



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102021159 A

(43) 申请公布日 2011.04.20

(21) 申请号 201010543625.4

代理人 罗菊华

(22) 申请日 1998.10.23

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

08/956,323 1997.10.23 US

08/956,324 1997.10.23 US

08/956,564 1997.10.23 US

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 9/56 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

98811435.6 1998.10.23

A23K 1/16 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

(71) 申请人 金克克国际有限公司

D06M 16/00 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 A·J·宝露斯 V·夏兰伯格

J·T·小凯利斯 C·培驰

J·纳德尼 D·P·纳奇

R·M·卡尔德威尔 K·D·科里尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 7 页

(54) 发明名称

具有改变的净电荷、在去污剂中使用的多点
置换的蛋白酶变体

(57) 摘要

公开了具有改变的净电荷、在去污剂中使用的
多点置换的蛋白酶变体。变异蛋白酶的获得方
法通常是,对编码天然存在的或重组的蛋白酶
的前体 DNA 序列进行体外修饰,在前体蛋白酶的氨
基酸序列中引起多处氨基酸残基的置换。提供了
如下蛋白酶变体,其在一个或多个残基位置处含
有氨基酸置换,该置换改变了该位置的电荷,使
其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更
弱,因此该蛋白酶变体在低去污剂浓度体系中比
前体蛋白酶更有效。也提供了如下蛋白酶变体,其
在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换,该置
换改变了该位置的电荷,使其电荷与前体蛋白酶
相比正电性更强或负电性更弱,因此该蛋白酶变
体在高去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。

1. 一种蛋白酶变体，其在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换，其中该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更弱，并且该蛋白酶变体在低去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。

2. 权利要求 1 的蛋白酶变体，其中该蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶。

3. 根据权利要求 1 的蛋白酶变体，其来源于芽孢杆菌属的枯草杆菌蛋白酶。

4. 根据权利要求 3 的蛋白酶变体，其来源于迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶。

5. 一种编码权利要求 1 的蛋白酶变体的 DNA。

6. 一种编码权利要求 5 的 DNA 的表达载体。

7. 一种用权利要求 6 的表达载体转化的宿主细胞。

8. 一种含有权利要求 1 的蛋白酶变体的清洁用组合物。

9. 一种含有权利要求 1 的蛋白酶变体的动物饲料。

10. 一种含有权利要求 1 的蛋白酶变体的用于处理纺织品的组合物。

11. 一种蛋白酶变体，其在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换，其中该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比正电性更强或负电性更弱，并且该蛋白酶变体在高去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。

12. 权利要求 11 的蛋白酶变体，其中该蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶。

13. 根据权利要求 11 的蛋白酶变体，其来源于芽孢杆菌属的枯草杆菌蛋白酶。

14. 根据权利要求 13 的蛋白酶变体，其来源于迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶。

15. 一种编码权利要求 11 的蛋白酶变体的 DNA。

16. 一种编码权利要求 15 的 DNA 的表达载体。

17. 一种用权利要求 16 的表达载体转化的宿主细胞。

18. 一种含有权利要求 11 的蛋白酶变体的清洁用组合物。

19. 一种含有权利要求 11 的蛋白酶变体的动物饲料。

20. 一种含有权利要求 11 的蛋白酶变体的用于处理纺织品的组合物。

21. 权利要求 1 的蛋白酶变体，其中高去污剂浓度高于洗涤用水中 2000ppm 的浓度。

22. 一种产生在低、中及高去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效的蛋白酶变体的方法，包括：

a) 置换一个或多个残基位置的氨基酸，其中该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比正电性更强或负电性更弱；

b) 置换一个或多个残基位置的氨基酸，其中该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更弱；

c) 检测该变体，测定它在中、高及低去污剂浓度体系中与前体蛋白酶相比的有效性；及

d) 必要时重复步骤 a)-c)，产生在低、中及高去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效的蛋白酶变体。

23. 一种蛋白酶变体，其在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换，其中该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比正电性更强或负电性更弱，并且该蛋白酶变体在中去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。

24. 一种蛋白酶变体，其在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换，其中该置换改变

了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更弱，并且该蛋白酶变体在中去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。

具有改变的净电荷、在去污剂中使用的多点置换的蛋白酶变体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是 1998 年 10 月 23 日提交的美国专利申请 08/956,323、1998 年 10 月 23 日提交的美国专利申请 08/956,564 和 1998 年 10 月 23 日提交的美国专利申请 08/956,324 的部分继续申请，所有这些申请在此都完整引用。

[0003] 发明背景

[0004] 丝氨酸蛋白酶是羧基水解酶的一个亚组。其包括多种类别的具有广泛特性和生物功能的酶。Stroud, R., 科学美国人 (Sci.Amer.) 131 : 74-88。尽管其功能的多样性，但丝氨酸蛋白酶的催化机制至少由两种遗传分离的酶家族来完成：1) 枯草杆菌蛋白酶和 2) 哺乳动物胰凝乳蛋白酶相关的丝氨酸蛋白酶及同源细菌丝氨酸蛋白酶（例如胰蛋白酶和灰色链霉菌 (*S.gresius*) 胰蛋白酶）。这两个丝氨酸蛋白酶家族显示非常相似的催化机理。Kraut, J.(1977), 生物化学年述 (Annu.Rev.Biochem.), 46 : 331-358。此外，尽管一级结构不相关，但这两个酶家族的三级结构存在由丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸组成的氨基酸保守催化三联体。

[0005] 枯草杆菌蛋白酶是由多种芽孢杆菌属的种及其它微生物大量分泌的丝氨酸蛋白酶（分子量约为 27,500）。已经测定了芽孢杆菌属至少九个不同种的枯草杆菌蛋白酶的蛋白质序列。Markland, F.S. 等人 (1983), Hooppe-Seyler' s Z.Physiol.Chem., 364 : 1537-1540。曾经报道了来源于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 和迟缓芽孢杆菌 (*B.lentus*) 几种天然变体的枯草杆菌蛋白酶的三维晶体结构。这些研究表明，尽管枯草杆菌蛋白酶与哺乳动物丝氨酸蛋白酶在遗传上是不相关的，但它具有相似的活性部位结构。含有共价结合的肽抑制剂的枯草杆菌蛋白酶 (Robertus, J.D. 等人 (1972), 生物化学 (Biochemistry), 11 : 239-2449) 或产物复合物 (Robertus, J.D. 等人 (1976), 生物化学杂志 (J.Biol.Chem.), 251 : 1097-1103) 的 x- 射线晶体结构也提供了关于枯草杆菌蛋白酶的活性部位和推断的底物结合裂隙的信息。另外，曾经报道了关于枯草杆菌蛋白酶的大量动力学和化学修饰研究 (Svendsen, B.(1976), Carlsberg 研究通讯 (Carlsberg Res.Communi.), 41 : 237-291 ; Markland, F.S., 同前)，并且至少有一条报道，其中枯草杆菌蛋白酶残基 222 的甲硫氨酸的侧链被过氧化氢转化为甲硫氨酸-亚砷 (Stauffer, D.C. 等人 (1965), 生物化学杂志, 244 : 5333-5338)，并进行了广泛的位点专一诱变 (Wells 和 Estell (1988) TIBS 13 : 291-297)。

[0006] 在用于去污剂制剂的蛋白酶变体的开发中，一个常见的问题是洗涤条件的多样性，包括可在其中使用蛋白酶变体的不同去污剂制剂。例如，在不同领域中使用的去污剂配方在洗涤用水 (wash water) 中含有不同浓度的有关成分。例如，欧洲去污剂体系一般在洗涤用水中含有大约 4500-5000ppm 的去污剂成分，而日本去污剂体系一般在洗涤用水中含有大约 667ppm 的去污剂成分。在北美洲，尤其在美国，去污剂体系一般在洗涤用水中含有约 975ppm 的去污剂成分。令人惊奇地，发展了一种可用于低去污剂浓度体系、高去污剂浓度体系和 / 或中去污剂浓度体系以及可用于所有这三种去污剂浓度体系的蛋

白酶变体的合理设计方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的一个目的在于提供在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换的蛋白酶变体，该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更弱，因此该蛋白酶变体在低去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。一种低去污剂浓度体系是在洗涤用水中存在少于约 800ppm 的去污剂成分的洗涤体系。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换的蛋白酶变体，该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比正电性更强或负电性更弱，因此该蛋白酶变体在高去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。一种高去污剂浓度体系是在洗涤用水中存在超过约 2000ppm 的去污剂成分的洗涤体系。

[0010] 本发明的另一个目的在于提供在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换的蛋白酶变体，该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比正电性更强或负电性更弱，因此该蛋白酶变体在中去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。一种中去污剂浓度体系是在洗涤用水中存在约 800ppm 到约 2000ppm 的去污剂成分的体系。

[0011] 本发明的另一个目的在于提供在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换的蛋白酶变体，该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更弱，因此该蛋白酶变体在中去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效。一种中去污剂浓度体系是在洗涤用水中存在约 800ppm 到约 2000ppm 的去污剂成分的洗涤体系。

[0012] 本发明另外一个目的在于提供编码这些蛋白酶变体的 DNA 序列，以及含有这些变体 DNA 序列的表达载体。

[0013] 更进一步，本发明的另一目的在于提供用这些载体转化的宿主细胞，以及能够表达这种 DNA 而在细胞内或细胞外产生蛋白酶变体的宿主细胞。

[0014] 进一步提供一种含有本发明的蛋白酶变体的清洁用组合物。

[0015] 另外，也提供一种含有本发明的蛋白酶变体的动物饲料。

[0016] 进一步提供一种产生在低、中及高去污剂浓度体系中都比前体蛋白酶更有效的蛋白酶变体的方法，包括：

[0017] a) 置换一个或多个残基位置处的氨基酸，其中该置换改变了该位置的电荷，使得其电荷与前体蛋白酶相比正电性更强或负电性更弱；

[0018] b) 置换一个或多个残基位置处的氨基酸，其中该置换改变了该位置的电荷，使得其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更弱；

[0019] c) 检测该变体，以测定它在中、高及低去污剂浓度体系中与前体蛋白酶相比的有效性；及

[0020] d) 必要时重复步骤 a)-c)，以产生在低、中及高去污剂浓度体系中比前体蛋白酶更有效的蛋白酶变体，其中步骤 a) 和 b) 能以任意顺序进行。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1A-B 描述解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的 DNA 及氨基酸序列，和该基因的部分限制酶切图谱。

[0023] 图 2 描述解淀粉芽孢杆菌 (BPN)' 和迟缓芽孢杆菌 (野生型) 枯草杆菌蛋白酶之间的保守氨基酸残基。

[0024] 图 3A 和 3B 描述四种枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列。最上一行代表来源于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶（有时也称为枯草杆菌蛋白酶 BPN'）的枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列。第二行描述来源于枯草芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列。第三行描述来源于地衣芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列。第四行描述来源于迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶（在 PCT WO89/06276 中也称为枯草杆菌蛋白酶 309）的氨基酸序列。符号 * 表示与枯草杆菌蛋白酶 BPN' 相比特定氨基酸残基缺如。

[0025] 发明详述

[0026] 如上所述，特定地区具有特定的洗涤条件，因而使用不同类型的去污剂。例如，日本使用低去污剂浓度体系，而欧洲使用高去污剂浓度体系。如前所述，美国使用中去污剂浓度体系。我们发现，在这些不同的去污剂制剂中表现最佳的蛋白酶变体各不相同。然而，由这些观察的结果可以预料，发现一种适用于所有这三种去污剂类型中的蛋白酶是不可能的。令人惊奇地，情况并非如此。已经发展了一种方法，用于合理设计可在低去污剂浓度体系或高去污剂浓度体系乃至中去污剂浓度体系中使用的蛋白酶变体，以及在所有这三种去污剂浓度体系都适用的蛋白酶变体。

[0027] 我们发现，为了产生在低去污剂浓度体系中更有效的蛋白酶变体，用带负电荷残基或中性残基替换带正电残基和 / 或用带负电残基替换中性残基是必要的。相反，我们注意到，为了产生在高去污剂浓度体系中更有效的蛋白酶变体，用带正电残基或中性残基替换带负电残基和 / 或用带正电残基替换中性残基是必要的。此外，我们发现，在低去污剂浓度体系 和 / 或高去污剂浓度体系中有用的许多蛋白酶变体在中去污剂浓度体系中也有效。通过平衡这些变化，可能产生在低去污剂浓度体系、低及中去污剂浓度体系、中及高去污剂浓度体系、高去污剂浓度体系或所有这三种去污剂浓度体系中有出色表现的蛋白酶变体。

[0028] 假定在水溶液中具有酸性或碱性功能的任何离子化氨基酸侧链的静电电荷是 pH 的函数。酸性残基 Glu 和 Asp 在平衡过程中由于在 pH3-6 之间解离而失去一个质子，由此得到一个负电荷。His、Lys 和 Arg 分别在 pH5-8、pH8.5-11.5 和 pH11-14 之间以相似的方式逐步去质子化，由此失去一个正电荷。Tyr OH 的质子在 pH8.5-11.5 之间逐渐解离，Tyr 由此得到一个负电荷。羧基端的解离范围是 pH1-4，产生一个负电荷，对于氨基端是 pH8-11，伴随着一个正电荷的丢失。对于此处列出的氨基酸侧链，解离范围是多种蛋白质的平均值，但公知在某些蛋白质中它受异常结构构型的影响。

[0029] 所有电荷的累积效应决定了一种蛋白质在特定的 pH 时是具有净正电荷还是净负电荷。正电荷和负电荷等效并使蛋白质处于静电中性状态时的 pH 称为等电点 (pI)。当 pH 改变或者添加或去除含有离子化侧链残基的氨基酸时，蛋白质将失去或得到电荷。通过将特定 pH 时带负电的残基替换为不带电的或带正电的残基，分别导致 +1 及 +2 的形式电荷改变，能实现净正电荷的增加。通过将不带电侧链残基替换为在特定 pH 时质子化的残基，形式电荷改变将为 +1。同样，将在观测 pH 时带正电及不带电的侧链替换为带负电的侧链，能增加净负电荷，并分别得到 -1 和 -2 的负电荷形式增加。

[0030] 低去污剂浓度体系包括在洗涤用水中存在低于大约 800ppm 的去污剂成分的去污剂。日本去污剂一般被认为是低去污剂浓度体系，因为它们在洗涤用水中存在大约 667ppm 的去污剂成分。

[0031] 中去污剂浓度包括在洗涤用水中存在大约 800ppm 到约 2000ppm 的去污剂成分的去污剂。北美去污剂一般被认为是中去污剂浓度体系，因为它们在洗涤用水中存在大约 975ppm 的去污剂成分。巴西的体系一般在洗涤用水中存在大约 1500ppm 的去污剂成分。

[0032] 高去污剂浓度体系包括在洗涤用水中存在高于大约 2000ppm 的去污剂成分的去污剂。欧洲去污剂一般被认为是高去污剂浓度体系，因为它们在洗涤用水中存在大约 4500-5000ppm 的去污剂成分。

[0033] 拉丁美洲去污剂一般是高泡沫磷酸盐助洗去污剂，在拉丁美洲使用的去污剂范围可能处于中及高去污剂浓度，因为在洗涤用水中它们有 1500ppm 到 6000ppm 的去污剂成分。如上所述，巴西的体系一般在洗涤用水中含有大约 1500ppm 的去污剂成分。然而，其它高泡沫磷酸盐助洗去污剂地区，不限于其它拉丁美洲国家，可能有在洗涤用水中存在可达大约 6000ppm 的去污剂成分的高去污剂浓度体系。

[0034] 根据前述，显然典型洗涤溶液中去污剂组合物的浓度在全世界范围内各不相同，从低于大约 800ppm 的去污剂组合物（“低去污剂浓度地区”），例如在日本为大约 667ppm，到约 800ppm-约 2000ppm（“中去污剂浓度地区”），例如在美国约为 975ppm、在巴西约为 1500ppm，到高于大约 2000ppm（“高去污剂浓度地区”），例如在欧洲为大约 4500ppm-约 5000ppm，在高泡沫助洗剂地区约为 6000ppm。

[0035] 典型洗涤溶液的浓度由经验确定。例如，在美国，一种典型的洗涤机可容纳大约 64.4 升体积的洗涤溶液。因此，为了获得在洗涤溶液中大约 975ppm 去污剂的浓度，必须向 64.4 升洗涤溶液中加入大约 62.79 克去污剂组合物。这种量是由消费者用去污剂所带量杯测量的加入洗涤用水中的典型量。

[0036] 蛋白酶是通常用来切割蛋白质或肽的肽键的羧基水解酶。在此使用时，“蛋白酶”意思是天然存在的蛋白酶或重组蛋白酶。天然存在的蛋白酶包括 α -氨肽水解酶、肽酰氨基酸水解酶、酰基氨基水解酶、丝氨酸羧基肽酶、金属羧基肽酶、巯基蛋白酶、羧基蛋白酶和金属蛋白酶。包括丝氨酸、金属、巯基和酸性蛋白酶，以及内切蛋白酶和外切蛋白酶。

[0037] 本发明包括非天然存在的羧基水解酶变体的蛋白酶（蛋白酶变体），与衍生出该变体氨基酸序列的前体羧基水解酶相比，其具有不同的蛋白水解活性、稳定性、底物特异性、pH 分布曲线和 / 或性能特征。特别是，这些蛋白酶变体具有自然界中未知的氨基酸序列，它是由于前体蛋白酶的大多数氨基酸残基被替换为不同氨基酸而产生的。前体蛋白酶可以是天然存在的蛋白酶或重组蛋白酶。

[0038] 此处有用的蛋白酶变体包含 19 种天然存在的 L-氨基酸中任一种在指定氨基酸残基位置处的置换。这些置换能在任何前体枯草杆菌蛋白酶（原核、真核、哺乳动物等）中进行。在整个申请中，以常用的单字母及三字母密码的形式提及不同的氨基酸。这些密码由 Dale, M.W.(1989), 《细菌分子遗传学》(Molecular Genetics of Bacteria), John Wiley & Sons, Ltd., 附录 B 确定。

[0039] 此处有用的蛋白酶变体优选地来源于芽孢杆菌属的枯草杆菌蛋白酶。更优选地，蛋白酶变体来源于迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶和 / 或枯草杆菌蛋白酶 309。

[0040] 枯草杆菌蛋白酶是一般用来切割蛋白质或肽的肽键的细菌或真菌蛋白酶。在

此使用时,“枯草杆菌蛋白酶”意思是天然存在的枯草杆菌蛋白酶或重组枯草杆菌蛋白酶。已知一系列天然存在的枯草杆菌蛋白酶是由不同微生物种产生且常常为分泌的。该系列成员的氨基酸序列不是完全同源的。然而,该系列中的枯草杆菌蛋白酶显示相同或相似类型的蛋白水解活性。该类丝氨酸蛋白酶具有一种共同的氨基酸序列,该序列定义了有别于胰凝乳蛋白酶相关种类丝氨酸蛋白酶的催化三联体。枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶相关的丝氨酸蛋白酶都含有包括天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸的催化三联体。在枯草杆菌蛋白酶相关蛋白酶中,这些氨基酸从氨基端向羧基端阅读的相对顺序是天冬氨酸-组氨酸-丝氨酸。但是,在胰凝乳蛋白酶相关蛋白酶中相对顺序为组氨酸-天冬氨酸-丝氨酸。因此,枯草杆菌蛋白酶在此是指含有枯草杆菌蛋白酶相关蛋白酶的催化三联体的丝氨酸蛋白酶。实例包括但不限于此处图 3 中所确定的枯草杆菌蛋白酶。一般而言,并且对于本发明,蛋白酶中氨基酸的编号对应于分配给图 1 所示成熟解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶序列的编号。

[0041] “重组枯草杆菌蛋白酶”或“重组蛋白酶”是指一种枯草杆菌蛋白酶或蛋白酶,其中编码枯草杆菌蛋白酶或蛋白酶的 DNA 序列受到修饰,产生一种变异(或突变)DNA 序列,该序列编码天然存在的氨基酸序列中一种或多种氨基酸的置换、缺失或插入。产生这种修饰、并且可与此处公开的方法结合的适当方法包括美国专利 RE34,606、美国专利 5,204,015 和美国专利 5,185,258、美国专利 5,700,676、美国专利 5,801,038 和美国专利 5,763,257 中公开的方法。

[0042] “非人类的枯草杆菌蛋白酶”及其编码 DNA 可以从多种原核及真核生物中获得。原核生物合适实例包括革兰氏阴性生物如大肠杆菌或假单胞菌(*Pseudomonas*)、革兰氏阳性菌如微球菌(*Micrococcus*)或芽孢杆菌。可从中获得枯草杆菌蛋白酶及其基因的真核生物的实例包括酵母如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、真菌如曲霉(*Aspergillus*)属的种。

[0043] “蛋白酶变体”具有由“前体蛋白酶”的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。前体蛋白酶包括天然存在的蛋白酶和重组蛋白酶。蛋白酶变体的氨基酸序列通过前体氨基酸序列中一种或多种氨基酸的置换、缺失或插入而由前体蛋白酶氨基酸序列“衍生”。这种修饰是编码前体蛋白酶氨基酸序列的“前体 DNA 序列”的修饰,而不是前体蛋白酶自身的操作。对前体 DNA 序列进行这种操作的适当方法包括此处公开的方法,以及本领域技术人员公知的方法(参见,例如,EP 0 328299、WO89/06279 和已经在此引用的美国专利及申请)。

[0044] 这些氨基酸位置编号是指那些分配给图 1 所示成熟解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶序列的编号。然而,本发明不限于该特定枯草杆菌蛋白酶的突变,而是扩展到在一定位置处含有这样的氨基酸残基的前体蛋白酶,该残基“等同”于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中特别确定的残基。在本发明的一个优选实施方案中,前体蛋白酶是迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶,并在迟缓芽孢杆菌中对应于以上所列位点的等同氨基酸残基位置处进行置换。

[0045] 如果前体蛋白酶的残基(氨基酸)位置与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中的特定残基或该残基的一部分同源(即,在一级或三级结构中位置相对应)或类似(即,具有相同或相似的化学结合、反应或相互作用的功能能力),则它相当于解淀粉芽孢杆菌枯草

杆菌蛋白酶的残基。

[0046] 为了建立与一级结构的同源性，将前体蛋白酶的氨基酸序列直接与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶一级序列相比较，特别与公知在序列已知的枯草杆菌蛋白酶中不变的一组残基相比较。例如，在此图 2 显示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶与迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶之间的保守残基。对比保守残基，为维持序列对比进行必要的插入和缺失（即，避免保守残基由于任意缺失和插入而消除）之后，确定等同于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶一级序列中特定氨基酸的残基。保守残基的对比优选地应当保持 100% 的这些残基。然而，超过 75% 或低至 50% 的保守残基的对比也足以确定等同的残基。催化三联体 Asp32/His64/Ser221 的保守性应当保持。Siezen 等人 (1991) 蛋白质工程 (Protein Eng.) 4(7) : 719-737 显示了大量丝氨酸蛋白酶的序列对比。Siezen 等人将此分组称为枯草杆菌酶 (Subtilase) 或枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶。

[0047] 例如，图 3 中，排列对比了解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌 (*carlsbergensis*) 和迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶之氨基酸序列，以提供氨基酸序列之间大量的同源性。这些序列的比较显示，在每种序列中含有许多保守残基。图 2 中确定了这些保守残基 (BPN' 与迟缓芽孢杆菌之间)。

[0048] 因此，可用这些保守残基确定其它枯草杆菌蛋白酶，诸如迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (1989 年 7 月 13 日公布的 PCT 公开文本 WO89/06279)、此处优选的蛋白酶前体酶或被称为 PB92 的枯草杆菌蛋白酶 (EP 0 328 299，它与优选的迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶高度同源) 中与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶相应的等同氨基酸残基。在图 3A 和 3B 中将这枯草杆菌蛋白酶中某些氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的序列相对比，产生保守残基的最大同源性。如所能看到的，与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶相比，迟缓芽孢杆菌序列中存在大量缺失。因此，例如，在其它枯草杆菌蛋白酶中与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中的 Val165 等同的氨基酸对于迟缓芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌而言是异亮氨酸。

[0049] 也可以通过测定已经通过 x-射线晶体分析法确定三级结构的前体蛋白酶在三级结构水平上的同源性，来确定“等同的残基”。等同的残基被定义为前体蛋白酶和解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶特定氨基酸残基的两个或多个主链原子的原子坐标 (N 对 N、CA 对 CA、C 对 C 和 O 对 O) 经对比后在 0.13nm 优选地 0.1nm 之内的残基。在定向并定位最佳模型之后完成对比，得到所述蛋白酶与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的非氢蛋白质原子的原子坐标的最大重叠。最佳模型是在可获得的最高分辨率时对于实验衍射数据可得到最低 R 因子的晶体模型。

[0050]

$$R \text{ 因子} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

[0051] 与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶特定残基功能类似的等同残基被定义为前体蛋白酶的如下氨基酸，它们可采取一种构象，使得它们以一种确定的方式改变、修饰或贡献于蛋白质结构、底物结合或催化，且其归因于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的特定残基。此外，它们是前体蛋白酶的那类残基（通过 x-射线晶体分析法已获得其三级结构），其占据了类似位点，使得尽管基于占据同源位点，特定残基的主链原子也许不

能满足等同的标准，但该残基的至少两个侧链原子之原子坐标位于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶相应侧链原子的 0.13nm 内。在 EPO 公开文本 0 251 446 (相当于美国专利 5,182,204, 其公开内容在此引用作为参考) 中阐述了解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的三维结构的坐标，并能如上所述用来在三级结构水平上确定等同的残基。

[0052] 为了置换所确定的某些残基是保守残基，而其它的则不是。对于不保守的残基而言，一种或多种氨基酸的置换限于产生这样一种变体的置换，该变体具有一种与自然中所发现的氨基酸序列不对应的序列。对于保守残基而言，这些置换不能产生天然存在的序列。本发明的蛋白酶变体包括蛋白酶变体的成熟形式，以及这些蛋白酶变体的原-形式和前原-形式。前原-形式是优选的结构，因为其有利于蛋白酶变体的表达、分泌和成熟。

[0053] “原序列”是指与蛋白酶成熟形式的 N 端部分结合的氨基酸序列，当它被去除后，导致该蛋白酶“成熟”形式的出现。实质上发现许多蛋白水解酶为翻译酶原产物，在不存在翻译后加工的情况下以该方式表达。用于产生蛋白酶变体的一种优选原序列是解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的推定的原序列，尽管也可使用其它蛋白酶原序列。

[0054] “信号序列”或“前序列”是指与蛋白酶 N 端部分结合或与蛋白酶 N 端部分结合的任何氨基酸序列，它们可能参与蛋白酶成熟形式或原形式的分泌。信号序列的这种定义是一种功能性定义，意为包括蛋白酶基因 N 端部分所编码的所有氨基酸序列，其在天然条件下参与蛋白酶分泌的实现。本发明利用这些序列实现此处所述蛋白酶变体的分泌。一种可能的信号序列包含枯草芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶信号序列的前 7 个氨基酸残基，这些残基与迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶信号序列 (ATCC21536) 的剩余部分相融合。

[0055] 蛋白酶变体的“前原”形式由含有与蛋白酶氨基端有效连接的原序列的蛋白酶成熟形式和与原序列氨基端有效连接的“前”序列或“信号”序列组成。

[0056] “表达载体”是指一种 DNA 构建体，其含有与能实现该 DNA 在适当宿主中表达的适当控制序列有效连接的 DNA 序列。这类控制序列包括实现转录的启动子、控制这种转录的任意操纵子序列、编码适当 mRNA 核糖体结合位点的序列和控制转录与翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒，或者仅仅是有效的基因组插入片段。一旦转化到适当宿主中，载体可不依赖于宿主基因组复制并起作用，或者在某些情况中可能整合到基因组自身中。在本说明书中，“质粒”和“载体”有时交换使用，因为质粒是目前最常用的载体形式。然而，本发明意在包括表达载体的其它形式，它们具有等同的功能，并且是或者可成为本领域所公知的。

[0057] 本发明中所用的“宿主细胞”通常是原核或真核宿主，它们优选地用美国专利 RE 34,606 中公开的方法操作，以使其不能分泌酶促活性的内切蛋白酶。表达蛋白酶的一种优选宿主细胞是芽孢杆菌株 BG2036，它缺乏具有有酶活性的中性蛋白酶和碱性蛋白酶 (枯草杆菌蛋白酶)。美国专利 5,264,366 中详述了菌株 BG2036 的构建。表达蛋白酶的其它宿主细胞包括枯草芽孢杆菌 1168 (在美国专利 RE 34,606 和美国专利 5,264,366 中也有描述，其公开内容在此引用作为参考)，以及任何合适的芽孢杆菌属的菌株，如地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌等。

[0058] 用以重组 DNA 技术构建的载体转化或转染宿主细胞。这些转化的宿主细胞能复

制编码蛋白酶变体的载体或表达希望的蛋白酶变体。对于编码蛋白酶变体前-形式或前原-形式的载体而言,这些变体当表达时一般由宿主细胞向宿主细胞培养基中分泌。

[0059] 当描述两个 DNA 区域之间的关系时,“有效连接”仅意味着它们在功能上彼此相关。例如,如果一种前序列作为信号序列参与蛋白质成熟形式的分泌,最可能的是参与信号序列的切割,则该前序列与肽有效连接。如果一种启动子控制一种编码序列的转录,则该启动子与该序列有效连接;如果一种核糖体结合位点位于一定位置使得翻译成为可能,则它与编码序列有效连接。

[0060] 编码天然存在的前体蛋白酶的基因可依照本领域技术人员公知的通用方法获得。这些方法一般包括:合成含有编码目标蛋白酶区推定序列的标记探针、由表达该蛋白酶的生物制备基因组文库,以及通过与该探针杂交为了获得目标基因筛选该文库。然后对阳性杂交克隆作图并测定。

[0061] 然后用克隆的蛋白酶转化宿主细胞,以表达该蛋白酶。然后将蛋白酶基因连接于高拷贝数质粒中。该质粒在宿主中复制,在此意义上它含有质粒复制所必需的众所周知的元件:与所述基因有效连接的启动子(如果它可被宿主识别,即转录,则可作为基因本身的同源启动子)、转录终止区和聚腺苷酸化区(在某些真核宿主细胞中,它对于由宿主从蛋白酶基因转录的 mRNA 的稳定性是必需的),它是外源的或由蛋白酶基因的内源终止区所提供的,质粒中还期望含有选择性基因,如抗生素抗性基因,它使得质粒感染的宿主细胞通过在含有抗生素的培养基中生长以维持连续培养成为可能。高拷贝数质粒也含有宿主的复制起点,从而能在细胞质中不受染色体限制地产生大量质粒。然而,宿主基因组中整合多拷贝的蛋白酶基因也处于本发明之内。利用对同源重组特别敏感的原核和真核生物利于此过程。

[0062] 该基因可能是天然迟缓芽孢杆菌基因。此外,也可以产生编码天然存在的或突变的前体蛋白酶的合成基因。这种方法中,测定前体蛋白酶的 DNA 和/或氨基酸序列。之后合成多个、重叠的合成单链 DNA 片段,杂交并连接后产生编码前体蛋白酶的合成 DNA。在美国专利 5,204,015 的实施例 3 中描述了合成的基因构建体的一个实例,其公开内容在此引用作为参考。

[0063] 一旦克隆了天然存在的或合成的前体蛋白酶基因,即进行大量修饰,以增强天然存在的前体蛋白酶合成之外的基因用途。这些修饰包括如美国专利 RE 34,606 和 EPO 公布号 0 251 446 所公开的重组蛋白酶的产生和此处所述的蛋白酶变体的产生。

[0064] 可用下列盒式诱变法促进本发明的蛋白酶变体的构建,尽管也可使用其它方法。首先,获得天然存在的编码蛋白酶的基因,并全部或部分测序。然后为了寻找希望在编码的酶中进行一个或多个氨基酸突变(缺失、插入或置换)的位点,扫描该序列。评价侧翼于该位点的序列是否存在估计限制酶切位点的存在,用于将基因的短片段替换为表达时编码不同突变体的寡核苷酸集合体。这些限制酶切位点优选地是蛋白酶基因内的唯一位点,以便于基因片段的置换。然而,可使用在蛋白酶基因中不过度丰余的任何适宜的限制酶切位点,只要限制酶切消化产生的基因片段能够在适当的序列中重新装配即可。如果在与所选位点适当距离内(10-15 个核苷酸)的位置处不存在限制酶切位点,则可通过以在最终构建中不改变读框也不改变所编码氨基酸的方式置换基因中的核苷酸来产生这些位点。为了改变其序列以符合目标序列,基因突变依照公知的方法通过 M13 引

物延伸来实现。根据遗传密码的冗余性、基因的限制酶图谱和大量不同的限制酶，常规进行定位适当侧翼区并估计所需改变以得到两种适宜的限制酶切位点序列的工作。注意到如果可获得适宜的侧翼限制酶切位点，则上述方法需要仅仅与不含该位点的侧翼区结合应用。

[0065] 一旦克隆了天然存在的 DNA 或合成的 DNA，即用同源的酶消化侧翼于待突变位点的限制酶切位点，并将多数末端互补的寡核苷酸盒连接于该基因中。该方法简化了诱变，因为能合成所有寡核苷酸使其具有相同的限制酶切位点，且合成的接头不是产生限制酶切位点所必需的。

[0066] 在此使用时，蛋白水解活性被定义为每毫克活性酶的肽键水解率。测定蛋白水解活性有许多众所周知的方法 (K.M.Kalish, “微生物蛋白酶” 《生物化学工程 / 生物技术进展》 (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), A.Fiechter 编, 1988)。除了改进的蛋白水解活性之外，或者作为一种备择，本发明的变异蛋白酶可能具有其它改进的性质，如 K_m 、 k_{cat} 或 k_{cat}/K_m 比值和 / 或改进的底物特异性和 / 或改进的 pH 活性分布曲线。这些酶能量身定做般地用于例如预计在肽制剂中存在的特定底物，或适于水解过程如洗衣用途。

[0067] 本发明的一个方面，目的在于获得一种与前体蛋白酶相比具有改变的蛋白水解活性的变异蛋白酶，因为提高这种活性（数字上的变大）使得酶更有效地作用于靶底物的用途成为可能。同样需要的是与前体相比具有改变的热稳定性和 / 或改变的底物特异性的变异酶。在有些情况中，可能希望较低的蛋白水解活性，例如，在需要蛋白酶合成活性时（对于合成肽）蛋白水解活性的降低可能是有用的。人们可希望降低该蛋白水解活性，该活性能破坏这种合成的产物。相反，在某些情况中，可能希望提高变异酶与其前体相比的蛋白水解活性。此外，变体稳定性 - 碱稳定性或热稳定性 - 的提高或降低（改变）可能是所希望的。 k_{cat} 、 K_m 或 k_{cat}/K_m 的增加或降低对于用来测定这些动力学参数的底物是特异性的。

[0068] 本发明的另一方面，发现如下的蛋白酶变体在低去污剂浓度中比前体蛋白酶更有效，该蛋白酶变体在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换，该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比负电性更强或正电性更弱。

[0069] 本发明的再另一方面，发现如下的蛋白酶变体在高去污剂浓度中比前体蛋白酶更有效，该蛋白酶变体在一个或多个残基位置处含有氨基酸置换，该置换改变了该位置的电荷，使其电荷与前体蛋白酶相比正电性更强或负电性更弱。

[0070] 此外，我们发现，在低去污剂浓度体系和 / 或高去污剂浓度体系中有用的许多蛋白酶变体在中去污剂浓度体系中也是有效的。

[0071] 这些置换优选地在迟缓芽孢杆菌（重组的或天然型）枯草杆菌蛋白酶中进行，尽管该置换也可在任何芽孢杆菌蛋白酶，优选地在芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中进行。

[0072] 根据用变异蛋白酶获得的筛选结果，解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中的显著突变对于这些酶的蛋白水解活性、性能和 / 或稳定性以及这些变异酶的清洁或洗涤能力至关重要。

[0073] 本发明的许多蛋白酶变体可用于配制不同的去污剂组合物或个人护理制剂如洗发剂或洗涤剂。许多公知的化合物是在含有本发明之蛋白酶突变体的组合物中有用的适

当表面活性剂。其包括非离子、阴离子、阳离子或两性离子去污剂，如 Barry J.Anderson 的 US 4,404,128 和 Jiri Flora 等人的 US 4,261,868 中所公开的。一种合适的去污剂制剂是美国专利 5,204,015 (前文引用作为参考) 的实施例 7 中所述的制剂。本领域技术人员熟悉能用作清洁用组合物的不同制剂。除了典型的清洁用组合物之外，易于理解本发明的蛋白酶变体也可用于使用天然或野生型蛋白酶的任何目的。因此，例如，这些变体能用于固体肥皂或液体肥皂的用途、餐具清洁 (dishcare) 剂、隐形眼镜清洁液或产品、肽水解、废物处理、纺织品用途、用作蛋白质生产中的融合-切割酶，等等。本发明的变体可在去污剂组合物中具有增强的性能 (与前体相比)。在此使用时，在去污剂中的增强性能定义为某些酶敏感性污迹如草或血液的清除加强，如在标准洗涤循环后通过通用评估所测定的。

[0074] 本发明的蛋白酶能以大约 0.01% 到大约 5% (优选地 0.1% -0.5%) 的重量百分比水平配制于已知的 pH6.5-12.0 的粉末及液体去污剂中。这些去污剂清洁用组合物也能包含其它的酶如已知的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶或糖苷内切酶，以及助洗剂和稳定剂。

[0075] 本发明的蛋白酶向常规清洁用组合物中的添加不产生任何特殊的应用限制。换句话说，适合于去污剂的任何温度和 pH 也适合于该组合物，只要 pH 位于上述范围之内，而温度低于所述蛋白酶的变性温度。另外，本发明的蛋白酶也能在不含去污剂的清洁用组合物中使用，单独或与助洗剂和稳定剂结合使用。

[0076] 本发明也涉及含有本发明的蛋白酶变体的清洁用组合物。清洁用组合物另外也可含有常用于清洁用组合物的添加剂。其能选自但不限于：漂白剂、表面活性剂、助洗剂、酶和漂白催化剂。本领域的一名普通技术人员可容易地理解何种添加剂适合包含于组合物中。此处提供的列表绝不是完全的，而只是作为适当添加剂的实例。本领域的一名普通技术人员可容易地理解，应当只使用那些与该组合物中的酶及其它成分如表面活性剂相适合的添加剂。

[0077] 制成后，清洁用组合物中存在的添加剂的量约为大约 0.01% - 约 99.9%，优选地约 1% - 约 95%，更优选地约 1% - 约 80%。

[0078] 本发明的变异蛋白酶能包含于动物饲料中，如作为动物饲料添加剂部分，例如，如 US 5,612,055、US 5,314,692 和 US 5,147,642 所述。

[0079] 本发明的一个方面是含有本发明的变异蛋白酶的用于纺织品处理的组合物。如出版物如 RD 216,034、EP 134,267、US 4,533,359 和 EP 344,259 中所述，能用该组合物处理如丝绸或毛。

[0080] 以下以实施例的方式描述，而不应理解为对权利要求书范围的限制。

[0081] 此处引用的所有出版物和专利在此都完全引入作为参考。

[0082] 实施例 1

[0083] 用本领域众所周知的方法生产并纯化大量蛋白酶变体。所有突变都在迟缓芽孢杆菌 GG36 枯草杆菌蛋白酶中进行。

[0084] 用美国系列号 60/068,796 “一种测定优选的酶和 / 或优选的去污剂组合物的改进方法” 中所述的微观 (microswatch) 测定法检测产生的蛋白酶变体在两种去污剂及洗涤条件中的表现。

[0085] 表 1-13 列出了所测定的变异蛋白酶和在两种不同去污剂中检测的结果。所有数值都是与表中所示第一种蛋白酶比较而得出的(即, 1.32 的值表示, 与表中第一种变体的 100% 相比释放 132% 的污物的能力)。

[0086] A 栏显示变体的电荷差异。对于 B 栏, 去污剂是 0.67g/l 过滤的 Ariel Ultra(Procter & Gamble, Cincinnati, OH, 美国), 溶于每加仑含有 3 格令混合 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 硬度的溶液中, 25°C 下每孔使用 0.3ppm 的酶(低浓度去污剂体系)。对于 C 栏, 去污剂是 3.38g/l 过滤的 Ariel Futur(Procter & Gamble, Cincinnati, OH, 美国), 溶于每加仑含有 15 格令混合 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 硬度的溶液中, 40°C 下每孔使用 0.3ppm 的酶(高浓度去污剂体系)。

[0087] 表 1

[0088]

						A	B	C
N76D	S103A	V104I	Q109R				1.00	1.00
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R		+1	0.48	1.41

[0089] 表 2

[0090]

								A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R			1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R	-1	1.11	0.03

[0091] 表 3

[0092]

						A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I				1.00	1.00
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I		+1	0.74	1.85

[0093] 表 4

[0094]

							A	B	C
N76D	S103A	V104I	M222S					1.00	1.00
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S			0	0.66	1.84
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R		+1	0.41	5.84

[0095] 表 5

[0096]

										A	B	C
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R					1.00	1.00
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D			-1	1.79	0.81
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R	-3	2.87	0.02

[0097] 表 6

[0098]

										A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R				+1	0.94	6.80
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			+3	0.44	20.60

[0099] 表 7

[0100]

									A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	+1	0.44	2.66

[0101] 表 8

[0102]

									A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			1.00	1.00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	-1	1.96	0.65

[0103] 表 9

[0104]

									A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				1.00	1.00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R		-2	1.27	0.12

[0105] 表 10

[0106]

										A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257 V		-1	1.56	0.48

[0107] 表 11

[0108]

										A	B	C
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.00	1.00
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1.90	0.15

[0109] 表 12

[0110]

										A	B	C
S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.00	1.00
N76D	S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	-1	1.28	0.39

[0111] 表 13

[0112]

											A	B	C
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N348D	N252K			1.00	1.00
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	+1	0.40	1.74

[0113] 实施例 2

[0114] 如实施例 1 所述制备并检测下列蛋白酶变体。

[0115] 表 14 中的变体是具有以下两种类型置换的蛋白酶变体：改变一个位置处的电荷使其电荷与迟缓芽孢杆菌 GG36 相比负电性更强或正电性更弱的置换，和改变一个位置处的电荷使其电荷正电性更强或负电性更弱的置换，以及不影响特定残基位置电荷的中性置换。这产生在低去污剂浓度体系（A 栏；0.67g/l 过滤的 Ariel Ultra (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, 美国)，溶于每加仑含有 3 格令混合 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 硬度的溶液中，25℃ 下每孔使用 0.3ppm 的酶）和高去污剂浓度体系（B 栏；3.38g/l 过滤的 Ariel Futur (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, 美国)，溶于每加仑含有 15 格令混合 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 硬度的溶液中，40℃ 下每孔使用 0.3ppm 的酶）中都比标准表现更好的蛋白酶变体。

[0116] 表 14

[0117]

												A	B
N76D	S103A	V104I										1.00	1.00
V68A	S103A	V104I										1.41	1.85
V68A	N76D	S103A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				T260A	1.30	1.73
V68A	S103A	V104I	G159D	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2.77	1.20
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.96	1.42
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					2.05	1.78
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				2.00	1.34
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R				1.67	1.45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2.16	1.72
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R			1.35	1.29
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R				2.01	1.72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R				2.09	1.62
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.44	1.41
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.81	1.72
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R			1.51	1.41
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.04	1.50
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					1.92	1.09

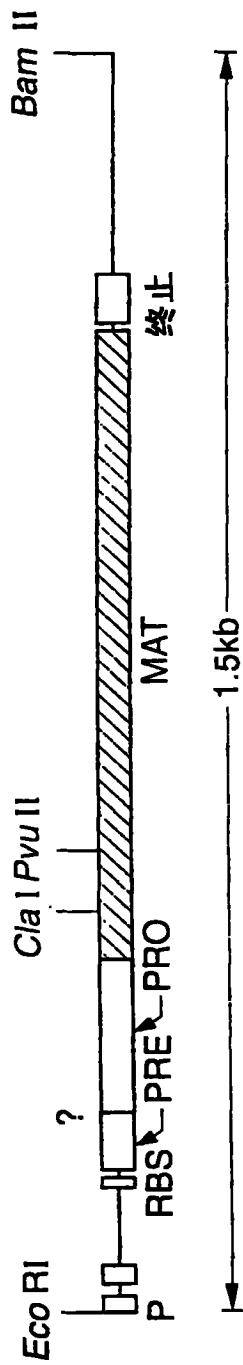


图 1A

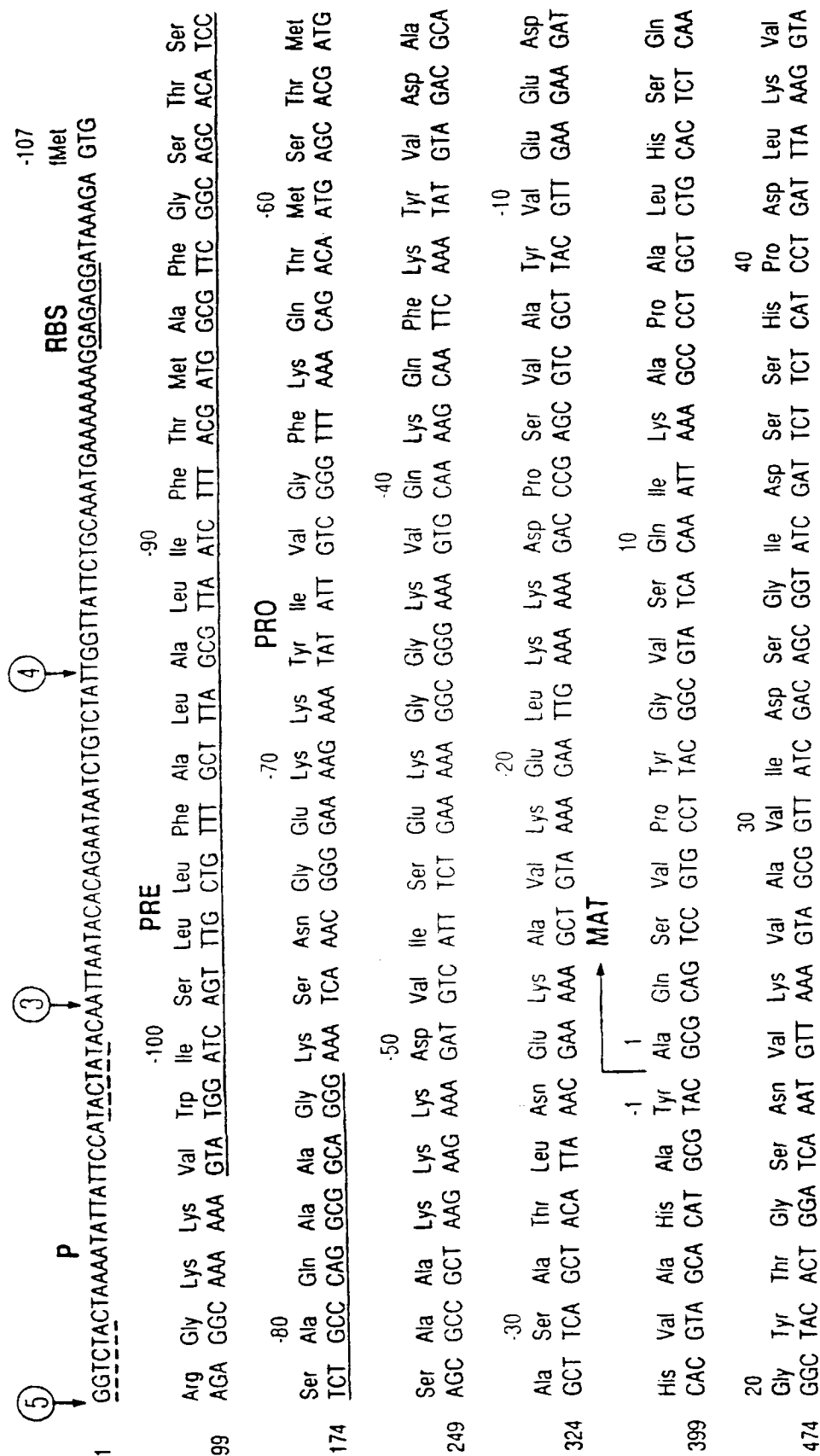


图 1B-1

549	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala
	GCA	GGC	GGA	GCC	AGC	ATG	GTT	CCT	TCT	GAA	ACA	AAT	CCT	TTC	CAA	GAC	AAC	AAC	TCT	CAC	GGA	ACT	CAC	GTT	GCC	
624	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Val	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Tyr	Ala	Val	Lys
	GGC	ACA	GTT	GCG	GCT	CTT	AAT	AAC	TCA	ATC	GGT	GTA	TTA	GGC	GTT	GCG	CCA	AGC	GCA	TCA	CTT	TAC	GCT	GTA	AAA	
699	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	Asn	Met	
	GTT	CTC	GGT	GCT	GAC	GGT	TCC	GGC	CAA	TAC	AGC	IGG	ATC	ATT	AAC	GGA	ATC	GAG	IGG	GCG	ATC	GCA	AAC	AAT	ATG	
774	Asp	Val	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Val	Ala	
	GAC	GTT	ATT	AAC	ATG	ATG	AGC	CTC	GGC	GGA	CCT	TCT	GGT	TCT	GCT	GCT	TTA	AAA	GCG	GCA	GTT	GAT	AAA	GCC	GTT	
849	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	
	TCC	GGC	GTC	GTA	GTC	GTT	GCG	GCA	GCC	GGT	AAC	GAA	GGC	ACT	TCC	GGC	AGC	TCA	AGC	ACA	GTG	GGC	TAC	CCT	GGT	
924	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	
	AAA	TAC	CCT	TCT	TCT	GTC	ATT	GCA	GTA	GGC	GCT	GTT	GAC	AGC	AGC	AAC	CAA	AGA	GCA	TCT	TTC	TCA	AGC	GTA	GGA	
999	Glu	Leu	Asp	Val	Met	Ala	Pro	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Gly	
	GAG	CTT	GAT	GTC	ATG	GCA	CCT	GGC	GTA	TCT	ATC	CAA	AGC	ACG	CTT	CCT	GGA	AAC	AAA	TAC	GGG	GCG	TAC	AAC	GGT	
1074	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	His	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Thr	Thr	Asn	Thr	
	ACG	TCA	ATG	GCA	TCT	CCG	CAC	GTT	GCC	GGA	GCG	GCT	GCT	TTG	ATT	CTT	TCT	AAG	CAC	CCG	AAC	TGG	ACA	AAC	ACT	

图 1B-2

250 Gln Gln 260 Tyr Tyr Tyr Gly Gly Leu Ile Asn
Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTC TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC
270 Val Gln Ala Ala Ala Gln OC
1224 GTA CAG GCG GCA GCT CAG TAA AACATAAAACCGGCCTTGGCCCCCGCGTTTTTATTTTTTCTCTCCCGCATGTTCAATCCGCTCC
终止
1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAAGTCCTGAAACGTCCTCAATCGCGG
1416 CTCCCGGTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGGTTTCCCTGATACCGGGGAGACGGCATTTCGTAATCGGATC

图 1B-3

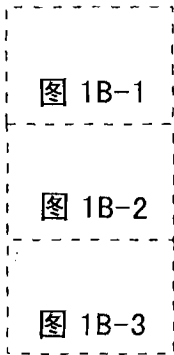


图 1B

来自解淀粉芽孢杆菌的枯草
杆菌蛋白酶中的保守残基

```
1          10          20
A Q S V P . G . . . . . A P A . H . . G

21          30          40
. T G S . V K V A V . D . G . . . . H P

41          50          60
D L . . . G G A S . V P . . . . . Q D

61          70          80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G

81          90          100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G

101          110          120
S G . . S . L . . G . E W A . N . . . .

121          130          140
V . N . S L G . P S . S . . . . . A . .

141          150          160
. . . . . G V . V V A A . G N . G . . .

161          170          180
. . . . . Y P . . Y . . . . A V G A .

181          190          200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A

201          210          220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . N G T

221          230          240
S M A . P H V A G A A A L . . . K . . .

241          250          260
W . . . Q . R . . L . N T . . . L G . .

261          270
. . Y G . G L . N . . A A . .
```

图 2

枯草杆菌蛋白酶序列比较, 分别来自:

解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶

枯草芽孢杆菌

地衣芽孢杆菌

迟缓芽孢杆菌

	10	20	30		40	50	60	70		80	90	100	110		120	130	140	150
01	A Q S S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S S G I D S S S H P																	
	A Q S S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S S G I D S S S H P																	
	A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A H N R G L T G S G V K V A V I D S S G I D S S S H P																	
	A Q S V P P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V I D S S G I D S S S H P																	
41	D L K V A G G A S S M V P S E T N P F Q D N S S H G T H V A G T V A A L N N S S I G																	
	D L N V R G G A S S F V P S E T N P Y Q D N S S H G T H V A G T V A A L N N S S I G																	
	D L N V V G G A S S F V A G E A Y N * T D G N G H G T H V A G T V A A L N N S S I G																	
	D L N I R G G A S S F V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T V A A L N N S S I G																	
81	V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M D																	
	V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M D																	
	V L G V A P S A S L Y A V K V L N S S G S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M D																	
	V L G V A P S A S L Y A V K V L G A S S G S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M H																	
121	V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S S G V V V A A A G N E G T S S G																	
	V I N M S L G G P T G S S A A L K A A V D K A V A S S G V V V A A A A G N E G T S S G																	
	V I N M S L G G A S S P S A A L K A A V D K A V A S S G V V V A A A A G N E G T S S G																	
	V A N L S L G S P S A A L K A A V D K A V A S S G V V V A A A A A S S G A S S																	

图 3A

[illegible]

图 3B

图 3A

图 3B

图 3