[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 15/55
C12N 9/20
C11D 3/386

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95192164.9

[45]授权公告日 2002 年 1 月 9 日

[11]授权公告号 CN 1077598C

[22]申请日 1995.2.22 [24]颁证日 2002.1.9
[21]申请号 95192164.9
[30]优先权
[32]1994.2.22 [33]DK [31]0217/1994
[86]国际申请 PCT/DK95/00079 1995.2.22
[87]国际公布 WO95/22615 英 1995.8.24
[85]进入国家阶段日期 1996.9.19
[73]专利权人 诺沃奇梅兹有限公司
地址 丹麦巴格司瓦德
[72]发明人 A·斯维德森 I·G·卡拉森
J·S·奥克尔司 M·斯来尔森
[56]参考文献
EP,A2,0525610 1993. 2. 3 _
WO,A1,9414964 1994. 7. 7 _
审查员 曾繁辉

[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
代理人 黄革生

权利要求书 5 页 说明书 50 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 制备脂解酶变异体的方法

[57]摘要

制备脂解酶变异体的方法,所述方法包括(a)随机诱变编码亲本脂解酶 的 DNA 序列,(b)在宿主细胞中表达步骤(a)中得到的突变 DNA 序列,和(c) 筛选表达突变的脂解酶的宿主细胞,所述突变的脂解酶与亲本脂解酶相 比:对钙的依赖性降低和/或对洗涤剂或洗涤剂组分的耐受性改善。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1 制备亲本脂解酶变异体的方法，所述方法包括

(a) 对编码亲本脂解酶的DNA序列进行随机诱变，

(b) 在宿主细胞中表达步骤(a)中得到的突变DNA序列，和

(c) 筛选表达对钙的依赖性降低的突变脂解酶的宿主细胞。

2 根据权利要求1的方法，其中步骤(c)还包括就与亲本脂解酶相比，对洗涤剂或洗涤剂组分的耐受性改善进行筛选。

3 根据权利要求1或2的方法，其中用物理或化学诱变剂，使用寡核苷酸或PCR产生的诱变来完成所述随机诱变。

4 根据权利要求2的方法，其中所述诱变剂选自甲酸，UV辐射，羟胺，N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍（MNNG），O-甲基羟胺，硝酸，甲烷磺酸乙酯（EMS），亚硫酸氢钠和核苷酸类似物。

5 根据权利要求1的方法，其中通过用突变DNA序列转化适宜的宿主细胞来完成所述突变DNA序列的表达，所述突变的DNA序列还可含有编码允许突变DNA序列表达的功能因子的DNA序列，然后在适宜表达突变DNA序列的条件下培养在步骤(b)中得到的宿主细胞。

6 根据权利要求1的方法，其中用于表达突变DNA序列的宿主细胞是微生物细胞。

7 根据权利要求5的方法，其中所述宿主细胞是真菌或细菌菌株的细胞。

8 根据权利要求6的方法，其中所述宿主细胞是真菌曲霉属，如黑曲霉，米曲霉和构巢曲霉的细胞，或糖酵母属，如啤酒酵母细胞。

9 根据权利要求7的方法，其中所述宿主细胞是革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌，地衣形芽孢杆菌，缓慢芽孢杆菌，短小芽孢杆菌，嗜热脂肪芽孢杆菌，嗜碱芽孢杆菌，解淀粉芽孢杆菌，凝结芽孢杆菌，环状芽孢杆菌，Bacillus lautus，苏云金芽孢杆菌或变青链霉菌或鼠灰链霉菌的细胞，或革兰氏阴性菌如大肠杆菌的细胞。

10 根据权利要求2的方法，其中突变的脂解酶对非离子、阴离子、阳

离子或两性表面活性剂的耐受性提高。

11 根据权利要求 10 的方法，其中所述非离子表面活性剂是脂肪醇乙氧基化物和/或阴离子表面活性剂是 LAS 或烷基硫酸盐。

12 根据权利要求 1 的方法，其中对在步骤(c)中筛选的宿主细胞进行第二次诱变处理，再筛选，再分离和/或再克隆。

13 根据权利要求 1 的方法，其中将随机诱变定位在编码亲本脂解酶的 DNA 序列的部分上。

14 根据权利要求 1 的方法，其中所述亲本脂解酶是脂酶，酯酶，角质酶或磷脂酶。

15 根据权利要求 13 或 14 的方法，其中亲本脂解酶是酯酶并且在编码亲本酯酶的脂接触区或其部分完成定位随机诱变。

16 根据权利要求 15 的方法，其中在编码亲本酯酶的罩区域和/或疏水缝隙或所述罩区域和/或疏水结合缝隙的部分上完成定位随机诱变。

17 根据权利要求 1 的方法，其中所述亲本脂解酶从微生物中得到。

18 根据根据权利要求 17 的方法，其中所述亲本脂解酶从真菌中得到。

19 根据权利要求 18 的方法，其中编码亲本脂解酶的 DNA 序列从腐质霉属，Rhizomucor 属，根霉属，假丝酵母属的菌株得到。

20 根据权利要求 19 的方法，其中所述亲本脂解酶是脂酶，且编码亲本脂酶的 DNA 序列是从 H. lanuginosa ，如 H. lanuginosa 菌株 DSM 4109，Rh. mucor 的菌株或 C. antarctica 菌株得到。

21 根据权利要求 20 的方法，其中经随机诱变的 DNA 序列编码至少一个由 DSM 4109 的 H. lanuginosa 脂酶的氨基酸残基 21－27，56－64，81－99，108－116，145－147，174，202－213，226－227，246－259 或 263－269 所限定的区域之一。

22 根据权利要求 20 的方法，其中在所述区域的至少两个中完成定位随机诱变。

23 根据权利要求 17 的方法，其中所述亲本脂解酶可从细菌中得到。

24 根据权利要求 23 的方法，其中编码所述亲本脂解酶的 DNA 序列可从假单孢菌属，如葱头假单孢菌，产碱假单孢菌，类产碱假单孢菌或莓实假

单孢菌的菌株，或芽孢杆菌的菌株中得到。

25 可从DSM4109得到的H. lanuginosa 脂酶变异体，在一个下列位置上含有突变:

K46, E56, S58, G61, T64, N73, S83, I90, G91, N92, N94, D96, L97, K98, E99, I100, D102, A121, E129, D167, R205, E210, K237, N251, I252, D254, P256, G263, L264 or T267.

26 从DSM4109菌株得到的H. lanuginosa 脂酶变异体，在由氨基酸残基56－64，83－100或205－211所限定的一个区域中带有突变。

27 根据权利要求26的变异体，含有下列突变之一:

K46R, D57G, S58F, G61S, D62C, T64R, S83T, I90F, G91A, N92H, N94I, N94K, L97M, K98I, I100V, D102K, A121V, E129K, D167G, R205K, E210W, K237M, N259W, I252L, D254W, P256T, G263A, L264Q or T267W.

28 从DSM4109菌株得到的H. lanuginosa 脂酶变异体，含有一个下列突变:

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H
A121V+R205K+E210Q
F95C+D96N
G91S+L93V+F95C
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A

S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E210W
E56T+D57L+I90F+D96L+E99K
E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
D57G+N94K+K96L+L97M
E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
K46R,E56R,G61S
D102K
D167G
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
E210V
E210W
N251W+D254W+T267W
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E56R+I90F+D96L+E99K
D57G+N94K+D96L+L97M.

29 编码权利要求 24－28 的任一 H. lanuginosa 脂酶变异体的 DNA 构建体。

30 含有权利要求 29 的 DNA 构建体的载体。

31 根据权利要求 31 的载体，它是质粒或噬菌体。

32 根据权利要求 31 的载体，它是还含有允许亲本脂解酶的变异体表达的 DNA 序列的表达载体。

33 含有权利要求 29 的 DNA 构建体或权利要求 31 的载体的宿主细胞。

34 根据权利要求 33 的细胞，它是微生物细胞。

35 根据权利要求 34 的细胞，它是真菌或细菌菌株的细胞。

36 根据权利要求 35 的细胞，是曲霉属，如黑曲霉，米曲霉和构巢曲霉

的细胞或糖酵母属如啤酒酵母的细胞。

37　根据权利要求 35 的细胞，它是革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌，地衣形芽孢杆菌，缓慢芽孢杆菌，短小芽孢杆菌，嗜热脂肪芽孢杆菌，嗜碱芽孢杆菌，解淀粉芽孢杆菌，凝结芽孢杆菌，环状芽孢杆菌，Bacillus lautus，苏云金芽孢杆菌或变青链霉菌或鼠灰链霉菌的细胞，或革兰氏阴性菌如大肠杆菌的细胞。

38　含有权利要求 24－28 的脂解酶变异体的洗涤剂添加剂，可以是无粉尘颗粒或稳定的液体或被保护的酶形式。

39　根据权利要求 38 的洗涤剂添加剂，含有 0.02-200 mg 酶蛋白/g 添加剂。

40　根据权利要求 38 的洗涤剂添加剂，还含有另一种酶，如蛋白酶，淀粉酶，过氧化物酶，角质酶脂酶/或纤维素酶。

41　含有权利要求 24－28 任一脂解酶变异体的洗涤剂组合物。

42　根据权利要求 41 的洗涤剂组合物，还含有另一种酶，如蛋白酶，淀粉酶，过氧化物酶，角质酶，脂酶和/或纤维素酶。

说 明 书

制备脂解酶变异体的方法

本发明领域

本发明涉及制备亲本脂解酶的变异体的方法和用所述方法制备的变异体。此外，本发明还涉及编码本发明变异体的 DNA 构建体，含所述 DNA 构建体的表达载体和宿主细胞以及含变异体的洗涤剂添加剂或洗涤剂组合物。

本发明的背景

用脂解酶作为洗涤剂酶，即从衣服和其他织物上除去脂或油斑已经有许多年了。

例如已经用各种微生物脂酶作为洗涤剂酶。所述脂酶的实例包括 Humicola lanuginosa 脂酶，如在 EP258068 和 EP 305216 中描述的，Rhizomucor miehei 脂酶，如在 EP 238023 中描述的，假丝酵母脂酶，如 C.antarctica 脂酶，如在 EP 214 761 中描述的 C.antarctica 脂酶A 或 B，假单胞菌脂酶，如 P. alcaligenes 和类产碱假单胞菌脂酶，如在 EP 218 272 中描述的，葱头假单胞菌脂酶，如在 EP 331 376 中描述的，芽孢杆菌脂酶，如枯草芽孢杆菌脂酶（Dartois et al., 1993），嗜热脂肪芽孢杆菌脂酶（JP 64/744992）和短小芽孢杆菌脂酶（EP 91 00664）。

此外，已经描述了大量克隆的脂酶，包括由 Yamaguchi,S. 等人（1991）描述的沙门氏柏干酪青霉脂酶，白地霉脂酶(Schimada ,Y,et al.,1989),和各种根霉属脂酶如德列马根霉脂酶（Hass ,M.J.et al.,1991），雪白根霉脂酶（Kugimiya ,W.1992）和米根霉脂酶。

已用来作为洗涤剂酶的其他类型的脂解酶包括角质酶，如在 WO 88/09367 中描述的得自多茵蜡假单胞菌的，或得自 Fusarium solani pisi 的角质酶（如在 WO 90/09446 中描述的）。

近年来，试图制备用于洗涤剂目的的具有改善的特性的脂酶变异体。如 WO 92/05249 描述了具有改善的特性的脂酶变异体，其中通过特异性

的，即定点修饰其氨基酸序列而改变了野生型脂酶的特定特征。更具体地说，描述了脂酶变异体，其中修饰了亲本脂酶所谓脂接触区的一个或多个氨基酸残基。

PCT/DK93/00225 描述了具有改善的特性的脂酶变异体，其中修饰了占据脂酶重要位置的氨基酸残基。

EP 407 225 公开了具有改善的抗蛋白水解酶的脂酶变异体，这是通过特定氨基酸修饰而制备的。

EP 260 105 描述了水解酶，其中取代了距离活性位点 15 埃内的氨基酸残基。

所有上述脂酶变异体都是通过导致特异性氨基酸残基修饰的定点诱变而构建的，特异性氨基酸残基的选择是在其类型或其在亲本脂酶二级或三级结构中的位置的基础上进行的。

构建给定蛋白质的突变体或变异体的另一种方法是以随机诱变为基础。例如在 US4898331 和 WO 93/01285 公开了所述技术。

需要具有改善的洗涤和/或餐具洗涤特性的新脂解酶，而本发明的目的就是制备所述酶。

本发明的概述

本发明人研制了一种制备脂解酶变异体的新方法，所述脂解酶与其亲本酶相比具有改善的洗涤和/或餐具洗涤特性。所述方法是以随机或定位随机诱变编码脂解酶的 DNA 序列为基础的。

更具体地说，在本发明的第一方面涉及制备亲本脂解酶的变异体的方法，所述方法包括

(a) 随机诱变编码亲本脂解酶的 DNA 序列，

(b) 在宿主细胞中表达步骤 (a)中得到的突变的 DNA 序列，和

(c) 筛选表达突变的脂解酶的宿主细胞，所述突变的脂解酶与亲本脂解酶相比对钙的依赖性降低和/或对洗涤剂或一种或多种洗涤剂组分的耐受性提高。

在本发明说明书中，术语“脂解酶”指表现出脂降解能力，如降解甘油三酯或磷脂能力的酶。所述脂解酶可以是例如脂酶，磷脂酶，酯酶或角

质酶。

术语“随机诱变”指在常规方法中是可以被理解的，即指在亲本酶的随机位置导入一个或多个突变（即与定点诱变相反）。通常通过将大量需要修饰的DNA序列拷贝暴露于诱变剂，然后筛选变异体的存在。下文将详细描述导入随机突变的技术。

认为步骤 c)的筛选标准在鉴定与其亲本酶相比具有改善的洗涤和/或餐具洗涤性能的亲本脂解酶的变异体时是特别有用的。。

在本发明说明书中，术语“对钙的依赖性降低”指当在相似条件下检测时，突变脂解酶在表现出与亲本酶相同的活性所需的钙量较低。优选的，本发明突变脂解酶在表现酶活性时基本上不需要钙的存在。

术语“改善的对洗涤剂或洗涤剂组分的耐受性”指突变的脂解酶在较高浓度的洗涤剂或洗涤组分时，与亲本脂解酶相比是有活性的。

在本发明说明书中，术语“洗涤剂”指通常用于洗涤或餐具洗涤的洗涤剂成分的混合物。类似地“洗涤剂组分”指在洗涤剂或餐具洗涤组合物中通常见到的组分或成分，将在下文的描述中给出其实例。

应当理解当在洗涤和/或餐具洗涤条件下检测时，用本发明方法制备的变异体除对钙的依赖性降低和/或对洗涤剂或一种或多种洗涤剂组分的耐受性提高外，显示出更好或超过其亲本脂解酶的脂解活性。

可以用本领域已知的适宜方法确定在本发明方法步骤 c)中限定的筛选标准。在下文的物质和材料部分描述了用于本发明目的的特别适宜的检测方法。

本发明的另一方面涉及DNA构建体，它含有编码脂解酶变异体的突变的 DNA 序列，所述变异体与亲本脂解酶相比对钙的依赖性降低和/或对洗涤剂或洗涤剂组分的耐受性提高，所述DNA序列是从在本发明方法步骤 c)中筛选的宿主细胞中分离。

本发明的另一方面涉及携带所述DNA构建体的重组表达载体，用所述DNA构建体或载体转化的细胞以及通过在适于生产所述变异体的条件下培养所述细胞，此后从培养物中回收所述变异体从而生产亲本脂解酶变异体的方法。

本发明的最后一方面涉及脂解酶变异体和所述变异体作为洗涤剂酶，特别是在洗涤或餐具洗涤中的应用，以及含有所述变异体的洗涤剂添加剂和洗涤剂组合物。

本发明的详细描述

克隆编码亲本脂解酶的 DNA 序列

利用本领域已知的方法，可以从生产所需亲本酶的任何细胞或微生物中分离编码亲本脂解酶的 DNA 序列，以便按本发明方法对其进行随机诱变。

例如，从预期含有所述序列的生物体中通过建立 cDNA 或基因组文库，然后用常规方法筛选阳性克隆来分离所述 DNA 序列。所述方法的实例是与根据标准技术（参见 Sambrook et al.,1989）以亲本酶（如果可获得序列资料）或有关脂解酶（如果不能得到有关亲本酶的序列资料）的 DNA 序列为基础制备的寡核苷酸探针杂交，和/或筛选表达脂解，如脂酶活性的克隆，和/或筛选生产与抗亲本脂解酶的抗体反应的蛋白质的克隆。

根据本发明从 cDNA 或基因组文库分离编码待修饰的亲本脂解酶的 DNA 序列的优选方法是使用简并寡核苷酸探针的聚合酶链反应（PCR），所述探针是以亲本酶的 DNA 或氨基酸序列为基础制备的。例如，可以用美国专利 4683202 或 R.K.Saike 等人（1988）描述的技术完成 PCR。

另外，可以通过已建立的标准方法，如由 Beaucage 和 Caruthers(1981) 描述的亚磷酰胺方法或 Matthes 等人描述的方法（1984）经合成而制备编码亲本酶的 DNA 序列。根据亚磷酰胺方法，用例如自动 DNA 合成仪合成寡核苷酸，将其纯化，退火，连接并克隆在适当的载体中。

最后，根据标准方法，可以从通过连接合成的，基因组的或 cDNA 源（适当的）的片段而制备的混合的基因组和合成的 DNA，混合的合成的和 cDNA 或混合的基因的和 cDNA 源 DNA 制备编码所述亲本酶的 DNA 序列，所述片段对应于编码亲本酶的完整 DNA 序列的各个部分。

随机诱变

可以利用本领域已知的任何方法，很容易地完成根据本发明方法步骤 a)需完成的随机诱变编码亲本脂解酶的 DNA 序列。

例如，可以利用适宜的物理或化学诱变剂，利用适宜的寡核苷酸或使所述 DNA 序列经 PCR 产生的诱变来完成随机诱变。此外，使用任何组合的这些诱变剂可以完成随机诱变。

所述诱变剂可以是如诱导碱基转换，碱基颠换，倒位，scrambling，缺失和/或插入的诱变剂。

适用于本发明目的的物理或化学诱变剂的实例包括紫外线（UV）辐射，羟胺，N－甲基－N'－硝基－N－亚硝基脲（MNNG），O－甲基羟胺，硝酸，甲烷磺酸乙酯（EMS），亚硫酸氢钠，甲酸和核苷酸类似物。

当使用所述的试剂时，通常在适于诱变发生的存在所述诱变剂的条件下，通过保温待诱变的编码亲本酶的 DNA 序列，然后筛选具有所需特性的突变的 DNA 来完成所述诱变。

当利用寡核苷酸完成诱变时，在待改变的位置合成所述寡核苷酸时，将所述寡核苷酸与三种非亲本的核苷酸掺杂在一起。可以完成掺杂以便避免不想要的氨基酸密码子。可以通过使用例如 PCR，LCR 或任何 DNA 聚合酶和连接酶的公知技术，将掺杂的寡核苷酸掺入编码脂解酶的 DNA 中。

当使用 PCR 产生的诱变时，使化学处理的或未处理的编码亲本脂解酶的基因在增加核苷酸错掺的条件下进行 PCR（Deshler 1992,Leung et al.,1989）。

为了随机诱变编码脂解酶的 DNA，可以使用大肠杆菌（Fowler et al.1974），啤酒酵母或任何其他微生物的增变菌株，例如通过将含亲本酶的质粒转化到增变菌株中，使增变菌株与所述质粒一起生长，然后从增变菌株中分离突变的质粒。随后可以将突变的质粒转化到表达生物中。

待诱变的 DNA 序列易于存在于从表达亲本脂解酶的生物制备的基因组或 cDNA 文库中。另外，所述 DNA 序列可存在于适当的载体，如质粒或噬菌体上，所述载体可以与诱变剂一起保温或暴露于诱变剂。所述待诱变的 DNA 还可以经整合存在于宿主细胞的基因组中或存在于所述细胞所含的载体上。最后，待诱变的 DNA 还可以是分离的形式。应当理解将要经随后诱变的 DNA 序列优选的是 cDNA 或基因组 DNA 序列。

在某些情况下，在进行表达步骤(b)或筛选步骤(c)之前可以方便地扩增

突变的DNA序列。可以根据本领域已知的方法完成所述扩增，目前优选的方法是利用寡核苷酸引物的PCR产生的扩增，所述引物是以亲本酶的DNA或氨基酸序列为基础而制备的。

在与诱变剂一起保温或暴露于诱变剂后，通过在允许表达的条件下培养携带所述DNA序列的适宜宿主细胞而表达突变的DNA。用于该目的的宿主细胞可以是用选择性地存在于载体上的突变DNA序列转化的，或者是在诱变过程中携带了所述编码亲本酶的DNA序列的宿主细胞。下面举出了适宜宿主细胞的例子。突变的DNA序列还可以含有编码具有使突变DNA序列表达之功能基团的DNA序列。

应该理解，已经仔细筛选了上述步骤(c)中所提到的选择标准。因此，不必局限于任何理论，对钙依赖性降低的筛选会得到具有全面改善之性能的变异体，即对钙的需求可以被认为是最佳活性的限制因素，特别是在只存在少量游离钙的条件下。与洗涤剂脂酶相关，通常从洗涤水中得到所需的游离钙离子，因此，脂解活性依赖于水中钙的含量。

所述变异体可以对任何类型的洗涤剂或洗涤剂组分有改善的耐受性，这将在下文作进一步描述。优选的洗涤剂组分是非离子的，阴离子，阳离子，两性表面活性剂。非离子表面活性剂的实例包括脂肪醇乙氧基化物，阴离子表面活性剂的实例包括LAS，硫酸烷基酯，脂肪醇乙氧基硫酸盐等。

特别是，设想对非离子表面活性剂脂肪醇乙氧基化物（市售的实例是Dobanol^{R}）改善的耐受性可以作为洗涤性能改善的标志。

利用以下列原理为基础的过滤方法可以方便地完成步骤(c)的筛选：

在适当的培养基中和适于所述酶分泌的条件下，培养能够表达所需突变脂解酶的微生物，所述培养基配有双层滤膜，包括第一蛋白质结合滤膜和在其上的有较低蛋白质结合能力的第二滤膜。微生物位于第二滤膜上。培养后，从含微生物的第二滤膜中分离含有分泌自所述微生物之酶的第一滤膜。对第一滤膜进行所需的酶活性筛选，然后鉴定在第二滤膜上的对应微生物菌落。

用于结合酶活性的滤膜可以是任何蛋白质结合滤膜，如尼龙或硝酸纤维素滤膜。带有表达生物菌落的顶部滤膜可以是没有或有较低蛋白质结合

亲和性的任何滤膜，如乙酸纤维素或Durapore™。可以用用于筛选的任何条件预处理所述滤膜或在酶活性检测过程中对其进行处理。

可以用染料，荧光，沉淀，pH指示剂，IR－吸收值或用于检测酶活性的任何已知的技术来检测酶活性。

可以用任何固定剂，如琼脂糖，琼脂，明胶，聚丙烯酰胺，淀粉，滤纸，布或固定剂的任何结合来固定待测的化合物。

可以用亮绿，若丹明B或苏丹黑结合脂，如橄榄油或猪脂来检测脂酶活性。用于鉴定具有改善的洗涤性能的亲本脂解酶变异体的筛选标准可以是如EGTA，EDTA，非离子或阴离子表面活性剂，碱性pH或任何洗涤剂组合物结合上述一种酶活性检测指标。

可以选择在本发明滤膜检测中所用的筛选标准以便与待筛选酶的所需特性或用途相一致。例如，在筛选特别用于纸浆工业的脂酶时，适合于筛选温度稳定性提高的酸性脂酶。在检测前或检测时，通过使用酸性pH（如pH 4）的缓冲液和/或在较高的温度下保温来达到该目的。

用比前次诱变处理更严格的筛选标准可以很方便地按上述步骤(a)-(c)将在步骤(c)中产生的宿主细胞进行再进一步的诱变。

可以用在步骤(c)中筛选的宿主细胞直接生产脂解酶变异体。另外，用在“本发明变异体之表达”部分所描述的方法（其中列出了适宜的宿主细胞），可以从宿主细胞中分离编码变异体的DNA序列并将其插入到另一适宜的宿主细胞中。

定位随机诱变

可以将本发明的随机诱变有利地定位于所述亲本脂解酶的某一部分。当经鉴定发现所述酶的特定区域对所述酶的某一特性特别重要，而且若进行修饰，则期望会得到具有改善特性的变异体时，这种方法是有利的。当阐明了所述亲本酶的三维结构，而且所述三维结构与所述酶的功能有关时，就可以鉴定所述区域。

用上文所述的PCR产生的诱变技术或本领域已知的任何其他适宜的技术可以方便地完成定位随机诱变。

另外，如通过被插入到适宜的载体中，可以分离编码待修饰部分的DNA

序列，随后将所述部分用上述讨论的任何诱变方法进行诱变。

亲本脂解酶

本发明待修饰的亲本脂解酶可以是任何具有上述脂解活性的酶。脂解酶的实例包括脂酶，酯酶，角质酶和磷脂酶。

优选的，经定位随机诱变修饰亲本脂解酶，所述诱变是针对编码脂接触区或部分所述区的DNA序列而完成的。

到目前为止，已经发现晶体化的所有脂酶均含有至少一个表面环状结构（也称为罩或flap），当脂酶处于失活形式时，所述结构盖住了活性位点（所述脂酶的一个实例是由Brady et al.,1990，描述的）。在所述脂酶被激活时，所述环状结构被移开，从而暴露出活性位点的残基，在活性位点Ser周围产生一个疏水表面，这样提高了表面疏水性并在水解时或期间与脂底物相互作用。所述激活称作界面激活，由Tilbeurgh等人（1993）作了进一步描述。

为了本发明的目的，将激活后产生的表面称为“脂接触区”，包括在所述表面内或其形成部分的氨基酸残基，可以是环状结构形式。当与脂表面接触而激活后，在脂酶水解来自脂相的甘油三酯时或过程中，这些残基参与了脂酶与底物的相互作用。

脂接触区含有用于脂底物结合的结合区，它是脂接触区的一部分，单个脂分子在水解前与其结合。所述结合区又含有一个酰基结合疏水缝隙和一个所谓的水解袋，它位于活性位点Ser周围，认为在此发生脂类底物的水解。在目前已知的所有脂酶中，很容易如从用适宜的计算机程序产生的所述脂酶的三维结构识别脂接触区。在WO92/05249的图1和2中分别示出了无活性和被激活脂酶的构型。

在本发明中详细讨论的Humicola lanuginosa脂酶的脂接触区由氨基酸残基21－25，36－38，56－62，81－98，110－116，144－147，172－174，199－213和248－269限定。已经在计算机模拟的脂酶和脂底物之间相互作用的基础上鉴定了这些残基。

其它脂解酶的脂接触区通过以下方法限定：

(a) 计算3－D分子结构的疏水向量，

(b) 通过直链序列活性位点 Ser 后的第二个氨基酸的 C α 原子向向量垂直切割，和

(c) 包括所有至少有一个原子在向量切面一边的残基，和

(d) 选择那些至少有一个原子在所述蛋白质表面 5 埃内的残基（如果是脂酶，则以其开或闭合的形式）。

当脂酶为开环或闭合形式时，通过将表面可及度（ Lee ,B. and Richards ,F.M. 1971, Mol. Biol. 55:379-400 ）为至少 10 %的残基的残基向量加起来，可从蛋白质结构计算疏水向量。将残基向量的起始点定义为残基的 C α－原子，其方向是通过侧链的质量中心。各残基向量的大小定义为残基相对的转移游离能。

用 Connolly 程序计算各残基的表面可及度。

优选的，在编码亲本脂酶罩区和/或疏水缝隙的，或所述罩区和/或疏水缝隙之部分的 DNA 序列部分上进行定位随机诱变。

本发明待修饰的亲本脂解酶可以是任何来源的。因此，所述酶可以是哺乳动物，植物，脊椎动物或任何其他来源的。但是优选的酶是微生物来源的，已经发现许多微生物菌株生产特别适用于洗涤剂目的的酶。

更具体地说，亲本脂解酶的 DNA 序列可以得自真菌，即酵母或丝状真菌。例如，所述 DNA 序列可以是得自腐质霉，如 H. lanuginosa 的菌株，Rhizomucor，如 Rh.miehei 的菌株，根霉的菌株，假丝酵母的菌株，镰孢，如 F.solani pisi 的菌株，黑星菌，如苹果黑星菌的菌株，毛盘孢属，如盘长孢状毛盘孢或葫芦科毛盘孢的菌株或青霉属，如小刺青霉或沙门氏柏干酪青霉的菌株的 DNA 序列。

在本发明说明书中，“可得自”不仅指由所研究的生物菌株生产的酶，还包括由从所述菌株分离的 DNA 编码并在用所述 DNA 序列转化的宿主生物中生产的酶。此外，该术语还指于合成的和/或 cDNA 源的 DNA 序列编码并具有所需酶的鉴定特征的酶。

特别有用的亲本脂解酶是得自 H. lanuginosa 的菌株，如 H. lanuginosa 菌株 DSM 4109 的脂酶或其类似物，或得自 Rh.mucor 的菌株或 C.antarctica 的菌株的脂酶。

在本发明说明书中，术语“类似物”包括多肽，所述多肽含有与 H. lanuginosa 脂酶有一个或多个氨基酸残基不同的氨基酸序列，并与所述脂酶的氨基酸序列有至少 70 %的同源性(按两个序列之间的相同性来判断)，如至少 75 %， 80 %， 90 %或 95 %的同源性，与该脂酶具有免疫交叉反应性，和/或所述多肽由与寡核苷酸探针杂交的 DNA 序列编码，所述探针是以所述脂酶的氨基酸序列或编码所述脂酶的 DNA 序列为基础的。

所述类似物可以是如通过修饰编码所述脂酶的 DNA 序列而制备的 H. lanuginosa 脂酶衍生物，所述修饰会导致将一个或多个氨基酸残基加到所述脂酶的 N －和 C －末端，在所述氨基酸序列的一个或多个不同位点发生取代，在所述脂酶的任一末端或两个末端或所述氨基酸序列中 的一个或多个位点发生缺失，或在所述氨基酸序列的一个或多个位点插入一个或多个氨基酸残基。根据熟知的技术，可以经定点或随机诱变或这些技术的结合完成所述 DNA 序列的修饰。

此外，类似物可以是得自另一生物，如在前面“本发明背景”中提到的那些的多肽。

可以将编码亲本 H. lanuginosa 脂酶类似物的 DNA 序列在允许所述 DNA 序列杂交的条件下与相关的寡核苷酸探针杂交。例如，所述条件是特定的条件，如包括预浸在 5xSSC 和在由 20 %甲酰胺， 5xDenhardt's 溶液， 50mM 磷酸钠， pH6.8 和 50 μ g 变性的声处理的牛胸腺 DNA 组成的溶液中，于-40 ℃预杂交 1 小时，然后在用 100 μ MATP 补充的相同溶液中，于－ 40 ℃杂交 18 小时，或按例如 Sambrook 等人（ 1989 ）描述的其他方法完成杂交。

利用抗纯化脂酶的至少一个抗原决定簇的抗体，可检测 H. Lanuginosa 脂酶类似物的免疫交叉反应性。该抗体可为单克隆或多克隆抗体，且可按已知方法如 Hudson 等人所述的方法（ 1989 ）制备。利用本领域已知的检测方法来测定免疫交叉反应性，这类检测方法的例子包括如 Hudson 等人（ 1989 ）所述的 Western 吸印法或基团免疫扩散法。

若亲本脂解酶是得自 DSM 4109 菌株的 H. lanuginosa 脂酶或其类似物时，优选的是经随机诱变的 DNA 序列含有编码至少由所述脂酶的氨基酸残

基21－27，56－64，81－99，83－100，108－116，145－147，174，202－213，如205－211，226－227，246－259或263－269所限定的区域的部分DNA序列的DNA序列组成。所述脂酶的DNA和氨基酸序列从SEQ ID NO1和2中可以分别看到。

可以在一个或多个这些区域中完成定位随后诱变，而且优选的是在至少两个这种区域内完成。

本发明待修饰的亲本脂解酶可以得自细菌。例如编码所述亲本脂解酶的DNA序列可得自假单孢菌属，如葱头假单孢菌，产碱假单孢菌，类产碱假单孢菌，门多茜娜假单胞菌（也称为恶臭假单孢菌），丁香假单孢菌，铜绿假单孢菌或莓实假单孢菌的菌株，芽孢杆菌属，如枯草芽孢杆菌或短小芽孢杆菌的菌株或链霉菌属，如疮痂病链霉菌的菌株。

亲本细菌脂解酶可以是得自上述任何种的脂酶，如在EP218272，EP331,376和EP407225中描述的假单孢菌脂酶或角质酶，如在WO88/09367中描述的。

本发明的变异体

为了便于参考，用下列命名来描述本发明的具体变异体：

原始氨基酸：位置：取代的氨基酸

根据该命名，按如下表示位置96的天冬氨酸为缬氨酸所取代：

Asp 96 Val　　或D96V

按如下表示缺失相同位置的天冬氨酸：

Asp 96*　　或D96*

按如下表示另一氨基酸残基如Lys的插入：

Asp 96 ValLys　　或D96VK

用加号隔开多个突变，即：

Asp 96 Val + Glu 87 Lys　　或D96V + E87K

代表在96和87位的天冬氨酸和谷氨分别被缬氨酸和赖氨酸所取代。

若将一个或多个选择性氨基酸残基插入到给定的位置，则表示为D96V，N或D96V或D96N

此外，若在本文中鉴定了一个适于修饰的位置，但未说明任何具体的

修饰，则应理解为可以用任何氨基酸残基取代该位置的氨基酸残基。因例如若只说明了在96位氨基酸可以进行修饰，但未具体说明，则应理解天冬氨酸可以被缺失或被任何其他氨基酸所取代，即可在该位置插入R，N，A，C，Q，E，G，H，I，L，K，M，F，P，S，T，W，Y，V或其他氨基酸中的任何一种。

最后，若本文鉴定了亲本H. lanuginosa脂酶的突变，则应理解为包括所述脂酶类似物（如上述鉴定的）的相似突变。

本发明的另一方面还涉及用本发明上述方法构建的变异体。

若亲本脂解酶是从菌株DSM 4109得到的H. lanuginosa脂酶或其类似物，则优选的是所述变异体含有至少下列位置之一上的突变：S58，T64，S83，N94，K98，I100，A121，E129，D167，R205，K237，I252，P256或G263。应理解在取代的情况下，可以插入除野生型氨基酸残基外的任何氨基酸残基，如选自R，N，A，C，Q，E，G，H，I，L，K，M，F，P，S，T，W，Y，V，D的氨基酸残基。

就本发明人所知，现有技术中在这些位置内没有公开具体的突变。

此外本发明还涉及可得自DSM 4109的H. lanuginosa脂酶或所述脂酶类似物的变异体，其中已经用不同于亮氨酸的氨基酸，即R，N，A，C，Q，E，G，H，I，K，M，F，P，S，T，W，Y，V，D替代了氨基酸残基L264。

优选的，本发明变异体含有至少一个下列突变K46R，E57G，G61S，S83T，S58F，D62C，T64R，I90F，G91A，N92H，N94I，N94K，L97M，K98I，I100V，D102K，A121V，E129K，D167G，R205K，E210W，K237M，N259W，I252L，D254W，P256T，G263A，L264Q或T267W。

已经发现或预计这些位置对于酶活性和/或洗涤剂耐受性是重要的。氨基酸残基的编号是以成熟脂酶的氨基酸为准。

优选的，本发明该方面的变异体含有至少下列突变之一：S83T，N94K，A121V，D167G，R205K。

应该理解，本发明包括亲本 H. lanuginosa 脂酶的变异体，所述变异体含有本文所限定的两个或更多突变或本文所限定的一个或多个突变加上在 WO 92/05249， WO 94/25577 和 WO 94/01541 中公开的任何突变。

本发明的另一方面还涉及含有至少下列突变之一的可从 DSM4109 可得到的 H. lanuginosa 脂酶或其类似物的变异体:

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H
A121V+R205K+E210Q
F95C+D96N
G91S+L93V+F95C
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A
S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E210W
E56T+D57L+I90F+D96L+E99K
E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
D57G+N94K+K96L+L97M
E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
K46R+E56R+G61S
D102K
D167G
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
E210V
E210W

N251W+D254W+T267W
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E56R+I90F+D96L+E99K
D57G+N94K+D96L+L97M

已经发现这些变异体对钙的抗性降低和/或对洗涤剂组分，如非离子表面活性剂脂肪醇乙氧基化物的耐受性提高，因此认为它们特别适用于洗涤剂或餐具洗涤目的。已经用本发明方法构建了所述变异体，随后对已介绍的突变进行了表征并将在下文实施例作进一步的描述。显然构建这些变异体的其他方法应以使用适当寡核苷酸探针的定点诱变为基础。将在实施例3－6中说明该方法。

本发明变异体的表达

根据本发明，用表达载体可以以酶形式表达用上述方法或本领域已知的任何其他方法制备的编码脂解酶变异体的突变DNA序列，所述表达载体通常含有编码启动子的控制序列，操纵子，核糖体结合位点，翻译起始信号和可选择的阻遏物基因或各种激活物基因。

携带编码本发明变异体的DNA序列的重组表达载体可以是任何适用于重组DNA方法的载体，而且载体的选择取决于载体所要导入的宿主细胞。因此，所述载体可以是自主复制载体，即作为染色体外成分存在的载体，其复制不依赖于染色体的复制，如质粒，噬菌体或染色体外成分，小染色体或人工染色体。另外，所述载体可以是在导入到宿主细胞后，将整合到宿主细胞基因组内并随其整合的染色体一起复制的载体。

在所述载体中，所述DNA序列应与适宜的启动子序列可操作相连。所述启动子可以是在所选的宿主细胞中有转录活性并可得自编码与宿主细胞同源或异源之蛋白质的基因的任何DNA序列。指导编码本发明变异体的DNA，特别是在细菌宿主中转录的适宜启动子的实例是大肠杆菌lac操纵子的启动子，天蓝色链霉菌琼脂酶（agarase）基因dagA启动子，地衣形芽孢杆菌α－淀粉酶基因（amyL）的启动子，如在WO 93/10249中描述

的嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽糖（maltogenic）淀粉酶基因（amyM）的启动子，解淀粉芽孢杆菌α－淀粉酶基因（amyQ）的启动子，枯草芽孢杆菌 xylA 和 xylB 基因的启动子等。为了在真菌宿主中转录，有用启动子的实例是得自编码米曲霉 TAKA 淀粉酶，Rhizomucor miehei 天冬氨酸蛋白酶，黑曲霉中性α－淀粉酶，黑曲霉酸稳定的α－淀粉酶，黑曲霉葡糖淀粉酶，Rhizomucor miehei 脂酶，米曲霉碱性蛋白酶，米曲霉磷酸丙糖异构酶或构巢曲霉乙酰胺酶（acetamidase）的基因的启动子。

本发明的表达载体还含有适宜的转录终止子，和在真核细胞中，与编码本发明变异体的 DNA 序列可操作相连的多聚腺苷酸化序列。可依从与启动子相同的来源得到终止子和多聚腺苷酸化序列。

所述载体还可以含有能够使所述载体在所需宿主细胞中复制的 DNA 序列。所述序列的实例是质粒 pUC19,pACYC177,pUB110,pE194,pAMB1 和 pIJ702 的复制源点。

所述载体还可含有选择性标记，如弥补宿主细胞中一个缺陷的产物基因，如来自枯草芽孢杆菌或地衣形芽孢杆菌的 dal 基因，或赋予抗生素抗性如氨苄青霉素，卡那霉素，氯霉素或四环素抗性的基因。此外，所述载体可含有曲霉选择标记，如 amdS,argB,niaD 和 sD，产生潮霉素抗性的标记或通过如在 WO91/17243 中描述的共转化而完成的选择。

从有些方面看，细胞内表达是有利的，例如当使用特定的细菌作为宿主细胞时，但通常优选的是细胞外表达。亲本脂解酶本身可含有可以使被表达的酶分泌到培养基中的前序列。如果需要，可以用不同的前区或信号序列替代所述该前区，这通过用编码不同前区的 DNA 序列可以很方便地完成。

用于连接分别编码亲本脂解酶变异体的本发明 DNA 构建体，启动子，终止子和其他成分并将其插入到含复制所必需的信息的适宜载体中的方法是本领域专业人员熟知的（参见如，Sambrook et al.,(1989)）。

在重组生产本发明亲本脂解酶变异体的过程中，可以用含有上述所定义的本发明 DNA 构建体或表达载体的细胞作为宿主细胞。通过方便地将所述 DNA 构建体整合到宿主染色体中，用编码所述变异体的本发明 DNA 构

建体可以转化所述细胞。由于所述 DNA 序列可以更稳定地保持在细胞中，所以通常认为这种整合是有利的。按照常规方法，如通过同源或异源重组可以将所述 DNA 构建体整合到宿主染色体中。另外，根据不同类型的宿主细胞，可以用下文所述的表达载体转化细胞。

本发明的细胞可以是高等生物，如哺乳动物或昆虫的细胞，优选的是微生物如细菌或真菌（包括酵母）细胞。

适宜细菌的实例是革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌，地衣形芽孢杆菌，缓慢芽孢杆菌，短小芽孢杆菌，嗜热脂肪芽孢杆菌，嗜碱芽孢杆菌，解淀粉芽孢杆菌，凝结芽孢杆菌，环状芽孢杆菌，Bacillus lautus，巨大芽孢杆菌，苏云金芽孢杆菌或变青链霉菌或鼠灰链霉菌，或革兰氏阴性菌如大肠杆菌。例如用原生质体转化或方法本身已知的感受态细胞可完成细菌的转化。

从糖酵母属或裂殖酵母属的种，如啤酒酵母中选择适用的酵母生物体。丝状真菌可以是曲霉属的种，如米曲霉，黑曲霉或构巢曲霉。用本身已知的方法包括原生质体形成，原生质体转化和细胞壁再生的方法可以转化真菌细胞。在 EP238023 中描述了适用于转化曲霉宿主细胞的方法。

在另一方面，本发明涉及生产本发明亲本脂解酶的变异体的方法，所述方法包括在允许生产所述变异体的条件下培养上述宿主细胞，然后从所述细胞和/或培养基中回收所述变异体。

用于培养细胞的培养基可以是任何适于所述宿主细胞生长并表达本发明亲本脂解酶变异体的常规培养基。适宜的培养基可从商业上的供应商处得到或可以根据公开的配方（如美国典型培养物收集中心的目录）制备。

用熟知的方法可以从培养基中很方便地回收从宿主细胞中分泌的本发明变异体，所述方法包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞，然后用盐，如硫酸铵方法，接着用层析方法，如离子交换层析，亲和层析等沉淀蛋白质类组分。

用于餐具洗涤和洗涤的洗涤剂添加剂和组合物

由于本发明的变异体对钙的依赖性降低和/或对洗涤剂或洗涤剂组分的耐受性提高，所以所述变异体特别适用于补充到洗涤剂组合物中，如用于

ph 为 7 - 13，特别是 pH8 - 11 的洗涤剂组合物。

洗涤剂组合物

根据本发明，本发明的脂酶变异体通常是作为洗涤剂组合物的一个成分。例如，将其包含在无粉尘的颗粒，稳定的液体或保护的酶形式的洗涤剂组合物中。可以例如按 US4106991 和 4661452（两者均是 Novo Industri A/S 的）中的公开生产无粉尘颗粒，而且可用本领域已知的方法将其包被。蜡状包被材料是分子量为 1000 - 20000 的聚(环氧乙烷)产物(聚乙二醇，PEG）；有 16 - 50 个环氧乙烷单位的乙氧基化的壬基酚；乙氧基化的脂肪族醇，其中所述醇含 12 - 20 个碳原子，并且其中有 15 - 80 个环氧乙烷单位；脂肪族醇；脂肪酸；和脂肪酸的单－，二－和甘油三酯。在专利 GB1483591 中给出了适于流床技术应用的成膜包被物质。液体酶制品例如可以按照常规方法，通过加入多元醇如丙二醇，糖或糖醇，乳酸或硼酸而将其稳定化。其他酶稳定剂是本领域熟知的。根据 EP238216 中公开的方法可以制备保护的酶。

本发明的洗涤剂组合物可以是任何方便的形式，如粉，颗粒，膏或液体。液体洗涤剂可以是含水的，通常含有高达 70 %的水和 0 - 30 %的有机溶剂，或不含水。

所述洗涤剂组合物含有一种或多种表面活性剂，它们可以分别是阴离子，非离子，阳离子或两性离子的。洗涤剂通常含有 0 - 50 %的阴离子表面活性剂，如 直链烷基苯磺酸盐（LAS），α－烯属磺酸盐（AOS），烷基硫酸盐（脂肪族醇硫酸盐）（AS），脂肪醇乙氧基硫酸盐（AEOS 或 AES），二级链烷磺酸盐（SAS），α－硫代脂肪酸甲基酯，烷基－或烯基琥珀酸，或皂。它还可含有 0 - 40 %的非离子表面活性剂，如脂肪醇乙氧基化物（AEO 或 AE），羧基化的脂肪醇乙氧基化物，壬基酚乙氧基化物，烷基聚苷（alkylpolyglycoside），烷基二甲基胺氧化物，乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺，脂肪酸单乙醇酰胺或聚羟基烷基脂肪酸酰胺（例如在 WO92/06154 中描述的）。

所述洗涤剂组合物还可含有一种或多种其他酶，如淀粉酶，支链淀粉酶，角质酶，蛋白酶纤维素酶过氧化物酶，氧化酶（如漆酶）和/或另一种

脂酶。

所述洗涤剂可含有 1 - 65 %的助洗剂或配位剂，如沸石，二磷酸，三磷酸，磷酸，柠檬酸，次氮基三乙酸酯（NTA），乙二胺四乙酸（EDTA），二亚乙基三胺五乙酸（DTMPA），烷基－或烯基琥珀酸，可溶的硅酸盐或层化的硅酸盐（如来自 Hoechst 的 SKS－6）。所述洗涤剂还可是未配制的，即不含有洗涤剂助洗剂。

所述洗涤剂可含有一种或多种聚合物。实例是羧甲基纤维素（CMC），聚乙烯吡咯烷酮（PVP），聚乙二醇（PEG），聚乙烯醇（PVA），聚羧酸酯如聚丙烯酸酯，马来酸/丙烯酸共聚物和月桂基异丁烯酸/丙烯酸共聚物。

所述洗涤剂可含有漂白系统，它可含有与过酸形成漂白活化剂，如四乙酰基亚乙基二胺（TAED）或壬酰氧苯磺酸盐（NOBS）结合的 H_2O_2 源，如过硼酸盐或过碳酸盐。另外，漂白系统可含有如酰胺，酰亚胺或砜类的过氧酸。

用常规稳定剂，，如多元醇如聚乙二醇或甘油，糖或糖醇，乳酸，硼酸或硼酸衍生物，如芳香族硼酸酯来稳定本发明洗涤剂组合物中的酶，而且按如 WO92/19709 和 WO92/19708 中的描述配制所述组合物。

所述洗涤剂还可含有其他常规洗涤剂成分，如织物调理剂包括粘土，泡沫促进剂，顽固泡沫抑制剂，抗－腐蚀剂，污垢悬浮剂，抗－污垢再沉淀剂，染料，杀菌剂，荧光增白剂或香料。

pH （在使用浓度的水溶液中测量的）通常是中性的或碱性的如 7 - 11 。

本发明范围内洗涤剂组合物的具体形式包括：

（1）配制成堆积密度至少为600g/l的洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	7 - 12 %
脂肪醇乙氧基硫酸盐（如 C_{12-18} 醇，1 - 2 EO）或烷基硫酸盐（如 C_{16-18}）	1 - 4 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{14-15} 醇，7 EO）	5 - 9 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	14 - 20 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2SiO_2$）	2 - 6 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	15 - 22 %
硫酸钠（Na_2SO_4）	0 - 6 %
柠檬酸钠/柠檬酸（$C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$）	0 - 15 %
过硼酸钠（$NaBO_3 \cdot H_2O$）	11 - 18 %
TAED	2 - 6 %
羧甲基纤维素	0 - 2 %
聚合物（如马来酸/丙烯酸共聚物，PVP，PEG）	0 - 3 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（2）配制成堆积密度至少为600 g/l的洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	6 - 11 %
脂肪醇乙氧基硫酸盐（如 C_{12-18} 醇，1 - 2 EO）或烷基硫酸盐（如 C_{16-18}）	1 - 3 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{14-15} 醇，7 EO）	5 - 9 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	15 - 21 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2SiO_2$）	1 - 4 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	24 - 34 %
硫酸钠（Na_2SO_4）	4 - 10 %
柠檬酸钠/柠檬酸（$C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$）	0 - 15 %

羧甲基纤维素	0 - 2 %
聚合物（如马来酸/丙烯酸共聚物，PVP，PEG）	1 - 6 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（3）配制成堆积密度至少为600 g/l的洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	5 - 9 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{14-15} 醇，7 EO）	7 - 14 %
为脂肪酸的皂（如 C_{16-22} 脂肪酸）	1 - 3 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	10 - 17 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2SiO_2$）	3 - 9 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	23 - 33 %
硫酸钠（Na_2SO_4）	0 - 4 %
过硼酸钠（$NaBO_3 \cdot H_2O$）	8 - 16 %
TAED	2 - 8 %
磷酸盐（如 EDTMPA）	0 - 1 %
羧甲基纤维素	0 - 2 %
聚合物（如马来酸/丙烯酸共聚物，PVP，PEG）	0 - 3 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（4）配制成堆积密度至少为600 g/l的洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	8 - 12 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{12-15} 醇，7 EO）	10 - 25 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	14 - 20 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2SiO_2$）	1 - 5 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	25 - 35 %
硫酸钠（Na_2SO_4）	0 - 10 %

羧甲基纤维素	0 - 2 %
聚合物（如马来酸/丙烯酸共聚物，PVP，PEG）	1 - 3 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（5）含水液体洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	15 - 21 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{12-15} 醇，7 EO 或 C_{12-15} 醇，5EO）	12 - 18 %
脂肪酸（如油酸）皂	3 - 13 %
烯基琥珀酸（C_{12-14}）	0 - 13 %
氨基乙醇	8 - 18 %
柠檬酸	2 - 8 %
磷酸盐	0 - 3 %
聚合物（如 PVP，PEG）	0 - 3 %
硼酸（B_4O_7）	0 - 3 %
乙醇	0 - 3 %
聚乙二醇	8 - 14 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（6）含水的液体洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	15 - 21 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{12-15} 醇，7 EO 或 C_{12-15} 醇，5EO）	3 - 9 %
脂肪酸（如油酸）皂	3 - 10 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	14 - 22 %
柠檬酸钾	9 - 18 %

硼酸（B_4O_7）	0 - 2 %
羧甲基纤维素	0 - 2 %
聚合物（如 PVP， PEG）	0 - 3 %
固定的聚合物如月桂基异丁烯酸/丙烯酸共聚物，摩尔比为 25： 1， MW3800	0 - 3 %
甘油	0 - 5 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（7）配制成堆积密度至少为 600g/l 的颗粒的洗涤剂组合物含有

脂肪族醇硫酸酯	5 - 10 %
乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺	3 - 9 %
为脂肪酸的皂	0 - 3 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	5 - 10 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2SiO_2$）	1 - 4 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	20 - 40 %
硫酸钠（Na_2SO_4）	2 - 8 %
过硼酸钠（$NaBO_3 \cdot H_2O$）	12 - 18 %
TAED	2 - 7 %
聚合物（如马来酸/丙烯酸共聚物， PEG）	1 - 5 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（8）配制成颗粒的洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	8 - 14 %
乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺	5 - 11 %
为脂肪酸的皂	0 - 3 %

碳酸钠（Na_2CO_3）	4 - 10 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2siO_2$）	1 - 4 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	30 - 50 %
硫酸钠（Na_2SO_4）	3 - 11 %
柠檬酸钠（$C_6H_5Na_3O_7$）	5 - 12 %
聚合物（如 PVP，马来酸/丙烯酸共聚物，PVP，PEG）	1 - 5 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（9）配制成颗粒的洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	6 - 12 %
非离子表面活性剂	1 - 4 %
为脂肪酸的皂	2 - 6 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	14 - 22 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	18 - 32 %
硫酸钠（Na_2SO_4）	5 - 20 %
柠檬酸钠（$C_6H_5Na_3O_7$）	3 - 8 %
过硼酸钠（$NaBO_3 \cdot H_2O$）	4 - 9 %
漂白激活剂（如 NOBS 或 TAED）	1 - 5 %
羧甲基纤维素	0 - 2 %
聚合物（如 PVP，马来酸/丙烯酸共聚物，PVP，PEG）	1 - 5 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（10）含水液体洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	15 – 23 %
脂肪醇乙氧基硫酸盐（如 C_{12-15} 醇，2 – 3 EO）	8 – 15 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{12-15} 醇，7EO，或 C_{12-15} 醇，5EO）	3 – 9 %
脂肪酸（如月桂酸）皂	0 – 3 %
氨基乙醇	1 – 5 %
柠檬酸钠	5 – 10 %
水溶助长剂（如甲苯磺酸钠）	2 – 6 %
硼酸 （B_4O_7）	0 – 2 %
羧甲基纤维素	0 – 1 %
乙醇	1 – 3 %
聚乙二醇	2 – 5 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 – 5 %

（11）含水液体洗涤剂组合物含有

直链烷基苯磺酸盐（按酸计算）	20 – 32 %
脂肪醇乙氧基化物（如 C_{12-15} 醇，7EO，或 C_{12-15} 醇，5EO）	6 – 12 %
氨基乙醇	2 – 6 %
柠檬酸	8 – 14 %
硼酸 （B_4O_7）	1 – 3 %
聚合物（如马来酸/丙烯酸共聚物，结合聚合物如月桂基异丁烯酸/丙烯酸共聚物）	0 – 3 %
甘油	3 – 8 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂	0 – 5 %

白剂）	

（12）配制成堆积密度至少为 600 g/l 的颗粒的洗涤剂组合物含有

阴离子表面活性剂（直链烷基苯磺酸盐，烷基硫酸盐，α－烯属磺酸盐，α－硫代脂肪酸甲基酯，链烷磺酸盐，皂）	25 － 40 %
非离子表面活性剂（如脂肪醇乙氧基化物）	1 － 10 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	8 － 25 %
可溶性硅酸（$Na_2O,2SiO_2$）	5 － 15 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	15 － 28 %
过硼酸钠（如 $NaBO_3 \cdot 4H_2O$)	0 － 20 %
漂白激活剂（TAED 或 NOBS）	0 － 5 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 － 3 %

（13）在 1)－ 12)描述的洗涤剂配方,其中用（C_{12} - C_{18}）烷基硫酸盐取代所有直链烷基苯磺酸盐

（14）配制成堆积密度至少为 600g/l 的颗粒的洗涤剂组合物含有

（C_{12} - C_{18}）烷基硫酸盐	9 － 15 %
脂肪醇乙氧基化物	3 － 6 %
多羟基烷基脂肪酸酰胺	1 － 5 %
沸石（$NaAlSiO_4$）	10 － 20 %
层化的二硅酸盐（如来自 Hoechst 的 SK56）	10 － 20 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	3 － 12 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2SiO_2$）	0 － 6 %
柠檬酸钠	4 － 8 %
过硼酸钠	13 － 22 %
TAED	3 － 8 %
聚合物（如聚羧酸盐和 PVP =，	0 － 5 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %

微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 5 %

（15）配制成堆积密度至少为600g/l的颗粒的洗涤剂组合物含有

（C_{12} - C_{18}）烷基硫酸盐	4 - 8 %
脂肪醇乙氧基化物	11 - 15 %
皂	1 - 4 %
沸石 MAP 或沸石 A	35 - 45 %
碳酸钠（Na_2CO_3）	2 - 8 %
可溶性硅酸盐（$Na_2O,2SiO_2$）	0 - 4 %
过硼酸钠	13 - 22 %
TAED	1 - 8 %
羧甲基纤维素	0 - 3 %
聚合物（如聚羧酸盐和 PVP）	0 - 3 %
酶（按纯酶蛋白质计算）	0.0001-0.1 %
微量成分（如顽固泡沫抑制剂，香料，荧光增白剂，光漂白剂）	0 - 3 %

（16）在1)- 15)描述的洗涤剂配方中，含有稳定化的或密封的过酸，作为一种添加剂组分或取代已经具体化的漂白系统。

（17）在1)，3)，7)，9)和12)描述的洗涤剂组合物中用过碳酸盐代替过硼酸。

（18）在1)，3)，7)，9)，12)，14)和15)描述的洗涤剂组合物中另外含有锰催化剂。锰催化剂可以是例如在“ Efficient mangaese catalysts for low-temperature bleaching ” Nature 369,1994,pp. 637-639 中描述的化合物之一。

（19）配制成不含水的洗涤液的洗涤剂组合物，含有液体非离子表面活性剂，如直链烷氧化的伯醇，助洗剂系统（如磷酸），酶和碱。所述洗涤剂还可含有阴离子表面活性剂和/或漂白系统。

可以以在洗涤剂中常规使用的浓度掺入本发明的脂酶变异体。目前设想在本发明的洗涤剂组合物中以相当于0.00001-1 mg脂酶变异体/升洗涤液

的量（按纯酶蛋白质计算）加入本发明的脂酶变异体。

餐具洗涤组合物

餐具洗涤剂组合物含有可以是阴离子，非离子，阳离子，两性离子或这些类型的混合物的表面活性剂。所述洗涤剂含有0－90%的非离子表面活性剂如低－到无泡乙氧基化的丙氧基化的直链醇。

所述洗涤剂组合物可含有无机和/或有机洗涤剂助洗剂盐。可将所述洗涤剂助洗剂再分成含磷的和不含磷类。所述洗涤剂组合物通常含有1－90%的洗涤剂助洗剂。

现有的含磷无机碱性洗涤剂助洗剂的实例包括水溶性盐，特别是碱金属焦磷酸盐，正磷酸盐，多磷酸盐和磷酸盐。不含磷的无机助洗剂的实例有可溶性碱金属碳酸盐，硼酸盐和硅酸盐以及各种水不溶性结晶的或无定形的硅酸铝，其中已知的最有代表性的是沸石。

适宜的有机助洗剂的实例包括碱金属，铵和取代的铵，柠檬酸盐，琥珀酸盐，丙二酸盐，脂肪酸磺酸盐，羧基甲氧基琥珀酸盐，多乙酸铵，羧酸盐，聚羧酸盐，氨基聚羧酸盐，聚乙酰基羧酸盐和多羟基磺酸盐。

其他适宜的有机助洗剂包括已知的与助洗剂特性的高分子量聚合物和共聚物，例如适宜的聚丙烯酸，聚马来酸和聚丙烯酸/聚马来酸共聚物和其盐。

餐具洗涤剂组合物可含有氯/溴类或氧类的漂白剂。无机氯/溴类漂白剂的实例是次氯酸和次溴酸锂，钠或钙以及氯化的磷酸三钠。有机氯/溴类漂白剂的实例是杂环的N－溴和N－氯酰亚胺如三氯异氰脲酸，三溴异氰脲酸，二溴异氰脲酸和二氯异氰脲酸和其水溶性阳离子如钾和钠的盐。海因化合物也是适宜的。

例如，无机过盐形式的氧漂白剂是优选的，优选的是与一个漂白前体或作为过氧酸化合物。适宜过氧漂白化合物的典型实例是碱金属过硼酸盐、四水合物和单水合物，碱金属过碳酸盐、过硅酸盐和过磷酸盐。优选的活化物质是TAED和甘油三乙酸酯。

可以用用于酶的常规稳定剂，如多元醇如聚乙二醇，糖或糖醇，乳酸，硼酸或硼酸衍生物如芳香族硼酸酯来稳定本发明的餐具洗涤剂组合物。

餐具洗涤剂组合物还可含有其他酶，特别是淀粉酶，蛋白质和/或纤维素酶。

本发明餐具洗涤剂组合物还可含有其他常规洗涤剂成分，如抗絮凝剂材料，填充材料，抑泡剂，抗腐蚀剂，污垢悬浮剂，螯合剂，抗污垢再沉积剂，脱水剂，染料，杀菌剂，荧光剂（fluorescers），增厚剂和香料。

最后，可以在常规餐具洗涤剂如在下列专利出版物中描述的任何洗涤剂中使用本发明的变异体：

EP 551670, EP 533239, WO 9303129, EP 507404, US 5141664, GB 2247025, EP 414285, GB 2234980, EP 408278, GB 2228945, GB 2228944, EP 387063, EP 385521, EP 373851, EP 364260, EP 349314, EP 331370, EP 318279, EP 318204, GB 2204319, EP 266904, US 5213706, EP 530870, CA 2006687, EP 481547, EP 337760, WO 93/14183, US 5223179, WO 93/06202, WO 93/05132, WO 92/19707, WO 92/09680, WO 92/08777, WO 92/06161, WO 92/06157, WO 92/06156, WO 91/13959, EP 399752, US 4941988, US 4908148.

此外，可在柔软剂组合物中使用本发明的脂酶变异体：

如在 Surfanctant and Consumei Products,Ed,by J.Falbe,1987,pp.295-296;Tenside Surfactants Detergents 30(1993),6,pp394-399; JAOCS,vol.61(1984),2, pp 367-376; EP 517762;EP 123400;WO92/19714；WO93/19147；US 5082578；EP494769；EP544493；EP543562；US5235082；EP568297；EP570237 中描述的织物柔软剂中使用所述脂酶变异体。

在附图中还描述了本发明，在附图中

图 1 是 pYESHL 的限制图谱，

图 2 是质粒 pAO1 的限制图谱，

图 3 是质粒 pAHL 的限制图谱，和

图 4 和 5 表示编码本发明变异体的基因的构建。

本发明还在下列实施例中作了进一步的描述，所述实施例不以任何方式限制本发明权利要求的范围。

材料和方法

可从 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,Mascheroderweg 1b ,D-3300,Braunschweig,Federal Republic of Germany 得到 Humicola lanuginosa DSM 4109 。

pYESHL 是酵母/大肠杆菌穿梭载体，在酵母中表达并分泌低水平的 H.lanuginosa 脂酶。更具体地说， pYESHL 是 pYES2 （从 Invitrogen Corp.,UK 购得）的衍生物，其中切掉 GAL1 启动子，然后将 Humicola lanuginosa 脂酶基因和来自啤酒酵母的 TPI （磷酸丙糖异构酶）启动子（ Alber,T. and Kawasaki, g.,J.Mol.apl.Genet 1,419-434(1982)）克隆 SphI 和 XbaI 位点之间。在图 1 中列出了 pYESHL 的限制图谱。

低钙过滤检测

方法

1) 提供在顶部带有第一蛋白质结合滤膜（尼龙膜）和第二低蛋白质结合滤膜（乙酸纤维素）的 SC Ura^- 复制平皿（用于筛选携带表达载体的菌株）。

2) 在双滤膜上涂覆含亲本脂酶基因或突变脂酶基因的酵母细胞，然后在 30 ℃培养 2 或 3 天。

3) 通过将顶层滤膜转移到新平皿上而将菌落保持在顶部滤膜上。

4) 将蛋白质结合滤膜放到一空培养皿中。

5) 将含有橄榄油乳液（ 2 % P.V.A.: 橄榄油 = 3 : 1 ），亮绿（指示剂， 0.004 %），100 mMTris 缓冲液 pH 9 和 EGTA（终浓度为 5 mM ）的琼脂糖溶液倒到底部的滤膜上以便鉴定为兰绿色点的表达脂酶活性的菌落。

6) 鉴定步骤 5)中的菌落与亲本脂酶相比是否对钙的依赖性降低。

Dobanol^{TM}25-7 滤膜检测:

利用与上述滤膜检测相对应的滤膜检测，所不同的是在 5)中的溶液中还含有 0.02%dobanol^{TM}25-7 ，来筛选对洗涤剂组分是否有改善的耐受性。

构建随机诱变的文库

a) 使用完整的脂酶编码基因

用 12M 甲酸将质粒 pYESHL 在室温处理 20 分钟。在诱变条件下（0.5 mM $MnCl_2$ 和 1/5 正常量的 ATP，参见 Leung et al.,1989），用 PCR 从甲酸处理的质粒扩增所得的脂酶编码基因。

由于甲酸主要产生碱基颠换，而 PCR 产生的突变主要是碱基转换，所以，该处理主要是为了得到较宽范围的突变。

将所得的 PCR 片段通过体内双重组（Muhlrad et al.,1992）而克隆到穿梭载体中或借助消化和连接克隆到穿梭载体中，然后转化大肠杆菌。

将随机捡出的 8 个克隆测序，发现平均含有 2 - 3 个突变－碱基颠换和碱基转换。

利用所述方法制备了 7 个含有 10000 - 140000 个克隆的文库。

b) 完成定位随机诱变

合成致诱变引物（寡核苷酸），所述引物除对应于待诱变氨基酸密码子的核苷酸外对应于待诱变 DNA 序列部分。

随后，在 PCR 中用所得的致诱变引物与适宜的相反引物反应。纯化并消化所得的 PCR 片段，然后将其克隆到穿梭载体中。另外，如果需要，可以在第二 PCR 反应中用所得的 PCR 片段为引物与适宜的第二相反引物反应，以便消化待诱变的区域并将其克隆到穿梭载体中。在正常条件下完成 PCR 反应。

用 Biosystems ABI DNA 测序仪 373A 型，按在 ABI Dye Terminator Cycle Sequencing 试剂盒中的方法完成 DNA 测序。

实施例

实施例　1

构建随机脂酶变异体

按上述材料和方法中的描述制备完整的 H.lanuginosa 脂酶基因和其氨基酸（aa）91 - 97 和 206 - 211 的随机诱变的文库。

首先选氨基酸区域 91 - 97 和 206 - 211 进行第一轮定位诱变，原因是已经发现这些区域对于洗涤性能是很重要的。区域 91 - 97 是脂酶罩区

域，而区域206 - 211组成了脂酶疏水缝隙。

针对各区域合成各自的寡核苷酸，它们分别含有93 %的野生型核苷酸和2.33 %在待诱变的氨基酸密码子上的其他三种核苷酸。在可能未改变氨基酸时，用50 % G/50 % C合成密码子中的第三个核苷酸（摆动碱基）以便使氨基酸的一个或两个密码子产生改变的可能性较大。区域91 - 97致诱变寡核苷酸的组成示于表1中。

利用所述的寡核苷酸，在该文库中，对于在亲本脂酶中导致一个氨基酸改变的理论突变频率约为65 - 70 %。对于导致两个或多个氨基酸改变的突变频率低于35 %。选择这种低突变频率来确保在阳性克隆中观察到的氨基酸改变与酶的改善有关，而高突变频率会产生“中性”改变。

在PCR反应中用所述致诱变引物与适宜的反引物反应。纯化所得的PCR片段，就区域206 - 211而论，将其消化并克隆到穿梭载体中。如果是区域91 - 97，在第二PCR反应中使用所得的PCR片段为引物与第二适宜的反引物反应。所述步骤对于消化被诱变的区域并将其克隆到穿梭载体中是必需的。

已经制备了含10000 - 80000个克隆/文库的区域91 - 97和区域206 - 211的文库。在亲本脂酶是阳性的，即表现出脂酶活性的条件下检测时，大多数菌落是阳性（大于90 %）的。用滤膜检测时用2.5 mMCa（代替5 mMEGTA）确定阳性反应。

用上述材料和方法中描述的Dobanol^{TM}25-7和低钙检测从不同的文库中筛选450000个菌落。从91 - 97文库（罩区）分离25个低钙阳性克隆，从完整基因文库分离12个Dobanol^{TM}25-7阳性克隆。将来自aa 91 - 97诱变的14个低钙阳性克隆测序。

尽管对于PCR错掺入来说，S83T是很少见的一种碱基颠换，但仍可用PCR错掺入来解释在诱变区外的三种其他突变（在密码子83，103，145）。

序列：

5′	5	C	G
T	5	C	3′
T	7	A	
A	8	G	瓶 5: 93% A; 2.33% C; 2.33% G 和 2.33% T
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	瓶 6: 93% C; 2.33% A; 2.33% G 和 2.33% T
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	瓶 7: 93% G; 2.33% A; 2.33% C 和 2.33% T
5	6	G	
7	G	A	
8	A	A	
6	T	C	瓶 8: 93% T; 2.33% A; 2.33% C 和 2.33% G
7			

表 1：说明如何构建用于定位随机诱变 Lipolase^R 的氨基酸 91 – 97 的寡核苷酸。序列中的数字是序列右边组合物的瓶号。

表 2

菌株号	变异体类型						
59	I			G91A	N94K		D96A
60	II	S83T			N94K		D96N
61	II	S83T			N94K		D96N
62	III		E87K				D96V
63	IV		E87K	G91A			D96V
64	II	S83T			N94K		D96N
65	III		E87K				D96V
67	V				N94K	F95L	D96H
69	V				N94K	F95L	D96H
71	III		E87K				D96V
72	II	S83T			N94K		D96N

表 2：菌株号指最初检出的克隆到曲霉表达载体 pAHL 中的克隆。变异体类型指在扩增随机诱变的文库时产生的相同克隆。变异体类 I 和 II 在 0.001

% Dobanol^{TM} 25-7 中是有活性的，但其余的像野生型一样无活性。

表 3

菌株号	变异体类型	DNA 序列 在序列上的氨基酸号										
		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
wt		GGC	TCT	CGT	TCC	ATA	GAG	AAC	TGG	ATC	GGG	AAT
59	I										C	
60	II		A								C	
61	II		A								C	
62	III						A				C	
63	IV						A				C	
64	II		A								C	
65	III						A				C	
67	V										C	
52/68	wt											
53	wt											
69	V										C	
71	III						A				C	
72	II		A								C	
73	VI											

		93	94	95	96	97	98	99	100	-103	-145
wt		CTT	AAC	TTC	GAC	TTG	AAA	GAA	ATA	-ATT	-CAT
59	I	G	G		C						
60	II	G	G		A						
61	II	G	G		A						
62	III				T						
63	IV				C					C	C
64	II	G	G		A						
65	III	G			T						
67	V		A	C	A	C					
52/68	wt										
53	wt										
69	V		A	C	A	C					
71	III	G			T						
72	II	G	A		A						
73	VI				A		?				

表3：在顶行列出了野生型序列。只写出了不同于野生型的变异体核苷酸。密码子91和93的碱基分别以1：1的C/T和T/G掺和。而在密码子91－97的核苷酸使用93％的野生型和2.33％的三种其他核苷酸。

实施例　2

用与实施例1所述类似的方法，通过随机诱变构建下列变异体。还描述了用于筛选某些变异体的实际筛选标准。

D167G+E210V

5mM EGTA,0.01% Dobanol™25-7,0.006% LAS
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A

5mM EGTA,0.02% Dobanol™25-7
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D96A
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
E87K+G91A+D96R+I100V
S83T+E87K+Q249R
E87K+G91A

实施例　3

在米曲霉中表达Humicola lanuginosa脂酶

在EP 305216中描述了Humicola lanuginosa脂酶的克隆。它还描述了脂酶在米曲霉中的表达和表征。所用的表达质粒被命名为p960。

在本申请中使用的表达质粒与p960相同，只是在脂酶编码区的3'端有很小的修饰。所述修饰用下列方法完成：用NruI和BamHI限制酶消化p960。在这两个位点之间克隆来自质粒pBR322的BamHI/NheI片段，其中用Klenow聚合酶补平NheI片段，由此得到质粒pA01（图2），所得的质粒含有特有的BamHI和NheI位点。克隆来自p960在这些特有位点间的BamHI/XbaI片段以得到pAHL（图3）。

脂酶基因的体外定点诱变

在 Nelson & Long ,analytical Biochemistry, 180,147-151(1989)中描述了将突变导入脂酶基因的方法。该方法包括用 3 步 PCR （聚合酶链反应）产生含有所需突变的片段，所述突变是通过在 PCR 反应中使用化学合成的 DNA 链为模板而导入的。从 PCR 产生的片段中，可以用限制酶裂解分离携带所述突变的 DNA 片段，然后再插入到所述表达质粒中。在实施例 5 中完整地描述了所述方法。在图 4 和 5 中进一步概括了该方法。

构建表达 Humicola lanuginosa 脂酶的 N94K/D96A 类似物的质粒

质粒 pAHL 的线性化

用限制酶 SphI 在 50 μl 下列反应混合物中将环状质粒 pAHL 线性化：50 mM NaCl，10 mM Tris-HCl，pH7.9，10 mM $MgCl_2$，1mM 二硫苏糖醇，1 μg 质粒和 2 单位 SphI。在 37 ℃消化 2 小时。用酚（用 Tris-HCl 平衡的，pH7.5）抽提反应混合物，然后通过加入 2 体积的冰冷 96 % 乙醇来沉淀。离心和干燥沉淀后，将线性化的 DNA 溶解在 50 μl 水中，在琼脂糖凝胶上估算浓度。

3 步 PCR 诱变

如图 5 所示，3 步诱变使用四种引物：

诱变引物 (=A)： 5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTC-CCGAT-3'

PCR 辅助物 1 (=B)： 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAA-ATCGGC-3'

PCR 辅助物 2 (=C)： 5'-CCATGGCTTTCACGGTGTCT-3'

PCR Handle (=D)： 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

辅助引物 1 和 2 与编码区外的序列互补，因此在构建变异体序列时可用其与任何诱变引物相结合。

所有 3 个步骤均在下列缓冲液中完成：10 mM Tris-HCl，pH8.3，

50 mM KCl， 1.5mM $MgCl_2$， 0.001 %明胶， 0.2 mM dATP， 0.2 mM dCTP， 0.2 mM GTP， 0.2 mM TTP， 2.5 单位的 Taq 聚合酶。

在步骤 1 中，将 100 pmol 引物 A， 100 pmol 引物 B 和 1 fmol 线性化的质粒加到共 100 μl 的反应混合物中，完成 15 个循环，每个循环包括 95 ℃ 2 分钟， 37 ℃ 2 分钟， 72 ℃ 3 分钟。

在琼脂糖凝胶上估算 PCR 产物的浓度。然后完成步骤 2。在前述 100 μl 的缓冲液中含 0.6 pmol 步骤 1 的产物和 1 fmol 线性化质粒，完成 1 个循环，该循环包括在 95 ℃ 5 分钟， 37 ℃ 2 分钟， 72 ℃ 10 分钟。

向步骤 2 的反应混合物中加入 100 pmol 引物 C 和 100 pmol 引物 D（各 1 μl），完成 20 个循环，每循环包括 95 ℃ 2 分钟， 37 ℃ 2 分钟， 72 ℃ 3 分钟。本操作过程包括了诱变方法中的步骤 3。

分离突变的限制片段

从琼脂糖凝胶中分离步骤 3 的产物，然后再溶在 20 μl 水中。接着在共 50 μl 含下列组分的混合物中用限制酶 BamHI 和 BstXI 将其消化： 100 mMNaCl， 50 mM Tris-HCl， pH7.9， 10 mM $MgCl_2$， 1 mM DTT， 10 单位 BamHI 和 10 单位 BstXI。在 37 ℃保温 2 小时。从琼脂糖凝胶中分离 733 bp 的 BamHI/BstXI 片段。

与表达载体 pAHL 相连

在上述条件下用 BamHI 和 BstXI 裂解表达载体 pAHL，从琼脂糖凝胶中分离较大的片段。将所述分离的突变片段与该载体相连，然后用连接混合物转化大肠杆菌。通过用限制酶裂解从转化体制备的质粒来确定所述片段的存在和方向。用 DyeDeoxy™ Terminater Cycle Sequencing 试剂盒（Applied Biosystems）在 ABI DNA 测序仪， 373A 型上对双链质粒进行序列分析。将所述质粒命名为 pAHLG91A/N94K/D96A，除取代的密码子外，该质粒与 pAHL 相同。

实施例 4

构建表达其他 Humicola 脂酶变异体的质粒

用与实施例 3 中所述相同的方法构建下列变异体。下面列出了用于修饰的质粒名称和引物。

质粒名称	引物 A 序列
pAHLS83T/N94K/D96A	5′-ATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTCCCGA-TCCAGTTCTCTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3′
pAHLE87K/D96V	5-TATTTCTTTCAAAACGAAGTTAAGATTCCCGATCC-AGTTCTTTATGGAACGAGA-3′
pAHLE87K/G91A/D96A	5′-TATTTCTTTCAAAGCGAAGTTAAGATTAGCGATC-CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3′
pAHLN94K/F95L/D96H	5′-TATTTCTTTCAAGTGCAACTTAAGATTCCCGAT-3′
pAHLF95C/D96N	5′-TATTTCTTTCAAGTTACAGTTAAGATTCCC-3′
pAHLG91S/L93V/F95C	5′-TATTTCTTTCAAGTCACAGTTAACATTAGAGATCC-AGTTCTC-3′
pAHLE87K/G91A/L93I/N94K/D96A	5′-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAATATTAGCGATC-CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3′
pAHLD167G	5′-ATATGAAAACACACCGATATCATACCC-3′
pAHLA121V	5′-CCTTAACGTATCAACTACAGACCTCCA-3′
pAHLR205K/E210Q	5′-GCTGTAACCGAATTGGCGCGGCGGGAGCTTAGGG-ACAATATC-3′
pAHLN73D/S85T/E87K/G91A/N94K/D96A	5′-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTAGCGATC-CAGTTCTTTATAGTACGAGAGCCACGGAA-AGAGAGGACGATCAATTTGTCCGTGTTGTCGAG-3′
pAHLS83T/E87K/W89G/G91A/N94K/D96V	5′-TATTTCTTTCAAAACGAACTTAAGATTAGCGATA-CCGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3′
pAHLE87K/G91A/D96R/I100V	5′-GCAAATGTCATTAACTTCTTTCAATCTGAAGTTAA-GATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGA-3′
pAHLS83T/E87K	5′-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-AAAGA-3′

pAHLE87K/G91A	5'-GAAGTTAAGATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAA-CGAGA-3'
pAHLS83T/E87K	5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-AAAGA-3'
pAHLQ249R	5'-CGGAATGTTAGGTCTGTTATTGCCGCC-3'

实施例 5

构建表达 Humicola 脂酶组合类似物的质粒

用适宜的引物，通过两个连续的诱变步骤来构建制质粒 pAHLD167G / E210V， pAHLA121V /R205K/E210Q 和 pAHLS83T/E87K/Q249R 。

实施例 6

在曲霉中表达脂酶类似物

米曲霉的转化（一般方法）

用米曲霉孢子接种 100 ml YPD （ Sherman et al.,Methods inYeast Genetics ,Cold Spring Harbor Laboratory,1981 ），然后振荡培养 24 小时。通过 miracloth 过滤收集菌丝体，用 200 ml 0.6 MMgSO$_4$ 洗涤。将菌丝体悬浮在 15 ml 1.2 M MgSO$_4$,,pH5.8 中。在冰上冷却悬浮液，加入 1 ml 含 120 Novozym^R 234,批号 1687 。 5 分钟后，加入 1 ml 12/mlBSA （ Sigma 型 H25 ），在 37 ℃缓慢搅拌继续培养 1.5-2.5 小时，直到在显微镜下检测的样品中可见到大量的原生质体。

通过 miracloth 过滤悬浮液，将滤物转移到无菌试管中，用 5 ml 0.6 M 山梨醇， 100 mMTris-HCl ,pH7.0 覆盖。以 1000 g 离心 15 分钟，从 MgSO$_4$ 层顶收集原生质体。将 2 体积的 STC （ 1.2M 山梨醇， 10 mMTris-HCl ,pH = 7.5， 10 mM CaCl ）加到原生质体悬浮液中，然后将混合物以 1000 g 离心 5 分钟。将原生质体沉淀悬浮在 3 mlSRC 中，然后再沉淀。重复该过程。最后，将原生质体重新悬浮在 0.2 -1 ml STC 中。

将 100 μ l 原生质体悬浮液与 10 μ lSTC 中的 5 － 25 μ g p3SR2(在 Hynes et al. Mol.and Cel.biol.,Vol.3,No.8,1430-1439,Aug.1983 中描述的携

带构巢曲霉 amdS 基因的质粒)混合。将混合物在室温放置 25 分钟。加入 0.2 ml 60% PEG 4000(BDH 29576），10 mM $CaCl_2$和 10 mM Tris-HCl,pH7.5，小心混合（两次），最后加入 0.85 ml 相同的溶液并仔细混合。将混合物在室温放 25 分钟，以 2500 g 离心 15 分钟，然后将沉淀重悬的 2 ml1.2 M 山梨醇中。沉淀一次以上后，将原生质体铺在含 1.0 M 蔗糖，pH =7.0,10 mM 乙酰胺为氮源和 20 mM CsCl 的基本平皿（Cove,Biochem.Biophys.Acta 113(1966)51-56）上以抑制背景生长。在 37 ℃培养 4 - 7 天后，捡出孢子，悬浮在无菌水中，涂覆以定点单个菌落。重复所述过程，贮存第二次分离后的单个菌落的孢子作为确定的转化体。

在米曲霉中表达脂酶类似物

将上述质粒通过与 p3SR2 共转化而转化到米曲霉 IFO 4177 中，所述 p3SR2 含有在上述实施例中描述的来自构巢曲霉的 amdS 基因。将上述制备的原生质体与等量的表达质粒和 p3SR2 一起培养，两种质粒各使用约 5 μg。两次分离可以用乙酰胺为唯一氮源的转化体。在 YPD 上生长 3 天后，用有关脂酶活性的检测方法分析培养物上清液。选择最好的转化体进行进一步的研究，使其在 1 升烧瓶中的 200 mlFG4 培养基（3 %豆糜，3 %麦芽糊精，1 %胨，用 4MNaOH 将 pH 调到 4）上于 30 ℃生长 4 天。

实施例　7

纯化本发明的脂酶变异体

脂酶活性的检测:

用阿拉伯树胶为乳化剂，通过乳化甘油三丁酸酯来制备脂酶底物。

用 pH stat 方法,在 pH7 检测脂酶活性。将 1 单位脂酶活性（LU/ mg）定义为每分钟释放 1 微摩尔正方形所需的量。

步骤 1：离心发酵上清液，丢弃沉淀。将所述上清液的 ph 条到 7，逐渐加入等体积的冷 96 %乙醇。将混合物在冰浴中保持 30 分钟。离心并去掉沉淀。

步骤：2 离心交换层析。过滤上清液并将其用在用 50 mM tris-HCl 缓

冲液，pH 7 平衡的 DEAE－快速（Pharmacia TM）柱。用相同的缓冲液洗涤所述柱，直到在 280 nm 的吸收值磁于 0.05 OD。用 5 个柱体积的相同缓冲液中的线性盐梯度（0 － 0.5 M NaCl）洗脱结合的酶活性。收集含酶活性的组分。

步骤 3：疏水层析。通过加入固体乙酸胺将含酶活性的收集物的体积摩尔浓度调到 0.8 M。将所述酶用在预先用 0.8 M 乙酸胺平衡的 TSK 凝胶 Butyl-Toyopearl 650C 柱（可从 Tosoh Corporation Japan 购买）。用 0.8 M 乙酸胺洗涤未结合的物质，用蒸馏水洗脱结合的物质。

步骤 4：用水稀释含酶活性的收集物，以便将电导调到 2 mS，将 pH 调到 7。将收集物用所预先用 50 mM tris-乙酸缓冲液 pH 7 平衡的 High Performance Q Sepharose (Pharmacia)柱。用盐线性梯度洗脱结合的酶。

实施例　8

本发明脂酶变异体的洗涤性能

与野生型 H.lanudinosa 脂酶相比以每升蛋白质 mg 计的酶量根据 OD_{280} 计算本发明 humicola lanuginosa 脂酶变异体的洗涤性能。

在放在 150 ml 烧杯的热稳定的水浴中完成洗涤试验。用三角形磁棒搅拌烧杯。

试验条件如下：

方法：　3 个循环，各循环间过夜干燥

洗涤液：　每烧杯 100 ml

布样：　每烧杯 6 个布样（3.5 × 3.5 cm）

织物：　100 % 棉，Test Fabrics style # 400

污垢：　用苏丹红染的猪脂（0.75 mg 染料/g 猪脂）。将 6 μl 加热到 70 ℃的猪脂放每块布的中心。产生污点后，将布在 75 ℃于烤箱中加热 30 分钟。然后在第一次洗涤前于室温将布过夜贮存。

洗涤剂：	LAS（Nansa 1169/P,30% a.m.）	1.17 g/l
	AEO（Dobanol™ 25-7）	0.15 g/l
	三磷酸钠	1.25 g/l

硫酸钠	1.00	g/l
碳酸钠	0.45	g/l
硅酸钠	0.15	g/l

pH： 10.2

脂酶浓度：每升脂酶蛋白质 0.075,0.188,0.375, 0.75 和 0.25 mg

时间： 20 分钟

温度： 30 ℃

漂洗： 流动的自来水中 15 分钟

干燥： 室温过夜（－ 20 ℃， 30 － 50 % RH ）

评价： 第 3 次洗涤后，测量在 460nm 的反射度。

结果

比较脂酶变异体和天然 H.lanuginosa 脂酶的剂量反应曲线。将测量值代到下列方程中而计算剂量反应曲线：

$$\Delta R = \Delta R_{max} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \qquad (I)$$

其中 △R 是用反射度单位表示的效果， C 是酶浓度（ mg/l ）

$\triangle R_{max}$ 是表示最大效果的常数

K 是常数； K^2 表示得到最大效果的一半时的酶浓度。

以各脂酶变异体和野生型脂酶的特征常数 $\triangle R_{max}$ 和 K 为基础，计算改善因子。改善因子的定义如下：

$$f_{improve} = C_{WT}/C \qquad (II)$$

表示得到与用 0.25 mg/l 参考野生型蛋白质（ C_{WT} ）相同的效果所需的脂酶变异体蛋白质的量。

因此，计算改善因子的方法如下：

1) 用方程（I）计算 0.25 mg/l 野生型蛋白质的效果（△ $R_{野生型}$）；

2) 用下列方程计算与 0.25 mg/l 野生型效果相同的脂酶变异体的浓度：

$$C = (K_{(analogue)} \frac{\Delta R_{(wild\text{-}type)}}{\Delta R_{max(analogue)} - \Delta R_{(wild\text{-}type)}})^2 \qquad (III)$$

3) 用方程（II）计算改善因子。

结果列在下列表 1 中。

表 1

变异体	改善因子
E87K+D96V	1.2
S83T+N94K+D96N	2.3
N94K+D96A	2.7
E87K+G91A+D96A	2.6
N94K+F95L+D96H	3.3
D167G+E210V	5.0
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A	1.3
E87K+G91A+D96R+I100V	5.2
E87K+G91A	5.0
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G	1.3
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3.8
K46R+E56R+G61S	1.9
D102K	0.2
D167G	1
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G	1.3
E210R	2.7
E210K	5.5
E210W	1
N251W+D254W+T267W	0.8
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3.8
E56R+I90F+D96L+E99K	4.8
D57G+N94K+D96L+L97M	1.9

参考文献:

Muhlrad et al., 1992; Yeast, Vol. 8, 79-82

Shimada, Y. et al. (1989). cDNA Molecular Cloning of Geotrichum candidum Lipase. J. Biochem., 106, 383-388.

Yamaguchi, S. et al. (1991). Cloning and structure of the mono- and diglycerol lipase-encoding gene from Penicillium camembertii U-150. Gene 103, 61-67.

Hass, M.J. et al. (1991). Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from Rhizopus delemar. Gene 109, 107-113.

Kugimiya, W. et al. (1992). Cloning and Sequences Analysis of DNA encoding Rhizopus niveus Lipase. Biosci. Boitech. Biochem. 56, 716-719.

Dartois, V. et al. (1993). Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260.

Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

R.K. Saiki et al., Science 239, pp. 487-491, 1988.

Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22, pp. 1859-1869, 1981.

Matthes et al., The EMBO J. 3, pp. 801-805, 1984.

J.O. Deshler, (1992) A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction. GATA 9(4): 103-106

Leung et al., Technique, Vol. 1, No. 1, pp. 11-15, 1989

Fowler et al., Molec. gen. Genet., 133, pp. 179-191, 1974.

Brady et al., "A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase", Nature 343, 1990, pp. 767-770, 1990.

Tilbeyrgh, H. van, Egloff, M.-P., Martinez,C., Rugani,N., Verger,R. and Cambillau (1993) Nature 362, p. 814-820. Interfacial activation of the lipase-prolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography.

Hudson et al., Practical Immunology, Third edition, Blackwell Scientific Publications, 1989

Alber, T. and Kawasaki, G., J.Mol.Appl. Genet 1, 419-434 (1982)

序列表

(1) 一般信息: (略)

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征
(A) 长度: 918 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链度: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(vi) 一原始来源
(A) 生物 : Humicola lanuginosa

(ix) 特征:
(A) 名称/关键词: CDS
(B) 位置 : 1..873
(C) 名称/关键词: mat_ 肽
(D) 位置 : 67..873

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

```
ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG   48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
       -20                 -15                 -10

GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC   96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
    -5                   1                   5                  10

AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT  144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
                15                  20                  25

GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC  192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
            30                  35                  40

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT  240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
        45                  50                  55

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA  288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
    60                  65                  70

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC  336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
75                  80                  85                  90

GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC  384
Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
                95                  100                 105

TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT  432
Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
            110                 115                 120
ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT  480
Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
        125                 130                 135

CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT  528
Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
    140                 145                 150

GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA  576
Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155                 160                 165                 170

TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC  624
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
                175                 180                 185

GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT  672
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
            190                 195                 200

GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA  720
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
        205                 210                 215

GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT  768
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
    220                 225                 230

ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT  816
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
235                 240                 245                 250

AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG  864
```

```
Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
                255                 260                 265

ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT    918
Thr Cys Leu
```

(2) SEQ NO: 2的信息

(i) 序列特征
(A)长度: 291个氨基酸
(B)类型: 氨基酸
(D)拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 2:

```
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
      -20                 -15                 -10

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
   -5                  1                   5                  10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
               15                  20                  25

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
           30                  35                  40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
        45                  50                  55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
    60                  65                  70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
75                  80                  85                  90

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
               95                  100                 105

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
           110                 115                 120

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
       125                 130                 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
   140                 145                 150

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155                 160                 165                 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
               175                 180                 185

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
           190                 195                 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
       205                 210                 215

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
   220                 225                 230
```

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
235 240 245 250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
255 260 265

Thr Cys Leu

说 明 书 附 图

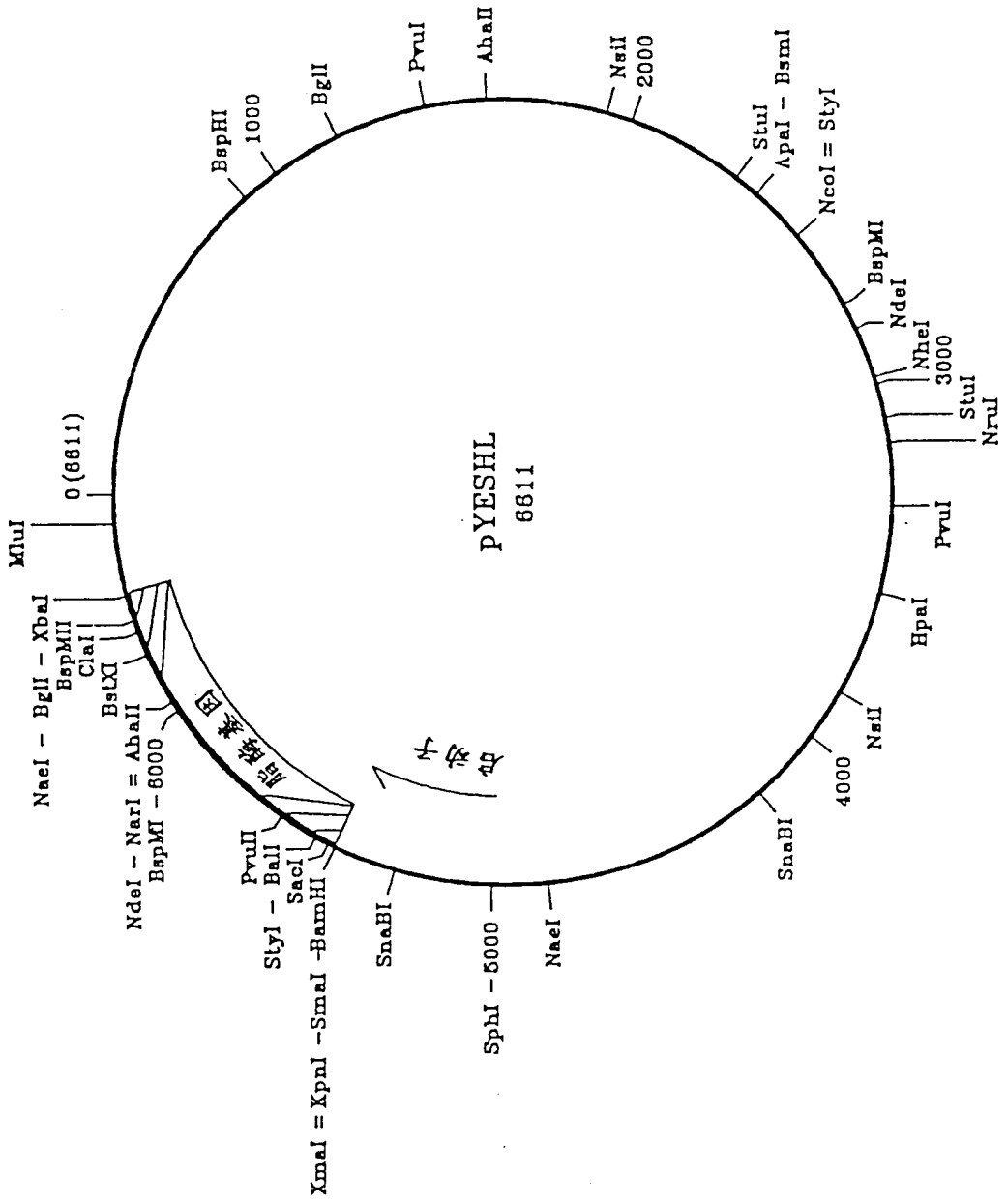

pYESHL
6811
0(6811)
MluI
NaeI - BglII - XbaI
BspMII
ClaI
BstXI
NdeI - NarI = AhaII
BspMI - 6000
PvuII
StyI - BalI
SacI
XmaI = KpnI -SmaI -BamHI
SnaBI
SphI - 5000
NaeI
SnaBI
4000
NsiI
HpaI
PvuI
NruI
StuI
3000
NheI
NdeI
BspMI
NcoI = StyI
StuI
ApaI - BsmI
NsiI
2000
AhaII
PvuI
BglII
1000
BspHI

图 1

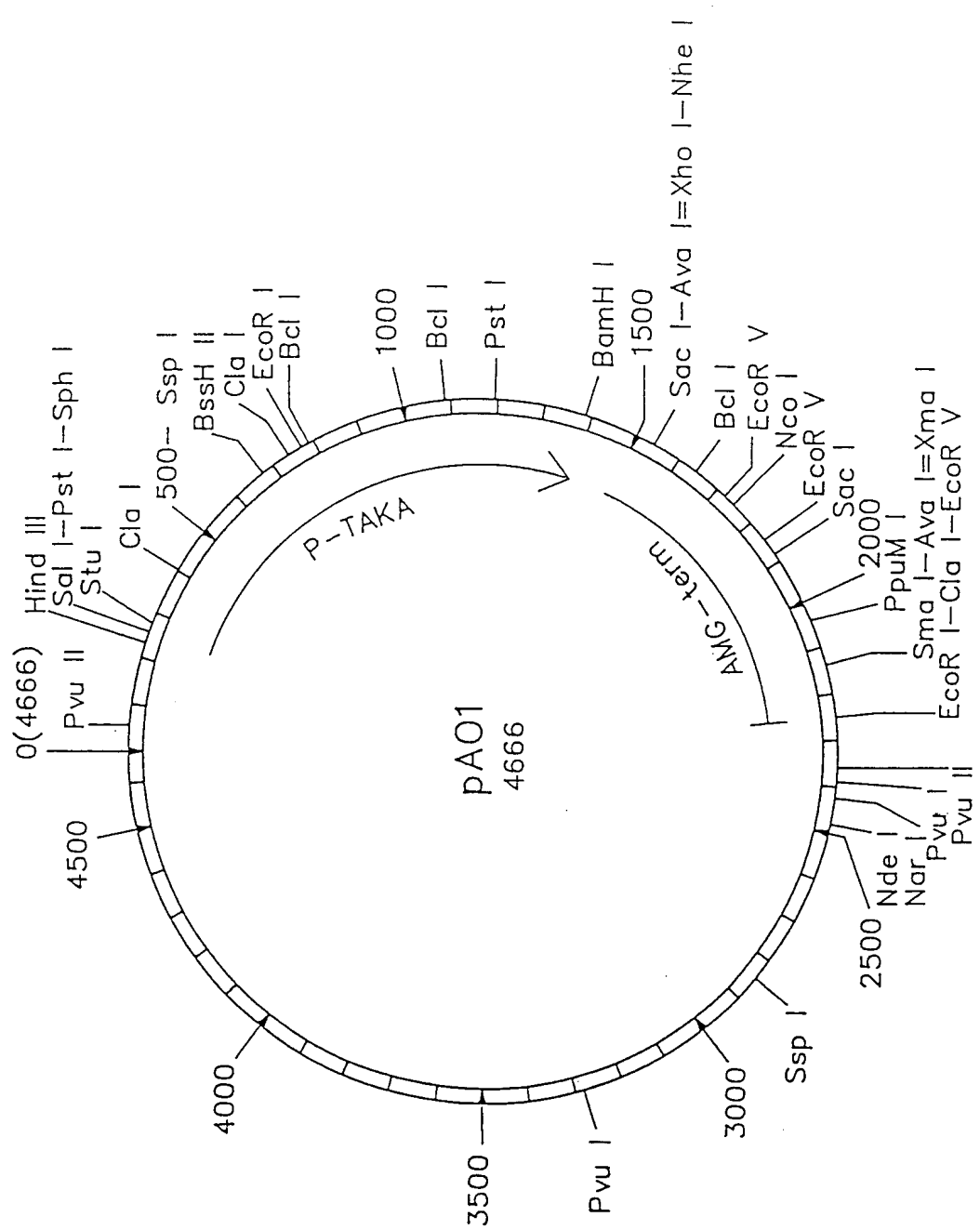

pAO1
4666
P-TAKA
AMG-term
0(4666)
Hind III
Sal I-Pst I-Sph I
Stu I
Pvu II
Cla I
500- Ssp I
BssH II
Cla I
EcoR I
Bcl I
1000
Bcl I
Pst I
BamH I
1500
Sac I-Ava I=Xho I-Nhe I
Bcl I
EcoR V
Nco I
EcoR V
Sac I
2000
PpuM I
Sma I-Ava I=Xma I
EcoR I-Cla I-EcoR V
Pvu II
Pvu I
Nde I
Nar I
2500
Ssp I
3000
Pvu I
3500
4000
4500

图 2

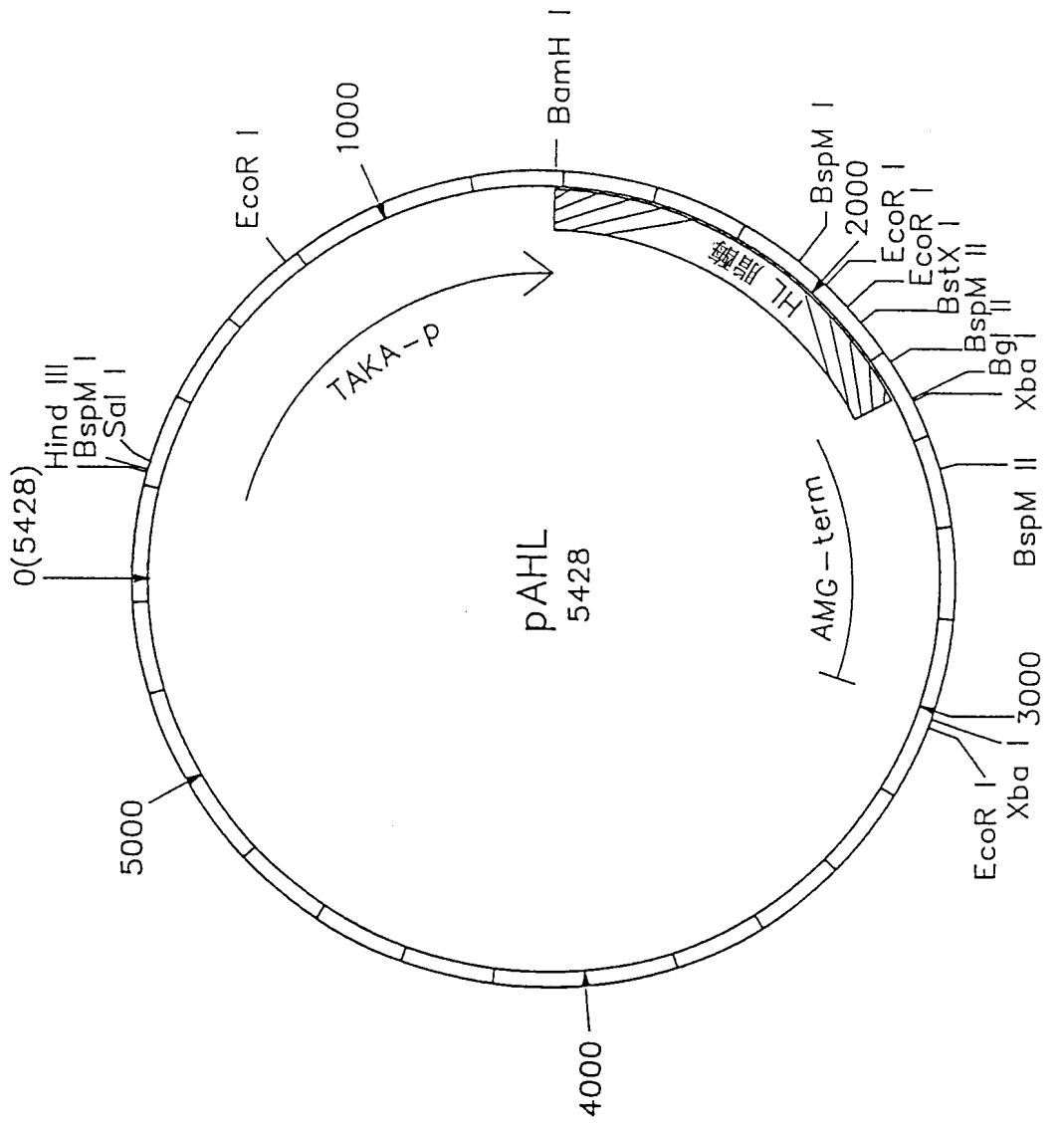

BamH I
1000
EcoR I
BspM I
2000
EcoR I
EcoR I
BstX I
BspM II
Bgl II
Xba I
BspM II
3000
EcoR I
Xba I
4000
5000
0(5428)
Hind III
BspM I
Sal I
TAKA-P
AMG-term
pAHL
5428

图 3

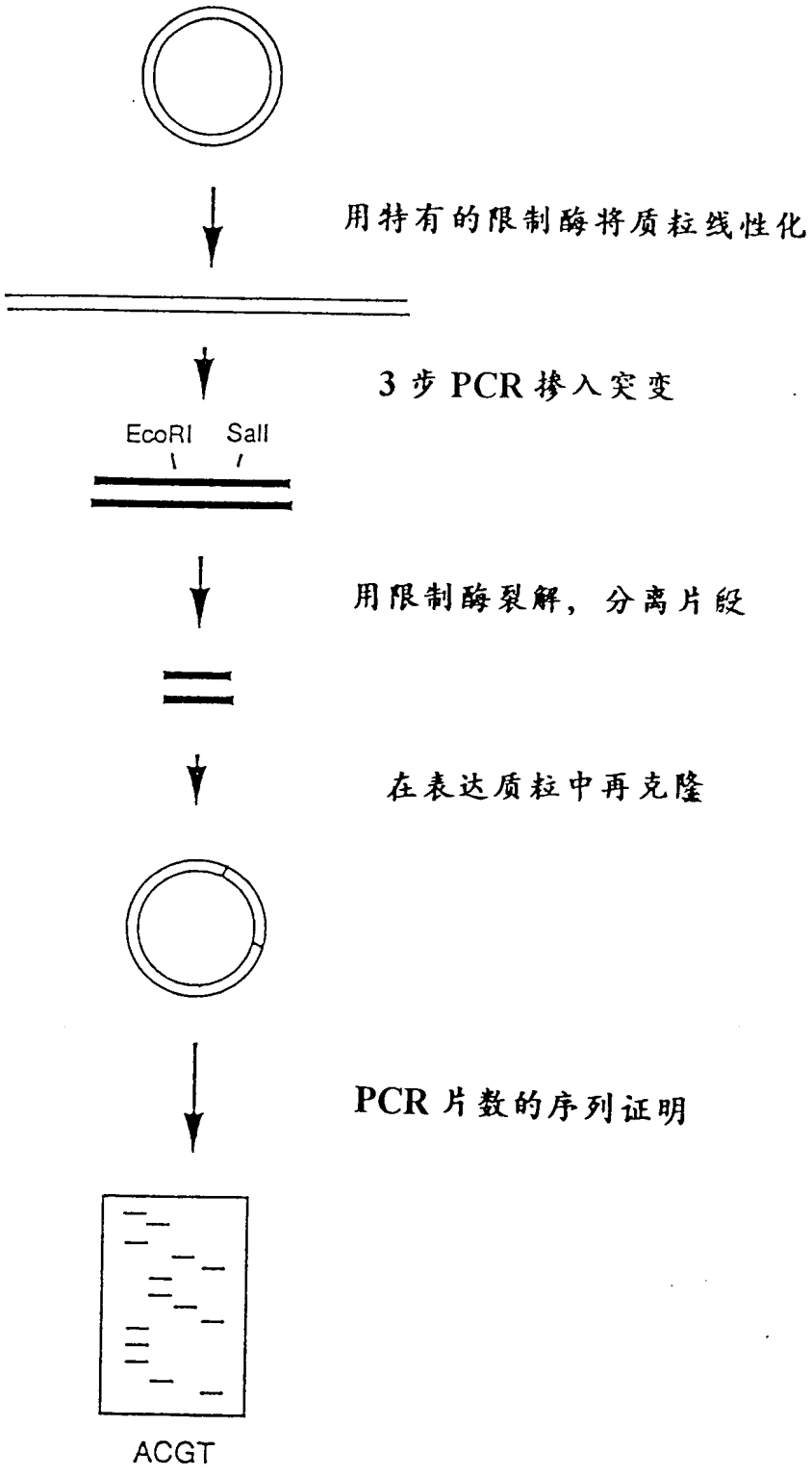

用特有的限制酶将质粒线性化
3 步 PCR 掺入突变
EcoRI
SalI
用限制酶裂解，分离片段
在表达质粒中再克隆
PCR 片数的序列证明
ACGT

图 4

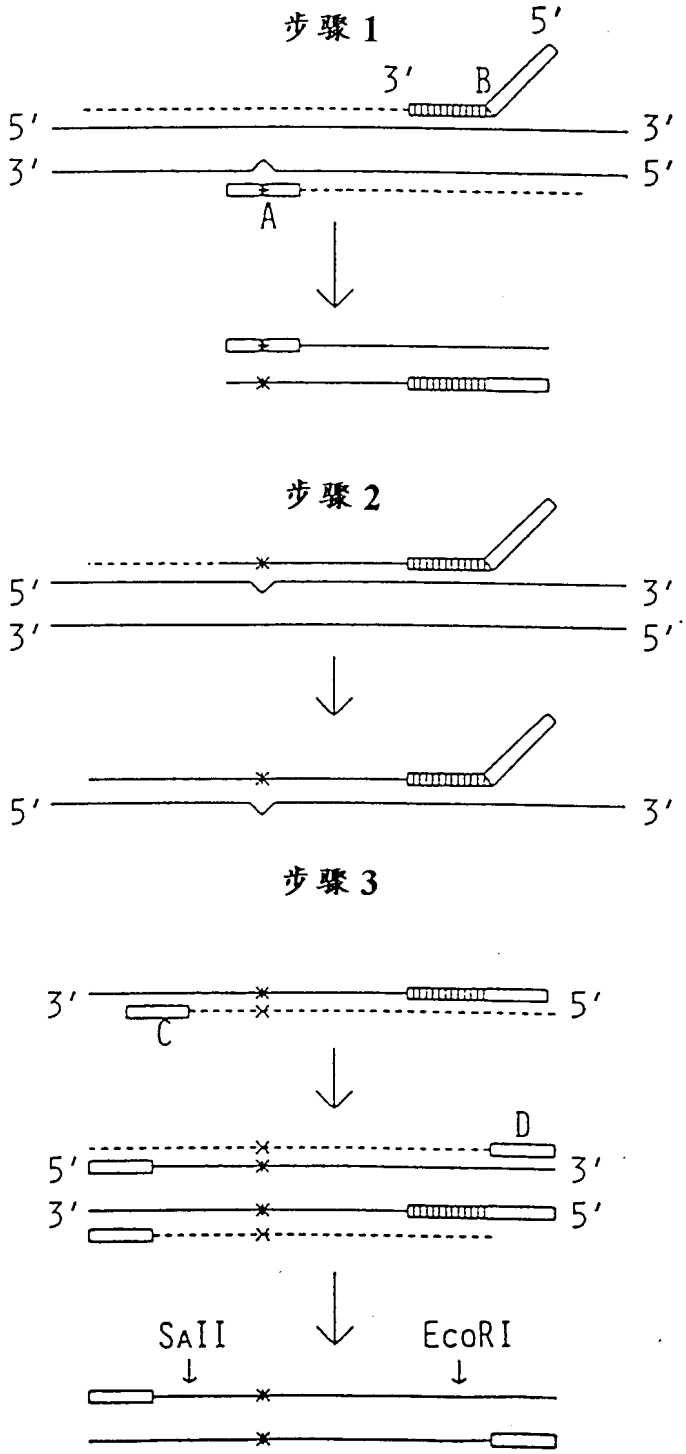


图 5