对辛癸酸甲酯的水解率

反应时间	4h	8h	12h	16h	20h	24h
水解率	10%	27%	41.5%	47.5%	56%	61%

[0134] 离心收集菌体,重新进行水解实验,从而验证天然固定化的SL4脂肪酶的可重复利用性,结果见表2所示,重复利用了6次后,SL4脂肪酶仍保持良好的水解效果。

[0135] 表2 SL4脂肪酶对辛癸酸甲酯的可重复利用性

	反应次数	1	2	3	4	5	6
[0136]	水解率	61%	60%	62%	61%	59.5%	59%

## 序列表

<110> 丰益(上海)生物技术研发中心有限公司

<120> 脂肪酶及其应用

<130> 2016SL4

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1221

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

aaagaggtcg tcgtctttgt tcatggtttg gccggttttg gtgatgatga attgggtccc 60
attgattatt gggccgagtt ggatgaattt cctcgtgacg gtttcgatgt tttcgttgcc 120
tctgttggtc ctgtttcttc taactgggat cgtgcctgcg aattgtatgc ccagattaaa 180
ggtagccctg ttgattatgg tctgccccat tcttctacct attcccatga acgttacggt 240
cgtgattatt ctggtcaggg cttttatcct tcttggctca ccaccaaacg tattcacttg 300
atcggtcatt ctatgggtgg tcagaccatt cgtcagttgg aagttatggt gcaggaaggt 360
gttcctgccg aagtttctgc cggttctacc tctcctttgt ttgccggttt gggcaacatg 420
attaaatccg tcaccaccat ttctaccct catgatggta cccctttgat tgatgttttg 480
ggtgaggata tcgtcgaatt gatcaaggat ttgatcttgg gttttgccgg tattaccggt 540
aacaccttgc ttgatttgat ctacgacttc gacttggacc attttggttt gggtcgctcag 600
cctggtgaat cttttggtga ttacgttgaa cgtgtttgcg ccaacgceat ttttgatatg 660
ggtttccgtg atttggcccc ttatgatttg tctattgacg gttctcgtga attgcagcag 720
caaggtcagc aggcctattc taacaccttc tactttggta tggctaccga acagaccggt 780
cagaacgttc cttggtgcga atgggggttat ggttgcggtt tgatttctgt tgccgaaacc 840
accatgggtt tgttgttca gcctttcgcc aacattattg gttctttgcg tgttgccctc 900
gatttgcgta aaaacgatgg tttggtccct tttgagtctt ctaagtgcc taagatcgg 960
tattctaacg gtgccaacgg ttgcacaaa tttaccggtta cctgggcacc tggtcggttg 1020
tattggatgg aagttgacag agatcacttg caggtcattg gtttcacctt cttgtatgcc 1080
ttgaccaacg atgcatceta ttctaaccat gccgaacgta tttggggtat ttctggtggt 1140
aacacctatg ttggttcttc caacgttggg gatggtaccg atgaagtctc tgaacctgaa 1200
cagaccteta actctgggta g 1221

```

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Lys Glu Val Val Val Phe Val His Gly Leu Ala Gly Phe Gly Asp Asp

1	5	10	15
Glu Leu Gly Pro Ile Asp Tyr Trp Ala Glu Leu Asp Glu Phe Pro Arg			
	20	25	30
Asp Arg Phe Asp Val Phe Val Ala Ser Val Gly Pro Val Ser Ser Asn			
	35	40	45
Trp Asp Arg Ala Cys Glu Leu Tyr Ala Gln Ile Lys Gly Thr Arg Val			
	50	55	60
Asp Tyr Gly Pro Ala His Ser Ser Thr Tyr Ser His Glu Arg Tyr Gly			
65	70	75	80
Arg Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Phe Tyr Pro Ser Trp Ser Thr Thr Lys			
	85	90	95
Arg Ile His Leu Ile Gly His Ser Met Gly Gly Gln Thr Ile Arg Gln			
	100	105	110
Leu Glu Val Met Leu Gln Glu Gly Val Pro Ala Glu Val Ser Ala Gly			
	115	120	125
Ser Thr Ser Pro Leu Phe Ala Gly Leu Gly Asn Met Ile Lys Ser Val			
	130	135	140
Thr Thr Ile Ser Thr Pro His Asp Gly Thr Pro Leu Ile Asp Val Leu			
145	150	155	160
Gly Glu Asp Ile Val Glu Leu Ile Lys Asp Leu Ile Leu Gly Phe Ala			
	165	170	175
Gly Ile Thr Gly Asn Thr Phe Val Asp Leu Ile Tyr Asp Phe Asp Leu			
	180	185	190
Asp His Phe Gly Leu Gly Arg Gln Pro Gly Glu Ser Phe Gly Asp Tyr			
	195	200	205
Val Glu Arg Val Cys Ala Asn Ala Ile Phe Asp Met Gly Phe Arg Asp			
	210	215	220
Leu Ala Pro Tyr Asp Leu Ser Ile Asp Gly Ser Arg Glu Leu Gln Gln			
225	230	235	240
Gln Gly Gln Gln Ala Tyr Ser Asn Thr Phe Tyr Phe Gly Met Ala Thr			
	245	250	255
Glu Gln Thr Val Gln Asn Val Pro Trp Cys Glu Trp Gly Tyr Gly Cys			
	260	265	270
Gly Leu Ile Ser Val Ala Glu Thr Thr Met Gly Leu Leu Leu Gln Pro			
	275	280	285
Phe Ala Asn Ile Ile Gly Ser Leu Arg Val Ala Ser Asp Leu Arg Lys			
	290	295	300
Asn Asp Gly Leu Val Pro Phe Glu Ser Ser Lys Cys Pro Lys Ile Gly			
305	310	315	320







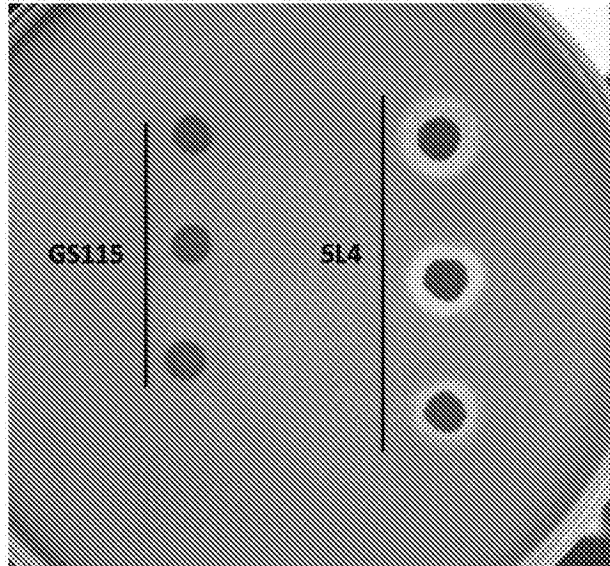


图1

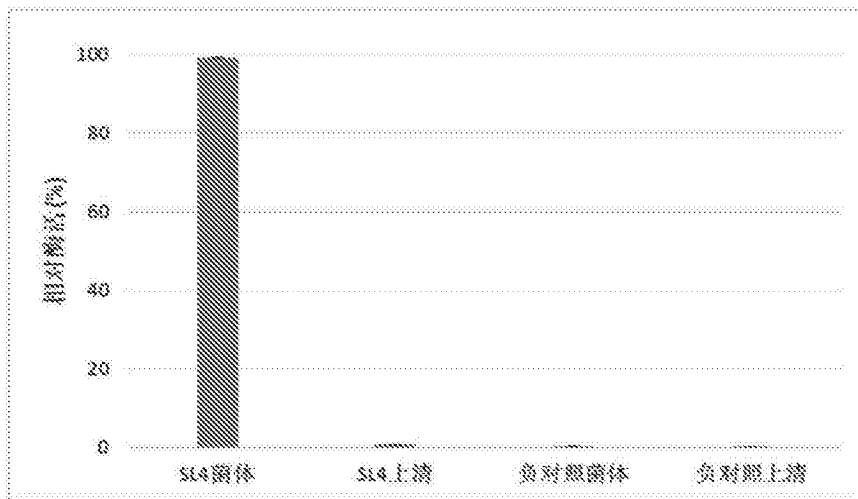


图2

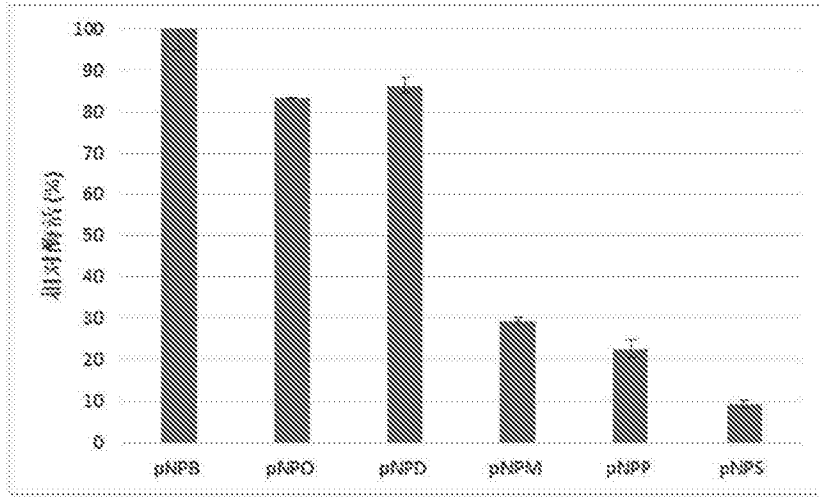


图3

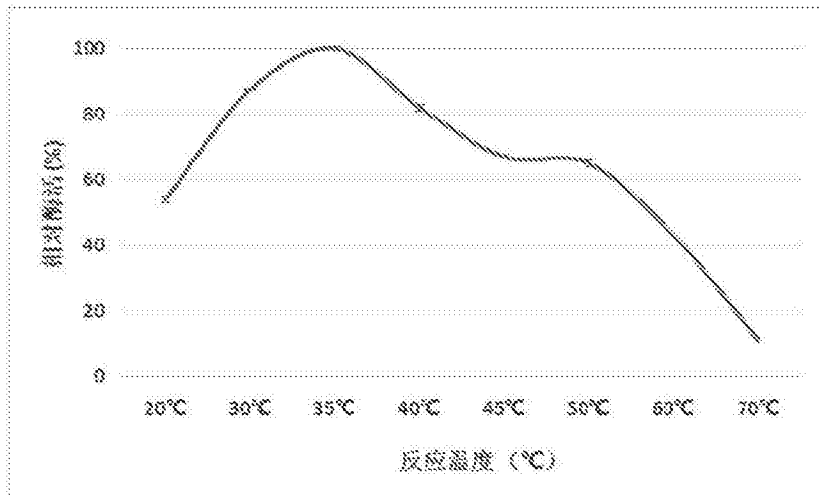


图4

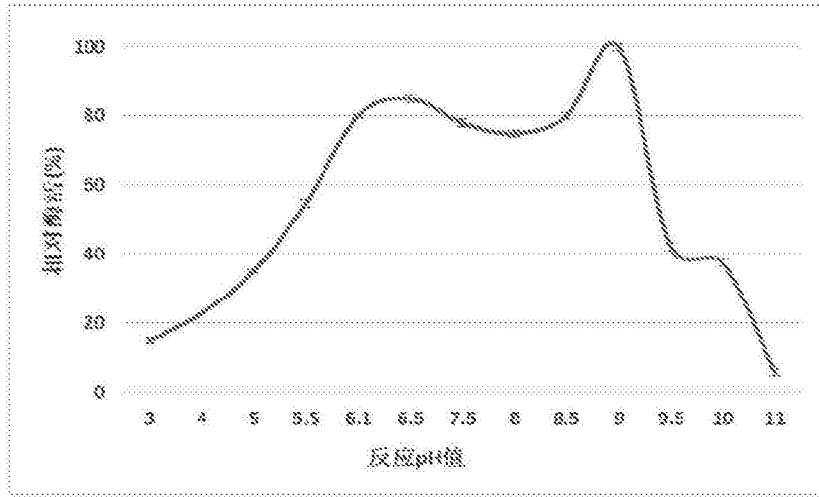


图5

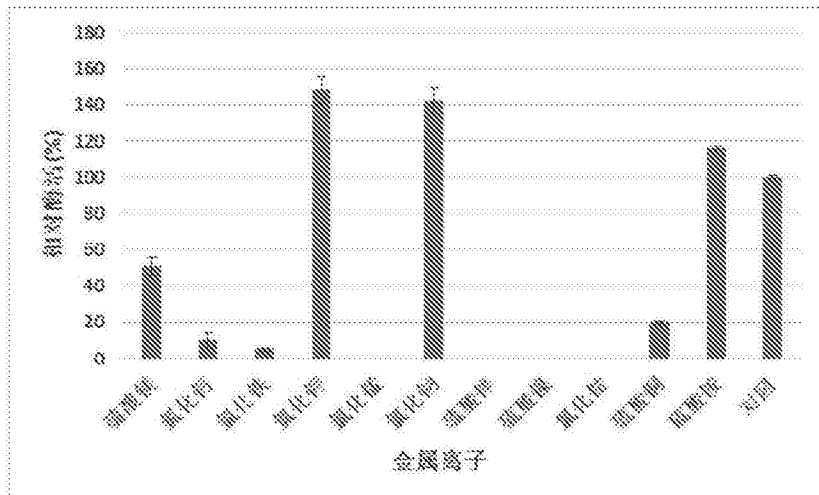


图6

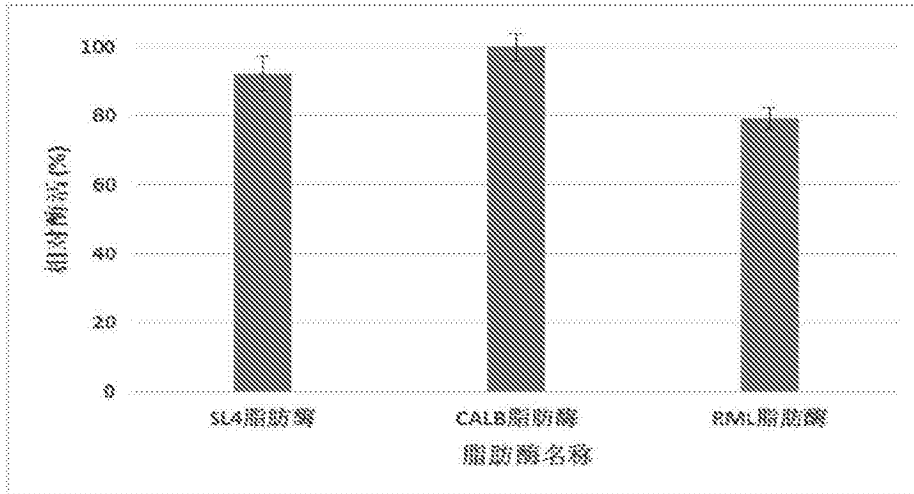
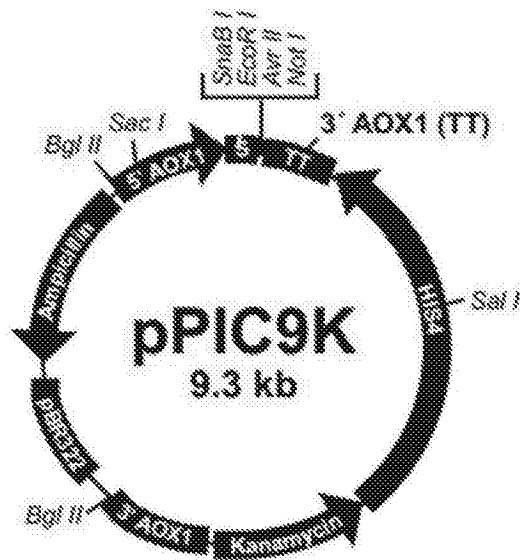


图7



Comments for pPIC9K:  
 9276 nucleotides

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-948  
 5' AOX1 primer site: bases 855-875  
 α-Factor secretion signal(s): bases 949-1218  
 α-Factor primer site: bases 1152-1172  
 Multiple Cloning Site: bases 1216-1241  
 3' AOX1 primer site: bases 1327-1347  
 3' AOX1 transcription termination (TT):  
 bases 1253-1586  
 HIS4 ORF: bases 4514-1980  
 Kanamycin resistance gene: bases 5743-4928  
 3' AOX1 fragment: bases 6122-6879  
 pBR322 origin: bases 7961-7288  
 Ampicillin resistance gene: bases 8955-8106

图8