



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102660521 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 03

(21) 申请号 201210113983. 0

审查员 毛颖

(22) 申请日 2012. 04. 17

(73) 专利权人 南京工业大学

地址 211816 江苏省南京市浦口区浦珠南路
30 号南京工业大学生工楼

(72) 发明人 何冰芳 庄宇 朱富成 吴斌

(74) 专利代理机构 江苏致邦律师事务所 32230

代理人 樊文红

(51) Int. Cl.

C12N 9/52(2006. 01)

C12N 15/57(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12P 21/06(2006. 01)

C12R 1/385(2006. 01)

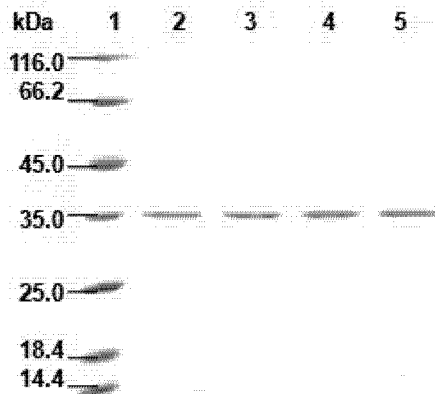
权利要求书1页 说明书8页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

耐有机溶剂蛋白酶的突变体

(57) 摘要

本发明属于基因工程研究领域,涉及一种耐有机溶剂蛋白酶的突变体。本发明所述的五个突变改造的蛋白酶是由具有氨基酸序列为 SEQIDNo. 1 的来源于铜绿假单胞菌的蛋白酶中氨基酸残基取代而产生的,所述的氨基酸突变包括第 46、224 位的取代。本发明公开了优选的分子改造的耐有机溶剂性能增强的蛋白酶、相应的氨基酸序列及其应用。本发明所述的五个突变体蛋白酶在有机溶剂中的稳定性方面更加优良,在多种有机溶剂体系中催化二肽合成的效率比野生型的显著提高。



1. 一种蛋白酶突变体,是通过用另一种氨基酸残基取代在由 SEQ ID No:1 表示的氨基酸序列的蛋白酶的下述位置上的氨基酸残基而获得的蛋白酶突变体,且所述的氨基酸残基位置为 SEQ ID No:1 中的:第 46 位,和 / 或第 224 位;其在有机溶剂中稳定性提高;其中,所述的另一种氨基酸残基选自下述的氨基酸:第 46 位:酪氨酸;第 224 位:苯丙氨酸或酪氨酸。

2. 编码权利要求 1 所述的蛋白酶突变体的基因。

3. 包含权利要求 2 所述基因的重组载体。

4. 包含权利要求 3 所述重组载体的转化体。

5. 利用权利要求 1 所述的蛋白酶突变体在非水体系中催化小肽合成反应的应用,其特征在于:以 Cbz-Gly-OH 和 L-Phe-NH₂ 为底物,所述的蛋白酶突变体溶解在 pH8.0 的 Tris-HCl 中,与等体积的有机溶剂混合,在 30℃ 保温反应。

耐有机溶剂蛋白酶的突变体

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程研究领域,涉及耐有机溶剂蛋白酶的突变体,具体的是通过基因工程改造得到的在有机溶剂中具有高稳定性的蛋白酶。

背景技术

[0002] 生物催化技术广泛用于制药、精细化工等合成领域,然而通常反应所用的底物或中间体水溶性差,因此在非水介质中的酶催化反应是推动该领域发展的关键技术。而多数酶在有机溶剂中不稳定、易失活,如何提高酶分子在有机溶剂中的稳定性成为了关键瓶颈。现有技术对在有机溶剂中进行酶催化的研究着重于酶催化介质工程、酶的物理化学修饰及固定化等技术,往往难以高效地改善酶的有机溶剂稳定性及催化反应效率,挖掘和开发在有机溶剂中具有高活性及高稳定性的酶类是十分迫切的,可提升生物催化工程的关键理论与技术。

[0003] Arnold 等 (J. Am. Chem. Soc. 113, 6336-6337) 对 α -裂解蛋白酶表面四个带电氨基酸残基进行定点饱和突变,获得的多个突变体在 84%DMF 中稳定性提高。Rhee 等 (Biochim. Biophys. Acta.-Protein Struct. Mol. Enzymol. 1547, 370-378) 通过定向进化技术获得了磷脂酶 A1 的三个突变体 (SA8、SA17 及 SA20) 在 50%DMSO 中的半衰期约是野生型的 4 倍。Reetz (Chem. Commun. 46, 8657-8658) 基于迭代饱和突变技术获得的枯草杆菌脂肪酶突变体在乙腈、DMSO 及 DMF 等有机溶剂中的稳定性显著提高。Dalfard 等 (J. Biochem. 148, 231-238) 通过定点突变提高了 *Salinivibrio proteolyticus* 来源的蛋白酶在多种有机溶剂中的稳定性,降低了其在有机相中的热失活速率。以上现有技术的文献显示出蛋白质分子改造手段对于提高酶在有机溶剂中的稳定性具有突出的优势,然而在实验水平上还没有成熟的相关理论报道,更没有可借鉴的分子改造方法。而运用定向进化策略对酶稳定性进行改造研究具有较高的可行性。

[0004] 近年来蛋白酶在有机相中的反应多样性越来越受到人们的关注,其可进行合成小肽合成、糖甙合物,转酯反应以及动力学拆分等,在医药中间体、日用品、化妆品、生物材料等领域具有广泛的应用前景。然而大多数蛋白酶在有机相中也容易失活,因此,提高蛋白酶在有机相中的稳定性对于推动蛋白酶非水相生物催化应用的发展具有突出的意义。

发明内容

[0005] 本发明的技术目的在于对本发明人团队在先授权专利的蛋白酶进行定向进化,以得到在有机溶剂中具有更高稳定性的蛋白酶;本发明的另一个技术目的在于提供该酶在有机相中催化小肽合成的应用,为有机相肽合成的工业化进程进一步提供基因资源。

[0006] 一、本发明通过定向进化技术对铜绿假单胞菌来源的耐有机溶剂蛋白酶 PT121 基因(见授权中国申请,授权公告号 CN 101240254 B)进行分子改造,使改造后的蛋白酶的突变体在有机溶剂稳定性方面更加优良。该耐有机溶剂蛋白酶突变体是通过用另一种氨基酸残基取代在由 SEQ ID No:1 表示的氨基酸序列的蛋白酶的下述位置、或其相应位置上的氨

氨基酸残基而获得的蛋白酶突变体,且所述的氨基酸残基位置为 SEQ ID No:1 中的:第 46 位,和 / 或第 224 位;其在有机溶剂中稳定性比原出发蛋白酶大大提高。其中,所述的 SEQ ID No:1 是在先授权专利 CN 101240254 B 中所述的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PT121 所产的蛋白酶的成熟肽部分,编码 301 个氨基酸。

[0007] 进一步地,所述的蛋白酶突变体是通过用另一种氨基酸残基取代在由 SEQ ID No:1 表示的氨基酸序列表现出至少 90% 同源性的氨基酸序列的蛋白酶的下述位置、或其相应位置上的氨基酸残基而获得的蛋白酶突变体,且所述的氨基酸残基位置为 SEQ ID No:1 中的:第 46 位,和 / 或第 224 位;其在有机溶剂中稳定性比原出发蛋白酶大大提高。

[0008] 更进一步地,所述的蛋白酶突变体是通过用另一种氨基酸残基取代在由 SEQ ID No:1 表示的氨基酸序列表现出至少 99% 同源性的氨基酸序列的蛋白酶的下述位置、或其相应位置上的氨基酸残基而获得的蛋白酶突变体,且所述的氨基酸残基位置为 SEQ ID No:1 中的:第 46 位,和 / 或第 224 位;其在有机溶剂中稳定性比原出发蛋白酶大大提高。

[0009] 更进一步地,所述的另一种氨基酸残基优选自下述的氨基酸:第 46 位:酪氨酸(氨基酸缩写名称为 Y);第 224 位:苯丙氨酸(氨基酸缩写名称为 F) 或酪氨酸(氨基酸缩写名称为 Y)。

[0010] 二、编码本发明所述的蛋白酶突变体的基因。其出发蛋白酶的基因序列参见在先授权中国专利 CN 101240254 B 所对应的蛋白酶成熟肽段编码的核苷酸序列。在该蛋白酶的第 46 位和第 224 位突变点对应的编码的核苷酸编码,另理解为本发明所述的“另一种氨基酸残基”所编码的核苷酸编码。

[0011] 三、包含本发明第二点所述基因的重组载体,以及包含所述重组载体的转化体(例如本发明所述的微生物)。

[0012] 本发明所述的重组载体,应理解为现有技术中任意的基因的重组载体,例如各种质粒,即将蛋白酶突变体的突变基因导入能使该蛋白酶突变体稳定的表达 DNA 载体质粒。

[0013] 而所述的重组载体的转化体,即指重组载体的宿主细胞,例如,本发明实施例 2 所述的微生物 *E. coli* BL21 的宿主细胞;当然,现有技术常用的宿主细胞的微生物包括革兰氏阳性细菌如枯草芽孢杆菌,革兰氏阴性细菌如大肠杆菌,放线菌如链霉菌,酵母如酿酒酵母,真菌如曲霉菌,它们的细胞均是常用的重组载体的宿主细胞。

[0014] 四、利用本发明所述的蛋白酶突变体在非水体系中催化小肽合成反应的应用:以 Cbz-Gly-OH 和 L-Phe-NH₂ 为底物,本发明所述的蛋白酶突变体溶解在 pH8.0 的 Tris-HCl 中,与等体积的有机溶剂混合,在 30°C 保温反应。

[0015] 本发明所述的蛋白酶突变体在 50% (v/v) 乙腈体系中催化二肽 Cbz-Gly-Phe-NH₂ 合成的效率比野生型提高了 29.9 ~ 106.7%,在 50% (v/v) DMF、甲醇、乙醇体系中的合成效率也有显著的提高,以上结果进一步提高了蛋白酶 PT121 工业化应用的可行性。

附图说明

[0016] 图 1 制备的蛋白酶突变体的 SDS-PAGE 电泳分析。

[0017] 图 2 蛋白酶 PT121 及其突变体在乙腈中的稳定性曲线。

[0018] 图 3 蛋白酶 PT121 及其突变体在丙酮中的稳定性曲线。

具体实施方式

[0019] 本发明所述的生物材料的来源的一般性说明：

[0020] 1、由 SEQ ID No:1 表示的氨基酸序列的蛋白酶：授权中国申请，授权公告号 CN 101240254 B。

[0021] 2、引物设计及制备：本发明中所使用的引物均由上海 Invitrogen 公司合成制备。

[0022] 3、实验中所使用的 pET22b(+) 质粒购自于 Novagen 公司，而所使用的 LA Taq DNA 聚合酶、PrimeSTAR HS 高保真酶、限制性内切酶及 T4 连接酶等均购自于 TaKaRa 公司，使用的 DNA 胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒均购自于 Axygen 公司。

[0023] 实施例 1：含蛋白酶 PT121 编码序列的重组质粒 pPT121 的构建

[0024] 采用酚-氯仿法抽提 *Pseudomonas aeruginosa* PT121 菌株的总 DNA。根据其所分泌的耐有机溶剂的蛋白酶 PT121 的基因序列，在去除信号肽的剩下的基因（编码前肽及成熟肽）的两端设计引物，扩增耐有机溶剂蛋白酶 PT121 的编码基因。设计的引物为：

[0025]

PT121_F: GCGGCCATGGTAGACCTGATCGACGTGTCCAAACT (SEQ ID No:2)

NcoI

PT121_R: AATGGATCCTTACAACGCGCTCGGGCAGGTC (SEQ ID No:3)

BamHI

[0026] PCR 反应体系如下：

[0027]

LA Taq DNA 聚合酶	0.5 μ L
2 \times GC buffer I	25 μ L
dNTP (2.5mM)	8 μ L
DNA	2 μ L
PT121_F (10pmol/ μ L)	2 μ L
PT121_R (10pmol/ μ L)	2 μ L
ddH ₂ O	10.5 μ L

[0028] PCR 程序设定：

[0029] 95 $^{\circ}$ C 预变性 1min；

[0030] 95 $^{\circ}$ C, 30s ; 60 $^{\circ}$ C, 30s ; 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min 30 个循环；

[0031] 72 $^{\circ}$ C 5min。

[0032] PCR 产物和 pET22b(+) 质粒 (Novagen 公司) 分别进行限制性内切酶 NcoI、BamHI 双酶切反应后，用 DNA 胶回收试剂盒回收酶切产物，在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接反应，连接产物电转化至大肠杆菌 DH5 α 菌株，涂布到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素 LB 琼脂平板上，筛选阳性克隆（携带有含蛋白酶 PT121 编码序列的重组质粒 pPT121），可培养阳性克隆后，运用质粒小提试剂盒从中提取重组质粒 pPT121，作为实施例 2 中的模板。

[0033] 实施例 2：通过易错 PCR 反应在蛋白酶 PT121 基因中引入随机突变

[0034] 采用普通 Taq DNA 聚合酶,以含有蛋白酶 PT121 编码序列的重组质粒 pPT121 为模板进行易错 PCR 反应。在 PCR 反应体系中添加 Mn^{2+} ,提高 Mg^{2+} 浓度以及改变 dNTP 混合物中各组分的比例等,使扩增的基因出现少量碱基错配,从而导致目的基因的随机突变。

[0035] PCR 反应体系如下:其中 10×PCR buffer 内含 70mM $MgCl_2$, 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH8.3,0.1%(w/v) 明胶;dNTP 内含 2mM dGTP, 2mM dATP,10mM dCTP,10mM dTTP。

[0036]

Taq 酶	0.5 μ L;
10×PCR buffer	5 μ L;
dNTP	5 μ L;
T7_F	2 μ L;
T7_R	2 μ L;
Template(模板)	2 μ L;
$MnCl_2$ (5mM)	5 μ L;
ddH ₂ O	18.5 μ L。

[0037] 两条 PCR 引物如下:

[0038] T7_F:TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID No:4);

[0039] T7_R:GCTAGTTATTGCTCAGCGG (SEQ ID No:5)。

[0040] PCR 程序设定:

[0041] 95 °C 预变性 5min;

[0042] 95 °C,1min;55°C,1min;72 °C,2 min 45 个循环;

[0043] 72 °C 5min。

[0044] PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 回收试剂盒进行胶回收,得到大约 1.5kb 的片段。

[0045] 将易错 PCR 胶回收产物与表达载体 pET22b(+) 分别进行限制性内切酶 Nde I/Hind III 双酶切,酶切条件如下:

[0046]

PCR 片段酶切体系(20 μ L)	
PCR 片段	10 μ L;
10×Buffer	2 μ L;
Nde I	0.5 μ L;
Hind III	0.5 μ L;
ddH ₂ O	7 μ L。

[0047]

质粒 pET22b(+)酶切体系(20 μ L)

质粒	10 μ L;
10 \times Buffer	2 μ L;
Nde I	0.5 μ L;
Hind III	0.5 μ L;
ddH ₂ O	7 μ L。

[0048] 37 $^{\circ}$ C酶切7小时,电泳后分别回收两个酶切产物片段,再用T4 DNA连接酶连接,连接体系如下:

[0049]

PCR 片段	5 μ L;
质粒	1 μ L;
T4 DNA 酶	0.5 μ L;
10 \times Buffer	1 μ L;
ddH ₂ O	2.5 μ L;
Total	10 μ L。

[0050] 16 $^{\circ}$ C连接过夜,电泳检测结果显示有一条大约7000bp的片段,说明连接成功。连接产物电转化至*E. coli* BL21,涂布到含有100 μ g/mL氨苄青霉素LB琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养。

[0051] 将所有的转化克隆子转接至奶粉琼脂平板上,具体配方为:胰蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,氯化钠10g/L,脱脂奶粉10g/L,琼脂18g/L。在37 $^{\circ}$ C培养24h后根据菌落是否产生水解圈,初步筛选获得带有蛋白酶PT121突变基因的重组菌,能产生水解圈的菌落即为阳性重组子。

[0052] 实施例3:突变体蛋白酶的表达与制备

[0053] 将阳性重组子接入种子培养基,具体配方为胰蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,氯化钠10g/L,葡萄糖10g/L,氨苄青霉素100 μ g/mL。在96孔板中37 $^{\circ}$ C,180rpm培养过夜作为种子液。在12孔培养板每孔中加入3mL LB氨苄培养基,按接种量1%接入种子液,摇床37 $^{\circ}$ C,120rpm培养3-3.5h。当OD达到0.6-0.8时加入IPTG至终浓度为1mM,然后30 $^{\circ}$ C,120rpm,诱导培养2-3h。离心收集菌体,用Tris-HCl缓冲(100mM, pH 8.0)洗涤菌体两次,最后用Tris-HCl缓冲(100mM, pH8.0,含0.25mg/mL溶菌酶)混悬菌体,在37 $^{\circ}$ C下水浴2h后离心去除菌体,取上清酶液保存,上清液为电泳纯的酶液(如图1所示),可直接用于后续筛选及性质研究。

[0054] 实施例4:在有机溶剂中具有更高稳定性的突变基因的筛选

[0055] Folin-酚法测定蛋白酶活力:取若干1.5mL离心管编号,分别加入酶液200 μ L及

200 μ L 酪蛋白底物溶液 (2%, w/v), 放入 40 $^{\circ}$ C 恒温水浴保温 10min 后立即加入 400 μ L TCA 反应终止液 (0.4M 三氯乙酸)。每个样品做空白对照, 即先加入终止液使酶失活后再加入底物溶液。反应液室温, 15000rpm 离心 15min, 然后取各离心管上清液 40 μ L, 分别移入 96 微孔板中, 再加入 0.4M 碳酸钠溶液 200 μ L 和福林 - 酚试剂 (上海生工生物工程有限公司) 40 μ L, 混匀, 40 $^{\circ}$ C 下保温显色 20min 后, 进行比色测定 (波长 660nm)。蛋白酶活力定义: 在一定 pH 值 (pH8.0) 和 40 $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸所需的酶量为一个蛋白酶活力单位 (U)。

[0056] 将制备的突变体酶液加入到 25%(v/v) 乙腈体系中, 在 30 $^{\circ}$ C 下保温 5h, 考察 0h 时的酶活力 A_0 和 5h 时的酶活力 A_5 , 稳定性定义为 $S=A_5/A_0$ 。以未突变蛋白酶 PT121 为对照, 筛选有机溶剂稳定性显著提高的突变体。

[0057] 筛选获得了三个稳定性提高的突变体, 经基因序列测定 (由上海 Invitrogen 公司完成) 分析后发现, 两个位点的氨基酸参加发生了突变, 见表 1, 分别命名为 T46Y、H224F 及 H224Y, 其与原出发蛋白酶的源性均为 99%。它们对应的稳定性分别为 115.8%, 107.2% 及 108.4%, 而野生型的蛋白酶 PT121 的稳定性为 82.6%。这三个突变体即为优势突变体。本实验中这三个突变体是通过随机突变及筛选的方法获得, 而本领域公知常识可知, 而用定点突变的方法也能获得这三个突变体, 这对于本领域普通技术人员而言是公知可以实现的实验技术。

表 1

突变蛋白酶编号	PT121	T46Y	H224F	H224Y
[0058] 位点: 第 46 位	T	Y	T	T
位点: 第 224 位	H	H	F	Y

[0059] 实施例 5: 定点突变构建多重突变体

[0060] 前述实施例说明了随机突变已筛选获得了三个突变体, 并分析了其突变的位点及类型, 因此通过定点突变的方法构建多重突变体, 以获得有机溶剂稳定性更高的突变体。首先运用质粒小提试剂盒提取 T46Y 突变体的重组质粒, 以此为模板, 以带有突变位点的一对互补的寡核苷酸作为引物, 用 PrimeSTAR HS 高保真酶 (TaKaRa 公司) 进行全质粒 PCR 扩增, 获得具有特定突变位点的重组质粒。

[0061] 所用引物如下:

[0062] SM224F_F: CATCGACGTGCACTTCTCCAGCGGCGTG (SEQ ID No:6);

[0063] SM224F_R: CACGCCGCTGGAGAAGTGCACGTCGATG (SEQ ID No:7);

[0064] SM224Y_F: CATCGACGTGCACTACTCCAGCGGCGTG (SEQ ID No:8);

[0065] SM224Y_R: CACGCCGCTGGAGTAGTGCACGTCGATG (SEQ ID No:9)。

[0066] PCR 反应体系如下:

[0067]

PrimeSTAR HS 高保真酶	0.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer (含 Mg ²⁺)	10 μ L
引物 1 (10pmol/ μ L)	2 μ L
引物 2 (10pmol/ μ L)	2 μ L
模板	2 μ L
dNTP (2.5mM)	4 μ L
ddH ₂ O	29.5 μ L

[0068] PCR 程序设定：

[0069] 95 °C 预变性 1min；

[0070] 98 °C, 10s ; 68°C, 7.5min 30 个循环。

[0071] 胶回收 PCR 产物, 参见试剂盒说明书, 用 DpnI 酶 (Fermentas 公司) 在 37°C 下消化胶回收产物 3h, 降解初始模板。消化产物电转化至 *E. coli* BL21, 涂布到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素 LB 琼脂平板上, 37°C 过夜培养。将转化克隆子转接至奶粉琼脂平板上, 在 37°C 培养 24h, 能产生水解圈的菌落即为阳性重组子。经序列测定 (由上海 Invitrogen 公司完成) 验证突变结果。获得了两个双突变体 T46Y/H224F 和 T46Y/H224Y, 其与原出发蛋白酶的同源性均为 99%。突变信息见表 2。

表 2

突变蛋白酶编号	PT121	T46Y/H224F	T46Y/H224Y
[0072] 位点: 第 46 位	T	Y	Y
位点: 第 224 位	H	F	Y

[0073] 对于本领域普通技术人员的公知常识可知, 基于同源性 90% 以上的上述两个位点的突变体, 均应理论上可以实现本发明所述的蛋白酶突变体耐有机溶剂的特性, 即在有机溶剂中的稳定性提高的技术功能, 因此, 本发明对此常规同源性 90% 突变体的突变方法和突变体序列不再赘述。

[0074] 实施例 6 : 对优势突变体的有机溶剂稳定性分析

[0075] 将制备的优势突变体的酶液在不同浓度的乙腈、丙酮溶液中保存 3 小时后测定剩余活力, 混合后的有机溶剂 - 水溶液中酶的初始活力约为 1000U/mL。以有机溶剂浓度为横坐标, 以酶剩余活力为纵坐标制作稳定性曲线, 结果如图 2、图 3 所示。由图可见, 本发明所述的突变体的有机溶剂稳定性有了较大的提高, 在高浓度有机溶剂中保存一段时间后的剩余活力比野生型蛋白酶的高, 因此本发明所述的突变体在有机相中的生物催化反应中可能更有优势。

[0076] 实施例 7 : 优势突变体在有机溶剂中的半衰期测定

[0077] 将制备的优势突变蛋白酶液 0.5mL (初始活力约为 2000U/mL), 分别加入等体积有机溶剂 (乙腈、丙酮) 中, 置于密封试管中, 在 30°C, 140rpm 水浴摇床中振荡, 分别在 0, 1, 3, 5, 7, 10 和 15 天取样检测蛋白酶活力, 通过指数回归曲线求蛋白酶的半衰期, 测定结果见表

3。

[0078]

表 3

溶剂体系	半衰期 (天)					
	PT121	T46Y	H224F	H224Y	T46Y/H224F	T46Y/H224Y
50%乙腈	0.2	0.5	0.3	0.4	0.7	0.7
50%丙酮	2.3	4.8	2.7	2.9	5.2	5.5

[0079] 实施例 8 :优势突变体在非水相中催化二肽合成的应用研究

[0080] 将制备的蛋白酶 PT121 及优势突变体蛋白酶,与等体积的有机溶剂混合,以 40mM 的 Cbz-Gly-OH 和 80mM 的 L-Phe-NH₂ 为底物在 30℃ 下进行催化反应,反应总体积为 1mL,酶初始活力均为 1000U/mL,反应 6h 后取样用甲醇稀释 5 倍,以化学合成的产物为标准品采用反向 HPLC 检测产物,结果表明,在乙腈体系中蛋白酶 PT121 及本发明所述的五个优势突变体 T46Y、H224F、H224Y、T46Y/H224F 及 T46Y/H224Y 催化合成的产率分别为 16.4%、21.3%、32.6%、33.9%、38.7% 及 39.4%,催化效率分别比野生型的提高 29.9%、98.8%、106.7%、136.0% 及 140.2%。此外,在 DMF、甲醇及乙醇体系中五个突变体催化合成的产率也都有不同程度的提高,见表 4。

表 4

溶剂体系	Cbz-Gly-Phe-NH ₂ 产率 (%)					
	PT121	T46Y	H224F	H224Y	T46Y/H224F	T46Y/H224Y
[0081] 乙腈	16.4	21.3	32.6	33.9	38.7	39.4
DMF	6.5	8.7	12.3	11.2	15.8	14.3
甲醇	7.0	7.5	8.2	7.3	8.9	8.1
乙醇	5.7	6.6	8.2	7.6	9.0	8.2

Ala Tyr Trp Asp Gly Thr Ala Met Leu Phe Gly Asp Gly Ala Thr Met
 115 120 125

Phe Tyr Pro Leu Val Ser Leu Asp Val Ala Ala His Glu Val Ser His
 130 135 140

Gly Phe Thr Glu Gln Asn Ser Gly Leu Ile Tyr Arg Gly Gln Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Met Asn Glu Ala Phe Ser Asp Met Ala Gly Glu Ala Ala Glu Phe
 165 170 175

Tyr Met Arg Gly Lys Asn Asp Phe Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Lys Lys
 180 185 190

Gly Ser Gly Ala Leu Arg Tyr Met Asp Gln Pro Ser Arg Asp Gly Arg
 195 200 205

Ser Ile Asp Asn Ala Ser Gln Tyr Tyr Asn Gly Ile Asp Val His His
 210 215 220

Ser Ser Gly Val Tyr Asn Arg Ala Phe Tyr Leu Leu Ala Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Gly Trp Asp Thr Arg Lys Ala Phe Glu Val Phe Val Asp Ala Asn Arg
 245 250 255

Tyr Tyr Trp Thr Ala Thr Ser Asn Tyr Asn Ser Gly Ala Cys Gly Val
 260 265 270

Ile Arg Ser Ala Gln Asn Arg Asn Tyr Ser Ala Ala Asp Val Thr Arg
 275 280 285

Ala Phe Ser Thr Val Gly Val Thr Cys Pro Ser Ala Leu
 290 295 300

[0003]

<210> 2	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> PT121_F	
<400> 2	
gcggccatgg tagacctgat cgacgtgtcc aaact	35
<210> 3	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> PT121_R	
<400> 3	
aatggatcct tacaacgcgc tcgggcaggt c	31
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> T7_F	
<400> 4	
taatacgact cactataggg	20
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> T7_R	
<400> 5	
gctagttatt gctcagcgg	19

[0004]

<210>	6	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	SM224F_F	
<400>	6	
	catcgacgtg cacttctcca gcggcgtg	28
<210>	7	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	SM224F_R	
<400>	7	
	cacgccgctg gagaagtgca cgtcgatg	28
<210>	8	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	SM224Y_F	
<400>	8	
	catcgacgtg cactactcca gggcgtg	28
<210>	9	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	SM224Y_R	
<400>	9	
[0005]		
	cacgccgctg gagtagtgca cgtcgatg	28

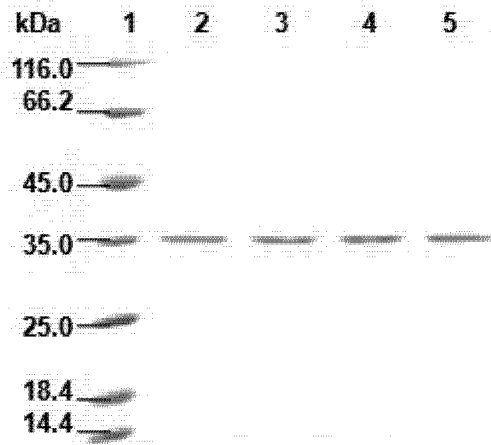


图 1

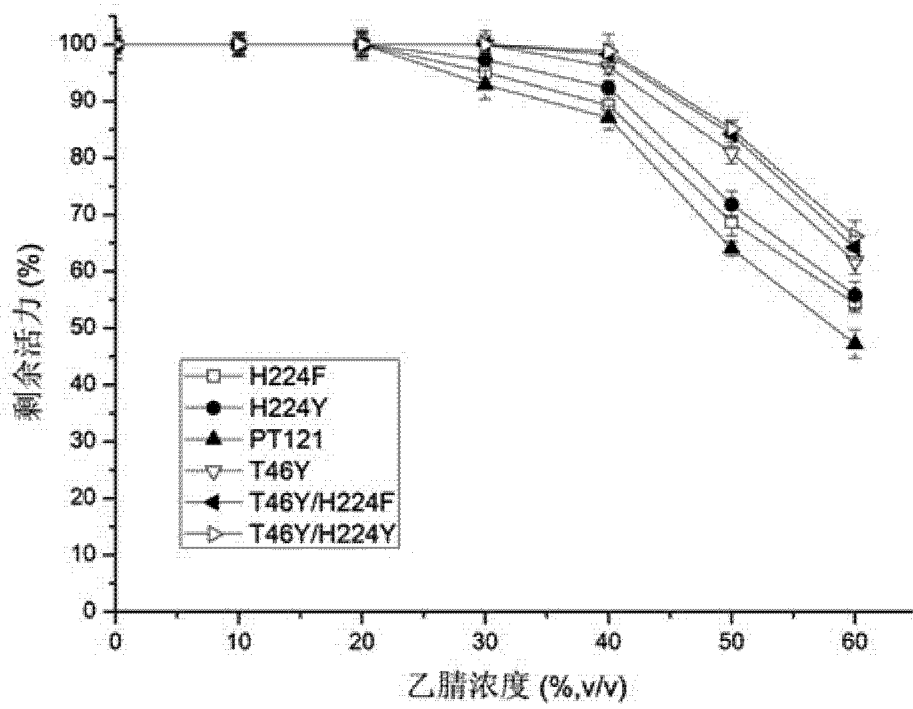


图 2

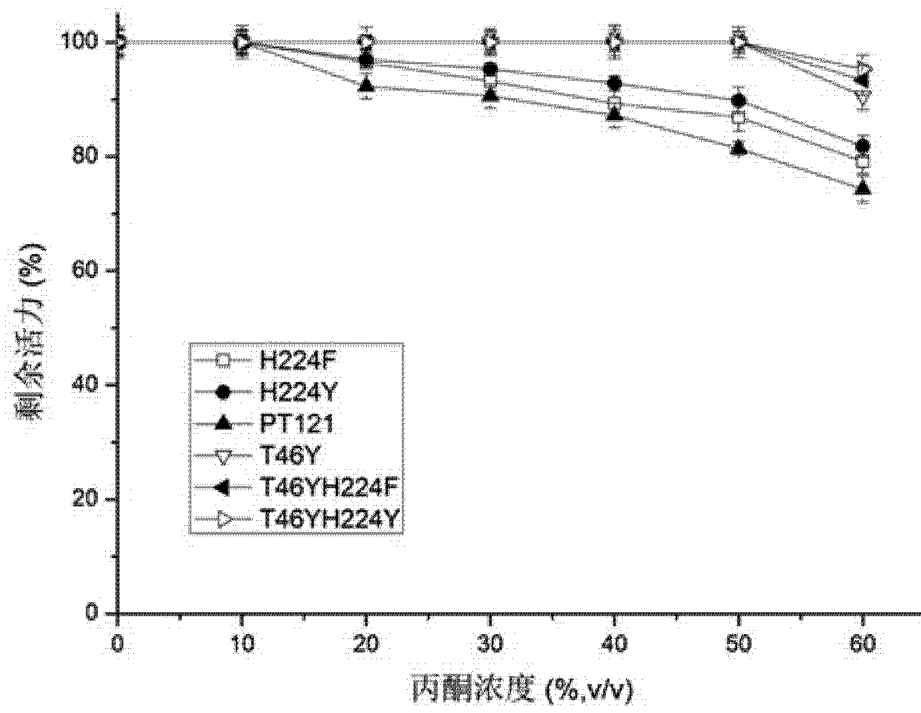


图 3