



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101802194 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 12

(21) 申请号 200880101252. 6

C12N 15/52(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 06. 06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/933, 307 2007. 06. 06 US

60/933, 312 2007. 06. 06 US

60/933, 331 2007. 06. 06 US

EP 0945502 A1, 1999. 09. 29, 权利要求书.

EP 0995801 A1, 2000. 04. 26, 权利要求书及
实施例 13.

WO 2005/005654 A1, 2005. 01. 20, 全文.

R. Gupta • Q. K. Beg • P. Lorenz. Bacterial
alkaline proteases: molecular approaches
and industrial applications. 《Appl Microbiol
Biotechnol》. 2002, 15-32.

Alan j. Russell & Alan R. Fersht. Rational
modification of enzyme catalysis by
engineering surface charge. 《Nature》. 1987,
第 328 卷 496 — 500.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2010. 01. 29

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/US2008/007113 2008. 06. 06

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02008/153934 EN 2008. 12. 18

(73) 专利权人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

审查员 曲凯

(72) 发明人 W • 埃赫勒 L • G • 卡斯考 - 佩雷拉

J • T • 小凯利斯 A • 肖

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

C12N 15/01(2006. 01)

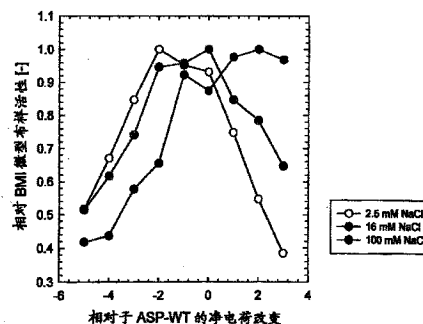
权利要求书2页 说明书63页 附图17页

(54) 发明名称

用于改良蛋白质性能的方法

(57) 摘要

本发明提供用于改造蛋白质以优化其在某些目的环境条件下的性能的方法。在某些实施方案中, 本发明提供用于改造酶以优化其在特定环境条件下的催化活性的方法。在某些优选实施方案中, 本发明提供用于改变酶(例如, 金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶)的净表面电荷和/或表面电荷分布的方法, 以获得与起始或亲本酶比较在洗涤剂制剂中显示改良性能的酶变体。



1. 用于产生与亲本蛋白质比较具有改良性能的至少一种蛋白质变体的方法,其包括:

- (a) 产生亲本蛋白的电荷梯变体;
- (b) 在至少一种目的测验中评价每个电荷梯变体与亲本蛋白的性能;
- (c) 针对目的性能,确定该蛋白质的最佳电荷范围;和
- (d) 修饰所述亲本蛋白质中一个或多个位置处的至少一个氨基酸残基,以产生与亲本蛋白质比较,具有更多正电荷或更多负电荷的至少一种蛋白质变体,使该蛋白质变体具有在最佳电荷范围中的电荷,

其中与所述亲本蛋白质比较,所述至少一种蛋白质变体在至少一种所述目的测验中显示改良的性能。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述修饰包括置换、添加和 / 或缺失至少一个氨基酸。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述修饰包括化学修饰。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述蛋白质是酶。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述酶是蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、聚酯酶、酯酶、脂肪酶、角质酶、果胶酶、氧化酶、转移酶、alkalase 或过氧化氢酶。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述蛋白酶是丝氨酸蛋白酶或中性金属蛋白酶。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述至少一种目的测验包括测量底物结合、酶抑制、表达水平、洗涤剂稳定性、热稳定性、反应速率、反应程度、热活性、淀粉液化、酯水解、酶促漂白、洗涤性能、生物质降解、溶解性、螯合剂稳定性、纺织品变性、和 / 或糖化。

8. 用于产生与亲本酶比较具有改良的洗涤性能的至少一种酶变体的方法,其包括:

- (a) 产生亲本蛋白的电荷梯变体;
- (b) 评价每个电荷梯变体与亲本蛋白的洗涤性能;
- (c) 针对洗涤性能,确定该酶的最佳电荷范围;和

(d) 修饰所述亲本酶中的一个或多个位置处的至少一个氨基酸残基,以产生与亲本酶比较,具有更多正电荷或更多负电荷的至少一种酶变体,使该酶变体具有在该最佳电荷范围内的电荷,其中该至少一种酶变体具有比亲本酶改良的洗涤性能。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述修饰包括置换、添加和 / 或缺失至少一个氨基酸。

10. 权利要求 8 的方法,其中所述修饰包括化学修饰。

11. 权利要求 8 的方法,其进一步包括:测试所述酶变体和所述亲本酶的洗涤性能,以提供所述酶变体和所述亲本酶的性能指数。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述酶变体的所述性能指数具有大于 1.0 的值,所述亲本酶的所述洗涤性能具有 1.0 的性能指数。

13. 权利要求 8 的方法,其进一步包括:产生具有改良的洗涤性能的变体酶。

14. 权利要求 8 的方法,其中所述酶是蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、聚酯酶、酯酶、脂肪酶、角质酶、果胶酶、氧化酶、转移酶、alkalase 或过氧化氢酶。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述蛋白酶是丝氨酸蛋白酶或中性金属蛋白酶。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述蛋白酶是芽孢杆菌蛋白酶。

17. 权利要求 11 的方法,其中所述洗涤性能在具有 5-12.0 的 pH 的粉末或液体洗涤剂组合中进行测试。

18. 权利要求 11 的方法,其中所述洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试。

试。

19. 权利要求 11 的方法,其中所述洗涤性能在包含碱性 pH 的冷水液体洗涤剂中进行测试。

20. 权利要求 8 的方法,其中所述亲本酶中一个或多个位置具有大于约 25% 的溶剂可及表面 (SAS)。

21. 权利要求 8 的方法,其中所述亲本酶中一个或多个位置具有大于约 50% 或大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS)。

22. 权利要求 8 的方法,其中至少一个酸性氨基酸残基用至少一个碱性氨基酸残基置换。

23. 权利要求 8 的方法,其中至少一个酸性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换。

24. 权利要求 8 的方法,其中至少一个中性氨基酸残基用至少一个碱性氨基酸残基置换。

25. 权利要求 8 的方法,其中至少一个碱性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换。

26. 权利要求 8 的方法,其中至少一个碱性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换。

27. 权利要求 8 的方法,其中至少一个中性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换。

28. 权利要求 1 的方法,其中所述一个或多个位置在包含所述亲本蛋白质和至少一种另外的蛋白质的同源蛋白质序列的氨基酸比对中不是保守的。

29. 权利要求 1 的方法,其中相对于亲本蛋白质,所述蛋白质变体具有 +1 或 +2 的净电荷改变。

30. 权利要求 1 的方法,其中相对于亲本蛋白质,所述蛋白质变体具有 -1 或 -2 的净电荷改变。

31. 权利要求 1 的方法,其中所述亲本酶中一个或多个位置具有大于约 50% 的溶剂可及表面 (SAS)。

32. 权利要求 1 的方法,其中所述亲本酶中一个或多个位置具有大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS)。

用于改良蛋白质性能的方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2007 年 6 月 6 日提交的美国临时专利申请序列号 60/933, 307、60/933, 331 和 60/933, 312 的优先权, 所述美国临时专利申请在此整体引入作为参考。

发明领域

[0003] 本发明提供了用于改造蛋白质以优化其在某些目的环境条件下的性能的方法。在某些实施方案中, 本发明提供了用于改造酶以优化其在特定环境条件下的催化活性的方法。在某些优选实施方案中, 本发明提供了用于改变酶 (例如, 金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶) 的净表面电荷和 / 或表面电荷分布的方法, 以获得与起始或亲本酶比较在洗涤剂制剂中表现出改良性能的酶变体。

[0004] 发明背景

[0005] 蛋白质在其天然环境外工作时, 性质通常是次佳的。例如, 酶 (例如, 蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶等) 通常用于衣物洗涤剂中清洁织物上的污渍, 所述衣物洗涤剂一般包括活性成分的复杂组合。事实上, 大多数清洁用品包括表面活性剂系统、漂白剂、助洗剂、抑泡剂、污垢悬浮剂、污垢释放剂、荧光增白剂、软化剂、分散剂、染料转移抑制化合物、磨料、杀菌剂和香料, 以及用于清洁的酶。因此, 尽管目前洗涤剂的复杂性, 但仍存在难以完全去除的许多污渍, 部分原因就在于亚最佳的酶性能。尽管有许多酶开发研究, 但本领域仍需要改造蛋白质以用于特定用途和条件的方法。事实上, 本领域仍需要快速且系统地修改蛋白质的静电性质以优化其在商业应用中的性能的方法。特别地, 本领域仍需要改造在工业上有用的酶的方法, 所述酶包括但不限于脂肪酶、淀粉酶、角质酶、甘露聚糖酶、氧化还原酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和其他酶, 以便在清洁溶液中提供改良的活性、稳定性和溶解性。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供用于改造蛋白质以优化其在某些目的环境条件下的性能的方法。在某些实施方案中, 本发明提供用于改造酶以优化其在特定环境条件下的催化活性的方法。在某些优选实施方案中, 本发明提供用于改变酶 (例如, 金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶) 的净表面电荷和 / 或表面电荷分布、以获得与起始或亲本酶比较在洗涤剂制剂中显示改良性能的酶变体的方法。

[0008] 在某些实施方案中, 本发明提供用于在蛋白质, 特别是酶中进行电荷置换的方法。在某些优选实施方案中, 本发明提供产生具有改良的洗涤性能的酶的方法。本发明可以用于改造各种酶以及其他蛋白质。特别地, 本发明可以用于开发改良的工业有用酶, 所述工业包括但不限于清洁 (例如, 衣物、餐具、硬表面等)。然而, 本发明不旨在局限于任何具体酶或蛋白质。

[0009] 本发明提供用于产生与亲本中性金属蛋白酶比较, 具有改良的洗涤性能的中性金属蛋白酶变体的方法, 其包括: 置换亲本中性金属蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基, 以产生与亲本比较具有更多正电荷或更多负电荷的中性金属蛋白酶变体。在某些特别

优选的实施方案中,该方法进一步包括通过比较亲本和变体去除污渍的能力,测试变体的洗涤性能,其中亲本的洗涤性能被定为值 1.0,具有改良的洗涤性能的变体达到大于 1.0 的值。在进一步的实施方案中,本发明提供用于产生具有改良的洗涤性能的变体的方法。在某些实施方案中,亲本中性金属蛋白酶是野生型成熟形式的中性金属蛋白酶。在某些其他实施方案中,变体衍生自芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 中性金属蛋白酶。在某些优选实施方案中,变体衍生自芽孢杆菌属 (Bacillus) 中性金属蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中,洗涤性能在具有 6.5-12.0pH 的粉末或液体洗涤剂组合物中进行测试。在某些优选实施方案中,洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试。在某些备选优选实施方案中,亲本中性金属蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 50% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些另外的优选实施方案中,亲本中性金属蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。

[0010] 本发明还提供用于产生与亲本中性金属蛋白酶比较,具有改良的洗涤性能的中性金属蛋白酶变体的方法,其包括:置换亲本中性金属蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基,以产生与亲本比较具有更多正电荷或较少负电荷的中性金属蛋白酶变体;和置换亲本中性金属蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基,以产生与亲本比较具有更多负电荷或较少正电荷的中性金属蛋白酶变体。在某些特别优选的实施方案中,该方法进一步包括通过比较亲本和变体去除污渍的能力,测试变体的洗涤性能,其中亲本的洗涤性能被定为值 1.0,具有改良的洗涤性能的变体达到大于 1.0 的值。在再其它实施方案中,该方法包括产生具有改良的洗涤性能的变体。这些步骤旨在以任何合适的顺序进行。在某些实施方案中,亲本中性金属蛋白酶是野生型成熟形式的中性金属蛋白酶。在某些其他实施方案中,变体衍生自芽孢杆菌科中性金属蛋白酶。在某些优选实施方案中,变体衍生自芽孢杆菌属中性金属蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中,洗涤性能在具有 6.5-12.0pH 的粉末或液体洗涤剂组合物中进行测试。在某些优选实施方案中,洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试。在某些备选优选实施方案中,亲本中性金属蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 50% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些另外的优选实施方案中,亲本中性金属蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些优选实施方案中,至少一个酸性氨基酸残基用至少一个碱性氨基酸残基置换,而在其他实施方案中,至少一个酸性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,并且在某些另外的实施方案中,至少一个中性氨基酸残基用碱性氨基酸残基置换。在某些实施方案中,提供各种置换组合。在另外的实施方案中,至少一个碱性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换,而在其他实施方案中,至少一个碱性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,并且在再其它实施方案中,至少一个中性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换。在其他另外的实施方案中,亲本中性金属蛋白酶中的至少一个中性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,以产生与亲本比较具有相同电荷的中性金属蛋白酶变体。本发明不旨在局限于任何具体的置换组合。所述置换也不旨在以任何特定顺序执行。

[0011] 本发明提供用于产生与亲本丝氨酸蛋白酶比较,具有改良的洗涤性能的丝氨酸蛋白酶变体的方法,其包括:置换亲本丝氨酸蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基,以产生与亲本比较具有更多正电荷或更多负电荷的丝氨酸蛋白酶变体。在某些特别优选的实施方案中,该方法进一步包括通过比较亲本和变体去除污渍的能力,测试变体的洗涤性能,其

中亲本的洗涤性能被定为值 1.0, 具有改良的洗涤性能的变体达到大于 1.0 的值。在进一步的实施方案中, 本发明提供用于产生具有改良的洗涤性能的变体的方法。在某些实施方案中, 亲本丝氨酸蛋白酶是野生型成熟形式的丝氨酸蛋白酶。在某些其他实施方案中, 变体衍生自芽孢杆菌科丝氨酸蛋白酶。在某些优选实施方案中, 变体衍生自芽孢杆菌属丝氨酸蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中, 洗涤性能在具有 6.5-12.0pH 的粉末或液体洗涤剂组合物中进行测试。在某些优选实施方案中, 洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试。在某些备选优选实施方案中, 亲本丝氨酸蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 50% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些另外的优选实施方案中, 亲本丝氨酸蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。

[0012] 本发明还提供用于产生与亲本丝氨酸蛋白酶比较, 具有改良的洗涤性能的丝氨酸蛋白酶变体的方法, 其包括: 置换亲本丝氨酸蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基, 以产生与亲本比较具有更多正电荷或较少负电荷的丝氨酸蛋白酶变体; 和置换亲本丝氨酸蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基, 以产生与亲本比较具有更多负电荷或较少正电荷的丝氨酸蛋白酶变体。在某些特别优选的实施方案中, 该方法进一步包括通过比较亲本和变体去除污渍的能力, 测试变体的洗涤性能, 其中亲本的洗涤性能被定为值 1.0, 具有改良的洗涤性能的变体达到大于 1.0 的值。在再进一步的实施方案中, 该方法包括产生具有改良的洗涤性能的变体。所述步骤旨在以任何合适的顺序进行。在某些实施方案中, 亲本丝氨酸蛋白酶是野生型成熟形式的丝氨酸蛋白酶。在某些其他实施方案中, 变体衍生自微球菌亚目 (Micrococccineae) 丝氨酸蛋白酶。在某些优选实施方案中, 变体衍生自纤维单胞菌属 (Cellulomonas) 丝氨酸蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中, 洗涤性能在具有 6.5-12.0pH 的粉末或液体洗涤剂组合物中进行测试。在某些优选实施方案中, 洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试。在某些备选优选实施方案中, 亲本丝氨酸蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 50% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些另外的优选实施方案中, 亲本丝氨酸蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些优选实施方案中, 至少一个酸性氨基酸残基用至少一个碱性氨基酸残基置换, 而在其他实施方案中, 至少一个酸性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换, 并且在某些另外的实施方案中, 至少一个中性氨基酸残基用碱性氨基酸残基置换。在某些实施方案中, 提供各种置换组合。在另外的实施方案中, 至少一个碱性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换, 而在其他实施方案中, 至少一个碱性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换, 并且在再其它实施方案中, 至少一个中性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换。在其他另外的实施方案中, 亲本丝氨酸蛋白酶中的至少一个中性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换, 以产生与亲本比较具有相同电荷的丝氨酸蛋白酶变体。本发明不旨在局限于任何具体的置换组合。这些置换也不旨在以任何特定的顺序执行。

[0013] 本发明还提供用于产生与亲本丝氨酸蛋白酶比较, 具有改良的洗涤性能的丝氨酸蛋白酶变体的方法, 其包括: 置换亲本丝氨酸蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基, 以产生与亲本比较具有更多正电荷或较少负电荷的丝氨酸蛋白酶变体; 置换亲本丝氨酸蛋白酶中一个或多个位置处的氨基酸残基, 以产生与亲本比较具有更多负电荷或较少正电荷的丝氨酸蛋白酶变体; 和获得通过这些步骤产生的丝氨酸蛋白酶变体。在另外的实施方案中,

该方法包括通过比较亲本和变体去除污渍的能力,测试变体的洗涤性能,其中亲本的洗涤性能被定为值 1.0,具有改良的洗涤性能的变体达到大于 1.0 的值。在进一步的实施方案中,该方法包括产生具有改良的洗涤性能的变体。所述步骤旨在以任何合适的顺序进行。在某些实施方案中,亲本丝氨酸蛋白酶是野生型成熟形式的丝氨酸蛋白酶。在某些其他实施方案中,变体衍生自微球菌亚目丝氨酸蛋白酶。在某些优选实施方案中,变体衍生自纤维单胞菌属丝氨酸蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中,洗涤性能在具有 6.5-12.0pH 的粉末或液体洗涤剂组合物中进行测试。在某些优选实施方案中,洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试。在某些备选优选实施方案中,亲本丝氨酸蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 50% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些另外的优选实施方案中,亲本丝氨酸蛋白酶中的一个或多个位置是具有大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置。在某些优选实施方案中,至少一个酸性氨基酸残基用至少一个碱性氨基酸残基置换,而在其他实施方案中,至少一个酸性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,并且在某些另外的实施方案中,至少一个中性氨基酸残基用碱性氨基酸残基置换。在某些实施方案中,提供各种置换组合。在另外的实施方案中,至少一个碱性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换,而在其他实施方案中,至少一个碱性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,并且在再其它实施方案中,至少一个中性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换。在其他另外的实施方案中,亲本丝氨酸蛋白酶中的至少一个中性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,以产生与亲本比较具有相同电荷的丝氨酸蛋白酶变体。本发明不旨在局限于任何具体的置换组合。这些置换也不旨在以任何特定的顺序执行。

[0014] 本发明提供用于产生与亲本蛋白质比较,具有改良的洗涤性能的至少一种蛋白质变体的方法,其包括修饰亲本蛋白质中一个或多个位置处的至少一个氨基酸残基,以产生与亲本蛋白质比较,具有更多正电荷、更多负电荷、更少正电荷或更少负电荷的至少一种蛋白质变体。在某些实施方案中,所述修饰包括置换、添加和 / 或缺失,而在其他实施方案中,修饰包括化学修饰。在某些实施方案中,蛋白质是酶。在某些特别优选的实施方案中,酶是蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、聚酯酶、酯酶、脂肪酶、角质酶、果胶酶、氧化酶、转移酶、alkalase 或过氧化氢酶。在某些进一步特别优选的实施方案中,蛋白酶是丝氨酸蛋白酶或中性金属蛋白酶。在某些另外的实施方案中,使用至少一种目的测验,评估至少一种蛋白质变体的性能。在某些进一步的实施方案中,所述至少一种目的测验包括测量底物结合、酶抑制、表达水平、洗涤剂稳定性、热稳定性、反应速率、反应进度 (extent of reaction)、热活性、淀粉液化、酯水解、酶促漂白、洗涤性能、生物质降解、溶解性、螯合剂稳定性和 / 或糖化。在某些其他另外的实施方案中,与亲本蛋白质比较,至少一种蛋白质变体在至少一种目的测验中显示改良的性能。

[0015] 本发明还提供用于产生与亲本酶比较,具有改良的洗涤性能的至少一种酶变体的方法,其包括修饰亲本酶中一个或多个位置处的至少一个氨基酸残基,以产生与亲本酶比较,具有更多正电荷、更多负电荷、更少正电荷或更少负电荷的至少一种酶变体。在某些实施方案中,修饰包括置换、添加和 / 或缺失,而在备选实施方案中,修饰包括化学修饰。在某些另外的实施方案中,该方法进一步包括测试酶变体和亲本酶的洗涤性能,以提供关于酶变体和亲本酶的性能指数。在某些实施方案中,酶变体的性能指数具有大于 1.0 的值,而亲本酶的洗涤性能具有 1.0 的性能指数。在某些特别优选的实施方案中,该方法进一步包括

产生具有改良的洗涤性能的变体酶。在某些另外的实施方案中,酶是蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、聚酯酶、酯酶、脂肪酶、角质酶、果胶酶、氧化酶、转移酶、alkalase 或过氧化氢酶。在某些优选实施方案中,蛋白酶是丝氨酸蛋白酶或中性金属蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中,蛋白酶是芽孢杆菌属蛋白酶。在某些再进一步的实施方案中,洗涤性能在具有 5-12.0 的 pH 的粉末或液体洗涤剂组合物中进行测试。在某些实施方案中,洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试,而在某些其他实施方案中,洗涤性能在包含碱性 pH 的冷水液体洗涤剂中进行测试。在某些实施方案中,置换发生在亲本酶中具有大于约 25% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置中。在某些进一步的实施方案中,置换发生在亲本酶中具有大于约 50% 或大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置中。

[0016] 本发明还提供用于产生与亲本酶比较,具有改良的洗涤性能的酶变体的方法,其包括:a) 修饰亲本酶中一个或多个位置处的至少一个氨基酸残基,以产生与亲本酶比较,具有更多正电荷、更多负电荷、更少正电荷或更少负电荷的第一酶变体;和 b) 修饰亲本酶中一个或多个位置处的至少一个氨基酸残基,以产生与亲本酶比较,具有更多正电荷、更多负电荷、更少正电荷或更少负电荷的第二酶变体。在某些实施方案中,修饰包括置换、添加和/或缺失,而在其他实施方案中,修饰包括化学修饰。在某些另外的实施方案中,重复这些步骤以产生多种酶变体。在某些进一步的实施方案中,亲本酶是蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、聚酯酶、酯酶、脂肪酶、角质酶、果胶酶、氧化酶、转移酶、alkalase 或过氧化氢酶。在某些优选实施方案中,蛋白酶是中性金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中,亲本酶是芽孢杆菌属蛋白酶。在某些进一步的实施方案中,该方法进一步包括测试变体酶和亲本酶的洗涤性能,并且在该洗涤性能测验中比较亲本和变体酶去除污渍的能力,其中亲本酶的洗涤性能被定为值 1.0,具有改良的洗涤性能的变体酶达到大于 1.0 的值。在某些实施方案中,该方法进一步包括产生与亲本酶比较具有改良的洗涤性能的酶变体。在某些优选实施方案中,亲本酶是丝氨酸蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中,丝氨酸蛋白酶是芽孢杆菌属丝氨酸蛋白酶或纤维单胞菌属丝氨酸蛋白酶。在某些进一步的实施方案中,洗涤性能在具有 5-12.0 的 pH 的粉末或液体洗涤剂组合物中进行测试。在某些另外的实施方案中,洗涤性能在具有碱性 pH 的液体衣物洗涤剂中进行测试。在再进一步的实施方案中,洗涤性能在包含碱性 pH 的冷水液体洗涤剂中进行测试。在某些备选实施方案中,置换发生在亲本酶中具有大于约 25% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置中,而在某些其他实施方案中,置换发生在亲本酶中具有大于约 50% 或大于约 65% 的溶剂可及表面 (SAS) 的位置中。在某些实施方案中,至少一个酸性氨基酸残基用至少一个碱性氨基酸残基置换,而在其他实施方案中,至少一个酸性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,至少一个中性氨基酸残基用至少一个碱性氨基酸残基置换,至少一个碱性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换,至少一个碱性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换,至少一个中性氨基酸残基用至少一个酸性氨基酸残基置换,和/或亲本酶中的至少一个中性氨基酸残基用至少一个中性氨基酸残基置换以产生与亲本酶比较具有相同电荷的酶变体。本发明旨在按需使用任何合适的置换组合。

[0017] 本发明还提供用于产生与亲本蛋白质比较,具有改良的洗涤性能的至少一种蛋白质变体的方法,其包括修饰亲本蛋白质中一个或多个位置处的至少一个氨基酸残基,以产生与亲本蛋白质比较,具有更多正电荷、更多负电荷、更少正电荷或更少负电荷的至少一种

蛋白质变体,并且其中该一个或多个位置具有大于约 25%的溶剂可及表面(SAS)。在某些实施方案中,一个或多个位置在包含亲本蛋白质和至少一种另外蛋白质的同源蛋白质序列氨基酸比对中是非保守的。在某些优选实施方案中,亲本蛋白质是酶。在某些特别优选的实施方案中,酶是蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、聚酯酶、酯酶、脂肪酶、角质酶、果胶酶、氧化酶、转移酶、alkalase 或过氧化氢酶。在某些进一步的实施方案中,改良的性能包括选自下述的一种或多种性能的增加:底物结合、酶抑制、表达、洗涤剂中的稳定性、热稳定性、反应速率、反应进度、热活性、淀粉液化、生物质降解、糖化、酯水解、酶促漂白、洗涤性能、溶解性、螯合剂稳定性和/或纺织品变性(textilemodification)。在某些另外的实施方案中,修饰包括置换、添加和/或缺失,而在其他实施方案中,修饰包括化学修饰。在某些实施方案中,至少一个置换包含,相对于亲本蛋白质,0、-1 或 -2 的净电荷改变,而在其他实施方案中,至少一个置换包含,相对于亲本蛋白质,+1 或 +2 的净电荷改变。在某些进一步的实施方案中,亲本蛋白质中的至少一个置换包含 0、-1 或 -2 的电荷改变,并且其中亲本蛋白质中的至少一个另外置换包含,相对于亲本蛋白质,+1 或 +2 的电荷改变。在某些备选实施方案中,相对于亲本蛋白质,蛋白质变体具有 +1 或 +2 的净电荷改变,而在其他实施方案中,相对于亲本蛋白质,蛋白质变体具有 0、-1 或 -2 的净电荷改变。在某些另外的实施方案中,置换发生在亲本酶中具有大于约 50%或大于约 65%的溶剂可及表面(SAS)的位置中。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1A 描述了在 AATCC 液体洗涤剂(实心三角)以及匹配 pH 和传导性的缓冲液(空心三角)(5mM HEPES pH8.0, 2.5mM NaCl)中测量的,随着相对于野生型 ASP 的净电荷改变,ASP 变体的血液、乳、墨(BMI)微型布样(microswatch)相对活性(基于最佳性能者进行标准化后)。相似地,图 1B 描述了随着相对于野生型的电荷改变,ASP 组合电荷文库(CCL)的 BMI 微型布样相对活性。

[0020] 图 2 描述了在具有各种 NaCl 浓度——2.5mM(空心圆圈)、16mM(灰色圆圈)和 100mM(黑色圆圈)——的 5mM HEPES pH8.0 中测量的,随着相对于野生型 ASP 的电荷改变,ASP 变体的相对 BMI 微型布样活性(基于最佳性能者进行标准化后)。

[0021] 图 3A 描述了随着电荷改变,FNA CCL 在北美衣物洗涤剂中的 BMI 清洁性能。相似地,图 3B 描述了随着电荷改变,GG36 CCL 在北美衣物洗涤剂中的 BMI 清洁性能。

[0022] 图 4A 描述了随着电荷改变,FNA CCL 在西欧液体衣物洗涤剂中的 BMI 清洁性能。相似地,图 4B 描述了随着电荷改变,GG36 CCL 在西欧液体衣物洗涤剂中的 BMI 清洁性能。

[0023] 图 5A 描述了随着电荷改变,FNA CCL 在日本粉末衣物洗涤剂中的 BMI 清洁性能。相似地,图 5B 描述了随着电荷改变,GG36 CCL 在日本粉末衣物洗涤剂中的 BMI 清洁性能。

[0024] 图 6A 描述了随着电荷改变,FNA CCL 在自动餐具洗涤的洗涤剂中的烤蛋黄清洁性能。相似地,图 6B 描述了随着电荷改变,GG36 CCL 在自动餐具洗涤的洗涤剂中的烤蛋黄清洁性能。

[0025] 图 7A 描述了随着电荷改变,AmyS-S242Q CCL 在 BODIPY 淀粉上的比酶活性。类似地,图 7B 针对与亲本 AmyS 酶相比跨越 -12 至 +4 的电荷改变梯度的 AmyS 表面电荷变体,描述了玉米淀粉液化后的粘度。

[0026] 图 8 描述了随着相对于野生型 ASP 的净电荷改变,ASP 变体在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的表达水平。

[0027] 图 9 描述了随着相对于亲本 FNA 的净电荷改变, FNA 变体的 LAS/EDTA 稳定性。

[0028] 图 10 描述了随着相对于野生型 ASP 的净电荷改变, ASP 变体的热稳定性。

[0029] 图 11 描述了随着相对于野生型 AmyS 的电荷改变, 第一 AmyS 电荷梯的热稳定性。

[0030] 图 12 提供随着 pH 的改变, 第一 AmyS 电荷梯的稻淀粉清洁活性。pH3.0-4.25 是 200mM 甲酸钠 +0.01% Tween-80。pH4.25-5.5 是 200mM 乙酸钠 +0.01% Tween-80。数据拟合滴定曲线, 各自具有单个 pKa 值。

[0031] 图 13 提供依据相对于野生型 AmyS 的电荷改变绘制的在图 12 中测定的 pKa 值。

[0032] 发明概述

[0033] 本发明提供用于改造蛋白质以优化其在某些目的环境条件下的性能的方法。在某些实施方案中, 本发明提供用于改造酶以优化其在特定环境条件下的催化活性的方法。在某些优选实施方案中, 本发明提供用于改变酶(例如, 金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶)的净表面电荷和/或表面电荷分布的方法, 以获得与起始或亲本酶比较在洗涤剂制剂中显示改良性能的酶变体。

[0034] 蛋白酶枯草杆菌蛋白酶是在衣物洗涤剂中使用的主要酶, 并且可能是全世界最广泛使用的酶。大约 20 年前, 注意到表面静电效应可能调节枯草杆菌蛋白酶的催化活性(参见例如, Russell 和 Fersht, Nature 328:496-500[1987])。较为近来, 观察到涉及改变枯草杆菌蛋白酶的净电荷的突变显著影响在洗涤剂中的洗涤性能(参见例如, 引入本文作为参考的 EP 专利号 0479870B1)。这个有利效应被认为是使枯草杆菌蛋白酶 pI(等电点)朝向洗涤液的 pH 迁移的结果。然而, 随后的工作证实这个结论并非总是适用(参见例如, 引入本文作为参考的美国专利号 6,673,590B1)。如本专利中指出的, 枯草杆菌蛋白酶中电荷突变的效应显著地依赖于洗涤剂浓度, 其中降低亲本枯草杆菌蛋白酶的 pI 的突变提供在低洗涤剂浓度下更有效的酶, 而提高 pI 的突变提供在高洗涤剂浓度下更有效的酶。这具有极大用途, 因为洗涤液中的洗涤剂浓度在全世界范围内变化极大。因此, 对于本领域技术人员已经显而易见的是, 对于枯草杆菌蛋白酶的洗涤性能, 存在依赖于洗涤液中的 pH 和洗涤剂浓度的最适 pI。改善枯草杆菌蛋白酶在衣物洗涤剂中的活性的其它努力已经描述(参见美国专利公开号 2005/0221461)。令人惊讶的是, 发现具有与亲本枯草杆菌蛋白酶相同的净静电电荷的枯草杆菌蛋白酶变体在高和低洗涤剂浓度的洗涤条件下均具有增加的洗涤性能。

[0035] 除非另有说明, 本发明的实践涉及属于本领域技术人员能力范围内的、蛋白质工程、分子生物学、微生物学和重组 DNA 中常用的常规技术。此类技术是本领域技术人员已知的, 并且在本领域技术人员众所周知的众多教科书和参考文献中描述。本文中, 上文和下文, 提及的所有专利、专利申请、论文和出版物特此明确地引入此处作为参考。

[0036] 除非本文另有定义, 本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。尽管本文描述了优选方法和材料, 但与本文描述的那些相似或等价的任何方法和材料也均可以用于本发明的实践。因此, 紧在下文定义的术语将通过参考说明书整体得到更充分的描述。

[0037] 此外, 如本文所使用的, 除非上下文另有明确说明, 单数“a”、“an”和“the”包括对复数的提及。除非另有说明, 分别地, 核酸以 5' 至 3' 方向从左往右书写; 氨基酸序列以氨基至羧基方向从左往右书写。应当理解本发明并不限于所描述的具体方法、方案和试剂, 因为这些可以由本领域技术人员根据它们所使用的环境而加以改变。

[0038] 在整个本说明书中每个最大数值限制均旨在包括每个较低的数值限制,就好像这些较低数值限制已经在本文中明确进行过陈述一样。在整个本说明书中每个最小数值限制均旨在包括每个较高的数值限制,就好像这些较高的数值限制已经在本文中明确进行过陈述一样。在整个本说明书中每个数值范围都将包括落入此较宽数值范围内的每一个较窄数值范围,就好像这些较窄的数值范围均已经在本文中明确进行过陈述一样。

[0039] 此外,本文提供的标题并不构成对本发明的各个方面或实施方案的限制,本发明的各个方面或实施方案可以通过参考说明书整体而获得。因此,紧在下文限定的术语将通过参考说明书整体作更充分的定义。然而,为了利于本发明的理解,下文定义了多个术语。

[0040] 定义

[0041] 如本文所使用的,术语“蛋白酶”和“蛋白水解活性”指显示水解肽或具有肽键的底物的能力的蛋白质或肽。存在用于测量蛋白水解活性的许多众所周知的方法(参见例如, Kalisz, " Microbial Proteinases, " In :Fiechter(编辑), Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, [1988])。例如,蛋白水解活性可以通过比较测定法进行确定,所述比较测定法分析相应蛋白酶水解商业底物的能力。在蛋白酶或蛋白水解活性的此种分析中有用的示例性底物包括但不限于二甲基酪蛋白(Sigma C-9801)、牛胶原蛋白(Sigma C-9879)、牛弹性蛋白(Sigma E-1625)和牛角蛋白(ICNBiomedical 902111)。利用这些底物的比色测定法是本领域众所周知的(参见例如 WO 99/34011;和美国专利号 6,376,450,都引入本文作为参考)。pNA 测定法(参见例如,De1 Mar 等人,Anal Biochem, 99:316-320[1979])也可以用于测定梯度洗脱过程中收集的级分的活性酶浓度。这个测定法测量随着酶水解可溶性合成底物——琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺(sAAPF-pNA),对硝基苯胺的释放速度。自水解反应产生黄色的速率在分光光度计上在 410nm 处进行测量,其与活性酶浓度成比例。此外,在 280nm 处的吸光度测量可以用于测定总蛋白浓度。活性酶/总蛋白质的比值给出酶纯度。

[0042] 如本文所使用的,术语“ASP 蛋白酶”、“Asp 蛋白酶”和“Asp”指在本文和美国专利申请序列号 10/576,331(引入本文作为参考)中描述的丝氨酸蛋白酶。在某些优选实施方案中,Asp 蛋白酶是本文中称为 69B4 蛋白酶的获自纤维单胞菌属菌株 69B4 的蛋白酶。因此,在优选实施方案中,术语“69B4 蛋白酶”指源自纤维单胞菌属菌株 69B4(DSM 16035)的天然成熟蛋白酶,具有与 SEQ ID NO:8 中提供的基本上相同的氨基酸序列。在备选实施方案中,本发明提供 ASP 蛋白酶的部分。

[0043] 术语“纤维单胞菌属蛋白酶同源物”指与源自纤维单胞菌属菌株 69B4 的成熟蛋白酶具有基本上相同的氨基酸序列的天然蛋白酶,或指编码此种天然蛋白酶的多核苷酸序列,其中所述蛋白酶保持由此类核酸编码的丝氨酸蛋白酶的功能特征。在某些实施方案中,这些蛋白酶同源物称为“cellulomonadins”。

[0044] 如本文所使用的,术语“ASP 变体”、“ASP 蛋白酶变体”和“69B 蛋白酶变体”用于指这样的蛋白酶,其与野生型 ASP 相似,特别是在功能上相似,但在其氨基酸序列中具有使其与野生型蛋白酶存在序列差异的突变。

[0045] 如本文所使用的,“纤维单胞菌属物种”指在“纤维单胞菌属”内的所有物种,其是分类为放线菌纲(Actinobacteria)放线菌目(Actinomycetales)微球菌亚目(Micrococccineae)纤维单胞菌科(Cellulomonadaceae)的成员的革兰氏阳性菌。应认识到

纤维单胞菌属持续经历分类学重组。因此,该属旨在包括已重分类的物种。

[0046] 如本文所使用的,“链霉菌属物种 (*Streptomyces* spp.)”指在“链霉菌属”内的所有物种,其是分类为放线菌纲放线菌目链霉菌亚目 (*Streptomycineae*) 链霉菌科 (*Streptomycetaceae*) 的成员的革兰氏阳性菌。应认识到链霉菌属持续经历分类学重组。因此,该属旨在包括已重分类的物种。

[0047] 如本文所使用的,“芽孢杆菌属”包括在“芽孢杆菌属”内的所有物种,如本领域技术人员已知的,包括但不限于,枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*)、耐盐嗜碱芽孢杆菌 (*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*B. lautus*)、和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。应认识到芽孢杆菌属持续经历分类学重组。因此,该属旨在包括已重分类的物种,包括但不限于诸如现命名为“嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)”的嗜热脂肪芽孢杆菌的生物。在氧存在下产生抗性内生孢子被视为芽孢杆菌属的定义特征,尽管这个特征也应用于近期命名的脂环酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*)、兼性芽孢杆菌属 (*Amphibacillus*)、硫胺素芽孢杆菌属 (*Aneurinibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属 (*Anoxybacillus*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、*Filobacillus*、*Gracilibacillus*、嗜盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、*Salibacillus*、耐热芽孢杆菌属 (*Thermobacillus*)、脲芽孢杆菌属 (*Ureibacillus*)、和枝芽孢杆菌属 (*Virgibacillus*)。

[0048] 在本文中可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”指任何长度的聚合形式的核苷酸 (核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)。这些术语包括但不限于,单链、双链或三链 DNA,基因组 DNA, cDNA, RNA, DNA-RNA 杂合体,或包含嘌呤和嘧啶碱基、或其他天然、化学修饰、生物化学修饰、非天然或衍生的核苷酸碱基的聚合物。下述是多核苷酸的非限制性例子:基因、基因片段、染色体片段、ESTs、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支的多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离 DNA、任何序列的分离 RNA、核酸探针和引物。在某些实施方案中,多核苷酸包含经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物、尿嘧啶、其他糖和连接基团例如氟代核糖 (fluororibose) 和硫酯 (thioate)、和核苷酸分支。在备选实施方案中,核苷酸序列由非核苷酸组分中断。

[0049] 如本文所使用的,术语“DNA 构建体”和“转化 DNA”可互换使用,指用于将序列引入宿主细胞或生物内的 DNA。DNA 可以在体外通过 PCR 或本领域技术人员已知的任何其他合适的一种或多种技术产生。在特别优选的实施方案中,DNA 构建体包含目的序列 (例如,作为引入的序列 (incoming sequence))。在某些实施方案中,序列与另外的元件例如控制元件 (例如启动子等) 可操作地连接。DNA 构建体可以进一步包含选择标记。它可以进一步包含侧翼连接同源盒的引入序列。在一个进一步的实施方案中,转化 DNA 包含添加在末端的其他非同源序列 (例如,填充序列或侧翼)。在某些实施方案中,引入序列的末端是闭合的,使得转化 DNA 形成闭合环。转化序列可以是野生型、突变型或经修饰的。在某些实施方案中,DNA 构建体包含与宿主细胞染色体同源的序列。在其他实施方案中,DNA 构建体包

含非同源序列。在体外装配 DNA 构建体后,它可以用于:1) 将异源序列插入宿主细胞的期望靶序列中;和/或 2) 诱变宿主细胞染色体的区域(即,用异源序列替换内源序列),和/或 3) 缺失靶基因;和/或将复制型质粒引入宿主内。

[0050] 如本文所使用的,术语“表达盒”和“表达载体”指重组或合成产生的核酸构建体,具有允许特定核酸在靶细胞中转录的一系列专门核酸元件。重组表达盒可以掺入质粒、染色体、线粒体 DNA、质粒 DNA、病毒或核酸片段内。一般地,表达载体的重组表达盒部分包括待转录的核酸序列和启动子等序列。在优选实施方案中,表达载体具有在宿主细胞中掺入且表达异源 DNA 片段的能力。许多原核生物和真核生物表达载体是商购可得的。合适的表达载体的选择在本领域技术人员知识范围内。术语“表达盒”在本文中可与“DNA 构建体”以及它们的语法等价物互换使用。合适的表达载体的选择在本领域技术人员知识范围内。

[0051] 如本文所使用的,术语“载体”指设计用于将核酸引入一个或多个细胞类型内的多核苷酸构建体。载体包括克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、盒等。在某些实施方案中,该多核苷酸构建体包含编码蛋白酶(例如,前体或成熟蛋白酶)的 DNA 序列,其与能够实现 DNA 在合适宿主中表达的合适前序列(prosequence)(例如,分泌序列等)可操作地连接。

[0052] 如本文所使用的,术语“质粒”指用作克隆载体的环状双链(ds)DNA 构建体,其在某些真核或原核生物中形成染色体外自主复制的遗传元件,或整合到宿主染色体。

[0053] 本文中,在将核酸序列引入细胞的情况下使用的术语“引入”,指适于将核酸序列转移到细胞内的任何方法。此种用于引入的方法包括但不限于原生质体融合、转染、转化、接合和转导(参见例如, Ferrari 等人, " Genetics, " in Hardwood 等人, (编辑), Bacillus, Plenum Publishing Corp., 第 57-72 页 [1989])。

[0054] 如本文所使用的,术语“转化”和“稳定转化”指细胞具有整合到其基因组内或作为附加型质粒维持至少 2 代的非天然(异源)多核苷酸序列。

[0055] 如本文所使用的,术语“编码选择标记的核苷酸序列”指这样的核苷酸序列,其能够在宿主细胞中表达,并且选择标记的表达能够赋予包含该表达基因的细胞在存在相应选择试剂或缺乏必需营养素的情况下生长的能力。

[0056] 如本文所使用的,术语“选择标记”和“可选择标记”指能够在宿主细胞中表达的核酸(例如,基因),其允许容易地选择包含载体的那些宿主。此种选择标记的例子包括但不限于抗微生物药。因此,术语“选择标记”指提供宿主细胞已摄取目的引入 DNA 或某些其他反应已发生的指示的基因。一般地,选择标记是能向宿主细胞赋予抗微生物药抗性或代谢优势的基因,由此允许将包含该外源 DNA 的细胞与在转化过程中未接受任何外源序列的细胞区分开来。“居留型选择标记”(residing selectable marker)是位于待转化的微生物的染色体上的选择标记。居留型选择标记编码不同于在转化 DNA 构建体上的选择标记的基因。选择标记是本领域技术人员众所周知的。如上所述,优选地,标记是抗微生物药抗性标记(例如, amp^R ; phleo^R ; spec^R ; kan^R ; ery^R ; tet^R ; cmp^R ; 和 neo^R (参见例如, Guerot-Fleury, Gene, 167:335-337 [1995]; Palmeros 等人, Gene 247:255-264 [2000]; 和 Trieu-Cuot 等人, Gene, 23:331-341, [1983])。依照本发明有用的其他标记包括但不限于营养(例如色氨酸)缺陷型标记;和检测标记,例如 β -半乳糖苷酶。

[0057] 如本文所使用的,术语“启动子”指作用在于指导下游基因转录的核酸序列。在优选实施方案中,启动子对待表达靶基因的宿主细胞是适宜的。启动子,以及其他转录和翻译

调节核酸序列（也称为“控制序列”），是表达给定基因所需的。一般而言，转录和翻译调节序列包括但不限于，启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、以及增强子或激活物序列。

[0058] 当核酸被放置在与另一核酸序列形成功能关系的位置上时，它是“可操作地连接的”。例如，编码分泌引导区（例如，信号肽）的 DNA 与编码多肽的 DNA 可操作地连接时，其将作为参与多肽分泌的前蛋白表达；启动子或增强子与编码序列可操作地连接时，它将影响序列的转录；或核糖体结合位点与编码序列可操作地连接时，它的放置将促进翻译的进行。一般地，“可操作地连接”意味着所连接的 DNA 序列是邻接的，并且在分泌引导区的情况下，是邻接且在阅读框中的。然而，增强子无需是邻接的。连接可以通过在方便的限制位点处的连接来完成。如果不存在此种位点，那么可以依照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0059] 如本文所使用的，术语“基因”指编码多肽且包括位于编码区前和后的区域以及在单个的编码区段（外显子）之间的间插序列（内含子）的多核苷酸（例如，DNA 区段）。

[0060] 如本文所使用的，“同源基因”指来自不同但通常相关的物种的一对基因，其彼此对应并且彼此相同或非常相似。该术语涵盖通过物种形成（即，新物种发生）而分离的基因（例如直系同源基因），以及已通过基因复制而分离的基因（例如，旁系同源基因）。

[0061] 如本文所使用的，“直系同源物”和“直系同源基因”指在不同物种中的基因，其通过物种形成由共同祖先基因（即，同源基因）进化而来。一般地，直系同源物在进化过程中保留相同功能。直系同源物的鉴定可以用于在新测序的基因组中可靠地预测基因功能。

[0062] 如本文所使用的，“旁系同源物”和“旁系同源基因”指通过基因组内的复制而关联的基因。虽然直系同源物在进化过程中保留相同功能，但旁系同源物会进化出新功能，尽管某些功能通常与原始功能相关。旁系同源基因的例子包括但不限于，编码胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶的基因，这些都是丝氨酸蛋白酶并且一起存在于相同物种内。

[0063] 如本文所使用的，“同源性”指序列相似性或同一性，其中同一性是优选的。这种同源性可以使用本领域已知的标准技术进行确定（参见例如，Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482[1981]；Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443[1970]；Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444[1988]；程序例如 Wisconsin Genetics SoftwarePackage 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, Madison, WI；和 Devereux 等人, *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395[1984]）。

[0064] 如本文所使用的，“类似序列”是指这样的序列，其中该基因的功能与基于亲本基因（例如，纤维单胞菌属菌株 69B4 蛋白酶）的基因基本上相同。此外，类似基因可以包括与亲本基因的序列至少 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。备选地，类似序列具有与亲本基因（例如，纤维单胞菌属菌株 69B4 蛋白酶）区域中的 70-100% 基因的序列匹配、和 / 或具有与包含亲本基因的染色体（例如，纤维单胞菌属菌株 69B4 蛋白酶）中的基因比对的至少 5-10 个在该区域中的基因。在另外的实施方案中，一种以上的上述性质适用于该序列。通过序列比对的已知方法可以确定类似序列。常用的比对方法是 BLAST，尽管如上文和下文所述，其他方法也适用于比对序列。

[0065] 有用算法的一个例子是 PILEUP。PILEUP 使用渐进式成对比对，由一组相关序列

产生多重序列比对。它还可以绘制显示聚类关系的树,用于构建比对。PILEUP 使用简化的 Feng 和 Doolittle (Feng 和 Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35 :351-360 [1987]) 的渐进式比对方法。该方法与 Higgins 和 Sharp (Higgins 和 Sharp, *CABIOS* 5 :151-153 [1989]) 描述的方法相似。有用的 PILEUP 参数包括缺省空位权重 3.00、缺省空位长度权重 0.10 和加权的末端空位。

[0066] 另一个有用算法的例子是由 Altschul 等人描述的 BLAST 算法 (Altschul 等人, *J. Mol. Biol.*, 215 :403-410 [1990]; 和 Karlin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90 :5873-5787 [1993])。特别有用的 BLAST 程序是 WU-BLAST-2 程序 (参见, Altschul 等人, *Meth. Enzymol.*, 266 :460-480 [1996])。WU-BLAST-2 使用几个搜索参数,其中大多数可以被设定为缺省值。这些可调参数可以使用下述值进行设定:重叠跨度 (overlapspan) = 1, 重叠部分 (overlap fraction) = 0.125, 字阈值 (T) = 11。HSP S 和 HSP S2 参数是动态值,由程序自身根据具体序列的组成和目的序列所搜索的具体数据库的组成来建立。然而,可以调整这些值以增加灵敏度。通过匹配的相同残基的数目除以比对区域中“较长”序列的总残基数目,确定氨基酸序列同一性%。“较长”序列是在比对区域中具有最多实际残基的序列 (不计为使比对得分达到最大而由 WU-Blast-2 引入的空位)。

[0067] 因此,“核酸序列同一性百分比 (%)”定义为在候选序列中与起始序列 (即,目的序列) 的核苷酸残基等同的核苷酸残基的百分比。优选方法利用设定为缺省参数的 WU-BLAST-2 的 BLASTN 模块,其中重叠跨度和重叠部分分别设定为 1 和 0.125。

[0068] 如本文所使用的,术语“杂交”指如本领域已知的、一条核酸链通过碱基配对与互补链连接的过程。

[0069] 如果核酸序列与参考核酸序列在中等至高严格杂交和洗涤条件下彼此特异性杂交,则核酸序列被视为与参考核酸序列“可选择性地杂交”。杂交条件基于核酸结合复合物或探针的解链温度 (T_m)。例如,“最高严格性”一般在约 $T_m-5^{\circ}\text{C}$ (比探针的 T_m 低 5°C) 发生;“高严格”在低于 T_m 约 $5-10^{\circ}\text{C}$ 发生;“中等严格”在低于探针的 T_m 约 $10-20^{\circ}\text{C}$ 发生;和“低严格”在低于 T_m 约 $20-25^{\circ}\text{C}$ 发生。在功能上,最高严格条件可以用于鉴定与杂交探针具有严格相同或接近严格相同的序列;而中等或低严格杂交可以用于鉴定或检测多核苷酸序列同源物。

[0070] 中等和高严格杂交条件是本领域众所周知的。高严格条件的例子包括在约 42°C 在 50% 甲酰胺、5X SSC、5X Denhardt' s 溶液、0.5% SDS 和 $100\mu\text{g/ml}$ 变性载体 DNA 中杂交,随后在 2X SSC 和 0.5% SDS 中室温洗涤 2 次,并且在 0.1X SSC 和 0.5% SDS 中 42°C 再洗涤 2 次。中等严格条件的例子包括在 37°C 在溶液中过夜温育,所述溶液包含 20% 甲酰胺、5x SSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5x Denhardt' s 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20mg/ml 变性剪切鲑精 DNA;随后在 1xSSC 中在约 $37-50^{\circ}\text{C}$ 洗涤滤膜。本领域技术人员明了如何按照需要来调整温度、离子强度等,以适应诸如探针长度等的因素。

[0071] 如本文所使用的,“重组体”包括提及已通过引入异源核酸序列进行了修饰的细胞或载体,或衍生自如此修饰的细胞的细胞。因此,例如,重组细胞表达在天然 (非重组) 形式的细胞内无等同形式的基因,或作为有意人为干预的结果而表达原本异常表达、低表达或完全不表达的天然基因。“重组”、“进行重组”和产生“重组”核酸一般是指装配 2 个或更多个核酸片段,其中该装配导致产生嵌合基因。

[0072] 在一个优选实施方案中,用位点饱和诱变在至少一个密码子中产生突变 DNA 序列。在另一个优选实施方案中,位点饱和诱变针对 2 个或更多个密码子执行。在一个进一步的实施方案中,突变 DNA 序列与野生型序列具有大于 50%、大于 55%、大于 60%、大于 65%、大于 70%、大于 75%、大于 80%、大于 85%、大于 90%、大于 95%、或大于 98% 的同源性。在备选实施方案中,可以使用任何已知的诱变方法,例如辐射、亚硝基胍等,在体内产生突变 DNA。随后在本文提供的方法中分离期望 DNA 序列并且使用。

[0073] 如本文所使用的,术语“靶序列”指在宿主细胞中编码如下序列的 DNA 序列,其中期望在该序列处将引入的序列插入宿主细胞基因组中。在某些实施方案中,靶序列编码功能性野生型基因或操纵子,而在其他实施方案中,靶序列编码功能性突变基因或操纵子、或非功能性基因或操纵子。

[0074] 如本文所使用的,“侧翼序列”指在所讨论序列的上游或下游的任何序列(例如,对于基因 A-B-C,基因 B 的侧翼为 A 和 C 基因序列)。在一个优选实施方案中,引入的序列在每侧上均侧接同源盒。在另一个实施方案中,引入的序列和同源盒构成单元,该单元在每侧上均侧接填充序列。在某些实施方案中,侧翼序列仅存在于单侧上(3' 或 5'),但在优选实施方案中,序列每一侧都有侧翼序列。在某些实施方案中,侧翼序列仅存在于单侧上(3' 或 5'),而在优选实施方案中,它存在于侧接其的序列的每一侧上。

[0075] 如本文所使用的,术语“填充序列”指位于同源盒侧翼的任何额外 DNA(一般是载体序列)。然而,该术语涵盖任何非同源 DNA 序列。不受任何理论束缚,填充序列可以为细胞提供非关键靶以起始 DNA 摄取。

[0076] 如本文所使用的,术语“扩增”和“基因扩增”指特定 DNA 序列不成比例地复制的过程,由此扩增后基因以比初始存在于基因组中的拷贝数要高的拷贝数存在。在某些实施方案中,通过在药物(例如,可抑制性酶的抑制剂)存在下的生长来进行的细胞选择,导致编码在药物存在下生长所必需的基因产物的内源基因的扩增、或编码此基因产物的外源(即,输入)序列的扩增,或两者的扩增。

[0077] “扩增”是涉及模板特异性的核酸复制的一种特殊情况。它与非特异性模板复制(即,模板依赖性但不依赖于特定模板的复制)形成对比。模板特异性在此处与复制的保真性(即,合成正确多核苷酸序列)和核苷酸(核糖或脱氧核糖-核苷酸)的特异性是不同的。模板特异性通常就“靶”特异性而言进行描述。靶序列,在寻求将其从其他核酸中挑选出来这一意义上,是“靶”。已设计了主要用于这种挑选的扩增技术。

[0078] 如本文所使用的,术语“共扩增”指将可扩增标记与其他基因序列(即,包含一个或多个非选择基因,例如表达载体中包含的那些)一起引入单个细胞内,应用合适的选择压力,从而使得细胞扩增该可扩增标记和该其他非选择基因序列。可扩增标记可以与该其他基因序列进行物理连接,或备选地 2 个分开的 DNA 片段,一个包含可扩增标记并且另一个包含该非选择标记,可以引入相同细胞内。

[0079] 如本文所使用的,术语“可扩增标记”、“可扩增基因”和“扩增载体”指基因或编码基因的载体,其允许该基因在合适的生长条件下扩增。

[0080] “模板特异性”可以在大多数扩增技术中通过选择酶来达到。扩增酶是在使用条件下仅加工异源核酸混合物中的特定核酸序列的酶。例如,在 Q β 复制酶的情况下,MDV-1RNA 是该复制酶的特定模板(参见例如,Kacian 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 :

3038[1972]),其他核酸不能通过这种扩增酶复制。类似地,在 T7RNA 聚合酶的情况下,这种扩增酶具有针对其自身启动子的严格特异性(参见,Chamberlin 等人,Nature 228:227[1970])。在 T4DNA 连接酶的情况下,当在寡核苷酸或多核苷酸底物和模板之间在连接接头处存在错配时,该酶将无法连接这 2 个寡核苷酸或多核苷酸(参见,Wu 和 Wallace,Genomics 4:560[1989])。最后,Taq 和 Pfu 聚合酶,由于其在高温下起作用的能力,而被发现能够对引物结合并由此规定的序列显示出高特异性;高温导致有利于引物与靶序列杂交而不利与与非靶序列杂交的热力学条件。

[0081] 如本文所使用的,术语“可扩增核酸”指可以通过任何扩增方法扩增的核酸。可以考虑到,“可扩增核酸”通常可以包含“样品模板”。

[0082] 如本文所使用的,术语“样品模板”指源于待就“靶”(下文定义)的存在进行分析的样品的核酸。相对地,“本底模板”用于指样品模板之外的核酸,其可以存在或不存在于样品中。本底模板最通常是无意的。它可以是遗留(carryover)引起的,或它可以由于待从样品中纯化除去的核酸杂质的存在而引起。例如,来自待检生物之外的生物的核酸可以作为本底在测试样品中存在。

[0083] 如本文所使用的,术语“引物”指天然的(如在纯化的限制消化物中)或合成产生的寡核苷酸,当被置于可以诱导与核酸链互补的引物延伸产物合成的条件下(即,在核苷酸和诱导试剂例如 DNA 聚合酶存在下以及合适温度和 pH 下)时,它能够充当合成起始点。对于扩增中的最大效率,引物优选是单链的,但备选地可以是双链的。如果是双链的,那么首先处理引物,以在用于制备延伸产物前使其链分开。优选地,引物是寡脱氧核苷酸。引物必须足够长以在诱导试剂的存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度依赖于许多因素,包括温度、引物来源和使用方法。

[0084] 如本文所使用的,术语“探针”指天然的(如在纯化的限制消化物中)或合成、重组或通过 PCR 扩增产生的寡核苷酸(即,核苷酸序列),它能够与另一目的寡核苷酸杂交。探针可以是单链或双链的。探针可以用于特定基因序列的检测、鉴定和分离。可以考虑到,在本发明中使用的任何探针可以用任何“报道分子”进行标记,从而使得可在任何检测系统中检测,所述检测系统包括但不限于酶(例如,ELISA 以及基于酶的组织化学测定法)、荧光、放射性和发光系统。本发明不旨在限制于任何具体检测系统或标记。

[0085] 如本文所使用的,当用于聚合酶链反应时,术语“靶”指用于聚合酶链反应的引物所结合的核酸区域。由此,可以寻求将“靶”从其他核酸序列中挑选出来。“区段”定义为靶序列内的核酸区域。

[0086] 如本文所使用的,术语“聚合酶链反应”(“PCR”)指在此引入作为参考的美国专利号 4,683,195、4,683,202 和 4,965,188 中的方法,其包括无需克隆或纯化用于增加靶序列区段在基因组 DNA 混合物中的浓度的方法,这是本领域技术人员已知的。因为靶序列的期望扩增区段在混合物中成为主要序列(就浓度而言),故将其称作“PCR 扩增的”。

[0087] 如本文所使用的,术语“扩增试剂”指除引物、核酸模板和扩增酶外,扩增所需的那些试剂(三磷酸脱氧核糖核苷酸、缓冲液等)。一般地,将扩增试剂连同其他反应组分一起置于和容纳在反应器皿(试管、微孔等)中。

[0088] 用 PCR,可以将基因组 DNA 中单拷贝的特定靶序列扩增至通过几种不同方法(例如,与标记探针杂交;掺入生物素化引物后利用抗生物素蛋白-酶缀合物检测;³²P 标记的三

磷酸脱氧核苷酸,例如 dCTP 或 dATP 掺入扩增区段内)可以检测的水平。除了基因组 DNA 外,任何寡核苷酸或多核苷酸序列都可以用合适的引物分子对进行扩增。特别地,通过 PCR 过程本身产生的扩增区段自身就可以是后续 PCR 扩增的有效模板。

[0089] 如本文所使用的,术语“PCR 产物”、“PCR 片段”和“扩增产物”指在变性、退火和延伸的 PCR 步骤的 2 个或更多个循环完成后得到的化合物混合物。这些术语涵盖已经扩增了一个或多个靶序列的一个或多个区段的情况。

[0090] 如本文所使用的,术语“RT-PCR”指 RNA 序列的复制和扩增。在这种方法中,逆转录与 PCR 偶联,最通常使用其中采用热稳定聚合酶的酶法,见引入本文作为参考的美国专利号 5,322,770 中的描述。在 RT-PCR 中,由于聚合酶的逆转录酶活性,RNA 模板被转化成 cDNA,并且随后使用聚合酶的聚合活性扩增(即,如在其他 PCR 方法中一样)。

[0091] 如本文所使用的,术语“限制性核酸内切酶”和“限制酶”指各自在特定核苷酸序列处或附近切割双链 DNA 的细菌酶。

[0092] “限制位点”指由给定的限制性核酸内切酶识别并切割的核苷酸序列,其通常是用于插入 DNA 片段的位点。在本发明的特定实施方案中,在选择标记以及 DNA 构建体的 5' 和 3' 端中构建限制位点。

[0093] 如本文所使用的,术语“染色体整合”指将引入的序列导入宿主细胞染色体内的过程。转化 DNA 的同源区与染色体的同源区进行序列匹配(align)。随后,同源盒之间的序列在双交换中被引入的序列置换(即,同源重组)。在本发明的某些实施方案中,DNA 构建体的失活染色体区段的同源部分与芽孢杆菌染色体的天生染色体区域的侧翼同源区进行序列匹配。随后,天生的染色体区域在双交换中通过 DNA 构建体缺失(即,同源重组)。

[0094] “同源重组”意指 2 个 DNA 分子或配对染色体之间在等同或接近等同的核苷酸序列位点处发生的 DNA 片段交换。在一个优选实施方案中,染色体整合是同源重组。

[0095] 如本文所使用的,“同源序列”指当就比较进行最佳比对时,一个核酸或多肽序列与另一个核酸或多肽序列具有 100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、88%、85%、80%、75% 或 70% 的序列同一性。在某些实施方案中,同源序列具有 85% -100% 序列同一性,而在其他实施方案中,存在 90% -100% 序列同一性,并且在更优选的实施方案中,存在 95% -100% 序列同一性。

[0096] 如本文所使用的,“氨基酸”指肽或蛋白质序列或其部分。术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用。

[0097] 如本文所使用的,“目的蛋白质”和“目的多肽”指期望的和/或待评估的蛋白质/多肽。在某些实施方案中,“目的蛋白质”是“亲本蛋白质”(即,起始蛋白质)。在某些实施方案中,亲本蛋白质是用作蛋白质工程/设计的起始点的野生型酶。在某些实施方案中,目的蛋白质在细胞内表达,而在其他实施方案中,它是分泌多肽。在特别优选的实施方案中,这些酶包括本文描述的丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。在某些实施方案中,目的蛋白质是与信号肽(即,在待分泌的蛋白质上的氨基末端延伸)融合的分泌多肽。几乎所有分泌蛋白都使用氨基末端蛋白质延伸,其在前体蛋白质的靶向和跨膜转运中起关键作用。该延伸可以在膜转移过程中或紧在膜转移后通过信号肽酶被蛋白水解去除。

[0098] 如本文所使用的,术语“异源蛋白质”指非天然存在在宿主细胞中的蛋白质或多肽。异源蛋白质的例子包括酶,例如水解酶,包括蛋白酶。在某些实施方案中,编码蛋白质

的基因是天然存在的基因,而在其他实施方案中,使用突变和 / 或合成的基因。

[0099] 如本文所使用的,“同源蛋白质”指细胞中天生的或天然存在的蛋白质或多肽。在优选实施方案中,细胞是革兰氏阳性细胞,而在特别优选的实施方案中,细胞是芽孢杆菌属宿主细胞。在备选实施方案中,同源蛋白是由其他生物,包括但不限于大肠杆菌 (*E. coli*)、纤维单胞菌、芽孢杆菌、链霉菌、木霉 (*Trichoderma*) 和曲霉 (*Aspergillus*),产生的天然蛋白质。本发明包括经由重组 DNA 技术产生同源蛋白质的宿主细胞。

[0100] 如本文所使用的,“操纵子区”包含一组邻近基因,其作为单个转录单位自共同启动子转录,并且由此受到共调节。在某些实施方案中,操纵子包括调节基因。在最优选的实施方案中,使用高度表达(如通过 RNA 水平测量)的、但具有未知或非必需功能的操纵子。

[0101] 如本文所使用的,“抗微生物区”是包含编码抗微生物蛋白质的至少一个基因的区域。

[0102] 如果多核苷酸,在其自然状态中或当通过本领域技术人员已知的方法操纵后,可以转录和 / 或翻译以产生 RNA、多肽或其片段,则称该多核苷酸“编码”RNA 或多肽。此种核酸的反义链也被说成编码该序列。

[0103] 如本领域已知的, DNA 可以通过 RNA 聚合酶转录以产生 RNA,而 RNA 可以通过逆转录酶进行逆转录以产生 DNA。因此, DNA 可以编码 RNA 并且反之亦然。

[0104] 术语“调节区段”或“调节序列”或“表达控制序列”指与编码多肽链的氨基酸序列的 DNA 多核苷酸序列可操作地连接以实现该编码氨基酸序列的表达的 DNA 多核苷酸序列。调节序列可以抑制、阻遏或促进可操作地连接的编码氨基酸的多核苷酸序列的表达。

[0105] “宿主菌株”或“宿主细胞”指对于包含本发明 DNA 的表达载体合适的宿主。

[0106] 如果酶在细胞中以比其在相应野生型细胞中的表达水平更高的水平表达,那么酶在宿主细胞中“超表达”。

[0107] 术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。本公开内容自始至终使用符合 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) 定义的氨基酸 3 字母代码。还应当理解由于遗传密码简并性,多肽可以由一种以上的核苷酸序列编码。

[0108] “前序列”是在信号序列和成熟蛋白酶之间的氨基酸序列,其对于蛋白酶分泌是必需的。前序列的切割将导致成熟的活性蛋白酶。

[0109] 术语“信号序列”或“信号肽”指参与成熟或前体形式的蛋白质分泌的任何核苷酸和 / 或氨基酸序列。信号序列的这个定义是功能定义,意欲包括由蛋白质基因的 N 末端部分编码的、参与实现蛋白质分泌的、所有那些氨基酸序列。它们通常但不是绝对地与蛋白质的 N 末端部分或前体蛋白质的 N 末端部分结合。信号序列可以是内源或外源的。信号序列可以是与蛋白质(例如,蛋白酶)天然结合的信号序列,或可以来自编码其它分泌蛋白质的基因。一种示例性外源信号序列包含与来自枯草芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的信号序列的前 7 个氨基酸残基融合的、来自迟缓芽孢杆菌 (ATCC21536) 的枯草杆菌蛋白酶的信号序列的其余部分。

[0110] 术语“杂合信号序列”指该信号序列的部分得自表达宿主、与待表达基因的信号序列融合。在某些实施方案中,利用合成序列。

[0111] 术语“基本上相同的信号活性”是指如通过蛋白酶向发酵培养基的基本上相同的分泌所指示的信号活性,例如,发酵培养基蛋白酶水平是由 SEQID NO :9 的信号序列提供的

发酵培养基中分泌蛋白酶水平的至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%。

[0112] 术语“成熟”形式的蛋白质或肽指蛋白质或肽的最终功能形式。为了例示，本发明的成熟形式的 ASP 蛋白酶至少包括 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列，而本发明的成熟形式的 NprE 蛋白酶至少包括 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列。

[0113] 术语蛋白质或肽的“前体”形式指具有与蛋白质的氨基或羧基末端可操作地连接的前序列的成熟形式蛋白质。前体还可以具有与前序列的氨基末端可操作地连接的“信号”序列。前体还可以具有参与翻译后活性的另外多核苷酸（例如，被切除以留下成熟形式的蛋白质或肽的多核苷酸）。

[0114] “天然酶”和“天然蛋白质”指具有与自然界中发现的酶或蛋白质等同的未经修饰的氨基酸序列的酶或蛋白质。天然酶包括天生的酶，在特定微生物中天然表达或存在的那些酶。

[0115] 术语“源自”或“得自”不仅指由所讨论的生物株产生的或可产生的酶（例如，蛋白酶），还指由此生物株中分离的 DNA 序列编码且在包含此 DNA 序列的宿主生物中产生的酶。此外，该术语还指由合成来源和 / 或 cDNA 来源的 DNA 序列编码的、具有所讨论酶的鉴定特征的酶。

[0116] 在本定义范畴中“衍生物”一般保留在野生型、天然或亲本形式中观察到的特征性蛋白水解活性，且保留的程度使得衍生物可以与野生型、天然或亲本形式用于相似的用途。功能性酶衍生物包括具有亲本酶的一般特征的、天然存在的或合成或重组产生的肽或肽片段。

[0117] 术语“功能性衍生物”指具有编码酶的核酸的功能特征的核酸衍生物。编码本文提供的酶的核酸的功能性衍生物包括天然存在、合成或重组产生的核酸或片段。编码本发明酶的野生型核酸包括基于本领域已知的遗传密码简并性的天然存在的等位基因和同源物。

[0118] 与 2 个核酸或多肽序列相关的术语“等同（同一）”是指，当就最大对应性进行比对时，在 2 个序列中相同的残基，可以使用下述序列比较或分析算法之一确定。

[0119] 术语“最佳比对”是指给出最高同一性百分比得分的比对。“序列同一性百分比”、“氨基酸序列同一性百分比”、“基因序列同一性百分比”和 / 或“核酸 / 多核苷酸序列同一性百分比”，就 2 个氨基酸、多核苷酸和 / 或基因序列（合适时）而言，指当序列进行最佳比时，在 2 个序列中等同的残基的百分比。因此，80%氨基酸序列同一性指在 2 个最佳比对的多肽序列中有 80%氨基酸是等同的。

[0120] 因此，与 2 个核酸或多肽相关的短语“基本上等同（同一）”是指，使用程序或算法（例如，BLAST、ALIGN、CLUSTAL），使用标准参数，与参考序列比较，一个多核苷酸或多肽包含至少 70%序列同一性、优选至少 75%、优选至少 80%、优选至少 85%、优选至少 90%、优选至少 95%、优选至少 97%、优选至少 98%且优选至少 99%序列同一性。2 个多肽基本上等同的一个指标是第一多肽与第二多肽具有免疫学交叉反应性。一般地，差异在于保守氨基酸置换的多肽具有免疫学交叉反应性。因此，例如，当一个多肽与第二多肽的差异仅在于保守置换时，这 2 个多肽基本上等同。2 个核酸序列基本上等同的另一个指标是 2 个分子在严格条件下（例如，在中等至高严格范围内）彼此杂交。

[0121] 术语“分离的”或“纯化的”指物质自其最初环境（例如，如果它是天然存在的，那

么天然环境)中被移出。例如,一个物质将被说成是“纯化的”,如果该物质在特定组合物中的存在浓度比其在天然或野生型生物中的存在浓度高或低、或如果该物质在特定组合物中与其自天然或野生型生物表达时通常不存在的组分组合存在。例如,在活动物中存在的天然多核苷酸或多肽不是分离的,但与天然系统中共存的一些或所有物质分开的该同一多核苷酸或多肽是分离的。在某些实施方案中,此种多核苷酸是载体的部分,和/或此种多核苷酸或多肽是组合物的部分,并且仍是分离的,因为此种载体或组合物不是其天然环境的一部分。在某些优选实施方案中,核酸或蛋白质被说成是纯化的,例如,如果它在凝胶电泳或印迹中产生基本上一个条带时。

[0122] 术语“分离的”,当用于DNA序列时,指这样的DNA序列,其已从其天然遗传环境中被移出并因此不含其他额外的或不希望有的编码序列,并且具有适于在遗传改造的蛋白质生产系统内使用的形式。此种分离的分子可以是从其天然环境中分离的分子,包括cDNA和基因组克隆。本发明的分离的DNA分子不含通常与之关联的其他基因,但可以包括天然存在的5'和3'非翻译区例如启动子和终止子。关联区域的鉴定对于本领域普通技术人员将是显而易见的(参见例如, Dynan 和 Tijan, Nature 316:774-78, 1985)。术语“分离的DNA序列”备选地称为“克隆的DNA序列”。

[0123] 术语“分离的”,当用于蛋白质时,指存在于非其天然环境的条件下的蛋白质。在优选形式中,分离的蛋白质基本上不含其他蛋白质,特别是其他同源蛋白质。分离的蛋白质,如通过SDS-PAGE测定的,可以具有大于10%的纯度、优选大于20%的纯度、并且更加优选大于30%的纯度。本发明的进一步方面包含,如通过SDS-PAGE测定的,高度纯化形式(即,大于40%纯、大于60%纯、大于80%纯、大于90%纯、大于95%纯、大于97%纯、以及甚至大于99%纯)的蛋白质。

[0124] 如本文所使用的,术语“组合诱变”指产生起始序列的变体文库的方法。在这些文库中,变体包含选自预定一组突变的一个或几个突变。此外,该方法可以提供引入并非该组预定突变的成员的随机突变的手段。在某些实施方案中,该方法包括在美国申请号9/699,250中阐述的那些,所述美国申请于2000年10月26日提交,在此引入作为参考。在备选实施方案中,组合诱变方法包括商购可得的试剂盒(例如, **QUIKCHANGE®** Multisite, Stratagene, La Jolla, CA)。

[0125] 如本文所使用的,术语“突变体文库”指一群细胞,这些细胞在其大部分基因组上是相同的,但包括一个或多个基因的不同同源物。此种文库可以用于例如鉴定具有改良性状的基因或操纵子。

[0126] 如本文所使用的,术语“起始基因”指编码待使用本发明改良和/或改变的目的蛋白质的目的基因。

[0127] 如本文所使用的,术语“变体”指通过一个或多个氨基酸的添加、置换或缺失而衍生自前体蛋白质(例如,“亲本”蛋白质)的蛋白质。在某些实施方案中,与前体蛋白质比较,变体包含至少一种修饰,所述修饰包含电荷的改变。在某些优选实施方案中,前体蛋白质是本身为野生型蛋白质的亲本蛋白质。

[0128] 如本文所使用的,术语“多重序列比对”和“MSA”指使用算法(例如, Clustal W)比对比起始基因的多个同源物的序列。

[0129] 如本文所使用的,术语“共有序列”和“规范序列”指与特定目的蛋白质或序列的所

有变体进行比较的原型氨基酸序列。该术语还指这样的序列,该序列陈列出在目的 DNA 序列中最常存在的核苷酸。对于基因的每个位置,共有序列给出在 MSA 中在那个位置中丰度最大的氨基酸。

[0130] 如本文所使用的,术语“共有突变”指在起始基因的序列和共有序列中的差异。共有突变可以通过比较起始基因的序列和得自 MSA 的共有序列进行鉴定。在某些实施方案中,将共有突变引入起始基因内,从而使得它变得与共有序列更相似。共有突变还包括如下氨基酸改变,所述改变导致起始基因的氨基酸变为在 MSA 中于该位置处出现频率高于起始基因氨基酸的出现频率的氨基酸。因此,术语共有突变包含用在 MSA 中比起始基因的氨基酸丰度更高的氨基酸替换起始基因的氨基酸的所有单氨基酸改变。

[0131] 如本文所使用的,术语“初始命中物”指通过筛选组合共有诱变文库鉴定到的变体。在优选实施方案中,与起始基因比较,初始命中物具有改良的性能特征。

[0132] 如本文所使用的,术语“改良命中物”指通过筛选增强的组合共有诱变文库鉴定到的变体。

[0133] 如本文所使用的,术语“改良突变”和“性能增强突变”是指,当被引入起始基因内时,导致改良性能的突变。在某些优选实施方案中,这些突变通过测序在本方法的筛选步骤过程中鉴定到的命中物来鉴定。在大多数实施方案中,与未筛选的组合共有诱变文库比较,在命中物中更频繁出现的突变很可能是改良突变。

[0134] 如本文所使用的,术语“增强的组合共有诱变文库”指基于来自较早的 CCM 诱变和筛选循环的筛选和/或测序结果设计和构建的 CCM 文库。在某些实施方案中,增强的 CCM 文库基于得自较早的 CCM 循环的初始命中物的序列。在另外的实施方案中,设计增强的 CCM,以有利于在较早诱变和筛选循环的初始命中物中频繁观察到的突变。在某些优选实施方案中,这通过如下方式实现:省略编码性能降低突变的引物,或者相对于在较早 CCM 文库中使用的其他引物,增加编码性能增强突变的引物的浓度。

[0135] 如本文所使用的,术语“性能降低突变”指与未筛选的组合共有诱变文库比较,在组合共有诱变文库中在筛选得到的命中物中出现频率较低的突变。在优选实施方案中,筛选过程去除和/或降低包含“性能降低突变”的变体的丰度。

[0136] 如本文所使用的,术语“功能测定法”指指示蛋白质活性的测定法。在特别优选的实施方案中,该术语指分析蛋白质以其通常的能力起作用的能力的测定系统。例如,在酶的情况下,功能测定法涉及测定酶催化反应的效力。

[0137] 如本文所使用的,术语“靶性质”指起始基因中待改变的性质。本发明不旨在局限于任何具体靶性质。然而,在某些优选实施方案中,靶性质是基因产物的稳定性(例如,对抗变性、蛋白水解或其他降解因素的抗性),而在其他实施方案中,改变在生产宿主中的生产水平。事实上,可以考虑到,本发明适用于起始基因的任何性质。

[0138] 如本文所使用的,与核酸相关的术语“性质”或其语法等价物是指,核酸的可以选择或检测的任何特征或属性。这些性质包括但不限于,影响与多肽的结合的性质,赋予包含特定核酸的细胞的性质、影响基因转录的性质(例如,启动子强度、启动子识别、启动子调节、增强子功能)、影响 RNA 加工的性质(例如, RNA 剪接、RNA 稳定性、RNA 构象和转录后修饰)、影响翻译的性质(例如,水平、调节、mRNA 与核糖体蛋白质的结合、翻译后修饰)。例如,可以改变核酸的转录因子、聚合酶、调节因子等的结合位点,以产生期望特征或鉴定不

希望有的特征。

[0139] 如本文所使用的,在多肽相关的术语“性质”、“目的性质”或其语法等价物是指,多肽的可以选择或检测的任何特征或属性。这些性质包括但不限于氧化稳定性、底物特异性、催化活性、热稳定性、碱稳定性、pH 活性谱、对蛋白水解降解的抗性、 K_M 、 k_{cat} 、 k_{cat}/k_M 比、蛋白质折叠、诱导免疫应答、与配体结合的能力、与受体结合的能力、被分泌的能力、在细胞表面上展示的能力、寡聚化的能力、发信号的能力、刺激细胞增殖的能力、抑制细胞增殖的能力、诱导凋亡的能力、被磷酸化或糖基化修饰的能力、治疗疾病的能力。

[0140] 如本文所使用的,术语“筛选”具有其在本领域中的通常含义,并且一般而言是多步骤过程。在第一个步骤中,提供突变体核酸或来自其的变体多肽。在第二个步骤中,测定突变体核酸或变体多肽的性质。在第三个步骤中,使测定的性质与相应亲本核酸的性质、相应天然多肽的性质、或用于产生该突变体核酸的原料(例如,初始序列)的性质比较。

[0141] 对于技术人员显而易见的是,用于获得具有改变性质的核酸或蛋白质的筛选操作将取决于原材料的如下性质,其中突变体核酸的产生旨在促进所述性质的变化。技术人员因此将理解本发明并不限于待筛选的任何特定性质,并且下述性质描述仅列出了举例说明性例子。用于筛选任何具体性质的方法在本领域中有一般描述。例如,可以测量在突变前和后的结合、pH、特异性等,其改变指示变化。优选地,筛选以高通量方式进行,包括同时筛选多个样品,包括但不限于利用芯片、噬菌体展示、以及多底物和/或指示物的测定法。

[0142] 如本文所使用的,在某些实施方案中,筛选包括自变体群体中富集目的变体的选择步骤。这些实施方案的例子包括对赋予宿主生物生长优势的变体的选择、以及噬菌体展示或任何其他展示方法,其中变体可以基于其结合或催化性质从变体群体中被捕获出来。在一个优选实施方案中,使变体文库暴露于胁迫(热、蛋白酶、变性),并且随后在筛选中鉴定仍完整的变体或通过选择富集之。该术语旨在包含任何合适的筛选方法。事实上,本发明不旨在局限于任何具体筛选方法。

[0143] 如本文所使用的,术语“靶向随机化”指产生其中一个或多个位置已被随机化的多个序列的过程。在某些实施方案中,随机化是完全的,即,所有 4 种核苷酸,A、T、G 和 C 都可以存在于进行随机化的位置处。在备选实施方案中,核苷酸的随机化被局限于 4 种核苷酸的子集。靶向随机化可以应用于序列的一个或几个密码子,从而编码一种或几种目的蛋白质。当表达时,所得到的文库产生蛋白质群体,在该蛋白质群体中一个或多个氨基酸位置可以包含所有 20 种氨基酸的混合物或氨基酸的子集,这由随机化密码子的随机化方案确定。在某些实施方案中,由于密码子的靶向或随机插入或缺失,由靶向随机化产生的群体的个体成员具有不同的氨基酸数目。在其它实施方案中,合成的氨基酸被包括在产生的蛋白质群体中。在某些优选实施方案中,与起始基因比较,由靶向随机化产生的群体的大多数成员显示与共有序列更大的序列同源性。在某些实施方案中,序列编码一种或多种目的蛋白质。在备选实施方案中,这些蛋白质具有不同的生物学功能。在某些优选实施方案中,引入的序列包含至少一个选择标记。

[0144] 术语“经修饰的序列”和“经修饰的基因”在本文中可互换使用,指包括对天然核酸序列的缺失、插入或中断的序列。在某些优选实施方案中,经修饰的序列的表达产物是截短蛋白质(例如,如果修饰是序列的缺失或中断)。在某些特别优选的实施方案中,截短蛋白质保留生物活性。在备选实施方案中,经修饰的序列的表达产物是延长蛋白质(例如,修

饰包含在核酸序列内的插入)。在某些实施方案中,插入导致截短蛋白质(例如,当插入导致形成终止密码子时)。因此,插入可以导致表达产物为截短蛋白质或延长蛋白质。

[0145] 如本文所使用的,术语“突变体序列”和“突变基因”可互换使用,并且指在宿主细胞的野生型序列的至少一个密码子中具有改变的序列。突变体序列的表达产物是相对于野生型具有改变的氨基酸序列的蛋白质。表达产物可以具有改变的功能能力(例如,增强的酶促活性)。

[0146] 术语“诱变引物”或“诱变寡核苷酸”(在本文中可互换使用)意欲指与模板序列的一部分对应并且能够与之杂交的寡核苷酸组合物。就诱变引物而言,引物与模板核酸不精确匹配,引物中该一个或多个错配用于将期望突变引入核酸文库内。如本文所使用的,“非诱变引物”或“非诱变寡核苷酸”指与模板核酸精确匹配的寡核苷酸组合物。在本发明的一个实施方案中,仅使用诱变引物。在本发明的另一个优选实施方案中,设计引物,使得对于已包括诱变引物的至少一个区域,还存在非诱变引物包括在寡核苷酸混合物中。通过加入诱变引物和与至少一种诱变引物对应的非诱变引物的混合物,可以导致所得核酸文库呈现出各种各样的组合突变模式。例如,如果希望突变体核酸文库的某些成员在某些位置处保留其亲本序列,而其他成员在此位点处发生突变,则非诱变引物能够针对给定残基在核酸文库中获得特定水平的非突变成员。本发明的方法采用诱变和非诱变的寡核苷酸,其长度一般为 10-50 个碱基、更优选长度约 15-45 个碱基。然而,为获得期望诱变结果,可能需要使用短于 10 个碱基或长于 50 个碱基的引物。就相应的诱变和非诱变引物而言,相应寡核苷酸无需具有等同长度,而是仅需要在与待添加的突变对应的区域中存在重叠。

[0147] 在某些实施方案中,引物以预定比例加入。例如,如果希望所得到的文库具有显著水平的某种特定突变以及在相同或不同位点处较少量的不同突变,那么通过调整加入的引物量,可以产生期望的偏倚文库。备选地,通过加入更少或更多量的非诱变引物,可以调整一种或多种相应突变在突变体核酸文库中的产生频率。

[0148] 如本文所使用的,短语“邻接突变”指在相同寡核苷酸引物内呈现的突变。例如,邻接突变可以是彼此邻近或接近的,然而,它们将通过相同引物引入到所得到的突变体模板核酸内。

[0149] 如本文所使用的,短语“非邻接突变”指在分开的寡核苷酸引物中呈现的突变。例如,非邻接突变将通过分开制备的寡核苷酸引物引入到所得到的突变体模板核酸内。

[0150] 术语“野生型序列”、“野生型核酸序列”和“野生型基因”在本文中可互换使用,指在宿主细胞中天生或天然存在的序列。在某些实施方案中,野生型序列指作为蛋白质改造计划的起始点的目的序列。野生型序列可以编码同源或异源蛋白质。同源蛋白质是宿主细胞在无干预的情况下产生的蛋白质。异源蛋白质是如果没有干预,宿主细胞将不产生的蛋白质。

[0151] 术语“氧化稳定的”指在本发明的蛋白水解、水解、清洁或其他过程期间占优势的条件下,例如在暴露于漂白剂或氧化剂或者与漂白剂或氧化剂接触时,经过给定时间段,本发明的蛋白酶保留特定量的酶促活性。在某些实施方案中,在与漂白剂或氧化剂接触给定时间段,例如至少 1 分钟、3 分钟、5 分钟、8 分钟、12 分钟、16 分钟、20 分钟等后,蛋白酶保留至少约 50%、约 60%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 92%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%蛋白水解活性。

[0152] 术语“螯合剂稳定的”指在本发明的蛋白水解、水解、清洁或其他过程期间占优势的条件下,例如在暴露于螯合剂或与螯合剂接触时,经过给定时间段,本发明的蛋白酶保留特定量的酶促活性。在某些实施方案中,在与螯合剂接触给定时间段,例如至少 10 分钟、20 分钟、40 分钟、60 分钟、100 分钟等后,蛋白酶保留至少约 50%、约 60%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 92%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%蛋白水解活性。

[0153] 术语“热稳定的”和“耐热的”指在本发明的蛋白水解、水解、清洁或其他过程期间占优势的条件下,在暴露于鉴定温度给定时间段后,例如,在暴露于改变的温度时,本发明的蛋白酶保留特定量的酶促活性。改变的温度包括增加或减少的温度。在某些实施方案中,在暴露于改变的温度给定时间段,例如至少 60 分钟、120 分钟、180 分钟、240 分钟、300 分钟等后,蛋白酶保留至少约 50%、约 60%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 92%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%蛋白水解活性。

[0154] 在氧化、螯合剂、热和 / 或 pH 稳定的蛋白酶中,术语“增强的稳定性”是指,与其他丝氨酸蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶)和 / 或野生型酶比较,随着时间过去保留更多的蛋白水解活性。

[0155] 在氧化、螯合剂、热和 / 或 pH 稳定的蛋白酶中,术语“减少的稳定性”是指,与其他丝氨酸蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶)和 / 或野生型酶比较,随着时间过去保留较少的蛋白水解活性。

[0156] 如本文所使用的,除非另有说明,术语“清洁组合物”包括颗粒或粉末形式的通用或“重役型”洗涤剂,特别是清洁洗涤剂;液体、凝胶或糊形式的通用洗涤剂,特别是所谓的重役型液体类型;液体精细织品洗涤剂;手洗餐具洗涤剂或轻役型餐具洗涤剂,特别是高泡型的那些;机洗餐具洗涤剂,包括用于家用和公共机构使用的各种片剂、颗粒、液体和漂洗辅助类型;液体清洁和消毒剂,包括抗菌洗手类型、清洁皂、漱口水、牙清洁剂、汽车或地毯香波、浴室清洁剂;洗发香波和护发素;沐浴凝胶和泡沫浴和金属清洁剂;以及清洁辅助剂例如漂白添加剂和“去污棒”或预处理类型。

[0157] 除非另有说明,所有组分或组合物水平是指该组分或组合物的活性水平,排除可能存在于商购可得来源中的杂质,例如残留溶剂或副产物。

[0158] 酶组分重量基于总活性蛋白质计。除非另有说明,所有百分比和比例都以重量进行计算。除非另有说明,所有百分比和比例都基于总组合物进行计算。

[0159] 术语“清洁活性”指在本发明的蛋白水解、水解、清洁或其他过程期间占优势的条件下,由蛋白酶达到的清洁性能。在某些实施方案中,清洁性能通过应用涉及酶敏感性污渍(例如草、血液、乳或卵蛋白质)的各种清洁测定法进行测定,如在对污渍实施标准洗涤条件后通过各种层析、分光光度或其他定量方法进行测定。示例性测定法包括但不限于在 W099/34011 和美国专利号 6,605,458 中描述的那些(两者都引入本文作为参考),以及在本实施例中包括的那些方法。

[0160] 术语蛋白酶的“清洁有效量”指在特定清洁组合物中达到期望酶促活性水平的上文所述蛋白酶的量。此种有效量可以由本领域普通技术人员容易地进行确定,其取决于许多因素,例如使用的具体蛋白酶、清洁应用、清洁组合物的具体组成、和需要液体还是干性(例如,颗粒、条)组合物等。

[0161] 如本文所使用的,术语“清洁附加材料(cleaning adjunct material)”意指针对

期望的特定类型清洁组合物和产品形式（例如，液体、颗粒、粉末、条、糊、喷雾、片剂、凝胶；或泡沫组合物）选择的任何液体、固体或气态材料，所述材料还优选与在组合物中使用的蛋白酶相容。在某些实施方案中，颗粒组合物为“压型（compact）”形式，而在其他实施方案中，液体组合物为“浓缩”形式。

[0162] 对于清洁活性，术语“增强的性能”和“改良的洗涤性能”是指，如在标准洗涤循环和 / 或多个洗涤循环后通过通常的评估所测定的，对某种酶敏感性污渍，例如蛋、乳、草或血液，增加或更大的清洁活性。

[0163] 对于清洁活性，术语“降低的性能”是指，如在标准洗涤循环后通过通常的评估所测定的，对某种酶敏感性污渍，例如蛋、乳、草或血液，减少或降低的清洁活性。

[0164] 对于清洁活性，术语“相当的性能”是指，相当蛋白酶（例如，商购可得蛋白酶）的清洁活性的至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%。清洁性能可以通过在涉及酶敏感性污渍（例如血液、乳和 / 或墨（BMI））的各种清洁测定法中比较本发明的蛋白酶与其他蛋白酶而确定，如在标准洗涤循环条件后通过通常的分光光度法或分析方法测定的那样。

[0165] 如本文所使用的，“低洗涤剂浓度”系统包括其中小于约 800ppm 洗涤剂组分存在于洗涤水中的洗涤剂。日本洗涤剂一般被视为低洗涤剂浓度系统，因为它们通常具有约 667ppm 洗涤剂组分存在于洗涤水中。

[0166] 如本文所使用的，“中等洗涤剂浓度”系统包括其中约 800ppm– 约 2000ppm 洗涤剂组分存在于洗涤水中的洗涤剂。北美洗涤剂一般被视为中等洗涤剂浓度系统，因为它们通常具有约 975ppm 洗涤剂组分存在于洗涤水中。巴西洗涤剂一般具有约 1500ppm 洗涤剂组分存在于洗涤水中。

[0167] 如本文所使用的，“高洗涤剂浓度”系统包括其中大于约 2000ppm 洗涤剂组分存在于洗涤水中的洗涤剂。欧洲洗涤剂一般被视为高洗涤剂浓度系统，因为它们于洗涤水中具有约 3000–8000ppm 洗涤剂组分。

[0168] 如本文所使用的，“织物清洁组合物”包括手洗和机洗衣物洗涤剂组合物，包括洗衣添加剂组合物和适用于在染色的织物（例如，衣服、亚麻和其他纺织品材料）的浸泡和 / 或预处理中使用的组合物。

[0169] 如本文所使用的，“非织物清洁组合物”包括非纺织品（即，织物）表面清洁组合物，包括但不限于餐具洗涤剂组合物、口腔清洁组合物、牙清洁组合物和个人清洁组合物。

[0170] “压型”形式的清洁组合物在本文中由密度最好地反映，并且就组合物而言，通过无机填充盐的量最佳反映。无机填充盐是粉末形式的洗涤剂组合物中的常规成分。在常规洗涤剂组合物中，填充盐以实质量存在，一般是总组合物的 17–35 重量%。相比之下，在压型组合物中，填充盐以不超过总组合物 15% 的量存在。在某些实施方案中，填充盐以不超过组合物的 10 重量%、或更优选地 5 重量% 的量存在。在某些实施方案中，无机填充盐选自硫酸和氯化物的碱金属和碱土金属盐。优选的填充盐是硫酸钠。

[0171] 发明详述

[0172] 本发明提供用于改造蛋白质以优化其在某些目的环境条件下的性能的方法。在某些实施方案中，本发明提供用于改造酶以优化其在特定环境条件下的催化活性的方法。在某些优选实施方案中，本发明提供用于改变酶（例如，金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶）的净表

面电荷和 / 或表面电荷分布的方法, 以获得与起始或亲本酶比较在洗涤剂制剂中表现改良性能的酶变体。

[0173] 在某些优选实施方案中, 本发明提供方法和组合物, 其包含在至少一种洗涤剂制剂中具有改良洗涤性能的至少一种变体中性金属蛋白酶和 / 或变体丝氨酸蛋白酶。在某些特别优选的实施方案中, 本发明提供解淀粉芽孢杆菌中性金属蛋白酶的变体。在其他特别优选的实施方案中, 本发明提供 *Cellulomonas bogoriensis* 分离菌 69B4 丝氨酸蛋白酶的变体。本发明在包括但不限于清洁、漂白和消毒的应用中特别有用。此外, 本发明提供用于改造酶以优化其在不利环境条件下的催化活性的方法。特别地, 本发明提供用于改变金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶的净表面电荷和 / 或表面电荷分布的方法, 以获得在洗涤剂制剂中显示改良性能的酶变体。

[0174] 许多蛋白质和酶对于变性高度敏感, 当贮藏于衣物洗涤剂中时经历不可逆的变性。已知衣物洗涤剂包含阴离子型、阳离子型和非离子型表面活性剂, 在此, 表面活性剂通过其在水中的离子 (电荷) 性质进行分类。这些成分与蛋白质分子的表面电荷相互作用, 导致蛋白质变性 (例如, 结构和功能的丧失)。

[0175] 已证实, 当贮藏于包括表面活性剂例如 LAS 的洗涤剂制剂中时, 2 种蛋白酶, ASP (丝氨酸蛋白酶) 和 NprE (中性金属蛋白酶), 是高度不稳定的。LAS 是阴离子型表面活性剂, 其中该总体负电荷增强与位于蛋白质表面的氨基酸的带正电荷侧链的相互作用。此种静电相互作用通过削弱或破坏稳定性静电相互作用来影响蛋白质的固有稳定性。失稳定的蛋白质随后解折叠并且灭活。

[0176] 已经发现带电荷残基在蛋白酶表面上的分布强烈影响洗涤性能。本发明的蛋白质改造方法可以通过优化蛋白酶的净表面电荷和 / 或表面电荷分布, 有效地优化蛋白酶, 以增加在洗涤剂制剂中的一种或多种性质的性能。尽管金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶用于例示本发明的方法, 但本发明不旨在局限于这些具体酶。事实上, 本发明对各种酶和其他蛋白质均有用。

[0177] 简言之, 在本发明的某些实施方案中, 本发明方法涉及在目的酶的多个氨基酸残基处产生位点评估文库, 并且就目的性质分析变体酶。这使得可以鉴定对于目的性质 (一种或多种) 而言有利的、中性的和有害的突变以及最佳的电荷改变 (相对于亲本酶)。在某些备选实施方案中, 对所有残基进行电荷扫描以产生具有分别在每个位点处改变电荷的突变的变体 (例如, 将中性残基突变成正和 / 或负电荷, 将带电荷残基突变成带相反电荷和 / 或中性残基)。在某些进一步优选的实施方案中, 该方法涉及制备组合“电荷平衡”文库, 所述文库包括以期望方向改变酶电荷的有利突变和以相反方向改变电荷的有利或中性突变, 并且随后就一种或多种目的性质分析该电荷平衡文库。由此, 同时优化酶的表面电荷和表面电荷分布, 并且可以鉴定在多重性质上具有改善的酶变体。

[0178] 本发明的方法可以用于改良各种类别的酶以及蛋白酶 (例如, 淀粉酶、纤维素酶、氧化酶、角质酶、甘露聚糖酶、果胶酶、淀粉酶、脂肪酶等) 的性能。事实上, 本发明不旨在局限于任何具体酶或具体酶类别。此外, 本发明可以用于优化需要特定表面电荷和电荷分布的非酶学蛋白质性质 (例如, 表达、细胞表面结合、对制剂的顺应性等)。

[0179] I. 具有改良性质的 ASP 变体的产生

[0180] 构建 ASP 的位点评估文库 (SELS), 其中成熟蛋白质的每一个氨基酸用其他氨基酸

中的大多数替换（参见，美国专利申请序列号 10/576, 331 和 WO 2005/052146, 两者都引入本文作为参考，因为它们与 SELs 有关）。随后将改良性能的单个突变组合，并且就性能进行再测试。对 SEL 和突变体组合数据的后续分析揭示了分子表面电荷的改变可以显著地减弱污渍去除性能。

[0181] 在已测定了表面电荷对洗涤剂中 ASP 的污渍去除性能的影响后，设计了系统改变 ASP 分子的表面电荷的确定文库，并且测定了变体的性能。对于液体 TIDE 中改良的洗涤性能，相对于野生型，ASP 分子在电荷上的改变是受限制的（例如，+2 至 -2 的范围，其中最佳性能出现在约 0 至 -1）。因此，将改良变体组合在一起并不是加性的，如果这种添加违背在这些条件下对于 ASP 的该总电荷改变限制（例如，小于 -2 或大于 +2）。对迄今未认识到的该电荷改变限制的确定，使得可以设计突变体文库，以产生对于改良性能具有最适电荷的分子。

[0182] 设计、构建且筛选了组合“电荷平衡”文库（参见引入本文作为参考的美国申请序列号 11/583, 334, 因为它与电荷平衡文库有关）。文库包含 4 种有利的负电荷突变和 4 种无害的正电荷突变（为了平衡负电荷突变）的几乎所有可能组合（230/256 种可能变体）。就多种性质进行了文库筛选，并且鉴定了在一种或多种目的性质上具有升高活性的酶变体。

[0183] 在某些实施方案中，一旦对于给定酶确定了最适电荷后，还可以筛选天然分离物以鉴定具有最适电荷 / 电荷分布的酶变体。

[0184] II. 具有改良性质的 NprE 变体的产生

[0185] 将用于 ASP 的方法随后延及至完全不同的蛋白酶主链。产生了 NprE 的 SELs 且就在洗涤剂中的污渍去除性能进行了筛选（参见，引入本文作为参考的美国专利申请序列号 11/581, 102, 因为它与 SELs 有关）。鉴定到具有显著改良的 BMI 清洁性能的突变体。所有的改良突变体给 NprE 分子添加正电荷。电荷平衡方法用于优化 NprE 的净表面电荷和表面电荷分布。在 NprE 的情况下，当分子的总体电荷比野生型蛋白质的总体电荷更正时，显著改善洗涤性能。当蛋白质上的电荷是 +1 或 +2 时，相对于野生型蛋白质，获得对 BMI 的最佳洗涤性能。

[0186] III. 用于产生有利的酶变体的一般方法

[0187] 如本文所描述的，确定了在 BMI 微型布样测定法中的洗涤性能和酶表面上的总体电荷之间的关系。本发明的方法可以用于改良各种酶和蛋白质（例如，淀粉酶、纤维素酶、氧化酶、角质酶、甘露聚糖酶、果胶酶、脂肪酶、蛋白酶和其他酶）的性能。此外，这些方法可以用于改良蛋白质的其他期望性质，包括但不限于，表达、热稳定性、在表面活性剂和 / 或螯合剂中的稳定性、以及 pH- 活性关系。简言之，鉴定位于野生型酶表面上大于约 35% 暴露于溶剂、优选大于约 50% 暴露于溶剂、并且更优选大于约 65% 暴露于溶剂的氨基酸残基，并且制备位点评估文库，在该文库中每个野生型残基被多个其他天然存在的氨基酸置换。此外，注意在一种或多种性质上显示改良性能的变体酶的净电荷改变，以便定义这种结构 - 功能关系。在另外的实施方案中，一旦针对给定酶确定了最适电荷后，筛选天然分离物，以鉴定具有最适电荷和电荷分布的酶变体。

[0188] 实验

[0189] 提供下述实施例以展示且进一步举例说明本发明的某些优选实施方案和方面，不应将这些实施例解释为限制本发明的范围。

[0190] 在随后的实验公开内容中,应用下述缩写: °C(摄氏度);rpm(每分钟转数);H₂O(水);HCl(盐酸);aa和AA(氨基酸);bp(碱基对);kb(千碱基对);kD(千道尔顿);gm(克);μg和ug(微克);mg(毫克);ng(纳克);μl和ul(微升);ml(毫升);mm(毫米);nm(纳米);μm和um(微米);M(摩尔);mM(毫摩尔);μM和uM(微摩尔);U(单位);V(伏特);MW(分子量);sec(秒);min(s)(分钟/复数分钟);hr(s)(小时/复数小时);MgCl₂(氯化镁);NaCl(氯化钠);OD₂₈₀(在280nm处的光密度);OD₄₀₅(在405nm处的光密度);OD₆₀₀(在600nm处的光密度);PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳);EtOH(乙醇);PBS(磷酸盐缓冲盐水)[150mM NaCl、10mM 磷酸钠缓冲液, pH7.2];LAS(月桂基磺酸钠);SDS(十二烷基硫酸钠);Tris(三(羟甲基)氨基甲烷);TAED(N, N, N' N' - 四乙酰乙二胺);BES(polyesstersulfone);MES(2- 吗啉代乙磺酸, 一水合物; f. w. 195.24; Sigma # M-3671);CaCl₂(氯化钙, 无水; f. w. 110.99; Sigma#C-4901);DMF(N, N- 二甲基甲酰胺, f. w. 73.09, d = 0.95);Abz-AGLA-Nba(2- 氨基苯甲酰基 -L- 丙氨酰甘氨酸 -L- 亮氨酸 -L- 丙氨酸 -4- 硝基苄基酰胺, f. w. 583.65; Bachem#H-6675, VWR 目录 #100040-598);SBG1 % (" Super Broth with Glucose " ; 6g Soytone[Difco]、3g 酵母提取物、6g NaCl、6g 葡萄糖);在使用本领域已知的方法灭菌前用 NaOH 将 pH 调整至 7.1;w/v(重量与体积比);v/v(体积与体积比);Npr 和 npr(中性金属蛋白酶);**SEQUEST®**(SEQUEST 数据库搜索程序, University of Washington);Npr 和 npr(中性金属蛋白酶基因);nprE 和 NprE(解淀粉芽孢杆菌中性金属蛋白酶);PMN(纯化的**MULTIFECT®**盒属蛋白酶);MTP(微量滴定板);MS(质谱法);SRI(污渍去除指数);TIGR(美国基因组研究所, The Institute for Genomic Research, Rockville, MD);AATCC(美国纺织化学师与印染师协会);Procter & Gamble(Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH);Amersham(Amersham LifeScience, Inc. Arlington Heights, IL);ICN(ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA);Pierce(Pierce Biotechnology, Rockford, IL);EMPA(Eidgenossische Material Prüfungs und Versuch Anstalt, St.Gallen, 瑞士);CFT(Center for Test Materials, Vlaardingen, The Netherlands);Amicon(Amicon, Inc., Beverly, MA);ATCC(美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA);Becton Dickinson(Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ);Perkin-Elmer(Perkin-Elmer, Wellesley, MA);Rainin(Rainin Instrument, LLC, Woburn, MA);Eppendorf(EppendorfAG, Hamburg, Germany);Waters(Waters, Inc., Milford, MA);Geneart(Geneart GmbH, Regensburg, Germany);Perseptive Biosystems(Perseptive Biosystems, Ramsey, MN);Molecular Probes(MolecularProbes, Eugene, OR);BioRad(BioRad, Richmond, CA);Clontech(CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA);Difco(Difco Laboratories, Detroit, MI);GIBCO BRL 或 Gibco BRL(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD);Epicentre(Epicentre Biotechnologies, Madison, WI);Zymo Research(Zymo Research Corp., Orange, CA);IntegratedDNA Technologies(Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA);New Brunswick(New Brunswick Scientific Company, Inc., Edison, NJ);Thermoelectron(Thermoelectron Corp., Waltham, MA);BMG(BMGLabtech, GmbH, Offenburg, 德国);Novex(Novex, San Diego, CA);Finnzymes(Finnzymes OY, 芬兰);Qiagen(Qiagen, Inc., Valencia, CA);Invitrogen(Invitrogen Corp., Carlsbad,

CA) ;Sigma(SigmaChemical Co., St.Louis, MO) ;DuPont Instruments(Asheville, NY) ; Global Medical Instrumentation 或 GMI(Global Medical Instrumentation ;Ramsey, MN) ;MJ Research(MJ Research, Waltham, MA) ;Infors(Infors AG, Bottmingen, 瑞士) ; Stratagene(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) ;Roche(Hoffmann La Roche, Inc., Nutley, NJ) ;IonBeam Analysis Laboratory(Ion Beam Analysis Laboratory, The University of Surrey Ion Beam Centre(Guildford, UK) ;TOM(Terg-o-Meter, 搅拌式去污力测定仪) ;BMI(血, 乳, 墨) ;BaChem(BaChem AG, Bubendorf, 瑞士) ;Molecular Devices(Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA) ;MicroCal(Microcal, Inc., Northampton, MA) ;ChemicalComputing(Chemical Computing Corp., Montreal, Canada) ; NCBI(美国国立生物技术信息中心) ;GE Healthcare(GE Healthcare, UK)。

[0191] 实施例 1

[0192] 测定法

[0193] 下述测定法在下文描述的实施例中使用。自下文提供的方案的任何偏离在实施例中指出。在这些实验中,使用分光光度计测量在反应完成后形成的产物的吸光度。使用反射计测量布样的反射度。

[0194] A. 用于 96 孔微量滴定板 (MTPs) 中蛋白质含量测定的 BCA 测定法

[0195] 在这些测定法中,BCA(二辛可宁酸 ;Pierce) 测定法用于在 MTP 规模上测定蛋白酶样品中的蛋白质浓度。在这个测定系统中,使用的化学试剂和溶液是 :BCA 蛋白质测定试剂,和 Pierce 稀释缓冲液 (50mM MES, pH6.5, 2mM CaCl_2 , 0.005% **TWEEN®**-80)。使用的设备是 SpectraMAX(型号 340)MTP 阅读器。MTPs 得自 Costar(型号 9017)。在测试中,将 200 μl BCA 试剂吸取到每个孔内,随后为 20 μl 稀释的蛋白质。在充分混合后,使 MTPs 在 37°C 温育 30 分钟。去除气泡,并且在 562nm 处阅读孔内溶液的光密度 (OD)。为了确定蛋白质浓度,从样品读数中扣除本底读数。针对蛋白质标准品 (纯化的蛋白酶) 绘制 OD₅₆₂ 值图,以产生标准曲线。从标准曲线外推出样品的蛋白质浓度。

[0196] B. 用于测试蛋白酶性能的微型布样测定法

[0197] 在这个测定法中使用的洗涤剂不包含酶。使用的设备是 EppendorfThermomixer 和 SpectraMAX(型号 340 ;Molecular Devices)MTP 阅读器。MTPs 得自 Costar(型号 9017)。

[0198] 洗涤剂制剂 (**TIDE®** 2X Ultra, Clean Breeze 液体衣物洗涤剂 (Procter&Gamble) ;美国洗涤条件)

[0199] 将 Milli-Q 水调整至 6gpg 水硬度 ($\text{Ca/Mg} = 3/1$), 并且加入 0.78g/l **TIDE®** 2X Ultra Clean Breeze”。此洗涤剂先前已在 95°C 进行热处理 1 小时,以灭活在制剂中存在的任何酶。搅拌洗涤剂溶液 15 分钟。随后,加入 5mM HEPES(游离酸) 并且将 pH 调整至 8.2。

[0200] 微型布样

[0201] 0.25 英寸圆直径的微型布样得自 CFT Vlaardingen。在切割布样前,用水洗涤织物 (EMPA 116)。在 96 孔微量滴定板的每个孔中放置 1 个微型布样。

[0202] 测试方法

[0203] 如上所述制备期望的洗涤剂溶液。使 Thermomixer 在 25°C 平衡后,向 MTP 的每个含微型布样的孔中加入 190 μl 洗涤剂溶液。向这个混合物中,加入 10 μl 稀释的酶溶液,

使终酶浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ (根据 BCA 测定法确定)。用胶带密封 MTP, 并且置于温育箱中 30 分钟并伴随 1400rpm 的搅动。在合适条件下温育后, 将来自每个孔的 $100 \mu\text{l}$ 溶液转移到新鲜 MTP 内。包含 $100 \mu\text{l}$ 溶液 / 孔的新 MTP 使用 MTP SpectraMax 阅读器在 405nm 处进行读数。还包括空白对照以及包含微型布样和洗涤剂但不含酶的对照。

[0204] 稻淀粉微型布样测定法

[0205] 稻淀粉测定法是对淀粉酶性能的测验。洗涤剂如本文中其他地方所述进行制备。使用的设备包括 New Brunswick Innova 4230 摇床 / 温育箱和 SpectraMAX (型号 340) MTP 阅读器。MTPs 得自 Corning (型号 3641)。陈化的稻淀粉与橙色颜料布样 (CS-28) 得自 Center for Test Materials (Vlaardingen, Netherlands)。在切割 0.25 英寸环状微型布样前, 用水洗涤织物。在 96 孔微量滴定板的每个孔中放置 2 个微型布样。测试洗涤剂在 20°C (北美) 或 40°C (西欧) 平衡, 向 MTP 的每个含微型布样的孔中加入 $190 \mu\text{l}$ 洗涤剂溶液。向这个混合物中, 加入 $10 \mu\text{l}$ 稀释的酶溶液。用粘性箔密封 MTP, 并且置于温育箱中 1 小时同时在期望测试温度 (一般是 20°C 或 40°C) 以 750rpm 搅动。温育后, 将来自每个孔的 $150 \mu\text{l}$ 溶液转移到新鲜 MTP 内。这个 MTP 使用 MTP SpectraMax 阅读器在 488nm 处进行读数, 以量化清洁。还包括空白对照以及包含微型布样和洗涤剂但不含酶的对照。

[0206] 酶性能的计算

[0207] 获得的吸光度值就空白值 (即, 在不存在酶的情况下温育微型布样后获得) 进行校正。所得到的吸光度提供所测试酶的水解活性的量度。

[0208] H. 洗涤剂热灭活

[0209] 通过热灭活商业洗涤剂制剂, 可以破坏任何蛋白质组分的酶促活性同时保留非酶组分的性质。因此, 这个方法适用于准备在测试本发明的酶变体中使用的商购洗涤剂。对于北美 (NA) 和西欧 (WE) 重役型液体衣物 (HDL) 洗涤剂, 热灭活通过将预称重的液体洗涤剂 (在玻璃瓶中) 置于 95°C 水浴中 2 小时来执行。对于北美 (NA) 和日本 (JPN) 重役型颗粒衣物 (HDG) 洗涤剂, 热灭活的温育时间是 8 小时, 对于西欧 (WE) HDG 洗涤剂是 5 小时。用于热灭活 NA 和 WE 自动餐具洗涤 (ADW) 洗涤剂的温育时间是 8 小时。这些洗涤剂购自当地超市店。未加热和加热的洗涤剂均在溶解洗涤剂的 5 分钟内进行测定, 以精确测定失活百分比。通过 suc-AAPF-pNA 测定法测定酶活性。

[0210] 对于在热灭活的洗涤剂中测试酶活性, 由热灭活母液制备洗涤剂的工作溶液。将合适的水硬度 (6gpg 或 12gpg) 和缓冲剂加入洗涤剂溶液中以匹配期望条件 (表 1-1)。溶液通过涡旋或颠倒瓶子进行混合。

[0211]

表 1-1. 衣物和餐具洗涤条件

地区	形式	剂量	洗涤剂*	缓冲剂	Gpg	pH	T(°C)
衣物 (重役型液体和颗粒)							
NA	HDL	0.78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0 g/l	Henkel Persil	5 mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8.0 g/l	P&G Ariel	2 mM Na ₂ CO ₃	12	10.5	40
JPN	HDG	0.7 g/l	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
NA	HDG	1.0 g/l	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
自动餐具洗涤							
WE	ADW	3.0 g/l	RB Calgonit	2 mM Na ₂ CO ₃	21	10.0	40
NA	ADW	3.0 g/l	P&G Cascade	2 mM Na ₂ CO ₃	9	10.0	40

[0212] *缩写:Procter & Gamble(P&G);和 Reckitt Benckiser(RB)。

[0213] 用于测定淀粉酶活性的 Bodipy 淀粉测定法

[0214] 使用 **EnzChek®** Ultra Amylase Assay Kit (E33651, Invitrogen) 执行 Bodipy 淀粉测定法。通过使包含冻干底物的小瓶内容物溶解于 100 μ L pH4.0 的 50mM 乙酸钠缓冲液中, 制备 DQ 淀粉底物的 1mg/mL 贮存液。涡旋小瓶约 20 秒, 留置室温黑暗中伴随偶尔的混合直至溶解。加入 900 μ L 测定缓冲液 (具有 2.6mM CaCl₂ pH5.8 的 50mM 乙酸钠), 涡旋小瓶约 20 秒。底物溶液贮藏在室温黑暗中直至临用前, 或贮藏在 4°C。对于该测定法, 在测定缓冲液中由 1mg/mL 底物溶液制备 100 μ g/mL 的 DQ 底物工作溶液。将 190 μ L 100 μ g/mL 底物溶液加入 96 孔平底微量滴定板的每个孔中。将 10 μ L 酶样品加入孔中, 使用恒温混匀器以 800rpms 混合 30 秒。在测定中包括仅包含缓冲液和底物的空白样品 (无酶空白)。在荧光微量滴定板阅读器中在 25°C 测量荧光强度的改变速率 5 分钟 (激发: 485nm, 发射: 520nm)。

[0215] K. 测定由淀粉酶引起的淀粉粘度下降

[0216] 在这个测定法, 在粘度计中测量玉米淀粉底物溶液的粘度减少。玉米淀粉底物浆以分批方式由 30% 玉米面粉干固形物在蒸馏水中新鲜配制, 并且使用硫酸调整至 pH5.8。对于每次运行, 称出 50 克浆 (15 克干固形物), 并且预温育 10 分钟以预热至 70°C。在淀粉酶加入后, 使温度立即从 70°C 升高到 85°C, 伴随 75rpm 的旋转速度。浆和淀粉酶的混合物的温度达到 85°C 后, 使温度保持恒定, 并且监控粘度另外 30 分钟。

[0217] 实施例 2

[0218] 在枯草芽孢杆菌中生产 NprE 蛋白酶

[0219] 在这个实施例中, 描述了在枯草芽孢杆菌中生产 NprE 蛋白酶的实验。特别地, 提供了用于将质粒 pUBnprE 转化到枯草芽孢杆菌内的方法。转化如本领域已知的进行 (参见例如, 引入本文作为参考的 WO 02/14490 和美国专利申请序列号 11/581, 102)。下文提供的 DNA 序列 (来自解淀粉芽孢杆菌的 nprE 引导区、nprE 前序列和 nprE 成熟 DNA 序列) 编码 NprE 前体蛋白质:

[0220] GTGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCTGTTGCTGTCGCCGCTTCCTTTATGAGTTTAACCATCAGTCTGCCG
GGTGTTCAGGCCGCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTGACGAATTTTGTACCGAAGCATTCTTTGGTGCAATC
AGAATTGCCTTCTGTCAAGTACAAAAGCTATCAAGCAATACTTGAAACAAAACGGCAAAGTCTTTAAAGGCAATCCTT
CTGAAAGATTGAAGCTGATTGACCAACGACCGATGATCTCGGCTACAAGCACTTCCGTTATGTGCCTGTGCTAAAC
GGTGTGCCTGTGAAAGACTCTCAAGTCATTATTCACGTCGATAAAATCCAACAACGTCTATGCGATTAAACGGTGAATT
AAACAACGATGTTTCCGCCAAAACGGCAAAACAGCAAAAAATTTATCTGCAAAATCAGGCGCTGGATCATGCTTATAAAG
CGATCGGCAAAATCACCTGAAGCCGTTTCTAACGGAACCGTTGCAACAAAACAAAGCCGAGCTGAAAGCAGCAGCC
ACAAAAGACGGCAAAATACCGCCTCGCCTATGATGTAACCATCCGCTACATCGAACCGGAACCTGCAAACTGGGAAGT
AACCCTTGATGCGGAAACAGGAAAAATCCTGAAAAAGCAAAACAAAGTGGAGCAT **GCCGCCACA**
ACCGGAACAGGTACGACTCTTAAAGGAAAAACGGTCTCATTAAATATTTCTTCT
GAAAGCGGCAAATATGTGCTGCGCGATCTTTCTAAACCTACCGGAACACAAAT
TATTACGTACGATCTGCAAAACCGCGAGTATAACCTGCCGGGCACACTCGTAT
CCAGCACCACAAACCAGTTTACAACCTTCTTCTCAGCGCGCTGCCGTTGATGCG
CATTACAACCTCGGCAAAGTGTATGATTATTTCTATCAGAAGTTTAATCGCAAC
AGCTACGACAATAAAGGCGGCAAGATCGTATCCTCCGTTTATTACGGCAGCAG
ATACAATAACGCAGCCTGGATCGGCGACCAAATGATTTACGGTGACGGCGACG
GTTTATTCTTCTCACCTCTTTCCGGTTCAATGGACGTAACCGCTCATGAAATGA
CACATGGCGTTACACAGGAAACAGCCAACCTGAACTACGAAAATCAGCCGGGC
GCTTTAAACGAATCCTTCTCTGATGTATTCCGGTACTTCAACGATACTGAGGAC
TGGGATATCGGTGAAGATATTACGGTCAGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCTTATC
CAATCCGACAAAATACGGACAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAACCTTCC
GAACACTGATGCCGGCGACTACGGCGGCGTGCATACAAACAGCGGAATCCCCG
AACAAAGCCGCTTACAATACGATTACAAAATCGGCGTGAACAAAGCGGAGCA
GATTTACTATCGTGCTCTGACGGTATACCTCACTCCGTCATCAACTTTTAAAGA
TGCAAAAGCCGCTTTGATTCAATCTGCGCGGGACCTTTACGGCTCTCAAGATG
CTGCAAGCGTAGAAGCTGCCTGGAATGCAGTCGGATTG TAA (SEQ ID NO :1)

[0221] 在上文序列中,粗体指示编码成熟 NprE 蛋白酶的 DNA,标准字体指示引导序列 (nprE 引导区),带下划线的指示前序列 (nprE 前)。下文提供的氨基酸序列 (NprE 引导区、NprE 前和 NprE 成熟 DNA 序列) (SEQID NO :2) 与全长 NprE 蛋白质对应。在这个序列中,下划线指示前序列,粗体指示成熟 NprE 蛋白酶。

[0222] MGLGKKLSVAVAA SFMSLTISLPGVQA AENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPSVSDKAIKQYLKQNGK
VFKNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFRYPVVNGVPVKDSQVI IHVDKSNNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQ
ALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNKAELKAAATKDGKYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVDAETGKILKKQNKVE
H **AATTGTGTTL**

**KGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTNQFTTSSQ
RAAVDAHYNLGVYDYFYQKFNRNSYDNKGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMI
YGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFN
DTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGI
PNKAAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPTSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAAS
VEAAWNAVGL** (SEQ ID NO :2)

[0223] 成熟 NprE 序列如 SEQ ID NO :3 所示。这个序列用作制备本文描述的变体文库的基础。

[0224] AATTGTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTNQFTTSSQ
RAAVDAHYNLGVYDYFYQKFNRNSYDNKGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHE
MTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNT
DAGDYGGVHTNSGIPNKAAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPTSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASVEAA
WNAVGL (SEQ ID NO :3)

[0225] 通过 PCR, 使用 2 个特异性引物 ;

[0226] Oligo AB 1740 :CTGCAGGAATTCAGATCTTAACATTTTTCCCCTATCATTTTTCCCG (SEQ ID NO :4)

[0227] Oligo AB 1741 :GGATCCAAGCTTCCCGGAAAAGACATATATGATCATGGTGAAGCC (SEQ ID NO :5)

[0228] 自解淀粉芽孢杆菌的染色体 DNA 扩增 nprE 基因, 构建了 pUBnprE 表达载体。

[0229] 在热循环仪中用 Phusion 高保真 DNA 聚合酶 (FINNZYMES) 执行 PCR。PCR 混合物包含 10 μ l 5x 缓冲液 (Finnzymes Phusion), 1 μ l 10mM dNTP、1.5 μ l DMSO、每种引物各 1 μ l、1 μ l Finnzymes Phusion DNA 聚合酶、1 μ l 染色体 DNA 溶液 50ng/ μ l、34.5 μ l MilliQ 水。使用下述方案 :

[0230] PCR 方案 :

[0231] 1) 98°C 30 秒 ;

[0232] 2) 98°C 10 秒 ;

[0233] 3) 55°C 20 秒 ;

[0234] 4) 72°C 1 分钟 ;

[0235] 5) 步骤 2 至 4 的 25 个循环 ; 和

[0236] 6) 72°C 5 分钟。

[0237] 这导致 1.9kb DNA 片段, 所述 DNA 片段使用 BglIII 和 BclI DNA 限制酶进行消化。多拷贝芽孢杆菌载体 pUB110 (参见例如, Gryczan, JBacteriol, 134 :318-329 [1978]) 用 BamHI 消化。PCR 片段 x BglIII x BclI 随后在 pUB110x BamHI 载体中连接, 以形成 pUBnprE 表达载体。

[0238] 用 pUBnprE 转化枯草芽孢杆菌 (Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIIE, degUHy32, Δ amy:: (xylR, pxylA-comK)) 菌株。进入枯草芽孢杆菌内的转化如引入本文作为参考的 WO 02/14490 中所述执行。在包含具 25mg/L 新霉素的 25ml MBD 培养基 (基于 MOPS 的确定成分培养基) 的摇瓶中, 选择性生长包含该 pUBnprE 载体的枯草芽孢杆菌转化体。MBD 培养基基本上如本领域已知的进行制备 (参见, Neidhardt 等人, J Bacteriol, 119 :

736-747[1974]),除了从基本培养基中排除 NH_4Cl_2 、 FeSO_4 和 CaCl_2 ,并且使用 3mM K_2HPO_4 ,向基础培养基补充 60mM 尿素、75g/L 葡萄糖和 1%大豆脲(soytone)。此外,微量营养素配制为 100X 贮存液,在 1 升中包含:400mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、50mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、10ml 1M CaCl_2 和 10ml 0.5M 柠檬酸钠。培养物在 37°C 在培养箱/摇床(Infors)中温育 3 天。如通过蛋白酶测定法证实的,此培养导致产生具有蛋白水解活性的分泌性 NprE 蛋白酶。使用 NuPageNovex 10% Bis-Tris 凝胶(Invitrogen,目录号 NP0301BOX)执行凝胶分析。为了制备用于分析的样品,2 体积的上清液与 1 体积 1M HCl 、1 体积 4xLDS 样品缓冲液(Invitrogen,目录号 NP0007)和 1% PMSF(20mg/ml)混合,并且随后在 70°C 加热 10 分钟。随后将每种样品各 25 μL ,连同 10 μL SeeBlue plus 2 预染蛋白质标准(Invitrogen,目录号 LC5925),加样到凝胶上。结果清楚地证实,本实施例描述的 nprE 克隆策略适合于在枯草芽孢杆菌中生产活性 NprE。

[0239] 实施例 3

[0240] 在枯草芽孢杆菌中生产 ASP 蛋白酶

[0241] 在本实施例中,描述了在枯草芽孢杆菌中生产 69B4 蛋白酶(在本文中也称为“ASP”、“Asp”和“ASP 蛋白酶”和“Asp 蛋白酶”)的实验。特别地,提供用于将质粒 pHPLT-ASP-C1-2 转化到枯草芽孢杆菌内的方法。转化如本领域已知的进行(参见例如引入本文作为参考的 WO 02/14490 和美国专利申请序列号 11/583,334)。为了优化在枯草芽孢杆菌中的 ASP 表达,通过 DNA2.0 产生合成的 DNA 序列,并且在这些表达实验中使用。下文提供的 DNA 序列(合成的 ASP DNA 序列),具有适应于芽孢杆菌属物种的密码子使用,编码野生型 ASP 前体蛋白质:

[0242] ATGACACCACGAACTGTCACAAGAGCTCTGGCTGTGGCAACAGCAGCTGCTACACTCTTGGCTGGGG
GTATGGCAGCACAAAGCTAACGAACCGGCTCCTCCAGGATCTGCATCAGCCCCTCCACGATTAGCTGAAAACTTG
ACCCTGACTTACTTGAAGCAATGGAACGCGATCTGGGGTTAGATGCAGAGGAAGCAGCTGCAACGTTAGCTTTTC
AGCATGACGCAGCTGAAACGGGAGAGGCTCTTGCTGAGGAACTCGACGAAGATTTTCGCGGGCACGTGGGTTGAAG
ATGATGTGCTGTATGTTGCAACCACTGATGAAGATGCTGTTGAAGAAGTCGAAGGCGAAGGAGCAACTGCTGTGA
CTGTTGAGCATTCTCTTGCTGATTTAGAGGCGTGGAAGACGGTTTTTGATGCTGCGCTGGAGGGTCATGATGATG
TGCCTACGTGGTACGTCGACGTGCCTACGAATTCGGTAGTCGTTGCTGTAAAGGCAGGAGCGCAGGATGTAGCTG
CAGGACTTGTGGAAGGCGCTGATGTGCCATCAGATGCGGTCACTTTTGTAGAAACGGACGAAACGCCTAGAACGAT
G**TTCGACGTAATTGGAGGCAAC**
GCATATACTATTGGCGGCCGGTCTAGATGTTCTATCGGATTCGCAGTAAACGG
TGGCTTCATTACTGCCGGTCACTGCGGAAGAACAGGAGCCACTACTGCCAATC

CGACTGGCACATTTGCAGGTAGCTCGTTTCCGGGAAATGATTATGCATTCGTC
CGAACAGGGGCAGGAGTAAATTTGCTTGCCCAAGTCAATACTACTCGGGCGG
CAGAGTCCAAGTAGCAGGACATACGGCCGCACCAGTTGGATCTGCTGTATGCC
GCTCAGGTAGCACTACAGGTTGGCATTGCGGAACTATCACGGCGCTGAATTCTG
TCTGTCACGTATCCAGAGGGAACAGTCCGAGGACTTATCCGCACGACGGTTTG
TGCCGAACCAGGTGATAGCGGAGGTAGCCTTTTAGCGGGAAATCAAGCCCAAG
GTGTCACGTCAGGTGGTTCTGGAAATTGTCGGACGGGGGGAACAACATTCTTT
CAACCAGTCAACCCGATTTTGCAGGCTTACGGCCTGAGAATGATTACGACTGA
CTCTGGAAGTTCCCCT GCTCCAGCACCTACATCATGTACAGGCTACGCAAGAACGTTACAGGAACCT
CGCAGCAGGAAGAGCAGCAGCTCAACCGAACGGTAGCTATGTTACAGTCAACCGAGCGGTACACATTCCGTCTGTC
TCAATGGACCTAGCGGTGCGGACTTTGATTTGTATGTGCAGCGATGGAATGGCAGTAGCTGGGTAACCGTCGCTCAA
TCGACATCGCCGGAAGCAATGAAACCATTACGTACCGCGGAAATGCTGGATATTATCGCTACGTGGTTAACGCTGC
GTCAGGATCAGGAGCTTACACAATGGGACTCACCTCCCCTGA (SEQ ID NO :6)

[0243] 在上文序列中,粗体指示编码成熟 ASP 蛋白酶的 DNA,标准字体指示引导序列 (ASP 引导区),下划线指示 N 末端和 C 末端前序列。下文提供的氨基酸序列 (SEQ ID NO :7) 与全长 ASP 蛋白质对应。在这个序列中,下划线指示前序列,粗体指示成熟 ASP 蛋白酶。

[0244] MTPRTVTRALAVATAAATLLAGGMAAQANEPAPPGSASAPPRLAEKLDPDLLEAMERDLGL
DAEEAAATLAFQHDAETGEALAEELDEDFAGTWVEDDVLYVATTDEDAVEEVEGEGATAVTVEHSLA
DLEAWKTVLDAALEGHDDVPTWYVDVPTNSVVAVKAGAQDVAAGLVEGADVPSDAVTFVETDETPRT
FDVIGGNAYTIGGRSRCSIGFAVNGGFITA
GHCGRTGATTANPTGTFAGSSFPGNDYAFVRTGAGVNLLAQVNNYSGGRVQVAG
HTAAPVGSACVCRSGSTTGWHCGTITALNSSVTYPEGTVRGLIRTTVCAEPGDSGGS
LLAGNQAQGVTSGGSGNCRTGGTTFFQPVNPILQAYGLRMITTDSGSSP APAPTSC
TGYARTFTGTLAAGRAAAQPNGSYVQVNRSGTHSVCLNGPSGADFDLYVQRWNGSSWVTVAQSTSPGSNETITYRGN
AGYYRYVVNAASGSGAYTMGLTLP (SEQ ID NO :7)

[0245] 成熟 ASP 序列如 SEQ ID NO :8 所示。这个序列用作制备本文描述的变体文库的基础。

[0246] FDVIGGNAYTIGGRSRCSIGFAVNGGFITAGHCGRTGATTANPTGTFAGSSFPGNDYAFVRTGAGVNLL
AQVNNYSGGRVQVAGHTAAPVGSACVCRSGSTTGWHCGTITALNSSVTYPEGTVRGLIRTTVCAEPGDSGGSLLAGNQ
AQGVTSGGSGNCRTGGTTFFQPVNPILQAYGLRMITTDSGSSP (SEQ ID NO :8)

[0247] 在 pXX-KpnI 载体中构建 Asp 表达盒,并且随后克隆到 pHPLT 载体内用于在枯草芽孢杆菌中表达 ASP。pXX-KpnI 是基于 pUC 的载体,具有驱动表达的 aprE 启动子 (枯草芽孢杆菌)、cat 基因、和重复 aprE 启动子用于在枯草芽孢杆菌中扩增拷贝数。bla 基因允许在大肠杆菌中的选择性生长。在 aprE 启动子区下游核糖体结合位点中引入的 KpnI,连同 HindIII 位点一起,使得能够在 pXX-KpnI 中克隆 Asp 表达盒。pHPLT-EBS2c2, pHPLT 的衍生物 (Solingen 等人, Extremophiles 5 :333-341 [2001]), 包含地衣芽孢杆菌的热稳定淀粉酶 LAT 启动子 (P_{LAT}), 随后为用于克隆 ASP 表达构建体的 XbaI 和 HpaI 限制位点。将 Asp 表达盒克隆在包含编码杂合信号肽 (SEQ ID NO :9) 的 DNA 的 pXX-KpnI 载体中,所述杂合信

号肽由 5 个枯草杆菌蛋白酶 AprE N 端信号肽氨基酸融合 25 个 Asp C 端信号肽氨基酸而构成：

[0248] MRSKKRTVTRALAVATAAATLLAGGMAAQA (SEQ ID NO :9)。

[0249] 杂合 ASP 信号肽由下述 DNA 序列编码：

[0250] ATGAGAAGCAAGAAGCGAACTGTCACAAGAGCTCTGGCTGTGGCAACAGCAGCTGCTACACTCTTGGCTGGGGGTATGGCAGCACAAGCT (SEQ ID NO :10)

[0251] 将在 pXX-KpnI 载体中克隆的 Asp 表达盒转化到大肠杆菌 (Electromax DH10B, Invitrogen, 目录号 12033-015) 内。使用的引物和克隆策略在下文提供。随后, 从这些载体中克隆表达盒并且引入 pHPLT 表达载体内用于转化枯草芽孢杆菌 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$) 菌株内。关于在 pHPLT 中克隆 ASP 表达盒的引物和克隆策略也在下文提供。

[0252] 引物得自 MWG 和 Invitrogen。根据 Invitrogen 的方案, InvitrogenPlatinum Taq DNA 聚合酶 High Fidelity (目录号 11304-029) 用于 PCR 扩增 (0.2 μ M 引物, 25 个至 30 个循环)。Asp 表达盒和宿主载体的连接酶反应, 通过利用推荐用于粘性末端的一般克隆的方案, 使用 Invitrogen T4DNA 连接酶 (目录号 15224-025) 来完成。

[0253] 在枯草芽孢杆菌菌株 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$) 中研究 asp 基因的表达。将质粒 pHPLT-ASP-C1-2 转化到枯草芽孢杆菌 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$) 内。转化如本领域已知的进行 (参见例如, 引入本文作为参考的 WO 02/14490)。

[0254] 在包含 25ml Synthetic Maxatase 培养基 (SMM) 的摇瓶中, 选择性生长包含 pHPLT-ASP-C1-2 载体的枯草芽孢杆菌 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$) 转化体, 所述培养基具有 0.97g/1CaCl₂·6H₂O 代替 0.5g/1CaCl₂ (参见, 引入本文作为参考的美国专利号 5,324,653) 并具有 20mg/L 新霉素。这种生长导致产生具有蛋白水解活性的分泌性 ASP。使用 NuPage Novex 10% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen, 目录号 NP0301BOX) 执行凝胶分析。为了制备用于分析的样品, 使 2 体积的上清液与 1 体积 1M HCl、1 体积 4xLDS 样品缓冲液 (Invitrogen, 目录号 NP0007) 和 1% PMSF (20mg/ml) 混合, 并且随后在 70°C 加热 10 分钟。随后将每种样品各 25 μ L, 连同 10 μ L SeeBlue plus 2 预染蛋白质标准 (Invitrogen, 目录号 LC5925), 加样到凝胶上。结果清楚地证实本实施例描述的 asp 克隆策略适合于在枯草芽孢杆菌中生产活性 Asp。

[0255]

表 3-1. 在 pXX-KpnI 和 p2JM103-DNNDPI 中的 ASP

载体构建体	引物	DNA 模板	宿主载体	限制性位点
pXX-ASP-4	ASP-PreCross-I-FW TCATGCAGGGTACCATGAGAAGCA AGAAGCGAACTGTCACAAGAGCTC TGGCT (SEQ IN NO: 11) ASP-syntc-mature-RV GTGTGCAAGCTTTCAAGGGGAACT TCCAGAGTCAGTC (SEQ ID NO: 12)	ASP 合成 DNA 序列	pXX-KpnI	<i>KpnI</i> x <i>HindIII</i>

[0256]

表 3-2. 在 pHPLT 中的 ASP 表达盒

载体构建体	引物	DNA 模板	宿主载体	限制性位点
pHPLT-ASP-C1-2	ASP-Cross-1&2-FW TGAGCTGCTAGCAAAAGGAGAGGG TAAAGAATGAGAAGCAAGAAG (SEQ IN NO: 13) pHPLT-ASPmat-RV CATGCATCCCGGGTTAAGGGGAAC TTCCAGAGTCAGTC (SEQ ID NO: 14)	pXX-ASP-4	PHPLT-EBS2c2(<i>XbaI</i> x <i>HpaI</i>)	<i>NheI</i> x <i>SmaI</i>

[0257] 实施例 4

[0258] 产生位点评估文库 (SELS) 和位点饱和诱变文库 (SSMLs) 在本实施例中,描述了用于构建 nprE 和 asp SELs 的方法。

[0259] A. nprE SELs 的产生

[0260] 包含上文描述的 nprE 表达盒的 pUBnprE 载体充当模板 DNA。此载体包含单 BglIII 限制位点,其用于位点评估文库的构建。简言之,为了构建 nprE 位点评估文库,执行 3 个 PCR 反应,包括 2 个诱变 PCRs 以将目的突变密码子引入成熟 nprE DNA 序列内,以及用于融合该 2 个诱变 PCR 的第 3 个 PCR 以便构建在成熟 nprE 序列中包括期望突变密码子的 pUBnprE 表达载体。

[0261] 诱变方法基于密码子特异性突变方法,其中使用包围特异设计的三联 DNA 序列 NNS (N = A、C、T 或 G; 和 S = C 或 G) 的长 25-45 个核苷酸的正向和反向寡核苷酸引物,在特定 DNA 三联体中一次性产生所有可能的突变,所述三联 DNA 序列 NNS 与待突变密码子的序列对应,并且保证在该特定 nprE 成熟密码子处随机掺入核苷酸。引物名称中列出的数字与该特定 nprE 成熟密码子的位置对应。评估的位点包括: 4、12、13、14、23、24、33、45、46、47、49、50、54、58、59、60、65、66、87、90、96、97、100、186、196、211、214、228 和 280。引物序列的示例性列表在引入本文作为参考的美国专利申请序列号 11/581, 102 中描述。

[0262] 2 个另外的引物用于构建包含 BglIII 限制位点连同侧接 BglIII 限制位点的部分 pUBnprE DNA 序列的位点评估文库。这些引物由 Invitrogen 生产 (50nmole 级,脱盐的):

[0263] pUB-BglIII-FW GTCAGTCAGATCTTCCTTCAGGTTATGACC(SEQ ID NO:15); 和 pUB-BglIII-RV GTCTCGAAGATCTGATTGCTTAAGTCTTC(SEQ ID NO:16)。

[0264] 每个 SEL 的构建都从 2 个初步 PCR 扩增开始,所述 PCR 扩增使用 pUB-BglIII-FW 引物和特定 nprE 反向诱变引物。对于第二个 PCR,使用 pUB-BglIII-RV 引物和特定 nprE 正向诱变引物(对于正向和反向诱变引物,具有等同的 nprE 成熟密码子位置)。

[0265] 使用 Phusion 高保真 DNA 聚合酶(Finnzymes;目录号 F-530L)在成熟 nprE 序列中引入突变。所有 PCRs 根据与聚合酶一起提供的 Finnzymes 方案进行。用于该初步 PCRs 的 PCR 条件是:

[0266] 对于初步 PCR 1:

[0267] pUB-BglIII-FW 引物和特定 NPPE 反向诱变引物 - 两者都是 1 μ L(10 μ M);

[0268] 对于初步 PCR 2:

[0269] pUB-BglIII-RV 引物和特定 NPPE 正向诱变引物 - 两者都是 1 μ L(10 μ M);以及

[0270] 5x Phusion HF 缓冲液 10 μ L

[0271] 10mM dNTP 混合物 1 μ L

[0272] Phusion DNA 聚合酶 0.75 μ L(2 单位/ μ L)

[0273] DMSO,100% 1 μ L

[0274] pUBnprE 模板 DNA 1 μ L(0.1-1ng/ μ L)

[0275] 高压灭菌蒸馏水 至 50 μ L

[0276] PCR 程序是:98°C 30 秒,30x(98°C 10 秒、55°C 20 秒、72°C 1.5 分钟)和 72°C 5 分钟,在 PTC-200Peltier 热循环仪(MJ Research)中执行。PCR 实验导致约 2-3kb 的 2 个片段,其具有围绕目的 NprE 成熟密码子的约 30 个核苷酸碱基重叠。片段在第三 PCR 反应中融合,其中使用这 2 个前述片段以及正向和反向 BglIII 引物。融合 PCR 反应在下述溶液中进行:

[0277] pUB-BglIII-FW 引物和 pUB-BglIII-RV 引物 - 两者都是 1 μ L(10 μ M) 连同

[0278] 5x Phusion HF 缓冲液 10 μ L

[0279] 10mM dNTP 混合物 1 μ L

[0280] Phusion DNA 聚合酶 0.75 μ L(2 单位/ μ L)

[0281] DMSO,100% 1 μ L

[0282] 初步 PCR 1 反应混合物 1 μ L

[0283] 初步 PCR 2 反应混合物 1 μ L

[0284] 高压灭菌蒸馏水 至 50 μ L

[0285] PCR 融合程序如下:98°C 30 秒,30x(98°C 10 秒、55°C 20 秒、72°C 2 分 40 秒)和 72°C 5 分钟,在 PTC-200Peltier 热循环仪(MJResearch)中执行。

[0286] 使用 **QIAQUICK®** PCR 纯化试剂盒(Qiagen,目录号 28106)纯化扩增的线性 6.5Kb 片段,并且用 BglIII 限制酶消化,以在融合片段的 2 侧产生粘性末端:

[0287] -35 μ L 纯化的线性 DNA 片段

[0288] -4 μ L **REACT®** 3 缓冲液(Invitrogen)

[0289] -1 μ L BglIII,10 单位/ml(Invitrogen)

[0290] 反应条件:1 小时,30°C。

[0291] BglIII 消化且使用 **QIAQUICK®** PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, 目录号 28106) 纯化的片段的连接, 导致包含期望突变的环状多体 DNA:

[0292] -30 μ L 纯化的 BglIII 消化的 DNA 片段

[0293] -8 μ L T4DNA 连接酶缓冲液 (Invitrogen 目录号 46300-018)

[0294] -1 μ L T4DNA 连接酶, 1 单位/ μ L (Invitrogen 目录号 15224-017)

[0295] 反应条件: 16-20 小时, 16°C。

[0296] 随后, 将连接混合物转化到枯草芽孢杆菌 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$ 菌株内。如引入本文作为参考的 WO 02/14490 中所述, 转化枯草芽孢杆菌。对于每个文库, 挑选 96 个单菌落, 并且在具有新霉素和 1.25g/L 酵母提取物的 MOPS 培养基中生长以用于序列分析 (BaseClear) 和筛选目的。每个文库包括最多 19 种 $nprE$ 位点特异性变体。

[0297] 通过在 96 孔 MTP 中, 在具有 20mg/L 新霉素和 1.25g/L 酵母提取物的 MBD 培养基中, 37°C 生长枯草芽孢杆菌 SEL 转化体 68 小时, 产生变体。

[0298] B. Asp SSMLs 的产生

[0299] 在本实施例中, 描述了产生 Asp 的位点饱和诱变文库 (SSML) 的实验。每个位点饱和 Asp 文库各自包含 96 个具有 pHPLT-ASP-c1-2 表达载体的枯草芽孢杆菌 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$ 克隆。发现包含 Asp 表达盒的这种载体能够表达下文所示的蛋白质 (信号肽和前体蛋白酶) 并且分泌成熟 Asp 蛋白酶, 所述 Asp 表达盒由编码 Asp 杂合信号肽以及 Asp N 端前序列和成熟蛋白质的合成 DNA 组成。

[0300] MTPRTVTRALAVATAAATLLAGGMAAQANEPAPPGSASAPPRLAEKLDPLLEAMERDLGLDAEEAAATLAFQHDAETGEALAEELDEDFAGTWVEDDVLVYVATTDEDAEEVEGEGATAVTVEHSLADLEAWKTVLDAALEGHDVPTWYVDVPTNSVVVAVKAGAQDVAAGLVEGADVPSDAVTFVETDETPRTMFDVIGGNAYTIGGRSRCSIGFAVNGGFITAGHCGRTGATTANPTGTGTFAGSSFPNDYAFVRTGAGVNLLAQVNNYSGGRVQVAGHTAAPVGSVAVCRSGSTTGWHCGTITALNSSVTYPEGTVRGLIRTTVCAEPGDSGGSLLAGNQAQGVTSGGSGNCRTGGTTFFQPVNPILQAYGLRMITTDSGSSP (SEQ ID NO: 17)

[0301] 使用 pHPLT-ASP-C1-2 表达载体作为模板, 完成 189 个 Asp 位点饱和诱变文库 (SSMLs) 的构建。在这些实验中使用的诱变引物在与待突变的 Asp 成熟序列密码子对应的位置处均含有三联 DNA 序列代码 NNS (N = A、C、T 或 G; 和 S = C 或 G), 保证了在该位置处随机掺入核苷酸。每个 SSM 文库的构建都从 2 个 PCR 扩增开始, 所述 PCR 扩增使用 pHPLT-BglIII-FW 引物和特定反向诱变引物、以及 pHPLT-BglIII-RV 引物和特定正向诱变引物 (对于诱变引物, 具有等同的位置)。特定正向和反向引物序列的示例性列表在 WO 2005/052146 中描述, 因为它与引物序列有关, 引入本文作为参考。pHPLT-BglIII-FW 引物的序列示于 SEQ ID NO: 18 (GCAATCAGATCTTCCTTCAGGTTATGACC); 并且 pHPLT-BglIII-RV 引物的序列示于 SEQ ID NO: 19 (GCATCGAAGATCTGATTGCTTAAGTCTTC)。

[0302] 根据制造商提供的方案, 用 Platinum Taq DNA 聚合酶 High Fidelity (Invitrogen, 目录号 11304-029) 实施 PCR 扩增 (0.2 μ M 引物, 20 至 30 个循环)。简言之, 将两者都靶向相同密码子的 2 个特定 PCR 混合物的 1 μ L 扩增 DNA 片段加入 48 μ L 新鲜的 PCR 反应溶液中, 并加入引物 pHPLT-BglIII-FW 和 pHPLT-BglIII-RV。这种融合 PCR

扩增(22个循环)导致线性 pHPLT-ASP-c1-2DNA 片段,具有随机突变的特定 Asp 成熟密码子和在 2 个末端上的单 BglIII 限制位点。纯化这个 DNA 片段(Qiagen PCR 纯化试剂盒,目录号 28106),用 BglIII 消化,再执行纯化步骤和连接反应(Invitrogen T4DNA 连接酶(目录号 15224-025),产生环状多体 DNA,其随后转化到枯草芽孢杆菌($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR,pxyIA-comK)$)内。对于每个文库,在 37°C 过夜温育后,从具有 20mg/L 新霉素的 Heart Infusion 琼脂平板中挑选 96 个单菌落,并且在具有 20mg/ml 新霉素和 1.25g/L 酵母提取物的 MOPS 培养基(关于本文使用的确切培养基配方,参见引入本文作为参考的 WO 03/062380)中 37°C 生长 4 天。为筛选目的,对于每个菌落,进行序列分析(BaseClear)和测定蛋白酶表达。文库编号为 1 至 189,其中每个编号代表随机突变的成熟 Asp 序列密码子。在选择后,每个文库包括最多 19 种 Asp 蛋白酶变体。

[0303] 实施例 5

[0304] 经由定点诱变产生变体蛋白酶

[0305] 在本实施例中,描述了使用 **QUIKCHANGE®** Multi 定点诱变试剂盒(Stratagene)产生 $nprE$ SEL 的方法。然而,此处提供的方法也适于产生其他目的酶(例如,Asp)的 SELs。如在上文实施例 4 中,包含 $nprE$ 表达盒的 pUB $nprE$ 载体充当模板 DNA 源用于产生 $nprE$ SELs 和 $NprE$ 变体。2 种方法之间的主要差异在于,这种方法要求使用互补定点诱变引物扩增整个载体。

[0306] 材料:

[0307] 包含 pUB $nprE$ 载体的芽孢杆菌菌株

[0308] Qiagen Plasmid Midi 试剂盒(Qiagen 目录号 12143)

[0309] Ready-Lyse 溶菌酶(Epicentre 目录号 R1802M)

[0310] dam 甲基化酶试剂盒(New England Biolabs 目录号 M0222L)

[0311] Zymoclean 凝胶 DNA 回收试剂盒(Zymo Research 目录号 D4001)

[0312] $nprE$ 定点诱变引物,100nmole 级,5' 磷酸化的, PAGE 纯化的(Integrated DNA Technologies)

[0313] **QUIKCHANGE®** Multi 定点诱变试剂盒(Stratagene 目录号 200514)

[0314] MJ Research PTC-200Peltier 热循环仪(Bio-Rad Laboratories)

[0315] 1.2%琼脂糖 E-凝胶(Invitrogen 目录号 G5018-01)

[0316] TempliPhi 扩增试剂盒(GE Healthcare 目录号 25-6400-10)

[0317] 感受态枯草芽孢杆菌细胞($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR,pxyIA-comK)$)

[0318] 方法:

[0319] 为了获得包含一个突变的 pUB $nprE$ 质粒(通过如上文在实施例 4 中和在引入本文作为参考的美国专利申请序列号 11/581,102 中描述的 $nprE$ SEL 筛选而鉴定),将每个目的芽孢杆菌菌株的单菌落用于接种 5ml LB+10ppm 新霉素试管(例如,起子培养物)。培养物在 37°C 和 225rpm 振荡下生长 6 小时。随后,用 1ml 起子培养物接种 100ml 新鲜的 LB+10ppm 新霉素。该培养物在 37°C 和 225rpm 振荡下生长过夜。此温育后,通过足够的离心收获细胞沉淀,以提供细胞沉淀物。将细胞沉淀物重悬浮于 10ml 缓冲液 P1(Qiagen Plasmid Midi Kit)中。随后,向重悬浮的细胞沉淀中加入 10 μ l Ready-Lyse 溶菌酶,并且在 37°C 温育 30

分钟。使用 10ml 缓冲液 P2 和 P3 继续 Qiagen Plasmid Midi Kit 方案,以解决该增加的细胞培养物体积。从芽孢杆菌中分离包含单个 nprE 突变的每种 pUBnprE 质粒后,测定每种质粒的浓度。质粒随后使用 dam 甲基化酶试剂盒 (New England Biolabs) 根据制造商的说明书进行 dam 甲基化,以每试管甲基化约 2 μ g 每种 pUBnprE 质粒。Zymoclean 凝胶 DNA 回收试剂盒用于纯化且浓缩 dam 甲基化的 pUBnprE 质粒。随后定量该 dam 甲基化的 pUBnprE 质粒,并且每种稀释至 50ng/ μ l 的工作浓度。对于每个反应,分别制备混合的定点诱变引物。例如,使用 pUBnprE T14R 质粒作为模板源,混合的定点诱变引物试管将包含 10 μ l nprE-S23R、10 μ l nprE-G24R、10 μ l nprE-N46K 和 10 μ l nprE-T54R (所有引物各 10 μ M)。根据制造商的说明书,使用 QuikChange Multi 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 执行 PCR 反应 (例如,1 μ l 包含 1 个突变的 dam 甲基化 pUBnprE 质粒 (50ng/ μ l)、2 μ l nprE 定点诱变引物 (10 μ M)、2.5 μ l 10x QuikChange Multi 反应缓冲液、1 μ l dNTP Mix、1 μ l QuikChange Multi Enzyme blend (2.5U/ μ l) 和 17.5 μ l 高压灭菌蒸馏水,以提供 25 μ l 总反应混合物。使用下述条件扩增 nprE 变体文库:95 $^{\circ}$ C,1 分钟 (仅第一个循环),随后为 95 $^{\circ}$ C 1 分钟、55 $^{\circ}$ C 1 分钟、65 $^{\circ}$ C 13.5 分钟,并且重复循环 29 次。反应产物贮藏于 4 $^{\circ}$ C 过夜。随后,反应混合物经历 DpnI 消化处理 (由 **QUIKCHANGE®** Multi 定点诱变试剂盒供应) 以消化亲本 pUB-nprE 质粒,其中使用制造商的方案 (即,1.5 μ l DpnI 限制酶加入每个试管中,并且在 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时);2 μ l DpnI 消化的 PCR 反应物随后在 1.2% E-凝胶上分析,以确保 PCR 反应有效工作以及亲本模板被降解。TempliPhi 滚环扩增随后用于产生大量 DNA 用于增加 nprE 多重变体文库的大小,其中使用制造商的方案,即;1 μ l DpnI 处理的 QuikChange Multi 定点诱变 PCR 产物、5 μ l TempliPhi 样品缓冲液、5 μ l TempliPhi 反应缓冲液和 0.2 μ l TempliPhi 酶混合物,共~11 μ l 总反应物;在 30 $^{\circ}$ C 温育 3 小时;TempliPhi 反应物通过添加 200 μ l 高压灭菌蒸馏水进行稀释并且短暂涡旋。随后,使用 1.5 μ l 稀释的 TempliPhi 材料转化感受态枯草芽孢杆菌细胞,使用 LA+10ppm 新霉素+1.6%脱脂乳平板选择 nprE 多重变体。挑选菌落并且随后测序,以鉴定不同的 nprE 变体文库组合。

[0320] 表 5-1 提供在这些实验中使用的引物名称和序列。Integrated DNATechnologies 合成所有这些引物 (100nmole 级,5' 磷酸化的和 PAGE 纯化的)。另外的诱变引物在美国专利申请序列号 11/581,102 (引入本文作为参考) 中描述。

[0321]

表 5-0. <i>nprE</i> 引物	
引物	序列
nprE-T14R	GGT ACG ACT CTT AAA GGA AAA AGA GTC TCA TTA AAT ATT TCT TCT GAA AG (SEQ ID NO: 20)
nprE-S23R	GTC TCA TTA AAT ATT TCT TCT GAA AGA GGC AAA TAT GTG CTG CGC GAT C (SEQ ID NO: 21)
nprE-G24R	CTC ATT AAA TAT TTC TTC TGA AAG CAG AGG CAA ATA TGT GCT GCG CGA TC (SEQ ID NO: 22)
nprE-N46K	CAC AAA TTA TTA CGT ACG ATC TGC AAA AAC GCG AGT ATA ACC TGC (SEQ ID NO: 23)
nprE-T54R	GTA TAA CCT GCC GGG CAG ACT CGT ATC CAG CAC CAC AAA CCA G (SEQ ID NO: 24)

[0322] 本实施例针对蛋白酶和淀粉酶还描述了酶电荷梯和组合电荷文库的产生。

[0323] 酶电荷梯

[0324] 自现有文库选择或者利用本领域已知的定点诱变技术（参见例如，美国专利申请序列号 10/576, 331、11/581, 102 和 11/583, 334）产生跨一系列目的物理性质的多重蛋白质变体。随后在目的试验中分析此组确定的探针蛋白质。

[0325] 示例性蛋白酶电荷梯变体显示于下表中，并且如本文所描述的进行测定。在这些表中，电荷改变是相对于野生型酶的。

[0326]

表 5-1. ASP 电荷梯变体	
ASP 变体	Δ 电荷
R14I-N112E-T116E-R123F-R159F	-5
R14I-N112E-T116E-R123F	-4
R14I-N112E-T116E	-3
R14I-N112E	-2
R14I	-1
R14I-D184T	0
R14I-T86K-D184T	+1
R14I-A64K-T86K-D184T	+2
R14I-A64K-Q81K-T86K-D184T	+3

[0327]

表 5-2. NprE 电荷梯变体

NprE 变体	Δ 电荷
S56D-T60D	-2
T60D	-1
野生型	0
S23R	+1
S23R-N46K	+2
S23R-N46K-T54R	+3
T14R-S23R-N46K-T54R	+4

[0328]

表 5-3. FNA 电荷梯变体

FNA 变体 (BPN 编号)	Δ 电荷
S87D-N109D-S188D-S248D	-4
S87D-N109D-S188D	-3
S87D-N109D	-2
N109D	-1
(FNA)	0
N109R	+1
S87R-N109R	+2
S87R-N109R-S188R	+3
S87R-N109R-S188R-S248R	+4

[0329] 成熟 FNA 蛋白酶的氨基酸序列用作制备本文描述的变体文库的基础：

[0330]

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPLDKVAGGASMVPSETN
 PFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIE
 WAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGY
 PGKYPSVIAVGAVDSSNQ RASFSSVGP ELDV MAPGVSIQSTLPGNKYGALNGTSMA
 SPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ

(SEQID NO :25).

[0331]

表 5-4. GG36 电荷梯变体

GG36 变体 (GG36 编号)	GG36 变体 (BPN 编号)	Δ 电荷
S85D-Q107D-S182D-N242D	S87D-Q109D-S188D-N248D	-4
S85D-Q107D-S182D	S87D-Q109D-S188D	-3
S85D-Q107D	S87D-Q109D	-2
Q107D	Q109D	-1
(GG36)	(GG36)	0
Q107R	Q109R	+1
S85R-Q107R	S87R-Q109R	+2
S85R-Q107R-S182R	S87R-Q109R-S188R	+3
S85R-Q107R-S182R-N242R	S87R-Q109R-S188R-N248R	+4

[0332] 成熟 GG36 蛋白酶的氨基酸序列用作制备本文描述的变体文库的基础：

[0333] AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHVAGT
IAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVL
VVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAG
AAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR (SEQ ID NO :26).

[0334] 示例性淀粉酶电荷梯变体显示于下表中, 并且如本文所描述的进行测试。在这些表中, 电荷改变是相对于野生型酶的。

[0335] 将 AmyS 基因的序列提供给 Gene Oracle (Mountain View, CA) 用于合成表 5-5 中显示的 25 种电荷梯变体。Gene Oracle 合成 AmyS 变体且将 AmyS 变体克隆到载体 pGov4 内, 转化大肠杆菌。对每一种变体, 提供从小量制备中分离的 DNA 以及琼脂穿刺培养物。

[0336] PCR 扩增变体, 克隆到 pHPLT 枯草芽孢杆菌表达载体内。

[0337]

表 5-5a. 第一 AmyS 电荷梯

编号	AmyS 变体	Δ 电荷
1-6	R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q K471Q N28D N224D N271D N281D Q86E Q89E	-12
1-5	R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q N28D N224D N271D N281D Q86E	-10
1-4	R308Q R483Q K171Q K383Q N28D N224D N271D N281D	-8
1-3	R308Q R483Q K171Q N28D N224D N271D	-6
1-2	R308Q R483Q N28D N224D	-4
1-1	R308Q N28D	-2
AmyS	亲本	0
2-1	D318N N28R	+2
2-2	D318N D306N N28R N224R	+4
2-3	D318N D306N D19N N28R N224R N271R	+6
2-4	D318N D306N D19N D393N N28R N224R N271R N281R	+8
2-5	D318N D306N D19N D393N D458N N28R N224R N271R N281R Q86R	+10
2-6	D318N D306N D19N D393N D458N E29Q N28R N224R N271R N281R Q86R Q89R	+12

[0338]

表 5-5b. 第二 AmyS 电荷梯

编号	AmyS 变体	Δ 电荷
3-7	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D Q86E Q89E R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q K471Q	-12
3-6	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D Q86E R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q	-10
3-5	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D R308Q R483Q K171Q K383Q	-8
3-4	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D R308Q R483Q K171Q	-6
3-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q R483Q	-4
3-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D	-2
3-1	Q97R Q319R Q358E Q443E	0
4-1	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K D318N	+2
4-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K D318N D306N	+4
4-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K D318N D306N D19N	+6
4-4	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K D318N D306N D19N D393N	+8
4-5	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K Q86R D318N D306N D19N D393N D458N	+10
4-6	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K Q86R Q89R D318N D306N D19N D393N D458N E29Q	+12
5-1	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D R308Q S242E	-3
5-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q S242E	-4
5-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q S242Q	-3

[0339] 成熟 AmyS 淀粉酶的氨基酸序列用作制备本文描述的变体文库的基础：

[0340]

**AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGTSRSD
VGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKAYLQAIQAHAAGMQVYADVVDHK
GGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHF**

DGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDYLMYADLDMDHPEVVTE
LKNWGKQWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWLSYVRSQTGKPLFTVGEYWSY
DINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLA
VTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPS
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGP GGS
KWMYVGKQHAGKVFDLTGNRSDTVTINS DGWGEFKVNGGSSVSVWVPRKTTVS
TIARPITTRPWTGEFVRWTEPRLVAWP (SEQ ID NO :27).

[0341]

表 5-6. AmyS-S242Q 电荷梯	
AmyS-S242Q 变体	Δ 电荷
Q97E-Q319E-Q358E-Q443E	-4
Q97E-Q319E-Q358E	-3
Q97E-Q319E	-2
Q97E	-1
Q97R-Q319E	0
亲本 AmyS-S242Q	0
Q97R	+1
Q97R-Q319R	+2
Q97R-Q319R-Q358R	+3
Q97R-Q319R-Q358R-Q443R	+4

[0342] 具有以斜体显示的置换氨基酸的成熟截短 S242Q 淀粉酶的氨基酸序列用作制备本文描述的变体文库的基础：

[0343]

AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGTSRSD
VGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKAYLQAIQAHAAGMQVYADVVDHK
GGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHF
DGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDYLMYADLDMDHPEVVTE
LKNWGKQWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFQFFPDWLSYVRSQTGKPLFTVGEYWSY
DINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLA
VTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPS
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGP GGS
KWMYVGKQHAGKVFDLTGNRSDTVTINS DGWGEFKVNGGSSVSVWVPRKTT
(SEQ ID NO :28).

[0344] 酶组合电荷文库

[0345] 迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (= GG36) 组合电荷文库的产生

[0346] 将包含密码子改良的 GG36 基因的 pAC-GG36ci 质粒送至 DNA 2.0Inc. (Menlo Park, CA) 用于产生组合电荷文库 (CCL)。此外, 还提供枯草芽孢杆菌菌株 (基因型: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $\Delta spoIIE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$) 用于转化。此外, 对 DNA2.0Inc. 提出了要求: 在表 5-7 所示的 GG36 蛋白酶 4 个位点之每一个处产生位置文库。变体作为甘油贮存物在 96 孔板中提供。

[0347] 通过鉴定活性位点外 4 个良好分布的、表面暴露的不带电荷极性氨基酸残基, 设计了 GG36CCL。这些残基是 Ser-85、Gln-107、Ser-182 和 Asn-242 (在 BPN 编号中残基 87、109、188 和 248)。通过在每个位点处制造 3 种可能性, 即, 野生型、精氨酸或天冬氨酸, 的所有组合, 产生 81 个成员的组合文库 (G-1 至 G-81)。

[0348]

表 5-7. GG36 CCL 变体					
变体#	S85	Q107	S182	N242	Δ 电荷
G-01	-	-	-	-	0
G-02	-	-	-	D	-1
G-03	-	-	-	R	+1
G-04	-	-	D	-	-1
G-05	-	-	D	D	-2
G-06	-	-	D	R	0
G-07	-	-	R	-	+1
G-08	-	-	R	D	0
G-09	-	-	R	R	+2
G-10	-	D	-	-	-1
G-11	-	D	-	D	-2
G-12	-	D	-	R	0
G-13	-	D	D	-	-2
G-14	-	D	D	D	-3
G-15	-	D	D	R	-1

[0349]

表 5-7. GG36 CCL 变体

G-16	-	D	R	-	0
G-17	-	D	R	D	-1
G-18	-	D	R	R	+1
G-19	-	R	-	-	+1
G-20	-	R	-	D	0
G-21	-	R	-	R	+2
G-22	-	R	D	-	0
G-23	-	R	D	D	-1
G-24	-	R	D	R	+1
G-25	-	R	R	-	+2
G-26	-	R	R	D	+1
G-27	-	R	R	R	+3
G-28	D	-	-	-	-1
G-29	D	-	-	D	-2
G-30	D	-	-	R	0
G-31	D	-	D	-	-2
G-32	D	-	D	D	-3
G-33	D	-	D	R	-1
G-34	D	-	R	-	0
G-35	D	-	R	D	-1
G-36	D	-	R	R	+1
G-37	D	D	-	-	-2
G-38	D	D	-	D	-3
G-39	D	D	-	R	-1
G-40	D	D	D	-	-3
G-41	D	D	D	D	-4
G-42	D	D	D	R	-2
G-43	D	D	R	-	-1
G-44	D	D	R	D	-2
G-45	D	D	R	R	0
G-46	D	R	-	-	0
G-47	D	R	-	D	-1
G-48	D	R	-	R	+1
G-49	D	R	D	-	-1
G-50	D	R	D	D	-2
G-51	D	R	D	R	0
G-52	D	R	R	-	+1
G-53	D	R	R	D	0
G-54	D	R	R	R	+2
G-55	R	-	-	-	+1
G-56	R	-	-	D	0
G-57	R	-	-	R	+2
G-58	R	-	D	-	0
G-59	R	-	D	D	-1
G-60	R	-	D	R	+1
G-61	R	-	R	-	+2
G-62	R	-	R	D	+1
G-63	R	-	R	R	+3

[0350]

表 5-7. GG36 CCL 变体

G-64	R	D	-	-	0
G-65	R	D	-	D	-1
G-66	R	D	-	R	+1
G-67	R	D	D	-	-1
G-68	R	D	D	D	-2
G-69	R	D	D	R	0
G-70	R	D	R	-	+1
G-71	R	D	R	D	0
G-72	R	D	R	R	+2
G-73	R	R	-	-	+2
G-74	R	R	-	D	+1
G-75	R	R	-	R	+3
G-76	R	R	D	-	+1
G-77	R	R	D	D	0
G-78	R	R	D	R	+2
G-79	R	R	R	-	+3
G-80	R	R	R	D	+2
G-81	R	R	R	R	+4

[0351] 解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 BPN' -Y217L(= FNA)CCL 的产生

[0352] 将包含 FNA 基因的 pAC-FNAre 质粒送至 DNA 2.0Inc. (Menlo Park, CA) 用于产生 CCL。此外,还提供枯草芽孢杆菌菌株(基因型: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $\Delta spoIIE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$) 用于转化。对 DNA2.0Inc. 提出的要求是:在表 5-8 所示的 4 个 FNA 蛋白酶位点之每一个处产生位置文库。变体作为甘油贮存物在 96 孔板中供应。

[0353] 通过鉴定活性位点外的 4 个良好分布、表面暴露的不带电荷极性氨基酸残基,设计枯草杆菌蛋白酶 BPN' -Y217L 组合电荷文库。这些残基是 Ser-87、Asn-109、Ser-188 和 Ser-248。通过在每个位点处制备 3 种可能性,即,野生型、精氨酸或天冬氨酸,的所有组合,产生了 81 个成员的组合文库(F-1 至 F-81)。

[0354]

表 5-8. FNA CCL 变体

变体#	S87	N109	S188	S248	Δ 电荷
F-01	-	-	-	-	0
F-02	-	-	-	D	-1
F-03	-	-	-	R	+1
F-04	-	-	D	-	-1
F-05	-	-	D	D	-2
F-06	-	-	D	R	0
F-07	-	-	R	-	+1
F-08	-	-	R	D	0
F-09	-	-	R	R	+2
F-10	-	D	-	-	-1
F-11	-	D	-	D	-2
F-12	-	D	-	R	0
F-13	-	D	D	-	-2
F-14	-	D	D	D	-3
F-15	-	D	D	R	-1
F-16	-	D	R	-	0
F-17	-	D	R	D	-1
F-18	-	D	R	R	+1
F-19	-	R	-	-	+1
F-20	-	R	-	D	0
F-21	-	R	-	R	+2
F-22	-	R	D	-	0
F-23	-	R	D	D	-1
F-24	-	R	D	R	+1
F-25	-	R	R	-	+2
F-26	-	R	R	D	+1
F-27	-	R	R	R	+3
F-28	D	-	-	-	-1
F-29	D	-	-	D	-2
F-30	D	-	-	R	0
F-31	D	-	D	-	-2
F-32	D	-	D	D	-3
F-33	D	-	D	R	-1
F-34	D	-	R	-	0
F-35	D	-	R	D	-1
F-36	D	-	R	R	+1
F-37	D	D	-	-	-2
F-38	D	D	-	D	-3
F-39	D	D	-	R	-1
F-40	D	D	D	-	-3
F-41	D	D	D	D	-4
F-42	D	D	D	R	-2
F-43	D	D	R	-	-1
F-44	D	D	R	D	-2
F-45	D	D	R	R	0

[0355]

F-46	D	R	-	-	0
F-47	D	R	-	D	-1
F-48	D	R	-	R	+1
F-49	D	R	D	-	-1
F-50	D	R	D	D	-2
F-51	D	R	D	R	0
F-52	D	R	R	-	+1
F-53	D	R	R	D	0
F-54	D	R	R	R	+2
F-55	R	-	-	-	+1
F-56	R	-	-	D	0
F-57	R	-	-	R	+2
F-58	R	-	D	-	0
F-59	R	-	D	D	-1
F-60	R	-	D	R	+1
F-61	R	-	R	-	+2
F-62	R	-	R	D	+1
F-63	R	-	R	R	+3
F-64	R	D	-	-	0
F-65	R	D	-	D	-1
F-66	R	D	-	R	+1
F-67	R	D	D	-	-1
F-68	R	D	D	D	-2
F-69	R	D	D	R	0
F-70	R	D	R	-	+1
F-71	R	D	R	D	0
F-72	R	D	R	R	+2
F-73	R	R	-	-	+2
F-74	R	R	-	D	+1
F-75	R	R	-	R	+3
F-76	R	R	D	-	+1
F-77	R	R	D	D	0
F-78	R	R	D	R	+2
F-79	R	R	R	-	+3
F-80	R	R	R	D	+2
F-81	R	R	R	R	+4

[0356] 嗜热脂肪芽孢杆菌 AmyS-S242Q CCL 的产生

[0357] 从转化的枯草芽孢杆菌菌株(基因型: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, amyE::xylRPxylAcomK-phleo)中分离 AmyS-S242Q 质粒 DNA, 并且送至 DNA 2.0 Inc. (Menlo Park, CA) 作为构建 CCL 的模板。对 DNA2.0 Inc. 提出的要求是: 在表 5-9 所示的 AmyS-S242Q(S242Q) 淀粉酶 4 个位点之每一个处产生位置文库。变体作为甘油贮存物在 96 孔板中供应。

[0358] 通过鉴定下述 4 个残基, 设计了 AmyS S242Q 组合电荷文库: Gln-97、Gln 319、Gln 358 和 Gln 443。通过在每个位点处进行 3 种可能性, 即, 野生型、精氨酸或天冬氨酸, 的所有组合, 制备 81 个成员的 4 位点 CLL。

[0359]

表 5-9. S242Q CCL 变体

变体#	Q97	Q319	Q358	Q443	Δ 电荷
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2
3	Q97E	Q319E	Q358E	-	-3
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2
5	Q97E	Q319E	Q358R	Q443R	0
6	Q97E	Q319E	Q358R	-	-1
7	Q97E	Q319E	-	Q443E	-3
8	Q97E	Q319E	-	Q443R	-1
9	Q97E	Q319E	-	-	-2
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0
12	Q97E	Q319R	Q358E	-	-1
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	+2
15	Q97E	Q319R	Q358R	-	+1
16	Q97E	Q319R	-	Q443E	-1
17	Q97E	Q319R	-	Q443R	+1
18	Q97E	Q319R	-	-	0
19	Q97E	-	Q358E	Q443E	-3
20	Q97E	-	Q358E	Q443R	-1
21	Q97E	-	Q358E	-	-2
22	Q97E	-	Q358R	Q443E	-1
23	Q97E	-	Q358R	Q443R	+1
24	Q97E	-	Q358R	-	0
25	Q97E	-	-	Q443E	-2
26	Q97E	-	-	Q443R	0
27	Q97E	-	-	-	-1
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0
30	Q97R	Q319E	Q358E	-	-1
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	+2
33	Q97R	Q319E	Q358R	-	+1
34	Q97R	Q319E	-	Q443E	-1
35	Q97R	Q319E	-	Q443R	+1
36	Q97R	Q319E	-	-	0
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	+2
39	Q97R	Q319R	Q358E	-	+1

[0360]

表 5-9. S242Q CCL 变体

40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	+2
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	+4
42	Q97R	Q319R	Q358R	-	+3
43	Q97R	Q319R	-	Q443E	+1
44	Q97R	Q319R	-	Q443R	+3
45	Q97R	Q319R	-	-	+2
46	Q97R	-	Q358E	Q443E	-1
47	Q97R	-	Q358E	Q443R	+1
48	Q97R	-	Q358E	-	0
49	Q97R	-	Q358R	Q443E	+1
50	Q97R	-	Q358R	Q443R	+3
51	Q97R	-	Q358R	-	+2
52	Q97R	-	-	Q443E	0
53	Q97R	-	-	Q443R	+2
54	Q97R	-	-	-	+1
55	-	Q319E	Q358E	Q443E	-3
56	-	Q319E	Q358E	Q443R	-1
57	-	Q319E	Q358E	-	-2
58	-	Q319E	Q358R	Q443E	-1
59	-	Q319E	Q358R	Q443R	+1
60	-	Q319E	Q358R	-	0
61	-	Q319E	-	Q443E	-2
62	-	Q319E	-	Q443R	0
63	-	Q319E	-	-	-1
64	-	Q319R	Q358E	Q443E	-1
65	-	Q319R	Q358E	Q443R	+1
66	-	Q319R	Q358E	-	0
67	-	Q319R	Q358R	Q443E	+1
68	-	Q319R	Q358R	Q443R	+3
69	-	Q319R	Q358R	-	+2
70	-	Q319R	-	Q443E	0
71	-	Q319R	-	Q443R	+2
72	-	Q319R	-	-	+1
73	-	-	Q358E	Q443E	-2
74	-	-	Q358E	Q443R	0
75	-	-	Q358E	-	-1
76	-	-	Q358R	Q443E	0
77	-	-	Q358R	Q443R	+2
78	-	-	Q358R	-	+1
79	-	-	-	Q443E	-1
80	-	-	-	Q443R	+1
81(亲本)	Q97	Q319	Q358	Q443	0

[0361] 实施例 6

[0362] 变体蛋白酶的纯化和表征

[0363] 本实施例描述了用于纯化由前述实施例的转化枯草芽孢杆菌表达的蛋白酶的方法。

[0364] 在 37℃温育 36 小时后,回收发酵液并且在 12,000rpm 离心 (SORVALL®离心机型号 RC5B)。从培养液中分离分泌的中性金属蛋白酶,并且使用具有 BES(聚醚砜)10kDa

截断的 Amicon 过滤系统 8400 浓缩约 10 倍。

[0365] 浓缩的上清液在 4℃ 用包含 10mM NaCl 的 25mM MES 缓冲液, pH5.4 透析过夜。随后如下所述将透析物加载到阳离子交换柱 Poros HS20 (总体积 ~ 83mL ; 结合容量 ~ 4.5g 蛋白质 /mL 柱 ; Waters)。柱用包含 10mM NaCl 的 25mM MES 缓冲液, pH5.4 进行预平衡。随后, 将约 200-300mL 样品加载到柱上。使用从 5.4 到 6.2 的 pH 梯度经过 10 柱体积的 MES 缓冲液, 洗脱结合的蛋白质。蛋白质的洗脱在 pH5.8-6.0 之间, 并且使用如本文描述的蛋白水解活性和 10% (w/v) **NUPAGE**[®] SDS-PAGE (Novex) 进行评估。随后合并包含中性蛋白酶的级分。加入 3 : 1 的氯化钙和氯化锌盐, 之后将 pH 调整至 5.8。Perceptive Biosystems **BIOCAD**[®] Vision (GMI) 用于蛋白质纯化。

[0366] 使用 10% (w/v) **NUPAGE**[®] SDS-PAGE 评估, 纯化的蛋白质被确定为均质的, 具有大于 95% 纯度。一般地, 当使用标准丝氨酸蛋白酶测定法用底物 N-琥珀酰-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-对硝基苯胺 (Bachem) 评估时, 纯化的制品显示出可忽略的丝氨酸蛋白酶活性。使用包含 1mM 氯化锌、4mM 氯化钙和 40% 丙二醇的 25mM MES 缓冲液, pH5.8 配制蛋白质用于贮藏。

[0367] 实施例 7

[0368] 洗涤性能

[0369] 本实施例描述了在 BMI (血、乳、墨) 微型布样测定法中在液体洗涤剂 (BMI-**TIDE**[®] 2X Ultra Clean Breeze™ 性能测定法) 中以 0.25 μg/ml 测试 NprE 和 ASP 变体。

[0370] 表 7-1a 概括了从野生型 (WT) NprE 和各种 NprE 变体获得的数据。该表列出了氨基酸位置和置换、BMI 清洁性能和相对于 WT NprE 的净电荷改变。

[0371] 表 7.1b 列出了在表 7-1a 中给出“AA”名称的 NprE 变体中包含的突变。

[0372]

表 7-1a NprE 突变、电荷改变和 BMI 性能

	电荷	平均值	校正后	SD
酶	变化	Abs 405 nm	Abs 405 nm	n=5
NprE wt	0	0.549	0.333	0.047
S199E	-1	0.490	0.275	0.006
Q45K S199E	0	0.595	0.379	0.024
K269T	-1	0.551	0.336	0.037
G24K K269T D220E	0	0.585	0.370	0.029
R280L	-1	0.537	0.321	0.019
T4K R280L	0	0.594	0.378	0.015
K244S	-1	0.513	0.298	0.026
S23K K244S	0	0.571	0.356	0.031
K214Q	-1	0.485	0.269	0.012
N90K K214Q	0	0.547	0.331	0.010
10AA	+1	0.520	0.304	0.015
12AA	+2	0.399	0.183	0.011
14AA	+2	0.453	0.237	0.008
18AA	+3	0.349	0.133	0.011
无酶		0.216	0.000	0.003

[0373]

表 7-1b. 多位点 NprE 变体的电荷改变和置换

变体	电荷改变	多重置换
18	+3	4K-45K-50R-54K-59K-90K-129I-138L-179P-190L-199E-214Q-220E-244S-265P-269H-285R-296E
14	+2	45K-50R-59K-90K-129I-138L-179P-190L-199E-214Q-220E-244S-265P-285R
12	+2	45K-59K-90K-129I-138L-179P-190L-199E-214Q-220E-265P-285R
10	+1	59K-90K-129I-179P-190L-199E-214Q-220E-265P-285R

[0374] 表 7-2a 和 7-2b 概括了从野生型 (WT) ASP 和各种 ASP 变体获得的数据。该表列出了氨基酸位置和置换、BMI 清洁性能和相对于 WT ASP 的净电荷改变。

[0375]

表 7-2a. ASP 和 ASP 变体

变体	取代											
	R14I	A64K	Q81E	Q81K	Q81R	T86K	D184T	N112E	T116E	T116R	R123F	R159F
ASP-wt												
CBL-31	X							X	X		X	X
CBL-29	X							X	X		X	
CBL-25	X							X	X			
CBL-17	X							X				
R14I	X											
CBL-2	X						X					
CBL-34	X					X	X					
CBL-162	X	X				X	X					
CBL-226	X	X		X		X	X					

[0376]

表 7-2b ASP 变体结果

酶	相对	平均值	校正后	SD
	电荷	Abs 405 nm	Abs 405 nm	n=5
ASP-wt	0	0.550	0.295	0.015
CBL-31	-5	0.342	0.087	0.010
CBL-29	-4	0.399	0.144	0.024
CBL-25	-3	0.495	0.240	0.020
CBL-17	-2	0.576	0.320	0.020
R14I	-1	0.556	0.300	0.025
CBL-2	0	0.613	0.358	0.020
CBL-34	+1	0.559	0.303	0.027
CBL-162	+2	0.563	0.308	0.021
CBL-226	+3	0.488	0.233	0.019
无酶		0.255	0.000	0.008

[0377] 因此,在蛋白酶中表面电荷突变影响其对 BMI 的洗涤性能,并且蛋白质的表面电荷的优化可以增强其洗涤性能。

[0378] 实施例 8

[0379] LAS 稳定性

[0380] 在本实施例中,在 0.06% LAS(十二烷基苯磺酸钠)的存在下温育测试蛋白酶后,测量 LAS 稳定性,并且使用 AAPF 测定法测定残留活性。

[0381] 试剂:

[0382] 十二烷基苯磺酸,钠盐(=LAS):Sigma D-2525

[0383] **TWEEN®**-80:Sigma P-8074

[0384] TRIS 缓冲液 (游离酸):Sigma T-1378;使 6.35g 溶解于约 960ml 水中;用 4N HCl 将 pH 调整至 8.2。TRIS 的终浓度是 52.5mM。

[0385] LAS 贮存液:在 MQ 水中制备 10.5% LAS 溶液 (= 10.5g/100ml MQ)

[0386] TRIS 缓冲液 -100mM/pH8.6(100mM Tris/0.005% Tween80)

[0387] TRIS-Ca 缓冲液, pH8.6(100mM Tris/10mM CaCl₂/0.005% Tween80)

[0388] 硬件:

[0389] 平底 MTPs :Costar (#9017)

[0390] Biomek FX

[0391] ASYS Multipipettor (多道移液器)

[0392] Spectramax MTP 阅读器

[0393] iEMS 温育箱 / 摇床

[0394] Innova 4330 温育箱 / 摇床

[0395] Biohit 多通道移液管

[0396] BMG 恒温摇床

[0397] 方法:

[0398] 在 52.5mM Tris 缓冲液 pH8.2 中制备 10 μ l 0.063% LAS 溶液。通过将 1ml 100mg/ml AAPF 贮存液 (在 DMSO 中) 加入 100ml (100mM) TRIS 缓冲液 pH8.6, 制备 AAPF 工作溶液。为了稀释上清液, 在平底平板中加入稀释缓冲液, 加入上清液等分试样, 充分混合。稀释比例依赖于生长平板中的 ASP- 对照浓度 (AAPF 活性)。期望蛋白质浓度是 80ppm。

[0399] 将 10 μ l 稀释的上清液加入 190 μ l 0.063% LAS 缓冲液 / 孔中。用胶带覆盖 MTP, 振荡数秒, 并且置于 25°C 温育箱 (Innova 4230), 200rpm 振荡 60 分钟。温育 10 分钟后, 通过将每个孔中的 10 μ l 混合物转移至包含 190 μ l AAPF 工作溶液的新鲜 MTP, 测定初始活性 (t = 10 分钟)。使这些溶液充分混合, 并且使用 MTP 阅读器测量 AAPF 活性 (在 5 分钟内 25°C 进行 20 次读数)。

[0400] 通过如下方式, 测定最终活性 (t = 60 分钟): 温育 60 分钟后, 从温育的平板中取出另外 10 μ l 溶液。随后如上所述测定 AAPF 活性。如下进行计算:

[0401] 残留活性%是 $[t-60 \text{ 值}] * 100 / [t-10 \text{ 值}]$ 。

[0402] 在某些实施方案中, 分析变体的一个优选方法是在目的过程中变体对亲本蛋白质的自由能差异。对于给定过程, 相对于亲本酶, Gibbs 自由能的变化 ($\Delta \Delta G$) 如下给出:

[0403] $\Delta \Delta G = -RT \ln(k_{\text{变体}}/k_{\text{亲本}})$

[0404] 其中 $k_{\text{变体}}$ 是亲本酶的速率常数, $k_{\text{亲本}}$ 是亲本酶的速率常数, R 是气体定律常数 (gaslaw constant), T 是绝对温度。大多数测定法并非构建以允许测定真实的自由能, 因此表观自由能改变 ($\Delta \Delta G_{\text{app}}$) 定义为:

[0405] $\Delta \Delta G_{\text{app}} = -RT \ln(P_{\text{变体}}/P_{\text{亲本}})$

[0406] 其中 $P_{\text{变体}}$ 是变体的性能值, $P_{\text{亲本}}$ 是在相同条件下的亲本酶的性能值。对于 LAS 稳定性的 $\Delta \Delta G_{\text{app}}$ 值的计算, 野生型的残留活性被定义为野生型分子性能的量度 ($P_{\text{亲本}}$), 变体的残留活性被定义为变体分子的性能 ($P_{\text{亲本}}$)。负 $\Delta \Delta G_{\text{app}}$ 值指示变体的 LAS 稳定性的改善, 而正 $\Delta \Delta G_{\text{app}}$ 值指示具有减少的 LAS 稳定性的变体。

[0407] 随后针对相对于野生型酶的电荷改变的 Bin, 范围 +2 至 -7, 计算平均 $\Delta \Delta G_{\text{app}}$ 值。

从此分析清楚地,增加 ASP 酶的总负电荷将增加该酶的 LAS 稳定性。

[0408]

表 8-1. ASP $\Delta\Delta G_{app}$ 值

	平均值	SD
电荷改变	LAS $\Delta\Delta G_{app}$	LAS $\Delta\Delta G_{app}$
-7	-1.89	0.04
-6	-1.88	0.04
-5	-1.78	0.17
-4	-1.61	0.39
-3	-1.40	0.23
-2	-0.66	0.79
-1	0.11	1.07
0	1.51	1.25
1	1.73	1.21
2	2.01	1.31

[0409] 实施例 9

[0410] 酶性能

[0411] 本实施例描述了在 BMI (血、乳、墨) 微型布样测定法中在 AATCCHDL 洗涤剂或 5mM HEPES 缓冲液中在各种离子强度下以 1.0 μ g/ml 测试 ASP 变体。还描述了就衣物和自动餐具洗涤两种应用,在 BMI 微型布样和烤蛋测定法中在代表各种地理市场的洗涤剂 (例如,不同 pH、T 和 / 或水硬度) 中测试 FNA 和 GG36 变体。本实施例进一步描述了在清洁应用中以及在淀粉液化中测试 α -淀粉酶变体。使用实施例 1 中提供的方法 (参见,“酶性能测定法”和“玉米面粉水解”)。

[0412] 如图 1A 中所示,对于 ASP 在 AATCC HDL 洗涤剂中的清洁性能,存在最佳的净电荷改变。性能就在 BMI 微型布样测定法中观察到的相对清洁性能进行量度。在此测定法中,约 1.0 的值指示最高清洁性能。如由该图显而易见的,相对于野生型的极端负 (-5) 或正 (+3) 电荷积聚将导致弱清洁性能。存在相对于野生型 ASP 以 -2 为中心的獨特清洁性能最适电荷。这是优化蛋白质物理性质 (例如,净电荷) 以改善给定结果或益处 (例如,在液体衣物洗涤剂中的清洁性能) 的一个例子。用该组有限的探针蛋白质鉴定到的最适电荷与测量整个 ASP 电荷组合文库时观察到的最适电荷相吻合,见图 1B 所示。因此,探针蛋白质的使用可以预示整个文库的行为。

[0413] 根据 Debye-Hückel 理论 (Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, 第 2 版: With Applications to Colloidal and Biological Systems, Academic Press 第 2 版. [1992]), 静电相互作用主要由在恒定电位或恒定电荷的相互作用物 (酶、底物、织物和洗涤剂) 之间的双层力的强度、它们的大小和周围介质的介电常数控制。为了表征微粒在复杂介质例如洗涤剂制剂中的静电行为,利用它们在具有相同 Debye 屏蔽长度的简化环境中的相互作用将是足够的。这通过选择与洗涤条件下的洗涤剂具有匹配的 pH 和传导性的缓冲液来完成。如图 1A 中所示,在此缓冲液中对 ASP 电荷梯的筛选正确地预测了用 AATCC

洗涤剂（实心圆圈）观察到的在 -2 最佳的电荷。图 2 描述了，随着相对于野生型 ASP 的电荷改变，在具有各种量的支持电解质（在该情况下 NaCl）的 5mM HEPES 缓冲液 pH8.0 中，相对的 BMI 污渍去除。2.5mM NaCl 在该缓冲液中的添加可以导致匹配典型北美洗涤条件的 pH 和传导性。更高浓度 NaCl 的添加代表一般离子强度更高（由增加的水硬度和洗涤剂浓度引起）的日本和欧洲洗涤条件。因此，ASP 最适电荷是溶液环境（例如，洗涤剂制剂）的函数。

[0414] 存在立即变得明显的 2 个特征。首先，在具有匹配的 pH 和传导性的简化缓冲液环境中使用由针对给定物理性质的有限数目的探针蛋白质（例如，电荷梯 ASP 变体）组成的模式系统，可以预示在洗涤剂条件下筛选的大型 ASP 文库的行为。事实上，图 1A 中所显示的在包含 2.5mM NaCl 的缓冲液（空心圆圈）中测量到的最适电荷，与在北美洗涤条件下在 AATCC 洗涤剂中筛选该 ASP 电荷梯时所观察到的最适电荷是一致的。其次，最适电荷的定位是强的离子强度函数。随着 NaCl 的进一步添加，最适电荷朝向相对于野生型 ASP 具有正电荷的变体移动。简言之，电荷梯蛋白质探针的使用允许快速预测不同酶变体在代表各种地理市场的制剂中的性能。

[0415] 上述观察对于其他丝氨酸蛋白酶例如枯草杆菌蛋白酶 FNA 和 GG36 适用。例如，图 3A 和 3B 分别显示，就使用 TIDE 2X 洗涤剂在北美洗衣条件下的清洁性能而言，FNA 和 GG36 的最适电荷。左侧 Y 轴显示微型布样清洁性能，其中更高的数指示优良的 BMI 污渍去除。右侧 Y 轴显示定义为变体（实心符号）相对于亲本分子（空心符号）的清洁性能的性能指数。水平线指示在测定法的噪声上 2 或 3 个标准差的性能指数。FNA 电荷组合文库（CCL）显示最适电荷在相对于亲本 FNA 的零电荷改变处，而 GG36CCL 显示最适电荷在相对于 GG36 亲本的负 2 电荷处。

[0416] 图 4A、4B、5A 和 5B 证实最适电荷的位置是洗涤剂制剂、pH、温度和由于水硬度以及洗涤剂浓度的离子强度决定的溶液环境的函数。例如，FNA CCL 的最适电荷从在北美洗衣条件下的零急剧迁移至在西欧和日本条件下的更正电荷。此外，对于液体和颗粒（粉末）衣服洗涤剂制剂，观察到最适电荷。相似地，在自动餐具洗涤（ADW）洗涤剂（例如，ReckittBenckiser Calgonit 40°C, 12gpg, pH10）中针对烤蛋作为酶底物，观察到了 FNA 和 GG36CCL 的最适电荷，如图 6A 和 6B 中显示。

[0417] 如在本发明的开发过程中证实的，蛋白酶电荷变体（例如，ASP、GG36、FNA 等）在不同洗涤剂中的清洁性能在很大程度上由工作溶液 pH 和传导性决定。最终的传导性是离子强度的量度，并且由水硬度、洗涤剂浓度和组成导致。例如，当在 pH10.6 和 3.0mS/cm 的传导性下进行，在欧洲和北美 ADW 洗涤剂下 GG36 和 FNA 变体针对烤蛋污渍的清洁性能之间存在相关性。具体地，如果 pH 和传导性相同，则电荷变体的清洁性能是良好相关的。这个发现使得能够使用给定洗涤剂筛选酶性能，从这些结果外推至匹配 pH 和传导性的另一种洗涤剂。同样地，可以在匹配 pH 和传导性的缓冲液中筛选酶性能，从这些结果外推至显示相似的工作 pH 和传导性的洗涤剂。

[0418] 对于淀粉酶电荷变体（例如，AmyS-S242Q 和 AmyTS23t 等）在清洁应用中的清洁性能，存在最适电荷，其是工作溶液的 pH 和传导性的强函数。具体地，如在本发明的开发过程中确定的，对于在北美洗衣条件（例如，TIDE 2X）下清洁稻淀粉微型布样，S242Q 的正电荷改变变体较好，而对于在西欧洗衣条件下清洁稻淀粉微型布样，AmyTS23t 的负电荷改变

变体更佳。此外,这些观察对于在淀粉水解反应中使用的淀粉酶适用。如图 7A 中所示,正 S242Q 变体对 BODIPY 淀粉底物的水解显示更高的比活性。

[0419] 通过监控在玉米淀粉液化后的最终粘度,测定了通过 AmyS 电荷梯变体的淀粉液化。低粘度值指示淀粉多糖的降解。如在图 7B 中所示,对于液化,观察到最适电荷(例如,-4 至 -2)。太负(例如,-12 至 -10)的 AmyS 变体显示极高的最终粘度,并且太正(例如,+6 或更大)的变体显示甚至更高的最终粘度(例如,由于转矩超负荷而超过实验设备的限度)。

[0420] 实施例 10

[0421] 蛋白质表达

[0422] 本实施例描述了测定蛋白质电荷和蛋白质表达之间的关系。

[0423] 在 14L 发酵罐规模生产 ASP 变体

[0424] 进行了一组 14L 规模的补料分批发酵,以比较 ASP 蛋白酶组合电荷文库变体(R14I-N112E-T116E-R123F-R159F、R14I-N112E-T116E-R123F、R14I-N112E-T116E、R14I-N112E、R14I、R14I-D184T、R14I-D184T-T86K、R14I-T86K-D184T-A64K 和 R14I-T86K-D184T-A64K-Q81K)的生产水平,所述变体的电荷变化从 -5 到 +3。通过用与每种变体对应的 1mL 枯草芽孢杆菌甘油贮存物接种包含 600mL 培养基(LB 肉汤 +1%葡萄糖 +20mg/L 新霉素)的 2L 无挡板摇瓶,生长种子培养物。培养物在 37℃在振荡培养箱中以 175rpm 振荡培养,直至 OD₅₅₀ 达到 0.8-1.5。在那时,将整个种子培养物无菌转移至 14L 发酵罐,该发酵罐配备有联合控制器以监控:温度、溶氧百分比(% DO)、pH 和搅动。废气通过线内质谱分光光度计进行监控。使用的发酵培养基(7L)由在基于磷酸盐的缓冲液中的 10%大豆粉组成,所述缓冲液包含硫酸镁、微量矿物质和另外的 20mg/L 新霉素。起始发酵参数设为:37℃、pH6.8(在运行过程中用氢氧化铵调整)、750rpm 搅动、40% DO(在运行过程中通过调整空气和搅动进行维持)、11slpm 气流和 1bar 压力。需要时加入消泡剂(Mazu DF204)以控制泡沫。设置 10 小时 0.5-2.1g/分钟葡萄糖线性补料的补料分批程序(使用 60%葡萄糖溶液用于补料),其中以 pH 的升高作为触发器。每 4 小时进行一次发酵取样,取 15mL 整个肉汤以执行下述测量:在分光光度计上的细胞密度(测量 550nm 吸光度)、ASP 变体生产、葡萄糖、氮、磷酸盐和总蛋白质。总发酵运行时间为 40-45 小时。

[0425] 使用 Aaa-Pna 测定法测量 ASP 变体滴度

[0426] 就变体 ASP 蛋白酶的生产,测定在发酵过程中获得的枯草芽孢杆菌培养物样品。测定产生的酶在底物 N-琥珀酰-Ala-Ala-Ala-对硝基苯胺(AAA-pNA)上的活性。根据由对硝基苯胺的水解和释放引起的 405nm 吸光度增加,该测定法测量了经修饰的蛋白酶的产生(Estell 等人,J BiolChem,260:6518-6521[1985])。来自发酵罐的枯草芽孢杆菌澄清上清液的等分试样在缓冲液中进行测定,所述缓冲液包含:100mM Tris、0.01mM CaCl₂、0.005% Triton X-100, pH8.6。野生型 ASP 蛋白酶标准品用于产生标准曲线以计算产生的蛋白质(g/L 发酵肉汤)。

[0427] 图 8 描述了作为相对于野生型 ASP 的净电荷的函数,ASP 电荷梯探针蛋白质在枯草芽孢杆菌中的表达水平。如由该图显而易见的,相对于野生型 ASP 的极端负(-5)或正(+3)电荷积聚导致弱表达水平。ASP 电荷梯探针蛋白质的使用,使得可以快速地鉴定对于改善在给定宿主生物中的表达而言最适的净电荷。在该情况下,相对于野生型 ASP 的 -2 至 +1 的净电荷改变与最佳表达水平对应。在针对 ASP 观察到的最适电荷(-2)本身处,与具有极端电

荷改变的变体比较,观察到表达接近 4 倍的改善。在摇瓶水平的这些观察在 14L 发酵规模上得以证实。表 8-1 显示 14L 发酵罐中的表达的 2 个量度,即,在 40 小时时的 ASP 近似滴度以及由表达曲线的线性部分计算的 ASP 生产。摇瓶滴度在最后 1 列中提供用于参考。所有滴度已相对于 ASP-R14I 水平进行标准化。相对于野生型 ASP 的 +2 至 -1 的净电荷改变范围对应于发酵罐规模的最佳表达水平。这是优化蛋白质物理性质(在该情况下净电荷)用于调节完全不同的益处(在该情况下重组蛋白质表达)的另一个例子。

[0428]

表 8-1. 14L 规模的 ASP 电荷梯变体的枯草芽孢杆菌表达*

运行 #	ASP 电荷梯变体	Δ 电荷	40 小时 滴度 % R14I	产率 % R14I	摇瓶 滴度 % R14I
0720	R14I-N112E-T116E-R123F-R159F	-5	7.53	8.24	36.00
0716	R14I-N112E-T116E-R123F	-4	9.59	13.93	63.33
0719	R14I-N112E-T116E	-3	22.95	22.77	58.67
0748	R14I-N112E	-2	104.1	110.56	113.33
0746	R14I	-1	100	100.00	100.00
0747	R14I-D184T	0	86.64	92.81	80.00
0749	R14I-D184T-T86K	+1	109.93	127.27	70.00
0721	R14I -T86K-D184T-A64K	+2	6.84	8.61	31.33
0717	R14I-T86K-D184T-A64K-Q81K	+3	55.82	72.96	46.67

[0429] * 相对于摇瓶规模的峰滴度和生产力,在 14L 发酵规模,ASP 变体在枯草芽孢杆菌中的表达。

[0430] 蛋白质在宿主细胞中的表达和分泌涉及表达的蛋白质与多种宿主蛋白质的相互作用。表达的蛋白质与宿主细胞蛋白质的最佳相互作用,特别是速率限制相互作用,对于蛋白质的生产是重要的。该相互作用可以通过修饰表达蛋白质(或宿主细胞蛋白质)的表面电荷/疏水性进行优化。然而,对涉及的一种或多种机制的了解不是实施且使用本发明所必需的。

[0431] 实施例 11

[0432] LAS 和螯合剂稳定性

[0433] 本实施例描述了测定在包含阴离子型表面活性剂和螯合剂的反应介质中蛋白质电荷和稳定性之间的关系。为了测定受到胁迫的和未受胁迫的样品的蛋白酶活性,使用 suc-AAPF-pNA 测定法。

[0434] 使用的试剂包括:对照缓冲液:50mM HEPES、0.005% Tween-80, pH8.0;和胁迫缓冲液 50mM HEPES、0.1% (w/v) LAS(十二烷基苯磺酸,钠盐, Sigma D-2525)、10mM EDTA,

pH8.0。将酶变体 (20ppm) 1 : 20 稀释到包含对照或胁迫缓冲液的 96 孔非结合平底平板内且混合。对照平板在室温温育,而胁迫平板立即放置于 37°C 30-60 分钟(依赖于待测酶的稳定性)。温育后,使用 suc-AAPF-pNA 测定法测量酶活性。剩余或残留活性的分数等于胁迫样品的反应速率除以对照样品的反应速率。亲本酶和变体在对照缓冲液中 60 分钟是稳定的。

[0435] 图 9 描述了对于包含 80 种变体的文库,作为相对于亲本 FNA 的净电荷改变的函数的 LAS/EDTA 稳定性。根据实施例 5 中描述的方法设计且构建了这个文库,以相对于亲本 FNA 分子跨越几个净电荷。如由该图显而易见的,相对于亲本 FNA 的负电荷(直至 -4)积聚对于组合的 LAS/螯合剂稳定性是有利的。这是优化蛋白质物理性质(在该情况下净电荷)用于改善蛋白质在复杂液体洗衣环境中的稳定性的例子。

[0436] 对于 ASP 和 FNA 的 LAS/EDTA 稳定性,存在电荷依赖性。添加负电荷增加稳定性。但是,甚至在比亲本多 1 个或 2 个正电荷时,通过我们的方法,也可以找到能够赋予与亲本相等或更大稳定性的电荷突变配置。

[0437] 实施例 12

[0438] 热稳定性

[0439] 本实施例描述了测定蛋白质电荷和热稳定性之间的关系。蛋白质测定法基于在加热缓冲的培养上清液前和后的二甲基酪蛋白(DMC)水解。淀粉酶测定法基于在加热培养上清液前和后的 BODIPY 淀粉水解。使用与实施例 1 中所述相同的化学和试剂溶液用于这些测定法。

[0440] 蛋白酶的热稳定性测定

[0441] 过滤的培养上清液在 PIPES 缓冲液中稀释至 20ppm(基于生长平板中的对照浓度)。首先,取 10 μ l 每种稀释的酶样品在二甲基酪蛋白测定法中测定起始活性,如下所述进行处理。随后,将 50 μ l 每种稀释的上清液置于 MTP 的空孔中。MTP 平板在 iEMS 温育箱/摇床 HT(ThermoLabsystems) 中在 60°C 和 400rpm 温育 90 分钟。平板在冰上冷却 5 分钟。随后,将 10 μ l 溶液加入包含 200 μ l 二甲基酪蛋白底物/孔的新鲜 MTP,以测定在温育后的最终活性。用胶带覆盖这个 MTP,振荡数秒并且置于烤箱中在 37°C 2 小时无搅动。

[0442] 样品的残留活性表示为最终吸光度和起始吸光度(两者都相对于空白进行过校正)的比值。图 10 显示对于 SEL 文库,作为相对于野生型 ASP 的净电荷改变的函数的热稳定性指数。更高的指数指示热稳定更高的变体。如由该图显而易见的,相对于野生型酶的极端负(-2)或正(+2)电荷积聚,对于热稳定性是有害的。以相对于野生型 ASP 的零净电荷改变为中心,存在一个明显的热稳定最适电荷。这是优化蛋白质物理性质(在该情况下净电荷)用于改善液体洗衣应用中酶的热稳定性的一个例子。

[0443] α -淀粉酶的热稳定性测定

[0444] 过滤的培养上清液在具有 0.02% Tween 的 50mM 乙酸钠 + 2mM CaCl₂ pH5.8 中进行系列稀释。通过 BODIPY 淀粉测定法,分析 10 μ l 每种稀释的培养上清液,以确定起始淀粉酶活性。将 50 μ l 每种稀释的培养上清液置于 VWR 无裙边(low profile)96 孔板中。向每个孔中加入 30 μ l 矿物油作为密封剂。使平板在 BioRad DNA engine Peltier Thermal Cycler 中在 95°C 温育 30 或 60 分钟,这取决于亲本酶的稳定性。温育后,使平板冷却至 4°C 5 分钟,并且随后保持在室温。将 10 μ l 每种样品加入新鲜平板中,并且如实施例 1 中所述,通

过 BODIPY 淀粉测定法进行测定,以确定最终淀粉酶活性。

[0445] 热稳定性的计算

[0446] 样品的残留活性表示为最终吸光度和起始吸光度(两者都相对于空白进行过校正)的比值。这些观察也对淀粉酶电荷变体进行。图 11 显示作为相对于野生型的电荷改变的函数,第一 AmyS 电荷梯的残留活性。再次,相对于野生型的极端负(-12)或正(+10)电荷积聚,对于热稳定性是有害的。这是优化蛋白质物理性质(在该情况下净电荷)用于改善液体洗衣应用中酶的热稳定性的例子。

[0447] 实施例 13

[0448] 酶的 pH- 活性谱的调节

[0449] 本实施例描述了使用表面电荷突变以优化酶在给定反应中的 pH- 活性谱。

[0450] 图 12 显示对于实施例 5 的第一 AmyS 电荷梯,作为 pH 的函数的稻淀粉微型布样清洁活性。3.0-4.25 的 pH 范围在包含 0.01% Tween-80 的 200mM 甲酸钠中,而 4.25-5.5 的 pH 范围在包含 0.01% Tween-80 的 200mM 乙酸钠中。数据拟合成滴度曲线,各自具有单个 pKa 值。

[0451] 图 13 显示对于实施例 5 的第一 AmyS 电荷梯,作为电荷改变的函数的 AmyS 催化的表观 pKa 值。这些数据证实对于 α -淀粉酶,pH 活性谱可通过表面电荷突变而显著地迁移,甚至是在 200mM 缓冲液中。尽管对于枯草杆菌蛋白酶(Russell 等人,J Mol Biol,193:803-13[1987])以及对于 D-木糖异构酶(Cha 等人,Mol Cell,8:374-82[1998]),这已在极低离子强度下进行过报告,但在 α -淀粉酶上这据信是第一次,并且令人惊讶的是,甚至在高离子强度下也是如此。

[0452] 尽管已举例说明且描述了本发明的具体实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是,无需背离本发明的精神和范围,即可进行各种其他变化和修饰。因此后附权利要求旨在涵盖包含在本发明的范围内的所有此种变化和修饰。

[0453] 说明书中提及的所有专利和申请指示了本发明所属领域的技术水平。所有专利和出版物引入本文作为参考,其程度与每个出版物特别地单独地指出引入作为参考一样。

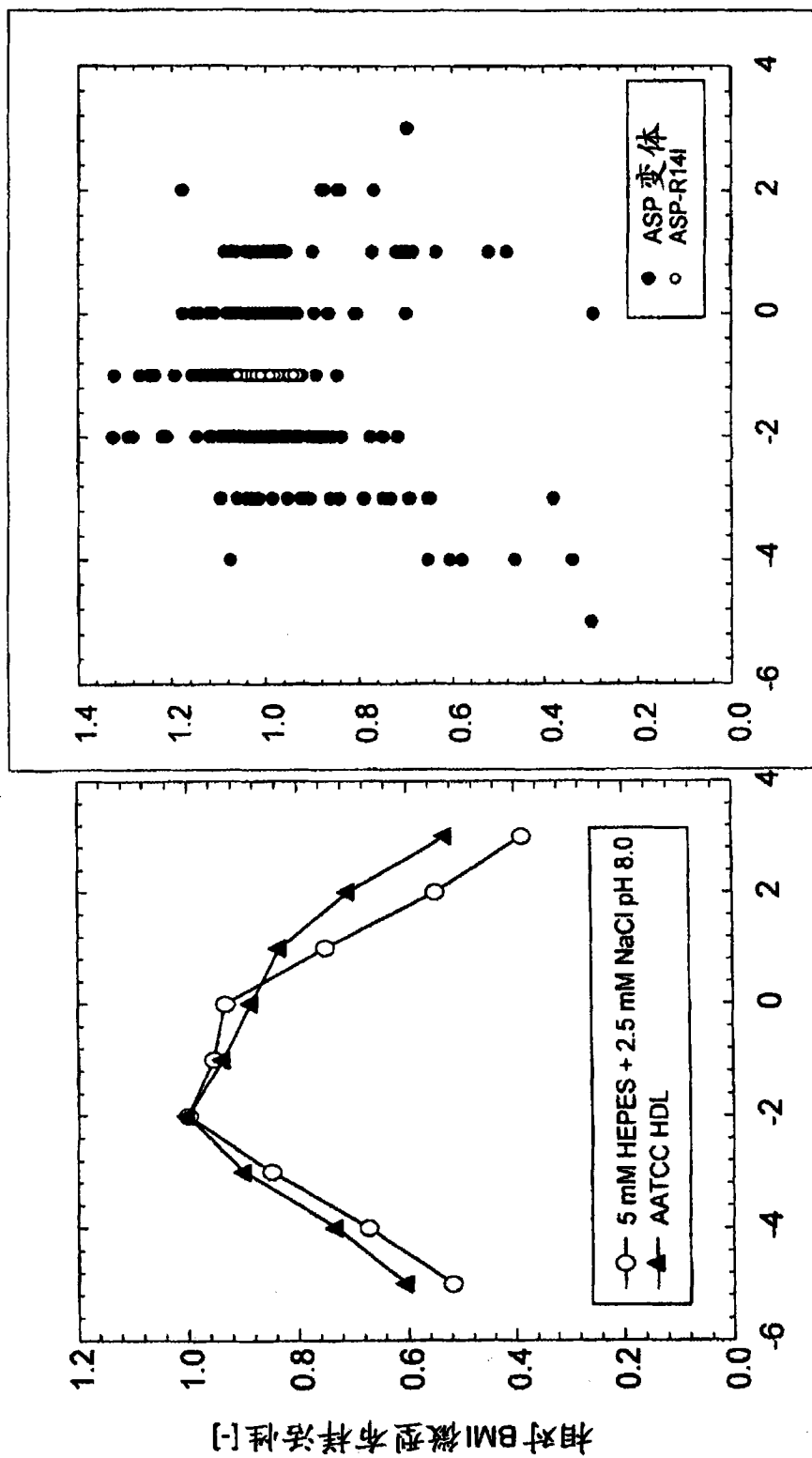
[0454] 已描述了本发明的优选实施方案,对于本领域普通技术人员显而易见是的,可以对公开的实施方案进行各种修饰,并且此种修饰旨在落入本发明的范围内。

[0455] 本领域技术人员容易理解本发明完全适用于实现目的并达到目的和获得所提及的以及其中所固有的那些益处。本文描述的组合物和方法代表优选实施方案且是示例性的,不旨在限制本发明范围。对于本领域技术人员显而易见是的,无需背离本发明的精神和范围,即可对本文公开的本发明进行各种置换和修饰。

[0456] 本文举例说明性描述的本发明可以在不存在本文未具体公开的任何一种或多种元件、一种或多种限制因素的情况下实施。已采用的术语和表达用作描述性而不是限制性术语,并且不希望此种术语和表达的使用排除所显示或描述的特征或其部分的任何等价物,应认识到各种修饰在请求保护的本发明范围内是可能的。因此,应当理解尽管本发明已通过优选实施方案和任选特征具体公开,但本领域技术人员可以诉诸于对本文公开概念的修饰和变化,并且此种修饰和变化应视为在如通过本文限定的本发明的范围内。

[0457] 本发明已在本文中进行了广泛且一般地描述。落入此一般公开内容内的下位或较具体内容也形成本发明的部分。这包括具有如下前提或负面限制的本发明上位描述,所述

前提或负面限制是从该上位描述中排除任何主题,而不管该被排除物是否在本文中有过具体提及。



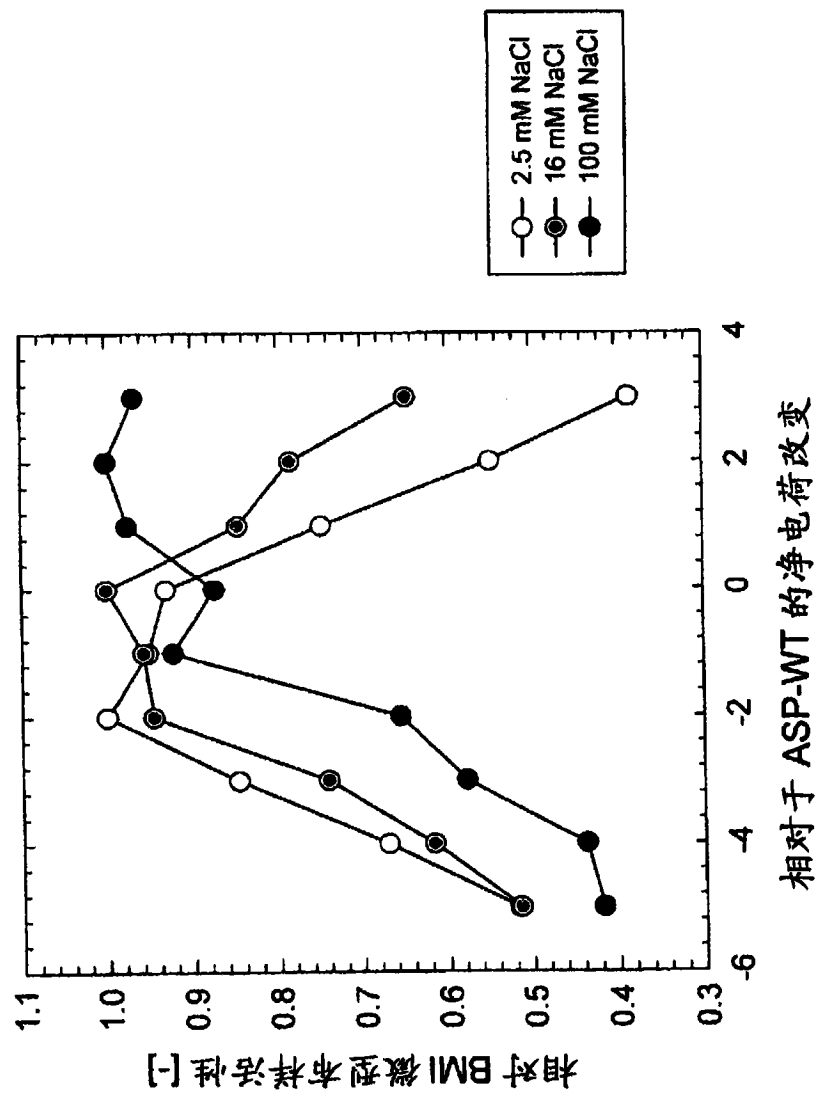
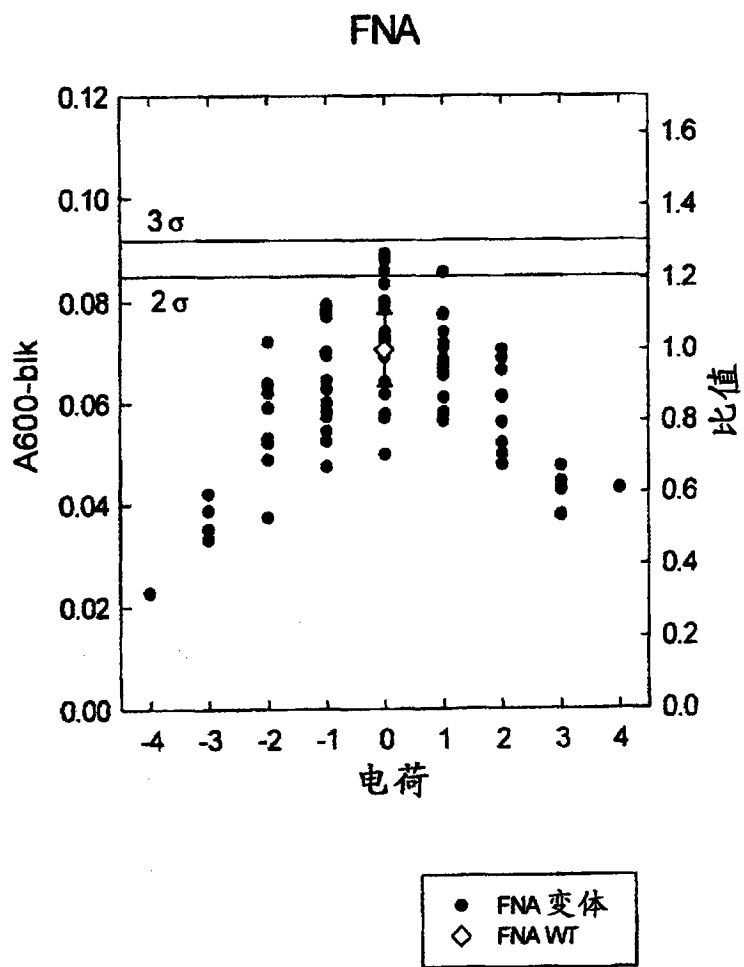


图 2



北美洗衣

图 3A

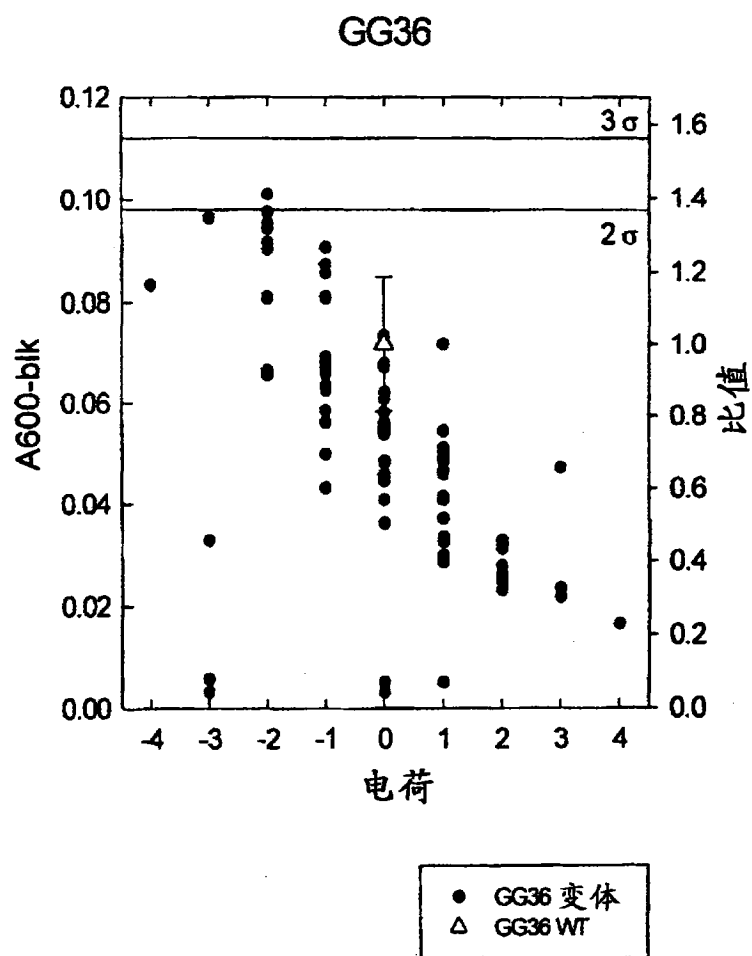
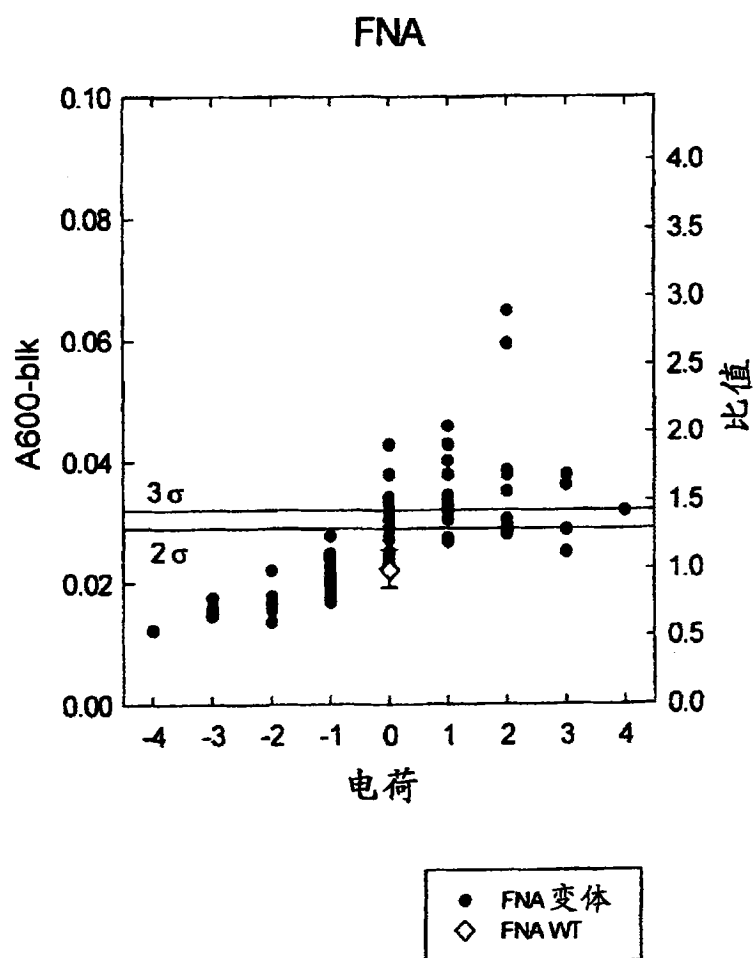


图 3B



西欧液体洗衣

图 4A

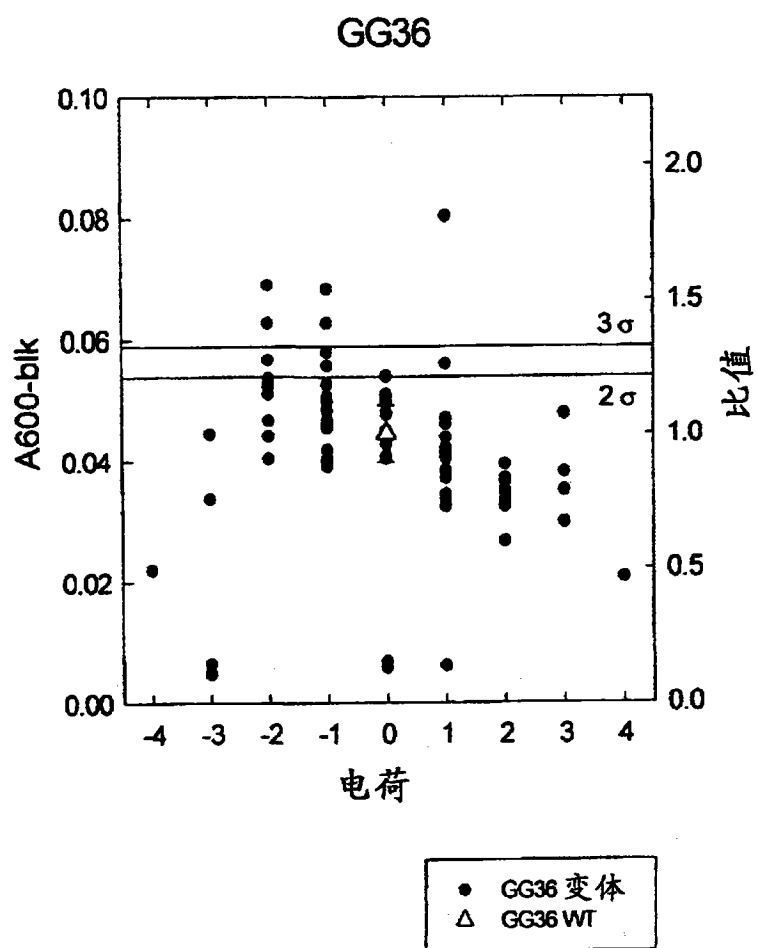


图 4B

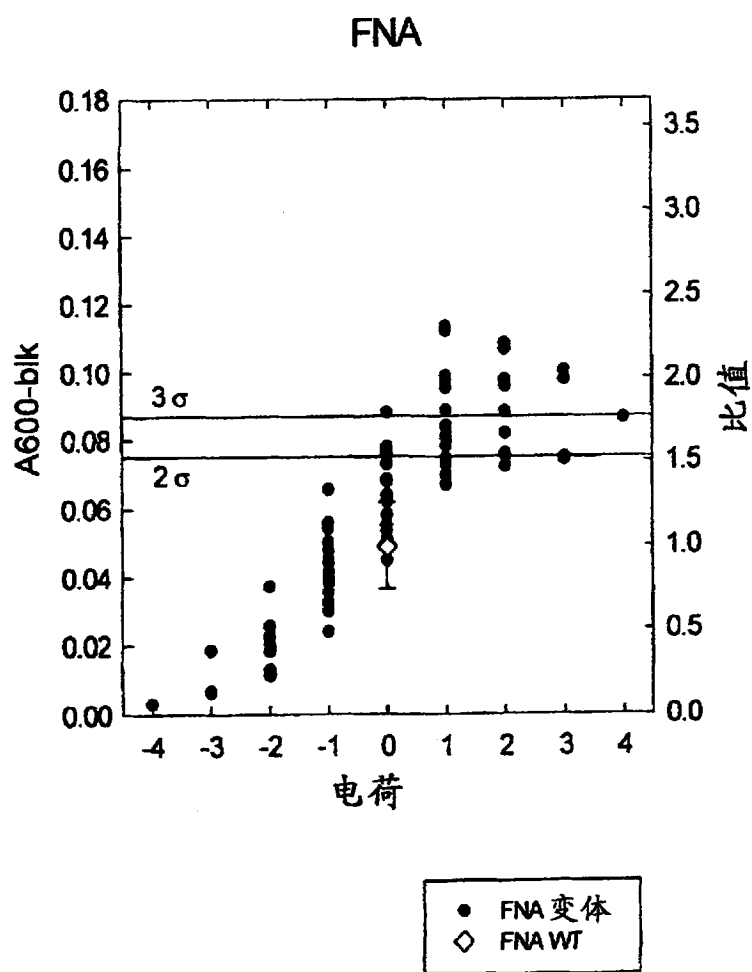


图 5A

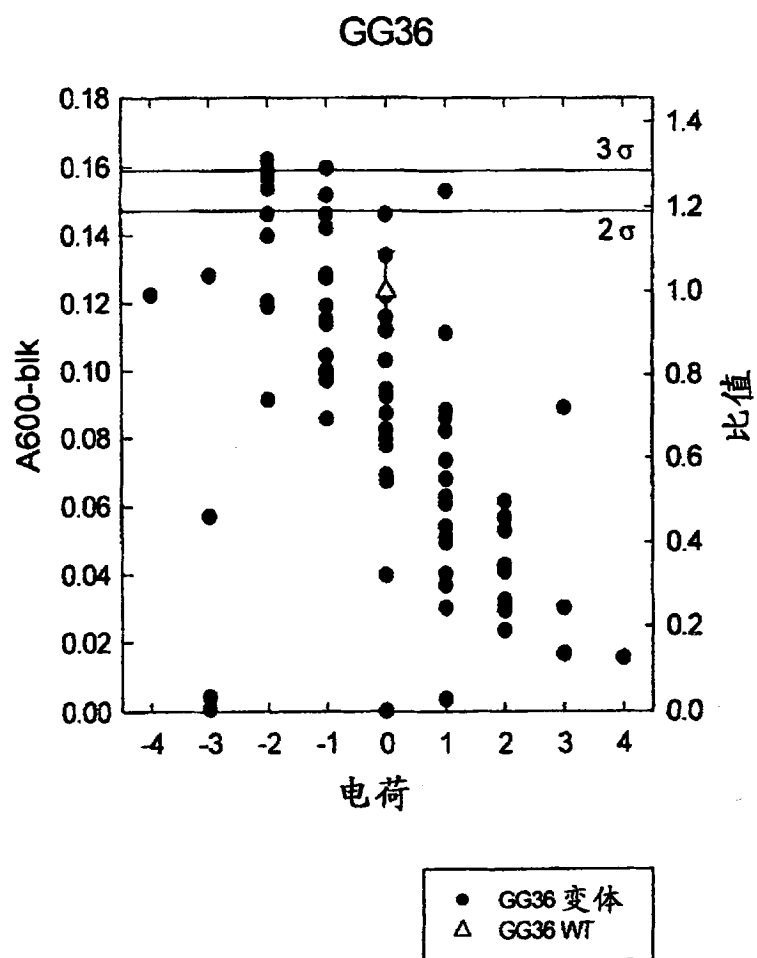
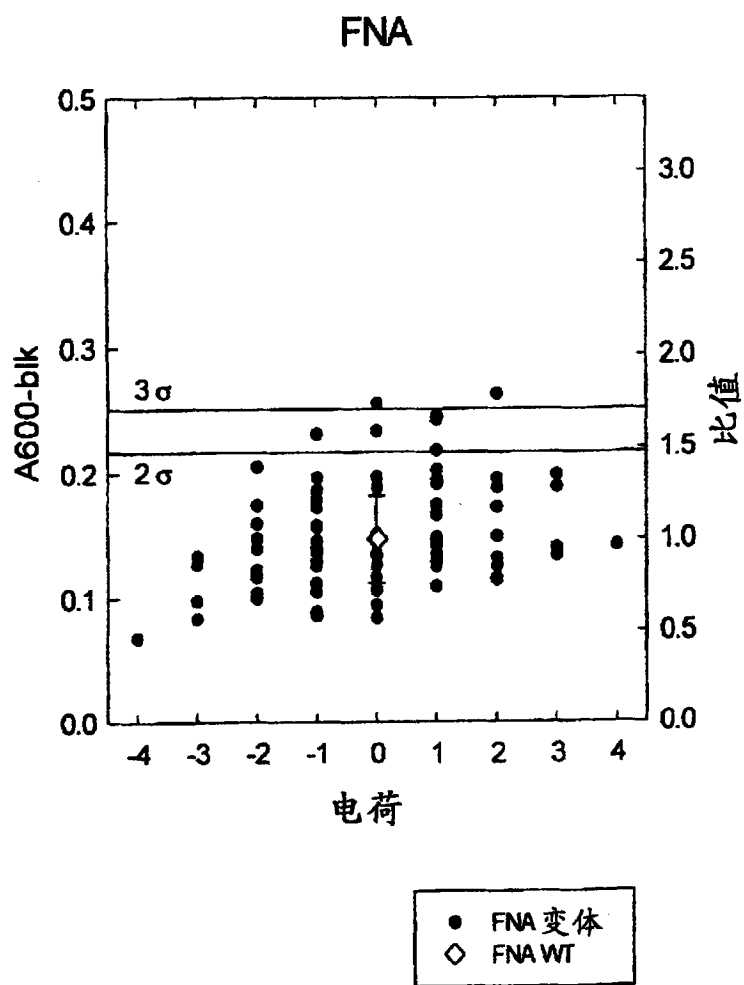


图 5B



自动餐具洗涤洗涤剂

图 6A

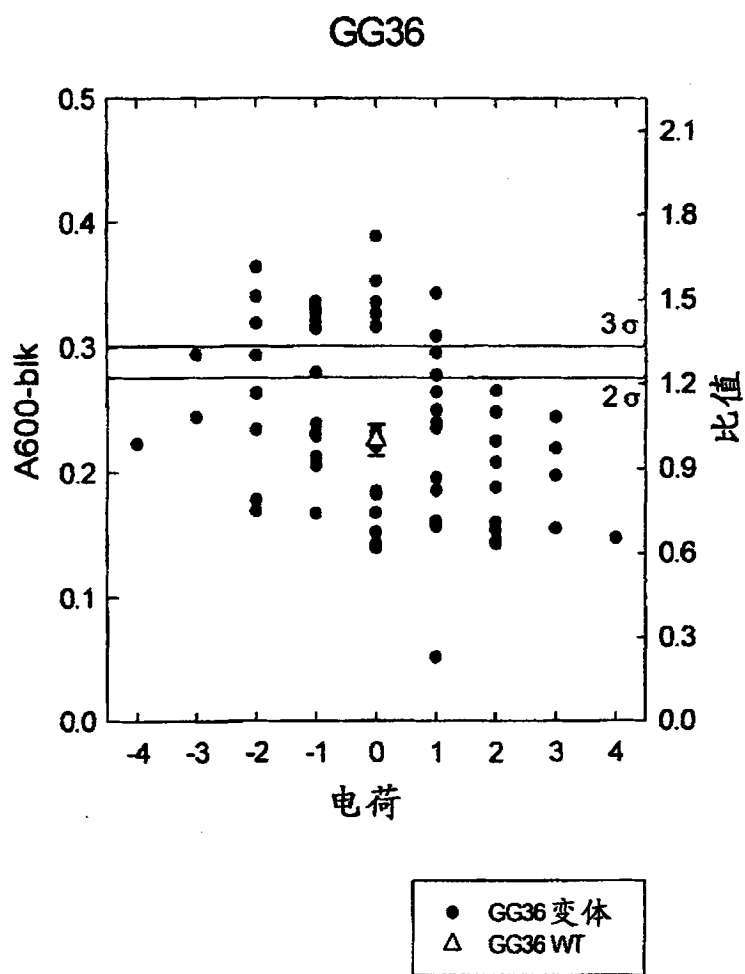


图 6B

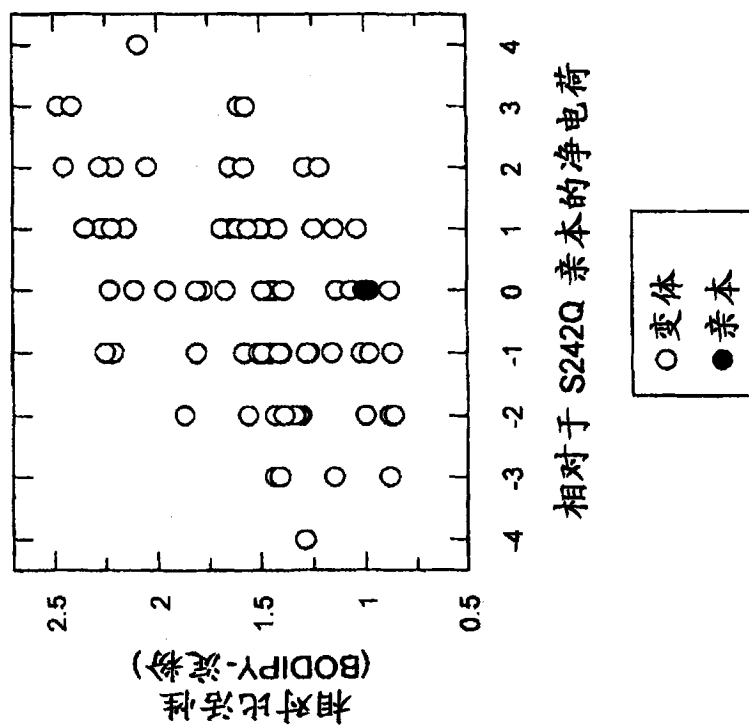


图 7A

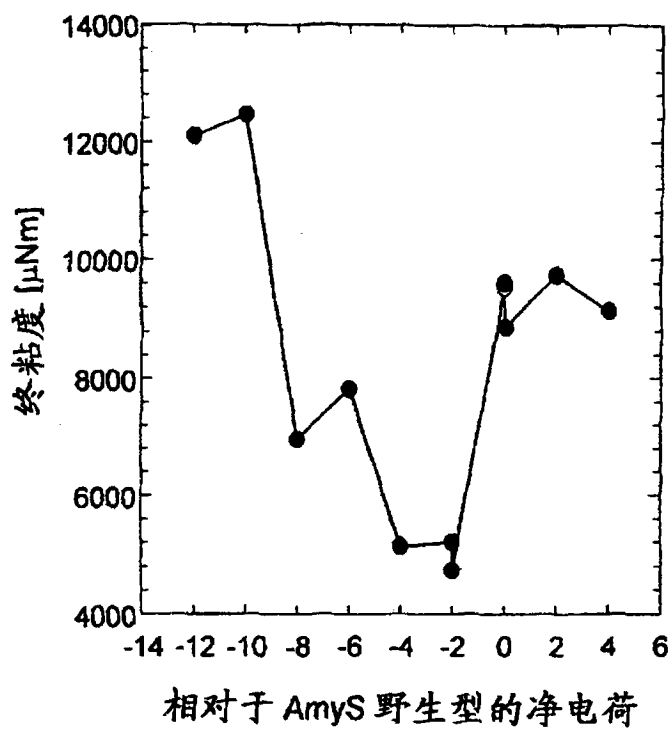


图 7B

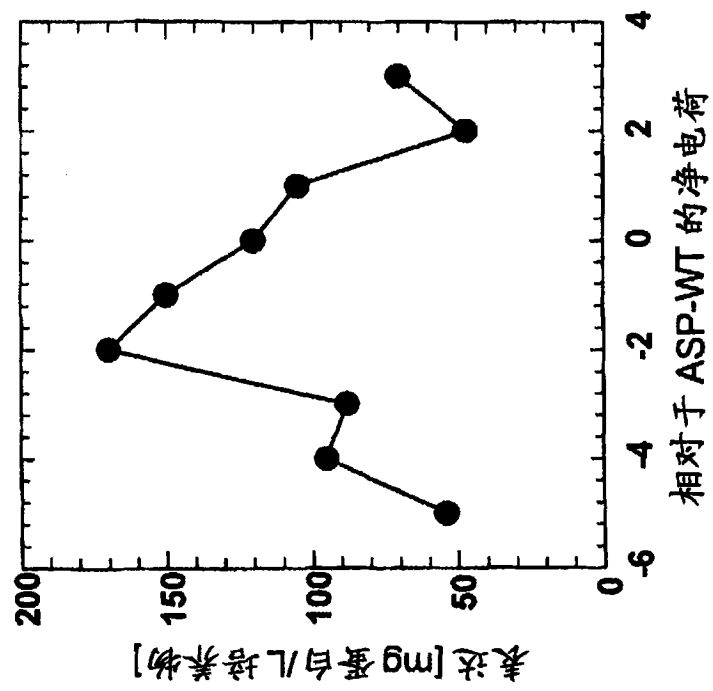


图 8

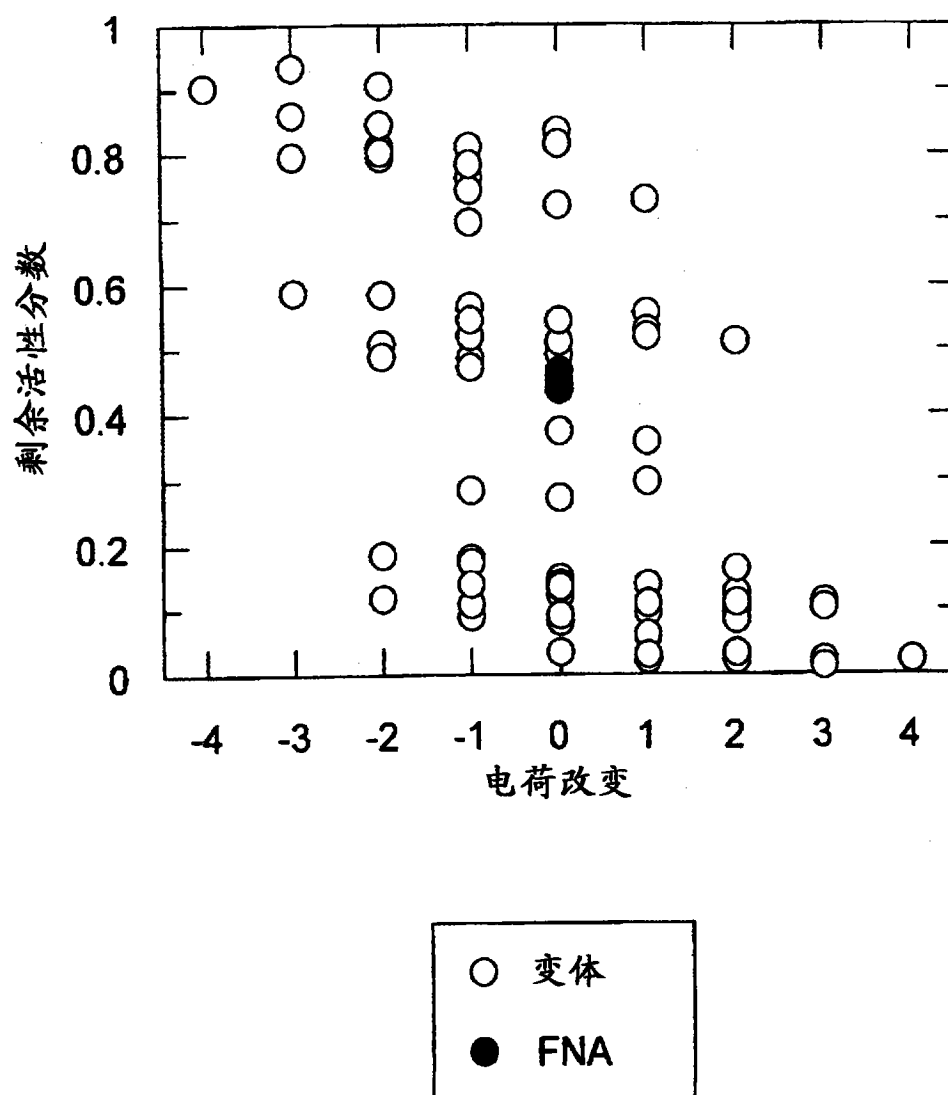


图 9

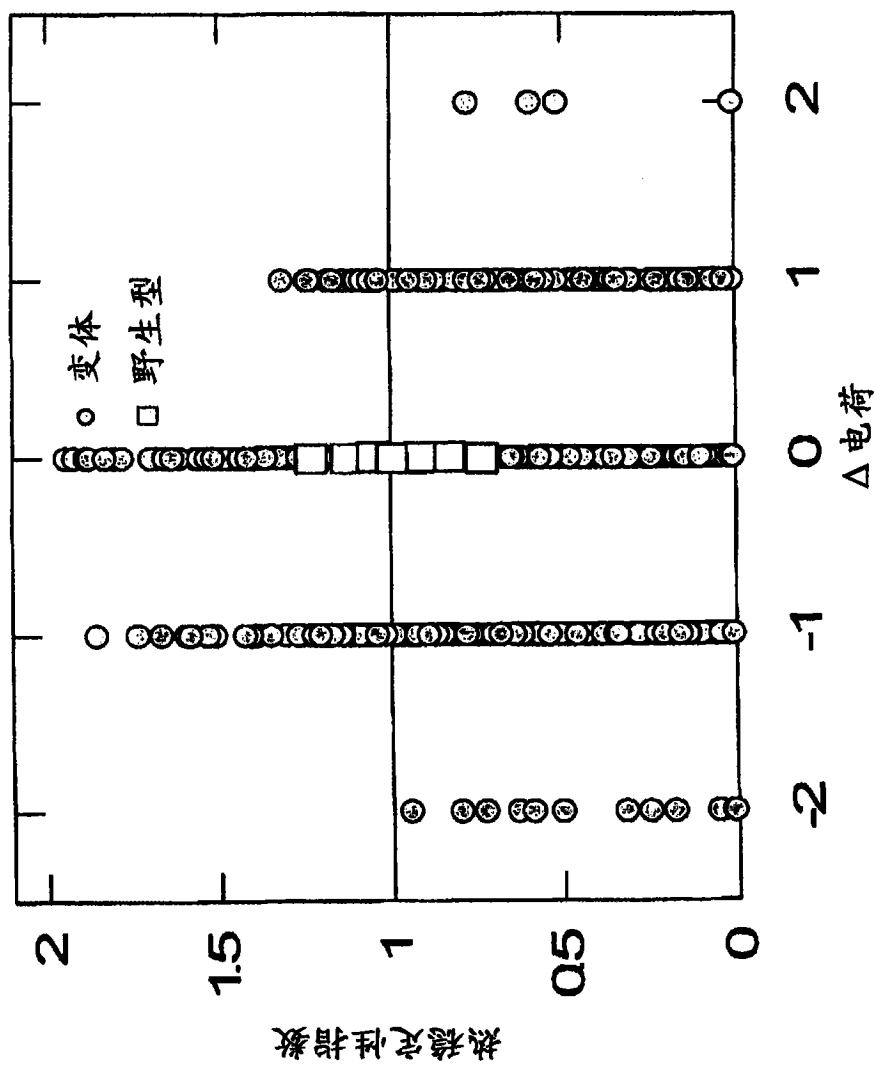


图 10

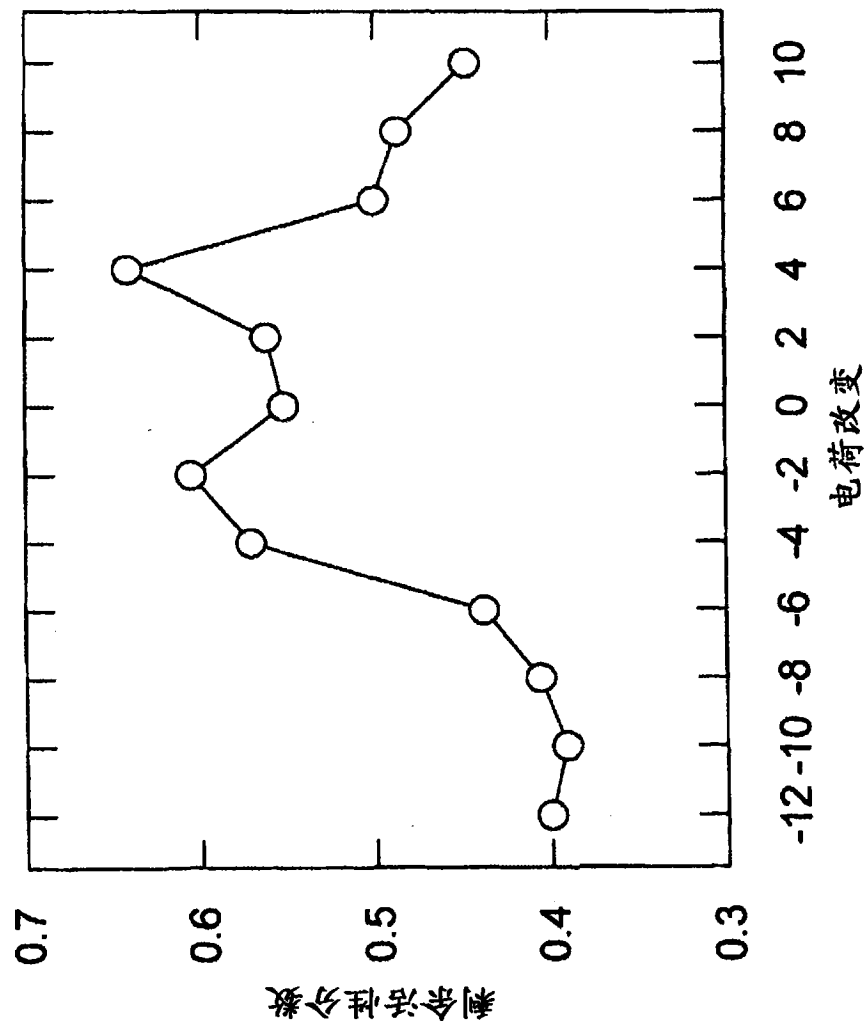


图 11

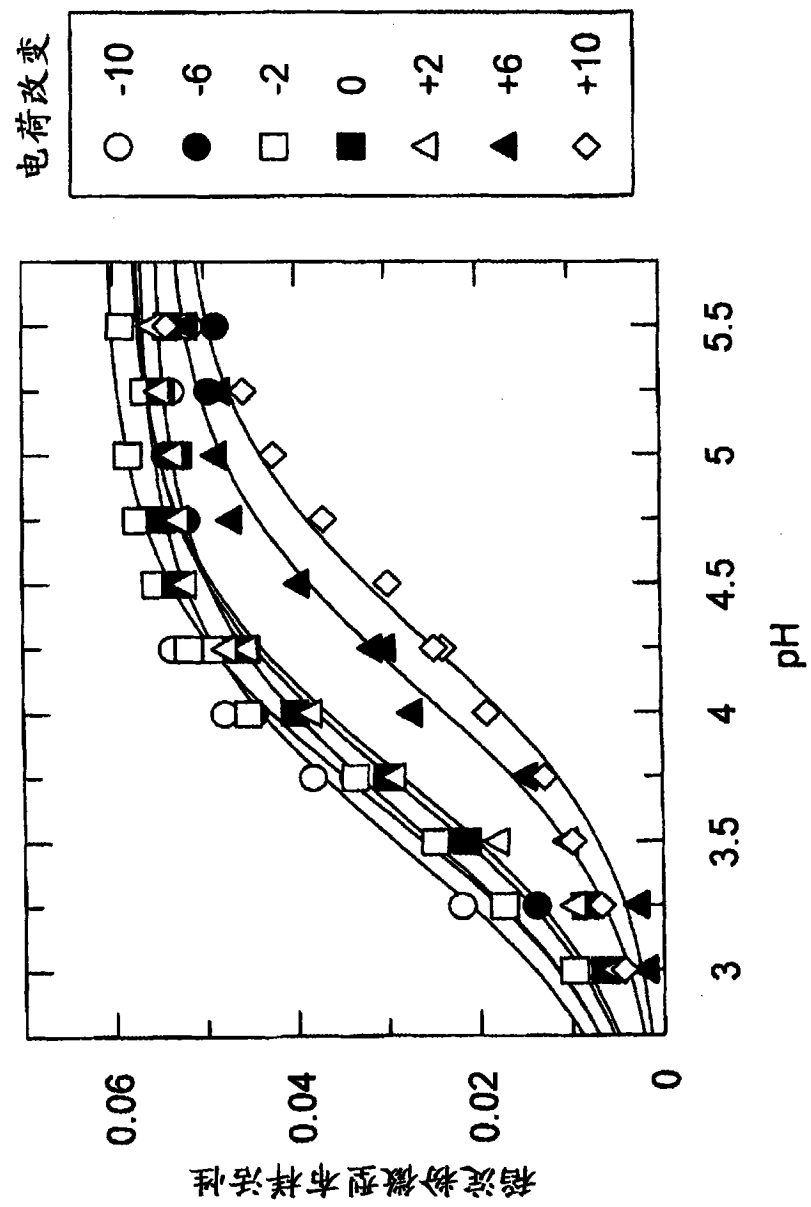


图 12

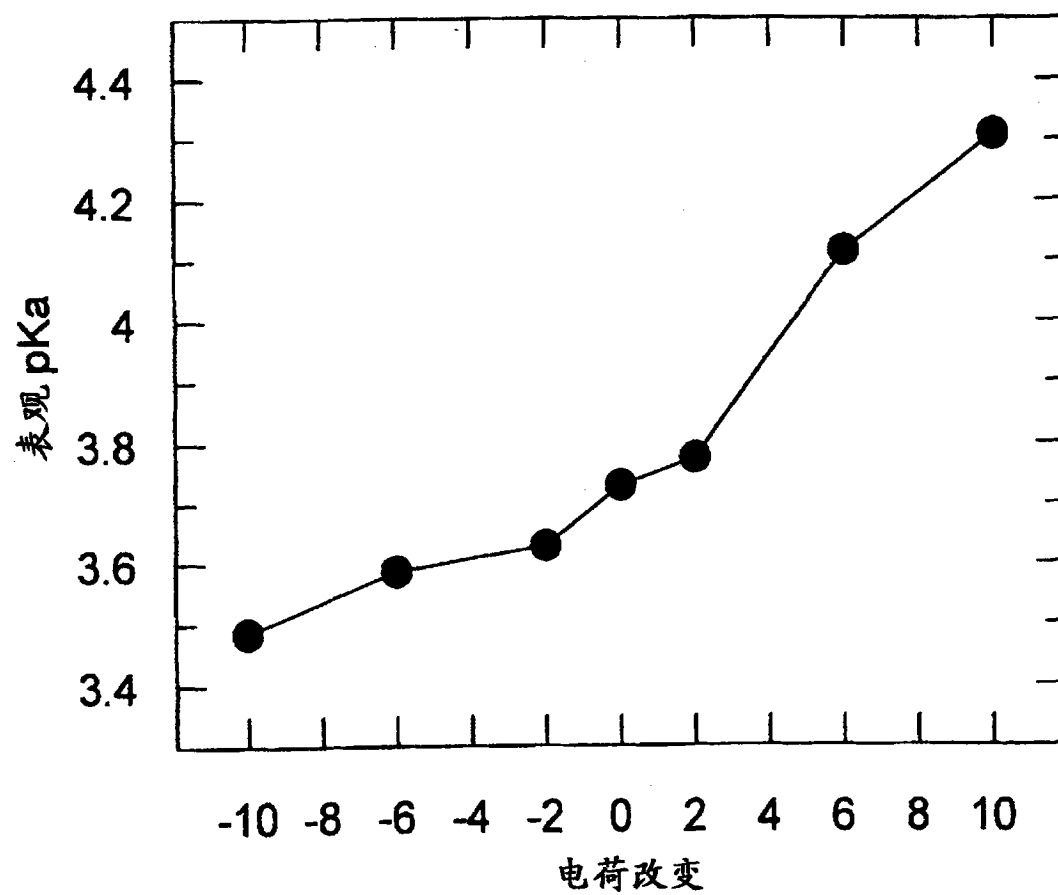


图 13