



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103773746 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410001214. 0

C12R 1/66 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 01. 02

(71) 申请人 青岛蔚蓝生物集团有限公司

地址 266061 山东省青岛市崂山区苗岭路  
29 号山东高速大厦 12A07

(72) 发明人 吴秀秀 张青 李宾 王华明

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有  
限公司 37201

代理人 曾庆国

(51) Int. Cl.

C12N 9/20 (2006. 01)

C12N 15/55 (2006. 01)

C12N 15/80 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12R 1/885 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页

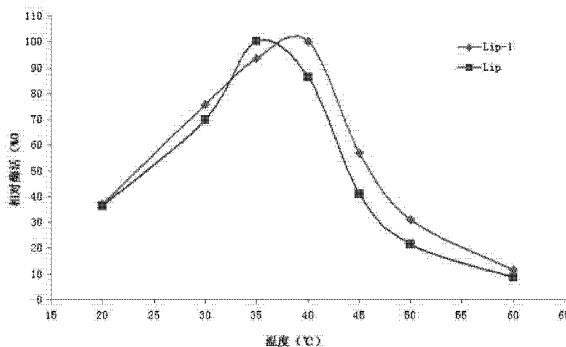
序列表11页 附图1页

(54) 发明名称

一种脂肪酶及其突变体

(57) 摘要

本发明提供一种新型脂肪酶及其突变体,所述的脂肪酶的氨基酸序列为SEQ ID NO :1。本发明从塔宾曲霉中克隆得到一种新型脂肪酶 Lip-1,其最适作用 pH 值为 6.5,最适作用温度为 40℃;在 pH4.0-7.0 的范围内能保留 52.3% 以上的酶活力。本发明同时在脂肪酶 Lip-1 基础上进行突变,获得了三个单点突变体,所述突变体对胰蛋白酶的耐受性较突变前分别提高了 34.64%,36.30% 和 53.43%,因此更有利于其在饲料添加剂领域的应用。本发明所述脂肪酶 Lip-1 及其三个突变体均能有效提高饲料中油脂类物质的利用率,从而提高肉鸡的采食量和日增重,降低料肉比,提高养殖动物的生产性能,应用前景广泛。



1. 一种脂肪酶,其特征在于,所述脂肪酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO :1。
2. 一种编码权利要求 1 所述脂肪酶的基因,其特征在于,所述基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO :2。
3. 一种重组质粒,其特征在于,所述的重组质粒携带有权利要求 2 所述的基因。
4. 一种重组里氏木霉,其特征在于,所述的重组里氏木霉携带有权利要求 3 所述的重组质粒。
5. 一种脂肪酶突变体,其特征在于,所述的脂肪酶突变体是权利要求 1 所述脂肪酶的 142 位氨基酸由 Lys 变为 Ile。
6. 一种脂肪酶突变体,其特征在于,所述的脂肪酶突变体是权利要求 1 所述脂肪酶的 154 位氨基酸由 Lys 变为 Cys。
7. 一种脂肪酶突变体,其特征在于,所述的脂肪酶突变体是权利要求 1 所述脂肪酶的 156 位氨基酸由 Lys 变为 Trp。
8. 一种基因,其特征在于,所述的基因编码权利要求 5-7 任一项所述的脂肪酶突变体。
9. 一种重组质粒,其特征在于,所述的重组质粒携带有权利要求 8 所述的基因。
10. 一种重组里氏木霉,其特征在于,所述的重组里氏木霉携带有权利要求 9 所述的重组质粒。

## 一种脂肪酶及其突变体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程及蛋白质改造技术领域,具体涉及一种脂肪酶及其突变体。

### 背景技术

[0002] 脂肪酶即三酰基甘油酰基水解酶,它催化天然底物油脂水解,生成脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯。脂肪酶基本组成单位仅为氨基酸,通常只有一条多肽链。它的催化活性仅仅决定于它的蛋白质结构(Schmid 等,1998)。脂肪酶具有广泛的应用价值,已成为市场上的第三大工业用酶。脂肪酶可以催化解脂、酯交换、酯合成等反应,广泛应用于饲料添加剂、油脂加工、食品、医药、日化等工业。

[0003] 酶学特性和酶的稳定性是影响其应用的关键因素之一;同时,很多酶学性质较好的蛋白在实际应用条件下,使用效果并不好。塔宾曲霉脂肪酶具有较好的胃酸和胃蛋白的耐受性;但是对胰蛋白酶耐受性较差。由于动物肠道是消化和吸收脂肪的主要器官,肠道中 pH 接近中性同时含有大量的胰蛋白酶;因此,肠道的消化特点限制了塔宾曲霉作为饲用酶制剂作用效果。

[0004] 寻找和克隆合适饲用脂肪酶的途径有 2 个:一是筛选产新型酶的微生物;二是对酶进行适当的蛋白质工程改造。微生物菌种选育是工业生产和学术研究最常用和最简单的手段之一;但是,其缺点是工作量大,随机性强;因此往往很难筛选到理想菌株。而蛋白质工程是这些年新兴的、借用分子生物学和生物信息学的方法对蛋白进行定向突变和理性改造,而获得理想蛋白或酶方法。其优点是工作量相对较小和概率大;缺点是多数突变体蛋白酶学性质没有改变或者变得更差。因此,获得更好效果的脂肪酶突变体一直是本领域的研究热点。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种新型脂肪酶及其突变体。本发明利用分子生物学手段从塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)中克隆得到一种新型脂肪酶,所述脂肪酶与已报道的黑曲霉(*Aspergillus niger*)的脂肪酶仅存在五个氨基酸位点的不同,但所述位点的不同导致两者的酶学性质发生很大变化。为了进一步提高所述脂肪酶的胰蛋白酶耐受性,本发明通过蛋白质改造技术,获得了该脂肪酶的突变体,所述突变体对胰蛋白酶的耐受性得到显著提升,因此更有利于其在饲料领域中的广泛应用。

[0006] 本发明一方面提供了一种新型脂肪酶,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:1。

[0007] 所述脂肪酶的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO:2。

[0008] 本发明还包括携带有编码序列为 SEQ ID NO:2 的脂肪酶基因的质粒。

[0009] 本发明还包括携带有上述质粒的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。

[0010] 为了进一步提高上述脂肪酶的胰蛋白酶耐受性,本发明对氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的脂肪酶进行突变,获得了三个脂肪酶突变体。

[0011] 本发明提供了第一个脂肪酶突变体,是将氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的脂肪酶的

142 位氨基酸由 Lys 变为 Ile。

[0012] 上述脂肪酶突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5, 其一种编码基因的核酸序列为 SEQ ID NO:6。

[0013] 本发明还包括携带有编码序列为 SEQ ID NO:6 的脂肪酶突变体基因的质粒。

[0014] 本发明提供的第二个脂肪酶突变体, 是氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的脂肪酶的 154 位氨基酸由 Lys 变为 Cys。

[0015] 上述脂肪酶突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7, 其一种编码基因的核酸序列为 SEQ ID NO:8。

[0016] 本发明还包括携带有编码序列为 SEQ ID NO:8 的脂肪酶突变体基因的质粒。

[0017] 本发明提供的第三个脂肪酶突变体, 是氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的脂肪酶的 156 位氨基酸由 Lys 变为 Trp。

[0018] 上述脂肪酶突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:9, 其一种编码基因的核酸序列为 SEQ ID NO:10。

[0019] 本发明还包括携带有编码序列为 SEQ ID NO:10 脂肪酶突变体基因的质粒。

[0020] 将上述的质粒转入里氏木霉中, 重组表达的脂肪酶突变体对胰蛋白酶具有很好的耐受性。

[0021] 本发明从塔宾曲霉中克隆得到一种新型脂肪酶 Lip-1, 其最适作用 pH 值为 6.5, 最适作用温度为 40°C; 在 pH4.0-7.0 的范围内能保留 52.3% 以上的酶活力, 比对照组的脂肪酶 Lip 具有更宽泛的 pH 适用范围。本发明同时在脂肪酶 Lip-1 基础上进行突变, 获得了三个单点突变体, 所述突变体对胰蛋白酶的耐受性较突变前分别提高了 34.64%, 36.30% 和 53.43%, 因此更有利于其在饲料添加剂领域的应用。本发明所述脂肪酶 Lip-1 及其三个突变体均能有效提高饲料中油脂类物质的利用率, 从而提高肉鸡的采食量和日增重, 降低料肉比, 提高养殖动物的生产性能, 应用前景广泛。

#### 附图说明

[0022] 图 1 为脂肪酶 Lip-1 和脂肪酶 Lip 最适作用 pH- 相对酶活曲线;

[0023] 图 2 为脂肪酶 Lip-1 和脂肪酶 Lip 最适作用温度 - 相对酶活曲线。

#### 具体实施方式

[0024] 本发明用到了遗传工程和分子生物学领域使用的常规技术和方法, 例如 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd Ed. (Sambrook, 2001) 和 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, 2003) 中所记载的方法。这些一般性参考文献提供了本领域技术人员已知的定义和方法。但是, 这并不意味着将本发明限定于所述的任何具体方法、实验方案和试剂, 因为它们可以改变。

[0025] 除非在本文中另作限定, 本文所用的全部技术术语和科学术语具有本发明所属领域的普通计数人员通常所理解的含义。DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 3rd Ed. (Singleton et al., 2006) 和 COLLINS DICTIONARY BIOLOGY (Hale et al., 2003) 为技术人员提供了本发明中所使用的许多术语的一般性解释。

[0026] 除非另作说明, 核酸是按 5' 至 3' 方向从左至右书写; 氨基酸是按氨基至羧基的

方向从左至右书写。

[0027] 如本文所用,术语“脂肪酶”即三酰基甘油酰基水解酶,它催化天然底物油脂水解,生成脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯。其基本组成单位仅为氨基酸,通常只有一条多肽链。它的催化活性决定于它的蛋白质结构。

[0028] 如本文所用,术语“重组”当被用于指代细胞、核酸、蛋白或载体时,表示该细胞、核酸、蛋白或载体已通过导入异源核酸或蛋白或者通过改变天然核酸或蛋白而被修饰。因此,例如,重组细胞是表达在天然(非重组)形式的该细胞中不曾发现的基因,或者表达天然基因。

[0029] 术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可以互换使用。本文使用氨基酸残基的传统的单字母或三字母代码。

[0030] 如本文所用,术语“基因”指参与生产多肽的 DNA 片段,包括编码区之前和之后的区域,以及各编码片段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

[0031] 术语“核酸”包括 DNA、RNA,单链或双链的,以及它们的化学修饰物。

[0032] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可以互换使用。

[0033] 术语“载体”指被设计用来将核酸导入一种或多种细胞类型的多核苷酸序列。载体包括克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、噬菌粒、序列盒以及类似物。

[0034] 术语“表达载体”表示包含 DNA 序列的 DNA 构建物,所述 DNA 序列被可操纵的连接于能够影响该 DNA 在合适宿主中表达的合适的控制序列。此类控制序列可以包括完成转录的启动子、可选的控制转录的操纵子序列、编码 mRNA 上合适的核糖体结合位点的序列、增强子以及控制转录和翻译的终止的序列。

[0035] 术语“启动子”表示参与结合 RNA 聚合酶以启动基因转录的的调控序列。启动子可以是诱导型启动子或组成型启动子。

[0036] 与另一序列具有某一百分比的序列同一性的多核苷酸或多肽是指,在比较这两个序列时所述百分比的碱基或氨基酸残基是相同的。

[0037] 由于遗传密码是简并的,所以可以使用一种以上的密码子来编码特定的氨基酸,本发明包括编码特定的氨基酸序列的多核苷酸。

[0038] 术语“宿主菌株”或“宿主细胞”是指表达载体或 DNA 构建物的合适宿主,所述表达载体或 DNA 构建物包含本发明的编码脂肪酶的多核苷酸。

[0039] 下面结合实施例对本发明进行详细的描述。

[0040] 实施例 1 脂肪酶基因的扩增

[0041] (1) 提取塔宾曲霉总基因组 DNA

[0042] 将塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)接种摇瓶培养基过夜培养,取适量菌体置于离心管中,13000rpm 离心 5min,弃上清;加入 400  $\mu$ l 抽提缓冲液(100mMTrisHCl, 100mMEDTA, 250mMNaCl, 1%SDS);然后加 100mg 石英砂或玻璃珠、在珠打仪剧烈振荡 2min 左右;水浴锅 65 $^{\circ}$ C 水浴 20min 后加入 200  $\mu$ l 10MNH<sub>4</sub>AC 冰浴 10min;13000rpm 离心 10min 取上清,然后加入 2 倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 30min;13000rpm 离心 10min 弃上清,用 70% 乙醇洗涤 2 次;晾干,加入适量水溶解于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0043] (2) 基因克隆

[0044] 以提取的基因组总 DNA 为模板利用引物

[0045] at1-F AAAGGTACCATGTTCTCTGGACGGTTTG 和

[0046] at1-R AGCTCTAGATTATAGCAGGCACTCGGAAATC) 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为 95°C 4min ;94°C 30S,59°C 40S,72°C 1min30 个循环 ;72°C 7min。利用凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。

[0047] (3) 基因测序分析及合成

[0048] 将回收的扩增产物连接到 pMD18-T 载体,获得克隆载体 pMD-ATL 质粒并送至北京华大基因研究中心进行测序分析。测序结果,扩增产物的基因序列为 SEQ ID NO:2,其编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1,多个克隆的结果证明没有发生扩增错误。

[0049] 经过 NCBI Blast 序列比对发现,SEQ ID NO:1 与已公开的黑曲霉(*Aspergillus niger*)的脂肪酶序列 SEQ ID NO:3 (GenBank: BAL22280.1) 相似性最高,为 98.3%,仅第 25 位、第 56 位、第 117 位、第 150 位和第 253 位的氨基酸存在差异。

[0050] 为了进一步验证本发明克隆得到的脂肪酶(命名为脂肪酶 Lip-1)与 SEQ ID NO:3 所述脂肪酶(命名为脂肪酶 Lip)在酶学性质上是否相同,依照里氏木霉的密码偏爱性而优化合成 SEQ ID NO:3 所述脂肪酶的编码基因,并且在合成序列 5' 和 3' 两端分别加上 KpnI 和 XbaI 两个酶切位点。上述基因合成工作由上海生工生物工程股份有限公司完成,合成后的基因序列为 SEQ ID NO:4。

[0051] 实施例 2 表达载体的构建

[0052] 将实施例 1 克隆得到的基因序列 SEQ ID NO:2 进行 KpnI 和 XbaI 过夜双酶切,然后凝胶回收目的基因片段;同样,对木霉表达载体 pTG (含潮霉素 hph 基因)进行 KpnI 和 XbaI 双酶切和回收;将回收的基因片段和载体 16°C 过夜连接,并转化大肠杆菌 DH5a,最后获得木霉重组表达质粒,分别命名为 pTG-Lip-1。

[0053] 采用上述同样方法,构建得到携带 SEQ ID NO:4 的重组表达质粒,命名为 pTG-Lip。

[0054] 实施例 3 转化和筛选

[0055] (1) 原生质体制备

[0056] 接种里氏木霉(*Trichoderma reesei*)菌丝于 PDA 平板上生长 4 天;切取直径约 3cm 的菌落置于约 60ml YEG (0.5% 酵母粉、1% 葡萄糖)的液体培养基中,30°C,200rpm 振荡培养过夜;多层纱布过滤收集菌丝;将菌丝置于盛有 10-20ml 裂解酶液(Sigma L1412)酶解 2-3 小时;取出酶解液,加入 0.7M NaCl 溶液,轻轻摇晃,倒于三层灭菌擦镜纸过滤,收集滤液,3000rpm,离心 10min;弃上清,加 10-20ml STC 液(20% 蔗糖,50mM Tris-Cl,50mM CaCl<sub>2</sub>)悬浮,然后 3000rpm,离心 10min;加适量 STC 悬浮分装(150 μl/管,10<sup>8</sup> 个/ml)。

[0057] (2) 转化与验证

[0058] 取 2 μg 表达质粒 pTG-Lip-1 加入含 150 μl 原生质体管中,接着加入 500 μl 125%PEG 轻轻混匀,室温静置 25min;然后分 2-3 次再加 1ml 125%PEG,轻轻混匀,室温静置 25min,把原生质体加到 50ml 左右融化后冷却至 45-55°C 的上层半固体培养基(0.1%MgSO<sub>4</sub>,1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.6%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1% 葡萄糖,18.3% 山梨醇,0.35% 琼脂糖),轻轻混匀后倒入含 100 μg/ml 潮霉素下层基础培养基平板(2% 葡萄糖,0.5%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1.5%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.06%MgSO<sub>4</sub>,0.06%CaCl<sub>2</sub>,1.5% 琼脂),28°C 黑暗培养数天至转化子长出。

[0059] 挑取转化子过夜培养,取适量菌体置于离心管中,13000rpm 离心 5min,弃上清;加入 400 μl 抽提缓冲液(100mM Tris-HCl,100mM EDTA,250mM NaCl,1%SDS);然后加 100mg

石英砂或玻璃珠,在珠打仪剧烈振荡 2min 左右 ;65℃水浴 20min 后,加入 200  $\mu$  110M  $\text{NH}_4\text{AC}$ ,冰浴 10min ;13000rpm 离心 10min,取上清 ;加入 2 倍体积的无水乙醇, -20℃放置 30min ;13000rpm 离心 10min,弃上清 ;用 70% 乙醇洗涤 2 次 ;晾干,加入水溶解,于 -20℃保存。

[0060] 以上述提取转化子基因组 DNA 为模板,利用引物 For-pri 和 Bac-pri 进行 PCR 扩增目的基因进行验证。

[0061] For-pri :ATGTTCTCCGGCCGGTTTGG

[0062] Bac-pri :GCAGACACTCTGAAATAGCG

[0063] PCR 扩增条件为 95℃ 3min ;94℃ 30s ;55℃ 30s,72℃ 1.5min30 个循环 ;72℃ 7min。利用凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物并进行测序分析 ;从测序正确的阳性转化子中挑选一株命名为里氏木霉 Lip-1 (*Trichoderma reesei* Lip-1),该菌株能重组表达脂肪酶 Lip-1。

[0064] 采用上述同样方法构建得到能重组表达脂肪酶 Lip 的重组菌株里氏木霉 Lip (*Trichoderma reesei* Lip)。

[0065] 实施例 4 发酵验证和酶学性质测定

[0066] 4.1 发酵验证

[0067] 将上述两株里氏木霉工程菌(Lip-1, Lip) 分别接种于 MM 发酵培养基(1.5% 葡萄糖,1.7% 乳糖,2.5% 玉米浆,0.44%( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.09%MgSO<sub>4</sub>,2%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.04%CaCl<sub>2</sub>,0.018%吐温 -80,0.018% 微量元素,0.018% 聚丙二醇 -2000),28℃培养 48 小时,然后 25℃培养 48 小时,取发酵液离心处理,将上清液分别进行酶活测定和酶活性质分析。

[0068] 脂肪酶活力定义

[0069] 1g 固体酶粉(或 1ml 液体酶),在一定温度和 pH 条件下,1min 水解底物产生 1  $\mu$  mol 的可滴定的脂肪酸,即为一个酶活力单位,以 u/g(u/ml) 表示。

[0070] 酶活测定方法 :

[0071] 取两个 100ml 三角瓶,分别于空白瓶(A) 和样品瓶(B) 中各加入底物溶液 4.00ml 和磷酸缓冲液 5.00ml,再于 A 瓶中假如 95% 乙醇 15.00ml,于 40℃  $\pm$  0.2℃水浴中预热 5min,然后于 A、B 瓶中各加待测酶液 1.00ml,立即混匀计时,准确反应 15min 后,于 B 瓶中立即补加 95% 乙醇 15.00ml 终止反应,取出 ;于空 白和样品溶液中各加酚酞指示液两滴,用氢氧化钠标准溶液滴定,直至微红色并保存 30s,不褪色为滴定终点,记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积。

[0072] 脂肪酶的酶活力按下列公式计算 :

[0073]

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 50 \times n}{0.05} \times 1/15$$

[0074] 式中 :

[0075] X1——样品的酶活力, u / ml ;

[0076] V1——滴定样品时消耗氢氧化钠标准溶液体积, ml ;

[0077] V2——滴定空白时消耗氢氧化钠标准溶液体积, ml ;

[0078] c——氢氧化钠标准溶液的浓度, mol / L ;

[0079] 50——0.05mol/L 氢氧化钠溶液 1.00ml 相当于脂肪酸 50  $\mu$  mol ;

[0080] n——酶液稀释倍数 ;

[0081] 0.05——氢氧化钠标准溶液浓度换算系数 ;

[0082] 1/15——反应时间 15min, 以 1min 计 ;

[0083] 所得实验结果表示至整数。

[0084] 按照上述方法测得本发明构建的里氏木霉 Lip 的发酵液酶活为 302U/mL, 里氏木霉 Lip-1 的发酵液酶活为 359U/mL。

[0085] 4.2 酶学性质分析

[0086] (1) 最适 pH 分析 :

[0087] 分别用 pH 值为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的缓冲液稀释上述发酵上清液, 在 40°C 条件下测定其酶活, 以最高酶活 100%, 计算相对酶活, 做 pH- 相对酶活曲线。结果如图 1 所示, 本发明所述脂肪酶 Lip-1 的最适作用 pH 为 6.5, 而作为对照组的脂肪酶 Lip 的最适作用 pH 为 6.0。

[0088] (2) 最适温度分析 :

[0089] 分别在 20°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、60°C, pH7.5 条件下测定上述发酵上清液的酶活, 以最高酶活为 100%, 计算相对酶活, 做温度- 相对酶活曲线。结果如图 2 所示, 本发明所述脂肪酶 Lip-1 的最适作用温度为 40°C, 而作为对照组的脂肪酶 Lip 的最适作用温度为 35°C。

[0090] (3) pH 耐受性分析 :

[0091] 分别用 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲液稀释上述发酵上清液 ; 40°C 保温 30min 后, 分别测定其酶活力, 以未处理的上清液酶活力为 100%, 计算残余酶活力。结果显示 : 本发明所述脂肪酶 Lip-1 在 pH4.0-7.0 的范围内能保留 52.3% 以上的酶活力, 而作为对照组的脂肪酶 Lip 仅在 pH5.0-6.5 范围内能保留约 50% 以上的酶活力, 从而说明本发明的脂肪酶 Lip-1 比对照组的脂肪酶 Lip 具有更宽泛的 pH 适用范围。

[0092] 综上, 本发明分离得到的脂肪酶 Lip-1 的最适作用温度和 pH 值均与对照组的脂肪酶 Lip 存在很大差异, 而且脂肪酶 Lip-1 比对照组的脂肪酶 Lip 具有更宽泛的 pH 适用范围, 从而说明本发明获得的脂肪酶 Lip-1 第 25 位、第 56 位、第 117 位、第 150 位和第 253 位氨基酸的不同导致其酶学性质与已公开的脂肪酶 Lip 产生很大的差别, 进一步证明本发明分离得到的脂肪酶 Lip-1 是一种新型脂肪酶。

[0093] 实施例 5 体外酶解的实验

[0094] (1) 胃液和胃蛋白酶耐受性

[0095] 用 pH5.5 的缓冲液分别稀释实施例 4 所述发酵上清液 (Lip-1, Lip) 至适当酶活, 调节 pH 至 2.0 后取上述上清液各 8ml, 分别加入到 2ml 胃液、胃蛋白酶 (5%) 中, 37°C 处理 2h 后测定其酶活, 以未处理的上清液酶活为 100%, 计算残余酶活。具体结果如下 :

[0096] A. 脂肪酶 Lip-1 在胃液和胃蛋白酶处理后, 残余酶活分别为 47.9% 和 65.2%。

[0097] B. 脂肪酶 Lip 在胃液和胃蛋白酶处理后, 残余酶活分别为 49.2% 和 66%。

[0098] (2) pH6.8、胰蛋白酶耐受性

[0099] 用 pH5.5 的缓冲液稀释实施例 4 所述发酵上清液至适当酶活, 调节 pH 至 6.8 后,



分别用 pH6.8 的缓冲液(人工肠液)和胰蛋白酶分别稀释 5 倍,37℃处理 6h 后测其酶活,以未处理的酶活为 100%,计算残余酶活。具体结果如下:

[0100] A. 脂肪酶 Lip-1 分别经 pH6.8 人工肠液和胰蛋白酶处理后,残余酶活分别约为 52.6% 和 17.71%。

[0101] B. 脂肪酶 Lip 分别经 pH6.8 人工肠液和胰蛋白酶处理后,残余酶活分别约为 61.8% 和 15.35%。

[0102] 上述实验结果表明,本发明所述脂肪酶 Lip-1 对胃液、胃蛋白酶和胰蛋白酶的耐受性与对照组的脂肪酶 Lip 几乎相同;其中所述脂肪酶 Lip-1 对胃液和胃蛋白酶的耐受性较强,残余酶活约为 50% 以上;但其对胰蛋白酶的耐受性比较低。因此需要进一步改善其对胰蛋白酶的耐受性,使之更适合在饲料领域的应用。

[0103] 实施例 6 脂肪酶突变体基因的合成

[0104] 为了进一步提高上述塔宾曲霉的脂肪酶 Lip-1 (氨基酸序列为 SEQ ID NO:1) 对胰蛋白酶的耐受性,本发明对该酶的胰蛋白酶水解位点进行了大量单点突变体的筛选,结果发现有些突变对胰蛋白酶的耐受性没有影响,有些突变甚至使胰蛋白酶耐受性变的更差了,还有一些突变虽然能提高对胰蛋白酶的耐受性,但突变后脂肪酶的酶学性质发生了显著的变化,均不符合要求。最终,申请人获得了既能显著提高胰蛋白酶活性,又不会影响脂肪酶原有酶学性质的三个单点突变位点:K142I, K154C, K156W。

[0105] K142I 单点突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5,参照该序列合成一个编码核苷酸序列 SEQ ID NO:6 (命名为 Mut-1);K154C 突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7,参照该序列合成一个编码核苷酸序列 SEQ ID NO:8 (命名为 Mut-2);K156W 单点突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:9,参照该序列合成一个编码核苷酸序列 SEQ ID NO:10 (命名为 Mut-3)。3 个序列均是依照里氏木霉的密码偏爱性而优化合成,并且在合成序列 5' 和 3' 两端分别加上 KpnI 和 XbaI 两个酶切位点。上述基因合成工作由上海生工生物工程股份有限公司完成。

[0106] 实施例 7 脂肪酶突变体的表达

[0107] 将实施例 5 合成的 3 个序列分别进行 KpnI 和 XbaI 过夜双酶切,然后凝胶回收目的片段 Mut-1、Mut-2 和 Mut-3;同样,对木霉表达载体 pTG (含潮霉素 hph 基因) 进行 KpnI 和 XbaI 双酶切和回收;将回收基因片段和载体进行 16℃ 过夜连接并转化大肠杆菌 DH5a,最后获得了木霉重组表达质粒,将 3 个表达质粒分别命名为 pTG-Mut-1, pTG-Mut-2 和 pTG-Mut-3。

[0108] 实施例 8 转化和筛选

[0109] (1) 原生质体制备

[0110] 接种里氏木霉菌丝于 PDA 平板上生长 4 天;切取直径约 3cm 的菌落置于约 60ml YEG (0.5% 酵母粉、1% 葡萄糖) 的液体培养基中,30℃,200rpm 振荡培养过夜;多层纱布过滤收集菌丝;将菌丝置于盛有 10-20ml 裂解酶液(SigmaL1412) 酶解 2-3 小时;取出酶解液,加入 0.7M NaCl 溶液,轻轻摇晃,倒于三层灭菌擦镜纸过滤,收集滤液,3000rpm,离心 10min;弃上清,加 10-20ml STC 液(20% 蔗糖,50mM Tris-Cl,50mM CaCl<sub>2</sub>) 悬浮,然后 3000rpm,离心 10min;加适量 STC 悬浮分装(150 μl/管,108 个/ml)。

[0111] (2) 转化与验证

[0112] 取 2 μg 表达质粒(pTG-Mut-1, pTG-Mut-2 和 pTG-Mut-3) 分别加入含 150 μl

原生质体管中,接着加入 500  $\mu$  l 25%PEG 轻轻混匀,室温静置 25min;然后分 2-3 次再加 1ml 25%PEG,轻轻混匀,室温静置 25min,把原生质体加到 50ml 左右熔化后冷却至 45-55 $^{\circ}$ C 的上层半固体培养基(0.1% $MgSO_4$ ,1% $KH_2PO_4$ ,0.6%  $(NH_4)_2SO_4$ ,1% 葡萄糖,18.3% 山梨醇,0.35% 琼脂糖),轻轻混匀后倒入含 100  $\mu$  g/ml 潮霉素下层基础培养基平板(2% 葡萄糖,0.5% $(NH_4)_2SO_4$ ,1.5% $KH_2PO_4$ ,0.06% $MgSO_4$ ,0.06% $CaCl_2$ ,1.5% 琼脂),28 $^{\circ}$ C 黑暗培养数天至转化子长出。

[0113] 挑取转化子过夜培养,取适量菌体置于离心管中,13000rpm 离心 5min,弃上清;加入 400  $\mu$  l 抽提缓冲液(100mM Tris-HCl,100mM EDTA,250mM NaCl,1%SDS);然后加 100mg 石英砂或玻璃珠,在珠打仪剧烈振荡 2min 左右;65 $^{\circ}$ C 水浴 20min 后,加入 200  $\mu$  l 10M  $NH_4AC$ ,冰浴 10min;13000rpm 离心 10min,取上清;加入 2 倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 30min;13000rpm 离心 10min,弃上清;用 70% 乙醇洗涤 2 次;晾干,加入水溶解,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0114] 以上述提取转化子基因组 DNA 为模板,利用引物 For-pri 和 Bac-pri 进行 PCR 扩增目的基因进行验证。

[0115] For-pri :ATGTTCTCCGCGCGTTTGG

[0116] Bac-pri :GCAGACACTCTGAAATAGCG

[0117] PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30S;55 $^{\circ}$ C 30S,72 $^{\circ}$ C 1.5min 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7min。利用凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物并进行测序分析;测序验证正确的即为含目的基因的里氏木霉工程菌。将携带表达质粒 pTG-Mut-1,pTG-Mut-2 和 pTG-Mut-3 的里氏木霉工程菌分别命名为里氏木霉 Mut-1(*Trichoderma reesei* Mut-1)、里氏木霉 Mut-2(*Trichoderma reesei* Mut-2) 和里氏木霉 Mut-3 (*Trichoderma reesei* Mut-3)。

[0118] 实施例 9 发酵验证和酶学性质测定

[0119] 将上述三株里氏木霉工程菌(Mut-1, Mut-2 和 Mut-3) 分别接种于 MM 发酵培养基(1.5% 葡萄糖,1.7% 乳糖,2.5% 玉米浆,0.44% $(NH_4)_2SO_4$ ,0.09% $MgSO_4$ ,2% $KH_2PO_4$ ,0.04% $CaCl_2$ ,0.018% 吐温-80,0.018% 微量元素,0.018% 聚丙二醇-2000),28 $^{\circ}$ C 培养 48 小时,然后 25 $^{\circ}$ C 培养 48 小时,取发酵上清液进行离心处理,然后分别对上清液进行酶活测定和酶学性质分析,并与突变前的脂肪酶 Lip-1(氨基酸序列为 SEQ ID NO:1) 进行比较。

[0120] 酶活测定结果显示,三株里氏木霉工程菌(Mut-1, Mut-2 和 Mut-3) 的发酵上清液酶活分别为 387U/mL,401U/mL,431U/mL。

[0121] (1) 最适 pH 分析:

[0122] 分别用 pH 值为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的缓冲液稀释上述发酵上清液,并在 40 $^{\circ}$ C 条件下测定其酶活,以最高酶活为 100%,计算相对酶活,做 pH- 相对酶活曲线。结果显示:与突变前的脂肪酶 Lip-1 相比,上述三个脂肪酶突变体 Mut-1, Mut-2 和 Mut-3 的最适作用 pH 值没有改变,最适 pH 均为 6.5。

[0123] (2) 最适温度分析:

[0124] 分别在 20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C, pH7.5 条件下测定上述发酵上清液的酶活,以最高酶活为 100%,计算相对酶活,做温度- 相对酶活曲线。结果显示:与突变前的脂肪酶 Lip-1 相比,上述三个脂肪酶突变体 Mut-1, Mut-2 和 Mut-3 的最适作用温度没有改变,最适作用温度均为 40 $^{\circ}$ C。

[0125] 上述实验结果表明,与突变前的脂肪酶 Lip-1 相比,本发明获得的脂肪酶突变体

的最适作用 pH 和作用温度并未发生显著变化,说明突变并未引起脂肪酶 Lip-1 原有酶学性质的改变。

[0126] 实施例 10 体外酶解的实验

[0127] (1) 胃液、胃蛋白酶耐受性:

[0128] 用 pH5.5 的缓冲液稀释上述发酵上清液(Lip-1, Mut-1, Mut-2, Mut-3)至适当的酶活,调节 pH 至 2.0 后取上述发酵上清液各 8ml,分别加入到 2ml 胃液、胃蛋白酶(5%)中,37℃处理 2h 后分别测定所述上清液的酶活,以未处理的上清液的酶活为 100%,计算残余酶活。具体结果如表 1 所述。

[0129] 表 1 胃液和胃蛋白酶处理后脂肪酶的残余酶活

[0130]

样品	胃液处理后残余酶活	胃蛋白酶处理后残余酶活
突变前的脂肪酶 Lip-1	47.9%	65.2%
突变体 Mut-1	48.7%	66.9%
突变体 Mut-2	50.2%	67.0%
突变体 Mut-3	51.1%	66.4%

[0131] 从表 1 的数据可知,与突变前的脂肪酶 Lip-1 相比,本发明获得的三个脂肪酶突变体(Mut-1, Mut-2, Mut-3)对胃液和胃蛋白酶的耐受性未发生显著变化。

[0132] (2) pH6.8、胰蛋白酶耐受性

[0133] 用 pH5.5 的缓冲液稀释发酵上清液至适当酶活,调节 pH6.8 后,分别用 pH6.8 的缓冲液(人工肠液)和胰蛋白酶稀释 5 倍,37℃处理 6h 后分别测定所述上清液的酶活,以未处理的上清液的酶活为 100%,计算残余酶活。具体结果如表 2 所述。

[0134] 表 2 pH6.8 缓冲液和胰蛋白酶处理后脂肪酶的残余酶活

[0135]

样品	pH6.8 缓冲液处理后残余酶活	胰蛋白酶处理后残余酶活
突变前的脂肪酶 Lip-1	52.6%	17.71%
突变体 Mut-1	61.9%	52.35%
突变体 Mut-2	62.0%	54.01%
突变体 Mut-3	68.0%	71.14%

[0136] 从表 2 的数据可知,与突变前的脂肪酶 Lip-1 相比,本发明获得的三个脂肪酶突变体对 pH6.8 缓冲液和胰蛋白酶的耐受性均得到显著提高;胰蛋白酶处理后突变体 Mut-1、Mut-2、Mut-3 的残余酶活比突变前的脂肪酶 Lip-1 分别提高了 34.64%,36.30% 和 53.43%,因此所述脂肪酶突变体更适合于在饲料领域的应用。

[0137] 实施例 11 脂肪酶 Lip-1 及其突变体对肉鸡生产性能的影响

[0138] 1. 材料与方法

[0139] 1.1 试验动物与分组

[0140] 六和种鸡场提供的罗斯肉雏鸡 600 只,随机分为 6 个处理,每个处理 10 个重复,每个重复 10 只肉鸡。具体分组设计见表 3。

[0141] 表 3 试验分组设计

[0142]

组别	处理说明	样品添加
正对照组	正常商品料	0
负对照组	-75Kcal/kg (鸡鸭油)	0
试验组 1	-75Kcal/kg (鸡鸭油)	250g/t 脂肪酶 Lip-1 (20000U/g)
试验组 2	-75Kcal/kg (鸡鸭油)	250g/t 突变体 Mut-1 (20000U/g)
试验组 3	-75Kcal/kg (鸡鸭油)	250g/t 突变体 Mut-2 (20000U/g)
试验组 4	-75Kcal/kg (鸡鸭油)	250g/t 突变体 Mut-3 (20000U/g)

[0143] 1.2 试验样品

[0144] 本试验选用本发明实施例 4 制备的脂肪酶 Lip-1 和实施例 9 制备的脂肪酶突变体 Mut-1、Mut-2 和 Mut-3。

[0145] 1.3 测定指标

[0146] 分别在肉鸡 0d、7d、21d、35 日龄时,对各栏试验鸡统一进行称重并记录采食量,计算日增重(ADG)、日采食量(ADFI)、料肉比(FCR)和体重(BW)等指标。

[0147] 1.4 数据处理与分析

[0148] 试验数据采用 SPSS13.0 统计软件中 ANOVA 方法进行分析,所有指标以每一个重复为试验单位,用 Duncan's 多重比较进行检验。结果用均值及平均标准差表示, $P < 0.05$  为差异显著。

[0149] 2. 结果与分析

[0150] 本发明的脂肪酶 Lip-1 及其突变体对 0-35 日龄肉鸡生产性能影响

[0151] 表 4 脂肪酶对 0-35 日龄肉鸡生产性能的影响

[0152]

组别	初重(g)	末重(g)	日增重(g)	日采食量(g)	料肉比
正对照组	43.1±0.64	2164.6±141.8	60.6±4.0	102.6±8.1	1.69±0.05
负对照组	43.0±0.38	2144.1±122.4	60.0±3.5	102.9±4.9	1.71±0.04
试验组 1	43.3±0.59	2208.1±152.3	61.9±4.3	104.1±6.6	1.69±0.06
试验组 2	43.1±0.34	2214.2±132.4	62.9±3.9	105.1±5.2	1.66±0.04
试验组 3	43.0±0.48	2221.4±129.7	62.8±4.1	105.4±8.3	1.65±0.03
试验组 4	43.2±0.57	2232.7±146.3	64.45±3.7	104.5±5.9	1.62±0.04

[0153] 注:表中数字右上角字母有相同字母或没有标注者表示差异不显著( $P > 0.05$ ),字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )

[0154] 由表 4 肉鸡 0-35d 试验结果可知,全期来看试验组 1-4 肉鸡日增重均高于正对照组,而料肉比均低于正对照组和负对照组;试验组 2-4 肉鸡的生产性能显著高于试验组 1,其中试验组 4 优势最显著:试验组 4 肉鸡日增重在正对照组基础上分别提高了 3.8g,在负对照组基础上提高了 4.45g,料肉比在负对照组基础上降低了 0.09,比试验组 2 和 3 生产性能均有显著性提高( $P < 0.05$ ),总之,试验组 4 全期的增重和料肉比均优于其它各组。

[0155] 上述试验结果表明,从肉鸡养殖全期来看,本发明提供的脂肪酶 Lip-1 和三个脂肪酶突变体均能提高饲料中油脂类物质的利用率,提高肉鸡的采食量和日增重,降低料肉

比,提高肉鸡的生产性能,而所述脂肪酶突变体与突变前的脂肪酶 Lip-1 相比,性能更优,其中突变体 Mut-3 的效果最好。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 青岛蔚蓝生物集团有限公司

&lt;120&gt; 一种脂肪酶及其突变体

&lt;130&gt;

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 297

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; seq 1

&lt;400&gt; 1

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Ala Val Arg Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr  
 35 40 45

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala  
 50 55 60

Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu  
 65 70 75 80

Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala  
 85 90 95

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr  
 100 105 110

Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp  
 115 120 125

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp  
 130 135 140

Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser  
 145 150 155 160

[0002]

Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly  
 165 170 175

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser  
 180 185 190

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu  
 195 200 205

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr  
 210 215 220

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe  
 225 230 235 240

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser  
 245 250 255

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala  
 260 265 270

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala His Leu Trp Tyr  
 275 280 285

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu  
 290 295

<210> 2

<211> 891

<212> DNA

<213> 2

<400> 2

atgttctctg gacggtttgg agtgcctctg acagcgettg ctgegetggg tgetgcecg 60  
 ceggeaccge ttgetgtgeg gagtgtctcg acttccactg tggatgagtt geaattgttc 120  
 gegeaatggt ctgegcage ttattgctcg aataatateg actcgaaaga ctcaactg 180  
 acatgcacgg ccaagcctg tccatcagtc gaggaggcca gtaccacaat gctgctggag 240  
 ttgacctga cgaacgactt tggaggcaca gccggtttec tggcegcgga caacaccaac 300  
 aageggctcg tggtcgectt ceggggaage agcagcattg agaactggat tgctaatett 360  
 gacttcatcc tggaagataa cgaegacctc tgaecggct gcaaggcca tactggttcc 420  
 tggaaagcat gggagtcgcg tgcgcagcaa ctgaecagca agatcaagtc tgcgatgagc 480

[0003]

acgtattcgg gctataacct ataactcacc gggcacagtt tgggceggce attggetacg 540  
 ctgggagcga cagttttgeg aaatgacggg tatagcgttg agctgtacac ctatggatgt 600  
 cctcgaateg gaaactatgc gctggctgag catatcacca gtcagggate tggggccaac 660  
 ttcegtgta cacaactgaa cgacatcgtc ccegggtgc cacccatgga ctttgatte 720  
 agtcagecaa gtccggaata ctggatcacc agtggcaatg gagecagtgt cacggcgtcg 780  
 gatattgaag tcategaggg aatcaattca acggcgggaa atgcaggega agcaacggtg 840  
 agcgttttgg ctcacttgtg gtacttttc gegatttccg agtgctget a 891

<210> 3  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> seq 3  
 <400> 3

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Asp Val Arg Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr  
 35 40 45

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Asp Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala  
 50 55 60

Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu  
 65 70 75 80

Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala  
 85 90 95

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr  
 100 105 110

Ile Glu Asn Trp Val Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp  
 115 120 125

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp  
 130 135 140

[0004]



Glu Ser Ala Ala Asp Asp Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser	145	150	155	160
Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly	165	170	175	
Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser	180	185	190	
Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu	195	200	205	
Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr	210	215	220	
His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe	225	230	235	240
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Gly Ala Ser	245	250	255	
Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala	260	265	270	
Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala His Leu Trp Tyr	275	280	285	
Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu	290	295		
<210>	4			
<211>	894			
<212>	DNA			
<213>	seq 4			
<400>	4			
atgttctctg gacggfittg agtgcitttg acggcgctcg ctgcgctggg tgctgccg				60
ccggeaccgc ttgatgtgeg gactgtctcg acttccaegt tggatgagtt gcaattgttc				120
ggcaatggt ctgccgcagc ttattgctcg aataatateg acteggatga ctccaacttg				180
acatgcaegg ccaacgctg tccatcagtc gaggaggcca gtaccaecat getgtggag				240
ttegacctga cgaacgactt tggaggcaeg gceggtttcc tagccgcgga caacaccaac				300
aageggctcg tggtegcctt ceggggaage agcacaattg agaattgggt cgtaattt				360

[0005]

gacttcaccc tggagataa cgaagacctc tgcaccggct gcaaggtcca tactggtttc 420  
 tggaaaggcgt gggaatccgc tgcgcacgat ctgacgagca agatcaagtc cgcgatgagc 480  
 acgtattcgg gctataacct atacttcaacc gggcacagtt tgggcggcgc attggetacg 540  
 ctgggagcga cggttttgag aatgacggg tatagegttg agctgtacac ctatggatgt 600  
 cctegaatcg gaaactatgc getggccgaa catatcacca gtcagggate tggggccaac 660  
 ttccgtgita cacactttaa cgacategtc ccccgggtgc caccatgga ctttgatc 720  
 agtcagccaa gtccggaata ctggatcacc agtggcactg gagccagtgt caccggctcg 780  
 gatattgaag tcategaggg aatcaattcg accgggggca atgcaggega agcaacggtg 840  
 agcgttttgg ctcacttgtg gtacttttc gcaattcag agtgtctgct atag 894

<210> 5  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> seq 5  
 <400> 5

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Ala Val Arg Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr  
 35 40 45

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala  
 50 55 60

Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu  
 65 70 75 80

Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala  
 85 90 95

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr  
 100 105 110

Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp  
 115 120 125

[0006]

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Ile Ala Trp 130 135 140	
Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser 145 150 155	160
Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly 165 170 175	
Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser 180 185 190	
Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu 195 200 205	
Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr 210 215 220	
His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe 225 230 235	240
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser 245 250 255	
Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala 260 265 270	
Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala His Leu Trp Tyr 275 280 285	
Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu 290 295	
<210> 6	
<211> 891	
<212> DNA	
<213> seq 6	
<400> 6	
atgttctctg gacggtttgg agtgcctctg acagcgettg ctgcgetggg tgetgccg	60
cggcaaccg ttgetgtgag gaggctctg acttccactg tggatgagtt gcaattgtc	120
gccaatggt ctgcgcgacg ttattgctcg aafaatatcg actegaaaga ctccaacttg	180
acatgcacgg ccaacgctg tccatcagtc gaggaggcca gtaccacaat gctgctggag	240

[0007]

ttegacctga cgaacgactt tggaggcaca gccggttcc tggeceggga caacaccaac 300  
 aageggcteg tggtegcctt ceggggaage agcaccattg agaactggat tgtaattctt 360  
 gactteatcc tggagataa cgacgacctc tgcaccgget geaaggcca tactggttc 420  
 tggategeat gggagtcegc tgccgacgaa ctgacgagca agatcaagtc tgcgatgagc 480  
 acgtattcgg gctataacct ataattcacc gggcacagtt tgggeggcgc attggctaeg 540  
 ctgggagcga cagttttgcg aatgacggg tatagegttg agctgtacac ctatggatgt 600  
 cctegaateg gaaactatgc gctggctgag catatcacca gtcagggatc tggggccaac 660  
 ttecggtta cacactgaa cgacatcgtc cccgggtgc caecatgga ctttgatc 720  
 agtcagcaa gtcgggaata ctggatcacc agtggcaatg gagccagtgt caeggcctcg 780  
 gatattgaag tcategaggg aatcaattca acggcgggaa atgcaggega agcaacggtg 840  
 agegtttgg ctcaattgtg gtaacttttc gcatctcag agtgctctgt a 891

<210> 7  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> seq 7

<400> 7

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu  
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Ala Val Arg Ser Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr  
35 40 45

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala  
50 55 60

Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu  
65 70 75 80

Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala  
85 90 95

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr  
100 105 110

[0008]

Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp  
 115 120 125

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp  
 130 135 140

Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Cys Ile Lys Ser Ala Met Ser  
 145 150 155 160

Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly  
 165 170 175

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser  
 180 185 190

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu  
 195 200 205

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr  
 210 215 220

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe  
 225 230 235 240

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser  
 245 250 255

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala  
 260 265 270

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala His Leu Trp Tyr  
 275 280 285

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu  
 290 295

<210> 8  
 <211> 891  
 <212> DNA  
 <213> seq 8

<400> 8  
 atgtctctcg gacggtttgg agtgccttg acageccttg ctgcctggg tgctgcecg 60  
 ccggcaccgc ttgctgtgcg gactgtctcg acttcacgt tggatgagtt gcaattgttc 120

[0009]

gegcaatggt ctgcegcage ttattgetcg aataatateg actcgaaaga ctccaacttg 180  
 acatgcaegg ccaacgectg tccatcagtc gaggaggcca gtaccacaat gctgctggag 240  
 ttcgacctga cgaacgaactt tggaggcaca gccggtttc tggcgegga caacaccaac 300  
 aageggcteg tggfegcett cgggggaage agcagcattg agaactggat tgctaattct 360  
 gactteatec tggaaagataa cgacgaccte tgcaccgget gcaaggteca tactggttc 420  
 tggaaaggeat gggagtcgc tgcgaagaa ctgacgagct gcatcaagtc tgegatgagc 480  
 acgtattcgg gctataacct ataactcacc gggcacagtt tggggeggec attggetacg 540  
 ctgggagcga cagttttgcg aatgacggg tatagcgttg agctgtacac ctatggatgt 600  
 cctegaateg gaaactatgc gctggetgag catacacca gtcagggate tggggccaac 660  
 tteegtgtta cacactgaa cgacatcgtc cccgggtgc caecatgga ctttgatc 720  
 agtcagccaa gtcggaata ctggateacc agtggcaatg gagccagtgt cacggcgtcg 780  
 gatattgaag tcategaggg aatcaattca acggggggaa atgcagcga agcaacggtg 840  
 agegttttg ctcacttctg gtaacttttc gegatttcg agtgcctgt a 891

<210> 9  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> seq 9

<400> 9

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Ala Val Arg Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr  
 35 40 45

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala  
 50 55 60

Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu  
 65 70 75 80

Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala  
 85 90 95

[0010]

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr  
 100 105 110

Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp  
 115 120 125

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp  
 130 135 140

Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile Trp Ser Ala Met Ser  
 145 150 155 160

Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly  
 165 170 175

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser  
 180 185 190

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu  
 195 200 205

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr  
 210 215 220

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe  
 225 230 235 240

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser  
 245 250 255

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala  
 260 265 270

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala His Leu Trp Tyr  
 275 280 285

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu  
 290 295

<210> 10  
 <211> 891  
 <212> DNA  
 <213> seq 10

[0011]

<400> 10	
atgtctcttg gaeggttfgg agtgctcttg acageccttg ctgcctggg tgetgcegg	60
ccggcaccgc ttgetgtgag gagggtctg acttccactg tggatgagtt gcaattgtc	120
ggcaatggg ctgcegcagc ttattgctg aataatctg actegaaaga ctccaactg	180
acatgcaegg ccaacgctg tccatcagc gaggaggcca gtaccacaat gctgctggag	240
ttgacctga cgaacgactt tggaggcaca gceggttcc tggcgcgga caacaccaac	300
aagcggctg tggtegett cgggggaagc agcagcttg agaactggat tgctaatct	360
gactteatec tggagataa cgaacacctc tgcaccgct gcaaggcca tactggttc	420
tggaggcat gggagtcgc tgcgacgaa ctgacgagca agatctggc tgcgatgagc	480
acgtattcgg gctataacct ataactcacc gggcacagtt tggcgccgc attgctacg	540
ctgggagcga cagttttgag aatgacggg tatagcgtg agctgtacac ctatggatg	600
cctcgaatcg gaaactatg gctggctgag catacaca gtcagggatc tggggccaac	660
ttcgtgtta cacactgaa cgacatgct cccgggtgc caccatgga cttggattc	720
agtcagcaa gtcggaata ctggatcacc agtggcaatg gagccagtgt cacggcgtg	780
gatattgaag tcatcgaggg aatcaatca acggcgggaa atgcaggcga agcaacggg	840
agegttttg ctaactgtg gtacttttc gcatctccg agtgctctg a	891



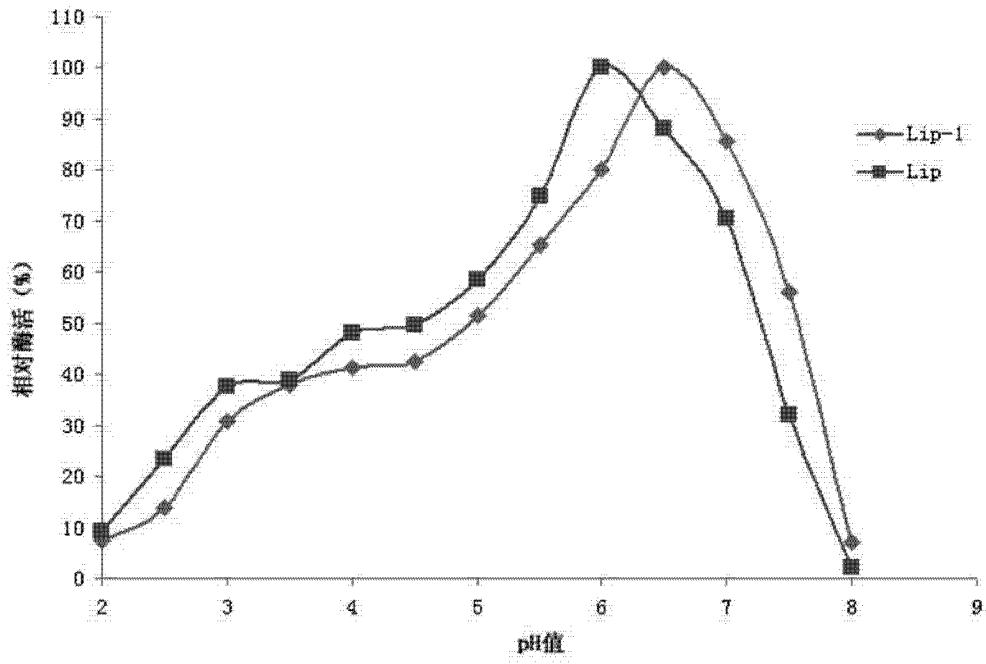


图 1

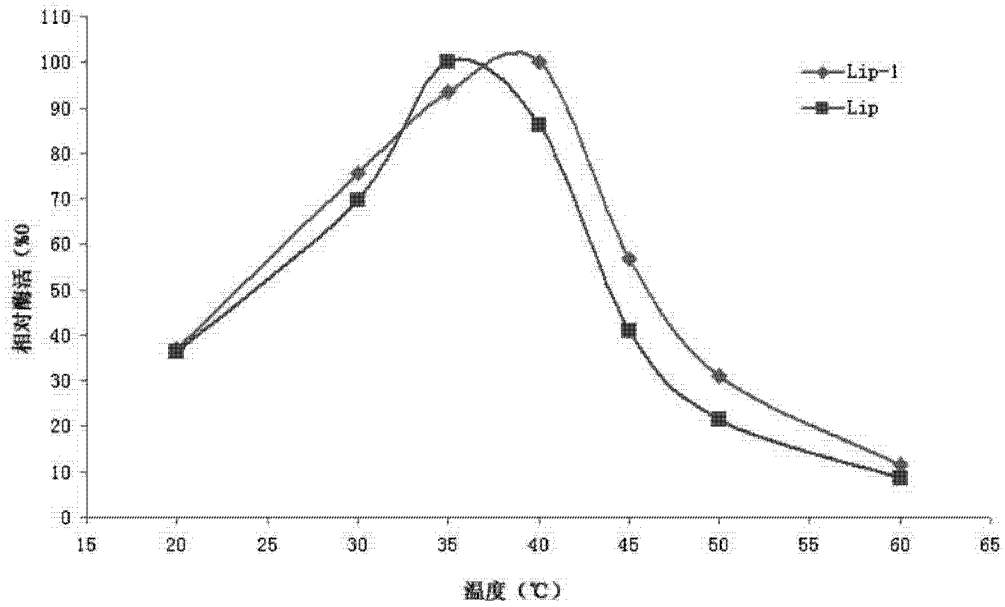


图 2