



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104387456 A

(43) 申请公布日 2015.03.04

(21) 申请号 201410677417.1

C12N 5/10(2006.01)

(22) 申请日 2014.11.21

C12P 17/10(2006.01)

(71) 申请人 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12 号中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

(72) 发明人 张瑞福 邵佳慧 张楠

(74) 专利代理机构 北京红凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

权利要求书4页 说明书11页
序列表7页 附图1页

(54) 发明名称

生物合成吡啶-3-乙酸的成套蛋白质及其应用

(57) 摘要

本发明公开了生物合成吡啶-3-乙酸的成套蛋白质及其应用。用于生物合成吡啶-3-乙酸的成套蛋白质由吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 组成。用于生物合成吡啶-3-乙酸的成套基因,由吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 组成。将上述成套基因导入解淀粉芽孢杆菌 SQR9 构建的重组解淀粉芽孢杆菌菌株 SQR9-E、将上述成套基因导入枯草芽孢杆菌 168 构建的重组枯草芽孢杆菌菌株 168-E 的吡啶-3-乙酸的产量均高于受体菌株。本发明可以有效提高重组菌株中吡啶-3-乙酸的产量。

1. 用于制备吡啶-3-乙酸的成套蛋白质,所述成套蛋白质由吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 组成;

所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A 为下述 A1) 或 A2) 的蛋白质:

A1) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 3 所示的蛋白质;

A2) 在 A1) 的蛋白质的氨基酸序列中经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由 A1) 衍生的蛋白质;

所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 为下述 B1) 或 B2) 的蛋白质:

B1) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 4 所示的蛋白质;

B2) 在 B1) 的蛋白质的氨基酸序列中经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由 B1) 衍生的蛋白质;

所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 为下述 C1) 或 C2) 的蛋白质:

C1) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 5 所示的蛋白质;

C2) 在 C1) 的蛋白质的氨基酸序列中经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由 C1) 衍生的蛋白质。

2. 用于制备吡啶-3-乙酸的成套基因,所述成套基因由吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 组成;

所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 编码权利要求 1 所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A;

所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 编码权利要求 1 所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B;

所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 编码权利要求 1 所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C。

3. 根据权利要求 2 所述的成套基因,其特征在于:所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 为如下 A11) 或 A12) 或 A13) 所示的核酸分子:

A11) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 1-1164 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子;

A12) 与 A11) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

A13) 在严格条件下与 A11) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 为如下 B11) 或 B12) 或 B13) 所示的核酸分子:

B11) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 1165-2586 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子;

B12) 与 B11) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

B13) 在严格条件下与 B11) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 为如下 C11) 或 C12) 或 C13) 所示的核酸分子:

C11) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 2587-4074 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子;

C12) 与 C11) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

C13) 在严格条件下与 C11) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关

蛋白 C 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子。

4. 用于制备吡哆-3- 乙酸的成套基因的相关遗传材料,为下述 1) 至 8) 中的任一种 ; 所述成套基因由权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1、权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 组成 ;

1) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1、权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 的表达盒 ;

2) 用于制备吡哆-3- 乙酸的表达盒组合物,为 21) 或 22) :

21) 由 21a)、21b) 和 21c) 组成的表达盒组合物 :

21a) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 的表达盒 ;

21b) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 的表达盒 ;

21c) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 的表达盒 ;

22) 由 22a)、22b) 和 22c) 组成的表达盒组合物 :

22a) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 的表达盒 ;

22b) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 的表达盒 ;

22c) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 的表达盒 ;

3) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1、权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 的重组表达载体 ;

4) 用于制备吡哆-3- 乙酸的重组载体组合物,为 41) 或 42) :

41) 由 41a)、41b) 和 41c) 组成的重组载体组合物 :

41a) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3 的重组载体 ;

41b) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 2 不含权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡哆-3- 乙酸合成相关基因 3

的重组载体；

41c) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 不含权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 的重组载体；

42) 由 42a)、42b) 和 42c) 组成的重组载体组合物；

42a) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 不含权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的重组载体；

42b) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 不含权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 的重组载体；

42c) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 不含权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 的重组载体；

5) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的重组微生物；

6) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的转基因植物细胞系；

7) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的转基因植物组织；

8) 含有权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和权利要求 2 或 3 中所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的转基因植物器官。

5. 用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA, 由吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 连接而成；所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 编码权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质。

6. 根据权利要求 5 所述的用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA, 其特征在于：所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 为如下 D1) 或 D2) 或 D3) 所示的核酸分子：

D1) 其核苷酸序列是 SEQ ID No. 1 的 DNA 分子或 cDNA 分子；

D2) 与 D1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性, 且编码权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子；

D3) 在严格条件下与 D1) 限定的核苷酸序列杂交, 且编码权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和权利要求 1 所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子。

7. 权利要求 5 或 6 所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的相关遗传材料,为 E1)-E6) 中任一种:

E1) 含有权利要求 5 或 6 所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的表达盒;

E2) 含有权利要求 5 或 6 所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的重组载体、或含有 E1) 所述表达盒的重组载体;

E3) 含有权利要求 5 或 6 所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的重组微生物、或含有 E1) 所述表达盒的重组微生物、或含有 E2) 所述重组载体的重组微生物;

E4) 含有权利要求 5 或 6 所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的转基因植物细胞系、或含有 E1) 所述表达盒的转基因植物细胞系、或含有 E2) 所述重组载体的转基因植物细胞系;

E5) 含有权利要求 5 或 6 所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的转基因植物组织、或含有 E1) 所述表达盒的转基因植物组织、或含有 E2) 所述重组载体的转基因植物组织;

E6) 含有权利要求 5 或 6 所述用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的转基因植物器官、或含有 E1) 所述表达盒的转基因植物器官、或含有 E2) 所述重组载体的转基因植物器官。

8. 下述 I - V 中任一种应用:

I、权利要求 1 所述的成套蛋白质在制备吡啶-3-乙酸中的应用;

II、权利要求 2 或 3 所述的成套基因在制备吡啶-3-乙酸中的应用;

III、权利要求 4 所述的成套基因的相关遗传材料在制备吡啶-3-乙酸中的应用;

IV、权利要求 5 或 6 所述的用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 在制备吡啶-3-乙酸中的应用;

V、权利要求 7 所述的用于制备吡啶-3-乙酸的 DNA 的相关遗传材料在制备吡啶-3-乙酸中的应用。

生物合成吲哚-3-乙酸的成套蛋白质及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域中生物合成吲哚-3-乙酸的成套蛋白质及其应用。

背景技术

[0002] 吲哚-3-乙酸 (Indole-3-acetic acid, 简称 IAA) 是一类含有一个不饱和芳香族环和一个乙酸侧链的内源激素, 属吲哚类化合物, 又名茁长素、生长素、异生长素。现已证实, 吲哚-3-乙酸存在于细菌、真菌、藻类和许多高等植物中。在高等植物中, 它主要存在于生长旺盛的部位, 如胚芽鞘、根尖、受精后的子房和幼嫩的种子等。虽然在植物体内含量甚微, 但参与了许多生理生化过程的调节与控制, 具有十分广泛的生理作用。从细胞水平看, 它可以影响细胞的伸长、分裂和分化; 从器官水平看, 它可以影响营养器官和生殖器官的生长、成熟和衰老。吲哚-3-乙酸的基本作用在于调节植物的生长, 不仅能促进生长, 而且具有抑制生长和器官建成的作用。吲哚-3-乙酸在农业生产领域具有广泛的用途, 它能促进植物生根, 提高农作物产量; 用于木本和草本植物的扦插 (插枝) 生根, 以加速根的形成和提高植株生根的百分率。

[0003] 微生物具有体积小、结构简单、生长繁殖快、代谢旺盛等特征, 如能得到高效合成吲哚-3-乙酸的微生物, 将为吲哚-3-乙酸的生产提供新的途径。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是如何利用微生物合成吲哚-3-乙酸。

[0005] 为解决上述技术问题, 本发明首先提供了用于生物合成吲哚-3-乙酸的成套蛋白质 (用于生物合成吲哚-3-乙酸的蛋白组合物)。

[0006] 本发明所提供的用于生物合成吲哚-3-乙酸的成套蛋白质 (用于生物合成吲哚-3-乙酸的蛋白组合物), 由吲哚-3-乙酸合成相关蛋白 A、吲哚-3-乙酸合成相关蛋白 B 和吲哚-3-乙酸合成相关蛋白 C 组成;

[0007] 所述吲哚-3-乙酸合成相关蛋白 A 为下述 A1) 或 A2) 的蛋白质:

[0008] A1) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 3 所示的蛋白质;

[0009] A2) 在 A1) 的蛋白质的氨基酸序列中经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由 A1) 衍生的蛋白质;

[0010] 所述吲哚-3-乙酸合成相关蛋白 B 为下述 B1) 或 B2) 的蛋白质:

[0011] B1) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 4 所示的蛋白质;

[0012] B2) 在 B1) 的蛋白质的氨基酸序列中经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由 B1) 衍生的蛋白质;

[0013] 所述吲哚-3-乙酸合成相关蛋白 C 为下述 C1) 或 C2) 的蛋白质:

[0014] C1) 氨基酸序列如 SEQ ID No. 5 所示的蛋白质;

[0015] C2) 在 C1) 的蛋白质的氨基酸序列中经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由 C1) 衍生的蛋白质。

[0016] 上述成套蛋白质中,所述成套蛋白质中各种蛋白质分别独立包装。

[0017] 为解决上述技术问题,本发明还提供了用于生物合成吡啶-3-乙酸的成套基因(用于生物合成吡啶-3-乙酸的基因组合物)。

[0018] 本发明所提供的用于生物合成吡啶-3-乙酸的成套基因,所述成套基因由吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 组成;

[0019] 所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A;

[0020] 所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B;

[0021] 所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C。

[0022] 所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 为如下 A11) 或 A12) 或 A13) 所示的核酸分子:

[0023] A11) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 1-1164 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子;

[0024] A12) 与 A11) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

[0025] A13) 在严格条件下与 A11) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

[0026] 所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 为如下 B11) 或 B12) 或 B13) 所示的核酸分子:

[0027] B11) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 1165-2586 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子;

[0028] B12) 与 B11) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

[0029] B13) 在严格条件下与 B11) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

[0030] 所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 为如下 C11) 或 C12) 或 C13) 所示的核酸分子:

[0031] C11) 其编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 2587-4074 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子;

[0032] C12) 与 C11) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

[0033] C13) 在严格条件下与 C11) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子。

[0034] 上述成套基因中,所述成套基因中各基因独立包装。

[0035] 上述成套基因中,本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法,例如定向进化和点突变的方法,对本发明的吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 或吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 或吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的,与本发明分离得到的吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 的核苷酸序列具有 75% 或者更高同一性且编码所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A,或与吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 的核苷酸序列具有 75% 或者更高同一性且编码所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B,或与吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的核苷酸序列具有 75% 或者更高同一性且编码所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C,均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

[0036] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的 SEQ ID No. 1 的第 1-1164 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子具有 75% 或更高, 或 85% 或更高, 或 90% 或更高, 或 95% 或更高同一性的核苷酸序列; 与本发明的 SEQ ID No. 1 的第 1165-2586 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子具有 75% 或更高, 或 85% 或更高, 或 90% 或更高, 或 95% 或更高同一性的核苷酸序列; 与本发明的 SEQ ID No. 1 的第 2587-4074 位核苷酸所示的 DNA 分子或 cDNA 分子具有 75% 或更高, 或 85% 或更高, 或 90% 或更高, 或 95% 或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件, 两个或多个序列之间的同一性可以用百分比 (%) 表示, 其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0037] 上述成套基因中, 所述严格条件是在 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 5min, 又于 $0.5\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 的溶液中, 在 68°C 下杂交并洗膜 2 次, 每次 15min。

[0038] 上述 75% 或 75% 以上同一性, 可为 80%、85%、90% 或 95% 以上的同一性。

[0039] 为解决上述技术问题, 本发明还提供了与用于生物合成吡咯-3-乙酸的成套基因相关的遗传材料。

[0040] 本发明所提供的与用于生物合成吡咯-3-乙酸的成套基因相关的遗传材料, 为下述 1) 至 8) 中的任一种; 所述成套基因由所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 组成;

[0041] 1) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 的表达盒;

[0042] 2) 用于生物合成吡咯-3-乙酸的表达盒组合物, 为 21) 或 22);

[0043] 21) 由 21a)、21b) 和 21c) 组成的表达盒组合物;

[0044] 21a) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1 不含所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 的表达盒;

[0045] 21b) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 不含所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 的表达盒;

[0046] 21c) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 不含所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 的表达盒;

[0047] 22) 由 22a)、22b) 和 22c) 组成的表达盒组合物;

[0048] 22a) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 不含所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 的表达盒;

[0049] 22b) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 不含所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 的表达盒;

[0050] 22c) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 不含所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1 的表达盒;

[0051] 3) 含有所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡咯-3-乙酸合成相关基因 3 的重组载体;

[0052] 4) 用于生物合成吡咯-3-乙酸的重组载体组合物, 为 41) 或 42);

[0053] 41) 由 41a)、41b) 和 41c) 组成的重组载体组合物;

[0054] 41a) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 不含所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的重组载体；

[0055] 41b) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 不含所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的重组载体；

[0056] 41c) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 不含所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 的重组载体；

[0057] 42) 由 42a)、42b) 和 42c) 组成的重组载体组合物；

[0058] 42a) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 不含所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的重组载体；

[0059] 42b) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 不含所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 的重组载体；

[0060] 42c) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 不含所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1 的重组载体；

[0061] 5) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的重组微生物；

[0062] 6) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的转基因植物细胞系；

[0063] 7) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的转基因植物组织；

[0064] 8) 含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的转基因植物器官。

[0065] 上述与所述吡啶-3-乙酸合成相关的成套基因相关的遗传材料中,所述表达盒是指能够在宿主细胞中表达相应蛋白质的 DNA,该 DNA 不但可包括启动相关基因转录的启动子,还可包括终止相关基因转录的终止子,如 1) 所述含有所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 的表达盒是指能够在宿主细胞中表达所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 的 DNA,该 DNA 的启动子可为 P43 启动子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。

[0066] 可用现有的载体构建含有上述表达盒的重组载体。上述与所述吡啶-3-乙酸合成相关的成套基因的相关遗传材料中,所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。上述与所述吡啶-3-乙酸合成相关的成套基因的相关遗传材料中,3) 所述重组载体可含有 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA;进一步 3) 所述重组载体具体可为 pUBC19-P43-E;所述 pUBC19-P43-E 为将 pUBC19-P43 载体的 KpnI 和 PstI 识别位点间的序列替换为 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列,保持其它序列不变,得到表达 SEQ ID No. 3 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、SEQ ID No. 4 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和 SEQ ID No. 5 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质的重组载体。

[0067] 上述与所述吡啶-3-乙酸合成相关的成套基因的相关遗传材料中,5) 所述的微生物可为细菌、酵母、藻或真菌。所述细菌可为革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。所述

革兰氏阳性细菌可为芽孢杆菌属细菌。所述革兰氏阴性细菌可为埃希氏菌属细菌。进一步所述芽孢杆菌属细菌为解淀粉芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌。所述埃希氏菌属细菌可为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。所述解淀粉芽孢杆菌可为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) SQR9、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 和所述大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 可为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21。

[0068] 上述与所述吡啶-3-乙酸合成相关的成套基因的相关遗传材料中,所述遗传材料不包括繁殖材料。

[0069] 为解决上述技术问题,本发明还提供了用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA。

[0070] 本发明所提供的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA,由吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 连接而成;所述用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质。

[0071] 所述用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 为如下 D1) 或 D2) 或 D3) 所示的核酸分子:

[0072] D1) 其核苷酸序列是 SEQ ID No. 1 的 DNA 分子或 cDNA 分子

[0073] D2) 与 D1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性,且编码所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子;

[0074] D3) 在严格条件下与 D1) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和所述的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质的 cDNA 分子或基因组 DNA 分子。

[0075] 上述用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA,本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法,例如定向进化和点突变的方法,对本发明的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的,与本发明分离得到的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列具有 75% 或者更高同一性且编码所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和所述吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质,均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

[0076] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的 SEQ ID No. 1 具有 75% 或更高,或 85% 或更高,或 90% 或更高,或 95% 或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0077] 上文中,所述严格条件是在 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 的溶液中,在 68°C 下杂交并洗膜 2 次,每次 5min,又于 $0.5\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 的溶液中,在 68°C 下杂交并洗膜 2 次,每次 15min。

[0078] 上述 75% 或 75% 以上同一性,可为 80%、85%、90% 或 95% 以上的同一性。

[0079] 本发明所提供的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 相关的遗传材料,为 E1)–E6) 中任一种:

[0080] E1) 含有所述用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的表达盒;

[0081] E2) 含有所述用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的重组载体、或含有 E1) 所述表达盒的重组载体;

[0082] E3) 含有所述用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 的重组微生物、或含有 E1) 所述表达盒的重组微生物、或含有 E2) 所述重组载体的重组微生物；

[0083] E4) 含有所述用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 的转基因植物细胞系、或含有 E1) 所述表达盒的转基因植物细胞系、或含有 E2) 所述重组载体的转基因植物细胞系；

[0084] E5) 含有所述用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 的转基因植物组织、或含有 E1) 所述表达盒的转基因植物组织、或含有 E2) 所述重组载体的转基因植物组织；

[0085] E6) 含有所述用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 的转基因植物器官、或含有 E1) 所述表达盒的转基因植物器官、或含有 E2) 所述重组载体的转基因植物器官。

[0086] 所述用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 相关的遗传材料中，E1) 所述用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 的表达盒是指能够在宿主细胞中表达所述吡哆-3-乙酸合成相关蛋白 A 和所述吡哆-3-乙酸合成相关蛋白 B 和所述吡哆-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质的 DNA，该 DNA 不但可包括启动所述吡哆-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡哆-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡哆-3-乙酸合成相关基因 3 转录的启动子，还可包括终止所述吡哆-3-乙酸合成相关基因 1、所述吡哆-3-乙酸合成相关基因 2 和所述吡哆-3-乙酸合成相关基因 3 转录的终止子。进一步，所述表达盒还可包括增强子序列。具体的，所述启动子可为 P43 启动子。

[0087] 可用现有的载体构建含有用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 表达盒的重组载体。上述与用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 相关遗传材料中，所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。所述重组载体的构建方法具体可为将 pUBC19-P43 载体的 KpnI 和 PstI 识别位点间的序列替换为 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列，保持其它序列不变，得到表达 SEQ ID No. 3 所示的吡哆-3-乙酸合成相关蛋白 A、SEQ ID No. 4 所示的吡哆-3-乙酸合成相关蛋白 B 和 SEQ ID No. 5 所示的吡哆-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质的重组载体。

[0088] 上述与用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 相关遗传材料中，E3) 所述的微生物可为细菌、酵母、藻或真菌。所述细菌可为革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。所述革兰氏阳性细菌可为芽孢杆菌属细菌。所述革兰氏阴性细菌可为埃希氏菌属细菌。进一步所述芽孢杆菌属细菌为解淀粉芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌。所述埃希氏菌属细菌可为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。所述解淀粉芽孢杆菌可为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) SQR9、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 和所述大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 可为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21。

[0089] 上述与用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 相关遗传材料中，所述遗传材料不包括繁殖材料。

[0090] 为解决上述技术问题，本发明还提供了下述 I - V 中任一种应用：

[0091] I、所述的成套蛋白质在生物合成吡哆-3-乙酸中的应用；

[0092] II、所述的成套基因在生物合成吡哆-3-乙酸中的应用；

[0093] III、所述的成套基因的相关遗传材料在生物合成吡哆-3-乙酸中的应用；

[0094] IV、所述的用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 在生物合成吡哆-3-乙酸中的应用；

[0095] V、所述的用于生物合成吡哆-3-乙酸的 DNA 的相关遗传材料在生物合成吡哆-3-乙酸中的应用。

[0096] 上文中,序列表中SEQ ID No. 1的第1-1164位核苷酸所示的DNA分子(吡啶-3-乙酸合成相关基因1)编码氨基酸序列为序列表中SEQ ID No. 3的蛋白质(吡啶-3-乙酸合成相关蛋白A);序列表中SEQ ID No. 1的第1165-2586位核苷酸所示的DNA分子(吡啶-3-乙酸合成相关基因2)编码氨基酸序列为序列表中SEQ ID No. 4的蛋白质(吡啶-3-乙酸合成相关蛋白B);序列表中SEQ ID No. 1的第2587-4074位核苷酸所示的DNA分子(吡啶-3-乙酸合成相关基因3)编码氨基酸序列为序列表中SEQ ID No. 5的蛋白质(吡啶-3-乙酸合成相关蛋白C);序列表中SEQ ID No. 1所示的DNA分子(由吡啶-3-乙酸合成相关基因1、吡啶-3-乙酸合成相关基因2和吡啶-3-乙酸合成相关基因3连接而成)编码氨基酸序列为序列表中SEQ ID No. 3的蛋白质(吡啶-3-乙酸合成相关蛋白A)、序列表中SEQ ID No. 4的蛋白质(吡啶-3-乙酸合成相关蛋白B)和序列表中SEQ ID No. 5的蛋白质(吡啶-3-乙酸合成相关蛋白C)这三种蛋白质。

[0097] 实验证明,将本申请的成套基因导入解淀粉芽孢杆菌 SQR9 构建的重组解淀粉芽孢杆菌菌株 SQR9-E、将本申请的成套基因导入枯草芽孢杆菌 168 构建的重组枯草芽孢杆菌菌株 168-E 均能够表达出吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质。SQR9-E 菌株的吡啶-3-乙酸的产量是其受体菌株 SQR9 菌株的 4.2 倍,是空载体对照菌株 SQR9-CK 菌株的 4 倍(SQR9-E 菌株的吡啶-3-乙酸产量为 $42 \pm 2.41\text{mg/L}$ 发酵液, SQR9 菌株的吡啶-3-乙酸产量为 $9.8 \pm 1.31\text{mg/L}$ 发酵液, SQR9-CK 菌株的吡啶-3-乙酸产量为 $10.5 \pm 1.08\text{mg/L}$ 发酵液);168-E 菌株的吡啶-3-乙酸的产量是其受体菌株 168 菌株的 10 倍,是空载体对照菌株 168-CK 菌株的 10 倍(168-E 菌株的吡啶-3-乙酸产量为 $22 \pm 2.32\text{mg/L}$ 发酵液, 168 菌株的吡啶-3-乙酸产量为 $2.2 \pm 0.30\text{mg/L}$ 发酵液, 168-CK 菌株的吡啶-3-乙酸产量为 $2.2 \pm 0.26\text{mg/L}$ 发酵液)。本发明的用于生物合成吡啶-3-乙酸的成套蛋白质及其相关生物材料可以有效提高重组菌株中吡啶-3-乙酸的产量,可广泛应用于农业生产领域。

附图说明

[0098] 图 1 为重组载体 pUBC19-P43-E 示意图。

[0099] 图 2 为重组菌株蛋白差异分析的变性聚丙烯酰胺凝胶。泳道 1 和泳道 8 为蛋白分子量标准 15-170KDa 的 Ladder,泳道 2 为 168-CK 菌株蛋白条带,泳道 3 为 168-E 菌株蛋白条带,泳道 4 为 BL21-CK 菌株蛋白条带,泳道 5 为 BL21-E 菌株蛋白条带,泳道 6 为 SQR9-CK 菌株蛋白条带,泳道 7 为 SQR9-E 菌株蛋白条带。

具体实施方式

[0100] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0101] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0102] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0103] 下述实施例中的解淀粉芽孢杆菌 SQR9 (*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9) (Xu Z, Shao J, Li B, Yan X, Shen Q, Zhang R. 2013. Contribution of Bacil lomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Antifungal Activity and Biofilm Formation.

Appl. Environ. Microbiol. 79:808 - 815.) 公众可从中国农业科学院农业资源与农业区划研究所获得, 该生物材料只为重复本发明的相关实验所用, 不可作为其它用途使用。解淀粉芽孢杆菌 SQR9 (*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9) 在下文中简称 SQR9。

[0104] 下述实施例中的枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* 168) (Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390:249 - 256.) 公众可从中国农业科学院农业资源与农业区划研究所获得, 该生物材料只为重复本发明的相关实验所用, 不可作为其它用途使用。枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* 168) 在下文中简称 168。

[0105] 下述实施例中的 pUBC19 (Zhang X-Z, Cui Z-L, Hong Q, Li S-P. 2005. High-Level Expression and Secretion of Methyl Parathion Hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. Appl. Environ. Microbiol. 71:4101 - 4103.) 公众可从中国农业科学院农业资源与农业区划研究所获得, 该生物材料只为重复本发明的相关实验所用, 不可作为其它用途使用。

[0106] 实施例 1、生物合成吡啶-3-乙酸

[0107] 一、高产吡啶-3-乙酸的重组菌体细胞的制备

[0108] 高产吡啶-3-乙酸的重组菌体细胞的构建方法, 包括向受体细胞中导入用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA, 得到产吡啶-3-乙酸的重组菌体细胞的步骤。其中, 用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA, 由吡啶-3-乙酸合成相关基因 1、吡啶-3-乙酸合成相关基因 2 和吡啶-3-乙酸合成相关基因 3 连接而成; 用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列为序列表中 SEQ ID No. 1。具体方法如下:

[0109] 将 pUBC19 载体的 BamHI 和 PstI 识别位点间的序列替换为 SEQ ID No. 2 所示的 P43 启动子的核苷酸序列保持其它序列不变, 得到重组载体 pUBC19-P43。

[0110] 将重组载体 pUBC19-P43 的 KpnI 和 PstI 识别位点间的序列替换为 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列, 保持其它序列不变, 得到重组载体 pUBC19-P43-E (图 1)。pUBC19-P43-E 可表达 SEQ ID No. 3 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、SEQ ID No. 4 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和 SEQ ID No. 5 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质。SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 编码 SEQ ID No. 3 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、SEQ ID No. 4 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和 SEQ ID No. 5 所示的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 这三种蛋白质。SEQ ID No. 1 中, 第 1-1164 位为吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A 的编码序列, 第 1165-2586 位为吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 的编码序列, 第 2587-4074 位为吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 的编码序列。

[0111] 采用化学方法将 pUBC19-P43-E 导入解淀粉芽孢杆菌 SQR9 菌株中, 得到含有 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株, 将该菌株命名为重组解淀粉芽孢杆菌 SQR9-E (下文中简称 SQR9-E 菌株); 将 pUBC19-P43-E 导入枯草芽孢杆菌 168 菌株中, 得到含有 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株, 将该菌株命名为重组枯草芽孢杆菌 168-E (下文中简称 168-E 菌株); 将 pUBC19-P43-E 导入大肠杆菌 BL21 菌株中, 得到含有 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株, 将该菌株命名为重组大肠杆菌 BL21-E (下文

中简称 BL21-E 菌株) ;将 pUBC19-P43 导入解淀粉芽孢杆菌 SQR9 菌株中,得到不含有 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株,将该菌株命名为重组解淀粉芽孢杆菌 SQR9-CK(下文中简称 SQR9-CK 菌株),该菌株是 SQR9-E 的空载体对照菌株;将 pUBC19-P43 导入枯草芽孢杆菌 168 菌株中,得到不含有 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株,将该菌株命名为重组枯草芽孢杆菌 168-CK(下文中简称 168-CK 菌株),该菌株是 168-E 的空载体对照菌株;将 pUBC19-P43 导入大肠杆菌 BL21 菌株中,得到不含有 SEQ ID No. 1 所示的用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株,将该菌株命名为重组大肠杆菌 BL21-CK(下文中简称 BL21-CK 菌株),该菌株是 BL21-CK 的空载体对照菌株。

[0112] 二、用于生物合成吡啶-3-乙酸的成套蛋白质的提取及分析

[0113] 1、不同处理的菌体细胞收集

[0114] 将步骤一的 BL21-CK、BL21-E、168-CK、168-E、SQR9-CK 和 SQR-E 菌株分别接种于含有 3mL 液体 LB 培养基的试管(卡那霉素的浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$) 中,过夜培养作为种子液,分别得到 BL21-CK、BL21-E、168-CK、168-E、SQR9-CK 和 SQR-E 菌株的种子液。将上述种子液分别以 1% 体积比的接种量接种于 100mL 含 3mM 色氨酸的 Landy 培养基(在 Landy 培养基中加入色氨酸,使色氨酸的含量为 3mM 得到的液体即为含 3mM 色氨酸的 Landy 培养基)中(Landy M, Warren GH, Rosenman M SB, Colio LG. 1948. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic Fungi. Exp. Biol. Med. 67:539-541.), 22°C , 90rpm 避光培养 72 小时后在 4°C , 8000g 离心收集菌体,分别得到 BL21-CK、BL21-E、168-CK、168-E、SQR9-CK 和 SQR-E 菌株的菌体。

[0115] 2、用于生物合成吡啶-3-乙酸的成套蛋白质的提取

[0116] 将收集到的菌体用 0.2M pH 6.8 磷酸缓冲液洗涤, 4°C , 8000g 离心 10min 收集菌体,共进行上述操作三次。将收集到的菌体采用 B-PER[®] Bacteria Protein Extraction Reagent(Thermo Scientific)试剂盒提取菌体蛋白。具体流程如下:离心沉淀的菌体用 10mL B-PER Reagent 重悬,并且加入 $2 \mu\text{L}$ 100mg/mL 溶菌酶;其中 BL21-CK 和 BL21-E 菌体置于室温反应 10-15min,得到 BL21-CK 菌体裂解液和 BL21-E 菌体裂解液;SQR9-CK、SQR9-E、168-CK 和 168-E 菌株置于室温反应 45min,得到 SQR9-CK 菌体裂解液、SQR9-E 菌体裂解液、168-CK 菌体裂解液和 168-E 菌体裂解液,将各裂解液 15000g 离心 5min,所获上清液即为菌株的蛋白粗提液,获得 BL21-CK 蛋白粗提液、BL21-E 蛋白粗提液、SQR9-CK 蛋白粗提液、SQR9-E 蛋白粗提液、168-CK 蛋白粗提液和 168-E 蛋白粗提液。将各菌株的蛋白粗提液置于 -70°C 冰箱中保存。

[0117] 3、BCA 法测定蛋白总量

[0118] 蛋白定量采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国生物技术有限责任公司),具体流程如下:根据标准品和样品的数量,将试剂 A(BCA 碱性溶液)和试剂 B(硫酸铜溶液)以 50:1(V/V) 的比例混合配制 BCA 工作液;将 0、1、2、4、6、8、10 μL 的标准 BSA 蛋白溶液(1mg/mL) 分别加入 96 孔板的不同孔中,并加 ddH_2O 使得每孔的体积为 $10 \mu\text{L}$,每个浓度设置 3 个复孔。分别取 $10 \mu\text{L}$ 稀释的待测蛋白样品加入 96 孔板的不同孔中,每个样品设置 3 个复孔。向 BSA 蛋白标准品孔和待测样品孔中每孔分别加入 $200 \mu\text{L}$ 配置好的 BCA 工作液,充分混匀后于 37°C 反应 30min,反应结束后将 96 孔板冷却至室温,采用酶标仪测定各样品的吸光度

OD₅₆₂。以 BSA 蛋白标准品浓度作为横坐标,吸光度值作为纵坐标制作标准曲线。根据标准曲线,计算各样品的蛋白质含量。

[0119] 4、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0120] SDS-PAGE 凝胶制备:先灌制浓度为 10% 的分离胶,浓度为 10% 的分离胶包含 5.3mL 30% Acr/Bis(29:1) 贮存液、4.0mL 下层缓冲液、0.8mL 10% APS、0.008mL TEMED 和 6.7mL 去离子水,分离胶灌好后置于 37℃ 凝固 30min;待分离胶凝固后灌制浓度为 5% 的浓缩胶,浓度为 5% 的浓缩胶包含 0.75mL 30% Acr/Bis(29:1) 贮存液、1.25mL 上层缓冲液、0.015mL 10% APS、0.005mL TEMED 和 3.0mL 去离子水,浓缩胶灌好后置于室温凝结 15-20min。

[0121] 在电泳槽内加入新鲜配置的 1× 电极缓冲液。根据待测蛋白浓度取适量的待测蛋白样品,加入 10 μL 样品缓冲液混合均匀,然后去离子水补齐至 30 μL,各个样品的蛋白质质量浓度均相同,将样品进行沸水浴 5min,14000rpm 离心 5min 后上样,每个泳道的上样体积均相同。首先采用 80V 的电压使样品先从浓缩胶迁移至分离胶,随后采用 100V 的电压使得样品跑至分离胶底部。

[0122] 凝胶的染色及脱色:电泳结束后,将凝胶从玻璃板上轻轻拨下,放入已加入适量固定液的干净玻璃皿内,固定 30min,固定结束后倒出固定液加入适量考马氏亮蓝 R-250 染色液,震荡染色 1h,然后倒出染色液加入脱色液进行震荡脱色,每隔 10min 更换脱色液,重复脱色洗脱四次,之后加脱色液连续脱色 4-8h,期间更换脱色液 3-4 次,脱色完全后进行扫描拍照。

[0123] 吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A 的分子量为 43KDa,吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 的分子量为 53KDa 和吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 的分子量为 54KDa,图 2 中显示含有用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株 BL21-E、SQR9-E 和 168-E 均能够表达出吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C。相对于不含有用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株,含有用于生物合成吡啶-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株 BL21-E、SQR9-E 和 168-E 表达出的吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 A、吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 B 和吡啶-3-乙酸合成相关蛋白 C 的含量均明显增多,168-E 菌株蛋白条带中在约 43KDa 处明显比 168-CK 菌株增强,而由于菌株在 55KDa 大小的蛋白很多,只能推测 168-E 菌株与 168-CK 菌株相比能更多的表达 55KDa 左右的蛋白;与 BL21-CK 菌株相比,在菌株 BL21-E 蛋白条带中能清晰分辨出在 43KDa、54KDa 和 53KDa 大小处条带增强;在 SQR9-E 菌株蛋白条带中可清晰分辨出在 43KDa、54KDa 和 53KDa 大小处条带比 SQR9-CK 菌株蛋白条带增强。

[0124] 三、吡啶-3-乙酸产量检测

[0125] 将 SQR9 菌株、SQR9-E 菌株、SQR9-CK 菌株、168 菌株、168-E 菌株和 168-CK 菌株分别接种于含有 3mL 液体 LB 培养基的试管(卡那霉素的浓度为 20 μg/mL)中,过夜培养作为种子液,分别得到 SQR9 菌株、SQR9-E 菌株、SQR9-CK 菌株、168 菌株、168-E 菌株和 168-CK 菌株的种子液。将上述种子液分别以 1% 体积比的接种量接种于 100mL 含 3mM 色氨酸的 Landy 培养基(在 Landy 培养基中加入色氨酸,使色氨酸的含量为 3mM 得到的液体即为含 3mM 色氨酸的 Landy 培养基)中,SQR9 菌株、SQR9-E 菌株和 SQR9-CK 菌株的接种量以菌体含量计相同,168 菌株、168-E 菌株和 168-CK 菌株的接种量以菌体含量计相同。在 22℃,90rpm 避

光培养 72 小时,分别得到 SQR9-E 菌株、SQR9-CK 菌株、168-E 菌株和 168-CK 菌株的发酵液。实验设三次重复,每次重复每个菌株均接入 10 个装有 100mL 含 3mM 色氨酸的 Landy 培养基的容积为 500mL 三角瓶在上述条件下进行发酵。

[0126] 分别将各菌株的 100mL 发酵液在 4℃,8000rpm 离心 10min 去除菌体细胞,收集 SQR9 菌株、SQR9-E 菌株、SQR9-CK 菌株、168 菌株、168-E 菌株和 168-CK 菌株的上清液。将各菌株的上清液分别倒入不同的无菌三角瓶中,用 2M HCl 溶液调节各菌株的上清液 pH 值至 2.0,然后加入与上述三角瓶中等体积的乙酸乙酯萃取三次,萃取结束后 8000rpm,4℃离心 10min,将各菌株的乙酸乙酯相 37℃旋转蒸发获得旋转蒸发后的样品。将各菌株的旋转蒸发后的样品分别用 1mL 甲醇溶解,过 0.22 μm 滤膜,放入 -20℃冰箱保存。甲醇溶解的样品采用 HPLC 进行定量分析,HPLC 的分析条件为:采用 Agilent TC-C18 色谱柱,柱温 25℃,流动相为 A(甲醇)和 B(0.1%乙酸)的体积比为 60:40,进样量为 10 μL,流速为 0.4mL/min,紫外吸收波长为 220nm。HPLC 分析中,以吲哚-3-乙酸(Sigma,CAS NO:87-51-4)为标准品,根据标准品的保留时间定性和采用标准曲线法(外标法)进行定量分析。

[0127] 试验所有数据采用 SPSS12.0(SPSS Inc.,USA)统计软件的独立样本 t 检验处理统计。

[0128] 不同菌株的吲哚-3-乙酸产量如表 1,结果表明含有用于生物合成吲哚-3-乙酸的 DNA 的核苷酸序列的重组菌株 SQR9-E 和 168-E 中吲哚-3-乙酸的产量均高于每株相应的受体菌株和空载体对照菌株。SQR9-E 菌株的吲哚-3-乙酸产量是 SQR9 菌株的 4.2 倍,是 SQR9-CK 菌株的 4 倍(SQR9-E 菌株的吲哚-3-乙酸产量为 42 ± 2.41 mg/L 发酵液,SQR9 菌株的吲哚-3-乙酸产量为 9.8 ± 1.31 mg/L 发酵液,SQR9-CK 菌株的吲哚-3-乙酸产量为 10.5 ± 1.08 mg/L 发酵液);168-E 菌株合成吲哚-3-乙酸的产量是 168 菌株的 10 倍,是 168-CK 菌株的 10 倍(168-E 菌株的吲哚-3-乙酸产量为 22 ± 2.32 mg/L 发酵液,168 菌株的吲哚-3-乙酸产量为 2.2 ± 0.30 mg/L 发酵液,168-CK 菌株的吲哚-3-乙酸产量为 2.2 ± 0.26 mg/L 发酵液)。

[0129] 表 1、各菌株的吲哚-3-乙酸产量

[0130]

菌株 \ 吲哚-3-乙酸产量	mg/L 发酵液
SQR9	9.8 ± 1.31^c
SQR9-CK	10.5 ± 1.08^c
SQR9-E	42 ± 2.41^a
168	2.2 ± 0.30^d
168-CK	2.2 ± 0.26^d
168-E	22 ± 2.32^b

[0131] 注:各列数值后面的英文字母表示差异显著程度,相同字母的处理间在 0.05 水平无显著差异,字母不同的处理间在 0.05 水平有显著差异。

[0001]

序 列 表

<110> 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

<120> 生物合成咪唑-3-乙酸的成套蛋白质及其应用

<130> CGGNARLR143182

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4074

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

atgaactttg atettegaga aaacegtctt ggcacacaat cggtgaaatg ggacaaggcg	60
gaagcggttat teggcgatc ggatgcgctt ccgatgtggg ttgccgatat ggatttccgc	120
gtccccgaag eggtaactga cgccttaaaa gcccgcttg accacggcat attcggttat	180
acgtctcctg acgaaaacac aagagaagcc gtcgcttcac ggccttgagac gcggcacggc	240
taccgacccg atcccgcaag catcgcgttc agtcccggtg ttgtcacgga aatcagcatg	300
gccgtacaag cctttaccga accaggcgat ccggtgttga ttcaatcacc ggtgtatacg	360
cctttttatc agatgatcaa ggaaaacaaa cggcaggttt tacataacce attacgggaa	420
gaaaacggcg tctactgcct ggattttgag gatcttgaga aaaaactgag cgattctgag	480
gtcaagctga tgattcttg taatccccac aatccgctcg gcagagcgtg gagecgggat	540
gagcttatga agctcggatc gctgtgcgcc gcccataacg tcaccgtcgt ttctgacgag	600
atacattccg acttgatgat gtacggaaag ccgcatacgc ctctcgttc tctgtctgag	660
gagtttgcgc ggatttccgt tacttgtgtc gcgccgagca agacgtttaa tattgccggc	720
attcaggcat ccgccattat caattccgat cgggtataagc gggcgaaatt ctccgcgcga	780
ttgcatcaga acgggatttc cagcctcaac acatttgcgg ttgcagcaat cgaagcggcc	840
tatacaaagg gaggcccttg gcttgacgcg ctgattcctt acattgaagg gaatatgaaa	900
ttggctgagg actttttaag aaaagaattg ccgaaagtc gcatgatgaa gcctgacgt	960
tctattttga tctggatgga ttccagcgaa tacggatttt cggatgccga gctcaaagaa	1020
agaatgctca aaaaaggga aatcatatta gagccgggaa caaaatacgg accggggcgc	1080
gaaggattta tgagacttaa tgcggctgt tcagccgccg ccgtaaaaga agggcttgag	1140
agaatgaaag cagcgtcgc ttagatggcc taccaggatt ttagggaatt tctcgcgct	1200
cttgaaaaag aagggcagct cttacagtc gacgaagagg tgaaaccgga gccggatctg	1260
ggcgcgcgcg cgcgtgcagc cagcaatctc ggggataaaa cccctgcgt tttgtttaac	1320
aatatittaeg gacatcacca tgcgcaggtg gctctgaatg tcctcggtc gtggccgaat	1380
cacgcgatga tgcctggcat gccgaaagat acgcctgtaa aagaacaatt ctttgagttt	1440
gccaaacggt acgatgcatt tccggtgccg gtcaaaccgg aagaaaccgc gccgtttcat	1500
gaaaatgaaa taacggaaga tatcaatcta ttgacatcc ttccgtatt cagaatcaac	1560
cagggggacg gcgctacta ttggataaaa gcgtgtgtca ttcccgca tottgaagat	1620
ccggacaatt tcggcaagca gaatgtcggc atttacagaa tgcaggtaaa gggaaaagac	1680
cgcctcggca ttcagcccggt gcctcagcat gatattgcga ttcatctteg ccaagctgaa	1740
gaacgcggcg tgaatcttcc cgttacgac gccttggtg gtgagccggt gattacgacg	1800
gttcgctcaa ctccgctgtt atacgatcaa tccgagtag aaatggccgg ccgcatteaa	1860
ggggagccct acagaatcgt caaatctaaa ttgtctgatt tagatatccc ttggggcgct	1920

[0002]

gaagtcgttc	tggaaggaga	gattcttgcg	ggagaacggg	aatacgaagg	accttctggt	1980
gagttcacgg	gccattatlc	cggcggcgc	agcatgccgg	tgatcaaat	caaacgggta	2040
tatcatagaa	acaatccgat	ttttgaacat	ttatacttag	gcatgccgtg	gacggagtgc	2100
gatttatatga	teggcattaa	tacgtgcgtg	ccgctttacc	agcagctcaa	ggaagcttat	2160
ccgaacgaaa	ttgtcgccgt	gaatgcgatg	tatacgcacg	ggctgacgc	cattatttcc	2220
acgaaaacgc	gctacggcgg	atttgccaag	gggtcggea	tgcgcgccct	gaccacgccg	2280
cacggactcg	gctactgcaa	aatggtcatt	gtcgtggatg	aagatgtcga	tcggtttaac	2340
ctgccgcaag	tcatgtgggc	gctctcaacg	aaaatgcac	cgaacacga	tgcagtcac	2400
attcctgacc	tgtccgtcct	tccgttgac	ccggggtctg	atccggcagg	gatgacacac	2460
aaaatgatlc	ttgaecceac	aacgcctgtc	gcgccgaaa	caagaggcca	ttattcgcag	2520
ccgcttgatt	ctccgctgac	aacgaaagag	tggaacaaa	aactgatgga	cttaatgaat	2580
caataaatga	gttctttaac	gatgcagatc	acaaaaagge	tggaacatt	ttacagggt	2640
acgaagaaac	tttatattga	cggaaaattt	gttcgagcgc	cttcaggatc	aacatttgtc	2700
acaccgaatc	cggcaaccgg	agaaacgtg	atgacgcttt	acgaggcaca	gtcagaagac	2760
attgacagtg	cagtgaagac	ggcacgcaaa	gcctttgatc	acggcgaatg	gcgcactatg	2820
ccggccgctt	ccagaagcag	gctgatgtat	aagcttgccg	atttaattga	agagcacaaa	2880
acggaactcg	cgcagcttga	aacacttgat	aacggaaaac	cgattaatga	aacaacaaat	2940
ggggatatcc	cgctcgcaat	tgagcatatg	cgttattatg	ccgggtggtc	tacaaagata	3000
accggacaaa	caattccggt	cgcggctca	tattttaatt	acaccgccca	tgagcctgtc	3060
ggcgctcgtg	gacagatcat	cccttggaac	tcccgcctcc	ttatggcgat	gtggaaaatg	3120
ggcgccgccc	ttgccacagg	ctgcacaatc	gttttgaaac	cggcggaaca	gacaccgctg	3180
accgccctct	atttagcgga	gttaatagat	caggcgggct	tccctgacgg	cgteatcaat	3240
attgtcccag	ggttcggcga	gacggccggg	gaagcgctga	ccaaccatga	cgatgtcgat	3300
aaactcgctt	ttaccggttc	tacagaaatc	ggcaaaaaaa	tcatggaaaa	agccgcaaaa	3360
aaaattaaac	gcgtgacact	ggagcttggc	ggaaagtcac	ctaatacat	tttgctgac	3420
gccaatttga	agaaagccat	tcccggcgt	ttaaacgggg	tcatgtttaa	tcaggggcag	3480
gtatgctgcg	caggtcccg	tgtcttcatt	cacaaagaca	aatatgatga	ggtcgtcagc	3540
gaaatggttt	catatgcgaa	atcgcttcag	caaggcgccg	gccttcacca	agatacacia	3600
atcgcccgcc	tcgtcagtc	agaacagcat	gagcgctgc	ttcatatat	tgaaaaagga	3660
aaagcggaag	gagccaaagc	tgctgcgggc	ggcagctgcc	catttgaaga	agggtatttt	3720
gtctcccgga	ctgtatttgc	ggatgtggat	gacagcatga	ccatcgcaaa	agaagaaatt	3780
ttcgccctg	tttagccgc	cattccgtat	gatacggtag	atgaagtcat	tgacggggcg	3840
aaccgctcgg	aatacggcct	ggcagccgga	ctttggactg	agaatgtgaa	aaacgcccac	3900
tacattgctg	accgtctcca	agccggcacc	gtttgggtca	actgctacaa	tgttttcgat	3960
gggcacatct	ctttcgggcg	ctataagcaa	tccggcctcg	ggcgggaaat	gggtctctac	4020
gcgtgaata	attatacaga	agtgaaaagt	gtctggatca	atctggaaga	ttaa	4074

<210> 2

<211> 395

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

ggatccgata	ggtatgtttt	cgttgaact	tttaaatata	gccattgaac	atacggttga	60
tttaataact	gacaaacate	acctctttgc	taaagcggcc	aaggacgtg	ccgcgggggc	120

[0003]

```

tgtttgcgtt tttgccgtga tttcgtgtat cattgcttta cttatTTTTT tgccaaagct 180
gtaatggctg aaaatttetta cttttatTTT acatttttag aaatgggcgt gaaaaaaagc 240
gcgcgattat gtaaaatata aagtgatagc ggtaccatta taggtaagag aggaatgtac 300
acatgcgcac ctggaccaag acatctctat tactggcegg cttatgcaca ggggccccaa 360
tggttttTgt aacacatgcc tcaggtacc tgcag 395

```

<210> 3
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 3

```

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

```

[0004]

260 265 270
 Ala Val Ala Ala Ile Glu Ala Ala Tyr Thr Lys Gly Gly Pro Trp Leu
 275 280 285
 Asp Ala Leu Ile Pro Tyr Ile Glu Gly Asn Met Lys Leu Ala Glu Asp
 290 295 300
 Phe Leu Arg Lys Glu Leu Pro Lys Val Arg Met Met Lys Pro Asp Ala
 305 310 315 320
 Ser Tyr Leu Ile Trp Met Asp Phe Ser Glu Tyr Gly Phe Ser Asp Ala
 325 330 335
 Glu Leu Lys Glu Arg Met Leu Lys Lys Gly Lys Ile Ile Leu Glu Pro
 340 345 350
 Gly Thr Lys Tyr Gly Pro Gly Gly Glu Gly Phe Met Arg Leu Asn Val
 355 360 365
 Gly Cys Ser Ala Ala Ala Val Lys Glu Gly Leu Glu Arg Met Lys Ala
 370 375 380
 Ala Leu Ala
 385

<210> 4
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 4

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

[0005]

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

<210> 5
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>

[0006]

<400> 5

Met Ser Ser Leu Thr Met Gln Ile Thr Lys Arg Leu Glu Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 Gln Gly Thr Lys Lys Leu Tyr Ile Asp Gly Lys Phe Val Pro Ser Ala
 20 25 30
 Ser Gly Ser Thr Phe Val Thr Pro Asn Pro Ala Thr Gly Glu Thr Leu
 35 40 45
 Met Thr Leu Tyr Glu Ala Gln Ser Glu Asp Ile Asp Ser Ala Val Lys
 50 55 60
 Ala Ala Arg Lys Ala Phe Asp His Gly Glu Trp Arg Thr Met Pro Ala
 65 70 75 80
 Ala Ser Arg Ser Arg Leu Met Tyr Lys Leu Ala Asp Leu Met Glu Glu
 85 90 95
 His Lys Thr Glu Leu Ala Gln Leu Glu Thr Leu Asp Asn Gly Lys Pro
 100 105 110
 Ile Asn Glu Thr Thr Asn Gly Asp Ile Pro Leu Ala Ile Glu His Met
 115 120 125
 Arg Tyr Tyr Ala Gly Trp Ser Thr Lys Ile Thr Gly Gln Thr Ile Pro
 130 135 140
 Val Ala Gly Ser Tyr Phe Asn Tyr Thr Arg His Glu Pro Val Gly Val
 145 150 155 160
 Val Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Leu Met Ala Met Trp
 165 170 175
 Lys Met Gly Ala Ala Leu Ala Thr Gly Cys Thr Ile Val Leu Lys Pro
 180 185 190
 Ala Glu Gln Thr Pro Leu Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Glu Leu Ile Asp
 195 200 205
 Gln Ala Gly Phe Pro Asp Gly Val Ile Asn Ile Val Pro Gly Phe Gly
 210 215 220
 Glu Thr Ala Gly Glu Ala Leu Thr Asn His Asp Asp Val Asp Lys Leu
 225 230 235 240
 Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Ile Gly Lys Lys Ile Met Glu Lys Ala
 245 250 255
 Ala Lys Lys Ile Lys Arg Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro
 260 265 270
 Asn Ile Ile Leu Pro Asp Ala Asn Leu Lys Lys Ala Ile Pro Gly Ala
 275 280 285
 Leu Asn Gly Val Met Phe Asn Gln Gly Gln Val Cys Cys Ala Gly Ser
 290 295 300
 Arg Val Phe Ile His Lys Asp Lys Tyr Asp Glu Val Val Ser Glu Met
 305 310 315 320
 Val Ser Tyr Ala Lys Ser Leu Gln Gln Gly Ala Gly Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Thr Gln Ile Gly Pro Leu Val Ser Gln Glu Gln His Glu Arg Val Leu
 340 345 350

[0007]

Ser Tyr Ile Glu Lys Gly Lys Ala Glu Gly Ala Lys Ala Val Ala Gly		
355	360	365
Gly Ser Cys Pro Phe Glu Glu Gly Tyr Phe Val Ser Pro Thr Val Phe		
370	375	380
Ala Asp Val Asp Asp Ser Met Thr Ile Ala Lys Glu Glu Ile Phe Gly		
385	390	395
Pro Val Leu Ala Ala Ile Pro Tyr Asp Thr Val Asp Glu Val Ile Glu		
405	410	415
Arg Ala Asn Arg Ser Glu Tyr Gly Leu Ala Ala Gly Leu Trp Thr Glu		
420	425	430
Asn Val Lys Asn Ala His Tyr Ile Ala Asp Arg Leu Gln Ala Gly Thr		
435	440	445
Val Trp Val Asn Cys Tyr Asn Val Phe Asp Ala Ala Ser Pro Phe Gly		
450	455	460
Gly Tyr Lys Gln Ser Gly Leu Gly Arg Glu Met Gly Ser Tyr Ala Leu		
465	470	475
Asn Asn Tyr Thr Glu Val Lys Ser Val Trp Ile Asn Leu Glu Asp		
485	490	495

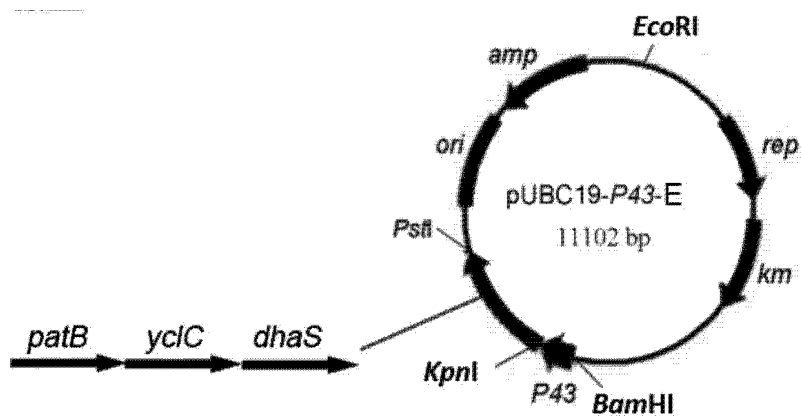


图 1

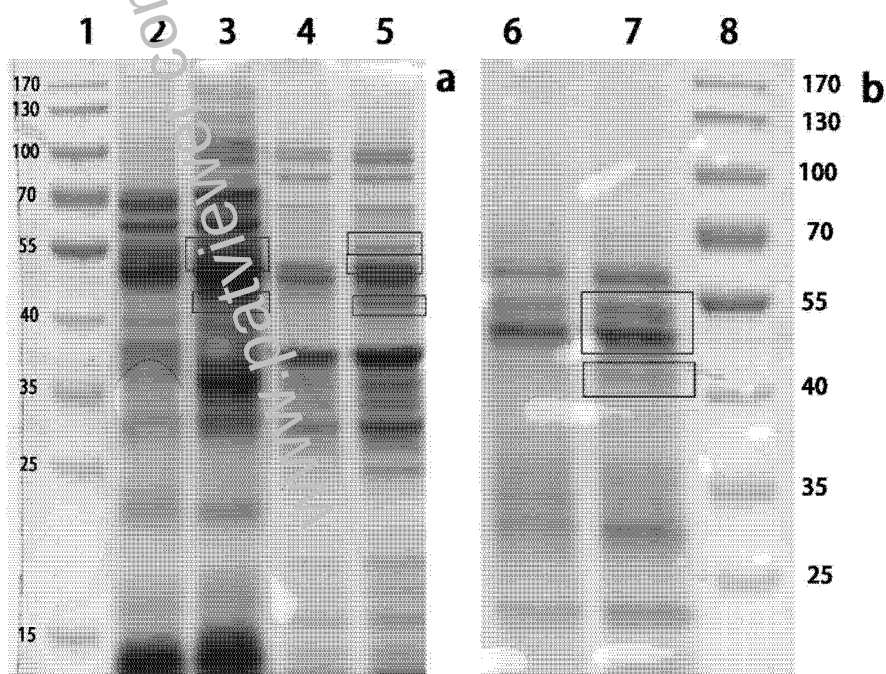


图 2