



(10) 授权公告号 CN 105408477 B

(45) 授权公告日 2025.05.27

(21) 申请号 201480039197.8

(22) 申请日 2014.07.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105408477 A

(43) 申请公布日 2016.03.16

(30) 优先权数据
13175790.8 2013.07.09 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.01.08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/064767 2014.07.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/004211 EN 2015.01.15

(73) 专利权人 环球生物能源公司

地址 法国埃弗里

专利权人 财富科学家股份有限公司

(72) 发明人 S·马扎勒拉 M·德勒库特
M·阿尼斯莫瓦 P·马利埃

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 黄革生 林柏楠

(51) Int.Cl.
C12N 9/90 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2012052427 A1, 2012.04.26

审查员 温婧

权利要求书3页 说明书43页
序列表2页 附图15页

(54) 发明名称

甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体

(57) 摘要

描述了在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有改进活性的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体。这类变体可以用于从3-羟基异戊酸生物产生异丁烯或从3-羟基-3-甲基丁酸生物产生异丁烯、用于从甲羟戊酸或从甲羟戊酸-3-磷酸生物产生3-甲基丁-3-烯-1-醇或用于从3-羟基戊-4-烯酸或从3-磷酸氧基戊-4-烯酸生物产生1,3-丁二烯的方法中。还描述一种酶,其特征在于它能够以多于 0.1s^{-1} 的 k_{cat} 将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯。

1. 甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的变体, 相对于其衍生自的对应的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶, 所述变体在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示改进的活性, 其中甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体的特征在于在SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中位置282处的半胱氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸或天冬氨酸取代。

2. 权利要求1的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体, 其中将SEQ ID NO:1中选自位置9、11、16、24、28、42、45、53、80、105、116、118、120、121、122、123、129、134、141、159、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315的位置处至少一个其他氨基酸残基再取代。

3. 权利要求1或2的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体, 其中:

(1) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置16处的氨基酸残基用亮氨酸取代; 和/或

(2) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置23处的氨基酸残基用亮氨酸取代; 和/或

(3) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置24处的氨基酸残基用精氨酸、丝氨酸或亮氨酸取代; 和/或

(4) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置28处的氨基酸残基用赖氨酸或丙氨酸取代; 和/或

(5) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置31处的氨基酸残基用丝氨酸取代; 和/或

(6) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置105处的氨基酸残基用丙氨酸取代; 和/或

(7) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置111处的氨基酸残基用甲硫氨酸取代; 和/或

(8) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置134处的氨基酸残基用甘氨酸取代; 和/或

(9) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置139处的氨基酸残基用半胱氨酸或丙氨酸取代; 和/或

(10) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置141处的氨基酸残基用脯氨酸、半胱氨酸、甘氨酸或苏氨酸取代; 和/或

(11) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置142处的氨基酸残基用丙氨酸取代; 和/或

(12) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置182处的氨基酸残基用谷氨酸取代; 和/或

(13) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置186处的氨基酸残基用组氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或天冬酰胺取代; 和/或

(14) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置188处的氨基酸残基用半胱氨酸取代; 和/或

(15) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置279处的氨基酸残基用丙氨酸取代。

4. 权利要求1或2的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体,其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282处的氨基酸残基用半胱氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸或天冬氨酸取代,并且其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置121处的氨基酸残基用精氨酸取代。

5. 权利要求1或2的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体,所述变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列,其中已经实现以下取代:

K24R-C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-E291D-F297L-L303M-T308S。

6. 权利要求5的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体,所述变体显示以下额外的取代:
S141P-I16L-K241I-S248T-M28K-K180P。

7. 权利要求5的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体,所述变体显示以下额外的取代:
S141P-I16L-R91H-K241M-S248T-Q299K。

8. 权利要求1或2的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体,所述变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列,其中已经实现以下取代:

Y121R-E159L-M173C-K282C-L303M-T308S。

9. 核酸分子,其编码权利要求1至8中任一项的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体。

10. 载体,其包含权利要求9的核酸分子。

11. 宿主细胞,其包含权利要求10的载体。

12. 用于提供甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的变体的方法,其中所述变体在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示改进的活性,所述方法包括步骤:用半胱氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸或天冬氨酸取代SEQ ID NO:1所示氨基酸序列中的氨基酸位置282处的氨基酸。

13. 权利要求12的方法,其中实现的变化还包括权利要求2中所述的变化。

14. 权利要求1至8中任一项的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶或权利要求11的宿主细胞用于将3-羟基异戊酸或3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的用途。

15. 用于从3-羟基异戊酸或从3-磷酸氧基异戊酸生产异丁烯的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 在合适的培养基中培养权利要求11的宿主细胞;和
- (ii) 回收生产的异丁烯。

16. 权利要求1至8中任一项的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶或权利要求11的宿主细胞用于将甲羟戊酸或甲羟戊酸-3-磷酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇的用途。

17. 用于从甲羟戊酸或从甲羟戊酸-3-磷酸生产3-甲基丁-3-烯-1-醇的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 在合适的培养基中培养权利要求11的宿主细胞;和
- (ii) 回收生产的3-甲基丁-3-烯-1-醇。

18. 权利要求1至8中任一项的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶或权利要求11的宿主细胞的用于将3-羟基戊-4-烯酸或3-磷酸氧基戊-4-烯酸转化成1,3-丁二烯的用途。

19. 用于从3-羟基戊-4-烯酸或从3-磷酸氧基戊-4-烯酸生产1,3-丁二烯的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 在合适的培养基中培养权利要求11的宿主细胞;和

(ii) 回收生产的1,3-丁二烯。

甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体

[0001] 本发明涉及在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有改进的活性的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体。另外,本发明涉及酶,所述酶的特征在于它们能够将3-磷酸氧基异戊酸以多于 0.1s^{-1} 的 k_{cat} 转化成异丁烯。

[0002] 许多的化学化合物目前源自石油化学品。烯类(如乙烯、丙烯、不同的丁烯或其他戊烯,例如)在例如用于产生聚丙烯或聚乙烯的塑料工业,和在化学工业其他领域和燃料领域中使用。在过去数年,塑料(“生物塑料”)和生物燃料的生物生产已经变成繁荣发展的领域,归因于与油价相关的经济顾虑和全球性(碳中和产品)和本地(废物管理)的环境考虑。因此,需要用于产生烯类如异丁烯的有效率的酶。

[0003] WO 2010/001078描述了通过用具有脱羧酶活性的酶,例如甲羟戊酸二磷酸(MDP)脱羧酶,酶促转化3-羟基烷酸而产生烯类(如异丁烯)的方法。这种方法是有利的,因为它有助于避免使用石油产品,有助于降低产生塑料和燃料的成本,并且通过允许以固体形式储藏碳能够产生可观的全球环境影响。可以显示,甲羟戊酸二磷酸脱羧酶能够利用除其天然底物甲羟戊酸二磷酸,尤其3-羟基烷酸之外的底物,并将它们转化成最终的烯。甲羟戊酸二磷酸(MDP)脱羧酶(酶命名法EC 4.1.1.33)是参与胆固醇生物合成的酶。这种酶已经从包括动物、真菌、酵母和一些细菌的多种生物分离。它也可以由一些植物表达(Lalitha等人, *Phytochemistry* 24(11), (1985), 2569-2571)。已经克隆和测序了编码这种酶的许多基因。这些酶是通常由300至400个氨基酸组成并且使用ATP作为共底物,所述ATP在反应期间转化成ADP和无机磷酸。在第一步骤中,磷酸基团从ATP分子转移至甲羟戊酸二磷酸的叔醇,释放ADP。在3-羟基上磷酸化的反应中间体在第二步骤中经历磷酸基团的消除及脱羧,在生理情况下释放异戊烯基二磷酸。

[0004] MDP脱羧酶已经从多种不同真核和原核生物分离,并且已经详细分析及表征。另外,已经产生多种突变体以鉴定可能在酶的酶促活性中发挥重要作用的氨基酸残基。例如, Alvear等人(*Biochemistry* 21(1982), 4646-4650)描述禽肝MDP脱羧酶的纯化和表征,并且 Dhe-Paganon等人(*Biochemistry* 33(1994), 13355-13362)描述了受MDP脱羧酶催化的反应的机理。Berges等人(*J. Bacteriol.* 179(1997), 4664-4670)报道了导致热敏感性的酿酒酵母(*S. cerevisiae*)MDP脱羧酶的突变。Krepkiy和Mizioro(*Protein Sci.* 13(2004), 1875-1881)鉴定酵母的MDP脱羧酶中的活性位点残基并且分析了导致活性降低的突变。类似地, Krepkiy和Mizioro(*Biochemistry* 44(2005), 2671-2677)就其相关性研究了位于MDP脱羧酶的所建议的结构域间活性部位裂隙中的保守丝氨酸残基并且可以证实这些丝氨酸残基中任一个的突变均导致活性降低或丧失。另外, Qiu等人(*Bioorganic&medicinal Chemistry Letters* 17(2007), 6164-6168)分析了(大鼠)MDP脱羧酶并报道了导致活性降低或丧失的多种突变体。Voynova等人(*Arch. Biochem. Biophys.* 480(2008), 58-67)表征了人MDP脱羧酶并鉴定出导致酶活性降低或损失的若干氨基酸残基。

[0005] 另外,已经建立了不同来源的几种MDP脱羧酶和MDP脱羧酶突变体的晶体结构,例如以下酶的晶体结构:表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)酶(Barta等人, *J. Biol. Chem.* 286(2011), 23900-23910; Barta等人, *Biochemistry* 51(2012), 5611-5621;

PDB登录号3QT5-6-7-8和4DPX、4DPY、4DPU、4DPT、4DU8、4DU7和4DPW)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)酶(Byres等人, *J.Mol.Biol.* 371 (2007), 540-553; PDB登录号2HKE、2HK2、2HK3)、人类酶(Voynova等人, *Arch.Biochem.Biophys.* 480 (2008), 58-67; PDB登录号3D4J)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)酶(PDB登录号2GS8)、小鼠酶(PDB登录号3F0N)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)酶(PDB登录号3LT0)和酿酒酵母酶(Bonanno等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 98 (2001), 12896-12901; PDB登录号1FI4)。

[0006] Lefurgy等人(*J.Biol.Chem.* 285 (2010), 20654-20663)通过使用一系列MDP类似物分析了肺炎链球菌的MDP脱羧酶的配体结合袋,并且Weerasinghe和Dassanayake(*J.Mol.Model.* 16 (2010) 489-498)报道了使用Berges等人(*J.Bacteriol.* 179 (1997), 4664-4670)中描述的野生型酶和热敏感性突变体模拟酿酒酵母MDP脱羧酶的结构特性及功能特性。

[0007] Byres等人(*J.Mol.Biol.* 371 (2007), 540-553)比较了不同MDP脱羧酶的晶体结构,尤其来自布氏锥虫(*T.brucei*)、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母的那些脱羧酶的晶体结构并且观察到酶的总体构造维持保守。

[0008] WO 2010/001078尤其公开可以通过脱羧酶、尤其是MDP脱羧酶,将3-羟-3-甲基丁酸(或3-羟基异戊酸)转化成异丁烯。在这种情况下,反应中间体是3-磷酸氧基异戊酸,其在反应的第二部分中进一步转换成异丁烯。Gogerty等人(*Appl.Environ.Microbiol.* 76 (2010), 8004-8010)还报道使用来自酿酒酵母的MDP脱羧酶从3-羟-3-甲基丁酸形成异丁烯并且显示,在这种酶的残基145和74处的突变(位于此酶的建议的活性位点内部或与之接近处)导致3-羟-3-甲基丁酸至异丁烯的转化增加。但是,对于商业应用,产生异丁烯的水平仍然太低。

[0009] 后来的工作已经显示,就催化如上文所述反应的第一和第二步骤而言,不同的MDP脱羧酶可显示不同的效率,其中一些MDP脱羧酶显示在第一步中显示高活性并且其他在第二步中显示高活性。因此,已经提出组合在反应的第一和在第二步中分别显示高活性的两种MDP脱羧酶,从而优化总体酶促反应(WO 2012/052427)。

[0010] 然而,尽管这种方法允许通过酶促转化3-羟基烷酸来产生烯(例如,从3-羟基异戊酸生产异丁烯),但是仍需要改进,尤其在进一步提高方法的效率方面从而使其更适合于产业目的。

[0011] 本申请通过提供如权利要求书中定义的实施方案解决这种需求。

[0012] 特别地,本发明提供酶,所述酶的特征在于其能够将3-磷酸氧基异戊酸以多于 0.01s^{-1} 或 0.1s^{-1} 、优选地多于 1s^{-1} 、更优选地多于 10s^{-1} 并且甚至更优选地多于 10^2s^{-1} 或最优选地多于 10^3s^{-1} 的 k_{cat} 转化成异丁烯。优选地这类酶是甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体,并且甚至更优选地,这类酶具有与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列显示多于60%序列同源性的氨基酸序列。优选本发明的酶是非天然存在的酶。这意味着它们基本上与天然存在的酶不同,尤其就它们的一级结构,即,氨基酸序列而言不同。因此,它们显示在自然界中不存在的氨基酸序列。优选这类非天然存在的酶还与天然存在的酶不同在于它们对本文所述的反应具有更高酶促活性。

[0013] 因此,本发明尤其提供甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的变体,其就将3-磷酸氧基异戊酸

转化成异丁烯而言显示改进的活性,因而允许大幅度提高从3-羟基异戊酸产生异丁烯的效率。

[0014] 在本发明的上下文中,术语“甲羟戊酸二磷酸脱羧酶”指天然具有将甲羟戊酸二磷酸转化成异戊烯基二磷酸酯的能力并且分类为EC 4.1.1.33的酶。术语“甲羟戊酸二磷酸脱羧酶”还涵盖分类为甲羟戊酸二磷酸脱羧酶并且作用于甲羟戊酸单磷酸的酶,即所述酶是甲羟戊酸单磷酸脱羧酶。这种酶的例子是分类为甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的来自玫瑰弯菌属物种(*Roseiflexus* sp.) (菌株RS-1)的酶(Uniprot登录号:A5V173)。由于已经报道来自玫瑰弯菌属的一些细菌,例如*Roseiflexus castenholzii*,具有涉及甲羟戊酸单磷酸脱羧酶的作用的备选甲羟戊酸途径,来自玫瑰弯菌属物种的酶可以充当甲羟戊酸单磷酸脱羧酶。另外,近已经在*T.acidophilum*中描述了第三条甲羟戊酸途径。在这条途径中,异戊烯基单磷酸的形成可能通过甲羟戊酸-3,5-焦磷酸(MVA-3,5-PP)发生。能够牵涉这种中间体脱羧的两个基因是Ta0461和Ta0893。这些基因能够与如IPR005935 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR005935>)的InterPro数据库中参考的二磷酸甲羟戊酸脱羧酶家族相关,但是这两种酶可以充当甲羟戊酸-3,5-焦磷酸脱羧酶。因此,术语“甲羟戊酸二磷酸脱羧酶”也涵盖这类酶。本发明涉及从甲羟戊酸二磷酸脱羧酶衍生的变体。根据本发明的这种酶的变体由下述特征表征,即它们从具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列或具有相关序列(至少40%相同、优选地至少50%相同、甚至更优选地至少60%或至少90%相同)并且其中突变在如下文所示的一个或多个位置处实现的MDP脱羧酶衍生,并且由以下特征表征,即它们显示将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的能力以及它们可以以改进的活性完成这种转化。在优选的实施方案中,根据本发明的变体衍生自显示与SEQ ID NO:1至少80%序列同一性并且其中已经在下文所示的位置处实现一个或多个取代和/或缺失和/或插入的序列。

[0015] 鉴于MDP脱羧酶之间高度保守,本发明的教导不限于缓症链球菌(*S.mitis*)的酶(由SEQ ID NO:1代表)但可以扩展至来自其他生物的MDP脱羧酶。因此,本发明还涉及MDP脱羧酶的变体,所述变体衍生自结构上与缓症链球菌序列相关并且在与如下文所示任何位置相对应的位置处显示一个或多个取代和/或缺失和/或插入的酶。术语“结构上相关的”指与SEQ ID NO:1中所示的序列显示至少n%序列同一性的MDP脱羧酶,其中n是在40和100之间的整数,优选地是40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99。在优选的实施方案中,结构上相关的MDP脱羧酶是原核来源的。这些变体由以下特征表征:它们显示将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的能力并且与衍生这些变体的酶比较时,它们可以以改进的活性完成这种转化。甚至更优选地,与具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的酶相比时,这类变体还显示改进的活性。

[0016] 因此,在一个实施方案中,根据本发明的MDP脱羧酶的变体具有或优选地衍生自与SEQ ID NO:1至少n%相同并且在如下文所示的位置具有一个或多个取代和/或缺失和/或插入的序列,其中n是在40和100之间的整数,优选地是40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99。当比较的序列不具有相同的长度时,同一性程度指较短序列中与较长序列内氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数或指较长序列中与较短序列内氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。优选地,它指较短序列中与较长序列内氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。可以根据本领域熟知的方法,优选地使用合适的计算机算法(如CLUSTAL)确定序列同一性程度。

[0017] 当使用Clustal分析方法来确定特定序列是否与参考序列例如至少40%、50%或60%或90%相同时,对于氨基酸序列的比较,可以使用默认设置或者设置优选如下:矩阵:blosum 30;开放空位罚分:10.0;延伸空位罚分:0.05;延迟趋异:40;空位分隔距离:8。对于核苷酸序列比较,延伸空位罚分优选地设置至5.0。

[0018] 在优选实施方案中,ClustalW2是用于氨基酸序列的比较。在配对比较/比对的情况下,优选地选择以下设置:蛋白质权重矩阵:BLOSUM 62;空位开放:10;空位延伸:2。在多重比较/比对的情况下,优选地选择以下设置:蛋白质权重矩阵:BLOSUM 62;空位开放:10;空位延伸:2;空位距离:5;无末端空位。

[0019] 优选地,在序列的整个长度上计算同一性的程度。

[0020] 下表中显示与SEQ ID NO:1显示至少60%、特别是60%和80%之间序列同一性的MDP脱羧酶的实例。

[0021] 表1

条目名称 UniprotKb	登录	生物	输入 日期	数据 库最 后更 新	条 目 版 本	序 列 版 本	与 SEQ ID NO: 1 的 同一 性%
F5U3H6_STRAP	F5U3H6	咽峡炎链球菌 (Streptococcus anginosus)SK	2011 年 7 月 27 日	2011 年 10 月 19 日	3	1	77
A8AUU9_STRGC	A8AUU9	戈登链球菌 (Streptococcus gordonii)(菌株 Challis / ATCC 35105 / CH1 / DL1 / V288)	2011 年 10 月 23 日	2011 年 10 月 19 日	29	1	74
F2C8L7_STRSA	F2C8L7	血链球菌 (Streptococcus sanguinis)SK330	2011 年 5 月 31 日	2011 年 10 月 19 日	4	1	74
E7S990_9STRE	E7S990	澳洲链球菌 (Streptococcus australis) ATCC 700641	2011 年 4 月 5 日	2011 年 10 月 19 日	4	1	71

[0022]

[0023]

E7S3Q3_STRAG	E7S3Q3	无乳链球菌 (Streptococcus agalactiae)ATCC 13813	2011 年 4 月 5 日	2011 年 10 月 19 日	4	1	71
F0VY81_STRG2	F0VY81	解没食子酸链球菌 (Streptococcus gallolyticus)(菌株 ATCC BAA-2069)	2011 年 5 月 3 日	2011 年 10 月 19 日	5	1	71
B9DU65_STRU0	F0VY81	乳房链球菌 (Streptococcus uberis)(菌株 ATCC BAA-854/0140J)	2009 年 3 月 24 日	2011 年 10 月 19 日	21	1	70
E8JNQ3_STREI	E8JNQ3	马链球菌 (Streptococcus equi)ATCC 9812	2011 年 4 月 5 日	2011 年 10 月 19 日	4	1	70
E0PW14_STRPY	E0PW14	酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes) ATCC 10782	2010 年 11 月 2 日	2011 年 10 月 19 日	7	1	70
Q9FD58_STRPY	Q9FD58	酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)	2001 年 3 月 27 日	2011 年 10 月 19 日	49	1	70
D0GIF6_9FUSO	D0GIF6	古氏纤毛菌 (Leptotrichia goodfellowii)F0264	2009 年 12 月 15 日	2011 年 10 月 19 日	19	1	62

[0024] 下表中显示与SEQ ID NO:1显示至少80%、特别是80%和90%之间序列同一性的MDP脱羧酶的实例。

[0025] 表2

[0026]

条目名称 UniprotKb	登录	生物	输入日期	最后更新	条目版本	序列版本	与SEQ ID NO:1的同一性%
E8KA62_9STRE	E8KA62	Streptococcus peroris ATCC700780	2011年 4月5日	2011 年 10 月 19	5	1	89

				日				
[0027]	E8JYA8_9STRE	E8JYA8	婴儿链球菌 (Streptococcus infantis) ATCC700779	2011年 4月5日	2011 年 10 月 19 日	4	1	88
	F5VZT1_9STRE	F5VZT1	婴儿链球菌 (Streptococcus infantis) SK1076	2011年 7月27 日	2011 年 10 月 19 日	3	1	88

[0028] 下表中显示与SEQ ID NO:1显示至少90%、特别是90%和100%之间序列同一性的MDP脱羧酶的实例。

[0029] 表3

条目名称 UniprotKb	登录	生物	输入日期	最后更新	条目版本	序列版本	与SEQ ID NO:1的同一性%	
[0030]	E1LJ67_STRMT	E1LJG7	缓症链球菌 (Streptococcus mitis)SK321	2010年 11月 30日	2011 年 10 月 19 日	8	1	96
	E9FM52_9STRE	E9FM52	链球菌属物种 M334	2011年 4月5 日	2011 年 10 月 19 日	5	1	95
	E6KKU6_STRSA	E6KKU6	血链球菌 (Streptococcus sanguinis) ATCC 49296	2011年 3月8 日	2011 年 10 月 19 日	4	1	95
	D4FR73-STROR	D4FR73	口腔链球菌 (Streptococcus oralis) ATCC 35037	2010年 5月18 日	2011 年 10 月 19 日	9	1	94
	Q8DR50_STRR6	Q8DR50	肺炎链球菌属 (Streptococcus pneumonia) ATCC BAA-255/R6	2003年 3月1 日	2011 年 10 月 19 日	58	1	94

[0031] 可以由技术人员通过本领域已知的方法鉴定位于与SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列中如下文所示的位置相对应的位置处的氨基酸残基。例如,可以通过将所讨论的序列与SEQ ID NO:1中所示的序列比对并且通过确定与SEQ ID NO:1的上述位置对应的位置,鉴定这类氨基酸残基。比对可以用技术人员已知的手段和方法进行,例如通过使用已知的计算机算法如Lipman-Pearson方法(Science 227(1985),1435)或CLUSTAL算法。优选在这种比对中,将最大同源性分配给氨基酸序列中存在的保守氨基酸残基。

[0032] 在优选实施方案中,ClustalW2是用于氨基酸序列的比较。在配对比较/比对的情

况下,优选地选择以下设置:蛋白质权重矩阵:BLOSUM 62;空位开放:10;空位延伸:2。在多重比较/比对的情况下,优选地选择以下设置:蛋白质权重矩阵:BLOSUM 62;空位开放:10;空位延伸:2;空位距离:5;无末端空位。

[0033] 当借助这种方法比对MDP脱羧酶的氨基酸序列时,无论氨基酸序列中存在的插入或缺失是什么,均可以在每种MDP脱羧酶中确定相应氨基酸残基的位置。比对的实例在图10至12中提供。

[0034] 在本发明的上下文中,“用另一个氨基酸残基取代”意指所示位置处的相应氨基酸残基可以用任何其他可能的氨基酸残基取代,例如,天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸(Brustad和Arnold,Curr.Opin.Chem.Biol.15(2011),201-210),优选地用选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的氨基酸残基。下文进一步指出某些位置的优选取代。另外,术语“取代的”或“取代”还意指在所示位置处的相应氨基酸残基受到修饰。

[0035] 这类修饰包括天然发生的修饰和非天然发生的修饰。天然发生的修饰包括但不限于真核翻译后修饰,如连接官能团(例如乙酸酯、磷酸酯、羟基、脂质(甘氨酸残基的肉豆蔻酰化)和糖(例如精氨酸、天冬酰胺等的糖基化)。天然发生的修饰还涵盖由瓜氨酸化、氨甲酰化和半胱氨酸残基之间二硫键形成所致的化学结构变化;连接辅因子(可以共价连接的FMN或FAD)或连接肽(例如泛素化或SUMO化)。

[0036] 非天然发生的修饰例如包括体外修饰如赖氨酸残基的生物素化或包含非规范氨基酸(参见Liu和Schultz,Annu.Rev.Biochem.79(2010),413-44和Wang等人,Chem.Bio.2009March 27;16(3),323-336;doi:10.1016/j.chembiol.2009.03.001)。

[0037] 在本发明的上下文中,“缺失的”或“缺失”意指相应位置处的氨基酸缺失。

[0038] 在本发明的上下文中,“插入的”或“插入”意指在相应位置处插入一个或两个,优选地一个氨基酸残基,优选地在所示位置前方插入。

[0039] 因此,本发明涉及甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体,相对于其衍生自的相应甲羟戊酸二磷酸脱羧酶,所述变体在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示改进的活性,其中甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体的特征在于与变体衍生自的相应序列相比,它显示一个或多个取代、缺失和/或插入并且其中这些取代、缺失和/或插入出现在与SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的位置282、9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、121、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315相对应的一个或多个位置处。与这些位置“相对应的”意指与相关序列中这些位置中的任一者相对应。

[0040] 在优选实施方案中,变体衍生自的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶是这样的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶,其显示如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、优选地至少50%和甚至更优选地至少60%、或最优选地至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0041] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中在选自SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置9、11、16、

24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、121、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、282、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315位置处或在相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处的一个或多个氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代或缺失或在这些位置的至少一个位置处显示插入并且其中所述甲羟戊酸二磷酸脱羧酶在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有改进的活性。在优选实施方案中,缺失、插入或取代处于选自位置9、11、42、43、45、66、77、116、118、120、121、123、129、134、159、160、173、177、186、251、253、282、293、297、299、303、307和308的位置处。

[0042] 发明人已经发现,可以通过在某些位置突变MDP脱羧酶,大幅度改善甲羟戊酸二磷酸脱羧酶催化上述3-羟基异戊酸向异丁烯转化的第二步骤,即3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的活性。他们使用来自缓症链球菌的酶作为模型酶,其序列在SEQ ID NO:1中显示。鉴定的单突变导致与未突变的缓症链球菌酶序列(由SEQ ID NO:1代表)相比时,活性增加多至超过300%。组合突变导致活性进一步增加多至750%,并且鉴定到除这些组合之外的额外突变允许实现进一步增加16倍。

[0043] 特别地,发明人发现,在9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、121、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、282、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267或315位置处的取代或在这些位置的组合处的取代导致酶将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的能力大幅增加。

[0044] 如上文所示,根据本发明的MDP脱羧酶的变体特征在于,与变体衍生自的MDP脱羧酶相比时,它们在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示增加的活性。因此,在变体衍生自具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的缓症链球菌的MDP脱羧酶的情况下,与SEQ ID NO:1所示的MDP脱羧酶相比时,变体在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示增加的活性。当变体衍生自结构上与如上文定义的缓症链球菌的MDP脱羧酶相关的MDP脱羧酶时,与已经向其中引入相应突变的相应起始序列相比时,变体在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示增加的活性。在特别优选的实施方案中,与SEQ ID NO:1中所示的MDP脱羧酶相比时,这类变体还在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示增加的活性。可以通过本领域技术人员已知的方法确定将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的活性。在一个实施方案中,这种活性如本文所附的实施例中所述那样确定。在具体实施方案中,可以尤其通过使用以下测定测量这种活性:

[0045] 将编码各种酶的核酸分子转化入大肠杆菌,如大肠杆菌BL21DE3并且在大肠杆菌中表达酶。随后可以使用以下测量酶的活性

[0046] -粗制细胞裂解物(即,将细胞培养物离心,将细胞沉淀物重悬于低渗缓冲液中,超声处理,或者不超声处理但不离心);或

[0047] -可溶性级分(即在离心粗制细胞裂解物后获得的上清液);或

[0048] -纯化的蛋白质(即存在于可溶性级分中并且例如使用色谱捕集在树脂上的重组蛋白)。

[0049] 所表达酶的活性如下测试：

[0050] 通过将如上文所述的粗制细胞裂解物、可溶性级分或纯化的蛋白质与3-磷酸氧基异戊酸以50mM Tris pH 7终浓度混合，在玻璃GC瓶中配制反应混合物。提供ATP、MgCl₂和KCl作为辅因子。

[0051] 将瓶全密封并将反应混合物在37℃孵育适宜的时间(例如24小时)。通过将获自样品瓶的气相注入气相色谱，用气相色谱法确定由反应产生的异丁烯。测定中的对照是具有未转化的细菌、以空表达载体转化的细菌和表达相应起始酶(例如显示如SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的缓症链球菌酶)的细菌的培养物：。

[0052] 测定中所用的3-磷酸氧基异戊酸可以按不同方式制备。一个可能性是通过以下反应提供这种化合物：

[0053] 将0.063mg/ml纯化的*Thermophilus acidophilum* MDP脱羧酶与50mM羟基异戊酸、40mM ATP在50mM Tris-Cl pH 7、20mM KCl、20mM MgCl₂中混合并且在45℃孵育24小时。这种酶促制备的3-磷酸氧基异戊酸底物用于反应混合物中。

[0054] 另一个优选的可能性是化学合成该测定中所用的3-磷酸氧基异戊酸。图9中显示合成方案。

[0055] 如果测定中使用化学合成的3-磷酸氧基异戊酸，则浓度优选地在3mM和8mM之间，优选地，是5mM。

[0056] 在检验酶活性的优选测定中，使用纯化的酶。在这种情况下，反应混合物含有50mM Tris HCl pH 7.5中的500μg纯化的酶和3-磷酸氧基异戊酸(如上文所述提供)。

[0057] 确保存在辅因子如ATP、MgCl₂和KCl。将体积用50mM Tris HCl pH 7.5调节至500μl并将反应在37℃孵育15小时。随后，通过气相色谱法确定产生的异丁烯。

[0058] 在一个实施方案中，如上文所述酶促地制备3-磷酸氧基异戊酸。

[0059] 在特别优选的实施方案中，化学合成3-磷酸氧基异戊酸。在这种情况下，反应混合物含有：

[0060] 200μg纯化的酶

[0061] 3-磷酸氧基异戊酸

[0062] 5mM ATP、20mM KCl、10mM MgCl₂和50mM Tris-Cl pH 7.5。

[0063] 为了测试酶活性，使用3-磷酸氧基异戊酸的变动浓度，优选地以下浓度：0.625mM、1.25mM、2.5mM、5mM、10mM、20mM、40mM、80mM和160mM。特别优选3-磷酸氧基异戊酸的浓度是5mM。

[0064] 将体积用50mM Tris HCl pH 7.5调节至500μl并将反应在37℃孵育15小时。随后，通过气相色谱法确定产生的异丁烯。

[0065] 下文实施例部分实施例1中给出确定酶将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的活性的这种测定的实例。

[0066] 在本发明的上下文中，“改进的活性”意指所讨论的MDP脱羧酶的活性至少10%、优选地至少20%、更优选地至少30%或50%、甚至更优选地至少70%或80%和特别优选至少90%或100%高于变体衍生自的MDP脱羧酶的活性、优选地高于SEQ ID NO:1代表的缓症链球菌的MDP脱羧酶的活性。在甚至更优选的实施方案中，改进的活性可以为至少150%、至少200%、至少300%、至少750%或至少1000%高于变体衍生自的MDP脱羧酶的活性、优选地高

于SEQ ID NO:1代表的缓症链球菌MDP脱羧酶的活性。在特别优选的实施方案中,通过使用采用纯化的酶和如上文所述的化学合成的3-磷酸氧基异戊酸的测定测量活性。变体的改进活性可以计量为与亲本酶相比,在限定条件下给定时间内更高的异丁烯生产。这种改进的活性可以由于较高的kcat值。它还可以由于较低的Km值。它还可以由于较高的kcat/Km值。改进的程度可以计量为异丁烯生产的改进。也可以就kcat改善、kcat/Km改善而言或就Km降低而言计量改进的程度。

[0067] 根据一个实施方案,本发明的MDP脱羧酶具有氨基酸序列,其中

[0068] (1) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置1处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或

[0069] (2) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置2处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用组氨酸取代;和/或

[0070] (3) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置9处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或

[0071] (4) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置11处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用半胱氨酸、谷氨酸或苯丙氨酸、优选地半胱氨酸取代;和/或

[0072] (5) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置16处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或

[0073] (6) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置23处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或

[0074] (7) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置24处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用精氨酸、丝氨酸或亮氨酸取代;和/或

[0075] (8) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置28处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用赖氨酸或丙氨酸取代;和/或

[0076] (9) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置31处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丝氨酸取代;和/或

[0077] (10) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置42处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丙氨酸或亮氨酸取代;和/或

[0078] (11) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置43处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或

[0079] (12) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置45处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸、优选地亮氨酸取代;和/或

[0080] (13) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置53处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用缬氨酸取代;和/或

[0081] (14) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置57处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丝氨酸取代;和/或

[0082] (15) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置58处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用苏氨酸取代;和/或

- [0083] (16) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置66处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用组氨酸取代;和/或
- [0084] (17) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置75处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用异亮氨酸取代;和/或
- [0085] (18) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置77处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用天冬酰胺或精氨酸取代;和/或
- [0086] (19) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置80处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用甘氨酸取代;和/或
- [0087] (20) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置86处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酰胺取代;和/或
- [0088] (21) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置87处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酸取代;和/或
- [0089] (22) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置91处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用组氨酸取代;和/或
- [0090] (23) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置105处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丙氨酸取代;和/或
- [0091] (24) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置111处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用甲硫氨酸取代;和/或
- [0092] (25) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置116处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用精氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丝氨酸或甲硫氨酸、优选地精氨酸或异亮氨酸取代;和/或
- [0093] (26) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置118处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸或色氨酸取代;和/或
- [0094] (27) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置120处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用天冬酰胺、亮氨酸、精氨酸、异亮氨酸或缬氨酸、优选地天冬酰胺、亮氨酸、精氨酸或异亮氨酸取代;和/或
- [0095] (28) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置121处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用精氨酸、亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、天冬酰胺或赖氨酸、优选地精氨酸或苯丙氨酸取代;和/或
- [0096] (29) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置122处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用甲硫氨酸或酪氨酸取代;和/或
- [0097] (30) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置123处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用甲硫氨酸或精氨酸取代;和/或
- [0098] (30) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置129处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用脯氨酸或缬氨酸取代;和/或
- [0099] (32) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置134处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用甘氨酸取代;和/或
- [0100] (33) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置139处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用半胱氨酸或丙氨酸取代;和/或

- [0101] (34) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置141处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用脯氨酸、半胱氨酸、甘氨酸或苏氨酸取代;和/或
- [0102] (35) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置142处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丙氨酸取代;和/或
- [0103] (36) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置159处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或
- [0104] (37) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置160处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用缬氨酸取代;和/或
- [0105] (38) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置161处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用精氨酸取代;和/或
- [0106] (39) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置164处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酰胺取代;和/或
- [0107] (40) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置166处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丝氨酸取代;和/或
- [0108] (41) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置173处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用半胱氨酸取代;和/或
- [0109] (42) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置177处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用缬氨酸或半胱氨酸、优选地缬氨酸取代;和/或
- [0110] (43) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置179处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用赖氨酸或亮氨酸取代;和/或
- [0111] (44) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置180处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用脯氨酸取代;和/或
- [0112] (45) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置182处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酸取代;和/或
- [0113] (46) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置186处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用组氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或天冬酰胺取代;和/或
- [0114] (47) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置188处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用半胱氨酸取代;和/或
- [0115] (48) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置198处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用天冬氨酸取代;和/或
- [0116] (49) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置204处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或
- [0117] (50) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置205处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用组氨酸取代;和/或
- [0118] (51) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置208处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或
- [0119] (52) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置215处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丙氨酸取代;和/或

- [0120] (53) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置221处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酸取代;和/或
- [0121] (54) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置227处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用赖氨酸取代;和/或
- [0122] (55) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置231处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酰胺或亮氨酸取代;和/或
- [0123] (56) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置238处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用精氨酸、谷氨酸或赖氨酸取代;和/或
- [0124] (57) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置241处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用甲硫氨酸或异亮氨酸取代;和/或
- [0125] (58) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置242处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丙氨酸或谷氨酸取代;和/或
- [0126] (59) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置246处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酸取代;和/或
- [0127] (60) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置248处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用苏氨酸取代;和/或
- [0128] (61) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置251处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用甲硫氨酸、苯丙氨酸或缬氨酸、优选地甲硫氨酸取代;和/或
- [0129] (62) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置252处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酸取代;和/或
- [0130] (63) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置253处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用缬氨酸或异亮氨酸取代;和/或
- [0131] (64) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置255处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酸取代;和/或
- [0132] (65) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置258处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用亮氨酸取代;和/或
- [0133] (66) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置264处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用谷氨酰胺取代;和/或
- [0134] (67) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置267处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用精氨酸取代;和/或
- [0135] (68) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置279处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丙氨酸取代;和/或
- [0136] (69) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用半胱氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸或天冬氨酸取代;和/或
- [0137] (70) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置291处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用天冬氨酸取代;和/或
- [0138] (71) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置293处或相关序列中与这个位置

相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用苯丙氨酸或色氨酸取代；和/或

[0139] (72) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置297处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用半胱氨酸或亮氨酸、优选地半胱氨酸取代；和/或

[0140] (73) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置299处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用脯氨酸或赖氨酸取代；和/或

[0141] (74) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置303处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用甲硫氨酸取代；和/或

[0142] (75) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置307处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用组氨酸取代；和/或

[0143] (76) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置308处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丝氨酸取代；和/或

[0144] (77) 将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置315处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用丝氨酸取代。

[0145] 本发明还涉及如上文(1)至(77)中所限定的变体,其中如取代SEQ ID NO:1中位置处的氨基酸残基所指的氨基酸残基不是这个具体氨基酸残基,而是相对于所指的取代性氨基酸保守的氨基酸残基。

[0146] 可以根据本领域已知的手段和方法判定某氨基酸是否相对于另一个氨基酸保守。一个可能性是PAM250矩阵;备选地,可以使用Blosum Family矩阵。

[0147] 在一个实施方案中,本发明涉及MDP脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代或缺失。在优选实施方案中,本发明涉及这样的变体,其中在选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、121、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置9、11、16、24、28、42、45、53、80、91、105、116、118、120、121、122、123、129、141、159、161、173、177、180、215、238、241、242、248、251、253、264、279、291、293、297、299、303、307、308和315、甚至更优选地选自位置9、11、42、45、116、118、120、121、122、123、129、177、251、253、264、293、297和303的位置取代或缺失至少一个其他氨基酸残基。

[0148] 在一个具体实施方案中,将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用半胱氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺,苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸或天冬氨酸取代,优选地用半胱氨酸取代。在另一个具体实施方案中,在位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、121、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315中的任一位置处的取代如上文所示。

[0149] 在一个实施方案中,本发明涉及MDP脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1

中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置121处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用另一个氨基酸残基、优选地精氨酸、亮氨酸、赖氨酸或苯丙氨酸取代。在优选实施方案中,本发明涉及这样的变体,其中在选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、282、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置11、16、24、28、45、53、80、91、105、116、118、120、123、141、159、161、173、177、180、215、238、241、242、248、258、279、282、291、297、299、303、307、308和315的位置处缺失或取代至少一个其他氨基酸残基。在这些位置中任一位置处的取代优选地是如上文列出的那些。

[0150] 本发明还涉及MDP脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282处或相关序列中与这个位置相对应的位置处氨基酸残基缺失或用另一个氨基酸残基取代,其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置121处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基缺失或用另一个氨基酸残基取代并且其中在选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置11、16、24、28、45、53、80、91、105、116、118、120、123、141、159、161、173、177、180、215、238、241、242、248、258、279、291、297、299、303、307、308和315的位置处取代至少一个其他氨基酸残基。

[0151] 在另一个具体实施方案中,将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置121处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用精氨酸、亮氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸取代。在又一个优选的实施方案中,在位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315中的任一位置处的取代是如上文所示的那些。

[0152] 在优选实施方案中,本发明的变体特征在于,它含有至少三个缺失、取代和/或插入,其中一个缺失/取代处于SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282处或相关序列中与这个位置相对应的位置处,另一个缺失/取代处于SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置121处或相关序列中与这个位置相对应的位置处并且至少一个其他缺失/取代处于选自SEQ ID NO:1的位置11、45、116、120或177的位置处或与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0153] 优选至少通过缺失或取代修饰SEQ ID NO:1中的以下位置或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置:

[0154] 45、121和282;或

[0155] 11、121和282;或

[0156] 116、121和282;或

[0157] 121、177和282;或

[0158] 120、121和282;或

[0159] 173、282和297。

[0160] 在所示位置的取代优选地是如上文所示的那些。

[0161] 具有三个突变的特别优选的变体显示在SEQ ID NO:1中的以下取代:

[0162] E45L-Y121R-K282C

[0163] K282C-Y121R-Y11E

[0164] K116I-Y121R-K282C

[0165] Y121R-E177V-K282C

[0166] A120R-Y121L-K282C

[0167] M173C-K282C-F297L

[0168] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0169] 本发明还涉及MDP脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置297处或相关序列中与这个位置相对应的位置处氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代,其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置297处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代并且其中将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置173处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代。在具体实施方案中,将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用半胱氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺,苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸或天冬氨酸取代,优选地用半胱氨酸取代。在另一个具体实施方案中,将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置297处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用亮氨酸取代。在又一个实施方案中,将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置173处或相关序列中与这个位置相对应的位置处的氨基酸残基用半胱氨酸取代。

[0170] 在另一个实施方案中,本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置9、11、16、24、28、45、53、80、91、105、118、121、123、141、159、161、173、177、180、215、238、241、242、248、258、279、282、291、297、299、303、307、308和315的位置处或在如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少四个缺失和/或取代。优选地,所述缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置303处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由甲硫氨酸替换。在另一个实施方案中,剩余三个位置处的取代在选自位置45、121、173、282、307和308的位置处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处实现。

[0171] 优选至少通过缺失或取代修饰SEQ ID NO:1中的以下位置或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置:

[0172] 121、282、303和308;或

[0173] 173、303、307和308;或

[0174] 45、173、282和303。

[0175] 优选地,位置45处的取代是缬氨酸,位置121处的取代是精氨酸,位置173或282处的取代是半胱氨酸,位置307处的取代是组氨酸并且位置308处的取代是丝氨酸。最优选的是以下取代组合:Y121R-K282C-L303M-T308S;M173C-L303M-K307H-T308S;E45V-M173C-K282C-L303M或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0176] 在另一个实施方案中,根据本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置9、11、16、24、28、45、53、80、91、105、118、121、123、141、159、161、173、177、180、215、238、241、242、248、258、279、282、291、297、299、303、307、308和315的位置处或在如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少五个缺失和/或取代。优选地,这些取代之处于SEQ ID NO:1的位置303处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由甲硫氨酸替换。在另一个实施方案中,剩余三个位置处的缺失/取代在选自位置9、11、118、121、159、173、282、307和308的位置处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处实现。

[0177] 优选至少通过缺失或取代修饰SEQ ID NO:1中的以下位置或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置:

[0178] 121、173、282、303和308;或

[0179] 159、173、303、307和308;或

[0180] 9、11、303、307和308;或

[0181] 118、121、173、282和303。

[0182] 优选地,位置9处的取代是亮氨酸,位置11处的取代是苯丙氨酸,位置118处的取代是亮氨酸,位置121处的取代是精氨酸,位置159处的取代是亮氨酸,位置173或282处的取代是半胱氨酸,位置307处的取代是组氨酸并且位置308处的取代是丝氨酸。

[0183] 具有五个突变的特别优选的变体显示在SEQ ID NO:1中的以下取代:

[0184] Y121R-M173C-K282C-L303M-T308S

[0185] E159L-M173C-L303M-K307H-T308S

[0186] R9L-Y11F-L303M-K307H-T308S

[0187] C118L-Y121R-M173C-K282C-L303M

[0188] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0189] 在另一个实施方案中,根据本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、

264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置16、24、28、45、53、80、91、105、118、121、123、141、159、161、173、177、180、215、238、241、242、248、258、279、282、291、297、299、303、307、308和315的位置处或在如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少六个缺失和/或取代。优选地,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置282处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由半胱氨酸替换。在另一个实施方案中,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置173处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由半胱氨酸替换。在另一个实施方案中,剩余四个位置处的缺失/取代在选自位置45、121、159、215、297、303和308的位置处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处实现。

[0190] 优选至少通过缺失或取代修饰SEQ ID NO:1中的以下位置或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置:

[0191] 121、159、173、282、303和308;或

[0192] 121、159、173、215、282和303;或

[0193] 45、159、173、282、297和308。

[0194] 优选地,位置45处的取代是亮氨酸,位置处121的取代是精氨酸,位置159处的取代是亮氨酸,位置215处的取代是丙氨酸,位置297处的取代是亮氨酸,位置303处的取代是甲硫氨酸并且位置308处的取代是丝氨酸。最优选以下取代组合:

[0195] 具有六个突变的特别优选的变体显示在SEQ ID NO:1中的以下取代:

[0196] Y121R-E159L-M173C-K282C-L303M-T308S

[0197] Y121R-E159L-M173C-V215A-K282C-L303M

[0198] E45L-E159L-M173C-K282C-F297L-T308S

[0199] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0200] 在另一个实施方案中,根据本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置16、24、28、45、53、80、91、105、118、121、123、141、159、161、173、177、180、215、238、241、242、248、258、279、282、291、297、299、303、307、308和315的位置处或在如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少七个取代。优选地,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置282处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由半胱氨酸替换。在另一个实施方案中,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置173处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由半胱氨酸替换。在另一个实施方案中,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置121处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由精氨酸替换。在另一个实施方案中,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置303处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由甲硫氨酸替

换。在另一个实施方案中,剩余三个位置处的缺失/取代在选自位置45、118、159、177、242、297、307、308和315的位置处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处实现。

[0201] 优选至少通过缺失或取代修饰SEQ ID NO:1中的以下位置或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置:

[0202] 121、159、173、282、303、307和308;或

[0203] 45、121、159、173、282、303和308;或

[0204] 121、159、173、282、297、303和308;或

[0205] 118、121、159、173、282、303和308;或

[0206] 121、159、173、177、282、303和308;或

[0207] 121、159、173、242、282、303和308;或

[0208] 118、121、159、173、282、303和315;或

[0209] 118、121、159、173、177、282和303;

[0210] 45、121、173、282、297、303和308;或

[0211] 45、118、121、173、282、303和308;或

[0212] 45、121、159、173、282、297和303。

[0213] 优选地,位置45处的取代是缬氨酸,位置118处的取代是亮氨酸或色氨酸,位置159处的取代是亮氨酸,位置177处的取代是半胱氨酸,位置242处的取代是丙氨酸,位置297处的取代是亮氨酸,位置307处的取代是组氨酸并且位置308或315处的取代是丝氨酸。最优选以下取代组合:

[0214] 具有七个突变的特别优选的变体显示在SEQ ID NO:1中以下取代:

[0215] Y121R-E159L-M173C-K282C-L303M-K307H-T308S

[0216] E45V-Y121R-E159L-M173C-K282C-L303M-T308S

[0217] Y121R-E159L-M173C-K282C-F297L-L303M-T308S

[0218] C118L-Y121R-E159L-M173C-K282C-L303M-T308S

[0219] Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-L303M-T308S

[0220] Y121R-E159L-M173C-T242A-K282C-L303M-T308S

[0221] C118L-Y121R-E159L-M173C-K282C-L303M-G315S

[0222] C118W-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-L303M

[0223] C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-L303M

[0224] E45V-Y121R-M173C-K282C-F297L-L303M-T308S

[0225] E45V-C118L-Y121R-M173C-K282C-L303M-T308S

[0226] E45V-Y121R-E159L-M173C-K282C-F297L-L303M

[0227] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0228] 在另一个实施方案中,根据本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位

置16、24、28、45、53、80、91、105、118、121、123、141、159、161、173、177、180、215、238、241、248、258、279、282、291、297、299、303、308和315的位置处或在如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少8个或至少9个缺失和/或取代。优选地,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置282处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由半胱氨酸替换。在另一个实施方案中,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置173处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由半胱氨酸替换。在另一个实施方案中,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置121处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由精氨酸替换。在另一个实施方案中,这些缺失/取代之处于SEQ ID NO:1的位置303处或如上文定义的相关序列中与这个位置相对应的位置处。更优选地,这个位置由甲硫氨酸替换。在另一个实施方案中,剩余四个和五个位置处的缺失/取代分别在选自位置24、45、80、118、123、159、177、215、258、297、308和315的位置处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处实现。

[0229] 优选至少通过缺失或取代修饰SEQ ID NO:1中的以下位置或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置:

- [0230] 80、121、159、173、282、303、308和315;或
- [0231] 24、121、159、123、173、258、282和303;或
- [0232] 118、121、159、173、177、215、282和303;或
- [0233] 24、118、121、159、173、177、282和303;或
- [0234] 45、80、121、173、282、297、303和308;或
- [0235] 45、121、159、173、177、282、303和308;或
- [0236] 118、121、159、173、177、282、297、303和308;或
- [0237] 118、121、159、173、177、215、282、297和303;或
- [0238] 80、118、121、159、173、177、282、303和315;或
- [0239] 24、45、121、123、173、282、297、303和308;或
- [0240] 45、121、159、173、177、215、258、282和303。

[0241] 优选地,位置24处的取代是精氨酸,位置45处的取代是缬氨酸或亮氨酸,位置80处的取代是甘氨酸,位置118处的取代是亮氨酸或色氨酸,位置123处的取代是精氨酸,位置159处的取代是亮氨酸,位置177处的取代是半胱氨酸,位置215处的取代是丙氨酸,位置258处的取代是亮氨酸,位置297处的取代是亮氨酸并且位置308或315处的取代是丝氨酸。

[0242] 具有8个或9个突变的特别优选的变体显示在SEQ ID NO:1中以下取代:

- [0243] D80G-Y121R-E159L-M173C-K282C-L303M-T308S-G315S
- [0244] K24R-121R-E159L-K123R-M173C-M258L-K282C-L303M
- [0245] C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-V215A-K282C-L303M
- [0246] K24R-C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-L303M
- [0247] E45V-D80G-Y121R-M173C-K282C-F297L-L303M-T308S
- [0248] E45L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-L303M-T308S
- [0249] C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-F297L-L303M-T308S
- [0250] C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-V215A-K282C-F297L-L303M

[0251] D80G-C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-L303M-G315S

[0252] K24R-E45V-Y121R-K123R-M173C-K282C-F297L-L303M-T308S

[0253] E45V-Y121R-E159L-M173C-E177C-V215A-M258L-K282C-L303M

[0254] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0255] 在另一个实施方案中,根据本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置16、24、28、45、53、91、105、118、121、141、159、161、173、177、180、215、238、241、248、279、282、291、297、299、303和308的位置处或在如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少10个取代。在一个实施方案中,缺失/取代的位置是位置45、118、121、159、173、215、282、297、303和308。优选地,位置45处的取代是缬氨酸,位置118、159和297处的取代是亮氨酸,位置121处的取代是精氨酸,位置173或282处的取代是半胱氨酸,位置215处的取代是丙氨酸,位置303处的取代是甲硫氨酸并且位置308处的取代是丝氨酸。因此,具有10个突变的特别优选的变体显示在SEQ ID NO:1中以下取代:

[0256] E45V-C118L-Y121R-E159L-M173C-V215A-K282C-F297L-L303M-T308S

[0257] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0258] 在另一个实施方案中,根据本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315、优选地选自位置16、24、28、53、91、105、118、121、141、159、161、173、177、180、238、241、248、279、282、291、297、299、303和308的位置处或在如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少11个缺失和/或取代。在一个实施方案中,缺失/取代的位置是位置24、118、121、159、173、177、282、291、297、303和308。优选地,位置24或121处的取代是精氨酸,位置118、159和297处的取代是亮氨酸,位置173、177或282处的取代是半胱氨酸或缬氨酸,位置291处的取代是天冬氨酸,位置303处的取代是甲硫氨酸并且位置308处的取代是丝氨酸。因此,具有11个突变的特别优选的变体显示在SEQ ID NO:1中以下取代:

[0259] K24R-C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-E291D-F297L-L303M-T308S

[0260] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0261] 含有这11个取代的突变体在所附实施例部分的上下文下也称作“F9”。

[0262] 在优选实施方案中,本发明的变体特征在于,它在SEQ ID NO:1中选自位置24、118、121、159、173、177、282、291、297、303和308的位置或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处含有至少10个、优选地至少11个缺失和/或取代,优选地如变体F9中的取代,并且它在SEQ ID NO:1中选自位置16、28、53、91、105、141、161、180、238、241、248、279、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和299的位置或如上文定义的相关序列中与这些

位置中任何位置相对应的位置处额外地含有至少一个其他缺失/取代。优选地,在这些位置中任一位置处的取代如上文定义。

[0263] 在一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16和105处或处于位置16和141处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0264] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141和241处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0265] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141、241和248处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0266] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置141、241和248处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0267] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、91、141、241和248处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0268] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、91、141、241、248和299处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0269] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、91、141、241、248、299和28处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0270] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、91、141、241、248、299和28处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0271] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141、241、248和28处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0272] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141、241、248、28和180处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0273] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141、241、248、28、53和180处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0274] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141、241、248、28、180和238处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0275] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141、241、248、28、180和279处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0276] 在另一个实施方案中,至少一个其他缺失/取代处于SEQ ID NO:1中位置16、141、241、248、28、180和161处或如上文定义的相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处。

[0277] 特别优选的变体在SEQ ID NO:1中选自位置24、118、121、159、173、177、282、291、297、303和308的位置处显示至少10个、优选地至少11个缺失和/或取代,优选地如变体F9中

的取代,或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代,并且额外地在SEQ ID NO:1中显示以下取代:

- [0278] S141P
- [0279] S141T
- [0280] S105A
- [0281] Q299K
- [0282] I16L
- [0283] S248T
- [0284] K241M
- [0285] I16L-S105A
- [0286] S141P-K241M-S248T
- [0287] I16L-R91H-S141P-K241M-S248T
- [0288] I16L-S141P
- [0289] I16L-R91H-S141P-K241M-S248T Q299K
- [0290] I16L-S141P-K241M
- [0291] I16L-S141P-K241M-S248T
- [0292] I16L-R91H-S141P-K241M-S248T-Q299K-M28K
- [0293] I16L-R91H-S141P-K241M-S248T-Q299K-M28A
- [0294] I16L-R91H-S141P-K241M-S248T-Q299K-K180P
- [0295] I16L-S141P-K241I-S248T
- [0296] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K
- [0297] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P
- [0298] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-T53V-K180P
- [0299] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-A238K
- [0300] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-A238R
- [0301] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-C282V
- [0302] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-P279A
- [0303] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-Y161R
- [0304] D2H
- [0305] M42L-D87E-S139C-R186L-K231Q
- [0306] E164Q-R186V-D252E
- [0307] D87E-S139C-R186L-K231Q
- [0308] R186V-Q267R
- [0309] S139C-R186I
- [0310] L111M-F122Y-R186L
- [0311] M75I-R186V
- [0312] S139A-S141C
- [0313] K179K-R186V
- [0314] R186V

- [0315] A57S-A58T-K77R-R186V
- [0316] L111M-R186L
- [0317] R186L
- [0318] A31S-R186V
- [0319] S139A-S141G
- [0320] M75I-R186L-S308T
- [0321] R186L-S308T
- [0322] R186I
- [0323] L111M-R186V-S308T
- [0324] R186V-D221E
- [0325] L111M-R186V
- [0326] M1L-L111M-R186V-S308T
- [0327] R186N
- [0328] R24S-G86Q-R186I
- [0329] I16L-S141P-K241I-K180P-E227K
- [0330] I16L-S141P-K241I-K180P-D291E-M303L
- [0331] S141P-K241I-S248T-K180P-R24K
- [0332] I16L-S141P-K241I-S248T-L297F
- [0333] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-A246E
- [0334] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-T242E
- [0335] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-Y255E
- [0336] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-T198D
- [0337] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K23L
- [0338] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K179L
- [0339] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K231L
- [0340] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-P182E
- [0341] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-A238E
- [0342] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K208L
- [0343] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-R204L
- [0344] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-R24L
- [0345] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F
- [0346] I16L-S141P-K241I-K180P-D291E
- [0347] I16L-S141P-K241I-S248T-K180P-Q267R-R24K-L118C-L159E
- [0348] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-S142A
- [0349] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L159E-D291E
- [0350] I16L-S141P-K241I-S248T-K180P-G166S-R24K
- [0351] I16L-S141P-K241I-S248T-K180P-R24K
- [0352] I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-Q205H
- [0353] 或如上文定义的结构上相关序列中相应位置处的相应取代。

[0354] 发明人还构建了由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列代表的缓症链球菌酶的计算机3D模型(参见图6)以定位三维结构中的突变的残基。该酶的结构以圆锥形折叠为特征,其中N端区域相对于包含5个 α 螺旋的相对扁平的C端区域法向取向。活性部位是在N结构域和C端结构域之间形成的带正电荷裂隙,附近具有ATP结合P环。缓症链球菌酶3D结构极其类似于酿脓链球菌(*S. pyogenes*)MDP脱羧酶的3D结构(参见图6),其氨基酸序列与缓症链球菌酶(SEQ ID NO:1)显示69%序列同一性。该3D结构也十分类似于Byres等人(*J. Mol. Biol.* 371 (2007), 540-553)对*S. brucei*和金黄色葡萄球菌MDP脱羧酶报道的3D结构。图7显示MDP脱羧酶的序列,其中突出显示二级结构(β -折叠和 α -螺旋)以及一些突变的残基。

[0355] 已经证明本发明中鉴定的突变直接影响该酶从3-磷酸氧基异戊酸产生异丁烯的速率;然而这些突变可能赋予该酶尚未充分鉴定的其他特性。例如,几种取代用半胱氨酸残基替换野生型残基(Y11、M173和K282)。在改进的突变体中,残基2B4、M173C和K282C在3D建模的结构中足够接近,提示创造二硫桥是可能的。这种键能够稳定酶的总体结构。为了支持这种可能性,一些初步数据显示一些突变体比野生型酶更抵抗热变性。

[0356] 类似地,这些突变可能对蛋白质的对pH的稳定性、最佳温度和寡聚状态产生影响。关于pH对异丁烯产量的影响所收集的初步数据提示,与野生型酶相比,一些突变体变体在酸性pH更有活性。

[0357] 一组鉴定的位置位于蛋白质的N端结构域,特别是位置1、2、9、11、42、43、45、57、58、75、77、80、86、87、91、116、118、120、121、122、123、129和134。

[0358] 分析揭示,残基77、80、116、118、120、121、122、123、129和134位于N端结构域中 α 螺旋N^o1、2和3上并且与底物结合袋相距最远。残基9、11、42、43、45和91紧邻于这些 α 螺旋并且尤其,它们位于彼此直接相邻的 β 链1和 β 链4上的 β 折叠中(参见图8)。因此,全部这些残基均位于N末端,在3D结构中相互靠近存在并且不显示与该酶的活性部位具有任何结构上邻近。因此,在一个优选的实施方案中,本发明涉及甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置9、11、42、43、45、77、80、91、116、118、120、121、122、123、129和134位置或与这些位置中任何位置相对应的位置处的一个或多个氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代并且其中所述甲羟戊酸二磷酸脱羧酶在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有改进的活性。

[0359] 另一组鉴定的位置,尤其位置159、160、164、166、173、177、179、198、204、205、208、221、227、231、238、241、242、246、248、251、252、253、255、258、264、267、282、291、293、297、299、303、307和308,位于C末端结构域中,并且这些位置大部分位于 α 螺旋和 β 链中,尤其位于 α 螺旋8和9中及位于 β 链9至12中。假定在位置238、241、242、248、253、258、264、291、293、297、299、303、307和308(即第9个 α 螺旋和第12个 β 链中)处的突变可能产生稳定整个结构的更稳定构象。因此,在一个优选的实施方案中,本发明涉及甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置159、160、173、177、238、241、242、248、251、253、258、264、282、291、293、297、299、303、307和308,更优选地选自位置238、241、242、248、253、258、264、291、293、297、299、303、307和308的位置或相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处的一个或多个氨基酸残基用

另一个氨基酸残基取代并且其中所述甲羟戊酸二磷酸脱羧酶在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有改进的活性。

[0360] 在一个具体实施方案中,优选将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置293、297、299、303、307和308的位置处或相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处的一个或多个氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代。这些残基位于酶的最C端部分(α 螺旋9和 β 链12内)并且可能产生稳定整个结构的更稳定构象。

[0361] 第三组鉴定的位置位于或接近于酶的结合袋。这个组涵盖位置16、23、24、28、31、111、139、141、142、182、186、188、279和282。MDP结合袋由形成ATP结合位点的区域13-22和97-107界定并且尤其包括P环(P99-S107)。另一侧由其中存在催化性碱D276的区域274-280及包含驱动底物的最终脱羧步骤的R144的区域136-146组成。位置S105位于磷酸结合环(缓症链球菌中的共有GHMP激酶P-Xaa-GLSASAA->PTAAGLSSSSS)内部。有趣地,与野生型缓症链球菌MDP P环序列相比,改进IBN生产的突变是更靠近共有P结合环序列的取代成A1a。S141紧密位于R144残基并且其羟基与酶天然底物相互作用并且因此认为其对重要决定酶特异性。S141取代之具有更庞大侧链的苏氨酸可能潜在地促进酶与较小尺寸的单磷酸化底物PIV相互作用。取代成脯氨酸将大幅度改变该区域的结构并且可能更好容纳这种非天然底物PIV。I16、K24R和M28毗邻与天然底物的磷酸基团相互作用的K22;改变这个残基可能影响这个环的结构并造成K22更靠近底物。表现最好的突变体携带改变侧链的长度同时增加结合袋带的正电荷环境的K24R和增加正电荷的突变M28K。P279和K282接近于催化性碱D276并且R186毗邻与MVAPP底物相互作用的S185。

[0362] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明涉及甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的变体,所述变体具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中选自位置16、24、28、141、186、279和282位置或相关序列中与这些位置中任何位置相对应的位置处的一个或多个氨基酸残基用另一个氨基酸残基取代并且其中所述甲羟戊酸二磷酸脱羧酶在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有改进的活性。

[0363] 本发明还涉及用于提供甲羟戊酸二磷酸脱羧酶变体的方法,其中所述变体在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中显示改进的活性,所述方法包括步骤:在甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的序列中实现一种或多种变化,其中所述(一种或多种)变化在选自与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中位置282、9、11、16、24、28、42、43、45、53、66、77、80、91、105、116、118、120、121、122、123、129、134、141、159、160、161、173、177、180、186、215、238、241、242、248、251、253、258、264、279、291、293、297、299、303、307、308、1、2、23、31、57、58、75、86、87、111、139、142、164、166、179、182、188、198、204、205、208、221、227、231、246、252、255、267和315的位置相对应的氨基酸位置的一个或多个氨基酸位置处实现。“与.....相对应的”意指与相关序列中这些位置中的任何位置相对应。

[0364] 就根据这种方法待突变的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶的优选实施方案而言,与上文已经阐述之内容相同的内容适用。

[0365] 在一个优选实施方案中,变体衍生自的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶是显示如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少40%、50%、60%或90%序列同一性或如上文所述的任何优选的序列同一性程度的氨基酸序列的甲羟戊酸二磷酸脱羧酶。

[0366] 另外,就活性改进的程度和待实现的变化优选实施方案而言,如上文所述的相同内容适用。

[0367] 本发明的MDP脱羧酶可以与同源或异源多肽或蛋白质、酶、底物或标签融合以形成融合蛋白。本发明的融合蛋白将具有与本发明MDP脱羧酶相同的改进的活性。可以添加至另一种蛋白质的多肽、酶、底物或标签是本领域已知的。它们可以用于纯化或检测本发明的蛋白质。例如,可以用于检测和/或纯化的标签例如是FLAG标签、His6标签或链霉亲和素标签。改善酶溶解性或稳定性的标签是MBP或ATS。备选地,本发明的蛋白质可以与酶例如萤光素酶融合,以检测或定位所述蛋白质。其他融合配偶体包括但不限于细菌 β -半乳糖苷酶、trpE、蛋白A、 β -内酰胺酶、 α 淀粉酶、醇脱氢酶或酵母 α 交配因子。

[0368] 还可构思在例如纯化后从本发明的蛋白质移除多肽、酶、底物或标签。

[0369] 融合蛋白一般可以通过现有技术中已知的重组核酸方法或合成多肽方法产生。

[0370] 本发明还涉及编码本发明的酶、更优选地本发明的MDP脱羧酶变体的核酸分子并涉及包含所述核酸分子的载体。可以根据本发明使用的载体是本领域已知的。所述载体还可以包含与包含于载体中的本发明核酸分子有效连接的表达控制序列。这些表达控制序列可以适用于确保可翻译性RNA在细菌或真菌中的转录和合成。表达控制序列可以例如是启动子。相对于其来源和/或相对于待表达的基因,用于与本发明核酸分子连接的启动子可以是同源或异源的。合适的启动子是例如自身导致组成型表达的启动子。然而,也可以使用仅在由外部影响所决定的时间点激活的启动子。在这种情况下,可以使用人工和/或化学诱导型启动子。

[0371] 优选地,本发明的载体是表达载体。已经在文献中广泛描述表达载体。通常,它们不仅含有选择标记基因和确保在选择的主宿中复制的复制起点,还含有细菌启动子或病毒启动子,和在大多数情况下转录终止信号。在启动子和终止信号之间通常存在使得插入编码DNA序列成为可能的至少一个限制性位点或多接头。如果在选择的宿主生物中有活性,则天然控制相应基因的转录的DNA序列可以用作启动子序列。然而,这种序列也可以交换为其他启动子序列。可以使用确保基因组型表达的启动子和允许有意控制基因表达的诱导型启动子。文献中详述了拥有这些特性的细菌启动子和病毒启动子序列。文献中充分描述了用于微生物(例如大肠杆菌、酿酒酵母)中表达的调节序列。允许特别高地表达下游序列的启动子例如是T7启动子(Studier等人,Methods in Enzymology 185(1990),60-89)、lacUV5、trp、trp-lacUV5(DeBoer等人,引自Rodriguez和Chamberlin(编著),Promoters, Structure and Function;Praeger,New York,(1982),462-481;DeBoer等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1983),21-25)、lp1、rac(Boros等人,Gene 42(1986),97-100)。诱导型启动子优选地用于多肽的合成。这些启动子经常导致比组成型启动子更高的多肽产量。为了获得最佳多肽量,经常使用两阶段方法。首先,将宿主细胞在最佳条件下培养直至相对高的细胞密度。在第二步骤中,根据使用的启动子的类型,诱导转录。在这个方面,tac启动子是特别合适的,所述tac启动子可以由乳糖或IPTG(=异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷)诱导(deBoer等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80(1983),21-25)。文献中也描述了转录的终止信号。

[0372] 优选地,根据本发明的核酸分子是非天然存在的核酸分子,即,它们是自然界中不存在的分子。这类非天然存在的分子因例如结构中的差异显著不同于天然存在的核酸分

子。例如,这种非天然存在的核酸分子可以编码如上文所述的非天然存在的酶。根据本发明的载体还优选地是非天然存在的载体,例如,因存在非天然存在的核酸分子或因在自然界中不以此类组合存在的元件组合所致。

[0373] 另外,本发明涉及包含本发明的载体的宿主细胞。

[0374] 在优选实施方案中,本发明的宿主细胞是微生物,尤其细菌或真菌。在更优选的实施方案中,本发明的宿主细胞是大肠杆菌、梭菌属(*Clostridium*)细菌或酵母细胞,如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)。在另一个优选实施方案中,宿主细胞是植物细胞或非人类动物细胞。

[0375] 可以通过例如Sambrook和Russell(2001),*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; *Methods in Yeast Genetics*, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990中描述的标准方法,实施用本发明的载体转化宿主细胞。宿主细胞在满足所用具体宿主细胞要求(尤其在pH值、温度、盐浓度、通气、抗生素、维生素、微量元素等方面)的营养培养基中培养。根据本发明的这种宿主细胞优选地是非天然存在的宿主细胞,即,自然界中不存在的宿主细胞。这种非天然存在的宿主细胞因如上文所述的修饰的核酸分子或载体而不同于天然存在的细胞。

[0376] 本发明还涉及本发明的MDP脱羧酶或包含所述MDP脱羧酶的宿主细胞用于转化3-羟基异戊酸或将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的用途。

[0377] 此外,本发明涉及用于从3-羟基异戊酸或从3-磷酸氧基异戊酸产生异丁烯的方法,所述方法包括步骤:在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞并回收所述异丁烯。

[0378] 先前已经描述,MDP脱羧酶能够经由中间体甲羟戊酸-3-磷酸催化甲羟戊酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇(参见WO 2011/076261)。发明人可以显示,根据本发明的MDP脱羧酶变体也能够催化这种转化并且尤其催化甲羟戊酸-3-磷酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇。因此,本发明还涉及根据本发明和如本文上述的MDP脱羧酶变体或表达这种变体的微生物用于将甲羟戊酸或甲羟戊酸-3-磷酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇的用途。

[0379] 此外,本发明涉及用于从甲羟戊酸或从甲羟戊酸-3-磷酸产生3-甲基丁-3-烯-1-醇的方法,所述方法包括步骤:在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞并回收所述3-甲基丁-3-烯-1-醇。

[0380] 还已经描述,MDP脱羧酶能够经由中间体3-磷酸氧基戊-4-烯酸催化3-羟基戊-4-烯酸转化成1,3-丁二烯(参见PCT/EP 2012/075921)。发明人可以显示,本发明的MDP脱羧酶变体也能够催化这种转化,尤其催化3-磷酸氧基戊-4-烯酸转化成1,3-丁二烯。因此,本发明还涉及根据本发明和如本文上述的MDP脱羧酶变体或表达这种变体的微生物用于将3-羟基戊-4-烯酸或3-磷酸氧基戊-4-烯酸转化成1,3-丁二烯的用途。

[0381] 此外,本发明涉及用于从3-羟基戊-4-烯酸或从3-磷酸氧基戊-4-烯酸产生1,3-丁二烯的方法,所述方法包括步骤:在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞并回收所述1,3-丁二烯。

[0382] 在上述方法中,在允许本发明MDP脱羧酶的酶促反应发生的合适培养条件下培育微生物。特定培养条件取决于所用的特定微生物,但是为本领域技术人员熟知。通常以如此方式选择培养条件,从而它们允许编码本发明MDP脱羧酶的基因表达。多种方法是本领域技术人员已知的,以便在培养的某些阶段改进并精细调节某些基因的表达,如通过化学诱导

物或通过温度变动诱导基因表达。

[0383] 在另一个实施方案中,本发明的上述方法包括步骤:提供生物,优选地处于(细胞)培养物形式、优选液态细胞培养物形式的携带各个酶活性的微生物,后续步骤是在发酵器(经常也称作生物反应器)中在允许各个酶表达的合适条件下培育所述生物,优选地微生物,并且还包括步骤:实现如本文上述的本发明的方法的酶促转化。合适的发酵器或生物反应器装置和发酵条件是本领域技术人员已知的。生物反应器或发酵器指支持生物活性环境的本领域已知的任何制造或工程化的装置或系统。因此,生物反应器或发酵器可以是其中实施化学/生物化学过程如本发明方法的容器,所述化学/生物化学过程涉及生物、优选地微生物和/或生物化学活性物质,即,源自携带上述(一种或多种)酶的这类生物或生物的上述(一种或多种)酶。在生物反应器或发酵器中,这种过程可以是需氧的或厌氧的。这些生物反应器常见是圆柱状,并且可以具有从数升至数百立方米的一系列规格,并经常由不锈钢制成。在这个方面,不受理论约束,发酵器或生物反应器可以按照这样的方式设计,从而它适合以例如分批培养、补料分批培养、灌流培养或恒化培养而培养生物,优选地微生物,全部培养方法通常均是本领域已知的。

[0384] 培养基可以是适于培养各种生物或微生物的任何培养基。

[0385] 根据本发明的方法还包括步骤:收集气态产物即异丁烯,从反应中脱气,即回收例如从培养物脱气的产物。因此在优选的实施方案中,在反应期间用于收集处于气体形式的异丁烯的系统存在下实施该方法。

[0386] 作为事实,短链烯如异丁烯在室温和常压呈气态。本发明的方法因此不需要从液体培养基提取产物,该步骤以工业规模进行时总是非常昂贵的步骤。可以根据本领域技术人员已知的何方法进行气体烃的排空和储存和它们可能的后续物理分离和化学转化。

[0387] 本发明参考以下非限制性图和实施例进一步描述。

[0388] 图1:定向进化方案的总图

[0389] 图2:筛选过程的总体示意性概述

[0390] 图3:通过使用采用纯化的蛋白质的活性测定法分析来自表1的突变体子集产生的异丁烯的量所获得的结果

[0391] 图4:改善将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的活性的位置K282和Y121处的一组取代

[0392] a) 位置K282处的突变分析表明,保守性取代可以对异丁烯生产具有相似的影响。即:K282取代成亲核性S或C或取代成疏水性V和A增加酶的活性(使用澄清的细胞裂解物建立的测定-n=3);

[0393] b) 位置Y121处的突变分析表明,保守性取代可以对异丁烯生产具有相似的影响(使用澄清的细胞裂解物建立的测定-n=3);

[0394] 图5:将异丁烯产生速率(摩尔异丁烯/摩尔酶/秒)作为3-磷酸氧基异戊酸浓度的函数作图并且使用Michealis Menten方程($V = (V_{max} * (\text{底物})) / (K_m + (\text{底物}))$)拟合曲线

[0395] 图6:缓症链球菌MDP脱羧酶(SEQ ID NO:1)的3D结构和与SEQ ID NO:1显示69%序列同一性的来自酿脓链球菌MDD的MDP脱羧酶的3D结构。通过使用Discovery Studio平台中执行的MODELER算法(3.0版,Accelrys,圣迭戈,CA)建立3D结构。生成100个结构并基于总能量最小化和根据MODELER概率密度函数分析模型的结构质量对其选择。选出的结构用于进

一步研究。在Discovery studio 3.0中执行计算机诱变以可视化2B4变体中的突变。

[0396] 图7:MDP脱羧酶的序列,其中突出显示二级结构(β -折叠和 α -螺旋)以及突变的残基。

[0397] 图8:(A) 甲羟戊酸二磷酸脱羧酶结构以圆锥形折叠为特征,其中N端区域相对于包含5个 α 螺旋的相对扁平的C端区域法向取向。活性位点是在N结构域和C端结构域之间形成的带正电荷裂隙,附近具有ATP结合P环。

[0398] 将突变根据它们在结构中的位置分类:残基以黄色可视化。

[0399] (B) 显示彼此直接相邻的 β 链1和 β 链4上残基9、11、42、43和45的位置的3-D结构。

[0400] (C) C末端结构域中的残基:这些残基大部分位于由 α 螺旋8-9和 β 链9-12限定的区域内。靶向位于最C末端残基L293、F297、Q299、L303、K307和T308(第9个 α 螺旋和第12条 β -链)的突变可能产生稳定整个结构的更稳定构象。

[0401] 图9:化学合成3-磷酸氧基异戊酸的方案

[0402] 图10:SEQ ID NO:1与对SEQ ID NO:1显示60%至80%序列同一性的MDP脱羧酶的序列比对。

[0403] 图11:SEQ ID NO:1与对SEQ ID NO:1显示80%至90%序列同一性MDP脱羧酶的序列比对。

[0404] 图12:SEQ ID NO:1与对SEQ ID NO:1显示90%至100%序列同一性MDP脱羧酶的序列比对。

[0405] 图13:MDP脱羧酶变体F9、F9-S141P、F9-116L-R91H-S141P-K241M-S248T-Q299K的表观 k_{cat} 。

[0406] 图14:通过几种突变体将甲羟戊酸-3-磷酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇。

[0407] 图15:在以下酶促测定中显示从(R)-3-羟基戊-4-烯酸产生1,3-丁二烯:

[0408] 测定A:无酶

[0409] 测定B:存在0.5mg *Th.acidophilum* MDP脱羧酶突变体L200E

[0410] 测定C:含有0.5mg *Th.acidophilum* MDP脱羧酶突变体L200E和5mg缓症链球菌MDP脱羧酶突变体2B4的联合测定。

[0411] 图16:在以下酶促测定中显示从(R)-3-羟基戊-4-烯酸产生1,3-丁二烯:

[0412] 测定法A:无酶

[0413] 测定法B:存在0.5mg *Th.acidophilum* MDP脱羧酶突变体L200E

[0414] 测定法C:含有0.5mg *Th.acidophilum* MDP脱羧酶突变体L200E和5mg缓症链球菌MDP脱羧酶突变体F9的联合测定。

实施例

[0415] 材料和方法

[0416] 用来构建并选择突变的方法

[0417] a. 定向进化策略

[0418] 酶缓症链球菌MDP脱羧酶能够催化,除了其他反应外,3-羟基异戊酸磷酸化为3-磷酸氧基异戊酸的反应及3-磷酸氧基异戊酸脱羧成异丁烯的反应。使用定向进化方案以特异性改善3-磷酸氧基异戊酸由缓症链球菌MDP脱羧酶转化成异丁烯的速率。这种方法在于:

(1) 产生缓症链球菌MDP脱羧酶的单点突变体的初始集合, (2) 设计测试这些酶变体活性的测定体系, (3) 使用这种活性测定筛选突变体集合以鉴定与野生型缓症链球菌MDP脱羧酶的活性相比活性改进的突变体, (4) 使用先前进化轮次期间鉴定的最佳突变体作起始材料进行额外轮次的进化(文库构建和筛选)(参见图1)。这种方法导致鉴定和表征与野生型酶相比活性增加的一组突变体。在进化的顺序轮次期间, 一系列分子生物学技术用来产生待筛选的文库和突变体集合。活性测定通常由几个步骤组成以消除初始阳性命中当中的假阴性或测定人为现象并且因此仅保留真实先导物。相应地修改该活性测定, 增加所分离的突变体的活性率以调节其灵敏度和通量。

[0419] b. 构建缓症链球菌MDP脱羧酶突变体

[0420] 使用一系列标准分子生物学技术, 生成编码缓症链球菌MDP脱羧酶进化期间鉴定的不同突变体的多核苷酸序列。全部这些技术均使用密码子优化的用于大肠杆菌中表达的多核苷酸序列作为模板(参见SEQ ID NO:4)。序列优化已经由Geneart使用其GeneOptimizer软件完成。

[0421] 本领域已知的基于PCR的不同技术用于构建单点突变体。为了产生携带多突变(至少两个突变)的酶变体, 使用基于PCR的技术或本领域已知的其他方法以引入这些突变。

[0422] 在诱变后, 使用基于连接酶的标准亚克隆技术、全质粒PCR延伸法或不依赖连接酶的克隆技术(LIC; Life Technology **Gateway**[®] recombinant technology), 将突变的多核苷酸序列插入表达载体中(用于大肠杆菌中产生重组蛋白和筛选)。

[0423] c. 选择活性增加的酶突变体

[0424] 筛选方法描述(参见图2):

[0425] 将插入表达载体的DNA文库或突变体集合转化至市售重组蛋白表达大肠杆菌菌株BL21DE3中。将DNA文库转化反应铺展到LB氨苄青霉素平板上并且分离的克隆用来接种起子培养物。当转化突变体的集合时, 将每个克隆单独转化, 铺开并且独立的克隆用来接种起子培养物; 或每个独立克隆的转化混合物直接用来接种起子培养物。使用如Studier F.W (Protein Expr. Purif. 41 (2005), 207-234) 中所述的自诱导培养基(ZYM-5250) 实施蛋白质表达, 其中细胞生长初始阶段是在37°C 6小时并且诱导阶段是在28°C 过夜。在转化后, 全部后续步骤均在微量平板或深孔平板中实施。将细胞培养物离心并将沉淀物在-80°C 贮存至少1小时。随后将细胞沉淀物重悬于小体积缓冲液中并通过超声处理法裂解, 之后进行离心以移除细胞残片。

[0426] 筛选将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的活性增加的变体

[0427] 为了测试突变体酶催化3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的活性, 通过将细胞裂解物(上清液)、3-磷酸氧基异戊酸底物在50mM Tris pH7终浓度中混合, 在玻璃GC样品瓶中制备反应混合物。已经通过将3-羟基异戊酸、纯化的Thermophilus acidophilum MDP脱羧酶和辅因子(ATP、MgCl₂、KCl) 在37°C 孵育24小时, 酶促制备3-磷酸氧基异戊酸。将反应混合物在37°C 以变动的的时间长度孵育并且将气体相连同适宜的参比(校正用异丁烯、野生型酶、阴性对照...) 注入气相色谱仪中。在分析GC色谱图后, 选择显示活性增加至少20%的突变体并对其进行第二轮筛选, 所述第二轮筛选遵循与初次筛选相同的条件。

[0428] 选择过程中的最终步骤包括生产和纯化最高命中, 即具有通过初次和二次筛选验证的最高改进的活性的酶变体, 并且以不同底物浓度测试它们的活性。进一步表征验证的

命中物并且计算反应的 k_{cat} 和 K_m 。

[0429] 筛选过程的修改:

[0430] 如之前提到,随着鉴定到新的改进的突变体,定期修改筛选方案。方案的主要修改涵盖以下点:

[0431] -细胞培养条件:接种模式(使用分离的克隆或转化反应)、培养基体积(200 μ l至5ml)、24深孔平板、96深孔和标准96孔微量平板,搅拌根据振荡培养箱类型变动。

[0432] -细胞裂解:所用缓冲液的类型和体积、超声处理或无超声处理、离心或不离心(可以有效地使用粗制裂解物)

[0433] -酶促反应的设置:

[0434] o在测定之前酶促制备3-磷酸氧基异戊酸(*T. acidophilum*酶的浓度、辅因子、HIV...变量以及孵育时间和温度)

[0435] o在一个管中合并3-羟基异戊酸的磷酸化和3-磷酸氧基异戊酸脱羧成为异丁烯的反应:缓症链球菌MDD突变体与纯化的*T. acidophilum*和3-羟基异戊酸组合。将反应孵育并测定异丁烯的存在和量。

[0436] o测定法中使用化学合成的纯3-磷酸氧基异戊酸化合物。根据图9中所述的方案由SYNTHEVAL(法国)从3-羟基异戊酸化学地合成3-磷酸氧基异戊酸(PIV)。

[0437] o在孵育期间对酶促反应进行搅拌导致信号增加5倍

[0438] -筛选中的步骤数目可以变动

[0439] -对每个克隆所分析的重复的数目变动(初次筛选中每个克隆1个反应,可以在后续筛选中一式两份、一式三份或一式更多份测试克隆)

[0440] -GC分析方法可以变动:柱类型、瓶和隔板的类型,和方法(炉、进样器、检测器、温度、分析时间...)

[0441] 实施例1:鉴定将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的反应的活性增加的缓症链球菌MDP脱羧酶的单点突变体

[0442] 使用标准分子生物学技术,制备2632个缓症链球菌MDP脱羧酶的单点突变体的集合。饱和诱变旨在用19个非野生型氨基酸系统取代缓症链球菌MDP脱羧酶的全部317个氨基酸。每个位置的平均取代数目是19种可能性中8种。将每种单个突变体的编码序列亚克隆于表达载体中以允许在大肠杆菌中生产N末端加6His标签的重组突变体酶。

[0443] 表达重组蛋白的大肠杆菌菌株BL21DE3用编码突变体酶的表达载体、空表达载体(阴性对照)和编码野生型酶的表达载体(阳性对照)转化。为了加速进程,在96孔板中实施转化。简而言之,将每种突变体和每种对照的每孔2 μ l DNA质粒微量制备物转移至96孔0.2ml pCR反应平板中,之后添加40 μ l/孔化学感受态大肠杆菌BL21DE3大肠杆菌细胞。将平板在冰上孵育15分钟,之后在AB2720热循环仪中在42 $^{\circ}$ C实施热休克1分钟。随后将平板立即置于冰上并冷却1分钟,之后添加1ml无菌Luria-Bertani培养基(10g/1胰蛋白胍,5g/1酵母提取物,10g/1 NaCl,pH 7)。使用可透气的胶粘薄膜,密封平板并且在37 $^{\circ}$ C以200转/分钟在Infors Minitron回转摇床中孵育45分钟。随后50 μ l转化混合物用来接种置于96深孔平板中的补充有100 μ g/ml氨苄青霉素的0.5ml Luria-Bertani培养基。将这些平板密封并在37 $^{\circ}$ C在200转/分钟孵育过夜。在96孔板中通过混合100 μ l过夜起子培养物与35 μ l无菌50%甘油并贮存在-80 $^{\circ}$ C制备细菌贮藏物,直至进一步使用。

[0444] 为了产生重组突变体酶,将补充有适宜抗生素的1ml无菌自诱导培养基(Studier F.W,Protein Expr.Purif.41(2005),207-234)分配于96深孔平板的孔中并且所述孔用10 μ l解冻的甘油贮藏物接种。每块平板含有大约70至80个不同的突变体酶、8个阴性对照(空表达载体)和8个野生型酶克隆用作参比。将平板在37 $^{\circ}$ C以1000转/分钟在Heidolph Titramax回转摇床中孵育6小时,随后在28 $^{\circ}$ C以1000转/分钟进一步孵育过夜。通过在4 $^{\circ}$ C以3200x g离心20分钟,沉淀细菌细胞。细胞沉淀物贮存在-80 $^{\circ}$ C。

[0445] 将沉淀物在冰上解冻5至10分钟并重悬于250 μ l重悬缓冲液(50mM Tris-Cl pH7,20mM KCl,10mM MgCl₂,10%葡萄糖,1 μ l/ml Merck-Novagen Lysonase)中。将细胞悬液在室温孵育15分钟并在冰上孵育30分钟。通过在填充冰和水的Advantage Lab超声波水浴中用4个5分钟脉冲超声处理这些细胞悬液(脉冲之间在冰上静息5分钟),实施细菌细胞裂解。将细胞裂解物随后在10 $^{\circ}$ C以3200x g离心20分钟以沉淀细胞残片并将240 μ l上清液转移入新平板。在Agilent 2ml玻璃瓶中通过混合200 μ l上清液与300 μ l 3-磷酸氧基异戊酸底物,建立酶促反应。将瓶使用钳口盖(PTFE-硅-PTFE涂覆)全密封,在37 $^{\circ}$ C在水浴中孵育24小时并贮存在-20 $^{\circ}$ C,之后用气相色谱分析。为了制备3-磷酸氧基异戊酸底物,将0.063mg/ml纯化的Thermophilus acidophilum MDP脱羧酶与50mM羟基异戊酸、40mM腺苷三磷酸在50mM Tris-Cl pH 7、20mM KCl、20mM MgCl₂中混合并且在45 $^{\circ}$ C孵育24小时。将这种酶促制备的3-磷酸氧基异戊酸底物等分并贮存在-20 $^{\circ}$ C直至进一步使用。

[0446] 通过气相色谱定量在缓症链球菌MDP脱羧酶存在下酶促反应产生的异丁烯。将瓶在30 $^{\circ}$ C迅速解冻30分钟并置于安装在VarianGC-430系统上的自动化样品上,所述系统配备VarianCP SilicaPlot柱(30m x 0.32mm)、一个注入端口和一个火焰电离检测器(FID)。设置采样器以注入100 μ l顶部空间气体。对于用来检测异丁烯的GC分析方法,将炉温设置成185 $^{\circ}$ C,注入口温度设置成150 $^{\circ}$ C,分流比4:1,并且FID探测器设置成250 $^{\circ}$ C。GC使用氮气作为载气(恒定流速1.5ml/分钟)并且空气(气流28ml/分钟)和氢气(300ml/分钟)的混合物用于FID探测系统。分析的持续时间是每份样品大约3分钟并且在这些条件下,观察到异丁烯在2.5分钟时洗脱。在开始分析前,注入商业购买的纯异丁烯的样品以校准GC系统并确定异丁烯的滞留时间。在分析后,使用Galaxy软件处理色谱图;对每种突变体的峰下面积积分并且与野生型酶比较。根据上文描述的方案,对显示与野生型酶产生的量相比异丁烯产量增加至少10-15%的突变体进行第二次测试,以消除假阳性。最后,在测定中使用归一化量的纯化的蛋白质,再次测试已经通过这两轮筛选而选择的全部突变体酶。简而言之,所选择的突变体酶的细菌甘油贮藏物用来接种7ml LB-Amp。2ml这种起子培养物用来接种200ml自诱导培养基并且从5ml培养剩余物提取质粒DNA。对质粒DNA测序以证实突变的存在和类型。用于产生突变体酶的细菌表达如先前所描述那样实施并且根据用户手册使用Macherey-Nagel Protino纯化试剂盒,从沉淀物纯化N末端加6His标签的突变体酶。通过在2ml GC瓶中混合:500 μ g纯化的酶、300 μ l 3-磷酸氧基异戊酸底物测定活性,并且用50mM Tris-Cl pH 7调节体积至500 μ l。将反应在37 $^{\circ}$ C孵育24小时并通过在-20 $^{\circ}$ C冷冻样品加以终止。通过GC分析确定产生的异丁烯的量。

[0447] 这个筛选程序导致鉴定到71个突变,所述突变赋予缓症链球菌MDP脱羧酶增加的异丁烯生产活性。表4列出已经鉴定到的取代的位置和类型。图3显示通过使用采用纯化的蛋白质的活性测定分析来自表4的突变体子集产生的异丁烯的量所获得的结果。图4a)和图

4b) 显示额外的数据。

[0448]

表 4: 已经鉴定到的取代的位置和类型的列表

取代	R9	Y11	M42	Y43	E45	L66	K77	K116	C118	A120	Y121	K123	S129	E134	与野生型酶相比的 % 增加
											R				>300%
															>200%
															>100%
															75-100%
								R,I							50-75
	C		A		L			S,M		N,L,R,I		M			25-50%
L	F			L	F,M,V	H	N		L	V	W		P,V	G	10-25%
取代	E159	I160	M173	E177	R186	T251	A253	K282	L293	F297	Q299	L303	K307	T308	与野生型酶相比的 % 增加
								C							>300%
								S							>200%
								E,G							>100%
								Q,T,V,A							75-100%
L					M										50-75
	V		C	V				D,	F,W	C		M			25-50%
				C	H	F,V	V,I			L	P		H	S	10-25%

[0449] 实施例2: 表征具有高转换率的缓症链球菌MDP脱羧酶的变体

[0450] 已经使用基于PCR的技术,通过组合赋予活性高度增加(与野生型酶的活性相比增加至少50%)的单点突变的选择,产生缓症链球菌MDP脱羧酶变体的集合。还通过随机诱变产生额外的多样性。在酶促测定法中测定由这些变体产生的异丁烯的量,其中将500 μ g纯化的酶混入50mM Tris-Cl pH 7缓冲液中的300 μ l 3-磷酸异戊酸底物。在37 $^{\circ}$ C 24小时孵育时间之后,通过在-20 $^{\circ}$ C冷冻样品终止反应并通过GC分析确定产生的异丁烯的量。对于GC顶部空间测定,将100 μ l顶部空间气体注入配备Varian CP SilicaPlot柱(30m x 0.32mm)和FID的Varian GC-430系统的注入口中。用来检测异丁烯的GC分析方法的特征为:炉温在185 $^{\circ}$ C,注入口温度在150 $^{\circ}$ C,分流比1:10和FID探测器温度在250 $^{\circ}$ C。使用氮气作为载气(恒定流速1.5ml/分钟)并且使用空气(气流28ml/分钟)和氢气(300ml/分钟)的混合物来供应FID探测系统。

[0451] 已经鉴定显示多至11个位置突变的多种变体,所述变体在活性测定中显示增加的活性。下表中显示不同的变体。

[0452] 表5:双突变体

突变	与野生型酶相比活性%增加
K282CM42A	483
K282CL264Q	453
K282CL303M	510
K282CC118L	465
K282CA253i	493
K282CA120N	507
K282CE45M	516
K282CF297L	471
K282CY11C	508
K282CY121R	400
K282CS129V	514
K282CA120L	435
K282CK116L	440
K282R9L	428
K282CY11E	270
K282CE177V	493
K282CK116R	479
K282CA120I	205
K282CK116M	576
K282CT251M	452
K282CL293F	375
K282CK123M	178
K282CF122M	233
K282CY121L	290

[0454] 表6:三重突变

突变	与野生型酶相比活性%增加
E45LY121RK282C	420
K282CY121RY11E	230
K116IY121RK282C	147
Y121RE177VK282C	524
A120RY121LK282C	184
M173CK282CF297L	500

[0455] 表7:四突变的组合

突变	与野生型酶相比活性%增加
Y121RK282CL303MT308S	377
M173CL303MK307HT308S	480
E45VM173CK282CL303M	500

[0456] 表8:五突变的组合

突变	与野生型酶相比活性%增加
Y121RM173CK282CL303MT308S	507
E159LM173CL303MK307HT308S	480
R9LY11FL303MK307HT308S	440
C118LY121RM173CK282CL303M	500

[0457] 表9:六突变的组合

突变	与野生型酶相比活性%增加
Y121RE159LM173CK282CL303MT308S	558
Y121RE159LM173CV215AK282CL303M	500
E45LE1 59LM1 73CK282CF297LT308S	550

[0458] 表10:七突变的组合

突变	与野生型酶相比活性%增加

	Y121RE159LM173CK282CL303MK307HT308S	643
	E45VY121RE159LM173CK282CL303MT308S	500
	Y121RE159LM173CK282CF297LL303MT308S	500
	C118LY121RE159LM173CK282CL303MT308S	500
	Y121RE159LM173CE177CK282CL303MT308S	500
[0460]	Y121RE159LM173CT242AK282CL303MT308S	500
	C118LY121RE159LM173CK282CL303MG315S	500
	C118WY121RE159LM173CE177CK282CL303M	500
	C118LY121RE159LM173CE177CK282CL303M	500
	E45VY121RM173CK282CF297LL303MT308S	500
	E45VC118LY121RM173CK282CL303MT308S	550
	E45VY121RE159LM173CK282CF297LL303M	550

[0461] 表11:八突变的组合

突变	与野生型酶相比活性 %增加
D80GY121RE159LM173CK282CL303MT308SG315S	500
K24RY121RE159LK123RM173CM258LK282CL303M	500
[0462] C118LY121RE159LM173CE177CV215AK282CL303M	500
K24RC118LY121RE159LM173CE177CK282CL303M	500
E45VD80GY121RM173CK282CF297LL303MT308S	500
E45LY121RE159LM173CE177CK282CL303MT308S	550

[0463] 表12:九突变的组合

突变	与野生型酶相比 活性%增加
C118LY121RE159LM173CE177CK282CF297LL303MT308S	500
[0464] C118LY121RE159LM173CE177CV215AK282CF297LL303M	500
D80GC118LY121RE159LM173CE177CK282CL303MG315S	500
K24RE45VY121RK123RM173CK282CF297LL303MT308S	550
E45VY121RE159LM173CE177CV215AM258LK282CL303M	550

[0465] 表13:十突变的组合

突变	与野生型酶相比 活性%增加
[0466]	
E45VC118LY121RE159LM173CV215AK282CF297LL303MT308S	500

[0467] 表14:十一突变的组合

[0468]	突变	与野生型酶相比活性%增加
	K24RC118LY121RE159LM173CE177CK282CE291DF297LL303MT308S	750

[0469] 选择在测定中活性高度增加的命名为2B4 (SEQ ID NO:2) 和F9 (SEQ ID NO:3) 的两个变体用于进一步表征。与野生型酶相比,2B4和F9蛋白质序列分别含有6个和11个突变(参见表15)。F9携带在原始单点突变筛选中没有鉴定到的两个新突变,K24R和E291D。

ID	突变	总突变
[0470] 2B4	Y121RE159LM173CK282CL303MT308S	6
F9	K24RC118LY121RE159LM173CE177CK282CE291DF297LL303MT308S	11

[0471] 表15:变体2B4和F9的突变

[0472] 如下测定这两种变体的Michaelis Menten k_{cat} 和 K_m 稳态动力学常数:在GC瓶中使用200 μ g纯化的2B4、F9或野生型酶、一系列0至320mM化学合成的3-磷酸氧基异戊酸、5mM ATP、20mM KCl、10mM MgCl₂和50mM Tris-Cl pH 7.5建立一系列酶促反应。将瓶密封并在37 $^{\circ}$ C孵育15小时,之后如先前所描述那样分析由GC产生的异丁烯。先前实验已经确定,在这个实验设置中异丁烯产生速率在酶促反应的前20个小时恒定并且因此15小时孵育后所测定的每小时产生的异丁烯的速率等于反应开始处异丁烯初始产生速率。为了定量该反应产生的异丁烯的绝对量,使用一系列纯异丁烯的浓度(0至10,000ppm)校准GC。发现校正表在异丁烯浓度的此范围内呈线性。将异丁烯产生速率(异丁烯摩尔数/酶摩尔数/秒)作为3-磷酸氧基异戊酸浓度的函数作图并且使用Michealis Menten方程($V = (V_{max} * (\text{底物})) / (K_m + (\text{底物}))$)拟合曲线以提取表16中汇总的 k_{cat} (s⁻¹)和 K_m 值(mM)。如图5和表16中所示,变体2B4和F9具有比野生型酶更高的 k_{cat} 。

[0473] 表16:变体2B4和F9的 k_{cat} (s⁻¹)和 K_m (mM)值的总结

ID	K_m (mM)	k_{cat} ($10^{-3} \cdot s^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} \cdot s^{-1}$)
[0474] 野生型酶	12.5	2.2	0.18
2B4	34.4	12	0.35
F9	38.38	16	0.42

[0475] 实施例3:鉴定将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的反应的活性进一步增加的缓症链球菌MDP脱羧酶的变体

[0476] 通过连续轮次的诱变、点突变重组和体外和/或体内筛选测定鉴定在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有进一步增强的活性的额外MVD变体。下表17中提供这些MVD变体的列表。

[0477] 表17

	增加至 F9 变体的突变	增加倍数	筛选测定
[0478]	S141P	3	在体外
	S141T	2	在体外
	S105A	1.8 - 2	在体外
	Q299K	1.25	在体外
	I16L	1.25	在体外
	S248T	1.4	在体外
	K241M	1.25	在体外
	I16L S105A	2.2	在体外
	S141P K241M S248T	3.1	在体外
	I16L R91H S141P K241M S248T	3.5	在体外
	I16L S141P	3.5	在体外
	I16L R91H S141P K241M S248T Q299K	3.6	在体外
	I16L S141P K241M	3.6	在体外
	I16L S141P K241M S248T	3.7	在体外
	I16L R91H S141P K241M S248T Q299K M28K	7.24	在体外
[0479]	I16L R91H S141P K241M S248T Q299K M28A	5.48	在体外
	I16L R91H S141P K241M S248T Q299K K180P	5.00	在体外
	I16L S141P K241I S248T	5.25	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K	8.37	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K K180P	11.55	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K T53V K180P	11.97	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K K180P A238K	15.015	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K K180P A238R	16.17	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K K180P C282V	15.015	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K K180P P279A	17.325	在体内
	I16L S141P K241I S248T M28K K180P Y161R	16.17	在体内

[0480] 增加倍数是MDP脱羧酶变体活性高于野生型MDP脱羧酶活性的比率。针对一个底物浓度(对于体外测定,1或2mM PIV并且对于体内测定,500mM丙酮)测定增加倍数。酶量未归一化,但是这些MVD变体以如对细胞裂解物的SDS-PAGE分析所观察到的相似的量表达。

[0481] 用于诱变的模板是命名为“F9”的变体,所述变体对应于具有以下突变的SEQ ID

NO:1的缓症链球菌MDP脱羧酶:K24RC118LY121RE159LM173CE177CK282CE291DF297LL303MT308S(参见SEQ ID NO:3)。所用的体外筛选测定是以上材料和方法c节中所述的那种,优选地是涉及使用细胞裂解物的体外测定。

[0482] 对于体内检验,开发了又一种体内测定。这种测定法基于使用以含有编码序列的表达载体转化的细菌菌株并导致参与将丙酮转化成异丁烯的代谢途径的3种酶生产;即为了生产3-羟基异戊酸(HIV)使用小家鼠(*M.musculus*)HMG-CoA合酶(在下文中称作HIV合酶);为了使3-羟基异戊酸磷酸化成3-磷酸氧基异戊酸(PIV),使用*T.acidophilum* MDP脱羧酶(在下文中称作HIV磷酸化酶),并且为了将PIV通过脱羧转化成异丁烯(IBN),使用了待检验的缓症链球菌MDP脱羧酶变体(在下文中称作PIV脱羧酶)。这个菌株首先在摇床中在30℃/1000转/分钟,在1ml自诱导培养基中培养过夜以产生三种重组酶。随后将含有这三种过量表达的重组酶的细胞沉淀物重悬于补充有500mM丙酮的500μl最少培养基中并且在设定于37℃/1000转/分钟的摇床中孵育另外16小时。在这个第二步期间,HIV合酶催化(来自培养基的)丙酮与细胞的乙酰CoA缩合成HIV,所述HIV随后由HIV磷酸化酶和PIV脱羧酶利用细胞ATP依次转化成PIV和IBN。随后使用与材料和方法章节c中描述的体外筛选测定相同的方法,通过气相色谱对产生的IBN定量。

[0483] 这种测定的主要优点如下:(1) IBN的产生在细胞内部发生,(2) 利用细胞代谢物(ATP和乙酰CoA)和细胞辅因子,仅向反应添加丙酮(丙酮是本途径中的非限制性因子,原因在于梭状芽孢杆菌丙酮途径的效率)(3) 在完整IBN产生途径的背景下测量到IBN产生的增加并且不仅考虑三种目的酶的协作,还考虑到存在潜在的内源抑制物或竞争物和低底物浓度,(4) 酶大多处于其天然形式并且未经历的任何形式的纯化过程提取,所述提取可能使这些酶变性并且不利地影响它们的活性。

[0484] 对于上述某些变体,还已经使用等量MDP脱羧酶变体在一系列范围内测定活性的增加倍数以计算动力学参数(表观kcat和Km)。表观kcat的增加倍数总体上类似于筛选分析法中测定的表观kcat(参见图13)。在图13中,与筛选测定中测定的x3相比,F9-S141P kcat的增加倍数大约是F9 kcat的x3.5;与筛选测定中测定的x3.7相比,F9-I16L-R91H-S141P-K241M-S248T-Q299K kcat的增加倍数大约是F9kcat的x5.5。

[0485] 实施例4:缓症链球菌MDP脱羧酶的变体还显示在催化甲羟戊酸-3-磷酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇中的活性增加

[0486] 使用偶联的酶测定评价MDP脱羧酶变体将甲羟戊酸-3-磷酸转化为3-甲基丁-3-烯-1-醇的能力。这种测定组合了两种MDP脱羧酶的依次活性:(1) *T.acidophilum* MDP脱羧酶(L200E突变体)催化甲羟戊酸磷酸化成甲羟戊酸-3-磷酸;(2) 缓症链球菌MDP脱羧酶催化甲羟戊酸-3-磷酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇。使用200mM R,S-甲羟戊酸钠底物,2mg/ml缓症链球菌MDP脱羧酶变体和0.1mg/ml *T.acidophilum* MDP脱羧酶(L200E突变体)在50mM Tris-HCl pH 7.5,10mM MgCl₂,20mM KCl,40mM ATP中建立这种测定。还制备了无酶或具有任一种酶的阴性对照。将反应混合物在37℃在密封的玻璃瓶中孵育24小时。通过将50μl反应混合物混入100μl乙酸乙酯,提取3-甲基丁-3-烯-1-醇。将100μl乙酸乙酯上层相转移至清洁瓶并通过气相色谱分析。使用商业3-甲基丁-3-烯-1-醇作为参比。在配备火焰电离检测器(FID)的Varian GC-430气相色谱仪上分析样品。在DB-WAX柱(30m,032x 0.50μm,Agilent)上使用以下温度梯度分析1μl样品:在60℃ 2分钟,温度斜坡至220℃(20℃/分钟)

和在220℃最终10分钟。在这些条件下,3-甲基丁-3-烯-1-醇的滞留时间是7.38分钟。

[0487] 观察到突变I160N、R186H、R91H还赋予缓症链球菌MDP脱羧酶将甲羟戊酸-3-磷酸转化成3-甲基丁-3-烯-1-醇的活性增加(参见图14)。活性增加对于这些特定突变是特异性的,因为在“2B4”或“F9”变体模板上检出生产增加。

[0488] 实施例5:由来自缓症链球菌的MDP脱羧酶的突变体2B4催化的从3-羟基戊-4-烯酸生产丁二烯

[0489] 实施例2中描述突变体2B4。

[0490] (R)-3-羟基戊-4-烯酸按要求由专门从事订制合成的公司(Syntheval,法国)合成。

[0491] 在以下条件下开展酶促反应:

[0492] 50mM Tris-HCl pH 7.5

[0493] 0-200mM(R)-3-羟基戊-4-烯酸(“R”HPA)

[0494] 50mM ATP

[0495] 20mM MgCl₂

[0496] 20mM KCl

[0497] 将pH调节至7.5

[0498] 通过向0.5ml反应混合物添加特定的纯化的酶启动每种测定。测定随后在37℃伴以振摇下在2ml密封瓶(Interchim)中孵育。平行进行对照反应。在孵育20小时后,如下分析丁二烯生产。收集每种测定的1ml气相并直接注入配备火焰电离检测器(FID)的气相色谱仪GC-450。使用氮气作为载气,流速1.5ml/min。使用等温模式在130℃在RT-氧化铝粘合/Na₂SO₄柱(30m,0.32mm ID,5μm)(Restek)上色谱分离挥发性化合物。通过与1,3-丁二烯标准品(Sigma)比较鉴定酶促反应产物。在这些GC条件下,丁二烯的滞留时间是7.4分钟。

[0499] 图15中显示结果:在无底物情况下未观察到1,3-丁二烯形成。无酶的反应的GC分析仅显示来自3-羟基戊-4-烯酸的热分解的痕量丁二烯。催化试验显示在来自缓症链球菌的MDP脱羧酶的突变体2B4存在下,丁二烯生产显著增加。

[0500] 实施例6:由来自缓症链球菌的MDP脱羧酶的突变体F9催化的从3-羟基戊-4-烯酸生产丁二烯

[0501] 实施例2中描述突变体F9。

[0502] 在以下条件下开展酶促反应:

[0503] 50mM Tris-HCl pH 7.5

[0504] 0-200mM“R”3-羟基戊-4-烯酸(“R”HPA)

[0505] 50mM ATP

[0506] 20mM MgCl₂

[0507] 20mM KCl

[0508] 将pH调节至7.5

[0509] 通过向0.5ml反应混合物添加特定的酶启动每种测定。测定随后在37℃伴以振摇下在2ml密封瓶(Interchim)中孵育。平行进行对照反应。在孵育20小时后,根据实施例5中描述的方法评价丁二烯生产。

[0510] 图16中显示结果:在无底物情况下未观察到1,3-丁二烯形成。无酶的反应的GC分

析仅显示来自3-羟基戊-4-烯酸的热分解的痕量丁二烯。催化试验显示在来自缓症链球菌的MDP脱羧酶的突变体F9存在下,丁二烯生产显著增加。

[0511] 实施例7:鉴定将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯的反应的活性进一步增加的缓症链球菌MDP脱羧酶的变体

[0512] 通过连续轮次的定向或随机诱变、点突变重组和体外和/或体内筛选测定鉴定在将3-磷酸氧基异戊酸转化成异丁烯中具有进一步增强的活性的额外MVD变体。下表18中提供这些MVD变体的列表。

[0513] 表18

增加至 F9 变体的突变	增加倍数	筛选测定
D2H	1.05	在体内
M42L-D87E-S139C-R186L-K231Q	1.31	在体内
E164Q-R186V-D252E	2.15	在体内
D87E-S139C-R186L-K231Q	2.27	在体内
R186V-Q267R	2.29	在体内
S139C-R186I	2.39	在体内
L111M-F122Y-R186L	2.50	在体内
M75I-R186V	2.57	在体内
S139A-S141C	2.60	在体内
K179K-R186V	2.77	在体内
R186V	2.78	在体内
A57S-A58T-K77R-R186V	2.86	在体内
L111M-R186L	2.94	在体内
R186L	2.94	在体内
A31S-R186V	3.03	在体内
S139A-S141G	3.04	在体内
M75I-R186L-S308T	3.34	在体内
R186L-S308T	3.40	在体内
R186I	3.46	在体内
L111M-R186V-S308T	3.58	在体内
R186V-D221E	3.67	在体内
L111M-R186V	3.77	在体内
M1L-L111M-R186V-S308T	3.77	在体内
R186N	4.16	在体内
R24S-G86Q-R186I	4.30	在体内
I16L-S141P-K241I-K180P-E227K	20.49	在体外
I16L-S141P-K241I-K180P-D291E-M303L	22.84	在体外
S141P-K241I-S248T-K180P-R24K	24.46	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-L297F	25.01	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-A246E	28.17	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-T242E	29.87	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-Y255E	31.23	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-T198D	31.56	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K23L	32.24	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K179L	32.58	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K231L	32.58	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-P182E	32.58	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-A238E	32.92	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-K208L	32.92	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-R204L	32.92	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-R24L	32.92	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F	33.94	在体外
I16L-S141P-K241I-K180P-D291E	35.32	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-K180P-Q267R-R24K-L118C-L159E	39.40	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-S142A	44.78	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L159E-D291E	44.94	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-K180P-G166S-R24K	51.64	在体外
I16L-S141P-K241I-S248T-K180P-R24K	57.93	在体外

[0516] | I16L-S141P-K241I-S248T-M28K-K180P-L188C-L297F-Q205H | 67.88 | 在体外 |

[0517] 增加倍数是MDP脱羧酶变体活性高于“F9”变体MDP脱羧酶活性的比率。“F9”变体对应于具有以下突变的SEQ ID NO:1的缓症链球菌MDP脱羧酶:K24R-C118L-Y121R-E159L-M173C-E177C-K282C-E291D-F297L-L303M-T308S(参见SEQ ID NO:3)。针对一个底物浓度(在体外测定中2或6mM PIV并且在体内测定中10mM HIV)测定增加倍数。酶量未归一化,但是这些MVD变体以如对细胞裂解物的SDS-PAGE分析所观察到的相似的量表达。

[0518] 本文实施例7中使用的体外筛选分析法在以上材料和方法c节中描述,其中优选地,已经使用涉及细胞裂解物的体外测定,而测定已经优选地在384深孔微量平板中进一步小型化。

[0519] 对于体内检验,已经开发了如下文概述的又一种体内筛选测定法。这种测定法基于使用表达载体转化的细菌菌株,所述表达载体含有编码序列并导致参与将丙酮转化成异丁烯的代谢途径的最后两种酶产生。更具体地,为了从3-羟基异戊酸(HIV)产生3-磷酸氧基异戊酸(PIV),使用*T. acidophilum* MDP脱羧酶(在下文中称作HIV磷酸化酶),并且为了PIV转化成异丁烯(IBN),使用了待检验的缓症链球菌MDP脱羧酶变体(在下文中称作PIV脱羧酶)。将这个菌株首先在摇床中在30°C,700转/分钟,在384深孔微量平板中的300μL自诱导培养基中培养24小时,以产生两类型的重组酶。随后将含有这两种过量表达重组酶的细胞沉淀物重悬于补充有10mM HIV的50μL最少培养基中并且在摇床中在30°C,700转/分钟进一步孵育另外4小时。在这个步骤期间,HIV磷酸化酶利用细胞ATP催化HIV磷酸化成PIV,所述PIV随后由PIV脱羧酶变体转化成IBN。随后使用与上文材料和方法章节c中描述的体外筛选测定相同的方法,通过气相色谱对产生的IBN定量。

序列表

- <110> 环球生物能源公司
财富科学家股份有限公司
- <120> 甲基戊酸二磷酸脱羧酶变体
- <130> T2557 EP S3
- <150> EP 13 17 5790.8
- <151> 2013-07-09
- <160> 4
- <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- <211> 317
- <212> PRT
- <213> 缓症链球菌B6

<400> 1
Met Asp Arg Glu Pro Val Thr Val Arg Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
1 5 10 15
Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Lys Lys Glu Lys Glu Met Val Pro Ala Thr
20 25 30
Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Tyr Thr Glu Thr Thr Leu
35 40 45
Ser Ser Leu Pro Thr Asp Ala Thr Ala Asp Ala Phe Tyr Ile Asn Gly
50 55 60
Gln Leu Gln Asn Glu Ala Glu His Val Lys Met Ser Lys Ile Ile Asp
65 70 75 80
Arg Tyr Arg Pro Asp Gly Asp Gly Phe Val Arg Ile Asp Thr Gln Asn
85 90 95
Ser Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ser Ser Ser Ser Gly Leu Ser
100 105 110
Ala Leu Val Lys Ala Cys Asn Ala Tyr Phe Lys Leu Gly Leu Asn Arg
115 120 125
Ser Gln Leu Ala Gln Glu Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ser Arg
130 135 140
Ser Phe Tyr Gly Pro Leu Gly Ala Trp Asp Lys Asp Ser Gly Glu Ile
145 150 155 160
Tyr Pro Val Glu Thr Gly Leu Lys Leu Ala Met Ile Met Leu Val Leu
165 170 175
Glu Asp Lys Lys Lys Pro Ile Ser Ser Arg Asp Gly Met Lys Leu Cys
180 185 190
Val Glu Thr Ser Thr Thr Phe Asp Asp Trp Val Arg Gln Ser Glu Lys
195 200 205
Asp Tyr Gln Asp Met Leu Val Tyr Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ala Lys
210 215 220
Val Gly Glu Leu Thr Glu Lys Asn Ala Leu Ala Met His Ala Thr Thr
225 230 235 240
Lys Thr Ala Ser Pro Ala Phe Ser Tyr Leu Thr Asp Ala Ser Tyr Glu
245 250 255
Ala Met Asp Phe Val Arg Gln Leu Arg Glu Gln Gly Glu Ala Cys Tyr
260 265 270
Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Leu Cys Gln Glu Lys
275 280 285
Asp Leu Glu His Leu Ser Glu Ile Phe Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ile
290 295 300
Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Ser Gln Asp Gly Cys Cys
305 310 315

[0001]

<210> 2
<211> 317
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MDP脱羧酶的突变体2B4

<400> 2
Met Asp Arg Glu Pro Val Thr Val Arg Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
1 5 10 15
Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Lys Lys Glu Lys Glu Met Val Pro Ala Thr
20 25 30
Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Tyr Thr Glu Thr Thr Leu
35 40 45
Ser Ser Leu Pro Thr Asp Ala Thr Ala Asp Ala Phe Tyr Ile Asn Gly
50 55 60
Gln Leu Gln Asn Glu Ala Glu His Val Lys Met Ser Lys Ile Ile Asp
65 70 75 80
Arg Tyr Arg Pro Asp Gly Asp Gly Phe Val Arg Ile Asp Thr Gln Asn
85 90 95
Ser Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly Leu Ser
100 105 110
Ala Leu Val Lys Ala Cys Asn Ala Arg Phe Lys Leu Gly Leu Asn Arg
115 120 125
Ser Gln Leu Ala Gln Glu Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ser Arg
130 135 140
Ser Phe Tyr Gly Pro Leu Gly Ala Trp Asp Lys Asp Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
Tyr Pro Val Glu Thr Gly Leu Lys Leu Ala Met Ile Cys Leu Val Leu
165 170 175
Glu Asp Lys Lys Lys Pro Ile Ser Ser Arg Asp Gly Met Lys Leu Cys
180 185 190
Val Glu Thr Ser Thr Thr Phe Asp Asp Trp Val Arg Gln Ser Glu Lys
195 200 205
Asp Tyr Gln Asp Met Leu Val Tyr Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ala Lys
210 215 220
Val Gly Glu Leu Thr Glu Lys Asn Ala Leu Ala Met His Ala Thr Thr
225 230 235 240
Lys Thr Ala Ser Pro Ala Phe Ser Tyr Leu Thr Asp Ala Ser Tyr Glu
245 250 255

Ala Met Asp Phe Val Arg Gln Leu Arg Glu Gln Gly Glu Ala Cys Tyr
 260 265 270
 Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Cys Val Leu Cys Gln Glu Lys
 275 280 285
 Asp Leu Glu His Leu Ser Glu Ile Phe Gly Gln Arg Tyr Arg Met Ile
 290 295 300
 Val Ser Lys Ser Lys Asp Leu Ser Gln Asp Gly Cys Cys
 305 310 315

<210> 3
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> MDP脱羧酶的突变体F9

<400> 3
 Met Asp Arg Glu Pro Val Thr Val Arg Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Lys Arg Glu Lys Glu Met Val Pro Ala Thr
 20 25 30
 Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Tyr Thr Glu Thr Thr Leu
 35 40 45
 Ser Ser Leu Pro Thr Asp Ala Thr Ala Asp Ala Phe Tyr Ile Asn Gly
 50 55 60
 Gln Leu Gln Asn Glu Ala Glu His Val Lys Met Ser Lys Ile Ile Asp
 65 70 75 80
 Arg Tyr Arg Pro Asp Gly Asp Gly Phe Val Arg Ile Asp Thr Gln Asn
 85 90 95
 Ser Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly Leu Ser
 100 105 110
 Ala Leu Val Lys Ala Leu Asn Ala Arg Phe Lys Leu Gly Leu Asn Arg
 115 120 125
 Ser Gln Leu Ala Gln Glu Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ser Arg
 130 135 140
 Ser Phe Tyr Gly Pro Leu Gly Ala Trp Asp Lys Asp Ser Gly Leu Ile
 145 150 155 160
 Tyr Pro Val Glu Thr Gly Leu Lys Leu Ala Met Ile Cys Leu Val Leu
 165 170 175
 Cys Asp Lys Lys Lys Pro Ile Ser Ser Arg Asp Gly Met Lys Leu Cys
 180 185 190
 Val Glu Thr Ser Thr Thr Phe Asp Asp Trp Val Arg Gln Ser Glu Lys
 195 200 205
 Asp Tyr Gln Asp Met Leu Val Tyr Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ala Lys
 210 215 220
 Val Gly Glu Leu Thr Glu Lys Asn Ala Leu Ala Met His Ala Thr Thr
 225 230 235 240
 Lys Thr Ala Ser Pro Ala Phe Ser Tyr Leu Thr Asp Ala Ser Tyr Glu
 245 250 255
 Ala Met Asp Phe Val Arg Gln Leu Arg Glu Gln Gly Glu Ala Cys Tyr
 260 265 270
 Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Cys Val Leu Cys Gln Glu Lys
 275 280 285
 Asp Leu Asp His Leu Ser Glu Ile Leu Gly Gln Arg Tyr Arg Met Ile
 290 295 300
 Val Ser Lys Ser Lys Asp Leu Ser Gln Asp Gly Cys Cys
 305 310 315

[0002]

<210> 4
 <211> 957
 <212> DNA
 <213> 缓症链球菌

<220>
 <221> source
 <222> 1..957
 <223> /mol_type="未指定的DNA"
 /生物="缓症链球菌"

<400> 4
 atggatcgtg aaccggttac cgttcgtage tatgcaaata tgccatcat caaatattgg 60
 ggcaaaaaaa aagaaaaaga aatggttccg gcaaccagca gcattagcct gacctggaa 120
 aatatgtata ccgaaaccac cctgagcage ctgccgaccg atgcaaccgc agatgcattt 180
 tatattaatg gtcagctgca gaacgaagcc gaacatgta aatgagcaa aatcatcgat 240
 cgctatcgtc cggatgggtga tggttttggt egtattgata cccagaatag tatgccgacc 300
 gcagcaggtc tgagcagcag cagcagtggt ctgagcgac tggttaaagc atgtaatgcc 360
 tattttaaac tgggtctgaa tcgtagccag ctggcacaag aagcaaaatt tgcaagcgtt 420
 agcagcagcc gtagcittta tggtcgctg ggtgcatggg ataaagatag cggtagaatt 480
 tatccggttg aaaccggtct gaaactggca atgattatgc tggttctgga agataaaaa 540
 aaaccgatta gcagcctgta tggtagaaa ctgtgtgttg aaaccagcac cacctttgat 600
 gattgggttc gtcagagcga aaaagattat caggatagc tgggtacct gaaagcaaat 660
 gattttgcca aagttgggtg gctgaccgaa aaaaatgcac tggcaatgca cgcaaccacc 720
 aaaacegcaa gtccggcatt tagctatctg accgatgcaa gctatgaagc aatggatttt 780
 gttctgacg tgcgtgaaca gggtagaaga tgttacttta caatggatgc aggtccgaat 840
 gttaaagttc tgtccaaga aaaagacctg gaacatctga gcgaaatatt tggtcagcgt 900
 tatcgtctga ttgtgagcaa aaccaaatag ctgagccagg atggttgctg ttaataa 957

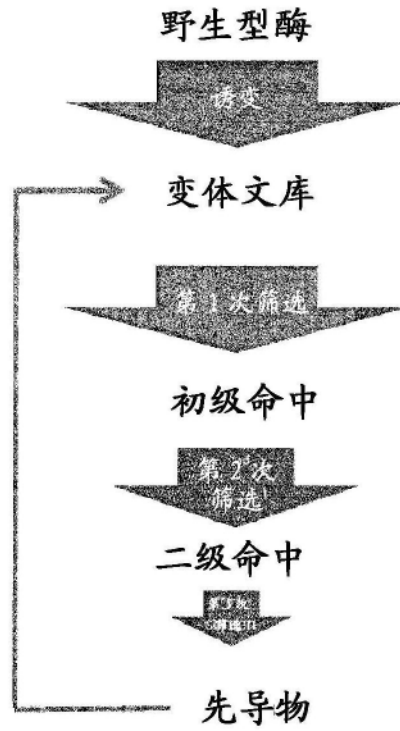


图1

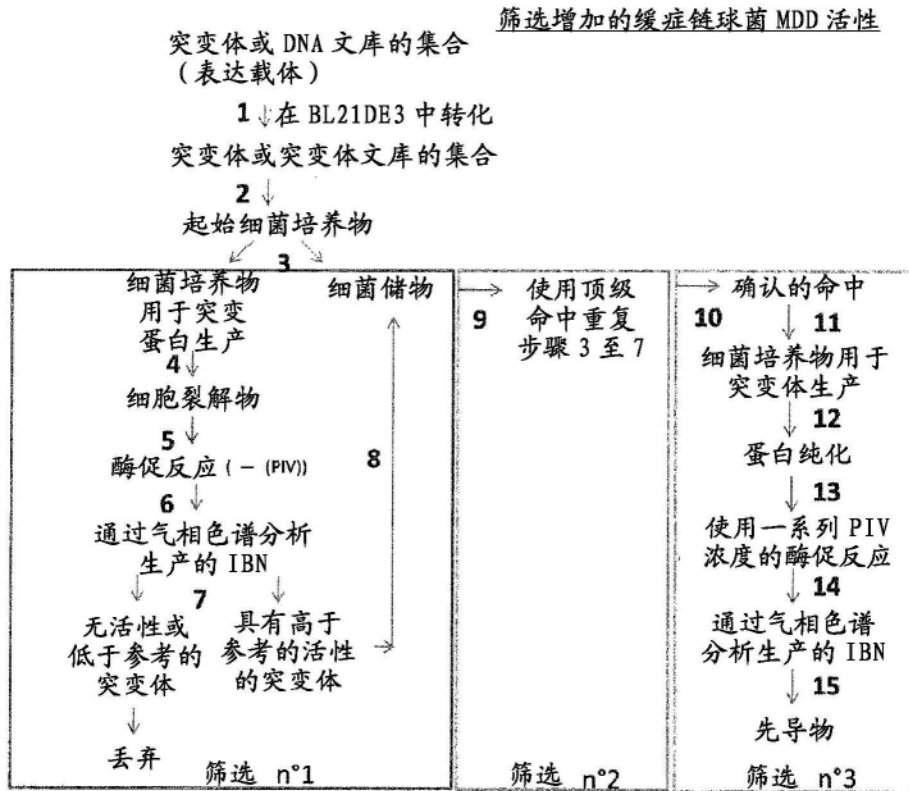


图2

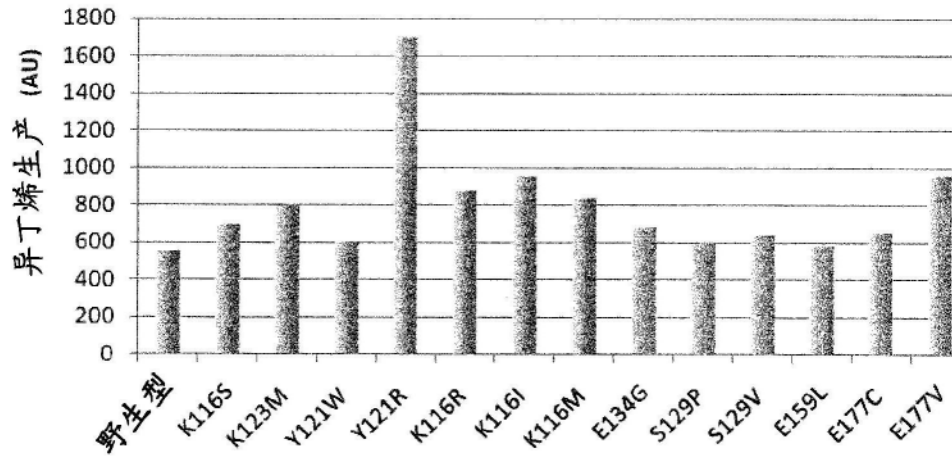


图3



图4a

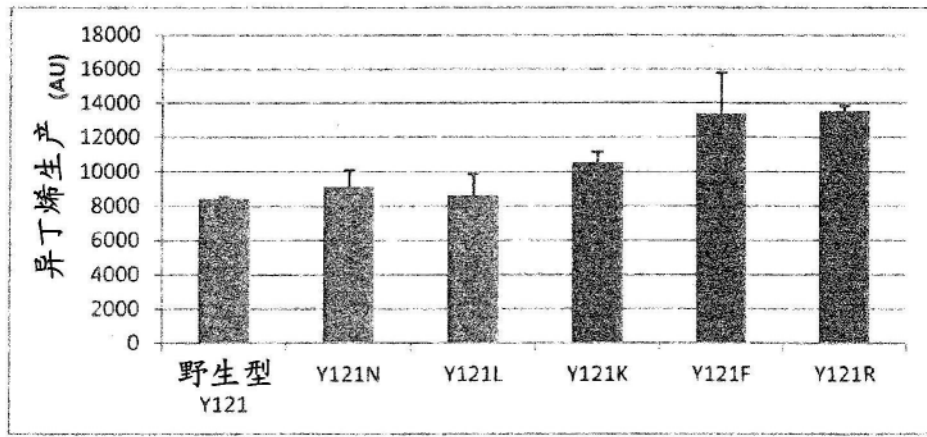


图4b

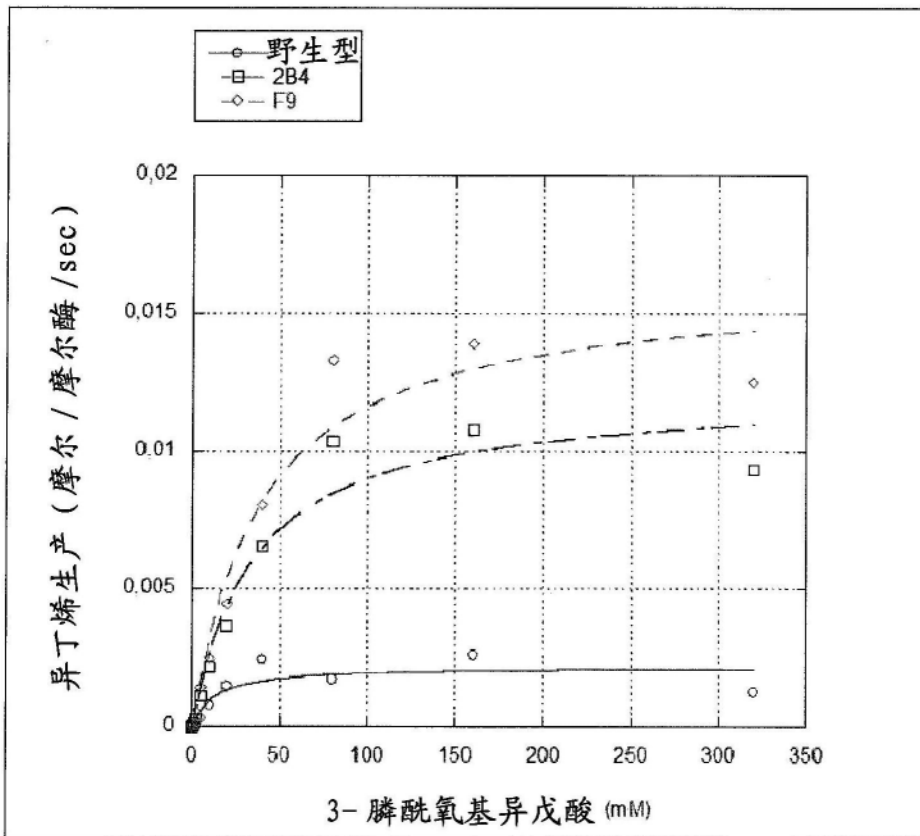


图5

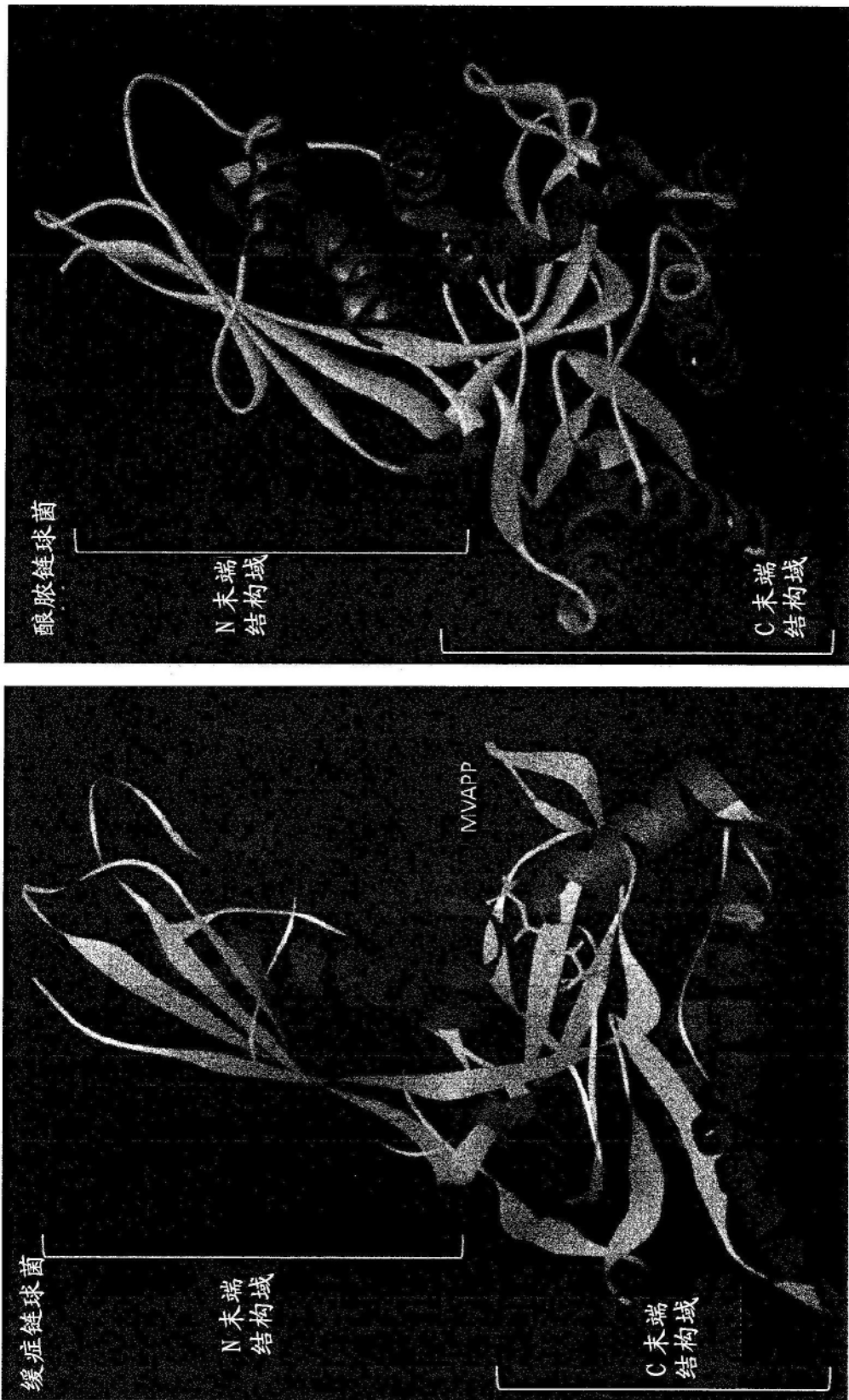


图6

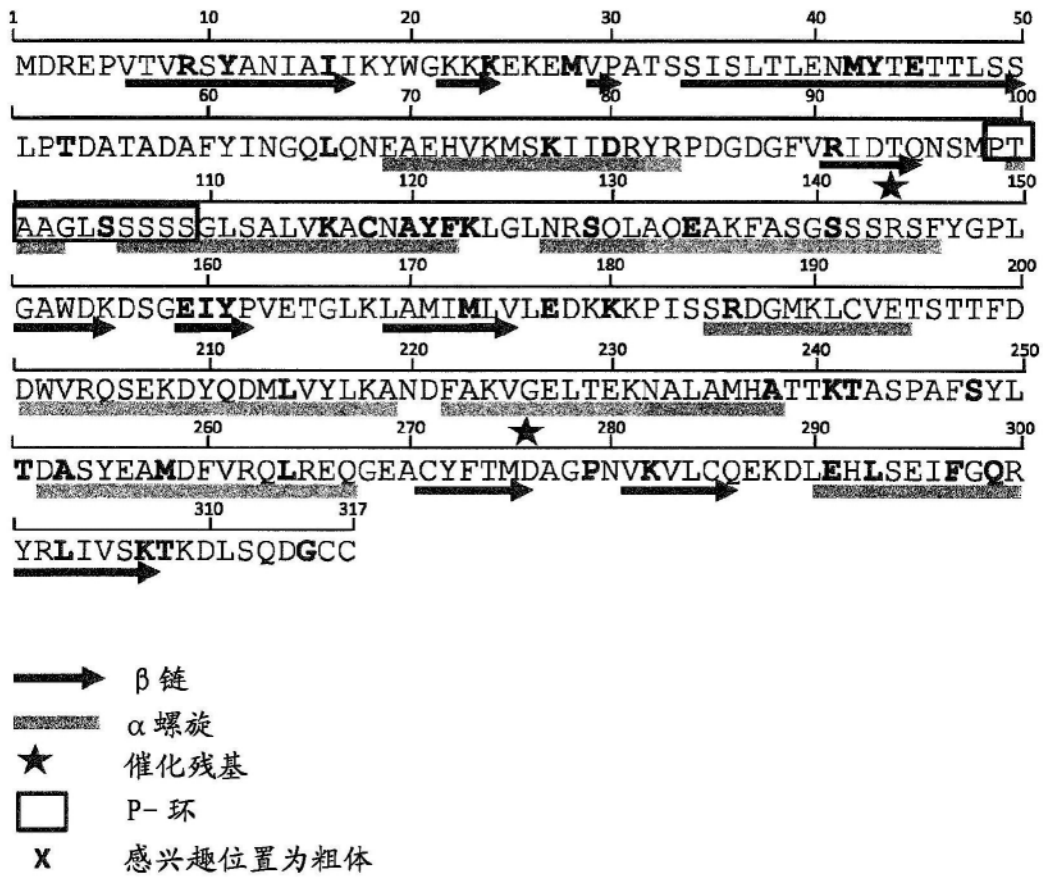
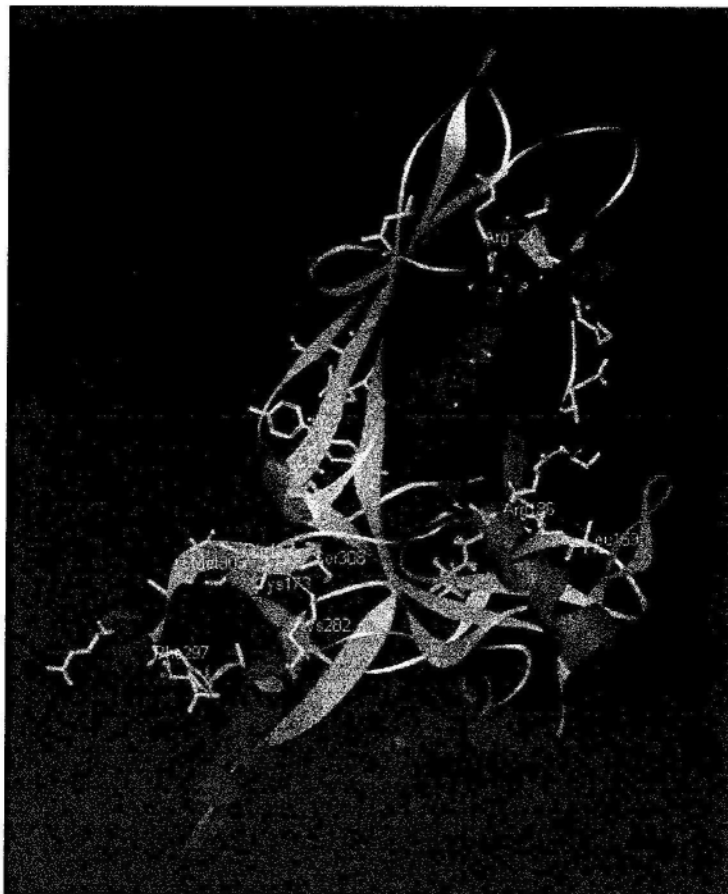
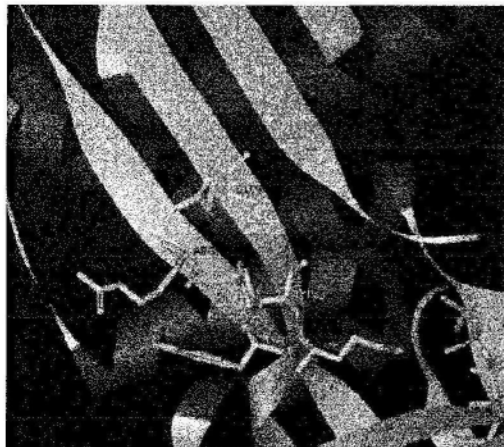


图7

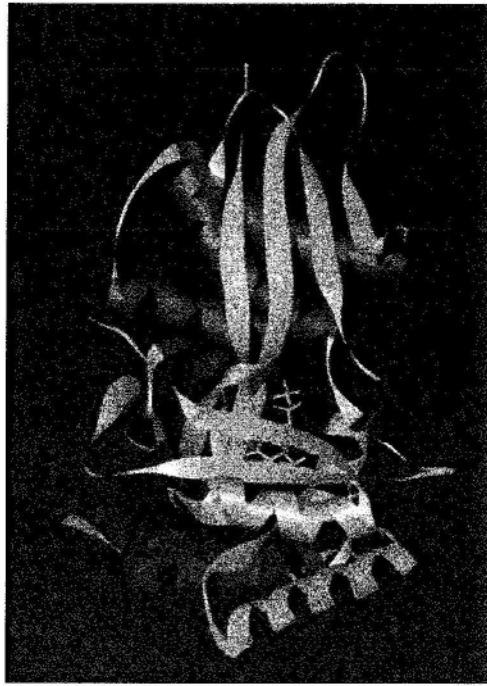


A



B

图8



C

图8(续)

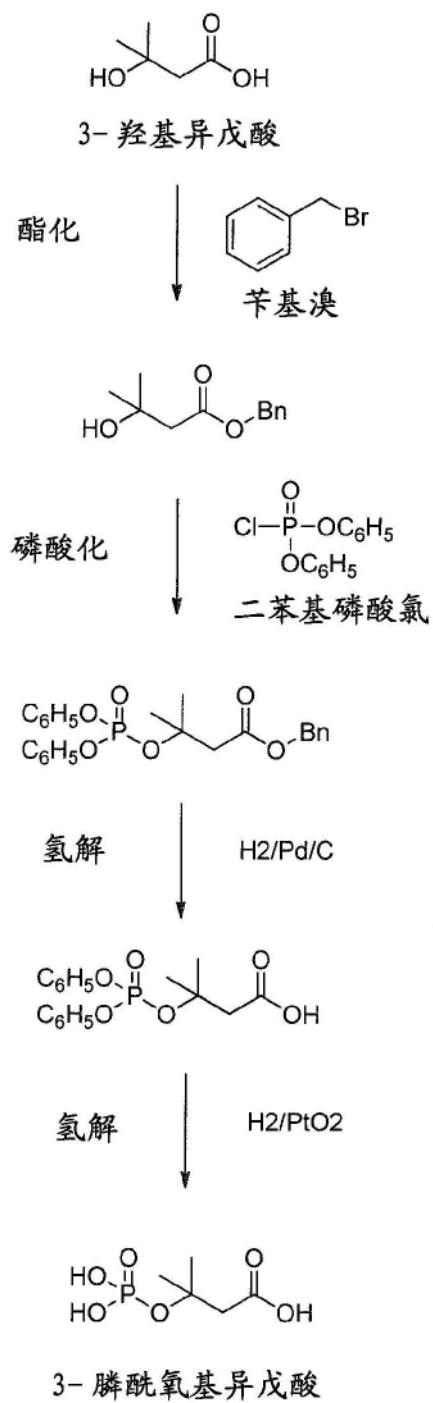


图9

1	MDRKPVT	RSYAN	AI	IKYWG	KKAEK	EMVPA	TSS	ISL	TLEN	MYTET	TL	SPL	PAD	ATA	DA	FY	ING	64																											
1	MDRKPVT	RSYAN	AI	IKYWG	KKKEK	EMVPA	TSS	ISL	TLEN	MYTET	TL	SPL	PAD	ASS	DA	FY	ING	64																											
1	MDRKPVT	RSYAN	AI	IKYWG	KKKEK	EMVPA	TSS	ISL	TLEN	MYTET	TL	SPL	PTD	AKA	DA	FY	ING	64																											
1	MDREPV	TVRSY	AN	AI	IKYWG	KKKEK	EMVPA	TSS	ISL	TLEN	MYTET	TL	SSL	PTD	ATA	DA	FY	ING	64																										
65	QLONEA	EHAKM	RKI	IDRYR	PEGAG	FVR	IDTKNN	MPTAA	AGL	SSSS	SGL	SAL	VKAC	NAYF	QL	GL	NR	128																											
65	QLONEA	EHVKM	SKI	IDRYR	PEGAG	SVR	IDTKNN	MPTAA	AGL	SSSS	SGL	SAL	VKAC	NAYF	QL	GL	NR	128																											
65	QLONEA	EHAKM	SKI	IDRYR	PEGAG	FVR	IDTKNN	MPTAA	AGL	SSSS	SGL	SAL	VKVC	NAYF	QL	GL	NR	128																											
65	QLONEA	EHVKM	SKI	IDRYR	PDGG	FVR	IDTQNS	MPTAA	AGL	SSSS	SGL	SAL	VKAC	NAYF	KL	GL	NR	128																											
129	RELALE	EAKFA	SGSS	RSFY	YGPL	AAW	DKD	SGE	IYP	VET	DL	KLAM	IML	VLE	DQ	KKP	ISS	RD	GM	KLC	192																								
129	KELALE	EAKFA	SGSS	RSFY	YGPL	AAW	DKD	SGE	IYP	VET	DL	KL	SM	IML	VLE	DQ	KKP	ISS	RD	GM	KLC	192																							
129	KELALE	EAKFA	SGSS	RSFY	YGPL	AAW	DKD	SGE	IYP	VET	DL	KLAM	IML	VLE	DQ	KKP	ISS	RD	GM	KLC	192																								
129	SQLAQE	EAKFA	SGSS	RSFY	YGPL	GAW	DKD	SGE	IYP	VET	DL	KLAM	IML	VLE	DQ	KKP	ISS	RD	GM	KLC	192																								
193	VETSTT	FDEWI	RQSE	QDYK	DM	LVYL	KEND	F	KKV	GEL	TE	KNAL	AM	HAT	TK	TAT	PS	F	S	Y	L	T	D	A	S	Y	E	256																	
193	VETSTT	FEEWI	RQSE	QDYK	DM	LVYL	KEND	F	KKV	GAL	TE	KNAL	AM	HAT	TK	TAN	PP	F	S	Y	L	T	D	A	S	Y	E	256																	
193	VETSTT	FEDWV	RQSE	QDYK	DM	LVYL	KEND	F	KKV	GEL	TE	KNAL	AM	HAT	TK	TAT	PS	F	S	Y	L	T	D	A	S	Y	E	256																	
193	VETSTT	FDDWV	RQSE	KDYQ	DM	LVYL	KAND	F	AKV	GEL	TE	KNAL	AM	HAT	TK	TAS	PA	F	S	Y	L	T	D	A	S	Y	E	256																	
257	AMDFV	RQLR	EKG	ESCY	F	TMD	AG	P	NV	KV	L	C	LE	K	F	E	H	S	E	L	L	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	317				
257	AMDFV	RQLR	EQ	GESCY	F	TMD	AG	P	NV	KV	L	C	LE	K	D	L	E	H	S	E	L	L	G	Q	H	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	317			
257	AMDFV	RQLR	EQ	GESCY	F	TMD	AG	P	NV	KV	L	C	LE	E	D	L	E	H	S	E	L	L	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	317			
257	AMDFV	RQLR	EQ	GE	AC	Y	F	TMD	AG	P	NV	KV	L	C	Q	E	K	D	L	E	H	S	E	I	F	G	O	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	317

图11

SEQMO/1-317	1	MDREPVTRSYANIAI	I	KYWG	KKKKE	KEMV	PATSS	ISL	TLEN	MYTET	TLSS	PLTDA	TADAF	YING	QLO	NEA	EHV	KMSK	I	80																																									
E1JG7/1-317	1	MDREPVTRSYANIAI	I	KYWG	KKKKE	KEMV	PATSS	ISL	TLEN	MYTET	TLSS	PLTDA	KADAF	YING	QLO	NEA	EHA	KMSK	I	80																																									
E6KKU6/1-317	1	MDRKPVTRSYANIAI	I	KYWG	KKKKE	KEMV	PATSS	ISL	TLEN	MYTET	TLSS	PLTDA	TADAF	YING	QLO	SEAE	HA	KMSK	I	80																																									
D4FR7/1-317	1	MDRKPVTRSYANIAI	I	KYWG	KKKKE	KEMV	PATSS	ISL	TLEN	MYTET	TLSS	PLTDA	TADAF	YING	QLO	NEA	EHA	KISK	I	80																																									
E9FM52/28-344	28	MDREPVTRSYANIAI	I	KYWG	KKQEK	KEMV	PATSS	ISL	TLEN	MYTET	TLSS	PLTDA	TADVF	YING	QLO	NEA	EHA	KMSK	I	107																																									
Q8DR50/28-344	28	MDREPVTRSYANIAI	I	KYWG	KKKKE	KEMV	PATSS	ISL	TLEN	MYTET	TLSS	PLPAN	VTADE	YING	QLO	NEA	VEHA	KMSK	I	107																																									
SEQMO/1-317	81	RYPDGGFVRIDTONSMPT	AA	GLSS	SSSSG	LSAL	VKAC	NAYF	KL	GLNR	SQ	LAQEA	KFA	SG	SSSR	SFY	GP	LG	AW	DKDS	GEI	160																																							
E1JG7/1-317	81	RYPAGEGFRIDTONNMP	TA	AGL	SSSSG	LSAL	VKAC	NAYF	KL	GLDR	SQ	LAQEA	KFA	SG	SSSR	SFY	GP	LG	AW	DKDS	GEI	160																																							
E6KKU6/1-317	81	RYPAGEGFRIDTONNMP	TA	AGL	SSSSG	LSAL	VKAC	NAYF	QL	GLNR	SQ	LAQEA	KFA	SG	SSSR	SFY	GP	LG	AW	DKDS	GEI	160																																							
D4FR7/1-317	81	RYPAGEGFRIDTONNMP	TA	AGL	SSSSG	LSAL	VKAC	NAYF	QL	GLDR	SQ	LAQEA	KFA	SG	SSSR	SFY	GP	LG	AW	DKDS	GEI	160																																							
E9FM52/28-344	108	RYPAGEGFRIDTONNMP	TA	AGL	SSSSG	LSAL	VKAC	NAYF	QL	GLDR	SQ	LAQEA	KFA	SG	SSSR	SFY	GP	LG	AW	DKDS	GEI	160																																							
Q8DR50/28-344	108	RYPAGEGFRIDTONNMP	TA	AGL	SSSSG	LSAL	VKAC	NAYF	KL	GLDR	SQ	LAQEA	KFA	SG	SSSR	SFY	GP	LG	AW	DKDS	GEI	187																																							
SEQMO/1-317	170	YPVETGLKAMIMLVLED	KKK	PI	SSR	DGM	KLC	VET	ST	TFD	DM	VRQ	SE	KD	YQ	DM	L	V	Y	L	KAN	DFA	KV	GEL	TE	KN	ALAM	HATT	240																																
E1JG7/1-317	161	YPVETDLKAMIMLVLED	KKK	PI	SSR	DGM	KLC	VET	ST	TFD	DM	VRQ	SE	KD	YQ	DM	L	V	Y	L	KEN	D	F	TK	V	GEL	TE	KN	ALAM	HATT	240																														
E6KKU6/1-317	161	YPVETDLRLAMIMLVLED	KKK	PI	SSR	DGM	KLC	VET	ST	TFD	DM	VRQ	SE	KD	YQ	DM	L	V	Y	L	KEN	D	F	AN	V	GEL	TE	KN	ALAM	HATT	240																														
D4FR7/1-317	161	YPVETDLKAMIMLVLED	KKK	PI	SSR	DGM	KLC	VET	ST	TFD	DM	VRQ	SE	KD	YQ	DM	L	V	Y	L	KEN	D	F	TK	V	GEL	TE	KN	ALAM	HATT	240																														
E9FM52/28-344	188	YPVETDLKAMIMLVLED	KKK	PI	SSR	DGM	KLC	VET	ST	TFD	DM	VRQ	SE	KD	YQ	DM	L	V	Y	L	KEN	D	F	AK	V	GEL	TE	KN	ALAM	HATT	267																														
Q8DR50/28-344	188	YPVETDLKAMIMLVLED	KKK	PI	SSR	DGM	KLC	VET	ST	TFD	DM	VRQ	SE	KD	YQ	DM	L	V	Y	L	KEN	D	F	AK	I	GEL	TE	KN	ALAM	HATT	267																														
SEQMO/1-317	241	KTASPAFSYLTDA	SYE	AM	D	FVR	QL	RE	Q	E	A	C	Y	T	M	D	A	G	P	N	V	K	V	L	C	O	E	K	D	L	E	H	L	S	E	I	F	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	G	C	317				
E1JG7/1-317	241	KTASPAFSYLTDA	SYE	AM	D	FVR	QL	RE	Q	E	S	C	Y	F	T	M	D	A	G	P	N	V	K	V	L	C	O	E	K	D	L	E	H	L	S	E	I	F	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	317			
E6KKU6/1-317	241	KTASPAFSYLTDA	SYE	AM	D	FVR	QL	RE	Q	E	A	C	Y	F	T	M	D	A	G	P	N	V	K	V	L	C	O	E	K	D	L	E	H	L	S	E	I	F	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	317			
D4FR7/1-317	241	KTASPAFSYLTDA	SYE	AM	D	FV	H	Q	L	R	E	Q	E	A	C	Y	F	T	M	D	A	G	P	N	V	K	V	L	C	O	E	K	D	L	E	H	L	S	E	I	F	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	317
E9FM52/28-344	268	KTASPAFSYLTDA	SYE	AM	D	FVR	QL	RE	Q	E	A	C	Y	F	T	M	D	A	G	P	N	V	K	V	L	C	O	E	K	D	L	E	H	L	S	E	I	F	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	344			
Q8DR50/28-344	268	KTASPAFSYLTDA	SYE	AM	D	FVR	QL	RE	K	E	G	E	A	C	Y	F	T	M	D	A	G	P	N	V	K	V	L	C	O	E	K	D	L	E	H	L	S	E	I	F	G	Q	R	Y	R	L	I	V	S	K	T	K	D	L	S	Q	D	D	C	344	

图12

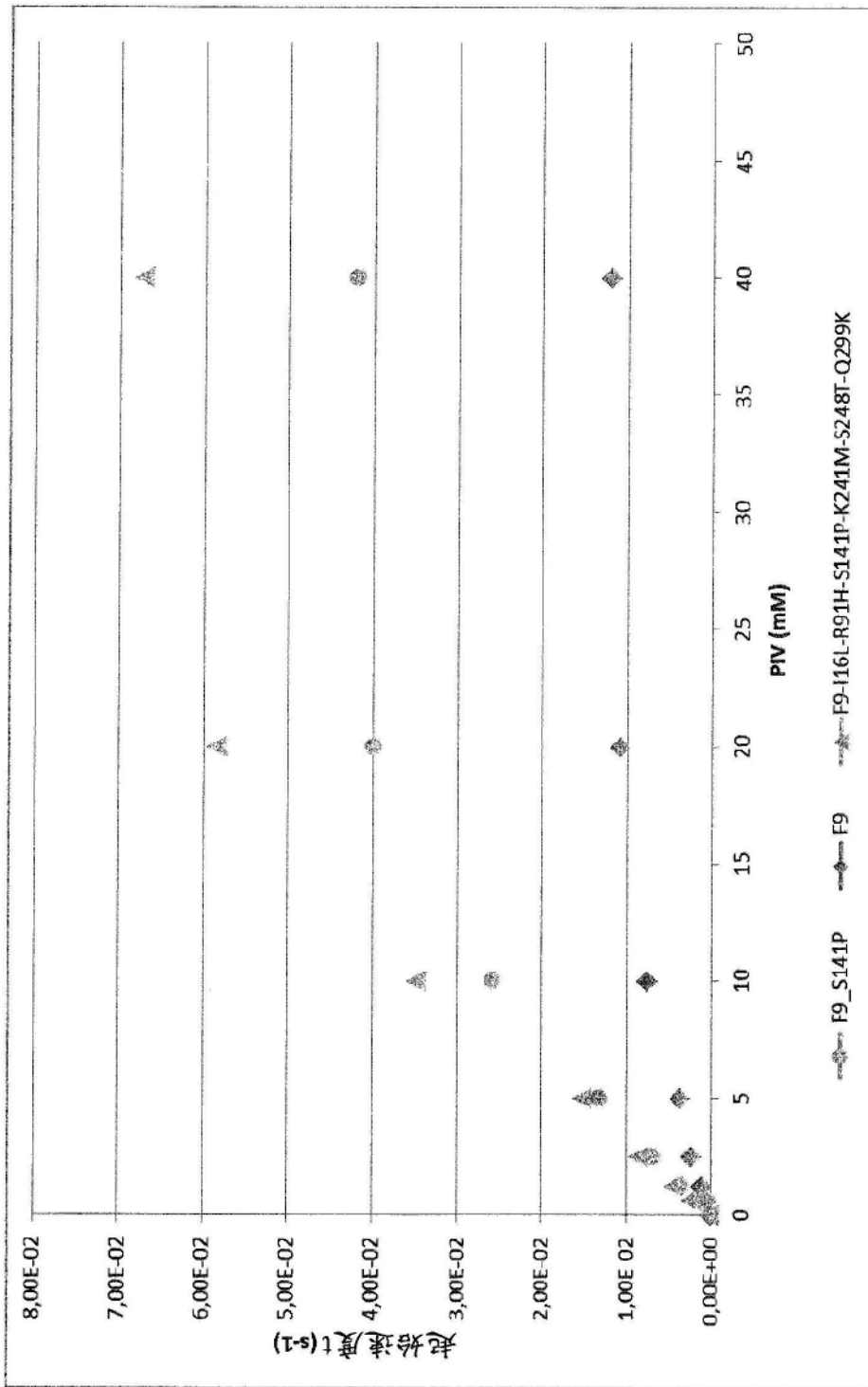


图13

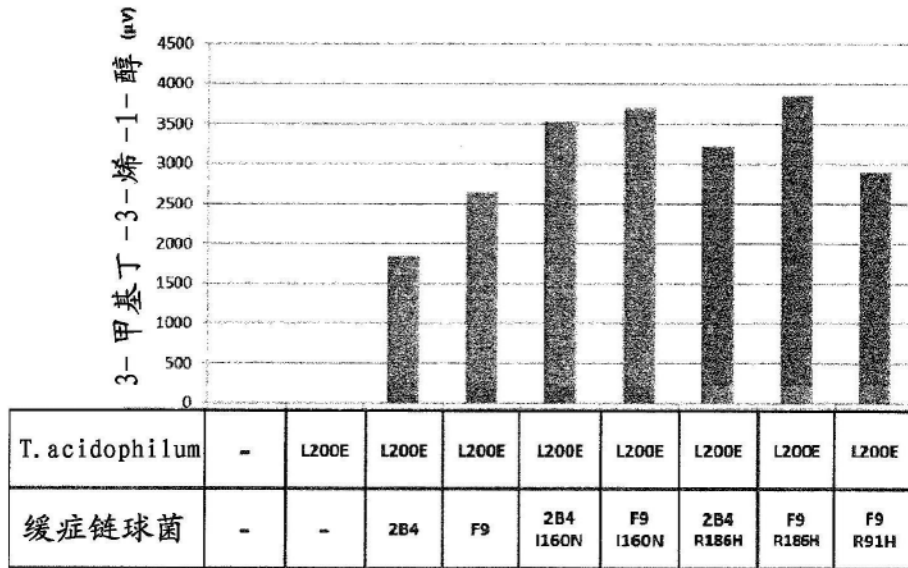


图14

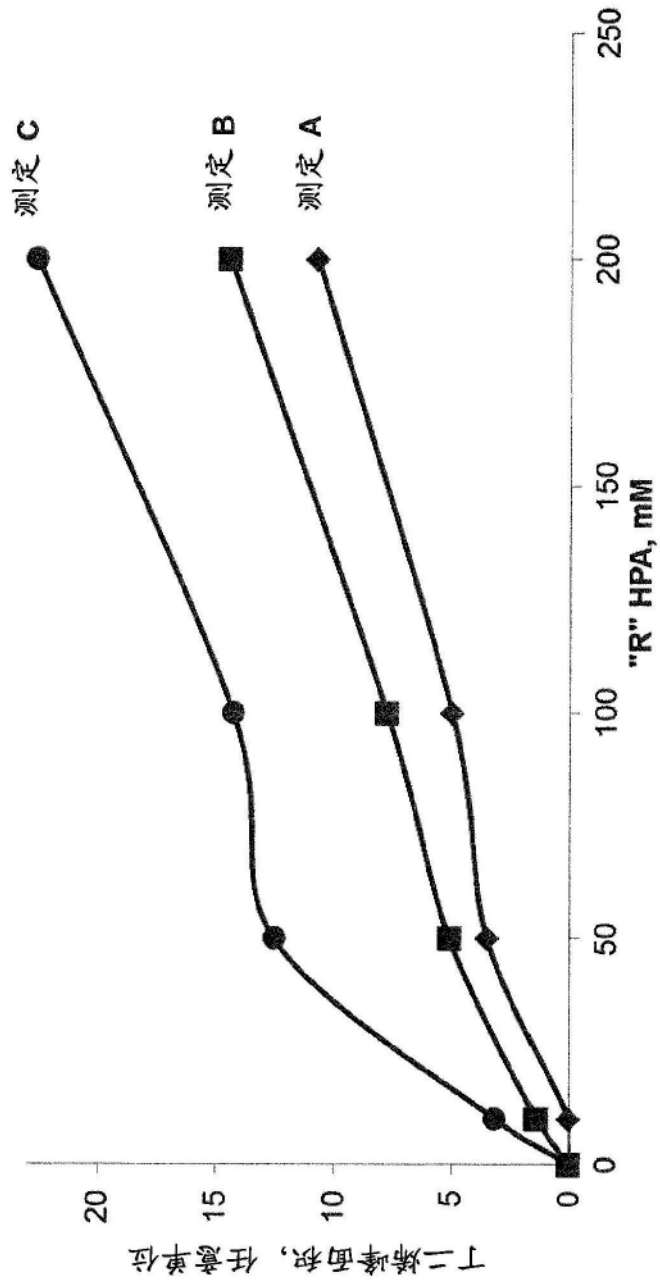


图15

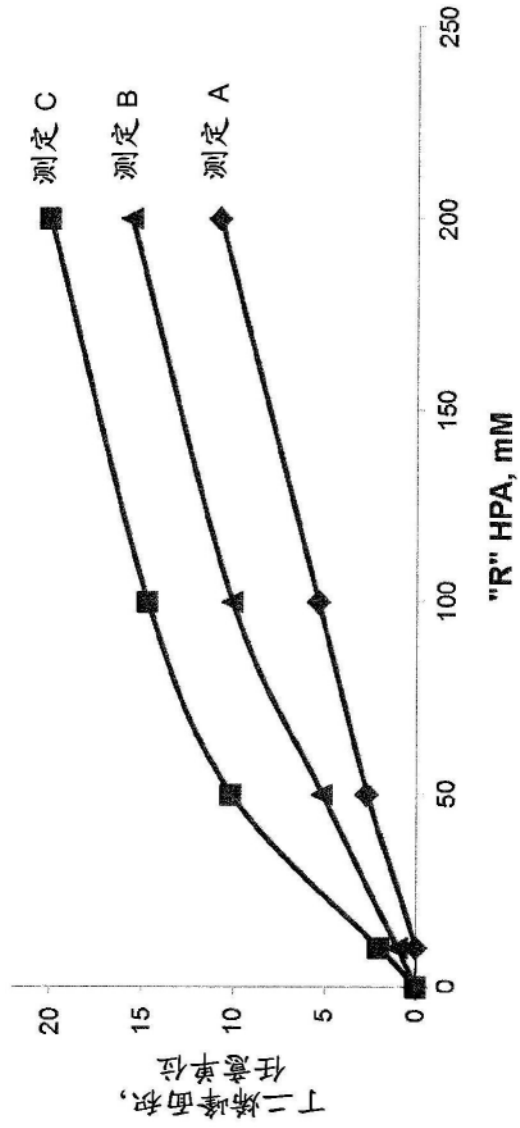


图16