

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2017 年 4 月 13 日 (13.04.2017)



(10) 国际公布号  
WO 2017/059626 A1

- (51) 国际专利分类号:  
*C12P 13/06* (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01) *C12R 1/465* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/097205
- (22) 国际申请日: 2015 年 12 月 11 日 (11.12.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201510651516.7 2015 年 10 月 10 日 (10.10.2015) CN
- (71) 申请人: 中国科学院南海海洋研究所 (SOUTH CHINA SEA INSTITUTE OF OCEANOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路 164 号, Guangdong 510301 (CN)。
- (72) 发明人: 鞠建华 (JU, Jianhua); 中国广东省广州市海珠区新港西路 164 号, Guangdong 510301 (CN)。李青连 (LI, Qinglian); 中国广东省广州市海珠区新港西路 164 号, Guangdong 510301 (CN)。秦湘静 (QIN, Xiangjing); 中国广东省广州市海珠区新港西路 164 号, Guangdong 510301 (CN)。刘静 (LIU, Jing); 中国广东省广州市海珠区新港西路 164 号, Guangdong 510301 (CN)。

(74) 代理人: 广州科粤专利商标代理有限公司 (GUANGZHOU KEYUE I.P. LAW OFFICE); 中国广东省广州市越秀区先烈中路 100 号大院 23-1 栋 616 室, Guangdong 510070 (CN)。

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

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

[见续页]

(54) Title: APPLICATION OF AMINOTRANSFERASE AND ISOMERASE IN CATALYTIC FORMATION OF L-ALLO-ILE

(54) 发明名称: 氨基转移酶和异构酶在催化形成 L-allo-Ile 中的应用

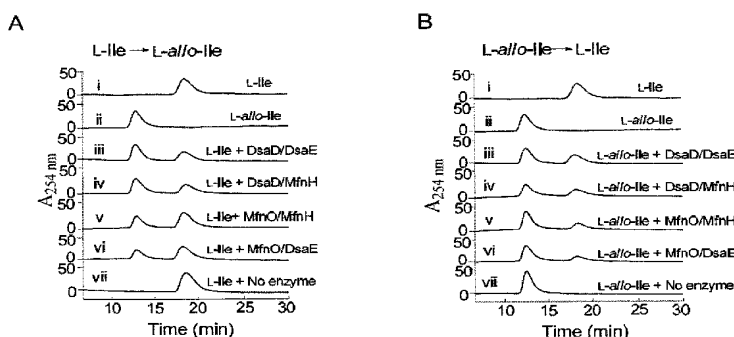


图 16

(57) Abstract: The present invention discloses use of an enzyme pair consisting of an aminotransferase and an isomerase in the catalytic formation of L-allo-Ile, the aminotransferase is DsaD represented by SEQ ID NO.7 or MfnO represented by SEQ ID NO.5, the isomerase is DsaE represented by SEQ ID NO.8 or MfnH represented by SEQ ID NO.6. The present invention explains biosynthetic mechanism of L-allo-Ile on enzymatic level, and is of important significance for the preparation of L-allo-Ile by using an enzymatic method and for the diagnosis and treatment of maple syrup urine disease.

(57) 摘要: 本发明公开了由氨基转移酶和异构酶组成的酶对在催化形成 L-别异亮氨酸 (L-allo-Ile) 中的应用, 所述氨基转移酶为 SEQ ID NO.7 所示的 DsaD 或 SEQ ID NO.5 所示的 MfnO, 所述异构酶为 SEQ ID NO.8 所示的 DsaE 或 SEQ ID NO.6 所示的 MfnH。本发明在酶学水平上解释了 L-allo-Ile 的生物合成机制, 对于利用酶学方法制备 L-allo-Ile 以及枫糖尿症的诊治具有重要意义。

WO 2017/059626 A1

- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

## 氨基转移酶和异构酶在催化形成 L-*allo*-Ile 中的应用

### 技术领域:

本发明属于基因工程和生物催化技术领域，具体涉及一类由磷酸吡哆醛  
5 (pyridoxal 5' -phosphate, PLP) 依赖的氨基转移酶 (PLP-linked aminotransferase) 和一种新型异构酶 (isomerase) 组成的酶对，在共同协作催化形成 L-别异亮氨酸 (L-*allo*-Ile) 中的应用。

### 背景技术:

异亮氨酸具有两个不对称中心，因此存在着 4 种立体异构体：L-异亮氨酸  
10 (L-Ile)、D-异亮氨酸 (D-Ile)、L-别异亮氨酸 (L-*allo*-Ile) 和 D-别异亮氨酸 (D-*allo*-Ile)，其对应关系如图 1 所示。除 L-Ile 之外，D-Ile, L-*allo*-Ile 和 D-*allo*-Ile 均属于非蛋白质氨基酸，其在自然界中的存在已有相关报道。其中，L-*allo*-Ile 由于其在自然界中的广泛存在及重要科学意义，而引起了科学家们的特别关注。L-*allo*-Ile 于 1985 年首次被报道发现，在随后的研究中，发现其除了存在于植物  
15 中，还可以作为结构单元存在于大量的环肽抗生素，如来源于真菌的 aureobasidin A, cordyheptapeptides 和 aspergillicin E，以及来源于放线菌的 globomycin, cypemycin, desotamides 和 marformycins (结构如图 2)。有趣的是，L-*allo*-Ile 还被发现存在于人体血浆中，在健康人群的血浆中，L-*allo*-Ile 的浓度很低，处于几乎可以被检测的浓度水平；然而，在患有常染色体隐性遗传病——枫糖尿症  
20 (maple syrup urine disease) 的病人血浆中，L-*allo*-Ile 却因为病人的代谢缺陷而得到累积，浓度达到 5  $\mu$ M 以上，因此，L-*allo*-Ile 在血浆中的浓度水平已经作为诊断枫糖尿症的重要手段之一。

L-*allo*-Ile 与蛋白质氨基酸 L-Ile 的结构非常相似，L-*allo*-Ile 与 L-Ile 的差别  
25 在  $\beta$  位的碳原子上的甲基的构象不同。尽管 L-*allo*-Ile 在结构上与 L-Ile 非常相似，以及在自然界中广泛存在，但目前为止，生命体是如何生物合成 L-*allo*-Ile 这种非蛋白质氨基酸，以及在此过程当中涉及的酶和酶促反应机制，还是一个未解之谜。

Desotamides 和 marformycins 从分别从南海深海来源的链霉菌 *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 和 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 分离纯化得到

的两类环肽类抗生素，研究表明，desotamides 对革兰氏阳性细菌具有较好的抑制活性，而 marformycins 对痤疮丙酸杆菌（*Propionibacterium acnes*）具有较好的抑制作用，是较好的用于治疗痤疮药物的先导化合物。更为重要的是，这两类环肽化合物结构中，均含有非蛋白质氨基酸结构单元 L-allo-Ile。目前，desotamides 和 margormycins 的生物合成基因簇已经被克隆，以上研究结果为我们在酶学水平上解释 L-allo-Ile 的生物合成机制奠定了重要的基础。L-allo-Ile 生物合成酶学机制的解释，将为利用绿色的酶学方法制备 L-allo-Ile，以及对枫糖尿症的诊断和治疗具有重要的实用意义。

### 发明内容：

10 本发明的目的是提供氨基转移酶和异构酶形成的酶对在催化 L-异亮氨酸形成 L-别异亮氨酸或者催化 L-别异亮氨酸形成 L-异亮氨酸中的应用。

本发明的氨基转移酶和异构酶形成的酶对在催化 L-异亮氨酸形成 L-别异亮氨酸或者催化 L-别异亮氨酸形成 L-异亮氨酸中的应用，所述的氨基转移酶为氨基转移酶 DsaD 或氨基转移酶 MfnO，所述的异构酶为异构酶 DsaE 或异构酶 MfnH，所述的氨基转移酶 DsaD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示，所述的异构酶 DsaE 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示，所述的氨基转移酶 MfnO 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，所述的异构酶 MfnH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

20 优选，所述的氨基转移酶 MfnO 的编码基因 *mfnO* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

优选，所述的异构酶 MfnH 的编码基因 *mfnH* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

优选，所述的氨基转移酶 DsaD 的编码基因 *dsaD* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

25 优选，所述的异构酶 DsaE 的编码基因 *dsaE* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

本发明主要涉及三方面的内容：一是利用生物信息学分析方法分别从 desotamides 和 marformycins 的生物合成基因簇中鉴定了参与 L-allo-Ile 生物合成的氨基转移酶/异构酶—DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH；二是通过体内基因敲除的方

法,对氨基转移酶/异构酶—DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH 进行体内缺失突变,获得生产含有 L-Val 结构单元的化合物 7, 9 和 11 (图 2) 的高产菌株 $\Delta mfnH$  和 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO , *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO; 三是本发明涉及利用鉴定的氨基转移酶/异构酶—DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH 在催化 L-Ile 转化生成 L-*allo*-Ile 中的应用,其特点在于,L-*allo*-Ile 的生成需要的两个酶协同作用,单独的氨基转移酶或者是异构酶均不能催化 L-*allo*-Ile 的生成,并且此催化过程不需要添加任何的辅因子。

本发明通过观察比较 L-*allo*-Ile 与 L-Ile 结构上的差别,发现的差别在  $\beta$  位的碳原子上的甲基的构象不同,其中,L-Ile 的  $\beta$  位的碳原子为 3*S* 型,而 L-*allo*-Ile 的  $\beta$  位的碳原子为 3*R* 型,因此本发明人推测 L-*allo*-Ile 可能由 L-Ile 转化形成,此转化过程能是氨基转移酶和异构酶两个酶分子协作完成两者之间的转变。首先是 L-Ile 在氨基转移酶的作用下,脱去氨基,变为羰基将  $\alpha$  位碳原子固定在平面内,使其不能自由旋转。其次在异构酶的作用下,完成  $\beta$  位的碳原子上甲基的翻转。本发明对 desotamides 和 marformycins 生物合成基因簇中分别被注释为氨基转移酶的 DsaD 和 MfnO 进行了生物信息学分析,多序列比对显示,DsaD/MfnO 与已经报道的支链氨基酸转移酶 (branched-chain aminotransferase, BCATs) 具有很高的序列同源性,并且具有与 IV-型氨基酸转移酶相同的特征基序 “EXGXXNLFXnLXTXnLXGVXR”, 以及具有与 PLP 共价相连的催化赖氨酸残基 (Lysine) (如图 3), 提示 DsaD/MfnO 具有 PLP-依赖的氨基转移酶活性。

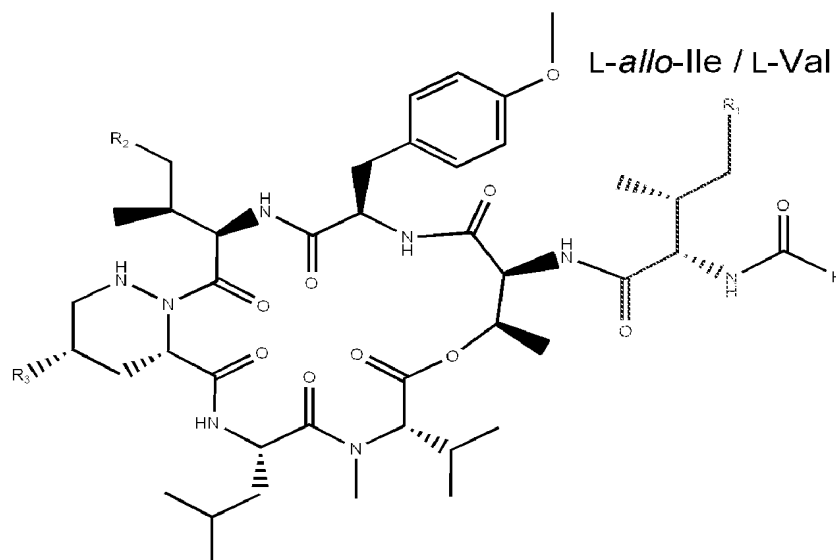
本发明还利用对蛋白进行结构同源性分析的在线资源 HHpred 分别对 desotamides 和 marformycins 的生物合成基因簇中被注释为异构酶的 DsaE 和 MfnH 进行了结构分析,显示其与属于核转运因子 2 超家族 (nuclear transport factor 2, NTF2) 的蛋白具有类似的二级结构折叠方式,核转运因子 2 超家族含有许多具有不同功能且彼此的氨基酸序列相似性很低的蛋白,包括已报道的 $\Delta^5$ -3-酮类固醇异构酶 ( $\Delta^5$ -3-ketosteroid isomerase), 其能够催化 $\Delta^5$ -3-酮固醇异构化生成 $\Delta^4$ -3-酮类固醇,本发明人推测 desotamides 基因簇中的 DsaE 和 marformycins 基因簇中的 MfnH 可能参与 L-Ile 的  $\beta$  碳原子上的甲基进行异构化生成 L-*allo*-Ile。在 marformycins 和 desotamides 的生物合成基因簇中分别鉴定到可能参与 L-*allo*-Ile 合成的氨基转移酶/异构酶酶对 (如图 4), 提示 L-*allo*-Ile 生物合成机制的具有保

守性。

本发明涉及在 marformycins 野生型产生菌 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 中对氨基转移酶/异构酶 MfnO/MfnH 的基因进行敲除突变 (如图 5 和 6), 构建了产生含有 L-Val 结构单元的化合物 7 的高产菌株  $\Delta mfnH$ 。通过 HPLC 对突变株  $\Delta mfnO$  和  $\Delta mfnH$  的发酵产物进行分析, 发现  $\Delta mfnH$  完全不生产含有 L-*allo*-Ile 结构单元的化合物 3 和 4, 但产生含有 L-Val 结构单元的化合物 5 和 7, 且化合物 7 的产量与野生型菌株相比提高约 100 倍左右 (如图 7);  $\Delta mfnO$  也完全不生产含有 L-*allo*-Ile 结构单元的化合物 4 (如图 7), 但仍能产生含有 L-Val 结构单元的化合物 5 和 7。这些数据证实了 MfnO/MfnH 在合成 L-*allo*-Ile 过程中的起到必不可少的作用, 由于 MfnO/MfnH 的缺失突变, 导致前体 L-*allo*-Ile 不能合成, 因此, 与 L-*allo*-Ile 具有相似结构的 L-Val 能够在合成 marformycin 的过程中以毫无竞争的优势整合到 marformycins 肽链骨架中, 从而获得产生含有 L-Val 结构单元的化合物 7 的高产菌株  $\Delta mfnH$ 。

因此, 本发明的第二个目的是提供一种高产化合物 7 的菌株  $\Delta mfnH$ , 其特征在于, 所述的菌株  $\Delta mfnH$  是将野生型 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 的 *mfnH* 基因进行敲除缺失突变而获得的;

所述的化合物 7 的结构式如式 1 所示, 其中  $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ,  $R_3=OH$ ;

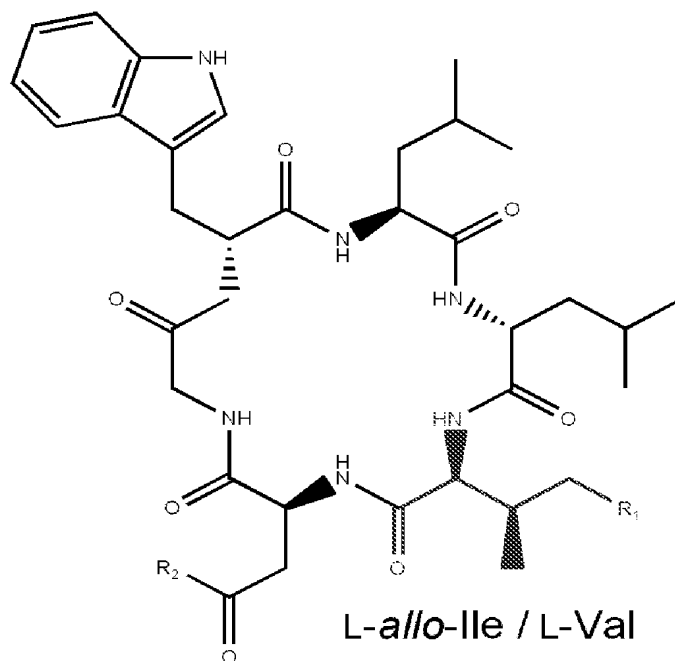


本发明还涉及对 desotamides 基因簇中的氨基转移酶/异构酶——DsaD/DsaE

的基因进行同框敲除突变 (in-frame deletion), 然后在异源宿主 *Streptomyces coelicolor* M1152 中进行表达 (如图 8 和 9), 构建了产生含 L-Val 结构单元的化合物 9 和 10 的高产菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 和 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO。通过 HPLC 对 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 和 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 的发酵产物进行分析, 发现 *dasE* 基因已经被同框缺失突变的 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 完全不生产含有 L-*allo*-Ile 结构单元的化合物 8 和 10, 但仍能生产含有 L-Val 结构单元的化合物 9 和 11, 且这两个化合物的产量与对照菌株相比均大大提高 (化合物 9 约 100 倍, 化合物 11 约 140 倍左右) (如图 10)。 *dsaD* 基因已经被同框缺失突变的异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 虽然仍能产生含有 L-*allo*-Ile 结构单元的化合物 8 和 10, 但其产量大大降低, 其仍能产生的含有 L-Val 结构单元的化合物 9 和 11, 且产量却大大提高 (化合物 9 约 80 倍; 化合物 11 约 50 倍) (如图 10)。这些数据也同样说明 DsaD/DsaE 在合成 L-*allo*-Ile 过程中的起到必不可少的作用。

因此, 本发明的第三个目的是提供一种高产化合物 9 和 11 的菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 或 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO, 其特征在于, 所述的菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 是将 *DsaE* 基因同框缺失突变的 *desotamides* 的生物合成基因簇导入菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152 中并进行表达而获得的, 所述的 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 是将 *DsaD* 基因同框缺失突变的 *desotamides* 的生物合成基因簇导入菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152 中并进行表达而获得的;

所述的化合物 9 和 11 的结构如式 2 所示, 其中化合物 9:  $R_1=H$ ,  $R_2=NH_2$ ; 化合物 11:  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ;



式 2。

本发明还涉及到在大肠杆菌 *E. coli* (DE3) 中对氨基转移酶/异构酶  
 5 —DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH 进行表达、纯化（如图 11），获得的酶对能够在不  
 添加任何辅因子的条件下，催化底物 L-Ile 转化形成 L-allo-Ile。在 pH 8.0 的 50 mM  
 磷酸盐缓冲液中，在不添加任何辅因子的条件下，DsaD/DsaE 或者 MfnO/MfnH  
 协作催化底物 L-Ile 转化生成 L-allo-Ile，转化率达到约 67%（如图 12），但单独  
 的氨基转移酶 DsaD/MfnO 或者单独的异构酶 DsaE/MfnH 不能催化 L-Ile 转化生  
 10 成 L-allo-Ile。DsaD/DsaE 或者 MfnO/MfnH 协作催化 L-Ile 转化生成 L-allo-Ile 属  
 于可逆反应，当以 L-allo-Ile 为底物时，在以上相同反应条件下，可以获得产物  
 L-Ile（如图 14）。以 L-Ile 为底物时，DsaD/DsaE 催化的可逆反应的平衡常数为  
 1.37（如图 15）。Desotamides 与 marformycins 生物合成途径中的氨基转移酶和异  
 15 构酶可以实现功能上的互补，DsaD/MfnH 和 MfnO/DsaE 可以协作催化 L-Ile 与  
 L-allo-Ile 之间的相互转化（如图 16）。

本发明公开了由氨基转移酶和异构酶组成的酶对在催化形成 L-别异亮氨酸  
 （L-allo-Ile）或 L-异亮氨酸中的应用。从而在酶学水平上解释 L-allo-Ile 的生物  
 合成机制奠定了重要的基础。L-allo-Ile 生物合成酶学机制的解释，将为利用绿  
 色的酶学方法制备 L-allo-Ile，以及对枫糖尿症的诊断和治疗具有重要的实用意



义。

本发明的链霉菌 *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 公开于文献: Yongxiang Song, Qinglian Li, Xue Liu, Yuchan Chen, Yun Zhang, Aijun Sun, Weimin Zhang, Jingren Zhang, and Jianhua Ju, Cyclic Hexapeptides from the Deep South China Sea-Derived *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 Active Against Pathogenic Gram-Positive Bacteria. J. Nat. Prod., 2014, 77 (8), pp 1937 - 1941。该菌株本申请人也持有，保证自 20 年内向公众提供。

本发明的 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 菌株公开于 Xiao Zhou, Hongbo Huang, Jie Lia, Yongxiang Song, Renwang Jiang, Jing Liu, Si Zhang, Yan Hua, Jianhua Ju. New anti-infective cycloheptadepsipeptide congeners and absolute stereochemistry from the deep sea-derived *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141. Tetrahedron. Volume 70, Issue 42, 21 October 2014, Pages 7795 - 7801。该菌株本申请人也持有，保证自 20 年内向公众提供。

本发明的天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) M1152 公开于硕士论文: 夏娟. 红树林来源 *Streptomyces* sp. OUC6819 中 Drimentines 类化合物生物合成研究. 中国海洋大学. 2013 年。该菌株本申请人也持有，保证自 20 年内向公众提供。

#### 附图说明:

图 1 是 L-异亮氨酸 (L-Ile)、D-异亮氨酸 (D-Ile)、L-别异亮氨酸 (L-*allo*-Ile) 和 D-别异亮氨酸 (D-*allo*-Ile) 的化学结构式。

图 2 是 marformycins 和 desotamides 化学结构式，其中 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 分别表示化合物 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11。

图 3 是氨基转移酶 DsaD/MfnO 与已经报道的支链氨基酸转移酶的多重序列比对。箭头所指为保守的与 PLP 共价结合的赖氨酸催化参加，方框所指的是 IV-氨基转移酶的特征基序 “EXGXXNLFX<sub>n</sub>LXTX<sub>n</sub>LXGVXR”。

图 4 是 maformycins 和 desotamides 的生物合成基因簇中氨基转移酶和异构酶的所在位置。氨基转移酶 DsaD/MfnO 用红色标出；异构酶 DsaE/MfnH 用绿色标出。

图 5 是利用 PCR-targeting 技术在 marformtcins 产生菌中对氨基转移酶基因 *mfnO* 进行缺失突变。(A) 突变过程示意图；(B) 对突变株  $\Delta mfnO$  进行 PCR 鉴

定，W：以野生型菌株 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 的基因组 DNA 为模板；M：以突变株  $\Delta mfnO$  基因组 DNA 为模板，maker: NDA 分子量标准品。

图 6 是利用 PCR-targeting 技术在 marformtcins 产生菌中对氨基转移酶基因 *mfnH* 进行缺失突变。(A) 突变过程示意图；(B) 对突变株  $\Delta mfnH$  进行 PCR 鉴定，W：以野生型菌株 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 的基因组 DNA 为模板；M：以突变株  $\Delta mfnH$  基因组 DNA 为模板，maker: NDA 分子量标准品。

图 7 是突变株  $\Delta mfnO$  和  $\Delta mfnH$  发酵产物的 HPLC 分析。

图 8 是 *dsaD* 基因的同框缺失突变以及在异源宿主 *Streptomyces coelicolor* M1152 中的表达。(A) 示意图；(B) 缺失突变的 PCR 鉴定，WT：以对照菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152 的基因组 DNA 为模板；DKO：以异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 基因组 DNA 为模板，M: DNA 分子量标准品。

图 9 是 *dsaE* 基因的同框缺失突变以及在异源宿主 *Streptomyces coelicolor* M1152 中的表达。(A) 示意图；(B) 缺失突变的 PCR 鉴定，WT：以对照菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152 的基因组 DNA 为模板；EKO：以异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 基因组 DNA 为模板，M: DNA 分子量标准品。

图 10 是 *dsaD* 和 *dsaE* 基因已经被同框缺失突变的异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 和 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 的发酵产物的 HPLC 分析。i: 对照菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152； ii: 含有 desotamides 的生物合成基因簇的异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H； iii: *dsaD* 已经被同框缺失突变的异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO； iv: *dsaE* 已经被同框缺失突变的异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO。

图 11 是 DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH 在大肠杆菌 *E. coli* (DE3) 中进行表达、纯化后利用 SDS-PAGE 进行分析。

图 12 是纯化的重组 DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH 在体外催化 L-Ile 转化生成 L-*allo*-Ile。

图 13 是由利用 DsaD/DsaE 制备获得酶促产物 L-*allo*-Ile 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。A:

酶促产物 L-*allo*-Ile 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱；B: L-*allo*-Ile 标准品的  $^1\text{H}$  NMR 图谱

图 14 是纯化的重组 DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH 在体外催化 L-*allo*-Ile 转化生成 L-Ile。

图 15 是 DsaD/DsaE 催化的可逆反应的平衡常数的测定。但以 L-Ile 为底物时,平衡常数  $K_{eq}$  根据公式计算可得  $K_{eq} = ([\text{L-}i\text{allo-Ile}]/[\text{L-Ile}]) = (2.89/2.11) = 1.37$ 。

图 16 是来源于不同生物合成途径的氨基转移酶/异构酶对 DsaD/MfnH 和 MfnO/DsaE 可以协作催化 L-Ile 与 L-*allo*-Ile 之间的相互转化。

### 具体实施方式:

以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

#### 10 实施例 1

*mfnO* 基因(其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示,其编码的氨基转移酶 MfnO 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示)和 *mfnH* 基因(其核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示,编码的异构酶 MfnH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示)在野生型产生菌 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 中的缺失突变

15 利用 PCR-targeting 的方法获得体外敲除突变株。根据获得的 marformycins 的生物合成基因簇序列,参照文献报道的 PCR-targeting 系统,设计一对 *mfnO* 和 *mfnH* 基因的敲除引物,引物序列见于表 1 中的 *mfnO* 和 *mfnH* 敲除引物。然后参照 PCR-targeting 的方法构建体外敲除质粒然后转入到接合转移的供体菌中。具体步骤如下:(1) 将含有 marformycins 的生物合成基因簇的 cosmid 质粒(质粒  
20 cosmid 247E, marformycins 的生物合成基因簇的核苷酸序列的 GenBank 登录号为: KP715145.1)转入大肠杆菌 *E. coli* BW25113/pIJ790 中获得含有目的质粒的 *E. coli* BW25113/pIJ790 菌株,用 10 mM 的 L-阿拉伯糖诱导  $\lambda$ /red 重组系统表达,并将其制备成为电转感受态细胞待用。(2) 用内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切质粒 pIJ778,回收其中约 1.4 kb 含有转移原点 (*oriT*) 和壮观霉素 (spectinomycin)  
25 抗性基因的 DNA 片段,以此作为 PCR 模板,用引物 mfnOdelF/mfnOdelR 和 mfnHdelF/mfnHdelR 通过 PCR 分别扩增出 1.4 kb 的 PCR 产物,50  $\mu\text{L}$  的 PCR 反应体系:高保真 DNA 聚合酶 3 U, 10 $\times$ Buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 0.5 mmol/L, DMSO 2.5  $\mu\text{L}$ , 引物各 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , DNA 模板约 1 ng,加水补至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min;扩增循环为 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸

90 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。将 1.4 kb 的 PCR 产物分别回收纯化待用。(3) 分别将 PCR 产物电转入 (1) 步骤中制备的感受态细胞 *E. coli* BW25113/pIJ790 中使其发生重组, 涂布于 LB 筛选平板(含 100 µg/mL 氨苄青霉素, 50 µg/mL 卡那霉素, 50 µg/mL 壮观霉素)上, 37℃ 过夜培养。从平板上挑出阳性单克隆, 抽提质粒, 重组质粒命名为 delmfnO 和 delmfnH, delmfnO 和 delmfnH 中的 *mfnO* 和 *mfnH* 基因的部分片段分别被转移原点和壮观霉素抗性基因取代。(4) 将构建好的重组突变质粒 delmfnO 和 delmfnH 分别转化到 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中, 获得重组菌株 *E. coli* ET12567/pUZ8002/delmfnO 和 *E. coli* ET12567/pUZ8002/delmfnH, 作为接合转移的供体菌。

野生型链霉菌 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 菌株在 ISP2 培养基(麦芽提取物 4 g, 酵母提取物 4 g, 葡萄糖 4 g, 海盐 30 g, 琼脂粉 20 g, 加水至 1L, pH 7.2)平板中划线培养 3-5 天, 长出的孢子用无菌棉签收集于的 TSB 培养基中, 涡旋振荡, 使孢子分散。过滤分离菌丝体和孢子, 孢子悬浮于 5 mL 的 TSB 培养基中, 50℃ 热激 10 min, 然后于 28℃ 萌发 2-4 小时, 作为接合转移的受体菌。

当供体菌 *E. coli* ET12567/pUZ8002/delmfnO 和 *E. coli* ET12567/pUZ8002/delmfnH 分别在 50 mL 含 50 µg/mL 卡那霉素, 25 µg/mL 氯霉素和 50 µg/mL 壮观霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 生长至 OD600 值约为 0.6 时, 离心收集菌体(4000 rpm, 10 min), 用 LB 清洗菌体 3 遍, 悬浮于 300 µL LB 培养基中, 作为接合转移的供体菌。取上述受体菌 400 µL 和供体菌 100 µL 混合均匀, 涂布于不含任何抗生素的 M-ISP4 固体培养基(可溶性淀粉 10 g, 酵母提取物 0.5 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 海盐 30 g, 微量元素 100 µL, 加水至 1L, pH 7.2) 上, 吹干后, 于 28℃ 培养 18-20 h。然后将平板取出, 用含有抗生素的水覆盖平板, 其终浓度为 100 µg/mL 壮观霉素和 50 µg/mL 甲氧苄氨嘧啶, 吹干后, 置于 28℃ 培养箱中, 培养 3-4 天后观察。

当接合转移平板上长出小菌落后, 用无菌牙签将其转接到含有 100 µg/mL 壮观霉素和 50 µg/mL 甲氧苄氨嘧啶的 ISP2 平板上, 28℃ 培养 2-3 天后, 抽取各个突变株的基因组 DNA, 利用检测引物(引物序列见于表 2 中的 *mfnO* 和 *mfnH* 的检测引物序列)通过 PCR 检测获得阳性克隆, 即获得氨基转移酶 *mfnO* 基因敲除双交换突变菌株  $\Delta$ *mfnO* 和异构酶 *mfnH* 基因敲除双交换突变菌株  $\Delta$ *mfnH*。

表 1：构建 *mfnO* 和 *mfnH* 基因突变株所需的敲除引物名称和序列

基因	引物配对名称和序列(5'→3')
<i>mfnO</i>	mfnOdelF : ACCTCGGCGTCTTCGGCCGACCGGCGTCGAGAGGCGCT Cattccggggatccgtcgacc
	mfnOdelR : ATACGAATCGGCTGCCTCGCCGCGGTGTACGGCAGCTAG tgtaggctggagctgcttc
<i>mfnH</i>	mfnHdelF: ATCCGTCGCTACTACGAACTAGTGGACGCGGCGGATTAC attccggggatccgtcgacc
	mfnHdelR: CTGATCCGCGAAATAGGTGTACCGACGCCAGATCTTCTC tgtaggctggagctgcttc

表 2：构建 *mfnO* 和 *mfnH* 基因突变株所需的检测引物名称和序列

基因	引物配对名称和序列(5'→3')
<i>mfnO</i>	mfnOTF: ACGACGATCCGATCAGCCGC
	mfnOTR: CTGTCTGACGGCGCTCCAGT
<i>mfnH</i>	mfnHTF: GAGGAATGGTTCACAGCTGCC
	mfnHTR: TCTCTTCCAGAGCGATGGCGA

5           **实施例 2**

*dsaD* 基因（其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，其编码的氨基转移酶 DsaD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示）和 *dsaE* 基因（其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示，其编码的异构酶 DsaE 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示）的同框缺失突变及在异源宿主 *Streptomyces coelicolor* M1152 中的表达

10           首先是对 *dsaD* 和 *dsaE* 基因进行同框缺失突变。具体操作过程如下：（1）参照文献报道的 PCR-targeting 系统，首先通过内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切质粒 pIJ773，回收其中约 1.4 kb 含有转移原点（*oriT*）和阿普拉霉素（apramycin）抗性基因的 DNA 片段，作为 PCR 扩增敲除 *dsaD* 和 *dsaE* 基因所需的 DNA 片段。

          （2）根据 *dsaD* 和 *dsaE* 基因的序列，分别设计一对敲除引物，此引物特点在于，  
15       有 39 个核苷酸与目标缺失突变基因同源（见表 3，大写字母所示），有 19 或者

20 个核苷酸与抗性基因片段左端或者右端同源（见表 3，小写字母所示），此外，在 39 个核苷酸和 19/20 个核苷酸之间加入了内切酶 *SpeI* 位点（见表 3，*SpeI* 位点用下划线标出）。利用此引物，以回收的 1.4 kb 含有转移原点（*oriT*）和阿普拉霉素（apramycin）抗性基因的 DNA 片段作为模板，进行 PCR 扩增获得 1.4 kb 的 PCR 产物，50  $\mu$ L 的 PCR 反应体系：高保真 DNA 聚合酶 3 U，10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L，dNTPs 0.5 mmol/L，DMSO 2.5  $\mu$ L，引物各 0.5  $\mu$ mol/L，DNA 模板约 1 ng，加水补至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min；扩增循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s，58 $^{\circ}$ C 退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s，30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 1.4 kb 的 PCR 产物分别回收纯化待用。（3）接下来选择 SuperCos1 质粒来源的粘粒 07-6H 作为对 *dsaD* 和 *dsaE* 进行同框缺失突变的起始粘粒，此粘粒含有 desotamides 的生物合成基因簇（desotamides 的生物合成基因簇的核苷酸序列的 GenBank 登录号为：KP769807.1）。将粘粒 07-6H 转入大肠杆菌 *E. coli* BW25113/pIJ790 中获得 *E. coli* BW25113/pIJ790/07-6H，用 10 mM 的 L-阿拉伯糖诱导  $\lambda$ /red 重组系统表达，并将其制备成为电转感受态细胞待用。（4）分别将（2）步骤中获得的 1.4 kb PCR 产物电转入（3）步骤中制备的感受态细胞 *E. coli* BW25113/pIJ790/07-6H 中使其发生重组，涂布于 LB 筛选平板（含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素，50  $\mu$ g/mL 卡那霉素，50  $\mu$ g/mL 阿普拉霉素）上，37  $^{\circ}$ C 过夜培养。从平板上挑出阳性单克隆，抽提质粒，重组粘粒命名为 07-6H-DKO 和 07-6H-EKO，07-6H-DKO 和 07-6H-EKO 中的 *dsaD* 和 *dsaE* 基因的部分片段分别被转移原点和阿普拉霉素抗性基因取代。（5）利用 *SpeI* 对重组粘粒 07-6H-DKO 和 07-6H-EKO 进行酶切，经酚：氯仿抽提，乙醇沉淀后，用 T4 连接酶进行连接，转化感受态细胞 *E. coli* DH5，涂布于含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素，50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上，于 37  $^{\circ}$ C 过夜培养。利用检测引物（见表 4）对克隆进行 PCR 鉴定，挑取丢失转移原点和阿普拉霉素抗性基因 DNA 片段而自连的粘粒，命名为 07-6H-DKO-IF 和 07-6H-EKO-IF。

接下来是将 *dsaD* 和 *dsaE* 基因已经被同框缺失突变的粘粒 07-6H-DKO-IF 和 07-6H-EKO-IF 导入到异源宿主 *Streptomyces coelicolor* M1152 中进行表达。在导入 *Streptomyces coelicolor* M1152 之前，首先要对粘粒 07-6H-DKO-IF 和 07-6H-EKO-IF 进行改造，以适合进行异源表达。改造的策略是利用大肠杆菌的  $\lambda$ /red 重组系统将粘粒 07-6H-DKO-IF 和 07-6H-EKO-IF 上的来源于质粒 SuperCos1

的卡那霉素抗性基因分别用含有阿普拉霉素抗性基因 *aac(3)IV*, 接合转移原点原件 *oriT*, 整合酶基因和 *int $\psi$ C31* 整合位点的 NDA 片段替换。此 *aac(3)IV-oriT-int $\psi$ C3* 的 DNA 片段来源于本实验室构建的质粒 pSET152AB, 利用 *BamH I/EcoR I* 完全酶切质粒 pSET152AB 后, 回收 5.5kb 左右片段, 此片段含有 *aac(3)IV-oriT-int $\psi$ C3* DNA 片段以及与被替换的卡那霉素基因两侧同源的 1.0 kb DNA 片段)。

将 07-6H-DKO-IF 和 07-6H-EKO-IF 转入到 *E.coli* BW25113/ pIJ790 中, 获得 *E.coli* BW25113/ pIJ790/07-6H-DKO-IF 和 *E.coli* BW25113/ pIJ790/07-6H-EKO-IF。将约 100 mg 回收的 5.5 kb DNA 片段分别加入到 *E.coli* BW25113/ pIJ790/07-6H-DKO-IF 和 *E.coli* BW25113/ pIJ790/07-6H-EKO-IF 感受态细胞中,

转入电击杯中, 1.4 kv 电压进行电转化。电击完成后迅速加入预冷的 0.5 mL 的 LB 培养基, 37 °C 复苏 1 小时后涂布于含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素和 50  $\mu$ g/mL 阿普拉霉素的 LB 平板。12 小时后待转化子长出后, 通过检测引物 (表 4) 利用 PCR 验证阳性的重组质粒, 阳性重组质粒命名为 07-6H-DKO-AB 和 07-6H-EKO-AB。将构建好的重组质粒电转到 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中, 获得

*E. coli* ET12567 / pUZ8002 /07-6H-DKO-AB 和 *E. coli* ET12567/ pUZ8002/07-6H-EKO-AB 作为接合转移的供体菌。

接下来是将 *E. coli* ET12567/pUZ8002 /07-6H-DKO-AB 和 *E. coli* ET12567/pUZ8002 /07-6H-EKO-AB 与 *Streptomyces coelicolor* M1152 进行接合转移。将菌株 *E. coli* ET12567/ pUZ8002 /07-6H-DKO-AB 和 07-6H-EKO-AB 分别接种于 3 mL 的 LB 液体培养基 (含有含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素, 50  $\mu$ g/mL 阿普拉霉素, 25  $\mu$ g/mL 氯霉素和 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素) 中, 37 °C 培养 12 小时后, 取 40  $\mu$ L 菌液转接于 4 mL 相同培养基中培养至 OD 为 0.6, 离心收集菌体, 用不含任何抗生素的 LB 液体培养基洗涤 2 次, 洗去抗生素, 离心浓缩菌体, 备用。

与此同时, 10 % 甘油收集 *S. coelicolor* M1152 孢子, 经过滤器过滤后, 3600 rpm 离心 8 min, 弃上清, 加入适量 LB 培养基悬浮孢子, 置于 50°C 水浴中热激 10 分钟。将转化菌株 *E. coli* ET12567/pUZ8002/07-6H-DKO-AB 和 07-6H-EKO-AB 分别与 *S. coelicolor* M1152 孢子按照体积比 2:1 比例混合, 涂布于 MS + MgCl<sub>2</sub> (终浓度为 10 mM) 固体平板上。20~24 小时后, 将平板取出, 用含有抗生素的水覆盖平板, 其终浓度为 100  $\mu$ g/mL 阿普拉霉素和 50  $\mu$ g/mL 甲氧苄氨嘧啶,

吹干后，置于 28 ℃培养箱中，培养 3-4 天后观察。当接合转移平板上长出小菌落后，用无菌牙签将其转接到含有 100 μg/mL 阿普拉霉素和 50 μg/mL 甲氧苄氨嘧啶的 MS 培养基（大豆粉 20 g，甘露醇 20 g，琼脂粉 20 g，加水至 1L，pH 7.2）平板上，28℃培养 2-3 天后，抽取各个突变株的基因组 DNA，利用检测引物（引物序列见于表 4）通过 PCR 检测获得阳性克隆，分别获得 *dsaD* 和 *dsaE* 基因已经被同框缺失突变的 *desotamides* 生物合成基因簇异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 和 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO。

表 3：构建 *dsaD* 和 *dsaE* 基因突变株所需的敲除引物名称和序列

基因	引物配对名称和序列(5'→3')
<i>dsaD</i>	<i>dsaDdelF</i> : GGAGTCGGGCAGTTCGCCGCGCTGGATGCCGAACAGCGC <u>ACTAGT</u> attccggggatccgtcgacc ( <i>SpeI</i> 酶切位点如下划线所示)
	<i>dsaDdelR</i> : ACGGAGCGCTGCGCCGCCCCCGCCTTCGGCACCGCGTTTC <u>ACTAGT</u> tgtaggctggagctgcttc ( <i>SpeI</i> 酶切位点如下划线所示)
<i>dsaE</i>	<i>dsaEdelF</i> : CAGTGGGGCGAAGAAGTACGTGTACGCCGACTGAACCG <u>ACTAGT</u> attccggggatccgtcgacc ( <i>SpeI</i> 酶切位点如下划线所示)
	<i>dsaEdelR</i> : GAGAGCTCTCCCACCGAGGTCAATGAGGCCCGGGTGCCT <u>ACTAGT</u> tgtaggctggagctgcttc ( <i>SpeI</i> 酶切位点如下划线所示)

10

表 4：构建 *dsaD* 和 *dsaE* 基因突变株所需的检测引物名称和序列

基因	引物配对名称和序列(5'→3')
<i>dsaD</i>	<i>mfnOTF</i> : GCTGTGACGCGACGAGTT
	<i>mfnOTR</i> : GGCCGGAGTGCAATATCG
<i>dsaE</i>	<i>mfnHTF</i> : TCCTGTGGCGGTTCGTG
	<i>mfnHTR</i> : ACAGCCCGTACACACCG

实施例 3

marformycins 的生物发酵与检测：

15 将海洋链霉菌 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 野生菌或突变株△



*mfnO* 和  $\Delta mfnH$  在 ISP2 培养基（麦芽提取物 4 g，酵母提取物 4 g，葡萄糖 4 g，海盐 30 g，琼脂粉 20 g，加水至 1L，pH 7.2）平板上活化产孢后，将等量的孢子分别接种到 250 mL 三角瓶的 50 mL m-AM2ab 发酵培养基（大豆粉 10 g，淀粉 5 g，蛋白胨 2 g，葡萄糖 20 g，酵母膏 2 g， $K_2HPO_4$  0.5 g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g，碳酸钙 2 g，海盐 30 g，加水至 1L，pH 7.0）中，于 28 °C，200 rpm 条件下摇菌发酵。培养第 7 天后加入 100 mL 的丁酮进行萃取，超声 30 min 破碎细胞，然后静置分层。待丁酮萃取液与水相分离后，吸取上清萃取液用旋转蒸发仪将丁酮蒸干，残留物溶解于甲醇形成样品，进行高效液相色谱（HPLC）检测。

检测条件为：Alltima C18（250×4.6mm，5 $\mu$ m）反相柱，流动相 A 相为 15% 乙腈，含 0.03% 乙酸，流动相 B 相为 85% 乙腈；流速为 1 mL/min，检测波长为 215 nm 和 275 nm。

HPLC 进样程序：0-20min, 0%-100% B 相；20-25min, 100% B 相；25.01-30min, 100%-0% B 相。

结果如图 7 所示，野生型产生菌 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 产生化合物 3，4 和 5， $\Delta mfnH$  完全不生产含有 L-allo-Ile 结构单元的化合物 3 和 4，但产生含有 L-Val 结构单元的化合物 5 和 7，且化合物 7 的产量与野生型菌株相比提高约 100 倍左右（如图 7）； $\Delta mfnO$  也完全不生产含有 L-allo-Ile 结构单元的化合物 4，但仍产生含有 L-Val 结构单元的化合物 5 和 7（如图 7）。

#### 实施例 4

desotamides 的生物发酵与检测：

将 desotamides 野生型产生菌 *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 涂布于 ISP4 培养基平板上活化产孢，以及将异源表达对照菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152，*dsaD* 和 *dsaE* 缺失突变异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 和 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 涂布于 MS 培养基（大豆粉 20 g，甘露醇 20 g，琼脂粉 20 g，加水至 1L，pH 7.2）平板上活化产孢。将等量的孢子分别接种到 250 mL 三角瓶的 50 mL m-AM2ab 发酵培养基（大豆粉 10 g，淀粉 5 g，蛋白胨 2 g，葡萄糖 20 g，酵母膏 2 g， $K_2HPO_4$  0.5 g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g，碳酸钙 2 g，海盐 30 g，加水至 1L，pH 7.0）中，于 28 °C，

200 rpm 条件下摇菌发酵。培养第 7 天后加入 100 mL 的丁酮进行萃取, 超声 30 min 破碎细胞, 然后静置分层。待丁酮萃取液与水相分离后, 吸取上层丁酮萃取液用旋转蒸发仪将丁酮蒸干, 残留物溶解于甲醇形成样品, 进行高效液相色谱(HPLC)检测。

5 检测条件为: Alltima C18 (250×4.6mm, 5μm) 反相柱, 流动相 A 相为 15% 乙腈, 含 0.03% 乙酸, 流动相 B 相为 85% 乙腈; 流速为 1 mL/min, 检测波长为 215 nm 和 275 nm。

HPLC 进样程序: 0-20min, 0%-100% B 相; 20-25min, 100% B 相; 25.01-30min, 100%-0% B 相;

10 结果如图 10 所示, *dasE* 基因已经被同框缺失突变的 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 完全不生产含有 L-*allo*-Ile 结构单元的化合物 **8** 和 **10**, 但仍能生产含有 L-Val 结构单元的化合物 **9** 和 **11**, 且这两个化合物的产量与对照菌株相比均大大提高 (化合物 **9** 约 100 倍, 化合物 **11** 约 140 倍左右) (如图 10)。 *dsaD* 基因已经被同框缺失突变的异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 虽然仍能产生含有 L-*allo*-Ile 结构单元的化合物 **8** 和 **10**, 但其产量大大降低; 此外, 其仍能产生的含有 L-Val 结构单元的化合物 **9** 和 **11**, 且产量却大大提高 (化合物 **9** 约 80 倍; 化合物 **11** 约 50 倍)。

### 实施例 5

20 氨基转移酶 DsaD (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示)、异构酶 DsaE (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示)、氨基转移酶 MfnO (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示) 和异构酶 MfnH (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示) 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达和纯化:

25 将 *dsaD* (其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示)、*dsaE* (其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示)、*mfnO* (其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示)、*mfnH* (其核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示) 基因按照常规方法克隆至载体 pET28a (+) 的 *Nde*I 和 *Eco*RI 位点之间以得到 pET28a (+) /*dsaD*, pET28a (+) /*dsaE*, pET28a (+) /*mfnO*, pET28a (+) /*mfnH*, 经测序正确后, 然后转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 以表达。将得到的转化菌株挑取单克隆过夜培养后按 1% 的接种量接入到规格为

1 L 的三角瓶中含有 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的 200 mL LB 培养液体（每个菌株共接种 1 L LB 培养基），于 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床 200 rpm/min 培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6 时，往培养液中加入终浓度为 0.1mM 的异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG），于 25 $^{\circ}\text{C}$  继续诱导表达 12-15 h。离心收集菌体，用 50 mL binding buffer（50 mM 磷酸钠，500 mM NaCl, 10 mM 咪唑, pH 8.0）洗涤菌体 2 遍后，重悬于 30 mL binding buffer 中，进行超声波破碎以释放蛋白，然后高速冷冻低温离心除去不溶部分。将可溶性上清部分上样到镍柱 HisTrap HT column（1 mL, GE Healthcare）上，待滤液全部过滤完后，用 10 mL wash buffer 1（50 mM 磷酸钠，500 mM NaCl, 50 mM 咪唑, pH 8.0）冲洗，再用 2 mL wash buffer 2（50 mM 磷酸钠，500 mM NaCl, 90 mM 咪唑, pH 8.0）冲洗，然后用 5 mL elution buffer（50 mM 磷酸钠，500 mM NaCl, 250 mM 咪唑, pH 8.0）洗脱。用超滤管（Millipore, 10 mL, 3 kD）浓缩至 2.5 mL，经 PD-10 脱盐柱（GE Healthcare）脱盐后，储存于含 10%甘油的磷酸钠 1 缓冲液（50 mM, pH 8.0），采用 Bradford 方法进行测定蛋白浓度测定，分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$  备用，由此分别得到纯化的氨基转移酶 DsaD, 异构酶 DsaE, 氨基转移酶 MfnO 和异构酶 MfnH。纯化后的蛋白电泳图如图 11 所示。

## 实施例 6

DsaD/DsaE 和 MfnO/MfnH 体外酶促反应及检测：

（1）以 L-Ile 为底物时检测氨基转移酶 DsaD/异构酶 DsaE 和氨基转移酶 MfnO/异构酶 MfnH 的酶活性：在 100  $\mu\text{L}$  磷酸钠缓冲液（50 mM, pH 8.0）中，加入 1 mM 的底物 L-Ile, 5  $\mu\text{M}$  氨基转移酶 DsaD 或者 MfnO, 5  $\mu\text{M}$  异构酶 DsaE 或者 MfnH, 置于 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 4 小时。

（2）以 L-*allo*-Ile 为底物时检测氨基转移酶 DsaD/异构酶 DsaE 和氨基转移酶 MfnO/异构酶的酶活性：在 100  $\mu\text{L}$  磷酸钠缓冲液（50 mM, pH 8.0）中，加入 1 mM 的底物 L-*allo*-Ile, 5  $\mu\text{M}$  氨基转移酶 DsaD 或者 MfnO, 5  $\mu\text{M}$  异构酶 DsaE 或者 MfnH, 置于 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 4 小时。

反应结束后，加入 200  $\mu\text{L}$  的甲醇以终止反应，涡旋震荡，于室温静置 20 分钟后，1,2000  $\times g$  离心 20 分钟，取上清用旋转蒸发仪蒸干，残留物溶于 40  $\mu\text{L}$  2 mM CuSO<sub>4</sub> 溶液，取 25  $\mu\text{L}$  进行手性 HPLC 分析，以检测酶促反应情况。手性

HPLC 分析条件为：使用 MCI GEL CRS10W column (Mitsubishi, 50 × 4.6 mm, 3 μm) 手性分析柱；流动为 2 mM CuSO<sub>4</sub> 溶液；流速为 1 mL/min，检测时间为 30 分钟，检测波长为 254 nm。

## 5 实施例 7

### 一、以 L-Ile 作为底物进行催化

(1) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中，加入 1 mM 的底物 L-Ile, 5 μM 氨基转移酶 DsaD, 5 μM 异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。反应结束后，加入 20 mL 的甲醇以终止反应，涡旋震荡，于室温静置 20 分钟后，  
10 1,2000 × g 离心 20 分钟，取上清蒸干，残留物溶于 2 mM CuSO<sub>4</sub> 溶液，利用手性 HPLC 进行纯化，条件为：使用 MCI GEL CRS10W column (Mitsubishi, 50 × 4.6 mm, 3 μm) 手性分析柱；流动相为 2 mM CuSO<sub>4</sub> 溶液；流速为 1 mL/min，检测时间为 30 分钟，检测波长为 254 nm。将滞留时间为 13 分钟的馏分接出合并后，加入乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 至终浓度为 2 mM, 15 并将以上混合液的 pH 值调至 4.0。用等体积的正庚烷和二- (2-乙基己基磷酸) 的混合液 (7: 3) 对以上 pH 4.0 溶液进行抽提两遍，收集合并有机相。用等体积的 5% 的 HCl 溶液对以上收集合并的有机相反萃两遍，收集合并水相。将收集合并的水性蒸干，残留物进一步用正向硅胶柱进行纯化 (利用正丁醇-冰醋酸-水 (4: 1: 5) 进行等梯度洗脱)，获得纯的酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12A 中的 V, 图 12A 和 12B 中 i 和 ii 分别为 L-Ile 和 L-*allo*-Ile 的标准品)。其 <sup>1</sup>H NMR 图谱如图 20 13 所示。

**酶促反应产物 L-*allo*-Ile:** HR-ESI-MS [M + H]<sup>+</sup> = 132.1038 (calc. for C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, 132.1019); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O), δ 0.86 (3H, t, J = 7.5 Hz), 0.83 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.19 ~ 1.40 (2H, m), 1.96 (1H, m), 3.62 (1H, m). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 23.4° (c 0.0575, aq HCl, pH 2.5). CD [θ]<sub>202</sub> + 165.7° (c 0.0575, aq. HCl, pH 2.5). 25

**L-*allo*-Ile 标准品:** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O), δ 0.86 (3H, t, J = 8.0 Hz), 0.84 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.20 ~ 1.40 (2H, m), 1.98 (1H, m), 3.64 (1H, m). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 23.2° (c 0.1, aq HCl, pH 2.5). CD [θ]<sub>202</sub> + 333.3° (c 0.1, aq. HCl, pH 2.5).

(2) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中，加入 1 mM 的底物 L-Ile,

5  $\mu\text{M}$  氨基转移酶 DsaD, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。按照步骤 (1) 的进行分析和结构鉴定, 未获得酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12A 中的 iii)。

(3) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 5  $\mu\text{M}$  异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。按照步骤 (1) 的进行分析和结构鉴定, 未获得酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12A 中的 iV)。

(4) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 不加入任何酶, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。按照步骤 (1) 的进行分析和结构鉴定, 未获得酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12A 中的 Vi)。

(5) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 10 5  $\mu\text{M}$  氨基转移酶 MfnO, 5  $\mu\text{M}$  异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。按照步骤 (1) 的进行分析和结构鉴定, 获得纯的酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12B 中的 V)。

(6) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 5  $\mu\text{M}$  氨基转移酶 MfnO, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。按照步骤 (1) 的进行分析和结构鉴定, 未获得酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12B 中的 iii)。

(7) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 5  $\mu\text{M}$  异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。按照步骤 (1) 的进行分析和结构鉴定, 未获得酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12B 中的 iV)。

(8) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 20 不加入任何酶, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。按照步骤 (1) 的进行分析和结构鉴定, 未获得酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 12B 中的 Vi)。

## 二、以 L-*allo*-Ile 作为底物

(1) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-*allo*-Ile, 5  $\mu\text{M}$  氨基转移酶 DsaD, 5  $\mu\text{M}$  异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 25 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 L-Ile (图 14A 中的 V, 图 14A 和 14B 中 i 和 ii 分别为 L-Ile 和 L-*allo*-Ile 的标准品)。

(2) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-*allo*-Ile, 5  $\mu\text{M}$  氨基转移酶 DsaD, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应产物 L-Ile (图 14A 中的 iii)。

(3) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-allo-Ile*, 5  $\mu$ M 异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应产物 *L-Ile* (图 14A 中的 iV)。

5 (4) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-allo-Ile*, 不加入任何酶, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应产物 *L-Ile* (图 14A 中的 Vi)。

(5) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-allo-Ile*, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 MfnO, 5  $\mu$ M 异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 *L-Ile* (图 14B 中的 V)。

10 (6) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-allo-Ile*, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 MfnO, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应产物 *L-Ile* (图 14B 中的 iii)。

(7) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-allo-Ile*, 5  $\mu$ M 异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应  
15 产物 *L-Ile* (图 14B 中的 iV)。

(8) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-allo-Ile*, 不加入任何酶, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应产物 *L-Ile* (图 14B 中的 Vi)。

20 三、

(1) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-Ile*, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 DsaD, 5  $\mu$ M 异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 *L-allo-Ile* (图 16A 中的 iii, 图 16A 和 16B 中 i 和 ii 分别为 *L-Ile* 和 *L-allo-Ile* 的标准品)。

25 (2) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-Ile*, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 DsaD, 5  $\mu$ M 异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 *L-allo-Ile* (图 16A 中的 iV)。

(3) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 *L-Ile*, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 MfnO, 5  $\mu$ M 异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获

得纯的酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 16A 中的 V)。

(4) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 MfnO, 5  $\mu$ M 异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 16A 中的 Vi)。

5 (5) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-Ile, 不加入任何酶, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应产物 L-*allo*-Ile (图 16A 中的 Vii)。

(6) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-*allo*-Ile, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 DsaD, 5  $\mu$ M 异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应  
10 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 L-Ile (图 16B 中的 iii)。

(7) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-*allo*-Ile, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 DsaD, 5  $\mu$ M 异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 L-Ile (图 16B 中的 iV)。

(8) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物  
15 L-*allo*-Ile, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 MfnO, 5  $\mu$ M 异构酶 MfnH, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 L-Ile (图 16B 中的 V)。

(9) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-*allo*-Ile, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 MfnO, 5  $\mu$ M 异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 获得纯的酶促反应产物 L-Ile (图 16B 中的 Vi)。

20 (10) 在 10 mL 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 1 mM 的底物 L-*allo*-Ile, 不加入任何酶, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时, 未获得酶促反应产物 L-Ile (图 16B 中的 Vii)。

## 实施例 8

25 DsaD/DsaE 催化的可逆反应平衡常数测定:

在 50  $\mu$ L 磷酸钠缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 中, 加入 2.5 mM 的底物 L-Ile 或者 L-*allo*-Ile, 0.1 mM PLP, 5  $\mu$ M 氨基转移酶 DsaD, 5  $\mu$ M 异构酶 DsaE, 置于 30 °C 条件下反应 4 小时。反应结束后, 加入 200  $\mu$ L 的甲醇以终止反应, 涡旋震荡, 于室温静置 20 分钟后, 1,2000  $\times g$  离心 20 分钟, 取上清用旋转蒸发仪蒸干,

残留物溶于 40  $\mu\text{L}$  2 mM  $\text{CuSO}_4$  溶液，取 25  $\mu\text{L}$  进行手性 HPLC 分析，以检测酶促反应情况。手性 HPLC 分析条件为：使用 MCI GEL CRS10W column (Mitsubishi, 50  $\times$  4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) 手性分析柱；流动为 2 mM  $\text{CuSO}_4$  溶液；流速为 1 mL/min，检测时间为 30 分钟，检测波长为 254 nm。底物和产物的终浓度通过对相应的 HPLC 5 峰值进行积分计算而得。平衡常数 ( $K_{\text{eq}}$ ) 根据以下计算公式计算而得  $K_{\text{eq}} = ([\text{产物浓度}]/[\text{底物浓度}])$ 。

测得以 L-Ile 为底物时，DsaD/DsaE 催化的可逆反应的平衡常数为 1.37（如图 15）。



## 序列表

&lt;110&gt;中国科学院南海海洋研究所

<120>氨基转移酶和异构酶在催化形成 L-*allo*-Ile 中的应用

&lt;160&gt;8

5 &lt;210&gt;1

&lt;211&gt;1122

&lt;212&gt;DNA

<213> *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141

&lt;400&gt;1

10 ATGACCACGA CCTCATCCGC AGCACCGGAC ATTGTCCTGC GCCCCGGTAC CTCGGCGTCT 60  
TCGGCCGACC GGCCTCGAGA GGCCTCGCC GGAGCGGCCT TCGGCGAGGT GTTCACCGAT 120  
CACATGGTCA CCGCACGATG GACCGCCACC GACGGCTGGC ACGACGCTGC ACTGGAACCA 180  
TTCGCTCCAT TGGAGTTGAG CCCGGCCGCT GTCGGAATGC ACTACGGGCA GAGCGTGTTC 240  
GAAGGATTCA AGGCCTACCA TCGGACACCG GAGCGGGCTG CCATCTTCCG TCCGTCGGCC 300  
15 CACGCCCCGCC GGTTCGCGGA CTCAGCCCCG CGCATGGCCC TTCCCGAGGT TCCGGTCGAC 360  
TTGTTCTGTCG GCGCCGCCGA AGCCCTGGTC CGCCAGGACA AGGACTGGAT CCCCAGTGGC 420  
GACGACCGGA GCCTGTACCT CAGACCGGTG CTCTTCGCTT CCGAGGCCCA TCTCGCCCTG 480  
CGGCCCCGCC GTGCATGCCT GTTCGTCTTA CTCGCCTTCC CCACGGGCAA CTTCTTCGAT 540  
GCGGGCGACC GCGCGGTGAC GGTGGCGGTC GCCGATGAGT ACGTGCAGCG CGCTCCGGGC 600  
20 GGCACGGGGG CGGCCAAGTG CGGTGGCAAC TACGCGAGCA CCTATCTCGC CCAGGAGACG 660  
GCCGCCCCGA AGGGCGCTGA CCAGGTGGTC TGGCTGGACG CAGTGGAGCG GCGCTGGGTG 720  
GAGGAACTGG GTGGCATGAA CCTCTTTTTC GTGTACGGCA CGGGAGACCA GACCACACTC 780  
ACAACCCCGC CACTGACTGG CACCATCCTG CCCGGCGTCA CCCGCGACAC CCTCCTCACC 840  
CTCGCCGGTG GCCTTGACT ACAAGTCACT GAGGCCCCCA TAACGGTCAG CCGGTGGCGT 900  
25 GAGGAGTGCG CCGCAGGCCG GATCACGGAG GTATTCGCGT GCGGCACTGC GGCCCGAATC 960  
ACGTCCGTCG GCCGTGTCCT CAGCGCGGAC GGGCCCTGGA CGGTGCGAGA CGGACGGCCA 1020  
GGACCCGTCG CGGGCCGGCT CTCGGCGGCG CTAGCTGCCG TACACCGCGG CGAGGCAGCC 1080  
GATTCGTATG GCTGGTGCCA TCTGGTGAAC CACGAGGCCT GA 1122

&lt;210&gt;2

30 &lt;211&gt;351

<212>DNA

<213> *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141

<400>2

ATGGGGCGCT CCGAGACCAT CCGTCGCTAC TACGAACTAG TGGACGCGGC GGATTACGAG 60  
5 GCCATGTTCC GTATATTCTG CGACGACCTG ATATACGAGC GGGCCGGAAC CGAACCCATC 120  
GAGGGAATCG TGGAGTTCCG TCACTTCTAT CTCGCCGACC GCAAGATCAG GTCGGGACGG 180  
CACTCTCTGG ACGTGCTCAT CGAGAATGGC GACTGGGTCG CCGCCAGAGG AGTCTTCACC 240  
GGACAACCTC GCACAGGGGA AGCCGTGACC ACCCGGTGGG CCGACTTCCA CCAGTTCCGG 300  
GGAGAGAAGA TCTGGCGTCG GTACACCTAT TTCGCGGATC AGTCGGTGTA G 351

10 <210>3

<211>1134

<212>DNA

<213> *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46

<400>3

15 GTGCATATCG TGACCACACC CGTAGCCCGA CCACTGACGG CGCAGGAGCG CACGGAGCGC 60  
TGCGCCGCCC CCGCCTTCGG CACCGCGTTC ACCGAGCACA TGGTCTCCGC CCGATGGAAC 120  
CCCGAACAGG GCTGGCATGA CGCCGAGTTG GTGCCCTACG GTCCGCTGCT GCTGGACCCC 180  
GCCACGGTCG GTCTGCACTA TGGCCAGGTC GTCTTCGAGG GACTCAAGGC GTTCCGTTCG 240  
CACACCGGCG AGGTGCGGGT CTTCCGGCCG GACGCGCACG CCGAACGGAT GCGCGCCTCG 300  
20 GCCCGCCGCC TCATGATGCC CGAGCCGCCC GAGGAACTGT TCCTCGCGGC GGTGGACGCC 360  
CTGGTCGCCC AGGACCAGGA GTGGATACCC GACGACCCCG GCATGAGTCT GTATCTGCGC 420  
CCCATCCTCT TCGCGAGCGA GCGGACTCTC GCTCTGCGTC CCGCCCGTGA ATACCGCTTC 480  
CTGCTGGTGG CGTTCATCAC CGAGGGCTAC TTCGGCCCTG CCCAGCGCCC GGTACGGGTG 540  
TGGGTCACCG ACGAGTACTC CCGGGCCGCC GCCGGCGGCA CCGAGCCGC CAAGTGCGCG 600  
25 GGCAACTACG CGGGAAGCCT GCTCGCCCAG GAGGAGGCCC AGCGCAAGGG GTGCGACCAA 660  
GTCGTCTGGC TCGACCCGGT GGAGCGCAAC TGGGTCGAGG AGATGGGAGG CATGAATCTC 720  
TTCTTCGTGT ACGAAGCCGG TGGCTCCGCC CGACTGGTCA CCCC GCCGCT GACGGGCAGC 780  
CTGCTGCCCC GCGTCACGCG GGACGCGCTG CTGCGACTGG CCCCCACCCT CGGTGTGCCG 840  
GTGAGTGAGG CACCCCTGAG CCTGGAACAG TGGCGGGCGG ACTGCGCCTC CGGCGCGATC 900

ACCGAGGTCT TCGCCTGCGG CACCGCCGCC CGGATCAGTC CCGTCAACGA GGTCAGCACC 960  
 AAGGACGGCT CCTGGACCAT CGGCGCGGGC GCCCCTGCCG AAGGCGGCGT CGCGGCCGGC 1020  
 GAGGTCACCG GCAGACTCTC CGCCGCGCTG TTCGGCATCC AGCGCGGCGA ACTGCCCCGAC 1080  
 TCCCACTCCT GGATGCGGCC GGTGTCCCCG GCCAGACAGT CGGCGATCAC ATGA 1134

5 <210>4

<211>375

<212>DNA

<213> *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46

<400>4

10 ATGACCGAGA GCTCTCCCAC CGAGGTCAAT GAGGCCCGGG TCGGTGAGTA CTACCGGTTG 60  
 GTGGACGCGG ACGACGTCCT CGGACTCGTC TCCCTCTTCG CGGAGGACGC CGTCTACCGG 120  
 CGGCCGGGAT ACGAACCCAT GCGCGGTAC ACCGGTCTGA CCGCCTTCTA CACCGGCGAG 180  
 CGCGTGATCG AGAGCGGTCG GCACACCGTC GCCACGGTCG TCGCGCGAGG CGATCAGGTC 240  
 GCGGTCAACG GAGTCTTCGA GGGCGTCCTC AAGGACGGCC GCCAAGTCCG CCTGGAATTC 300  
 15 GCCGACTTCT TTCTGCTCAA CGGCGAGCGG CGGTTCAAGT GCGGTGACAC GTACTTCTTC 360  
 GCCCCACTGG TGTGA 375

<210>5

<211>373

<212>PRT

20 <213> *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141

<400>5

Met Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Asp Ile Val Leu Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Ser Ala Ser Ser Ala Asp Arg Arg Arg Glu Ala Leu Ala  
 25 20 25 30  
 Gly Ala Ala Phe Gly Glu Val Phe Thr Asp His Met Val Thr Ala  
 35 40 45  
 Arg Trp Thr Ala Thr Asp Gly Trp His Asp Ala Ala Leu Glu Pro  
 50 55 60

	Phe	Ala	Pro	Leu	Glu	Leu	Ser	Pro	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	His	Tyr	
					65					70					75	
	Gly	Gln	Ser	Val	Phe	Glu	Gly	Phe	Lys	Ala	Tyr	His	Arg	Thr	Pro	
					80					85					90	
5	Glu	Arg	Ala	Ala	Ile	Phe	Arg	Pro	Ser	Ala	His	Ala	Arg	Arg	Phe	
					95					100					105	
	Ala	Asp	Ser	Ala	Arg	Arg	Met	Ala	Leu	Pro	Glu	Val	Pro	Val	Asp	
					110					115					120	
	Leu	Phe	Val	Gly	Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Val	Arg	Gln	Asp	Lys	Asp	
10					125					130					135	
	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Asp	Asp	Arg	Ser	Leu	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	
					140					145					150	
	Leu	Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	His	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Ala	
					155					160					165	
15	Cys	Leu	Phe	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Pro	Thr	Gly	Asn	Phe	Phe	Asp	
					170					175					180	
	Ala	Gly	Asp	Arg	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Val	Ala	Asp	Glu	Tyr	Val	
					185					190					195	
	Arg	Ala	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Lys	Cys	Gly	Gly	Asn	
20					200					205					210	
	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ala	Gln	Glu	Thr	Ala	Ala	Arg	Lys	Gly	
					215					220					225	
	Ala	Asp	Gln	Val	Val	Trp	Leu	Asp	Ala	Val	Glu	Arg	Arg	Trp	Val	
					230					235					240	
25	Glu	Glu	Leu	Gly	Gly	Met	Asn	Leu	Phe	Phe	Val	Tyr	Gly	Thr	Gly	
					245					250					255	
	Asp	Gln	Thr	Thr	Leu	Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Gly	Thr	Ile	Leu	
					260					265					270	
	Pro	Gly	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Gly	Leu	

275 280 285  
 Gly Leu Gln Val Thr Glu Ala Pro Ile Thr Val Ser Arg Trp Arg  
 290 295 300  
 Glu Glu Cys Ala Ala Gly Arg Ile Thr Glu Val Phe Ala Cys Gly  
 5 305 310 315  
 Thr Ala Ala Arg Ile Thr Ser Val Gly Arg Val Leu Ser Ala Asp  
 320 325 330  
 Gly Pro Trp Thr Val Gly Asp Gly Arg Pro Gly Pro Val Ala Gly  
 335 340 345  
 10 Arg Leu Ser Ala Ala Leu Ala Ala Val His Arg Gly Glu Ala Ala  
 350 355 360  
 Asp Ser Tyr Gly Trp Cys His Leu Val Asn His Glu Ala  
 365 370 373  
 <210>6  
 15 <211>116  
 <212>PRT  
 <213> *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141  
 <400>6  
 Met Gly Arg Ser Glu Thr Ile Arg Arg Tyr Tyr Glu Leu Val Asp  
 20 1 5 10 15  
 Ala Ala Asp Tyr Glu Ala Met Phe Arg Ile Phe Cys Asp Asp Leu  
 20 25 30  
 Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Thr Glu Pro Ile Glu Gly Ile Val Glu  
 35 40 45  
 25 Phe Arg His Phe Tyr Leu Ala Asp Arg Lys Ile Arg Ser Gly Arg  
 50 55 60  
 His Ser Leu Asp Val Leu Ile Glu Asn Gly Asp Trp Val Ala Ala  
 65 70 75  
 Arg Gly Val Phe Thr Gly Gln Leu Arg Thr Gly Glu Ala Val Thr

80 85 90  
 Thr Arg Trp Ala Asp Phe His Gln Phe Arg Gly Glu Lys Ile Trp  
 95 100 105  
 Arg Arg Tyr Thr Tyr Phe Ala Asp Gln Ser Val  
 5 110 115 116  
 <210>7  
 <211>377  
 <212>PRT  
 <213> *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46  
 10 <400>7  
 Met His Ile Val Thr Thr Pro Val Ala Arg Pro Leu Thr Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Thr Glu Arg Cys Ala Ala Pro Ala Phe Gly Thr Ala Phe  
 20 25 30  
 15 Thr Glu His Met Val Ser Ala Arg Trp Asn Pro Glu Gln Gly Trp  
 35 40 45  
 His Asp Ala Glu Leu Val Pro Tyr Gly Pro Leu Leu Leu Asp Pro  
 50 55 60  
 Ala Thr Val Gly Leu His Tyr Gly Gln Val Val Phe Glu Gly Leu  
 20 65 70 75  
 Lys Ala Phe Arg Ser His Thr Gly Glu Val Ala Val Phe Arg Pro  
 80 85 90  
 Asp Ala His Ala Glu Arg Met Arg Ala Ser Ala Arg Arg Leu Met  
 95 100 105  
 25 Met Pro Glu Pro Pro Glu Glu Leu Phe Leu Ala Ala Val Asp Ala  
 110 115 120  
 Leu Val Ala Gln Asp Gln Glu Trp Ile Pro Asp Asp Pro Gly Met  
 125 130 135  
 Ser Leu Tyr Leu Arg Pro Ile Leu Phe Ala Ser Glu Arg Thr Leu

					140					145					150
	Ala	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Glu	Tyr	Arg	Phe	Leu	Leu	Val	Ala	Phe
					155					160					165
	Ile	Thr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Gly	Pro	Ala	Gln	Arg	Pro	Val	Arg	Val
5					170					175					180
	Trp	Val	Thr	Asp	Glu	Tyr	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly
					185					190					195
	Ala	Ala	Lys	Cys	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ala	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Gln
					200					205					210
10	Glu	Glu	Ala	Gln	Arg	Lys	Gly	Cys	Asp	Gln	Val	Val	Trp	Leu	Asp
					215					220					225
	Pro	Val	Glu	Arg	Asn	Trp	Val	Glu	Glu	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Leu
					230					235					240
	Phe	Phe	Val	Tyr	Glu	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Arg	Leu	Val	Thr	Pro
15					245					250					255
	Pro	Leu	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Val	Thr	Arg	Asp	Ala	Leu
					260					265					270
	Leu	Arg	Leu	Ala	Pro	Thr	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Pro
					275					280					285
20	Leu	Ser	Leu	Glu	Gln	Trp	Arg	Ala	Asp	Cys	Ala	Ser	Gly	Ala	Ile
					290					295					300
	Thr	Glu	Val	Phe	Ala	Cys	Gly	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Ser	Pro	Val
					305					310					315
	Asn	Glu	Val	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Ser	Trp	Thr	Ile	Gly	Ala	Gly
25					320					325					330
	Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Val	Thr	Gly	Arg
					335					340					345
	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Phe	Gly	Ile	Gln	Arg	Gly	Glu	Leu	Pro	Asp
					350					355					360

Ser His Ser Trp Met Arg Pro Val Ser Pro Ala Arg Gln Ser Ala  
 365 370 375

Ile Thr  
 377

5 <210>8

<211>124

<212>PRT

<213> *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46

<400>8

10 Met Thr Glu Ser Ser Pro Thr Glu Val Asn Glu Ala Arg Val Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Tyr Tyr Arg Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Leu Gly Leu Val  
 20 25 30  
 Ser Leu Phe Ala Glu Asp Ala Val Tyr Arg Arg Pro Gly Tyr Glu  
 15 35 40 45  
 Pro Met Arg Gly His Thr Gly Leu Thr Ala Phe Tyr Thr Gly Glu  
 50 55 60  
 Arg Val Ile Glu Ser Gly Arg His Thr Val Ala Thr Val Val Ala  
 65 70 75  
 20 Arg Gly Asp Gln Val Ala Val Asn Gly Val Phe Glu Gly Val Leu  
 80 85 90  
 Lys Asp Gly Arg Gln Val Arg Leu Glu Phe Ala Asp Phe Phe Leu  
 95 100 105  
 Leu Asn Gly Glu Arg Arg Phe Ser Arg Arg Asp Thr Tyr Phe Phe  
 25 110 115 120  
 Ala Pro Leu Val  
 124



## 权利要求书

1、氨基转移酶和异构酶形成的酶对在催化 L-异亮氨酸形成 L-别异亮氨酸或者催化 L-别异亮氨酸形成 L-异亮氨酸中的应用，所述的氨基转移酶为氨基转移酶 DsaD 或氨基转移酶 MfnO，所述的异构酶为异构酶 DsaE 或异构酶 MfnH，所述的氨基转移酶 DsaD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示，所述的异构酶 DsaE 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示，所述的氨基转移酶 MfnO 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，所述的异构酶 MfnH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

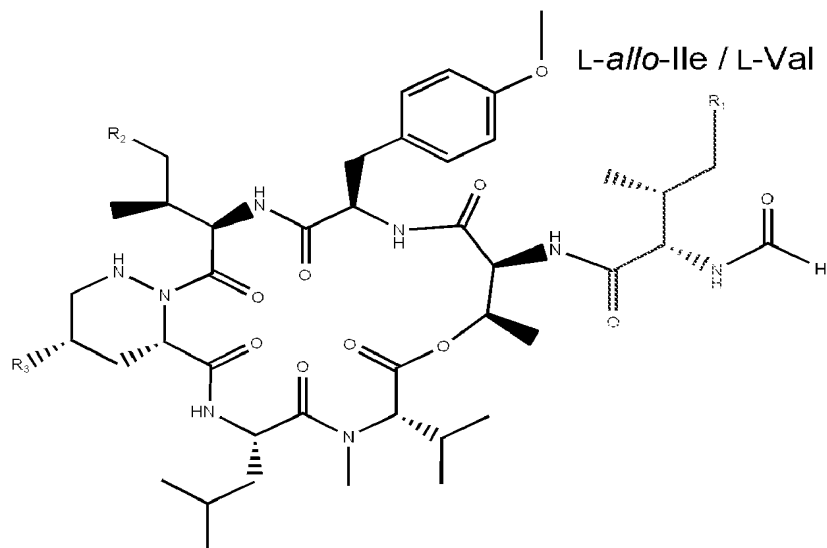
2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的氨基转移酶 MfnO 的编码基因 *mfnO* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

3、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的异构酶 MfnH 的编码基因 *mfnH* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

4、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的氨基转移酶 DsaD 的编码基因 *dsaD* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

5、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的异构酶 DsaE 的编码基因 *dsaE* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

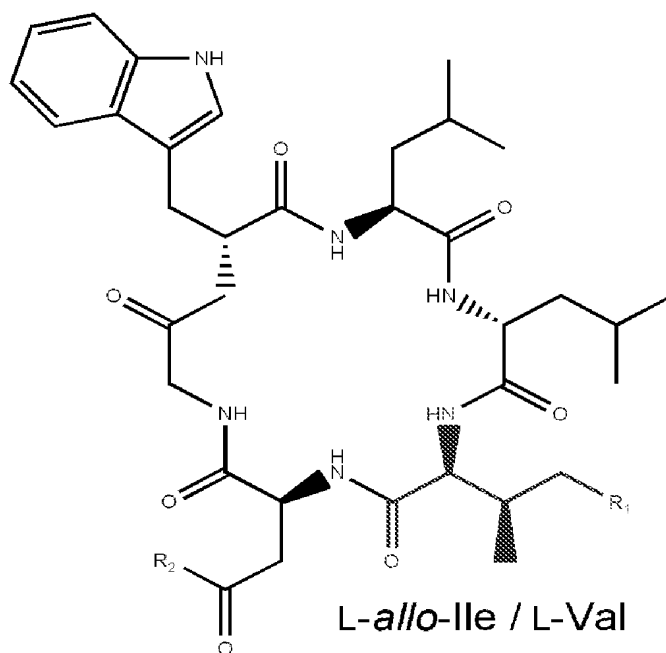
6、一种高产化合物 7 的菌株  $\Delta mfnH$ ，其特征在于，所述的菌株  $\Delta mfnH$  是将野生型 *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141 的 *mfnH* 基因进行敲除缺失突变而获得的；所述的化合物 7 的结构式如式 1 所示，其中  $R_1=H$ ， $R_2=CH_3$ ， $R_3=OH$ ；



式 1。

7、一种高产化合物 9 和 11 的菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 或 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO，其特征在于，所述的菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-EKO 是将 *DsaE* 基因同框缺失突变的 desotamides 的生物合成基因簇导入菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152 中并进行表达而获得的，所述的 *Streptomyces coelicolor* M1152/07-6H-DKO 是将 *DsaD* 基因同框缺失突变的 desotamides 的生物合成基因簇导入菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152 中并进行表达而获得的；

所述的化合物 9 和 11 的结构如式 2 所示，其中化合物 9：R<sub>1</sub>=H，R<sub>2</sub>=NH<sub>2</sub>；  
化合物 11：R<sub>1</sub>=H，R<sub>2</sub>=OH；



式 2。

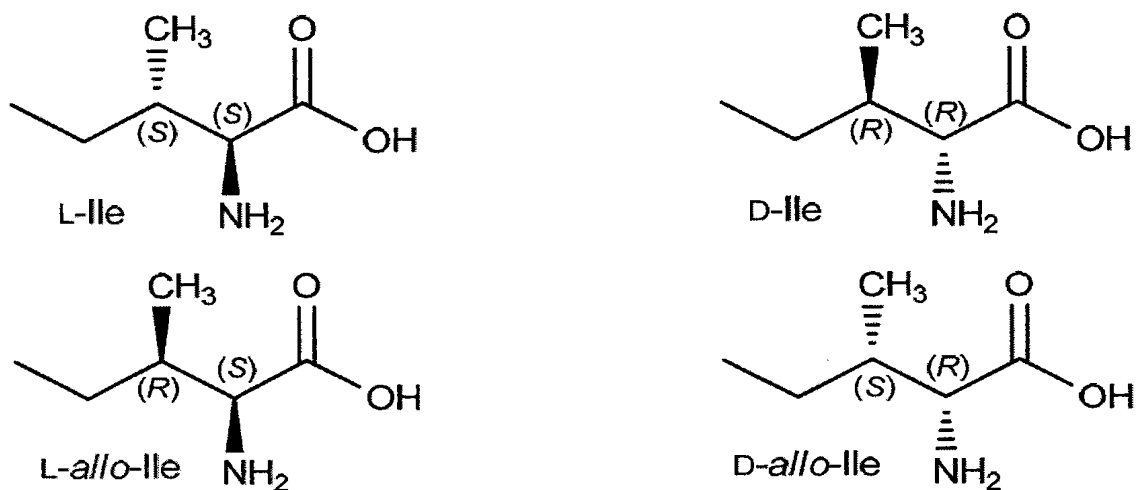
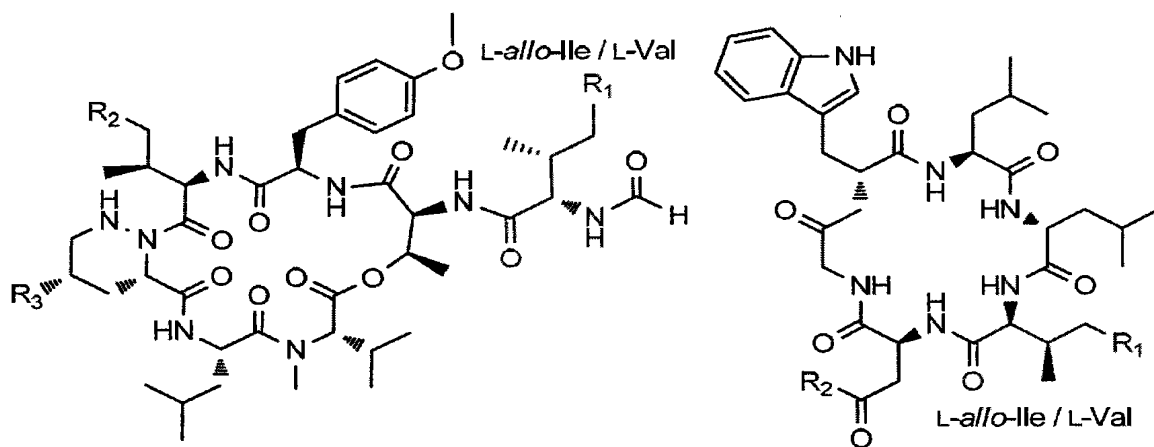


图 1



- 1 MFN A,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = H$   
 2 MFN B,  $R_1 = CH_3$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = H$   
 6 MFN F,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H$   
 3 MFN C,  $R_1 = CH_3$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = OH$   
 4 MFN D,  $R_1 = CH_3$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = OH$   
 5 MFN E,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = OH$   
 7 MFN G,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = OH$

- 8** DSA A,  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{NH}_2$   
**9** DSA B,  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{NH}_2$   
**10** DSA G,  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$   
**11** DSA H,  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$

图 2

DsaD .....VHIVTPVARPLIAQERTIERCAAPAFEGTAFIEHNVSAARINPEQGHDAEIVP  
 MfnO .....MITSSAAPDIVLRPGISSASSADRRREALAGAAFGVEFTCHMVTARNTATIDGWHDAAEIP  
 MsBCAT .....MNSGPLEFTVSANTNPATDARRREALANPGGKYYTCHMNVSDITVDEGWHNAQIIP  
 HsBCATm .....MAAAALGOINARKLLSVPWLLCGPRRYASSSFKAADLQLEMTOKPHKKKPGGPELVGKIFCHMMLMVENKKGNGQPRQOP  
 SmbCAT .....MKDCSNG.....CSAECTGEGGSKEVGFKAADLVTPATILKEKPDNNLVGTVFTCHMLTVENSSSEFGMEKPHKIP  
 HsBCATc .....MRLTILGMTAHDSPRPEQAKKLADIDWSTLGSYIRIELRYLAHMKGENDAGTTE  
 EcBCAT .....  
 DrBCAT .....

DsaD .....YGPILLDPATVGLHYGCVTFEGLKAYFMSHTGEVAVFERPDHARRMRAASARRIMPEPEPELFDAADALVAADQECIPDDPG  
 MfnO .....FAPLESPAAVGLHYGCVTFEGLKAYFMSHTGEVAVFERPDHARRMRAASARRIMPEPEPELFDAADALVAADQECIPDDPG  
 MsBCAT .....YCPHQLDPSAIVLHYGCVTFEGLKAYFMSHTGEVAVFERPDHARRMRAASARRIMPEPEPELFDAADALVAADQECIPDDPG  
 HsBCATm .....FQNLTHMPACSSLHYSLQLFEGMKAFKQKQDQVRLFFPPWINDRMLRSAMRILCLPSFDKLELEECURRLIEVDKDWVFDAAG  
 SmbCAT .....DATLHTISESPALHYSGENFEGMKAYRIKDGSGQLEFPNNRERLQRIADRLMPQVPTCKFIDAKQVVRANEYVVPYGGIG  
 HsBCATc .....LONLSHPGSSSALHYAVELFEGMKAYFMSHTGEVAVFERPDHARRMRAASARRIMPEPEPELFDAADALVAADQECIPDDPG  
 EcBCAT .....WEDAKHVMSSHALHYGTSVFEGLKAYFMSHTGEVAVFERPDHARRMRAASARRIMPEPEPELFDAADALVAADQECIPDDPG  
 DrBCAT .....DNQIHLAEGTALHYGCVTFEGLKAYFMSHTGEVAVFERPDHARRMRAASARRIMPEPEPELFDAADALVAADQECIPDDPG

DsaD .....MSLYIRPITFASERTLAIRPAR..EYREFLLVAFITTEGVTGPA..QRVVRVWITDEVSRAAAGCTGAANKCAGNYIAGSLLAQEEA  
 MfnO .....RSLYIRPVTUFASERHLLALRPAR..ACLFVLLAFPTIGNEFDAG..DRAVTVAVADEYVRAAPGCTGAANKCAGNYIAGSLLAQEEA  
 MsBCAT .....ESLYIRPFIATPGLGVHPSN..EYRYLLIISPAAYFKGGL..IKFVSVMLSHENVRAASPGCTGAANKCAGNYIAGSLLAQEEA  
 HsBCATm .....TSLYIRPVIIGNEPSLGVSQPT..RALLFVILCEVCAVEPGGS.VIPVSLADPAIIRKAWVGCVGNXYKLCCGNYGPTVLYVQEEA  
 SmbCAT .....ATLYIRPILLIGVGDVIGVHPAD..EYIFTIFAMPVENNEKGL..LAPTNFLIQDDNDRAAPHSTIGAAKVGNYAASLLPGKVA  
 HsBCATc .....ASLYIRPTPIGTPEPSLGVKKPT..KALLFVLISVAVPVESSGT.FNPVSLWAMPKTVRAKGGTGDCKMGGNYGSSLLFAQCEA  
 EcBCAT .....TSAYIRPLIFVGDVIGVHPAD..EYIFTIFAMPVENNEKGL..LAPTNFLIQDDNDRAAPHSTIGAAKVGNYIAGSLLAQEEA  
 DrBCAT .....GSLYIRPFIATPGLGVHPSN..EYRYLLIISPAAYFKGGL..IKFVSVMLSHENVRAASPGCTGAANKCAGNYIAGSLLAQEEA

	220	230	240	250	260	270	280	290	
Dsad	QRKGCDO/VN	LDVERNWVE	EMGGMNLF	FYYEAGGSAR	LVIFPLISS	PLPGVIR	DALLRLAPT	LGVPTSEAP	ISLEQWRADC
Mfn0	ARKGADQ/VN	DAVERRWVE	ELGGMNLF	FVYGGDQITL	ITPPLIGT	PLPGVTR	DTLLTIAGG	LGLQVTEAP	ITVSRWREEC
MsbCAT	AEMGCDO/VN	DAIERRYVE	EMGGMNLF	FVFGSGGSAR	LVITELSGS	PLPGLTR	DSLLQIATD	AGFAEERN	DYEWQKKA
HsBcATm	LKRCCEQ/VN	LYGPDHQL	TEVGTMNIF	VYMTHEHGVL	LVITPLNGV	PLPGVVR	DSLLDMAQ	OTWGEFR	VTIMQOLLRAL
SmBcAT	HERQFSD/VY	LDPATIKI	HEVVGSAF	GITKDNE...	FITPLSPS	PLPSVTK	NSLLYLA	AHRECMK	IEGDCVDE
HsBcATC	VDNGCCQ/VN	LYGXDHOIT	VGTMNLF	FLYMINEDGEE	ELAFPLDGI	ILPGVTRC	ILDLAHQNGE	FKSERY	ITMDLLIAL
EcBcAT	RNHGYQEG	IALDVNG	.YISFGAGEN	LEFKDGS...	VLFTFPFT	SSALPGOIT	DALLIKLAK	ELEGREQVLSK	.....
DrBcAT	KKKDFAD/VY	LDPATITIL	ESAGAANF	FALTQDGQK...	FVITPQSP	SLPSTIT	VSLWLAEH	RLLEEGDTRL	.....
				EXGXNLFXX	XXXXXXX	XLXIXXXXX	XXLXGVX	XR	

	300	310	320	330	340	350	360	370
Dsaa	ASGNATE	EVFNACG	GTAR	RTSTVNER	STKTC	GSWTC	GACAPAE	GGVAA
Mfn	ACGRITE	VFACG	GTAA	RTSVGRV	LSACG	PWTV	GDGRP	
Msb	GAGENTE	VFACG	GTAA	VITPVSH	KHHG	GEFT	IADGQP	
MsbCat	EECRVRE	VFEGS	GTACV	VCVHR	LYKERN	LHPT	MENG	
HsBcATm	ELDKFVE	EAGCG	GTAA	VISEPIGG	QHGD	DFHV	FYSETEV	
SmbCAT	EGNRVRE	MEFGS	GTACV	VCVSD	LYLKGE	TIHPT	MENG	
HsBcATc	SLYLADE	VEVMS	GTAA	ELTPVRS	VDG	...	IQNGE	GRC
EcBcAT	ELGKFSE	EAGCG	GTAA	VITPIGG	LQHGD	DFHV	FYSESEP	
DrBcAT								

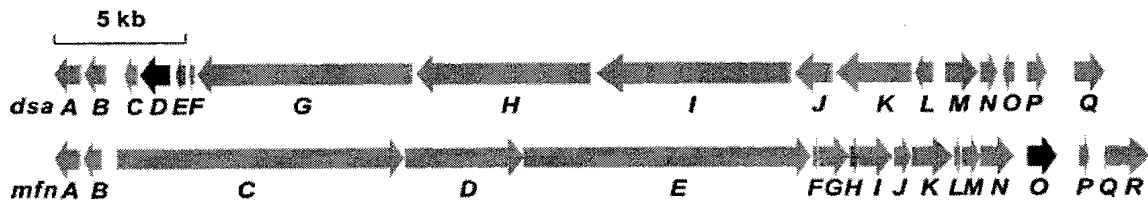


图 4

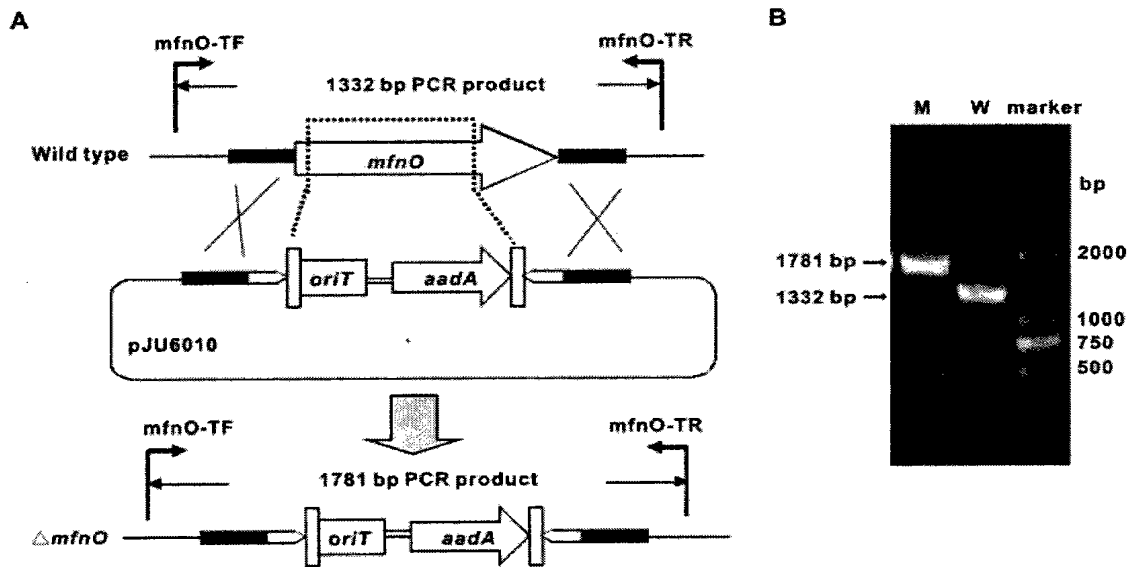


图 5

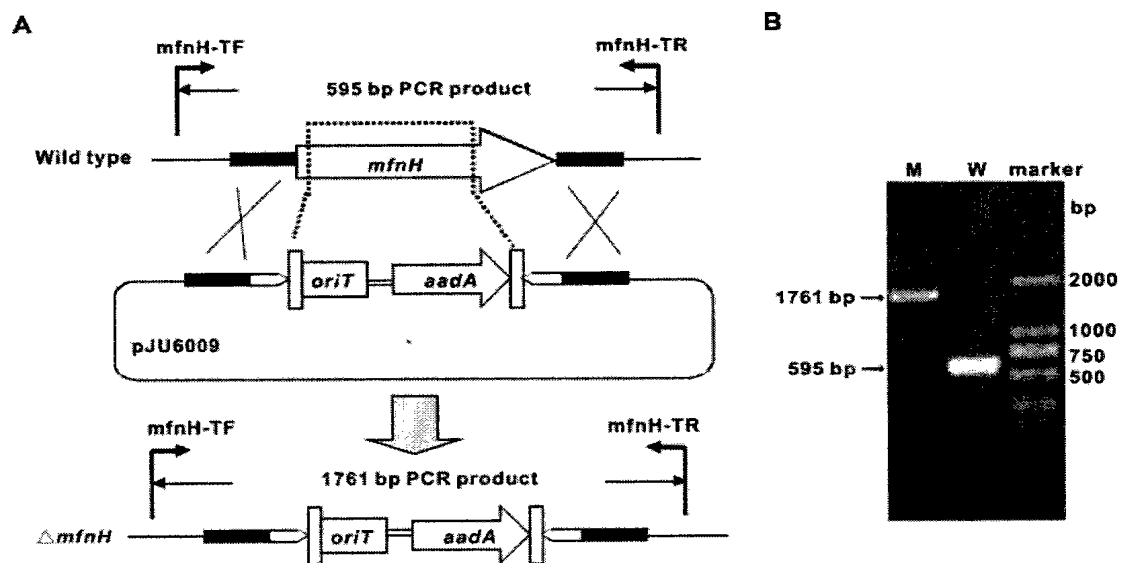


图 6

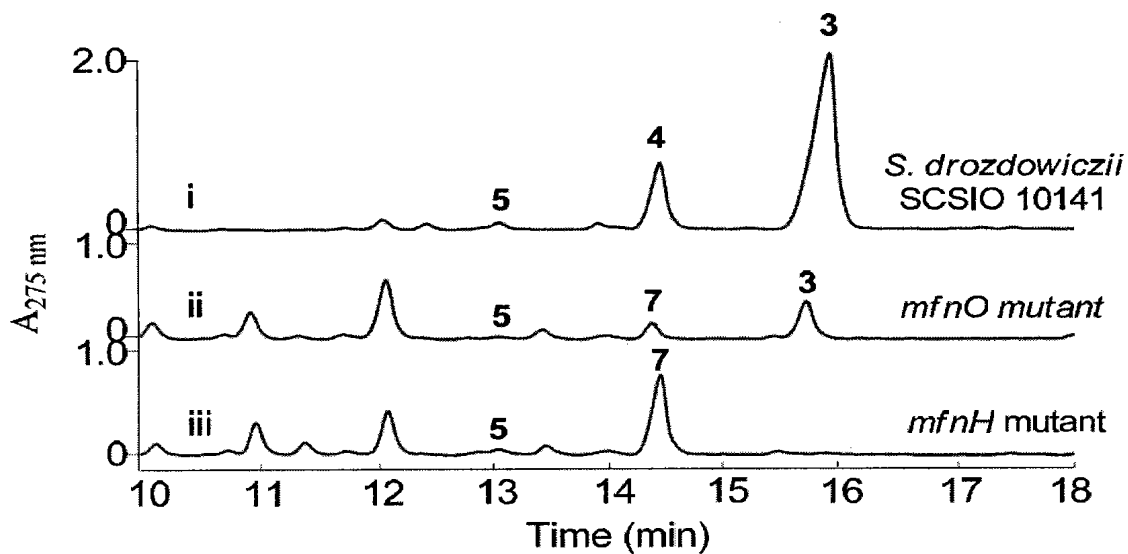


图 7

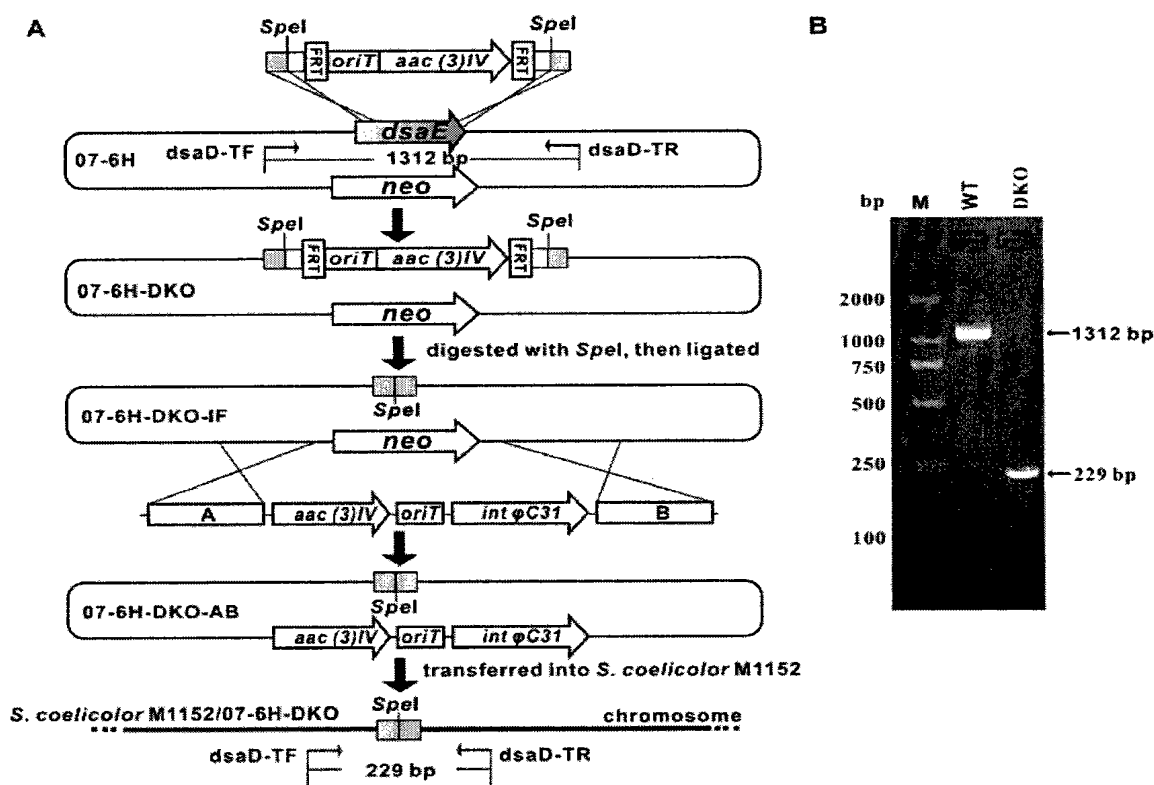


图 8

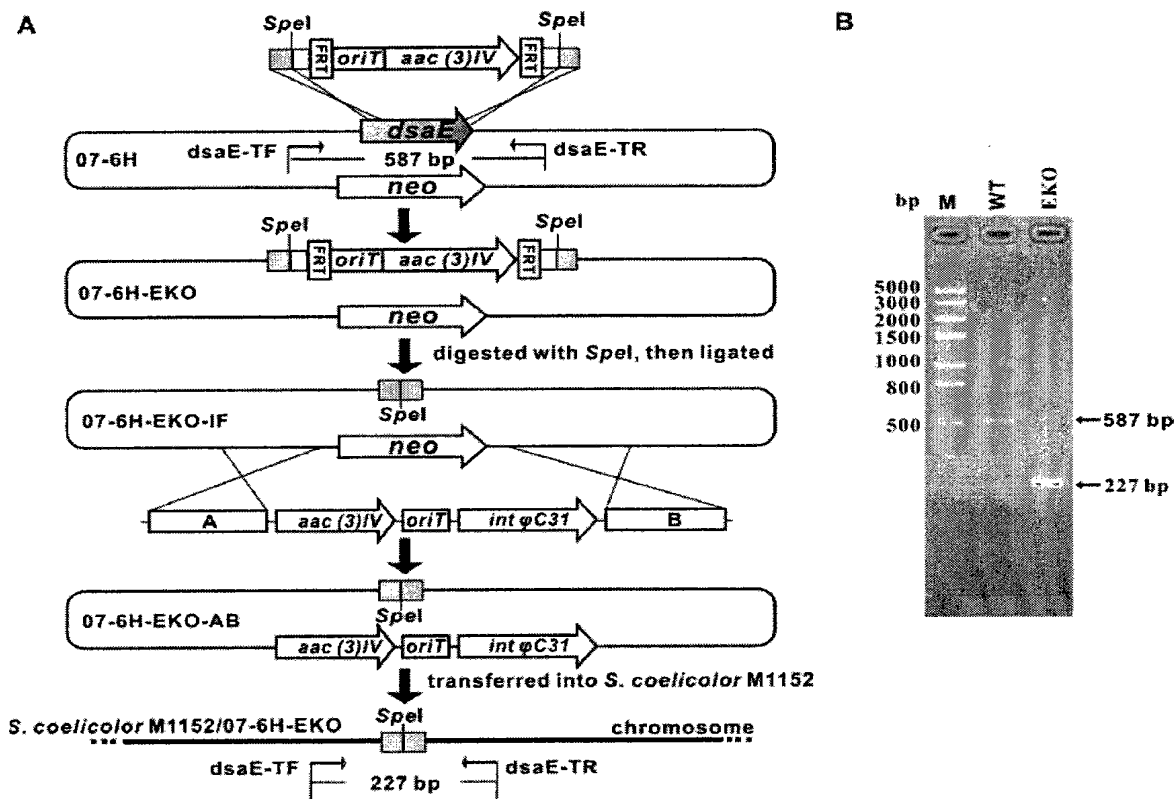


图 9

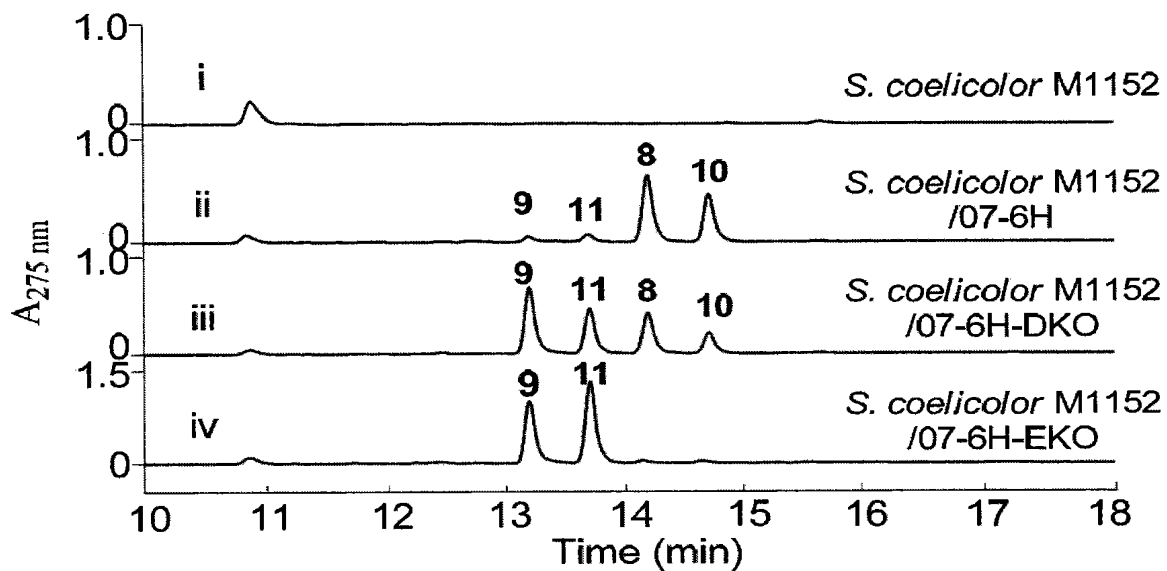


图 10



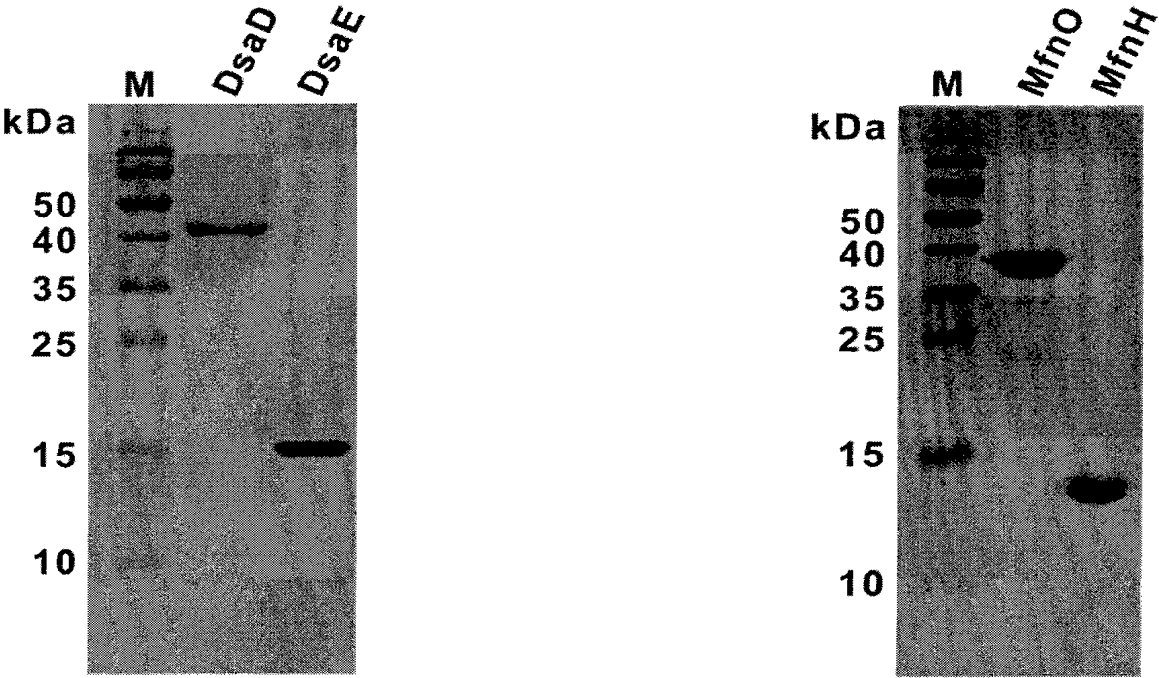


图 11

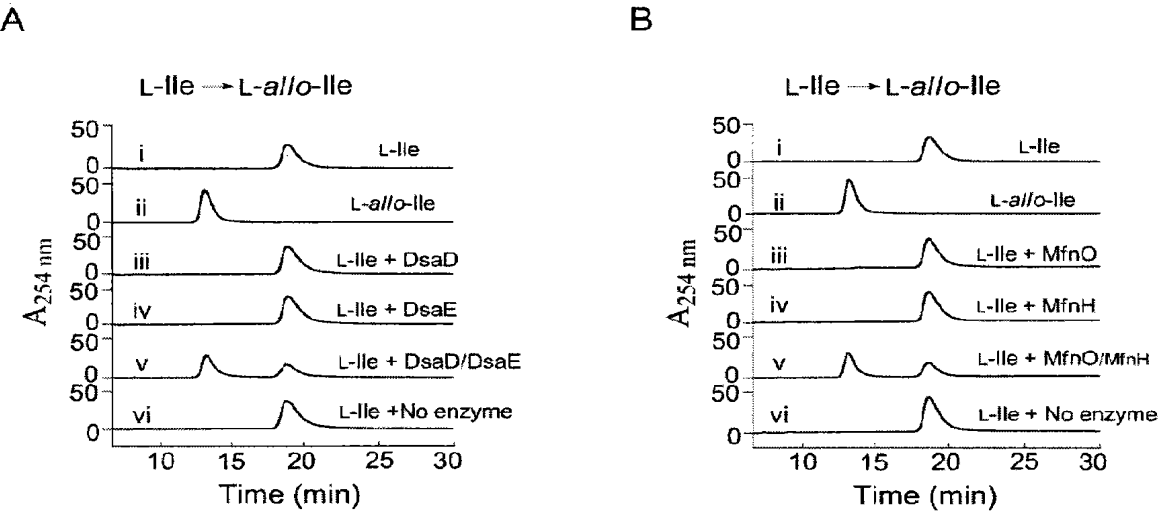
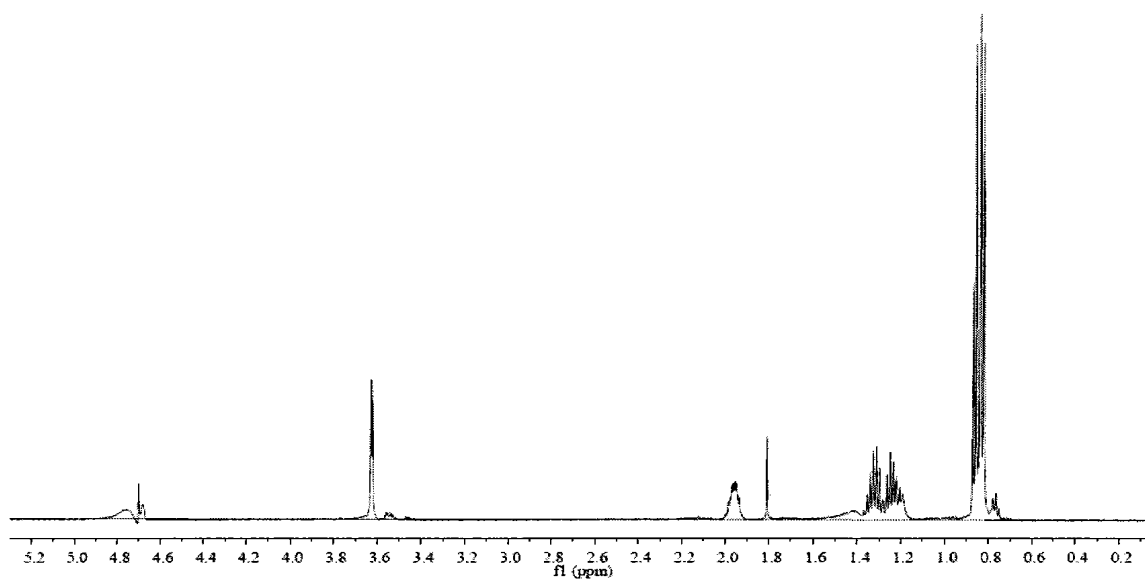


图 12

A



B

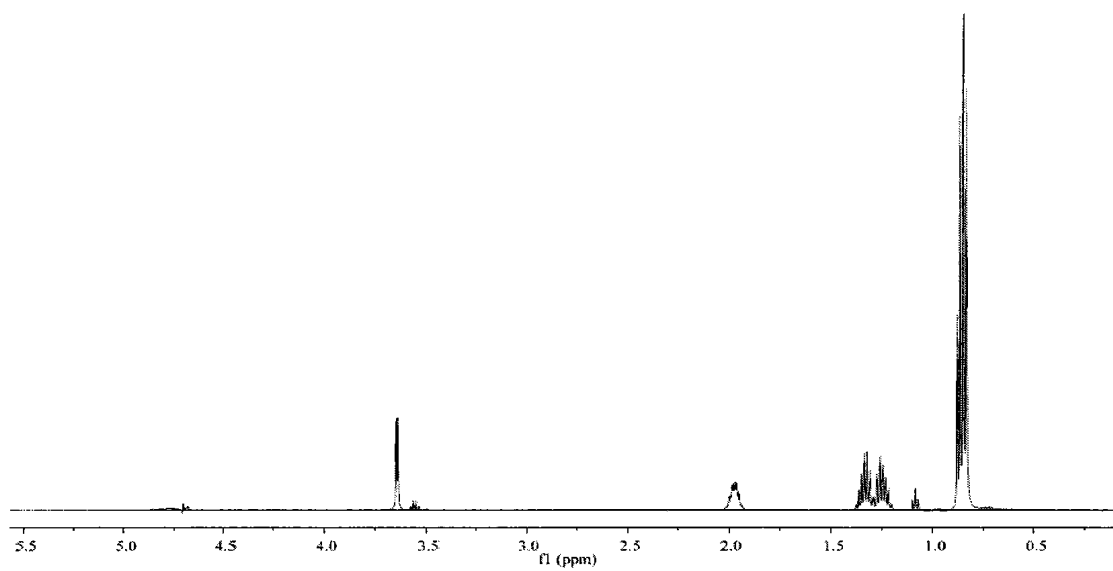


图 13

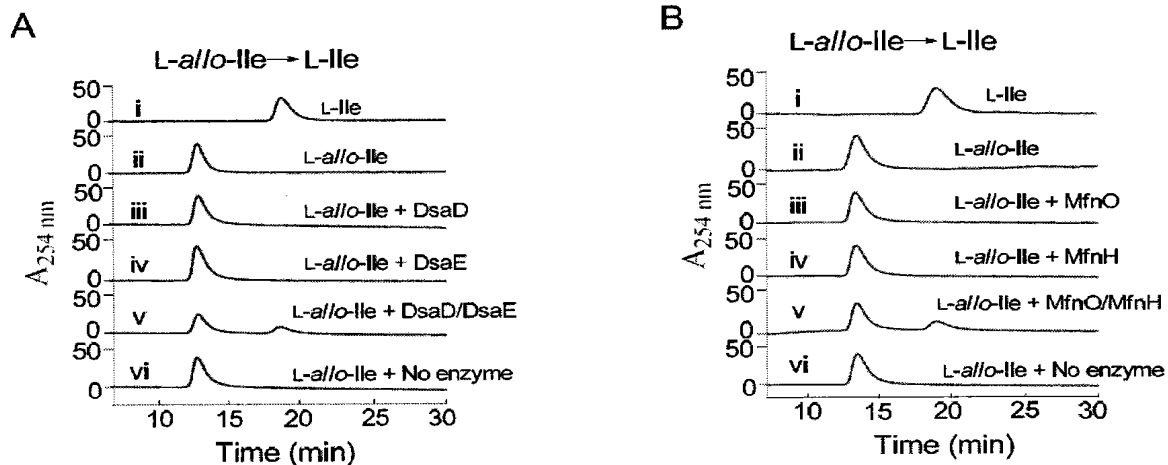


图 14

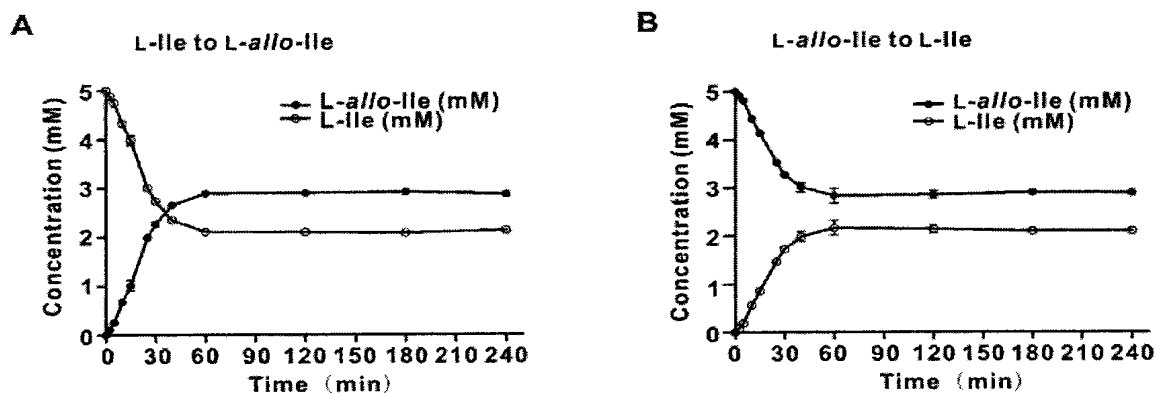


图 15

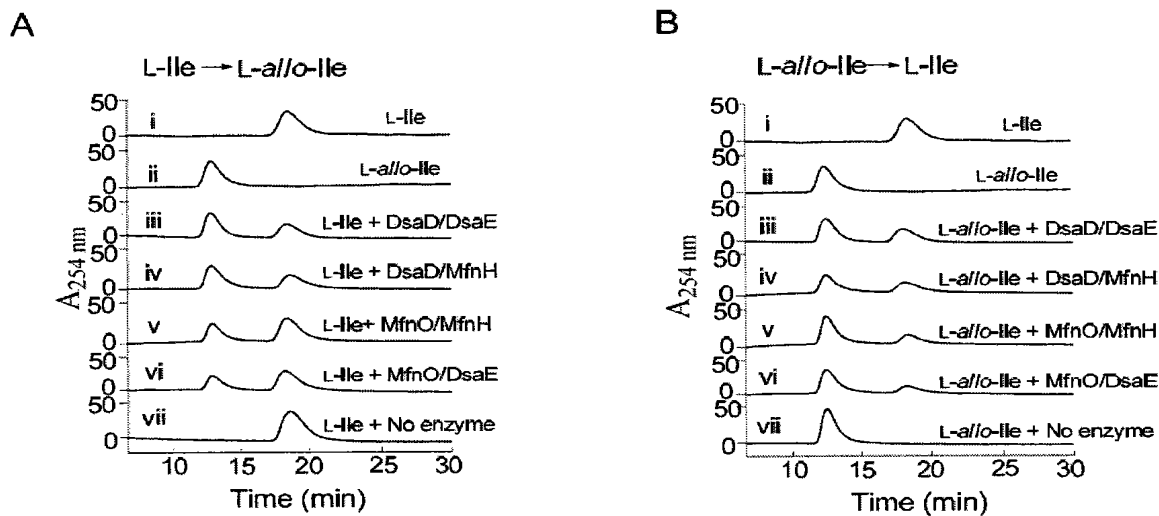


图 16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2015/097205**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 13/06 (2006.01) i; C12N 1/20 (2006.01) i; C12N 1/21 (2006.01) i; C12R 1/465 (2006.01) i  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12P, C12N, C12R

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CNABS, CPRSABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU and Search Terms: L-isoleucine, PLP-linked aminotransferase, isomerase, enzyme, DsaD, DsaE, MfnO, MfnH, L-allo-Ile, L-allo isoleucine, cataly+, biosynthesis, maple syrup urine disease, MSUD, etc.

NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT, Genbank, EMBL and Searched Sequences: SEQ ID NOs: 1-8

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FU, Minjie et al., "A Novel Isoleucine Dioxygenase and Its Expression in Recombinant Escherichia Coli for Synthesis of 4-Hydroxyisoleucine", CHEMICAL INDUSTRY AND ENGINEERING PROGRESS, volume 33, number 11, 05 November 2014 (05.11.2014), see abstract	1-7
A	SCHADEWALDT, P. et al., "Significance of L-Alloisoleucine in Plasma for Diagnosis of Maple Syrup Urine Disease", CLINICAL CHEMISTRY, volume 45, number 10, 31 October 1999 (31.10.1999), see page 1734, left column, paragraph 1 to right column, paragraph 1	1-7
A	CN 104246497 A (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION; SHISEIDO COMPANY, LIMITED), 24 December 2014 (24.12.2014), see claims 4, 8 and 12	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 16 June 2016 (16.06.2016)	Date of mailing of the international search report <b>30 June 2016 (30.06.2016)</b>
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer  <b>MA, Zhenlian</b>  Telephone No.: (86-10) <b>62412131</b>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2015/097205**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104246497 A	24 December 2014	EP 2829877 A1	28 January 2015
		JP 2013224929 A	31 October 2013
		US 2015079623 A1	19 March 2015
		WO 2013140785 A1	26 September 2013
		IN 2060MUN2014 A	21 August 2015
		TW 201344194 A	01 November 2013
		EP 2829877 A4	09 December 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/097205

A. 主题的分类

C12P 13/06(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12R 1/465(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12P, C12N, C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CPRSABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU和检索词: 氨基转移酶, 异构酶, L-别异亮氨酸, L-异亮氨酸, 催化, 枫糖尿症, PLP-linked aminotransferase, isomerase, enzyme, DsaD, DsaE, Mfn0, MfnH, L-allo-Ile, L-allo isoleucine, cataly+, biosynthesis, maple syrup urine disease, MSUD等; 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-8。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	付敏杰等. "新型异亮氨酸双加氧酶及其重组大肠杆菌合成羟基异亮氨酸" 化工进展, 第33卷, 第11期, 2014年 11月 5日 (2014 - 11 - 05), 参见摘要	1-7
A	Peter Schadowaldt等. "Significance of L-Alloisoleucine in Plasma for Diagnosis of Maple Syrup Urine Disease" Clinical Chemistry, 第45卷, 第10期, 1999年 10月 31日 (1999 - 10 - 31), 参见第1734页左栏第1段-右栏第1段	1-7
A	CN 104246497 A (国立大学法人九州大学, 株式会社资生堂) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 参见权利要求4、8、12	1-7

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件  
 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利  
 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)  
 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件  
 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件  
 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性  
 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性  
 “&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 6月 16日

国际检索报告邮寄日期

2016年 6月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

授权官员

马振莲

电话号码 (86-10) 62412131

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/097205

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104246497	A	2014年 12月 24日	EP	2829877	A1	2015年 1月 28日
				JP	2013224929	A	2013年 10月 31日
				US	2015079623	A1	2015年 3月 19日
				WO	2013140785	A1	2013年 9月 26日
				IN	2060MUN2014	A	2015年 8月 21日
				TW	201344194	A	2013年 11月 1日
				EP	2829877	A4	2015年 12月 9日
<hr/>							