



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109988714 B

(45) 授权公告日 2021.12.28

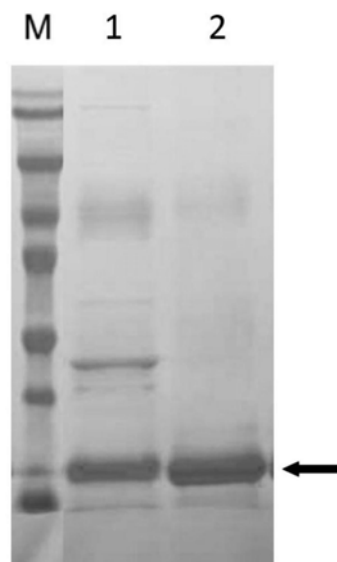
(21) 申请号 201711477699.0
 (22) 申请日 2017.12.29
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109988714 A
 (43) 申请公布日 2019.07.09
 (83) 生物保藏信息
 CCTCC NO:M2017796 2017.12.15
 (73) 专利权人 青岛蔚蓝生物集团有限公司
 地址 266061 山东省青岛市崂山区苗岭路
 29号山东高速大厦12A07
 (72) 发明人 许丽红 刘艳萍 王华明
 (74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有
 限公司 37201
 代理人 曾庆国

(51) Int.Cl.
 C12N 1/14 (2006.01)
 C12N 1/15 (2006.01)
 C12N 9/42 (2006.01)
 C12R 1/885 (2006.01)
 (56) 对比文件
 WO 2019128454 A1,2019.07.04
 CN 102080070 A,2011.06.01
 Takashima,S 等.endoglucanase
 [[*Humicola*] *grisea* var.*thermoidea*].
 《GenBank DataBase》.2002,
 审查员 郭雅萍

权利要求书1页 说明书9页
 序列表6页 附图1页

(54) 发明名称
 一种里氏木霉及其应用

(57) 摘要
 本发明涉及基因工程技术领域,具体提供了一种新型木霉宿主及其应用。所述木霉的保藏编号为CCTCC NO:M2017796,可用于有效表达一种或多种内源或外源蛋白,效果显著。



1. 一种里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) ,其特征在於,所述的里氏木霉的保藏编号为 CCTCC NO:M2017796。
2. 权利要求1所述的里氏木霉在表达一种或多种内源或外源蛋白中的应用。
3. 一种里氏木霉重组菌株,其特征在於,所述的重组菌株是将携带有目的基因的表达式载体转化到权利要求1所述的里氏木霉中构建获得的。
4. 如权利要求3所述的里氏木霉重组菌株,其特征在於,所述的目的基因为纤维素酶基因。
5. 如权利要求4所述的里氏木霉重组菌株,其特征在於,所述的纤维素酶基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7。
6. 如权利要求3所述的里氏木霉重组菌株,其特征在於,所述的表达式载体为真核表达式载体。
7. 权利要求4所述的里氏木霉重组菌株在生产纤维素酶中的应用。

一种里氏木霉及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体涉及一种里氏木霉表达宿主及其在表达外源蛋白中的应用。

背景技术

[0002] 随着基因工程技术的发展,到20世纪中后期人们利用基因工程的方法对微生物进行了改造,我们称这类微生物为基因工程菌也叫做转基因工程菌。由于微生物具有转化效率高、繁殖快、容易培养、易于控制的特点因此基因工程菌得到了广泛的应用,其研究前景亦十分广阔。基因工程菌的构建包括最佳表达载体的构建,适宜宿主细胞的选择、转化、筛选鉴定和遗传稳定性获得质粒能稳定遗传的、高效表达的转基因工程菌等过程。

[0003] 酶作为生物催化剂可应用于多个领域,酶的产率、产量、品质和功能是酶应用于工业中的重要决定因素。酶的高效表达与多个因素相关:宿主的细胞生长特性、表达水平、胞内/胞外表达模式、翻译后修饰、活性蛋白等。为了实现酶的高效表达,酶表达系统的选择至关重要。重组酶已在多个宿主中成功表达,如大肠杆菌、芽孢杆菌、酵母、丝状真菌等。

[0004] 在表达重组蛋白的系统中,大肠杆菌由于其遗传特性及生理学行为了解得最清楚,被广泛用作表达宿主。当前已商业化的基因工程产品大多是通过大肠杆菌表达的,其最突出的优点是工艺简单、产量高、周期短、生产成本低,表达外源基因产物的水平远高于其它基因工程表达系统。但该系统也存在明显的缺陷,例如表达出的蛋白质缺少糖基化、磷酸化等翻译后修饰,导致某些真核来源的蛋白质无法正常发挥功能;高表达引起蛋白质聚集,形成包涵体,导致表达产物没有活性;此外,表达产物中掺杂有大肠杆菌本身含有的内毒素或有毒蛋白,使其在医药应用上受到限制。

[0005] 芽孢杆菌因生长迅速、培养条件简单、遗传背景了解较清晰而被作为表达宿主广泛应用。芽孢杆菌具有良好的发酵基础和生产技术,其在相对简单的培养基中就能生长到很高的密度。芽孢杆菌的细胞壁组成简单,当分泌蛋白跨过细胞膜后,就被加工和直接释放到培养基中。此外,芽孢杆菌分泌的蛋白质产品中不会混杂有类似革兰氏阴性菌细胞壁成分中的热源性脂多糖等物质,从而使得目的蛋白的纯化相对比较简单。此外,多数芽孢杆菌无致病性,其拥有一套高效的分泌信号肽及分子伴侣系统,赋予了芽孢杆菌高效分泌目的蛋白的能力,而且在多数情况下,芽孢杆菌分泌的真核来源的重组蛋白质可以具有其天然构象和生物活性。

[0006] 酵母是一种单细胞低等真核微生物,作为表达工具有独特的优点,酵母可以在较宽的范围内生长;表达产物可以进行翻译后修饰;可进行分泌型表达,利于蛋白的分离纯化;可进行高密度发酵,能适应工业化生产的需要;菌种已长期广泛应用于酿酒和食品工业,安全可靠。酵母表达系统优点为蛋白翻译后修饰(如糖基化)、高热耐受性、高盐耐受性等。因此,酵母作为基因表达系统特别是在大分子真核生物基因研究方面得到日益广泛的应用。

[0007] 丝状真菌表达系统优点为可高效表达大分子真核蛋白、超强分泌蛋白能力、食品

安全型宿主等。木霉和曲霉等是公认的安全生产菌株,有十分成熟的批量发酵技术和较强的蛋白质胞外分泌能力,它们的转化系统和对外源基因的表达已引起广泛关注。木霉表达系统是近年来新兴的用于外源基因表达的体系,它可以克服在原核表达系统中无法进行特定翻译后修饰的缺陷,而且比酿酒酵母具有更高的分泌外源蛋白的能力,所以成为生产具有生物活性的真核生物蛋白的重要途径。

[0008] 然而,木霉大多自身可以合成一定的纤维素酶,所以表达出的为混合酶系,分离纯化目的蛋白比较困难,因此直接限制了木霉作为纤维素酶表达宿主的应用。另外,大量研究表明,木霉对外源蛋白的表达量并没有预计的高。因此,开发新型的表达系统,寻找更多、更高效的表达外源蛋白的方法,是需要进一步研究热点和难点。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种里氏木霉宿主,并将其用于重组表达外源或内源基因,蛋白表达量得到显著提高,应用前景广阔。

[0010] 本发明首先提供一种里氏木霉,为里氏木霉011-8U(*Trichoderma reesei* 011-8U),已于2017年12月15日保藏于中国武汉武汉大学的中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M2017796。

[0011] 本发明的里氏木霉宿主可用于有效表达一种或多种内源或外源蛋白。

[0012] 所述的蛋白选自半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂加氧酶、木质素酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、malanase、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶中的任一种或几种。

[0013] 所述的蛋白选自乙酰酯酶、氨肽酶、淀粉酶、阿拉伯糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、凝乳酶、角质酶、脱氧核糖核酸酶、差向异构酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 α -葡聚糖酶、葡聚糖裂解酶、内切- β -葡聚糖酶、葡糖淀粉酶、葡糖氧化酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、葡糖醛酸糖苷酶、半纤维素酶、己糖氧化酶、水解酶、转化酶、异构酶、漆酶、脂肪酶、裂解酶、甘露糖苷酶、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂解酶、果胶乙酰酯酶、果胶解聚酶、果胶甲基酯酶、果胶裂解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、植酸酶、多聚半乳糖醛酸酶、蛋白酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、核糖核酸酶、奇异果甜蛋白、转移酶、转运蛋白、转谷氨酰胺酶、木聚糖酶、己糖氧化酶中的任一种或几种。

[0014] 本发明再一个方面提供一种里氏木霉重组菌株,是将携带有目的基因的表达载体转化入上述里氏木霉宿主细胞获得的。

[0015] 作为实施例的优选,所述的目的基因为纤维素酶基因;

[0016] 所述的纤维素酶基因,其一种核苷酸序列为SEQ ID NO:5,编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:6。

[0017] 所述的纤维素酶基因,其一种核苷酸序列为SEQ ID NO:7,编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:8。

[0018] 所述表达载体,作为实施例的一种具体选择,为PC2G载体。

[0019] 上述里氏木霉重组菌株用于生产纤维素酶。

[0020] 本发明以里氏木霉U11-4为出发菌株,通过诱变获得的突变菌里氏木霉011-8U可

以作为一种新型宿主细胞,普遍应用于内源或异源基因的重组表达。以突变菌里氏木霉011-8U为宿主细胞构建得到的重组菌株能高效表达纤维素酶NCE5,其发酵酶活达到86U/mL,蛋白量达到0.62mg/ml,比以出发菌株里氏木霉U11-4为宿主细胞构建得到的对照菌株分别提高了56.4%和51.2%;所述里氏木霉011-8U还可高效表达纤维素酶TT45,以该菌为宿主构建得到的重组菌株的发酵酶活达到60.89U/ml,蛋白含量达到0.59mg/ml,比以出发菌株为宿主细胞构建得到的对照菌株分别提高了83.1%和78.8%,效果显著。

附图说明

[0021] 图1:SDS-PAGE电泳检测分析图;其中泳道1为对照菌株里氏木霉U11-4-NCE5的发酵上清液,泳道2为里氏木霉011-8U-NCE5的发酵上清液。箭头所指处的蛋白条带即为纤维素酶NCE5。

具体实施方式

[0022] 申请人通过基因敲除的方法,将野生型里氏木霉(*Trichoderma reesei*)中的纤维素酶基因CBH1、CBH2、EG1和EG2四个基因敲除后,获得一株自身不分泌纤维素酶的里氏木霉菌株,命名为里氏木霉U(*Trichoderma reesei* U)。

[0023] 申请人进一步通过对里氏木霉U进行紫外诱变,筛选获得一株突变菌里氏木霉U11,其菌丝形态粗短,菌丝体致密且分枝更多,能使发酵菌液的粘度显著降低,达到降低搅拌速度又提高溶氧的目的,更有利于菌株的高密度发酵。里氏木霉U11可以作为一种新型宿主细胞,普遍应用于内源或异源基因的重组表达。以突变菌里氏木霉U11为宿主细胞构建得到的重组菌株里氏木霉能高效表达NCE5和葡萄糖转苷酶基因,其发酵酶活分别高达412U/mL和3550U/mL,比对照菌株分别提高了43.1%和50.4%。此外,申请人还将糖化酶、葡萄糖氧化酶、果胶酶、淀粉酶等分别在突变菌宿主U11中进行重组表达。与对照宿主里氏木霉U相比,突变菌宿主U11对上述基因的表达量均提高了40-60%,取得了意料不到的效果。

[0024] 申请人已于2016年12月7日将上述突变菌里氏木霉U11(*Trichoderma reesei* U11)保藏于中国武汉武汉大学的中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M2016726。

[0025] 实施例1纤维二糖水解酶(CEL74a)基因的敲除

[0026] 1.1CEL74a基因敲除表达盒的构建

[0027] 首先,提取里氏木霉的总基因组DNA:将里氏木霉接种于PDA培养基培养7天,取1cm×1cm菌块于1.5mL离心管中,加入400μl裂解缓冲液(60mM Tris-HCl,pH7.8,20mM Na-Ac,1mM EDTA,1.5%SDS),用珠式研磨机剧烈震荡2.5min;65℃水浴20min,加入200μl 10M乙酸铵溶液混匀,冰浴10min,12000rpm离心10分钟,取上清;加入等体积苯酚抽提一次,12000rpm离心2分钟,取上清;加入等体积异丙醇沉淀5分钟,12000rpm离心5分钟;70%乙醇洗涤两次;最后将干燥的DNA溶于ddH₂O。

[0028] 以里氏木霉基因组DNA为模板扩增里氏木霉Cel74a基因(核苷酸序列为SEQ ID NO:1)的上下游序列,其中上游片段所用到的引物序列为:

[0029] Cel74aEcoR1-5F:GTACGAATTCGTAATGGAGATGAGCTCACTTC

[0030] Cel74aXba1-5R:GTAC TCTAGA TGCTAGAGTC TGTCTCGGAG

[0031] 下游片段所用到的引物序列为:

[0032] Cel174aMlu1-3F:GTACACGCGTCTCCAACCTCCCTATTGCAAATC、

[0033] Cel174aSph1-3R:GTACGCATGCGAACACCCGCGACGGTTGAACT;

[0034] 将该基因上下游用Phusion DNA聚合酶(Thermo scientific)从里氏木霉基因组DNA中扩增出来。PCR扩增条件为95°C 4min;94°C 30S;55°C 40S,72°C 1min 30个循环;72°C 7min。利用凝胶回收试剂盒回收PCR扩增产物。

[0035] 敲除盒构建时采用黑曲霉pyrG标签,采用上述方法提取黑曲霉基因组为模板,用如下引物扩增pyrG片段,扩增后的片段经胶回收后连接pMD18T载体。

[0036] pyrG F:CGCCGTCGTG TCTCGTCTCC

[0037] pyrG R:GCCGCTGGTCAATGTTATCTGGTAT

[0038] 载体连接后转化大肠杆菌,并挑取阳性转化子进行测序,测序后的质粒命名为pyrG4-pMD18T。

[0039] 将pyrG4-pMD18T质粒及Cel174a基因上游片段用限制性内切酶EcoRI、XbaI进行双酶切,酶切后的片段用PCR纯化试剂盒进行纯化。纯化后的片段与目的基因片段用T4连接酶进行连接。将连接产物转化进Trans5 α 大肠杆菌(Transgen),用氨苄青霉素进行选择。为确保准确,对若干克隆进行测序(Invitrogen)。测序后提取阳性转化子质粒,命名pMD18T-pyrG4-5F。

[0040] 同时用限制性内切酶Mlu1I和SphI(Fermentas)对纯化后的下游PCR产物进行酶切与质粒pMD18T-pyrG4-5F质粒进行酶切。使用凝胶纯化试剂盒将酶切产物纯化,并用T4 DNA连接酶(Fermentas)将上述两个酶切产物连接。将连接产物转化进Trans5 α 大肠杆菌(Transgen),用氨苄青霉素进行选择。为确保准确,对若干克隆进行测序(Invitrogen)。

[0041] 使用质粒中量制备试剂盒(Axygen)从测序结果正确的大肠杆菌克隆中纯化质粒。所得1个基因敲除质粒为 Δ Cel174a-pMD18T。

[0042] 1.2转化与筛选

[0043] 1.2.1原生质体制备

[0044] 接种里氏木霉U11(CCTCC NO:M2016726)菌丝于PDA平板上生长7天;切取直径约2cm的菌落置于约100ml YEG+U(0.5%酵母粉、1%葡萄糖、1%尿苷)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20ml裂解酶液(Sigma L1412)酶解2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 CaCl₂)悬浮,3000rpm,离心10min;加适量STC悬浮分装(150 μ l/管,10⁸个/ml)。

[0045] 1.2.2转化与验证

[0046] 取10 μ g Δ Cel174a-pMD18T质粒DNA加入到200 μ l原生质体中,接着加入50 μ l 25%PEG轻轻混匀,室温静置20min;然后再次加2ml 25%PEG,轻轻混匀,室温静置5min,加入4ml 1.2M山梨醇,室温放置。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%MgSO₄,1%KH₂PO₄,0.6%(NH₄)₂SO₄,1%葡萄糖,18.3%山梨醇,0.35%琼脂糖),轻轻混匀后倒入下层基础培养基平板(2%葡萄糖,0.5%(NH₄)₂SO₄,1.5%KH₂PO₄,0.06%MgSO₄,0.06%CaCl₂,1.5%琼脂),30°C黑暗培养数天至转化子长出。

[0047] 按照实施例1.1所述方法提取转化子基因组DNA为模板,利用基因组内部引物

(Ce174a-Fs:TATTCCGCTCCACAGACTCGGGCA;和Ce174a-Ra:ATTCTGCTTC TGGCAGACAT ACGG)扩增Ce174a基因验证转化子。PCR扩增条件为95°C 4min;94°C 30S;59°C 40S,72°C 1min 30个循环;72°C 7min。

[0048] 未扩增到Ce174a基因的转化子分别利用基因组CEL74A-F和pyrGR及pyrGF和CEL74A-R两对引物进行交叉验证。PCR扩增条件为95°C 4min;94°C 30S;59°C 40S,72°C 3min 30个循环;72°C 7min。

[0049] 两对引物序列为:

[0050] CEL74A-F:AAGTAGTGAGCGCAGCCAACATAC

[0051] CEL74A-R:GATTGTGAGA AGCAGGTTGT TGCTG

[0052] 两对交叉引物均能扩增到4k左右的目的片段,证明CEL74A基因在里氏木霉U11中敲除成功。申请人将敲除后的菌株命名为里氏木霉U11-1(*Trichoderma reesei* U11-1)。

[0053] 采用上述同样方法,申请人将里氏木霉U11中的EG III(核苷酸序列为SEQ ID NO:2),XYN III(核苷酸序列为SEQ ID NO:3),BGL(核苷酸序列为SEQ ID NO:4)3个基因也依次进行了敲除。

[0054] 申请人将敲除了CEL74A,EG III,XYN III和BGL4个基因的里氏木霉U11菌株命名为里氏木霉U11-4(*Trichoderma reesei* U11-4)。

[0055] 实施例2紫外诱变与筛选

[0056] 申请人以里氏木霉U11-4为出发菌,通过紫外诱变进一步筛选菌落变小、菌丝分枝增多的突变菌。

[0057] 将里氏木霉U11-4接种于新鲜的PDA平板,30°C培养5-7天。待菌落表面变白,产生大量孢子时,吸取5ml无菌水洗脱,获得孢子液,离心后用无菌水重悬,用血球计数板计数,使孢子浓度约为 5×10^7 个/ml。取一个转子放入90mm的无菌培养皿,加入10ml稀释好的孢子悬液,在磁力搅拌器上搅拌使孢子液处于均匀状态。在无菌超净工作台中,用功率为9w的紫外灯于垂直距离20cm的上方照射,分别照射60s、90s、120s、150s、180s。将照射后的孢子液稀释10000倍,取其中100u1均匀涂布PDA平板,30°C培养2-3d后计数,以未被紫外照射的孢子液为对照,计算致死率。结果显示,紫外照射120s时,里氏木霉孢子的致死率为90%,因此选取该照射时间进行后续诱变实验。

[0058] 诱变筛选:取一个转子放入90mm的无菌培养皿中,加入10ml稀释好的孢子悬液(浓度为 5×10^7 个/ml)。在磁力搅拌器上搅拌使孢子液处于均匀状态。在无菌超净工作台中,用功率为9w的紫外灯于垂直距离20cm的上方照射,照射120s,然后在黑暗条件下放置30min。将孢子悬液稀释10000倍,取其中100u1均匀涂布于PDA平板,30°C培养2-3d,同时以出发菌里氏木霉U11-4为对照组,采用同样方法涂布PDA平板,30°C培养2-3d。

[0059] 申请人共涂布了130个PDA平板,每个平板长出约50个菌落。通过观察菌落形态,并与出发菌里氏木霉U11-4进行比较,挑选出菌落形态发生明显变异的突变体177个,分别接种到PDA复筛平板(每个平板均匀接种12个突变体),30°C培养2-3d。

[0060] 最终,申请人筛选得到29株菌落形态明显变小,菌丝体致密且分枝更多的里氏木霉突变菌。这些突变菌在放大发酵过程中具有菌丝体粗短,溶氧水平高,发酵液黏度低等优点。

[0061] 实施例3里氏木霉表达宿主的尿嘧啶营养缺陷型筛选

[0062] 5-氟乳清酸可以诱导菌体缺失尿嘧啶核苷酸合成途径中的乳清核苷酸转移酶或乳清苷单磷酸脱羧酶,从而使5-氟乳清酸无法形成有毒的物质5-氟尿嘧啶核苷酸,从而产生了对5-氟乳清酸的抗性,其嘧啶核苷酸营养可以通过向培养基中添加尿嘧啶进行补充,因此利用5-氟乳清酸诱导形成的尿嘧啶营养缺陷型菌株可以在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶的培养基中生长;而野生型菌株因不具备对5-氟乳清酸的抗性,无法在含有5-氟乳清酸的培养条件下生长。因此常用5-氟乳清酸来筛选尿嘧啶缺陷型的突变株。

[0063] 分别将实施例2筛选到的29株里氏木霉突变菌的孢子用浓度为0.1%的吐温-20溶液稀释至约 1×10^7 个/mL;然后将孢子悬液均匀涂布于含有1.5g/mL 5-氟乳清酸和1.87g/mL尿嘧啶核苷(Uridine)的基本固体培养基(2%葡萄糖,0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,1.5% KH_2PO_4 ,0.06% MgSO_4 ,0.06% CaCl_2 ,1.5%琼脂)平板上,每一平板涂布约 1×10^6 个孢子,避光30℃培养7d以上。结果显示,每种突变菌的平板上都有不同数量的菌落长出,说明这些菌落有可能是对应突变菌的尿嘧啶缺陷型菌株。

[0064] 分别挑取上述每种突变菌对应平板上长出的菌落,将每个菌落分别涂布于基本培养基平板和含有1.87g/mL Uridine的基本培养基平板进行验证。真正的尿嘧啶缺陷型菌株只能在含有Uridine的基本培养基平板上生长,而在缺少Uridine的基本培养基平板上无法生长。最终,申请人在实施例2中通过紫外诱变获得的29株里氏木霉突变菌中,每株突变菌都对应筛选到1株生长状态相对最好的尿嘧啶缺陷型菌株,共29株,分别命名为里氏木霉011-1U,011-2U,011-3U,011-4U,……,011-29U。

[0065] 为了进一步确定上述29株尿嘧啶缺陷型突变菌株的稳定性,分别将其用液体基本培养基(2%葡萄糖,0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,1.5% KH_2PO_4 ,0.06% MgSO_4 ,0.06% CaCl_2)振荡培养7天,观察其能否生长,重复3次试验。实验结果显示,29株尿嘧啶缺陷型突变菌株在缺少Uridine的液体基本培养基中均无法生长。

[0066] 实施例4中性纤维素酶基因NCE5在里氏木霉突变菌中的表达

[0067] 为了验证突变菌里氏木霉011-1U,011-2U,011-3U,011-4U,……,011-29U对目标基因的表达效率,申请人选择将来源于里氏木霉的中性纤维素酶基因NCE5(其核苷酸序列为SEQ ID NO:5,编码氨基酸序列为SEQ ID NO:6)分别在出发菌里氏木霉U11-4和上述突变菌株中进行表达。

[0068] 4.1提取里氏木霉总基因组DNA

[0069] 将里氏木霉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 μ l抽提缓冲液(100mM TrisHCl,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;水浴锅65℃水浴20min后加入200 μ l 10M NH_4AC 冰浴10min;13000rpm离心10min取上清,然后加入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,加入适量水溶解于-20℃保存。

[0070] 4.2基因克隆

[0071] 以4.1中提取的基因组总DNA为模板,利用引物an1-F和an1-R(TCTAGAGGAGCGGCAGTCCGGCAGCGGCC和AGTTAGTTAGCACTCAAGGG A)进行PCR扩增。PCR扩增条件为95℃4min;94℃30S,59℃40S,72℃1min 30个循环;72℃7min。利用凝胶回收试剂盒回收PCR扩增产物。

[0072] 4.3测序分析

[0073] 将4.2中回收的扩增产物连接到PC2G载体,获得克隆载体NCE5-PC2G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,扩增产物的核苷酸序列为SEQ ID NO:5,其编码氨基酸序列为SEQ ID NO:6。多个克隆的结果证明没有发生扩增错误。

[0074] 4.4转化与筛选

[0075] 4.4.1原生质体制备

[0076] 接种实施例3获得的里氏木霉突变体011-1U菌丝于PDA平板上生长7天;切取直径约3cm的菌落置于约60ml YEG (0.5%酵母粉,1%葡萄糖,0.1%Uridine)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20ml裂解酶液(Sigma L1412)酶解2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 CaCl₂)悬浮,3000rpm,离心10min;加适量STC悬浮分装(200μl/管,10⁸个/ml)。

[0077] 4.4.2转化与验证

[0078] 取10μg NCE5-PC2G DNA加入到200μl原生质体中,接着加入50μl 25%PEG轻轻混匀,室温静置25min;然后分2-3次再加2ml 25%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℃的上层半固体培养基(0.1%MgSO₄,1%KH₂PO₄,0.6%(NH₄)₂SO₄,1%葡萄糖,18.3%山梨醇,0.35%琼脂糖),轻轻混匀后倒入下层基础培养基平板(2%葡萄糖,0.5%(NH₄)₂SO₄,1.5%KH₂PO₄,0.06%MgSO₄,0.06%CaCl₂,1.5%琼脂),30℃黑暗培养数天至转化子长出。通过摇瓶发酵,选出纤维素酶表达量最高的阳性转化子,命名为里氏木霉011-1U-NCE5。

[0079] 采用上述同样方法,分别以里氏木霉突变菌株011-2U,011-3U,011-4U,……,011-29U为宿主细胞,构建得到重组表达中性纤维素酶NCE5的里氏木霉重组菌株,对应选出表达量最高的阳性转化子,分别命名为里氏木霉011-2U-NCE5,011-3U-NCE5,011-4U-NCE5……,011-29U-NCE5。

[0080] 同时,以出发菌株里氏木霉U11-4作为对照宿主,采用上述同样方法,构建得到重组表达中性纤维素酶NCE5的里氏木霉重组菌株,对应选出表达量最高的阳性转化子,命名为里氏木霉U11-4-NCE5,作为对照菌株。

[0081] 4.5发酵验证

[0082] 将上述构建的对照菌株里氏木霉U11-4-NCE5,与以突变菌株011-1U,011-2U,011-3U,……,011-29U为宿主细胞构建得到的重组菌株里氏木霉011-1U-NCE5,011-2U-NCE5,011-3U-NCE5……,011-29U-NCE5分别接种于摇瓶培养基(葡萄糖10g/L,液糖10g/L,玉米浆15g/L,硫酸铵9g/L,硫酸镁5-10g/L,磷酸二氢钾20g/L磷酸氢二铵4g/L)30℃,200rpm摇床培养48h之后,温度控为25℃,发酵3天。分别取发酵上清液测定其中的纤维素酶酶活。

[0083] (1)酶活测定方法

[0084] 在50℃、pH值为4.8(中性为pH6.0)的条件下,每分钟从浓度为5mg/ml的羟甲基纤维素钠溶液中降解释放1μmol还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位U,还原糖以葡萄糖等量。

[0085] 取三支试管各加入0.5mL CMC底物,与待测酶液一起50℃水浴预热5min。在第一、二试管中各加入0.5mL待测液,并计时,50℃水浴中反应15min。反应完后在三支试管中各加

入1.5mLDNS试剂,并在第三支试管总补加0.5mL的待测酶液。取出并摇匀三支试管后,在沸水浴中反应5min。迅速冷却至室温,用水定到5.0mL。以第三支试管试液为对照在540nm波长条件下测第一、二试管试液的吸光度,吸光度在0.25-0.35之间为宜。待测酶液反应液的吸光度与水平控制酶液反应液吸光度之差的绝对值不超过0.015。

[0086] 酶活 $X = (\text{葡萄糖等量值}/180/15/0.5) \times n$

[0087] 其中:X——酶活力单位,IU/g (mL);

[0088] 180——葡萄糖从微克换算成微摩尔;

[0089] 15——待测液与底物的反应时间;

[0090] 0.5——加入反应的待测酶液量;

[0091] n——稀释倍数;

[0092] (2) 酶活测定结果

[0093] 以出发菌里氏木霉U11-4作为对照宿主构建得到的对照菌株里氏木霉U11-4-NCE5,其发酵上清液酶活为55U/mL,蛋白含量为0.41mg/ml,而以突变菌株011-1U,011-2U,011-3U,……,011-29U为宿主细胞构建得到的重组菌株里氏木霉011-1U-NCE5,011-2U-NCE5,011-3U-NCE5……,011-29U-NCE5,其发酵酶活约为71~86U/mL,蛋白量约为0.55-0.62mg/ml,说明纤维素酶基因NCE5在出发菌里氏木霉U11-4以及突变菌株011-1U,011-2U,011-3U,……,011-29U中均得到有效表达,且在突变菌中的表达量明显高于出发菌。其中,以突变菌011-8U为宿主细胞构建得到的重组菌株里氏木霉011-8U-NCE5发酵酶活最高,为86U/mL,蛋白量最高达0.62mg/ml,比对照菌株提高了56.4%和51.2%,取得了意料不到的技术效果。

[0094] 将对照菌株里氏木霉U11-4-NCE5和以突变菌株011-8U为宿主细胞构建得到的重组菌株里氏木霉011-8U-NCE5发酵上清液进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图1所示,与对照菌株相比,里氏木霉011-8U-NCE5中目的蛋白NCE5(箭头所指处)的表达量有明显提高。

[0095] 申请人已于2017年12月15日将上述突变菌里氏木霉011-8U (*Trichoderma reesei* 011-8U) 保藏于中国武汉武汉大学的中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: M2017796。

[0096] 实施例5纤维素酶TT45在里氏木霉011-8U中的表达

[0097] 参考实施例4所述方法,提取里氏木霉基因组,按以下引物进行PCR扩增,得到纤维素酶TT45基因片段(其核苷酸序列为SEQ ID NO:7,氨基酸序列为SEQ ID NO:8)。

[0098] TT45-KpnI-F:CGGGGTACCATGCGATCTACCCCGGTCC

[0099] TT45-MluI-R:CGACGCGTTCAGAGGCACTGAGAGTAGTAG

[0100] 将纤维素酶TT45基因片段连接到PC2G载体,获得重组载体;然后将重组载体转入宿主细胞里氏木霉011-8U,构建得到重组表达纤维素酶TT45的里氏木霉重组菌株,选出表达量最高的阳性转化子,命名为里氏木霉011-8U-TT45 (*Trichoderma reesei* 011-8U-TT45)。

[0101] 同时,以出发菌株里氏木霉U11-4作为对照宿主,采用上述同样方法,构建得到重组表达纤维素酶TT45的里氏木霉重组菌株,对应选出表达量最高的阳性转化子,命名为里氏木霉U11-4-TT45,作为对照菌株。

[0102] 将上述构建的里氏木霉011-8U-TT45和对照菌里氏木霉U11-4-TT45分别接种于摇

瓶培养基(葡萄糖10g/L,液糖10g/L,玉米浆15g/L,硫酸铵9g/L,硫酸镁5-10g/L,磷酸二氢钾20g/L磷酸氢二铵4g/L) 30℃,200rpm摇床培养48h之后,温度控为25℃,发酵3天。分别取发酵上清液测定其中的纤维素酶酶活(酶活测定方法参考实施例4.5)。

[0103] 酶活测定结果显示:对照菌里氏木霉U11-4-TT45的发酵酶活为33.26U/ml,蛋白含量为0.33mg/ml,而里氏木霉011-8U-TT45的发酵酶活高达60.89U/ml,蛋白含量高达0.59mg/ml,比对照菌提高了83.1%和78.8%,效果显著。所述结果也表明以突变菌株里氏木霉011-8U为宿主细胞构建得到的重组菌株中纤维素酶TT45的表达量远远高于以出发菌里氏木霉U11-4为宿主细胞构建得到的重组菌株。

[0104] 此外,申请人还将葡萄糖苷酶、葡聚糖酶、果胶酶、过氧化氢酶等分别在突变菌宿主011-8U中进行重组表达。与出发菌株宿主里氏木霉U11-4相比,突变菌宿主011-8U对上述基因的表达量均提高了30%以上,效果显著。

[0105] 综上,本发明以里氏木霉U11-4为出发菌株,通过诱变获得的突变菌里氏木霉011-8U(*Trichoderma reesei* 011-8U)可以作为一种新型宿主细胞,普遍应用于内源或异源基因的重组表达,有利于提高蛋白的产量,降低生产成本。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 青岛蔚蓝生物集团有限公司	
[0003]	<120> 一种新型木霉及其应用	
[0004]	<160> 8	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 2517	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0010]	<400> 1	
[0011]	atgaaggtct ctcgagtcct tgcccttgtc ctgggggccc tcatccctgc ccatgctgcc	60
[0012]	ttttcatgga agaacgtcaa gctcggcgcc ggccggcgct tcgtccccgg catcatcttc	120
[0013]	catcccaaga caaaaggcgt agcatatgca cgaacagata ttggcgggct gtaccgcctc	180
[0014]	aacgccgacg actcatggac cgccgtcagc gatgggattg ctgataatgc cggctggcac	240
[0015]	aactggggca tcgacgtgt tgcccttgat ccgaggagc atcaaaagggt gtatgccgca	300
[0016]	gtcggcatgt atacgaacag ctgggatccg agtaatggag ccatcattcg ctgctcagac	360
[0017]	cgccggcga cgtggtcctt caccaacttg cccttcaaag tcgggggtaa catgccagga	420
[0018]	cgccggagcc gagagcgtct ggctgtcgat ccggccaact ccaacatcat ctactttggt	480
[0019]	gctcgtcag gaaacgcct ctggaagtct acggacggcg gcgtgacct ttccaaggtc	540
[0020]	tcgtcgttca cggcaactgg gacgtacatc ccagaccga gtgattcaa cggctacaac	600
[0021]	agcacaagc aaggactcat gtgggttacg ttgactcaa ccagcagcac gaccggggga	660
[0022]	gccacgtctc gtatctttgt tggcacggct gataacatca ctgcttcagt ctatgtgagc	720
[0023]	acgaatgccg gctccacgtg gactgtctga ccggggcagc cagggaata ctttctctac	780
[0024]	aaggcgaac tgcagccagc agagaaggcc ttgtatctga cctattcca tggcacaggg	840
[0025]	ccgatgatg gcacacttgg ctcatgttgg aggtacgaca ttgcaggggg aacttggaaa	900
[0026]	gacatcccc ctgtctctgg atcagatcta tactttggtt ttggcggcct tggcctcgat	960
[0027]	ttgcaaaagc caggaaacct tgttgttctc tctttgaaact cttggtggcc agatgctcag	1020
[0028]	ctgtttcggc cgaccgactc tgggacaaca tggagcccga tctgggcgtg ggcgagctat	1080
[0029]	ccgactgaga cctattacta cagcatctca actcccaaag caccgtggat caagaacaac	1140
[0030]	tttatcgatg tgacgagcga gtcaccgtcc gatggtctca tcaagcgcct cggctggatg	1200
[0031]	attgagtctc tcgagattga cccaaccgac agcaaccact ggctctacgg caccggaatg	1260
[0032]	acaatctttg gcggccacga tctaccaac tgggacacgc gccacaatgt gtcaatcaa	1320
[0033]	tactggcag acggcatcga ggaattctcc gtccaggacc tggcctctgc acccggcgga	1380
[0034]	agcgagctat tggccgagc cggagacgac aacggcttca cttttgccag cagaaacgac	1440
[0035]	ctcgggacat cgccgagac ggtctgggca acgcccacat gggccacctc gacgagcgtc	1500
[0036]	gactacgccg ggaactcggc caagagcgtc gtccgcgtcg gcaacaccgc cggcacgcaa	1560
[0037]	cagtgggcca tctcgtccga cggcggcgcg acgtggagca tcgactacgc ggccgacacg	1620
[0038]	tccatgaacg ggggacggc ggcctattcg gccgacggcg acacgatcct ctggtcgacc	1680
[0039]	gcctcgtccg gcgtgcagc ctcgcagttc cagggcagct ttgcctccgt ctgagcctg	1740
[0040]	cccgcggcgc ccgtcatcgc ctcggacaag aagaccaaca gcgtcttcta cgccggtcc	1800
[0041]	ggatcgacct ttacgtcag caaggacacc ggcagcagct tcacgcgcgg gcccaagctg	1860

[0042] ggcagcgcag ggacgatccg ggatatcgt gctcaccga ccaccgcggg cacgttgtat 1920
 [0043] gtctcgaccg acgtcgcat attccgctcc acagactcgg gcacgacctt tggccaagtc 1980
 [0044] tccaccgcc tgaccaaac ctaccagatc gccctgggtg tgggctcagg ctogaactgg 2040
 [0045] aacctgtatg ctttcggcac cggcccgtca ggggctcgc tctaccagc tggagacagc 2100
 [0046] gggcctcct ggacggacat ccagggtcc cagggtctc gctccatga cagcaccaag 2160
 [0047] gtcgccgca gcggcagcac cgccgggcaa gtctactgg gcaccaacgg ccggggcgtc 2220
 [0048] ttttacgctc agggaccgt cggcggggc acggcgggga cttctcgtc gaccaagcag 2280
 [0049] agcagcagca gtaccttc cgccagctc agcaccagc tgaggctcag cgttgtatcc 2340
 [0050] acgaccggg cttcgacgt gacttcgtc aggaccagc cggccgccg tcccacggg 2400
 [0051] tcaggggtc ccggtcatta tgctcagtgc ggaggattg ggtggacgg gccgacgcag 2460
 [0052] tgtgtggcgc cgtatgtctg ccagaagcag aatgattatt actaccagtg tgtgtga 2517
 [0053] <210> 2
 [0054] <211> 705
 [0055] <212> DNA
 [0056] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0057] <400> 2
 [0058] atgaagtcc ttcaagtcc cctgcctc ataccggcc ccttgccca aaccagctgt 60
 [0059] gaccagtgg caacctcac tggcaacgc tacacagtc gcaacaacct ttggggagca 120
 [0060] tcagccgct ctggatttg ctgcgtgac gcggtatgc tcagcggcg ggcctcctgg 180
 [0061] cagcagact ggcagtggc cggcgccag aacaacgtc agtcgtacca gaactctcag 240
 [0062] attgccatt cccagaagag gaccgtcac agcatcagc gcatgccac cactgccagc 300
 [0063] tggagctaca gcgggagca catccgcgt aatggtgct atgacttgt caccgcagcc 360
 [0064] aaccgaatc atgtcacgta ctcgggagc tacgaactc tgatctggc tggcaatac 420
 [0065] ggcatattg ggccgattg gtctcacag ggaacagtc acgtcggtg ccagagctgg 480
 [0066] acgtctact atggctaca cggagccat caagtctatt ctttgtggc ccagaccaac 540
 [0067] actaccaact acagcggaga tgtcaagaac ttcttcaatt atctccgaga caataaagga 600
 [0068] tacaacgctg caggccaata tttcttagc taccaattg gtaccgagc cttcacgggc 660
 [0069] agtgaactc tgaacgtgc atcctggacc gcatctatc actaa 705
 [0070] <210> 3
 [0071] <211> 1044
 [0072] <212> DNA
 [0073] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0074] <400> 3
 [0075] atgaaagca acgtcatctt gtgcctcctg gccccctgg tcgccgtct cccaccgaa 60
 [0076] accatccacc tcgacccga gctcgccgt ctccgcgca acctaccga gcgaacagc 120
 [0077] gaccttggg accgcaagc ctctcaaagc atcgaccag tcatcaagag aaaaggcaag 180
 [0078] ctctactttg gcaccgcc cggaccggc ctctccaac gggaaaagaa cgcggccatc 240
 [0079] atccaggcag acctcgcca ggtgacccg gagaacagc tgaagtggc gtcgctcag 300
 [0080] aacaaccaag gccagctgaa ctggggagc gccgactat tcgtcaact tggccagca 360
 [0081] aacggcaagt cgatacggc ccacactct atctggcact cgcagctgc tgcgtgggtg 420
 [0082] aacaatatca acaacggga tactctcgg caagtcatt gcacccatg ctctactgtg 480
 [0083] gttggcggt acaagggca gattcgtgct tgggacgtg tcaatgaaat cttcaacgag 540

[0084]	gatggaacgc tgcgctcttc agtcttttcc aggctcctcg gcgaggagt tgtctcgatt	600
[0085]	gcctttcgtg ctgctcgaga tgctgaccct tctgcccgtc tttacatcaa cgactacaat	660
[0086]	ctcgaccgcg ccaactatgg caaggtcaac gggttgaaga cttacgtctc caagtggatc	720
[0087]	tctcaaggag ttcccattga cggatttga agccagtccc atctcagcgg cggcggaggc	780
[0088]	tctggtacgc tgggtgcgct ccagcagctg gcaacggtac ccgtcaccga gctggccatt	840
[0089]	accgagctgg acattcaggg ggcaccgacg acgattaca cccaagttgt tcaagcatgc	900
[0090]	ctgagcgtct ccaagtgcgt cggcatcacc gtgtggggca tcagtgaaa ggactcgtgg	960
[0091]	cgtgccagca ccaaccctct tctgtttgac gaaaacttca accccaagcc ggcatataac	1020
[0092]	agcattgttg gcacttaca atag	1044
[0093]	<210> 4	
[0094]	<211> 2235	
[0095]	<212> DNA	
[0096]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0097]	<400> 4	
[0098]	atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac	60
[0099]	agtcaactca catcgggggc ctcggtgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg	120
[0100]	ggaaccgctg acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc	180
[0101]	ggcatcgtga gcggtgctgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaacac atctccggcc	240
[0102]	tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcgggtg tcgatactcg	300
[0103]	acaggcagca cagcctttac gccgggctt caagcggcct cgacgtggga tgtcaatttg	360
[0104]	atccgcgaac gtggacagtt catcggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata	420
[0105]	cttggctctg tggctgggcc gctgggaaag actccgcagg gcggtcgcaa ctgggagggc	480
[0106]	ttcgggtgctg atccatatct cacgggcatt gccatgggtc aaaccatcaa cggcatccag	540
[0107]	tcggtaggcg tgcaggcagc agcgaagcac tatatctca acgagcagga gctcaatcga	600
[0108]	gaaaccattt cgagcaacc agatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt	660
[0109]	gccgacgctg ttcaggccaa tgctccttct gtcatgtgct cgtacaacaa ggtcaatacc	720
[0110]	acctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctgggggtc	780
[0111]	ccagctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct	840
[0112]	ggccttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggtc ctgggggtca	900
[0113]	gctctacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg	960
[0114]	actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc	1020
[0115]	aacatcagca gaaatgtca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccagggac	1080
[0116]	ggcatcgttc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt	1140
[0117]	gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgc ctcgtgcaac	1200
[0118]	gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat	1260
[0119]	ccgtacttcg tcgccccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag	1320
[0120]	gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcac ctgcagcaag aggaaaggac	1380
[0121]	gtcggcatcg tcttcatcac cgcgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac	1440
[0122]	gcgggcgatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcgggtg	1500
[0123]	gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag	1560
[0124]	cagattcttg ctcttcgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag	1620
[0125]	agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg	1680

[0126] tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac 1740
 [0127] agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacgccg 1800
 [0128] cggtagcagt teggetatgg actgtcttac accaagttca actactcacg cctctccgtc 1860
 [0129] ttgtcgaccg ccaagtctgg tcctgcgact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat 1920
 [0130] ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccggt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980
 [0131] gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccatcttcag caccaggac ccctccgaag 2040
 [0132] cagctcgcgag gctttgcaa gctgaacctc acgcttggtc agagcggaac agcaacgttc 2100
 [0133] aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg 2160
 [0134] tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220
 [0135] ctgtcggtag cgtag 2235
 [0136] <210> 5
 [0137] <211> 673
 [0138] <212> DNA
 [0139] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0140] <400> 5
 [0141] atgcagctcc ccctgaccac gctcctcacc ctctctcccc ccctcgcggc ggcccagtc 60
 [0142] ggcagcggcc gcaccacgcg ctactgggac tgctgcaagc gtcgtgcgcg tggcccggca 120
 [0143] agggcccggc gccctgctgg acgtgcgacc ggtgggacac ccgctgttcg acggcggcaa 180
 [0144] cacgcgcagc gggcgcgacg cgggcggcgg cgcctacagt gctcggacca gagcccgtgg 240
 [0145] gcggtcagcg acgacctggc gtacggctgg gcggccgcaa cattgccggc tccaacgaga 300
 [0146] ggcagtgggt ctgcgcctgc tacgagctga cttcacagc gggccggtgg cgggcaagag 360
 [0147] gatgattgtg caggcgagca atacgggagg cgattgggga acaaccactt tgatattgct 420
 [0148] atgcccggcg gtggcgtcgg tatcttaac gcctcaccga ccagtacggc gcgccccca 480
 [0149] acgggtgggg ccagcgtac ggggcatca gccacgccac gagtgcgacg ccttccccga 540
 [0150] gaagctcaag cccggtgct actggcgctt tgctggtgcg tttccctctt tctctctctc 600
 [0151] tcaactgtctt tgccccctgg aacagggcag agatgggaag aagttgtgtt ttttttccct 660
 [0152] tgagtctaa cta 673
 [0153] <210> 6
 [0154] <211> 227
 [0155] <212> PRT
 [0156] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0157] <400> 6
 [0158] Met Gln Leu Pro Leu Thr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Pro Ala Leu Ala
 [0159] 1 5 10 15
 [0160] Ala Ala Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys
 [0161] 20 25 30
 [0162] Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr
 [0163] 35 40 45
 [0164] Cys Asp Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser
 [0165] 50 55 60
 [0166] Gly Cys Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro
 [0167] 65 70 75 80

[0168]	Trp Ala Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile
[0169]	85 90 95
[0170]	Ala Gly Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr
[0171]	100 105 110
[0172]	Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser
[0173]	115 120 125
[0174]	Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro
[0175]	130 135 140
[0176]	Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala
[0177]	145 150 155 160
[0178]	Pro Pro Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His
[0179]	165 170 175
[0180]	Glu Cys Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg
[0181]	180 185 190
[0182]	Phe Asp Trp Cys Val Ser Leu Phe Pro Pro Leu Ser Leu Ser Leu Pro
[0183]	195 200 205
[0184]	Pro Gly Thr Gly Gln Thr Met Gly Arg Ser Cys Val Phe Phe Pro Leu
[0185]	210 215 220
[0186]	Ser Ala Asn
[0187]	225
[0188]	<210> 7
[0189]	<211> 900
[0190]	<212> DNA
[0191]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0192]	<400> 7
[0193]	atgcgtcteta ctcccgttct tcgcacaacc ctggccgctg cacttctctt ggtcgcctcc 60
[0194]	gcgccagtg gcagtggcca gtccacgaga tactgggact gctgcaagcc gtcgtgcgct 120
[0195]	tggcccggga aggccccgt cagccaaccg gtctacgcgt gcgatgcaa cttccagcgc 180
[0196]	ctgtccgact tcaatgtcca gtcgggctgc aacggcgctt cggcctaact ctgcgcccgc 240
[0197]	cagactccct gggcggtgaa cgacaatctc gcctacggct tcgccgagc gagcatgcc 300
[0198]	ggcggtccg aatcctcgtg gtgctgcgcc tgctacgcgc tcaccttcaac ttccggtccc 360
[0199]	gtcgcggca agacaatggt ggtgcagtca acgagcactg gcggcgacct gggaagtaac 420
[0200]	cagttcgata tcgcatgcc cggcgggcgc gtgggcatct tcaacggctg cagctcgcag 480
[0201]	ttcgcgggcc tccccggcgc tcaatacggc ggcatttctg cgcgcgacca gtgcgattcc 540
[0202]	ttccccgcgc cgctcaagcc cggctgccag tggcggtttg actggttcca gaacgccgac 600
[0203]	aaccgacgt tcacgtcca gcaggtgcag tgccccgcc agatcgttgc ccgctccggc 660
[0204]	tgcaagcgca acgacgactc cagcttcccc gtcttcaacc cccaagcgg tggcaacggt 720
[0205]	ggcaccggga cgcccagtc gactgcgctt gggctgggcc agacgtctcc cggcgggcgc 780
[0206]	agtggctgca cgtctcagaa gtgggctcag tcgggtggca tcggcttcag cggatgcacc 840
[0207]	acctgtgtct ctggcaccac ctgccagaag ttgaacgact actactcgca gtgcctctaa 900
[0208]	<210> 8
[0209]	<211> 299

[0210]	<212>	PRT
[0211]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0212]	<400>	8
[0213]	Met Arg Ser Thr Pro Val Leu Arg Thr Thr Leu Ala Ala Ala Leu Pro	
[0214]	1	5 10 15
[0215]	Leu Val Ala Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp	
[0216]		20 25 30
[0217]	Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Ala Ala Val Ser	
[0218]		35 40 45
[0219]	Gln Pro Val Tyr Ala Cys Asp Ala Asn Phe Gln Arg Leu Ser Asp Phe	
[0220]		50 55 60
[0221]	Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp	
[0222]		65 70 75 80
[0223]	Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala	
[0224]		85 90 95
[0225]	Thr Ser Ile Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr	
[0226]		100 105 110
[0227]	Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val	
[0228]		115 120 125
[0229]	Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Ile	
[0230]		130 135 140
[0231]	Ala Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln	
[0232]		145 150 155 160
[0233]	Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asp	
[0234]		165 170 175
[0235]	Gln Cys Asp Ser Phe Pro Ala Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg	
[0236]		180 185 190
[0237]	Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Gln Gln	
[0238]		195 200 205
[0239]	Val Gln Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Arg Ser Gly Cys Lys Arg Asn	
[0240]		210 215 220
[0241]	Asp Asp Ser Ser Phe Pro Val Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Asn Gly	
[0242]		225 230 235 240
[0243]	Gly Thr Gly Thr Pro Thr Ser Thr Ala Pro Gly Ser Gly Gln Thr Ser	
[0244]		245 250 255
[0245]	Pro Gly Gly Gly Ser Gly Cys Thr Ser Gln Lys Trp Ala Gln Cys Gly	
[0246]		260 265 270
[0247]	Gly Ile Gly Phe Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys	
[0248]		275 280 285
[0249]	Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu	
[0250]		290 295

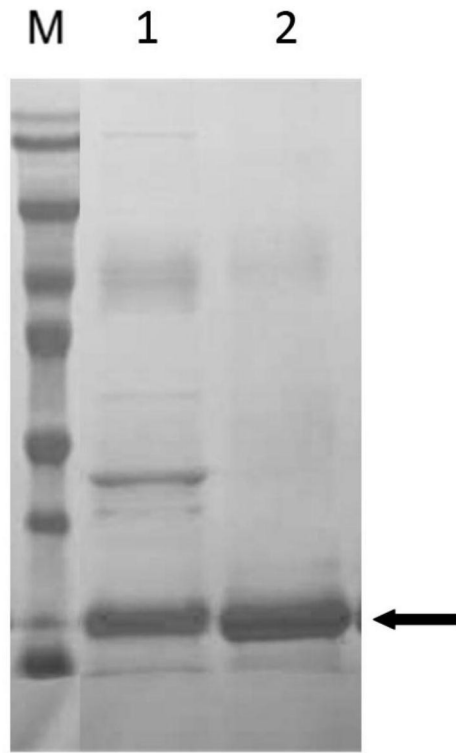


图1