



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102421893 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201080019156. 4

地址 日本东京都

(22) 申请日 2010. 04. 26

(72) 发明人 东畑正敏 奥田光美 佐藤刚  
远藤圭二 佐伯胜久

(30) 优先权数据

2009-110792 2009. 04. 30 JP  
2009-110793 2009. 04. 30 JP  
2010-093307 2010. 04. 14 JP  
2010-093339 2010. 04. 14 JP

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 10. 28

(51) Int. Cl.

C12N 9/54 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/057838 2010. 04. 26

(56) 对比文件

EP 1347044 A2, 2003. 09. 24, 摘要、权利要求 1 等.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/126156 EN 2010. 11. 04

审查员 周茂新

(73) 专利权人 花王株式会社

权利要求书1页 说明书19页

序列表59页 附图5页

(54) 发明名称

碱性蛋白酶变体

Met、Pro、Asp、Asn、His、或 Ser ;和 (j) 或其对应位点 :Arg、Gly、Ser、Lys、Gln、Thr、His、Ala、Cys、或 Val。

(57) 摘要

本发明提供一种碱性蛋白酶变体,其源自于由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的或由其具有 90%或更高一致性的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶,该变体具有突变,其中一个或多个选自于所述 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列的 (a) 位点 6、(b) 位点 15、(c) 位点 16、(d) 位点 65、(e) 位点 66、(f) 位点 82、(g) 位点 83、(h) 位点 204、(i) 位点 319 和 (j) 位点 337 或其对应位点的氨基酸残基被下列氨基酸残基取代:(a) 或其对应位点 :Tyr、Leu、Val、Ile、Met、Tyr、Gln、Lys、Thr、Phe、Arg、Ser、Cys、Ala、或 His ;(b) 或其对应位点 :Glu、Met、Asp、Val、Gln、Arg、Cys、Trp、Ala、或 Phe ;(c) 或其对应位点 :Met、Glu、Arg、Val、Lys、Phe、Tyr、Ile、His、Asp、或 Cys ;(d) 或其对应位点 :Trp ;(e) 或其对应位点 :His、Trp、Ser、或 Leu ;(f) 或其对应位点 :Ala、Glu、Gln、Ser、Cys、Gly、His、Lys、Arg、Met、或 Asn ;(g) 或其对应位点 :Ala、Ser、或 Cys ;(h) 或其对应位点 :Glu、Asp、Cys、Val、Thr、Pro、His、Ile、Trp、Ser、Asn、Lys、或 Arg ;(i) 或其对应位点 :Trp、Val、Thr、Leu、Ile、Cys、Glu、Lys、Tyr、Arg、Phe、Gln、

1. 一种碱性蛋白酶变体,其中,

所述碱性蛋白酶变体是在由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶中,选自于所述 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列的 (h) 位点 204 的氨基酸残基用下列氨基酸残基取代:

(h):谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、异亮氨酸、色氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、或精氨酸。

2. 根据权利要求 1 所述的碱性蛋白酶变体,其中,

所述碱性蛋白酶变体具有以下酶特性:

- 1) 具有氧化剂抗性,在碱性 pH 区间发挥作用且状态稳定;
- 2) 经 50°C、pH10 处理 10 分钟后表现出至少 80% 的残余活性;
- 3) 被二异丙基氟磷酸或苯甲基磺酰氟抑制;和
- 4) 具有由 SDS-PAGE 确定的  $43,000 \pm 2,000$  的分子量。

3. 一种基因,其编码如权利要求 1 或 2 所述的碱性蛋白酶变体。

4. 一种重组载体,其包括如权利要求 3 所述的基因。

5. 一种转化菌株,其包括如权利要求 4 所述的重组载体。

6. 根据权利要求 5 所述的转化菌株,其中,

其宿主为微生物。

7. 一种洗涤剂组合物,其包括如权利要求 1 或 2 所述的碱性蛋白酶变体。

8. 根据权利要求 7 所述的洗涤剂组合物,其中,

所述洗涤剂组合物包含阴离子表面活性剂。

9. 一种用于加强碱性蛋白酶在液体洗涤剂中的稳定性的方法,其中,

所述方法包括,在由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的所述碱性蛋白酶中,将选自于所述 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列的 (h) 位点 204 的氨基酸残基用下列氨基酸残基取代:

(h):谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、异亮氨酸、色氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、或精氨酸。

10. 一种用于制造如权利要求 1 或 2 所述的碱性蛋白酶变体的方法,其中,

所述方法包括培养如权利要求 5 所述的转化菌株。

## 碱性蛋白酶变体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及碱性蛋白酶变体,其为可混合到液体洗涤剂中的有用酶,以及涉及编码该碱性蛋白酶变体的基因。

### 背景技术

[0002] 长久以来,蛋白酶被用于大量工业产品,包括洗涤剂(例如,衣物洗涤剂)、纤维改良剂(fiber-modifying agent)、皮革处理剂、化妆品、洗浴剂、食品改良剂和药物。其中,工业上最大量生产的是用于洗涤剂的蛋白酶。迄今已知的该类蛋白酶的例子包括 Alcalase<sup>®</sup>、Savinase<sup>®</sup>(Novozymes)、Maxacal<sup>®</sup>(Genencor)、Blap<sup>®</sup>(Henkel)和 KAP(Kao Corporation)。

[0003] 将蛋白酶混合到衣物洗涤剂中以赋予该洗涤剂将主要由蛋白质构成且沉积在衣物上的污渍降解成低分子量产物的能力,从而通过表面活性剂促进该降解产物的溶解性。然而,实际上,该沉积的污渍是包括除蛋白质以外的很多例如皮脂来源的脂质和固体颗粒的有机和无机成分的复合污渍。因此,对于能对这样的复合污渍表现出极佳清洁力的洗涤剂一直有持续的需求。

[0004] 考虑到上述课题,本发明人之前发现数个具有大约 43,000 分子量的碱性蛋白酶,其甚至在高浓度脂肪酸的存在下都能保持充分的酪蛋白降解活性,且表现出对于含有蛋白质和皮脂的复合污渍的极佳清洁力;并且发明人之前提交了关于碱性蛋白酶的专利申请(专利文献 1)。这些碱性蛋白酶和传统已知的枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)在分子量、初级结构和酶学特征方面不同,其中,该传统已知的枯草杆菌蛋白酶是从属于芽孢杆菌属的细菌中得到的并且对氧化剂具有极强抗性的丝氨酸蛋白酶。建议将这些碱性蛋白酶分类到新的枯草杆菌蛋白酶亚族中(非专利文献 1)。

[0005] 同时,洗涤剂可按照其形态而分为粉末洗涤剂和液体洗涤剂。有利地,液体洗涤剂比粉末洗涤剂具有更高的溶解性,且其原液可以直接施用到污渍上。虽然液体洗涤剂具有粉末洗涤剂所不具有的优点,但公知液体洗涤剂在加入例如蛋白酶这样的酶时的稳定性方面遇到技术难题,而粉末洗涤剂没有该问题。一般而言,因为液体洗涤剂储藏在室温中,酶(蛋白质)容易变性。此外,液体洗涤剂含有表面活性剂、脂肪酸、溶剂等,且其 pH 落于弱碱性范围内。如此的条件对于酶而言是非常严苛的。而且,作为蛋白水解酶的蛋白酶所经历自我消化非常成问题,进一步降低了酶在液体洗涤剂中的储存稳定性。

[0006] 为了解决如上所述的技术问题,已公知添加酶稳定剂,例如钙离子、硼砂、硼酸、硼化合物、羧酸(例如,蚁酸)、或多元醇。已经进行了一些以抑制蛋白酶活性为基础的研究来解决自消化问题。具体地,已经报道了通过使用 4-取代苯基硼酸(专利文献 2)或某种肽醛和硼组合物(专利文献 3)对蛋白酶活性进行可逆抑制来稳定蛋白酶的方法。也报道了经葡聚糖修饰的蛋白酶可增强蛋白酶在包含表面活性剂的水溶液中的稳定性(非专利文献 2)。

[0007] 然而,由于酶稳定剂(例如,钙离子或硼酸)的添加而产生的蛋白酶稳定作用是不

充足的,且抑制效果依据蛋白酶的类型而不同。而且,该制剂的使用增加了生产成本。因此,不认为该对策是解决液体洗涤剂相关问题的最好方案。酶的化学修饰也造成生产成本方面的问题。

[0008] 一般地,液体洗涤剂中添加有表面活性剂、碱剂、抗-再沉积剂、溶剂、香料、荧光染料等。在这些添加物中,表面活性剂最严重地破坏了酶稳定性。典型地,阴离子表面活性剂和非离子表面活性剂会一起使用。虽然非离子表面活性剂不会在很大程度上对酶造成损伤,却认为阴离子表面活性剂在很大程度上损伤酶,因为阴离子表面活性剂通过其疏水部分进入酶并且破坏酶的疏水相互作用,并捕集稳定酶的二价金属离子(例如,钙离子)(非专利文献3)。因此,酶对阴离子表面活性剂的抗性的增加是对增强酶在液体洗涤剂中的稳定性的非常重要的因素。

[0009] 在源自于 KP43[芽孢杆菌属 KSM-KP43(FERM BP-6532)]的碱性蛋白酶中,已知其相对于母碱性蛋白酶活性的特定活性通过如下方式来增强:用组氨酸残基取代在氨基酸序列位点 15 的氨基酸残基;用苏氨酸或谷氨酰胺残基取代氨基酸序列位点 16 的氨基酸残基(专利文献4);用脯氨酸残基取代在氨基酸序列位点 65 的氨基酸残基(专利文献5);或者用天冬氨酸残基取代氨基酸序列位点 66 的氨基酸残基(专利文献6)。然而,对于能够增强源自于 KP43 的碱性蛋白酶在液体洗涤剂中的稳定性而不减少特异活性的碱性蛋白酶变体还是未知的。

[0010] 专利文献 1:WO 99/18218 小册子

[0011] 专利文献 2:JP-A-H11-507680

[0012] 专利文献 3:JP-A-2000-506933

[0013] 专利文献 4:JP-A-2004-305176

[0014] 专利文献 5:JP-A-2004-000122

[0015] 专利文献 6:JP-A-2002-218989

[0016] 非专利文献 1:Saeki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 279, 313-319, 2000

[0017] 非专利文献 2:Cosmetics & Toiletries magazine, 111, p. 79-88, 1996

[0018] 非专利文献 3:Detergent Enzyme: A Challenge! In Handbook of Detergents Part A, New York, p. 639-690, 1999

## 发明内容

[0019] 本发明涉及一种碱性蛋白酶变体,其源自于由 SEQ ID NO:2 表示的氨基酸序列构成的或与其具有 90%或更高一致性的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶,其中,一个或多个选自于所述 SEQ ID NO:2 表示的氨基酸序列的(a)位点 6、(b)位点 15、(c)位点 16、(d)位点 65、(e)位点 66、(f)位点 82、(g)位点 83、(h)位点 204、(i)位点 319 和 (j)位点 337,或其对应位点的氨基酸残基用下列氨基酸残基取代:

[0020] (a) 或其对应位点:色氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、或组氨酸;

[0021] (b) 或其对应位点:谷氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、半胱氨酸、色氨酸、丙氨酸、或苯丙氨酸;

[0022] (c) 或其对应位点:甲硫氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、酪氨

酸、异亮氨酸、组氨酸、天冬氨酸、或半胱氨酸；

[0023] (d) 或其对应位点：色氨酸；

[0024] (e) 或其对应位点：组氨酸、色氨酸、丝氨酸、或亮氨酸；

[0025] (f) 或其对应位点：丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、或天冬酰胺；

[0026] (g) 或其对应位点：丙氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸；

[0027] (h) 或其对应位点：谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、异亮氨酸、色氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、或精氨酸；

[0028] (i) 或其对应位点：色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸、或丝氨酸；和

[0029] (j) 或其对应位点：精氨酸、甘氨酸、丝氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、组氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸。

[0030] 本发明也涉及编码碱性蛋白酶变体的基因。

[0031] 本发明也涉及包括该基因的重组载体。

[0032] 本发明也涉及包括该重组载体的转化菌株。

[0033] 本发明也涉及包括该碱性蛋白酶变体的洗涤剂组合物。

[0034] 本发明也涉及用于增强碱性蛋白酶在液体洗涤剂中的稳定性的方法，该方法包括，在由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的或由与其具有 90% 或更高一致性的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶中，将一个或多个选自于所述 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列的 (a) 位点 6、(b) 位点 15、(c) 位点 16、(d) 位点 65、(e) 位点 66、(f) 位点 82、(g) 位点 83、(h) 位点 204、(i) 位点 319 和 (j) 位点 337，或其对应位点的氨基酸残基用下列氨基酸残基取代：

[0035] (a) 或其对应位点：色氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、或组氨酸；

[0036] (b) 或其对应位点：谷氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、半胱氨酸、色氨酸、丙氨酸、或苯丙氨酸；

[0037] (c) 或其对应位点：甲硫氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、组氨酸、天冬氨酸、或半胱氨酸；

[0038] (d) 或其对应位点：色氨酸；

[0039] (e) 或其对应位点：组氨酸、色氨酸、丝氨酸、或亮氨酸；

[0040] (f) 或其对应位点：丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、或天冬酰胺；

[0041] (g) 或其对应位点：丙氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸；

[0042] (h) 或其对应位点：谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、异亮氨酸、色氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、或精氨酸；

[0043] (i) 或其对应位点：色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸、或丝氨酸；和

[0044] (j) 或其对应位点：精氨酸、甘氨酸、丝氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、组氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸。

#### 附图说明

- [0045] [图 1] 显示在位点 6 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0046] [图 2] 显示在位点 15 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0047] [图 3] 显示在位点 16 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0048] [图 4] 显示在位点 65 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0049] [图 5] 显示在位点 66 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0050] [图 6] 显示在位点 82 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0051] [图 7] 显示在位点 83 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0052] [图 8] 显示在位点 204 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0053] [图 9] 显示在位点 319 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。  
[0054] [图 10] 显示在位点 337 的氨基酸残基被取代的变体的相对残余活性的图表。

#### 具体实施方式

- [0055] 本发明涉及提供一种在液体洗涤剂中具有增强稳定性的碱性蛋白酶变体。  
[0056] 本发明人已经发现, 通过用其他氨基酸残基来取代用来特征化具有大约 43,000 分子量的碱性蛋白酶 KP43 的特定氨基酸残基, 得到的碱性蛋白酶变体在液体洗涤剂中的稳定性相比于母碱性蛋白得到增强。  
[0057] 本发明可以提供在含有例如 LAS 的阴离子表面活性剂的液体洗涤剂中保持活性的碱性蛋白酶变体, 其具有高的特异活性并可用作洗涤剂的有用酶。  
[0058] 本发明的碱性蛋白酶变体是源自于由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的或与其具有 90% 或更高一致性的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶的碱性蛋白酶变体, 其中将一个或多个选自于 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列的 (a) 位点 6、(b) 位点 15、(c) 位点 16、(d) 位点 65、(e) 位点 66、(f) 位点 82、(g) 位点 83、(h) 位点 204、(i) 位点 319 和 (j) 位点 337, 或其对应位点的氨基酸残基用其他氨基酸残基来取代。本发明的碱性蛋白酶变体可以是野生型变体或人工创造的变体。  
[0059] 在本发明中, 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶的例子包括源自于 KP43 [芽孢杆菌属 KSM-KP43 (FERM BP-6532)] 的碱性蛋白酶 (WO 99/18218 小册子)。  
[0060] 由与 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列具有 90% 或更高一致性的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶的例子包括那些由不同于 SEQ ID NO :2 所表示的氨基酸序列但与 SEQ ID NO :2 所表示的氨基酸序列具有 90% 或更高一致性, 优选为 95% 或更高一致性, 更优选为 96% 或更高一致性, 更优选为 97% 或更高一致性, 更优选为 98% 或更高一致性, 更优选为 99% 或更高一致性的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶; 或那些由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的且其中一个或多个氨基酸被缺失、取代或增加的碱性蛋白酶。  
[0061] 优选地, 这些碱性蛋白酶具有的功能等同于或高于由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶的功能。  
[0062] 由与由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列具有 90% 或更高一致性的氨基酸序列

构成的碱性蛋白酶的具体例子包括蛋白酶 KP9860 [来源于芽孢杆菌属 KSM-KP9860 (FERM BP-6534) 的蛋白酶, WO 99/18218, GenBank 序列号 :AB046403] 和蛋白酶 9865 [来源于芽孢杆菌属 KSM-9865 (FERM BP-10139) 的蛋白酶, GenBank 序列号 :AB084155]。

[0063] 由与 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列具有 90% 或更高一致性的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶的具体例子还包括 :如下变体, 例如由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 66 和 246 的氨基酸残基分别被天冬氨酸和丝氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 103 的氨基酸残基被精氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 195 的氨基酸残基被丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、缬氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、丝氨酸、精氨酸、天冬酰胺或组氨酸取代的变体 (JP-A-2002-218989) ;如下变体, 例如由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 84 的氨基酸残基被精氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 104 的氨基酸残基被脯氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 256 的氨基酸残基被丙氨酸或丝氨酸取代的变体、和由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 369 的氨基酸残基被天冬酰胺取代的变体 (JP-A-2002-306176) ;如下变体, 例如由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 251 的氨基酸残基被谷氨酰胺、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸取代的变体、和由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 256 的氨基酸残基被谷氨酰胺、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸或天冬酰胺取代的变体 (JP-A-2003-125783) ;如下变体, 例如由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 65 的氨基酸残基被脯氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 273 的氨基酸残基被苏氨酸或异亮氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 320 的氨基酸残基被苯丙氨酸或异亮氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 356 的氨基酸残基被谷氨酰胺或丝氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 387 的氨基酸残基被赖氨酸、丙氨酸或谷氨酰胺取代的变体 (JP-A-2004-000122) ;如下变体, 例如由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 163 的氨基酸残基被组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、丙氨酸或苯丙氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 170 的氨基酸残基被缬氨酸或亮氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 171 的氨基酸残基被丙氨酸、甘氨酸或苏氨酸取代的变体 (JP-A-2004-057195) ;如下变体, 例如由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 63 的氨基酸残基被丝氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 89 的氨基酸残基被组氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 120 的氨基酸残基被精氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 63 和 187 的氨基酸残基都被丝氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 226 的氨基酸残基被酪氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 296 的氨基酸残基被缬氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 304 的氨基酸残基被丝氨酸取代的变体 (JP-A-2004-305175) ;如下变体, 例如由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 15 的氨基酸残基被组氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 16 的氨基酸残基被苏氨酸或谷氨酰胺取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 166 的氨基酸残基被

甘氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 167 的氨基酸残基被缬氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 346 的氨基酸残基被精氨酸取代的变体、由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中位点 405 的氨基酸残基被天冬氨酸取代的变体 (JP-A-2004-305176) ;以及具有大量如上所述变化的变体。

[0064] 在以上提到的碱性蛋白酶和蛋白酶变体中,优选那些具有任意以下由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成的碱性蛋白酶所具有的酶特性:

[0065] 1) 具有氧化剂抗性,在碱性 pH 区间 ( $\geq 8$ ) 发挥作用且状态稳定。在此处使用的关于“碱性蛋白酶表现氧化剂抗性”的表达是指,在允许碱性蛋白酶在含有过氧化氢 (50mM) 和氯化钙 (5mM) 的 20mM 伯瑞坦 - 罗比森缓冲液 (Britton-Robinson buffer, pH 10) 中在 20°C 下静置 20 分钟后,碱性蛋白酶表现出至少 50% 的残余活性 (合成底物法 synthetic substrate method) 的情况;

[0066] 2) 经 50°C、pH10 处理 10 分钟后表现出至少 80% 的残余活性;

[0067] 3) 被二异丙基氟磷酸 (DFP) 或苯甲基磺酰氟 (PMSF) 抑制;和

[0068] 4) 具有由 SDS-PAGE 确定的  $43,000 \pm 2,000$  的分子量。

[0069] 在本说明书中,氨基酸序列之间的一致性是通过 Lipman-Pearson 法 (Science, 227, 1435, (1985)) 计算的。具体地,一致性是通过使用遗传信息处理软件 Genetyx-Win (版本 5.1.1; Software Development Co., Ltd.) 的检索同源性 (Search homology) 程序来计算的,其中比较的单位大小 (ktup) 设为 2。

[0070] 在本说明书中,一个到多个氨基酸被缺失、取代或增加的氨基酸序列优选为一个到十个氨基酸被缺失、取代或增加的氨基酸序列。增加包括在两个末端增加一个到多个氨基酸。

[0071] 本发明的碱性蛋白酶变体包括分别由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成而其中 (a') 位点 6 的氨基酸残基 (甘氨酸残基) 已经被色氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、丙氨酸或组氨酸取代;(b') 位点 15 的氨基酸残基 (丝氨酸残基) 已经被谷氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、半胱氨酸、色氨酸、丙氨酸或苯丙氨酸代替;(c') 位点 16 的氨基酸残基 (丝氨酸残基) 已经被甲硫氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、组氨酸、天冬氨酸或半胱氨酸取代;(d') 位点 65 的氨基酸残基 (苏氨酸残基) 已经被色氨酸取代;(e') 位点 66 的氨基酸残基 (天冬酰胺残基) 已经被组氨酸、色氨酸、丝氨酸或亮氨酸取代;(f') 位点 82 的氨基酸残基 (苏氨酸残基) 已经被丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、甲硫氨酸或天冬酰胺取代;(g') 位点 83 的氨基酸残基 (天冬酰胺残基) 已经被丙氨酸、丝氨酸或半胱氨酸取代;(h') 位点 204 的氨基酸残基 (谷氨酰胺残基) 已经被谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、异亮氨酸、色氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、赖氨酸或精氨酸取代;(i') 位点 319 的氨基酸残基 (丙氨酸残基) 已经被色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸或丝氨酸取代;或 (j') 位点 337 的氨基酸残基 (苯丙氨酸残基) 已经被精氨酸、甘氨酸、丝氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、组氨酸、丙氨酸、半胱氨酸或缬氨酸取代的碱性蛋白酶变体;以及通过组合上述两种或更多取代 (a') 到 (j') 而获得的碱性

蛋白酶变体。

[0072] 本发明的碱性蛋白酶变体也包括分别由与 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列具有 90% 或更高一致性的氨基酸序列构成而其中 (a") 对应于位点 6 的位点上的氨基酸残基已经被色氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、丙氨酸或组氨酸取代 ;(b") 对应于位点 15 的位点上的氨基酸残基已经被谷氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、半胱氨酸、色氨酸、丙氨酸或苯丙氨酸代替 ;(c") 对应于位点 16 的位点上的氨基酸残基已经被甲硫氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、组氨酸、天冬氨酸或半胱氨酸取代 ;(d") 对应于位点 65 的位点上的氨基酸残基 ( 已经被色氨酸取代 ;(e") 对应于位点 66 的位点上的氨基酸残基已经被组氨酸、色氨酸、丝氨酸或亮氨酸取代 ;(f") 对应于位点 82 的位点上的氨基酸残基已经被丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、甲硫氨酸或天冬酰胺取代 ;(g") 对应于位点 83 的位点上的氨基酸残基已经被丙氨酸、丝氨酸或半胱氨酸取代 ;(h") 对应于位点 204 的位点上的氨基酸残基已经被谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、异亮氨酸、色氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、赖氨酸或精氨酸取代 ;(i") 对应于位点 319 的位点上的氨基酸残基已经被色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸或丝氨酸取代 ;或 (j") 对应于位点 337 的位点上的氨基酸残基已经被精氨酸、甘氨酸、丝氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、组氨酸、丙氨酸、半胱氨酸或缬氨酸取代的碱性蛋白酶变体 ;或者通过组合两个或更多上述 (a") 到 (j") 而得到的碱性蛋白酶变体。

[0073] 例如,在本发明的碱性蛋白酶变体中,任意一个或多个氨基酸残基可以在由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列的位点 6 或其对应位点、位点 15 或其对应位点、位点 16 或其对应位点、位点 65 或其对应位点、位点 66 或其对应位点、位点 82 或其对应位点、位点 83 或其对应位点、位点 204 或其对应位点、位点 319 或其对应位点、位点 337 或其对应位点处被同时取代。

[0074] 优选地,在本发明的碱性蛋白酶变体中,在由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 6 或其对应位点的氨基酸残基被色氨酸、亮氨酸、缬氨酸或异亮氨酸取代 ;位点 15 或其对应位点的氨基酸残基被谷氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸或缬氨酸取代 ;位点 16 或其对应位点的氨基酸残基被甲硫氨酸、谷氨酸、精氨酸或缬氨酸取代 ;位点 65 或其对应位点的氨基酸残基被色氨酸取代 ;位点 66 或其对应位点的氨基酸残基被组氨酸取代 ;位点 82 或其对应位点的氨基酸残基被丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺或丝氨酸取代 ;位点 83 或其对应位点的氨基酸残基被丙氨酸或丝氨酸取代 ;位点 204 或其对应位点的氨基酸残基被谷氨酸、天冬氨酸或色氨酸取代 ;位点 319 或其相对位点的氨基酸残基被色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸取代 ;和 / 或位点 337 或其对应位点的氨基酸残基被精氨酸或缬氨酸取代。

[0075] 更优选地,在本发明的碱性蛋白酶变体中,在由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 6 或其对应位点的氨基酸残基被色氨酸取代 ;位点 15 或其对应位点的氨基酸残基被谷氨酸取代 ;位点 16 或其对应位点的氨基酸残基被甲硫氨酸取代 ;位点 65 或其对应位点的氨基酸残基被色氨酸取代 ;位点 66 或其对应位点的氨基酸残基被组氨酸取代 ;位点

82 或其对应位点的氨基酸残基被丙氨酸取代 ;位点 83 或其对应位点的氨基酸残基被丙氨酸取代 ;位点 204 或其对应位点的氨基酸残基被谷氨酸取代 ;位点 319 或其相对位点的氨基酸残基被色氨酸取代 ;和 / 或位点 337 或其对应位点的氨基酸残基被精氨酸取代。

[0076] 在本发明中,“在对应位点的氨基酸残基”可通过已知演算法则(例如,Lipman-Pearson 法)对碱性蛋白酶的氨基酸序列进行比对来识别,从而将最高同源性定位到存在于氨基酸序列中的保守氨基酸残基上。当通过该方法对碱性蛋白酶的氨基酸序列进行定位时,不管氨基酸序列中存在什么插入或缺失,都可以确定每一蛋白酶中的同源氨基酸残基的位点。可以想象的是,同源氨基酸残基在碱性蛋白酶的三维结构中处于相同的位置上,因此这些蛋白酶在特异性相关的功能方面是相类似的。

[0077] 例如,当通过上述方法对由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列与蛋白酶 KP9860 以及蛋白酶 KP9865 的氨基酸序列进行比较时,可以确定以下关系:

[0078] (a) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 6 的氨基酸残基(甘氨酸残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 6 的甘氨酸残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 6 的甘氨酸残基;

[0079] (b) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 15 的氨基酸残基(丝氨酸残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 15 的丝氨酸残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 15 的丝氨酸残基;

[0080] (c) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 16 的氨基酸残基(丝氨酸残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 16 的丝氨酸残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 16 的丝氨酸残基;

[0081] (d) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 65 的氨基酸残基(苏氨酸残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 65 的苏氨酸残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 65 的苏氨酸残基;

[0082] (e) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 66 的氨基酸残基(天冬酰胺残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 66 的天冬酰胺残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 66 的天冬酰胺残基;

[0083] (f) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 82 的氨基酸残基(苏氨酸残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 82 的苏氨酸残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 82 的苏氨酸残基;

[0084] (g) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 83 的氨基酸残基(天冬酰胺残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 83 的天冬酰胺残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 83 的天冬酰胺残基;

[0085] (h) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 204 的氨基酸残基(谷氨酰胺残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 204 的谷氨酰胺残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 204 的谷氨酰胺残基;

[0086] (i) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 319 的氨基酸残基(丙氨酸残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 319 的丙氨酸残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 319 的丙氨酸残基;

[0087] (j) 由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列中的位点 337 的氨基酸残基(苯丙氨酸残基)对应于蛋白酶 KP9860 的位点 337 的苯丙氨酸残基以及蛋白酶 KP9865 的位点 337 的苯

丙氨酸残基。

[0088] 本发明的碱性蛋白酶变体可以通过将变化带入由 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列构成或由与 SEQ ID NO :2 表示的氨基酸序列具有 90% 或更高一致性的氨基酸序列构成而未经修饰的碱性蛋白酶（下文中可称作母碱性蛋白酶）的目标位点而产生。

[0089] 本发明的碱性蛋白酶变体可以通过例如以下过程来获得。具体地，使编码母碱性蛋白酶的克隆基因（例如，具有 SEQ ID NO :1 表示的核苷酸序列的基因）突变；将由此突变的基因转化到合适的宿主中；将经转化的宿主进行培养，之后从培养产物中重获碱性蛋白酶。对于编码母碱性蛋白酶的克隆可以通过常用的遗传重组技术来进行，例如，在 WO 99/18218 小册子或 WO 98/56927 小册子中描述的方法。

[0090] 编码母碱性蛋白酶的基因的突变可以通过任意的常用点突变技术来进行。更具体地，基因的突变可以通过，例如，Site-Directed Mutagenesis System Mutan<sup>®</sup>-Super Express Km 试剂盒 (Takara Bio Inc. 的产品) 的使用来进行。通过重组 PCR (聚合酶链式反应) 法 (PCR 实验方案, Academic Press, New York, 1990), 基因的任意序列片段可以被取代表为对应于该任意序列片段的另一基因的序列片段。

[0091] 使用如上获得的突变基因来产生本发明的蛋白酶变体的方法，例如，如下所示：将突变基因连接到可以持续扩增该基因的 DNA 载体中，之后转化到宿主细菌中的方法；或将突变基因引入能持续维持该基因的宿主细菌的染色体 DNA 中的方法。表现出如上所述特征的宿主细菌的例子包括属于芽孢杆菌属的细菌、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、霉菌、酵母和放线菌 (*Actinomyces*)。通过将含有突变基因的宿主微生物体接种到含有可同化碳源、氮源和其他必需营养素的培养基中，之后用常用方法进行培养可以产生出蛋白酶变体。

[0092] 如此产生的本发明的碱性蛋白酶变体表现出氧化剂抗性，保持酪蛋白降解活性（甚至在存在高浓度脂肪酸时），具有经 SDS-PAGE 确定的  $43,000 \pm 2,000$  的分子量，在碱性 pH 范围内表现出活性，并表现出高度特异活性。此外，保持高度特异活性的本发明的碱性蛋白酶被赋予了极佳的特性；例如，碱性蛋白酶变体在含有例如 LAS 的阴离子表面活性剂的液体洗涤剂中表现出比母碱性蛋白酶更高的稳定性。因此，在本发明的一个方面，提供了一个用于在液体清洗剂中稳定碱性蛋白酶的方法，该方法包括取代氨基酸残基的步骤。在本发明的方法中，用来进行取代的碱性蛋白酶是以上提到的母碱性蛋白酶，且进行取代所涉及的氨基酸残基是在上述 (a) 到 (j) 中描述的那些氨基酸残基。

[0093] 因此，本发明的碱性蛋白酶变体作为可混合到多种洗涤剂组合物中的酶有用。此外，通过本发明的稳定性增强方法，可以提供混合到多种洗涤剂组合物中的有用酶。

[0094] 对于混合到洗涤剂组合物中的本发明的碱性蛋白酶变体的用量没有特别的限定，只要碱性蛋白酶变体能表现出其活性即可。基于 1kg 洗涤剂组合物，要混合的碱性蛋白酶变体的量可以为 0.1 到 5,000PU，但是，从经济等的角度出发，混合量优选为 500PU 或更少。

[0095] 除本发明的碱性蛋白酶变体外，本发明的洗涤剂组合物可以含有多种酶，例如，水解酶、氧化酶、还原酶、转移酶、裂解酶、异构酶、连接酶和合成酶。其中，优选为除了本发明的碱性蛋白酶变体以外的蛋白酶、纤维素酶、角蛋白酶、酯酶、角质酶、淀粉酶、脂肪酶、支链淀粉酶、果胶酶、甘露聚糖酶、葡萄糖苷酶、葡聚糖酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、漆酶等，更优选为蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶。蛋白酶的例子包括市售的产品，例如 Alcalase<sup>®</sup>、Esperase<sup>®</sup>、Savinase<sup>®</sup>、Everlase<sup>®</sup> 和 Kannase<sup>®</sup>

(Novozymes) ;Properase<sup>®</sup>和 Purafect<sup>®</sup> (Genencor) ;和 KAP(Kao Corporation)。纤维素酶的例子包括 Celluzyme<sup>®</sup>和 Carezyme<sup>®</sup> (Novozymes) ;和 KAC(Kao Corporation), 在 JP-A-H10-313859 中描述的由芽孢杆菌属 KSM-S237 菌株产出的碱性纤维素酶, 和在 JP-A-2003-313592 中描述的突变碱性纤维素酶。淀粉酶的例子包括 Termamyl<sup>®</sup>、Duramyl<sup>®</sup>和 Stainzyme<sup>®</sup> (Novozymes) ;Purastar<sup>®</sup> (Genencor) 和 KAM(Kao Corporation)。脂肪酶的例子包括 Lipolase<sup>®</sup>、Lipolase<sup>®</sup> Ultra 和 Lipex<sup>®</sup> (Novozymes)。

[0096] 当除本发明的碱性蛋白酶变体外的蛋白酶与碱性蛋白酶变体一起混合到洗涤剂组合物中时, 基于 1kg 洗涤剂组合物, 蛋白酶含量优选为 0.1 到 500PU。当纤维素酶和碱性蛋白酶变体一起混合时, 基于 1kg 洗涤剂组合物, 纤维素酶含量优选为 300 到 3,000,000KU, 其中 KU 代表用在 JP-A-H10-313859 的第 [0020] 段中描述的酶活性测定法确定的单位。

[0097] 当淀粉酶和碱性蛋白酶变体一起混合时, 基于 1kg 洗涤剂组合物, 淀粉酶含量优选为 50 到 500,000IU, 其中 IU 代表用在 JP-A-H11-43690 的第 [0040] 段中描述的淀粉酶活性测定法确定的单位。

[0098] 当脂肪酶和碱性蛋白酶变体一起混合时, 基于 1kg 洗涤剂组合物, 淀粉酶含量优选为 10,000 到 1,000,000LU, 其中 LU 代表用 JP-A-H08-500013 的实施例 1 描述的脂肪酶活性测定法确定的单位。

[0099] 本发明的洗涤剂组合物可以含有已知的洗涤剂成分, 其例子包括以下物质。

[0100] (1) 表面活性剂

[0101] 将表面活性剂以 0.5 到 60 质量% 的量混合入洗涤剂组合物, 在洗涤剂组合物为粉末形式的情况下优选为 10 到 45 质量%, 在洗涤剂组合物是液体形式的情况下优选为 20 到 50 质量%。当本发明的洗涤剂组合物用作漂白剂或用于自动洗碗机的洗涤剂时, 需混合的表面活性剂的量一般为 1 到 10 质量%, 优选为 1 到 5 质量%。

[0102] 用于本发明洗涤剂组合物表面活性剂的例子包括选自于阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、两性表面活性剂和阳离子表面活性剂的一种; 和这些表面活性剂的组合。优选地, 使用阴离子表面活性剂或非离子表面活性剂。

[0103] 优选的阴离子表面活性剂的例子包括 C10-C18 醇硫酸酯盐、C8-C20 烷氧基醇硫酸酯盐、烷基苯磺酸盐、链烷磺酸盐、 $\alpha$ -烯炔磺酸盐、 $\alpha$ -磺基脂肪酸盐、 $\alpha$ -磺基脂肪酸烷基酯盐和脂肪酸盐。在本发明中, 优选为具有 C10-C14, 更优选 C12-C14 的烷基链的直链烷基苯磺酸盐。反离子种类优选为碱金属盐或胺盐, 更优选钠和 / 或钾; 单乙醇胺; 或二乙醇胺。

[0104] 优选的非离子表面活性剂的例子包括聚氧化烯 C8-C20 烷基醚、烷基多糖苷、聚氧化烯 C8-C20 烷基苯基醚、聚氧化烯失水山梨糖醇 C8-C22 脂肪酸酯、聚氧化烯二醇 C8-C22 脂肪酸酯、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物。非离子表面活性剂优选为通过例如环氧乙烷或环氧丙烷这样的环氧烷烃 (4 到 20mol) 与 C10-C18 醇的加成而获得的聚氧化烯烷基醚, 该聚氧化烯烷基醚优选具有 10.5 到 15.0、更优选 11.0 到 14.5 的 HLB 值 (亲水亲油平衡值) (用 Griffin 法计算得到)。

[0105] (2) 二价金属离子捕集剂

[0106] 二价金属离子捕集剂以 0.01 到 50 质量% 的量混入, 优选为 5 到 40 质量%。用于本发明的洗涤剂组合物二价金属离子捕集剂的例子包括缩合磷酸盐, 例如三聚磷酸盐、焦磷酸盐和正磷酸盐; 硅铝酸盐, 例如沸石; 合成的层状结晶型硅酸盐; 次氨基三乙酸盐; 乙

二胺四乙酸盐 ; 柠檬酸盐 ; 异柠檬酸盐 ; 和聚缩醛羧酸盐。其中, 优选结晶型硅铝酸盐 ( 合成沸石 )。在 A 型、X 型和 P 型沸石中, 优选 A 型沸石。优选使用的合成沸石具有 0.1 到 10  $\mu\text{m}$  的平均初级粒径, 更优选为 0.1 到 5  $\mu\text{m}$ 。

### [0107] (3) 碱剂

[0108] 碱剂以 0.01 到 80 质量%、优选为 1 到 40 质量%的量混入。在粉末洗涤剂中使用的碱剂的例子包括通常称作重质苏打灰或轻质苏打灰 的例如碳酸钠的碱金属碳酸盐, 和 JIS No. 1、2 或 3 的无定形碱金属硅酸盐。这些无机碱剂对洗涤剂在干燥过程中形成颗粒核是有效的, 从而能够提供一种具有极佳流动性的相对硬性的洗涤剂。可以用例如倍半碳酸钠或碳酸氢钠来代替以上这些碱剂, 并且例如三聚磷酸盐这样的磷酸盐也可以用作碱剂。可以用于液体洗涤剂并作为表面活性剂的反离子的碱剂的例子包括氢氧化钠和单 -、二 -、或三乙醇胺, 以及如上所述的碱剂。

### [0109] (4) 抗 - 再沉积剂

[0110] 抗 - 再沉积剂以 0.001 到 10 质量%、优选为 1 到 5 质量%的量混入。在本发明的洗涤剂组合物中使用的抗 - 再沉积剂的例子包括聚乙二醇、羧酸聚合物、聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。其中, 羧酸聚合物具有金属离子捕集能力和把固体微粒污渍从衣物中分散到洗涤槽中的能力, 以及抗 - 再沉积的能力。羧酸聚合物是由丙烯酸、甲基丙烯酸、衣康酸等形成的均聚物或共聚物, 且优选通过如上所述的单体与马来酸的共聚反应形成的共聚物。共聚物的分子量优选为数千到 100,000。除以上提到的羧酸聚合物外, 优选使用例如聚缩水甘油酸这样的聚合物、例如羧甲基纤维素这样的纤维素衍生物、或例如聚天冬氨酸这样的氨基酸聚合物, 因为这些物质也具有金属离子捕集能力、分散力和抗 - 再沉积力。

### [0111] (5) 漂白剂

[0112] 漂白剂例如过氧化氢或过碳酸盐, 优选地以 1 到 10 质量%的量混入。在使用漂白剂的情况下, 例如四乙酰乙二胺 (TAED) 这样的漂白活化剂或在 JP-A-H06-316700 中描述的漂白活化剂以 0.01 到 10 质量%的量混入。

### [0113] (6) 荧光剂

[0114] 在本发明洗涤剂组合物中使用的荧光剂的例子包括联苯荧光剂 ( 例如, Tinopal <sup>®</sup> CBS-X) 和芪荧光剂 ( 例如, DM 型荧光染料)。该荧光剂优选地以 0.001 到 2 质量%的量混入。

### [0115] (7) 其他成分

[0116] 本发明的洗涤剂组合物还可以含有在衣物洗涤剂领域中已知的增洁剂、软化剂、还原剂 ( 例如, 亚硫酸盐)、消泡剂 ( 例如, 硅酮)、或香料 ; 或其他添加剂。

[0117] 本发明的洗涤剂组合物可以通过常用方法使用以上获得的本发明的碱性蛋白酶变体以及上述其他酶和 / 或上述已知的洗涤剂成分 ( 如果需要的话) 来制备。洗涤剂组合物的形式可以根据用途来合理地选择, 且洗涤剂可以采用例如液体、粉末、颗粒、糊状或固体的形式。

[0118] 如此制备的本发明的洗涤剂组合物可以用作, 例如衣物洗涤剂、漂白剂、用于清洁硬表面的洗涤剂、用于排水管的洗涤剂、假牙清洗剂、和用于对医疗器械进行消毒灭菌的洗涤剂。

### [0119] 实施例

[0120] 接下来将以实施例的方式更加详细地说明本发明。

[0121] 实施例 1

[0122] KP43 蛋白酶的制备

[0123] 接下来将以野生型 KP43 蛋白酶为例说明制备用于酶稳定性评价的蛋白酶的方法。

[0124] 用限制性内切酶 BamHI 和 XbaI (Roche, 罗氏) 同时消化质粒 pHA64 (日本专利第 349293 号, 在表达启动子的下游侧具有 BamHI 位点和 XbaI 位点), 且该产物用作基因插入和基因表达的载体。

[0125] 用限制性内切酶 BamHI 和 XbaI 同时消化由 SEQ ID NO:1 表示的且包括野生型 KP43 蛋白酶基因 (在基因上游侧的 5' 端具有 BamHI 位点, 在基因下游侧的 3' 端具有 XbaI 位点) 的 DNA 片段, 之后和上述制备的插入和表达载体混合。混合物用 Ligation High (Toyobo 的产品) 进行连接。连接产物通过乙醇沉淀来纯化, 并通过电穿孔使纯化产物转化至作为宿主的芽孢杆菌属 KSM-9865 (FERM BP-10139)。将产物涂布到含脱脂奶的碱性 LB 琼脂培养基 (含有 1% 细菌用胰蛋白胨 (bactotrypton)、0.5% 酵母提取物、1% 氯化钠、1% 脱脂奶、1.5% 琼脂粉、0.05% 碳酸钠和 15ppm 四环素) 中。几天后从出现在琼脂培养基上的菌落中, 通过证实脱脂奶透明溶蛋白圈 (skimmed milk dissolution spots) 的存在来筛选转染上蛋白酶基因的转化菌株。从转化菌株中提取质粒 DNA, 并证实由 SEQ ID NO:1 表示的蛋白酶基因的正确插入。如此得到的质粒称为质粒 pHA64TSA。

[0126] 将含有 pHA64TSA 的 KSM-9865 转化菌株接种到接种培养基 (6.0% (w/v) 多聚蛋白胨 S、0.1% 酵母提取物、1.0% 麦芽糖、0.02% 七水硫酸镁、0.1% 磷酸二氢钾、0.3% 无水碳酸钠、30ppm 四环素) (5mL) 中, 并在 30°C 下振荡培养 16 小时。接下来, 将接种培养基接种 (1% (v/v)) 到培养用培养基 (8% 多聚蛋白胨 S、0.3% 酵母提取物、10% 麦芽糖、0.04% 七水硫酸镁、0.2% 磷酸二氢钾、1.5% 无水碳酸钠、30ppm 四环素) (30mL) 中, 在 30°C 下振荡培养三天。将含有通过培养得到的 KP43 蛋白酶的培养液进行离心, 并评估回收的球粒在液体洗涤剂中的稳定性。

[0127] 实施例 2

[0128] KP43 蛋白酶变体的生产

[0129] 接下来以变体“G6A”为例说明生产 KP43 蛋白酶变体的方法。在 G6A 中, 将野生型成熟 KP43 蛋白酶区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 中的位点 6 甘氨酸 (G6) 突变为丙氨酸。

[0130] 用充分稀释的作为模板的质粒 pHA64TSA、与起始密码子上游区域互补的引物 KG24S2 (SEQ ID NO:3, 具有 BamHI 位点)、以及与 G6 密码子相邻的上游区域互补的引物 G6\_R (SEQ ID NO:4) 来进行 PCR, 从而扩增编码 KP43 蛋白酶 N 端部分的 DNA 序列。另外, 用作为模板的质粒 pHA64TSA、用于使丙氨酸的密码子取代 G6 密码子的引物 G6A\_F (SEQ ID NO:5, 其 5' 端部分与引物 G6\_R 互补)、和在终止密码子下游侧的引物 KG11S (SEQ ID NO:6, 具有 XbaI 位点) 进行 PCR, 从而扩增编码 KP43 蛋白酶 C 端部分的 DNA 序列。接下来, 将由此得到的编码 N 端和 C 端部分的 PCR 产物混合到一起, 并将该混合物用作模板。使用引物 KG24S2 和引物 KG11S 来进行 PCR, 从而得到含有 KP43 蛋白酶变体基因全长的 PCR 产物, 其中, G6 密码子已经被丙氨酸的密码子取代。将 PCR 产物用乙醇沉淀来纯化, 纯化产物同时用限制性

内切酶 BamHI 和 XbaI 来消化。将消化产物和实施例 1 中用于插入和表达的载体混合,并用 Ligation High(Toyobo 的产品)来连接该混合物。连接产物通过乙醇沉淀来纯化,并通过电穿孔法使纯化产物转化至作为宿主的芽孢杆菌 KSM-9865(FERM BP-10139)。将产物涂布到含脱脂奶的碱性 LB 琼脂培养基上。从数天后出现在琼脂培养基上的菌落中,通过证实脱脂奶透明溶蛋白圈的存在来筛选转染上蛋白酶基因的转化菌株。因此,生产了转化菌株,该转化菌株生产 G6 被突变为丙氨酸的 KP43 蛋白酶变体“G6A”。

[0131] 重复以上过程,除了用列在下列表 1 到 10 中“突变体反向引物 (Mutation primer • R)”这一栏的 SEQ ID NO. 表示的引物来代替引物 G6R,以及用由列在下面表 1 到 10 中“突变体正向引物 (Mutation primer • F)”这一栏的 SEQ ID NO. 表示的引物来代替引物 G6A\_F 外,从而生产转化菌株,其中,该转化菌株生产具有列在下面表 1 到 10 的“KP43 蛋白酶突变”这一栏的突变的 KP43 蛋白酶变体。每一个如此得到的转化菌株都通过在实施例 1 中描述的方法进行培养,由此回收含有所需蛋白酶变体的培养上清液。评估蛋白酶变体在液体洗涤剂中的稳定性。

[0132] 表 1

[0133]

KP43 蛋白酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
G6A	G6_R	SEQ ID NO:4	G6A_F	SEQ ID NO:5
G6C	G6_R	SEQ ID NO:4	G6C_F	SEQ ID NO:7
G6D	G6_R	SEQ ID NO:4	G6D_F	SEQ ID NO:8
G6E	G6_R	SEQ ID NO:4	G6E_F	SEQ ID NO:9
G6F	G6_R	SEQ ID NO:4	G6F_F	SEQ ID NO:10
G6H	G6_R	SEQ ID NO:4	G6H_F	SEQ ID NO:11
G6I	G6_R	SEQ ID NO:4	G6I_F	SEQ ID NO:12
G6K	G6_R	SEQ ID NO:4	G6K_F	SEQ ID NO:13
G6L	G6_R	SEQ ID NO:4	G6L_F	SEQ ID NO:14
G6M	G6_R	SEQ ID NO:4	G6M_F	SEQ ID NO:15
G6N	G6_R	SEQ ID NO:4	G6N_F	SEQ ID NO:16
G6P	G6_R	SEQ ID NO:4	G6P_F	SEQ ID NO:17
G6Q	G6_R	SEQ ID NO:4	G6Q_F	SEQ ID NO:18
G6R	G6_R	SEQ ID NO:4	G6R_F	SEQ ID NO:19
G6S	G6_R	SEQ ID NO:4	G6S_F	SEQ ID NO:20
G6T	G6_R	SEQ ID NO:4	G6T_F	SEQ ID NO:21
G6V	G6_R	SEQ ID NO:4	G6V_F	SEQ ID NO:22
G6W	G6_R	SEQ ID NO:4	G6W_F	SEQ ID NO:23
G6Y	G6_R	SEQ ID NO:4	G6Y_F	SEQ ID NO:24

[0134] 表 2

[0135]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
S15A	S15_R	SEQ ID NO:25	S15A_F	SEQ ID NO:26
S15C	S15_R	SEQ ID NO:25	S15C_F	SEQ ID NO:27
S15D	S15_R	SEQ ID NO:25	S15D_F	SEQ ID NO:28
S15E	S15_R	SEQ ID NO:25	S15E_F	SEQ ID NO:29
S15F	S15_R	SEQ ID NO:25	S15F_F	SEQ ID NO:30
S15G	S15_R	SEQ ID NO:25	S15G_F	SEQ ID NO:31
S15I	S15_R	SEQ ID NO:25	S15I_F	SEQ ID NO:32
S15K	S15_R	SEQ ID NO:25	S15K_F	SEQ ID NO:33
S15L	S15_R	SEQ ID NO:25	S15L_F	SEQ ID NO:34
S15M	S15_R	SEQ ID NO:25	S15M_F	SEQ ID NO:35
S15N	S15_R	SEQ ID NO:25	S15N_F	SEQ ID NO:36
S15P	S15_R	SEQ ID NO:25	S15P_F	SEQ ID NO:37
S15Q	S15_R	SEQ ID NO:25	S15Q_F	SEQ ID NO:38
S15R	S15_R	SEQ ID NO:25	S15R_F	SEQ ID NO:39
S15T	S15_R	SEQ ID NO:25	S15T_F	SEQ ID NO:40
S15V	S15_R	SEQ ID NO:25	S15V_F	SEQ ID NO:41
S15W	S15_R	SEQ ID NO:25	S15W_F	SEQ ID NO:42
S15Y	S15_R	SEQ ID NO:25	S15Y_F	SEQ ID NO:43

[0136] 表 3

[0137]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
S16A	S16_R	SEQ ID NO:44	S16A_F	SEQ ID NO:45
S16C	S16_R	SEQ ID NO:44	S16C_F	SEQ ID NO:46
S16D	S16_R	SEQ ID NO:44	S16D_F	SEQ ID NO:47
S16E	S16_R	SEQ ID NO:44	S16E_F	SEQ ID NO:48
S16F	S16_R	SEQ ID NO:44	S16F_F	SEQ ID NO:49
S16G	S16_R	SEQ ID NO:44	S16G_F	SEQ ID NO:50
S16H	S16_R	SEQ ID NO:44	S16H_F	SEQ ID NO:51
S16I	S16_R	SEQ ID NO:44	S16I_F	SEQ ID NO:52
S16K	S16_R	SEQ ID NO:44	S16K_F	SEQ ID NO:53
S16L	S16_R	SEQ ID NO:44	S16L_F	SEQ ID NO:54
S16M	S16_R	SEQ ID NO:44	S16M_F	SEQ ID NO:55
S16N	S16_R	SEQ ID NO:44	S16N_F	SEQ ID NO:56
S16P	S16_R	SEQ ID NO:44	S16P_F	SEQ ID NO:57
S16R	S16_R	SEQ ID NO:44	S16R_F	SEQ ID NO:58
S16V	S16_R	SEQ ID NO:44	S16V_F	SEQ ID NO:59
S16W	S16_R	SEQ ID NO:44	S16W_F	SEQ ID NO:60
S16Y	S16_R	SEQ ID NO:44	S16Y_F	SEQ ID NO:61

[0138] 表 4

[0139]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
T65A	T65_R	SEQ ID NO:62	T65A_F	SEQ ID NO:63
T65C	T65_R	SEQ ID NO:62	T65C_F	SEQ ID NO:64
T65D	T65_R	SEQ ID NO:62	T65D_F	SEQ ID NO:65
T65E	T65_R	SEQ ID NO:62	T65E_F	SEQ ID NO:66
T65F	T65_R	SEQ ID NO:62	T65F_F	SEQ ID NO:67
T65G	T65_R	SEQ ID NO:62	T65G_F	SEQ ID NO:68
T65H	T65_R	SEQ ID NO:62	T65H_F	SEQ ID NO:69
T65I	T65_R	SEQ ID NO:62	T65I_F	SEQ ID NO:70
T65K	T65_R	SEQ ID NO:62	T65K_F	SEQ ID NO:71
T65L	T65_R	SEQ ID NO:62	T65L_F	SEQ ID NO:72
T65M	T65_R	SEQ ID NO:62	T65M_F	SEQ ID NO:73
T65N	T65_R	SEQ ID NO:62	T65N_F	SEQ ID NO:74
T65Q	T65_R	SEQ ID NO:62	T65Q_F	SEQ ID NO:75
T65R	T65_R	SEQ ID NO:62	T65R_F	SEQ ID NO:76
T65S	T65_R	SEQ ID NO:62	T65S_F	SEQ ID NO:77
T65V	T65_R	SEQ ID NO:62	T65V_F	SEQ ID NO:78
T65W	T65_R	SEQ ID NO:62	T65W_F	SEQ ID NO:79
T65Y	T65_R	SEQ ID NO:62	T65Y_F	SEQ ID NO:80

[0140] 表 5

[0141]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
N66A	N66_R	SEQ ID NO:81	N66A_F	SEQ ID NO:82
N66C	N66_R	SEQ ID NO:81	N66C_F	SEQ ID NO:83
N66D	N66_R	SEQ ID NO:81	N66D_F	SEQ ID NO:84
N66E	N66_R	SEQ ID NO:81	N66E_F	SEQ ID NO:85
N66F	N66_R	SEQ ID NO:81	N66F_F	SEQ ID NO:86
N66G	N66_R	SEQ ID NO:81	N66G_F	SEQ ID NO:87
N66H	N66_R	SEQ ID NO:81	N66H_F	SEQ ID NO:88
N66I	N66_R	SEQ ID NO:81	N66I_F	SEQ ID NO:89
N66K	N66_R	SEQ ID NO:81	N66K_F	SEQ ID NO:90
N66L	N66_R	SEQ ID NO:81	N66L_F	SEQ ID NO:91
N66M	N66_R	SEQ ID NO:81	N66M_F	SEQ ID NO:92
N66P	N66_R	SEQ ID NO:81	N66P_F	SEQ ID NO:93
N66Q	N66_R	SEQ ID NO:81	N66Q_F	SEQ ID NO:94
N66R	N66_R	SEQ ID NO:81	N66R_F	SEQ ID NO:95
N66S	N66_R	SEQ ID NO:81	N66S_F	SEQ ID NO:96
N66T	N66_R	SEQ ID NO:81	N66T_F	SEQ ID NO:97
N66V	N66_R	SEQ ID NO:81	N66V_F	SEQ ID NO:98
N66W	N66_R	SEQ ID NO:81	N66W_F	SEQ ID NO:99
N66Y	N66_R	SEQ ID NO:81	N66Y_F	SEQ ID NO:100

[0142] 表 6

[0143]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
T82A	T82_R	SEQ ID NO:101	T82A_F	SEQ ID NO:102
T82C	T82_R	SEQ ID NO:101	T82C_F	SEQ ID NO:103
T82D	T82_R	SEQ ID NO:101	T82D_F	SEQ ID NO:104
T82E	T82_R	SEQ ID NO:101	T82E_F	SEQ ID NO:105
T82F	T82_R	SEQ ID NO:101	T82F_F	SEQ ID NO:106
T82G	T82_R	SEQ ID NO:101	T82G_F	SEQ ID NO:107
T82H	T82_R	SEQ ID NO:101	T82H_F	SEQ ID NO:108
T82I	T82_R	SEQ ID NO:101	T82I_F	SEQ ID NO:109
T82K	T82_R	SEQ ID NO:101	T82K_F	SEQ ID NO:110
T82L	T82_R	SEQ ID NO:101	T82L_F	SEQ ID NO:111
T82M	T82_R	SEQ ID NO:101	T82M_F	SEQ ID NO:112
T82N	T82_R	SEQ ID NO:101	T82N_F	SEQ ID NO:113
T82P	T82_R	SEQ ID NO:101	T82P_F	SEQ ID NO:114
T82Q	T82_R	SEQ ID NO:101	T82Q_F	SEQ ID NO:115
T82R	T82_R	SEQ ID NO:101	T82R_F	SEQ ID NO:116
T82S	T82_R	SEQ ID NO:101	T82S_F	SEQ ID NO:117
T82V	T82_R	SEQ ID NO:101	T82V_F	SEQ ID NO:118
T82W	T82_R	SEQ ID NO:101	T82W_F	SEQ ID NO:119
T82Y	T82_R	SEQ ID NO:101	T82Y_F	SEQ ID NO:120

[0144] 表 7

[0145]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
N83A	N83_R	SEQ ID NO:121	N83A_F	SEQ ID NO:122
N83C	N83_R	SEQ ID NO:121	N83C_F	SEQ ID NO:123
N83D	N83_R	SEQ ID NO:121	N83D_F	SEQ ID NO:124
N83E	N83_R	SEQ ID NO:121	N83E_F	SEQ ID NO:125
N83F	N83_R	SEQ ID NO:121	N83F_F	SEQ ID NO:126
N83G	N83_R	SEQ ID NO:121	N83G_F	SEQ ID NO:127
N83H	N83_R	SEQ ID NO:121	N83H_F	SEQ ID NO:128
N83I	N83_R	SEQ ID NO:121	N83I_F	SEQ ID NO:129
N83K	N83_R	SEQ ID NO:121	N83K_F	SEQ ID NO:130
N83L	N83_R	SEQ ID NO:121	N83L_F	SEQ ID NO:131
N83M	N83_R	SEQ ID NO:121	N83M_F	SEQ ID NO:132
N83P	N83_R	SEQ ID NO:121	N83P_F	SEQ ID NO:133
N83Q	N83_R	SEQ ID NO:121	N83Q_F	SEQ ID NO:134
N83R	N83_R	SEQ ID NO:121	N83R_F	SEQ ID NO:135
N83S	N83_R	SEQ ID NO:121	N83S_F	SEQ ID NO:136
N83T	N83_R	SEQ ID NO:121	N83T_F	SEQ ID NO:137
N83V	N83_R	SEQ ID NO:121	N83V_F	SEQ ID NO:138
N83W	N83_R	SEQ ID NO:121	N83W_F	SEQ ID NO:139
N83Y	N83_R	SEQ ID NO:121	N83Y_F	SEQ ID NO:140

[0146] 表 8

[0147]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
Q204A	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204A_F	SEQ ID NO:142
Q204C	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204C_F	SEQ ID NO:143
Q204D	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204D_F	SEQ ID NO:144
Q204E	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204E_F	SEQ ID NO:145
Q204F	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204F_F	SEQ ID NO:146
Q204G	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204G_F	SEQ ID NO:147
Q204H	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204H_F	SEQ ID NO:148
Q204I	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204I_F	SEQ ID NO:149
Q204K	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204K_F	SEQ ID NO:150
Q204L	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204L_F	SEQ ID NO:151
Q204M	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204M_F	SEQ ID NO:152
Q204N	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204N_F	SEQ ID NO:153
Q204P	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204P_F	SEQ ID NO:154
Q204R	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204R_F	SEQ ID NO:155
Q204S	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204S_F	SEQ ID NO:156
Q204T	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204T_F	SEQ ID NO:157
Q204V	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204V_F	SEQ ID NO:158
Q204W	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204W_F	SEQ ID NO:159
Q204Y	Q204_R	SEQ ID NO:141	Q204Y_F	SEQ ID NO:160

[0148] 表 9

[0149]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
A319C	A319_R	SEQ ID NO:161	A319C_F	SEQ ID NO:162
A319D	A319_R	SEQ ID NO:161	A319D_F	SEQ ID NO:163
A319E	A319_R	SEQ ID NO:161	A319E_F	SEQ ID NO:164
A319F	A319_R	SEQ ID NO:161	A319F_F	SEQ ID NO:165
A319G	A319_R	SEQ ID NO:161	A319G_F	SEQ ID NO:166
A319H	A319_R	SEQ ID NO:161	A319H_F	SEQ ID NO:167
A319I	A319_R	SEQ ID NO:161	A319I_F	SEQ ID NO:168
A319K	A319_R	SEQ ID NO:161	A319K_F	SEQ ID NO:169
A319L	A319_R	SEQ ID NO:161	A319L_F	SEQ ID NO:170
A319M	A319_R	SEQ ID NO:161	A319M_F	SEQ ID NO:171
A319N	A319_R	SEQ ID NO:161	A319N_F	SEQ ID NO:172
A319P	A319_R	SEQ ID NO:161	A319P_F	SEQ ID NO:173
A319Q	A319_R	SEQ ID NO:161	A319Q_F	SEQ ID NO:174
A319R	A319_R	SEQ ID NO:161	A319R_F	SEQ ID NO:175
A319S	A319_R	SEQ ID NO:161	A319S_F	SEQ ID NO:176
A319T	A319_R	SEQ ID NO:161	A319T_F	SEQ ID NO:177
A319V	A319_R	SEQ ID NO:161	A319V_F	SEQ ID NO:178
A319W	A319_R	SEQ ID NO:161	A319W_F	SEQ ID NO:179
A319Y	A319_R	SEQ ID NO:161	A319Y_F	SEQ ID NO:180

[0150] 表 10

[0151]

KP43 蛋白 酶突变	突变体反向引物		突变体正向引物	
	引物	SEQ ID NO	引物	SEQ ID NO
F337A	F337_R	SEQ ID NO:181	F337A_F	SEQ ID NO:182
F337C	F337_R	SEQ ID NO:181	F337C_F	SEQ ID NO:183
F337D	F337_R	SEQ ID NO:181	F337D_F	SEQ ID NO:184
F337E	F337_R	SEQ ID NO:181	F337E_F	SEQ ID NO:185
F337G	F337_R	SEQ ID NO:181	F337G_F	SEQ ID NO:186
F337H	F337_R	SEQ ID NO:181	F337H_F	SEQ ID NO:187
F337I	F337_R	SEQ ID NO:181	F337I_F	SEQ ID NO:188
F337K	F337_R	SEQ ID NO:181	F337K_F	SEQ ID NO:189
F337L	F337_R	SEQ ID NO:181	F337L_F	SEQ ID NO:190
F337M	F337_R	SEQ ID NO:181	F337M_F	SEQ ID NO:191
F337N	F337_R	SEQ ID NO:181	F337N_F	SEQ ID NO:192
F337P	F337_R	SEQ ID NO:181	F337P_F	SEQ ID NO:193
F337Q	F337_R	SEQ ID NO:181	F337Q_F	SEQ ID NO:194
F337R	F337_R	SEQ ID NO:181	F337R_F	SEQ ID NO:195
F337S	F337_R	SEQ ID NO:181	F337S_F	SEQ ID NO:196
F337T	F337_R	SEQ ID NO:181	F337T_F	SEQ ID NO:197
F337V	F337_R	SEQ ID NO:181	F337V_F	SEQ ID NO:198
F337W	F337_R	SEQ ID NO:181	F337W_F	SEQ ID NO:199
F337Y	F337_R	SEQ ID NO:181	F337Y_F	SEQ ID NO:200

## [0152] 实施例 3

## [0153] 确定蛋白酶活性的方法

[0154] 蛋白酶活性用以下方式确定。具体地,将 40mM 的 Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA·H<sub>2</sub>O (AAPL) (Peptide Laboratory 的产品) 溶解于二甲亚砜的溶液 (3 体积份)、200mM 的硼酸盐缓冲液 (pH:10.5) (10 体积份)、和离子交换水 (7 体积份) 进行混合,从而制备出底物溶液。将该底物溶液分装在 96 孔检测板上 (50 μL/孔)。将每一含蛋白酶的溶液都用离子交换水稀释到合适的浓度,并将稀释的蛋白酶加到检测板上 (50 μL/孔),从而开始反应。反应一旦开始,就将检测板放到保持在 30°C 的箱体 (VersaMax™, Molecular Device 的产品) 内。在动力模式 (Kinetic mode) 下对 420nm 的吸收值的变化进行 10 分钟监控。用分析软件 (Softmax® Pro, Molecular Device 的产品) 来进行测定,并将吸收变化率 (mOD/min) 的输出用作蛋白酶的临时活性值 (provisional activity value)。

## [0155] 实施例 4

## [0156] 变体稳定性的评估

[0157] 将组合物 A (8% Softanol® ,70H, 14% Emulgen®, 120, 8% 用于直链烷基苯磺酸钠液体 (LAS-S) 的酸前体, 4% Lunac® L-55, 2% 乙醇, 4% 丁氧基双甘醇, 3.5% 单乙醇胺, 0.1% 亚硫酸钠, 0.55% 柠檬酸, pH:9.0) 加入到 96 孔板 (90 μL/孔) 上。然后,将含有野生型 KP43 蛋白酶或每一 KP43 蛋白酶变体的培养上清液加到 96 孔板 (10 μL/孔), 之后进行充分的振荡。紧接在振荡之后,即刻收集液体混合物的一部分 (10 μL) 并用离子交换水 (250 μL) 稀释,之后进行充分振荡。稀释要按 26 倍的稀释因子来进行。将由此得到的稀释液体加到已加入底物溶液 (50 μL/孔) 的 96 孔检测板 (50 μL/孔) 上。将该板置于酶标仪 (VersaMax™, Molecular Device 的产品) 内,确定样品的蛋白酶活性。确定初始活性值以用于对样品保藏稳定性的评估。将已加入每一待评估液体 (组合物 A 和培养上清液) 的

96 孔板保存在 40℃ 的密封容器中。保藏 72 小时后, 将板从容器中移出, 通过用来确定初始活性的相同程序来确定残余活性。在将野生型 KP43 蛋白酶的残余活性设为 100% 的基础上, 计算每一 KP43 蛋白酶变体的残余活性 (相对值)。

[0158] 图 1 到 10 显示野生型蛋白酶和 KP43 蛋白酶变体的稳定性。

[0001]

## 序列表

<110> 花王株式会社  
 <120> 碱性蛋白酶变体  
 <130> KS1081  
 <150> JP2009-110792  
 <151> 2009-04-30  
 <150> JP2009-110793  
 <151> 2009-04-30  
 <150> JP2010-093307  
 <151> 2010-04-14  
 <150> JP2010-093339  
 <151> 2010-04-14  
 <160> 200  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 2040  
 <212> DNA  
 <213> 芽孢杆菌属 KSM-KP43  
 <400> 1  
 ggatccgtga ggagggaacc gaatgagaaa gaagaaaaag gtgtttttat ctgtttttat 60  
 agctgcagcg attttgtcga ctgttgcggt aagtaatcca tctgcaggtg gtgcaaggaa 120  
 ttttgatctg gatttcaaag gaattcagac aacaactgat gctaaaggtt tctccaagca 180  
 ggggcagact ggtgctgctg cttttctggt ggaatctgaa aatgtgaaac tcccaaaagg 240  
 tttgcagaag aagcttgaaa cagtcccggc aaataataaa ctccatatta tccaattcaa 300  
 tggaccaatt ttagaagaaa caaacagca gctggaaaa acaggggcaa agattctcga 360  
 ctacatacct gattatgctt acattgtcga gtatgagggc gatgttaagt cagcaacaag 420

[0002]

caccattgag cacgtggaat ccgtggagcc ttatttgccg atatacagaa tagatcccca	480
gcttttcaca aaaggggcat cagagcttgt aaaagcagt ggccttgata caaagcagaa	540
aaataaagag gtgcaattaa gaggcacga acaaatcgca caattcgca taagcaatga	600
tgtgctatat attacggcaa agcctgagta taaggtgatg aatgatgttg cgcgtggaat	660
tgtcaaagcg gatgtggctc agagcagcta cgggttgat ggacaaggac agatcgtagc	720
ggttgccgat acagggcttg atacaggtcg caatgacagt tcgatgcatg aagccttccg	780
cgggaaaatt actgcattat atgcattggg acggacgaat aatgccaatg atacgaatgg	840
tcatggtacg catgtggctg gctccgtatt aggaaacggc tccactaata aaggaatggc	900
gcctcaggcg aatctagtct tccaatctat catggatagc gttgggggac ttggaggact	960
accttcgaat ctgcaaacct tattcagcca agcatacagt gctggtgcca gaattcatac	1020
aaactcctgg ggagcagcag tgaatggggc ttacacaaca gattccagaa atgtggatga	1080
ctatgtgcgc aaaaatgata tgacgatcct tttcgtgcc gggaatgaag gaccgaacgg	1140
cggaaccatc agtgcaccag gcacagctaa aaatgcaata acagtcggag ctacggaaaa	1200
cctccgcca agctttgggt cttatgcgga caatatcaac catgtggcac agttctctc	1260
acgtggaccg acaaaggatg gacggatcaa accggatgtc atggcaccgg gaacgttcat	1320
actatcagca agatcttctc ttgcaccgga ttctctctc tgggcaacc atgacagtaa	1380
atatgcatac atgggtggaa cgtccatggc tacaccgatc gttgctggaa acgtggcaca	1440
gcttcgtgag cattttgtga aaaacagagg catcacacca aagccttctc tattaanaagc	1500
ggcactgatt gccggtgcag ctgacatcgg ccttggctac ccgaacggta accaaggatg	1560
gggacgagtg acattggata aatccctgaa cgttgctat gtgaacgagt ccagtctctc	1620
atccaccagc caaaaagcga cgtactcgtt tactgtact gccggcaagc ctttgaanaat	1680
ctccctggta tggctgatg ccctgcgag cacaactgct tccgtaacgc ttgtcaatga	1740

[0003]

tctggacctt gtcattaccg ctccaaatgg cacacagtat gtaggaaatg actttacttc 1800  
gccatacaat gataactggg atggccgcaa taacgtagaa aatgtattta ttaatgcacc 1860  
acaaagcggg acgtatacaa ttgaggtaca ggcttataac gtaccggttg gaccacagac 1920  
cttctcgttg gcaattgtga attaatagaa taacagacaa aaaacgctgg cgtatgccag 1980  
ggtttttttg tttgaaatca agaaaaaagg gtagaggaat taatatggta atcgtctaga 2040

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> 芽孢杆菌属 KSM-KP43

<400> 2

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser  
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly  
20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly  
35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp  
50 55 60

Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly  
65 70 75 80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser  
85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln  
100 105 110

[0004]

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn  
 115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn  
 130 135 140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala  
 145 150 155 160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala  
 165 170 175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe  
 180 185 190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg  
 195 200 205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly  
 210 215 220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe  
 225 230 235 240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met  
 245 250 255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe  
 260 265 270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala  
 275 280 285

[0005]

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn  
 290 295 300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr  
 305 310 315 320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser  
 325 330 335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser  
 340 345 350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu  
 355 360 365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp  
 370 375 380

Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu  
 385 390 395 400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val  
 405 410 415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile  
 420 425 430

Val Asn

<210> 3

<211> 26

[0006]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 KG24S2	
<400> 3	
ataaggatcc gtgaggaggg aaccga	26
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6_R	
<400> 4	
acgcgcaaca tcattcatca c	21
<210> 5	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6A_F	
<400> 5	
gtgatgaatg atggtgcgcg tgcaattgtc aaagcggatg tggct	45
<210> 6	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 KG11S	
<400> 6	
ccctctaga cgattacat attaattcct ctacce	36

[0007]

<210> 7  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6C\_F

<400> 7  
gtgatgaatg atgttgcgcg ttgcattgtc aaagcggatg tggct

45

<210> 8  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6D\_F

<400> 8  
gtgatgaatg atgttgcgcg tgatattgtc aaagcggatg tggct

45

<210> 9  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6E\_F

<400> 9  
gtgatgaatg atgttgcgcg tgaaattgtc aaagcggatg tggct

45

<210> 10  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0008]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6F\_F
- <400> 10  
 gtgatgaatg atggtgcgcg tttcattgtc aaagcggatg tggct 45
- <210> 11  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6H\_F
- <400> 11  
 gtgatgaatg atggtgcgcg tcatattgtc aaagcggatg tggct 45
- <210> 12  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6I\_F
- <400> 12  
 gtgatgaatg atggtgcgcg tattattgtc aaagcggatg tggct 45
- <210> 13  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6K\_F
- <400> 13  
 gtgatgaatg atggtgcgcg taaaattgtc aaagcggatg tggct 45
- <210> 14  
 <211> 45

[0009]

- <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6L\_F
- <400> 14  
 gtgatgaatg atggtgcgcg tcttattgtc aaagcggatg tggct 45
- <210> 15  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6M\_F
- <400> 15  
 gtgatgaatg atggtgcgcg tatgattgtc aaagcggatg tggct 45
- <210> 16  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6N\_F
- <400> 16  
 gtgatgaatg atggtgcgcg taatattgtc aaagcggatg tggct 45
- <210> 17  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6P\_F
- <400> 17  
 gtgatgaatg atggtgcgcg tccaattgtc aaagcggatg tggct 45

[0010]

<210> 18  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6Q\_F

<400> 18  
gtgatgaatg atggttgcgcg tcagattgtc aaagcggatg tggct

45

<210> 19  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6R\_F

<400> 19  
gtgatgaatg atggttgcgcg tagaattgtc aaagcggatg tggct

45

<210> 20  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6S\_F

<400> 20  
gtgatgaatg atggttgcgcg ttccattgtc aaagcggatg tggct

45

<210> 21  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0011]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6T\_F
- <400> 21  
gtgatgaatg atgttgcgcg tacaattgtc aaagcggatg tgget 45
- <210> 22  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6V\_F
- <400> 22  
gtgatgaatg atgttgcgcg tgtgattgtc aaagcggatg tgget 45
- <210> 23  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6W\_F
- <400> 23  
gtgatgaatg atgttgcgcg ttggattgtc aaagcggatg tgget 45
- <210> 24  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 G6Y\_F
- <400> 24  
gtgatgaatg atgttgcgcg ttatattgtc aaagcggatg tgget 45
- <210> 25  
<211> 21

[0012]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15_R	
<400> 25	
ctgagccaca tccgctttga c	21
<210> 26	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15A_F	
<400> 26	
gtcaaagcgg atgtggetca ggcaagctac gggttgtatg gacaa	45
<210> 27	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15C_F	
<400> 27	
gtcaaagcgg atgtggetca gtcagctac gggttgtatg gacaa	45
<210> 28	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15D_F	
<400> 28	
gtcaaagcgg atgtggetca ggatagctac gggttgtatg gacaa	45

[0013]

<210> 29  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15E\_F

<400> 29  
gtcaaagcgg atgtggctca ggaaagctac gggttgtatg gacaa

45

<210> 30  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15F\_F

<400> 30  
gtcaaagcgg atgtggctca gttcagctac gggttgtatg gacaa

45

<210> 31  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15G\_F

<400> 31  
gtcaaagcgg atgtggctca gggaagctac gggttgtatg gacaa

45

<210> 32  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0014]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15I\_F
- <400> 32  
gtcaaagcgg atgtggetca gattagctac gggttgtatg gacaa 45
- <210> 33  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15K\_F
- <400> 33  
gtcaaagcgg atgtggetca gaaaagctac gggttgtatg gacaa 45
- <210> 34  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15L\_F
- <400> 34  
gtcaaagcgg atgtggetca gcttagctac gggttgtatg gacaa 45
- <210> 35  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15M\_F
- <400> 35  
gtcaaagcgg atgtggetca gatgagctac gggttgtatg gacaa 45
- <210> 36  
<211> 45

[0015]

- <212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15N\_F
- <400> 36  
gtcaaagcgg atgtggctca gaatagctac gggttgtatg gacaa 45
- <210> 37  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15P\_F
- <400> 37  
gtcaaagcgg atgtggctca gccaaagctac gggttgtatg gacaa 45
- <210> 38  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15Q\_F
- <400> 38  
gtcaaagcgg atgtggctca gcagagctac gggttgtatg gacaa 45
- <210> 39  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15R\_F
- <400> 39  
gtcaaagcgg atgtggctca gagaagctac gggttgtatg gacaa 45

[0016]

<210> 40  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15T\_F

<400> 40

gtcaaagcgg atgtggctca gacaagctac gggttgtatg gacaa

45

<210> 41  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15V\_F

<400> 41

gtcaaagcgg atgtggctca ggtgagctac gggttgtatg gacaa

45

<210> 42  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15W\_F

<400> 42

gtcaaagcgg atgtggctca gtggagctac gggttgtatg gacaa

45

<210> 43  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

[0017]

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S15Y_F	
<400> 43	
gtcaaagcgg atgtggctca gtatagctac gggttgtatg gacaa	45
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16_R	
<400> 44	
gctctgagcc acatccgctt t	21
<210> 45	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16A_F	
<400> 45	
aaagcggatg tggctcagag cgcatacggg ttgtatggac aagga	45
<210> 46	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16C_F	
<400> 46	
aaagcggatg tggctcagag ctgctacggg ttgtatggac aagga	45
<210> 47	
<211> 45	

[0018]

- <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16D\_F
- <400> 47  
 aaagcggatg tggctcagag cgattacggg ttgtatggac aagga 45
- <210> 48  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16E\_F
- <400> 48  
 aaagcggatg tggctcagag cgaatacggg ttgtatggac aagga 45
- <210> 49  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16F\_F
- <400> 49  
 aaagcggatg tggctcagag cttctacggg ttgtatggac aagga 45
- <210> 50  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16G\_F
- <400> 50  
 aaagcggatg tggctcagag cggatacggg ttgtatggac aagga 45

[0019]

<210> 51  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16H\_F

<400> 51

aaagcggatg tggctcagag ccattacggg ttgtatggac aagga

45

<210> 52  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16I\_F

<400> 52

aaagcggatg tggctcagag catttacggg ttgtatggac aagga

45

<210> 53  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16K\_F

<400> 53

aaagcggatg tggctcagag caaatcggg ttgtatggac aagga

45

<210> 54  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0020]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16L\_F
- <400> 54  
aaagcggatg tggctcagag cctttacggg ttgtatggac aagga 45
- <210> 55  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16M\_F
- <400> 55  
aaagcggatg tggctcagag catgtacggg ttgtatggac aagga 45
- <210> 56  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16N\_F
- <400> 56  
aaagcggatg tggctcagag caattacggg ttgtatggac aagga 45
- <210> 57  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16P\_F
- <400> 57  
aaagcggatg tggctcagag cccatacggg ttgtatggac aagga 45
- <210> 58  
<211> 45

[0021]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16R_F	
<400> 58	
aaagcggatg tggctcagag cagatacggg ttgtatggac aagga	45
<210> 59	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16V_F	
<400> 59	
aaagcggatg tggctcagag cgtgtacggg ttgtatggac aagga	45
<210> 60	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16W_F	
<400> 60	
aaagcggatg tggctcagag ctggtacggg ttgtatggac aagga	45
<210> 61	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 S16Y_F	
<400> 61	
aaagcggatg tggctcagag ctattacggg ttgtatggac aagga	45

[0022]

<210> 62  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65\_R

<400> 62  
 atcattggca ttattcgtcc g 21

<210> 63  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65A\_F

<400> 63  
 cggacgaata atgccaatga tgcaaatggt catggtacgc atgtg 45

<210> 64  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65C\_F

<400> 64  
 cggacgaata atgccaatga ttgcaatggt catggtacgc atgtg 45

<210> 65  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

[0023]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65D\_F
- <400> 65  
cggacgaata atgccaatga tgataatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 66  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65E\_F
- <400> 66  
cggacgaata atgccaatga tgaaaatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 67  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65F\_F
- <400> 67  
cggacgaata atgccaatga tttcaatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 68  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65G\_F
- <400> 68  
cggacgaata atgccaatga tggaaatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 69  
<211> 45

[0024]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65H_F	
<400> 69	
cggacgaata atgccaatga tcataatggt catggtacgc atgtg	45
<210> 70	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65I_F	
<400> 70	
cggacgaata atgccaatga tattaatggt catggtacgc atgtg	45
<210> 71	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65K_F	
<400> 71	
cggacgaata atgccaatga taaaaatggt catggtacgc atgtg	45
<210> 72	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65L_F	
<400> 72	
cggacgaata atgccaatga tcttaatggt catggtacgc atgtg	45

[0025]

<210> 73  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65M\_F

<400> 73

cggacgaata atgccaatga tatgaatggt catggtacgc atgtg

45

<210> 74  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65N\_F

<400> 74

cggacgaata atgccaatga taataatggt catggtacgc atgtg

45

<210> 75  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65Q\_F

<400> 75

cggacgaata atgccaatga tcagaatggt catggtacgc atgtg

45

<210> 76  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0026]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65R\_F
- <400> 76  
cggacgaata atgccaatga tagaaatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 77  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65S\_F
- <400> 77  
cggacgaata atgccaatga ttccaatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 78  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65V\_F
- <400> 78  
cggacgaata atgccaatga tgtgaatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 79  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65W\_F
- <400> 79  
cggacgaata atgccaatga ttggaatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 80  
<211> 45

[0027]

- <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T65Y\_F
- <400> 80  
 cggacgaata atgccaatga ttataatggt catggtacgc atgtg 45
- <210> 81  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66\_R
- <400> 81  
 cgtatcattg gcattattcg t 21
- <210> 82  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66A\_F
- <400> 82  
 acgaataatg ccaatgatac ggcaggatcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 83  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66C\_F
- <400> 83  
 acgaataatg ccaatgatac gtgcggatcat ggtacgcatg tgget 45

[0028]

<210> 84  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66D\_F

<400> 84

acgaataatg ccaatgatac ggatggcat ggtacgcatg tggct

45

<210> 85  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66E\_F

<400> 85

acgaataatg ccaatgatac ggaaggcat ggtacgcatg tggct

45

<210> 86  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66F\_F

<400> 86

acgaataatg ccaatgatac gttcggcat ggtacgcatg tggct

45

<210> 87  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0029]

- <223> 寡核苷酸，作为 PCR 引物 N66G\_F
- <400> 87  
 acgaataatg ccaatgatac gggaggtcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 88  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸，作为 PCR 引物 N66H\_F
- <400> 88  
 acgaataatg ccaatgatac gcatggtcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 89  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸，作为 PCR 引物 N66I\_F
- <400> 89  
 acgaataatg ccaatgatac gattggtcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 90  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸，作为 PCR 引物 N66K\_F
- <400> 90  
 acgaataatg ccaatgatac gaaaggtcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 91  
 <211> 45

[0030]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66L_F	
<400> 91	
acgaataatg ccaatgatac gcttggatcat ggtacgcatg tggct	45
<210> 92	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66M_F	
<400> 92	
acgaataatg ccaatgatac gatgggtcat ggtacgcatg tggct	45
<210> 93	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66P_F	
<400> 93	
acgaataatg ccaatgatac gccaggtcat ggtacgcatg tggct	45
<210> 94	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66Q_F	
<400> 94	
acgaataatg ccaatgatac gcagggtcat ggtacgcatg tggct	45

[0031]

<210> 95  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66R\_F

<400> 95

acgaataatg ccaatgatac gagaggtcat ggtacgcatg tggct

45

<210> 96  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66S\_F

<400> 96

acgaataatg ccaatgatac gtccggtcat ggtacgcatg tggct

45

<210> 97  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66T\_F

<400> 97

acgaataatg ccaatgatac gacaggtcat ggtacgcatg tggct

45

<210> 98  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0032]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66V\_F
- <400> 98  
 acgaataatg ccaatgatac ggtgggtcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 99  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66W\_F
- <400> 99  
 acgaataatg ccaatgatac gtggggtcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 100  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N66Y\_F
- <400> 100  
 acgaataatg ccaatgatac gtatggtcat ggtacgcatg tgget 45
- <210> 101  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82\_R
- <400> 101  
 ggagccgttt cctaatacgg a 21
- <210> 102  
 <211> 45

[0033]

- <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82A\_F
- <400> 102  
 tccgtattag gaaacggctc cgcaaataaa ggaatggcgc ctgag 45
- <210> 103  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82C\_F
- <400> 103  
 tccgtattag gaaacggctc ctgcaataaa ggaatggcgc ctgag 45
- <210> 104  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82D\_F
- <400> 104  
 tccgtattag gaaacggctc cgataataaa ggaatggcgc ctgag 45
- <210> 105  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82E\_F
- <400> 105  
 tccgtattag gaaacggctc cgaaaataaa ggaatggcgc ctgag 45

[0034]

<210> 106  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82F\_F

<400> 106

tccgtattag gaaacggctc cttcaataaa ggaatggcgc ctacg

45

<210> 107  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82G\_F

<400> 107

tccgtattag gaaacggctc cggaaataaa ggaatggcgc ctacg

45

<210> 108  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82H\_F

<400> 108

tccgtattag gaaacggctc ccataataaa ggaatggcgc ctacg

45

<210> 109  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0035]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82I\_F
- <400> 109  
tccgtattag gaaacggctc cattaataaa ggaatggcgc ctacg 45
- <210> 110  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82K\_F
- <400> 110  
tccgtattag gaaacggctc caaaaataaa ggaatggcgc ctacg 45
- <210> 111  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82L\_F
- <400> 111  
tccgtattag gaaacggctc cettaataaa ggaatggcgc ctacg 45
- <210> 112  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>
- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82M\_F
- <400> 112  
tccgtattag gaaacggctc catgaataaa ggaatggcgc ctacg 45
- <210> 113  
<211> 45

[0036]

- <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82N\_F
- <400> 113  
 tccgtattag gaaacggctc caataataaa ggaatggcgc ctacg 45
- <210> 114  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82P\_F
- <400> 114  
 tccgtattag gaaacggctc cccaataaaa ggaatggcgc ctacg 45
- <210> 115  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82Q\_F
- <400> 115  
 tccgtattag gaaacggctc ccagaataaa ggaatggcgc ctacg 45
- <210> 116  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82R\_F
- <400> 116  
 tccgtattag gaaacggctc cagaaataaa ggaatggcgc ctacg 45

[0037]

<210> 117  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82S\_F

<400> 117

tccgtattag gaaacggctc ctccaataaa ggaatggcgc ctcag

45

<210> 118  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82V\_F

<400> 118

tccgtattag gaaacggctc cgtgaataaa ggaatggcgc ctcag

45

<210> 119  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82W\_F

<400> 119

tccgtattag gaaacggctc ctggaataaa ggaatggcgc ctcag

45

<210> 120  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

[0038]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 T82Y\_F
- <400> 120  
tccgtattag gaaacggctc ctataataaa ggaatggcgc ctcag 45
- <210> 121  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83\_R
- <400> 121  
agtggagccg tttcctaata c 21
- <210> 122  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83A\_F
- <400> 122  
gtattaggaa acggetccac tgcaaaagga atggcgctc aggcg 45
- <210> 123  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83C\_F
- <400> 123  
gtattaggaa acggetccac ttgcaaagga atggcgctc aggcg 45
- <210> 124  
<211> 45

[0039]

- <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83D\_F
- <400> 124  
 gtattaggaa acggctccac tgataaagga atggcgcctc aggcg 45
- <210> 125  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83E\_F
- <400> 125  
 gtattaggaa acggctccac tgaaaaagga atggcgcctc aggcg 45
- <210> 126  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83F\_F
- <400> 126  
 gtattaggaa acggctccac tttcaaagga atggcgcctc aggcg 45
- <210> 127  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工
- <220>  
 <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83G\_F
- <400> 127  
 gtattaggaa acggctccac tggaaaagga atggcgcctc aggcg 45

[0040]

<210> 128  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83H\_F

<400> 128

gtattaggaa acggctccac tcataaagga atggcgctc aggcg

45

<210> 129  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83I\_F

<400> 129

gtattaggaa acggctccac tattaagga atggcgctc aggcg

45

<210> 130  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83K\_F

<400> 130

gtattaggaa acggctccac taataaagga atggcgctc aggcg

45

<210> 131  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0041]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83L\_F
- <400> 131  
gtattaggaa acggetccac tettaaagga atggcgctc aggcg 45
- <210> 132  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83M\_F
- <400> 132  
gtattaggaa acggetccac tatgaaagga atggcgctc aggcg 45
- <210> 133  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83P\_F
- <400> 133  
gtattaggaa acggetccac tcaaaaagga atggcgctc aggcg 45
- <210> 134  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83Q\_F
- <400> 134  
gtattaggaa acggetccac tcagaaagga atggcgctc aggcg 45
- <210> 135  
<211> 45

[0042]

- <212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83R\_F
- <400> 135  
gtattaggaa acggctccac tagaaaagga atggcgcctc aggcg 45
- <210> 136  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83S\_F
- <400> 136  
gtattaggaa acggctccac ttccaaagga atggcgcctc aggcg 45
- <210> 137  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83T\_F
- <400> 137  
gtattaggaa acggctccac tacaaaagga atggcgcctc aggcg 45
- <210> 138  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83V\_F
- <400> 138  
gtattaggaa acggctccac tgtgaaagga atggcgcctc aggcg 45

[0043]

<210> 139  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83W\_F

<400> 139

gtattaggaa acggctccac ttggaaagga atggcgccctc aggcg

45

<210> 140  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 N83Y\_F

<400> 140

gtattaggaa acggctccac ttataaagga atggcgccctc aggcg

45

<210> 141  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204\_R

<400> 141

tgccacatgg ttgatattgt c

21

<210> 142  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

[0044]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204A\_F
- <400> 142  
gacaatatca accatgtggc agcatttctet tcacgtggac cgaca 45
- <210> 143  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204C\_F
- <400> 143  
gacaatatca accatgtggc atgcttctet tcacgtggac cgaca 45
- <210> 144  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204D\_F
- <400> 144  
gacaatatca accatgtggc agatttctet tcacgtggac cgaca 45
- <210> 145  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204E\_F
- <400> 145  
gacaatatca accatgtggc agaatttctet tcacgtggac cgaca 45
- <210> 146  
<211> 45

[0045]

- <212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204F\_F
- <400> 146  
gacaatatca accatgtggc attcttctct tcacgtggac cgaca 45
- <210> 147  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204G\_F
- <400> 147  
gacaatatca accatgtggc aggattctct tcacgtggac cgaca 45
- <210> 148  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204H\_F
- <400> 148  
gacaatatca accatgtggc acatttctct tcacgtggac cgaca 45
- <210> 149  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204I\_F
- <400> 149  
gacaatatca accatgtggc aattttctct tcacgtggac cgaca 45

[0046]

<210> 150  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204K\_F

<400> 150  
gacaatatca accatgtggc aaaattctct tcacgtggac cgaca

45

<210> 151  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204L\_F

<400> 151  
gacaatatca accatgtggc acttttctct tcacgtggac cgaca

45

<210> 152  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204M\_F

<400> 152  
gacaatatca accatgtggc aatggtctct tcacgtggac cgaca

45

<210> 153  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0047]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204N\_F
- <400> 153  
gacaatatca accatgtgga aaatttctct tcacgtggac cgaca 45
- <210> 154  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204P\_F
- <400> 154  
gacaatatca accatgtgga accattctct tcacgtggac cgaca 45
- <210> 155  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204R\_F
- <400> 155  
gacaatatca accatgtgga aagattctct tcacgtggac cgaca 45
- <210> 156  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204S\_F
- <400> 156  
gacaatatca accatgtgga atccttctct tcacgtggac cgaca 45
- <210> 157  
<211> 45

[0048]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204T_F	
<400> 157	
gacaatatca accatgtggc aacatttctct tcacgtggac cgaca	45
<210> 158	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204V_F	
<400> 158	
gacaatatca accatgtggc agtggttctct tcacgtggac cgaca	45
<210> 159	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204W_F	
<400> 159	
gacaatatca accatgtggc atggttctct tcacgtggac cgaca	45
<210> 160	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 Q204Y_F	
<400> 160	
gacaatatca accatgtggc atatttctct tcacgtggac cgaca	45

[0049]

<210> 161  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319\_R

<400> 161

aacgttcagg gatttatcca a

21

<210> 162  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319C\_F

<400> 162

ttggataaat ccctgaacgt ttgctatgtg aacgagtcca gttct

45

<210> 163  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319D\_F

<400> 163

ttggataaat ccctgaacgt tgattatgtg aacgagtcca gttct

45

<210> 164  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

[0050]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319E\_F
- <400> 164  
ttggataaat ccctgaacgt tgaatatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 165  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319F\_F
- <400> 165  
ttggataaat ccctgaacgt tttctatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 166  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319G\_F
- <400> 166  
ttggataaat ccctgaacgt tggatatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 167  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319H\_F
- <400> 167  
ttggataaat ccctgaacgt tcattatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 168  
<211> 45

[0051]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319I_F	
<400> 168	
ttggataaat ccctgaacgt tatttatgtg aacgagtcca gttct	45
<210> 169	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319K_F	
<400> 169	
ttggataaat ccctgaacgt taaatatgtg aacgagtcca gttct	45
<210> 170	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319L_F	
<400> 170	
ttggataaat ccctgaacgt tctttatgtg aacgagtcca gttct	45
<210> 171	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319M_F	
<400> 171	
ttggataaat ccctgaacgt tatgtatgtg aacgagtcca gttct	45

[0052]

<210> 172  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319N\_F

<400> 172  
ttggataaat ccctgaacgt taattatgtg aacgagtcca gttct

45

<210> 173  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319P\_F

<400> 173  
ttggataaat ccctgaacgt tccatattgtg aacgagtcca gttct

45

<210> 174  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319Q\_F

<400> 174  
ttggataaat ccctgaacgt tcagtattgtg aacgagtcca gttct

45

<210> 175  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0053]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319R\_F
- <400> 175  
ttgataaat ccctgaacgt tagatatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 176  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319S\_F
- <400> 176  
ttgataaat ccctgaacgt ttcctatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 177  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319T\_F
- <400> 177  
ttgataaat ccctgaacgt tacatatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 178  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319V\_F
- <400> 178  
ttgataaat ccctgaacgt tgtgtatgtg aacgagtcca gttct 45
- <210> 179  
<211> 45

[0054]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319W_F	
<400> 179	
ttggataaat cctgaacgt ttggtatgtg aacgagtcca gttct	45
<210> 180	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 A319Y_F	
<400> 180	
ttggataaat cctgaacgt ttattatgtg aacgagtcca gttct	45
<210> 181	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337_R	
<400> 181	
cgagtacgtc gctttttggc t	21
<210> 182	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337A_F	
<400> 182	
agccaaaaag cgacgtactc ggcaactgct actgcccggca agcct	45

[0055]

<210> 183  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337C\_F

<400> 183  
agccaaaaag cgacgtactc gtgcactgct actgccggca agcct

45

<210> 184  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337D\_F

<400> 184  
agccaaaaag cgacgtactc ggatactgct actgccggca agcct

45

<210> 185  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337E\_F

<400> 185  
agccaaaaag cgacgtactc ggaaactgct actgccggca agcct

45

<210> 186  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0056]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337G\_F
- <400> 186  
agccaaaaag cgacgtactc gggaactgct actgccggca agcct 45
- <210> 187  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337H\_F
- <400> 187  
agccaaaaag cgacgtactc gcatactgct actgccggca agcct 45
- <210> 188  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337I\_F
- <400> 188  
agccaaaaag cgacgtactc gattactgct actgccggca agcct 45
- <210> 189  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337K\_F
- <400> 189  
agccaaaaag cgacgtactc gaaaactgct actgccggca agcct 45
- <210> 190  
<211> 45

[0057]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337L_F	
<400> 190	
agccaaaaag cgacgtactc gcttactgct actgccggca agcct	45
<210> 191	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337M_F	
<400> 191	
agccaaaaag cgacgtactc gatgactgct actgccggca agcct	45
<210> 192	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337N_F	
<400> 192	
agccaaaaag cgacgtactc gaatactgct actgccggca agcct	45
<210> 193	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337P_F	
<400> 193	
agccaaaaag cgacgtactc gccactgct actgccggca agcct	45

[0058]

<210> 194  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337Q\_F

<400> 194  
agccaaaaag cgacgtactc gcagactgct actgccggca agcct

45

<210> 195  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337R\_F

<400> 195  
agccaaaaag cgacgtactc gagaactgct actgccggca agcct

45

<210> 196  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337S\_F

<400> 196  
agccaaaaag cgacgtactc gtccactgct actgccggca agcct

45

<210> 197  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

[0059]

- <223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337T\_F
- <400> 197  
agccaaaaag cgacgtactc gacaactgct actgccggca agcct 45
- <210> 198  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337V\_F
- <400> 198  
agccaaaaag cgacgtactc ggtgactgct actgccggca agcct 45
- <210> 199  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337W\_F
- <400> 199  
agccaaaaag cgacgtactc gtggactgct actgccggca agcct 45
- <210> 200  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 寡核苷酸, 作为 PCR 引物 F337Y\_F
- <400> 200  
agccaaaaag cgacgtactc gtatactgct actgccggca agcct 45

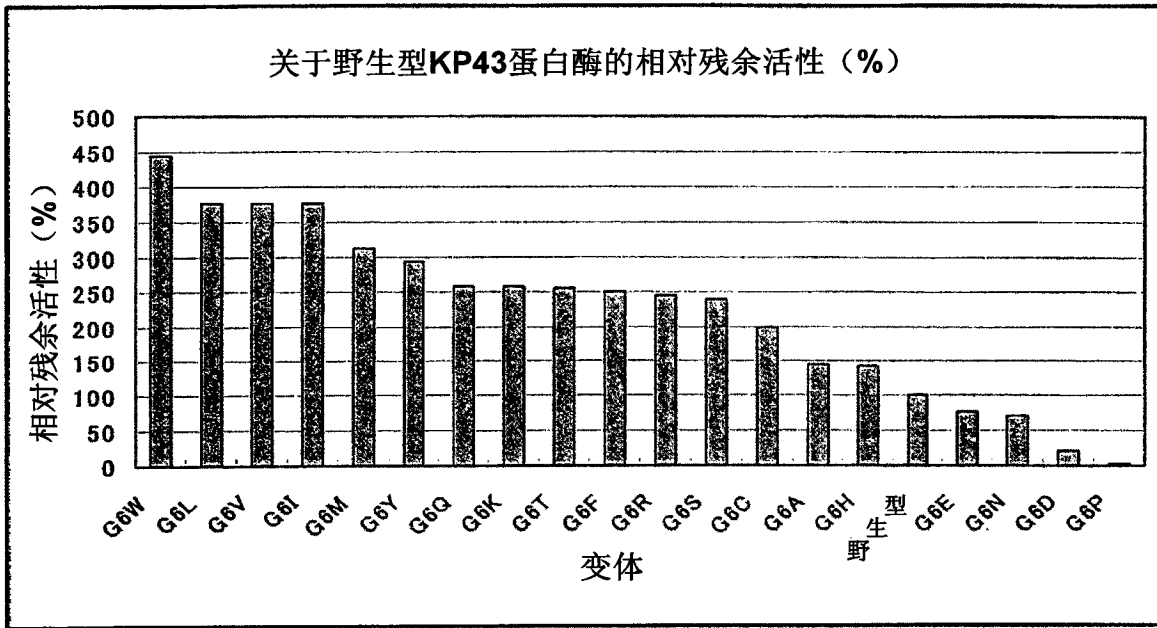


图 1

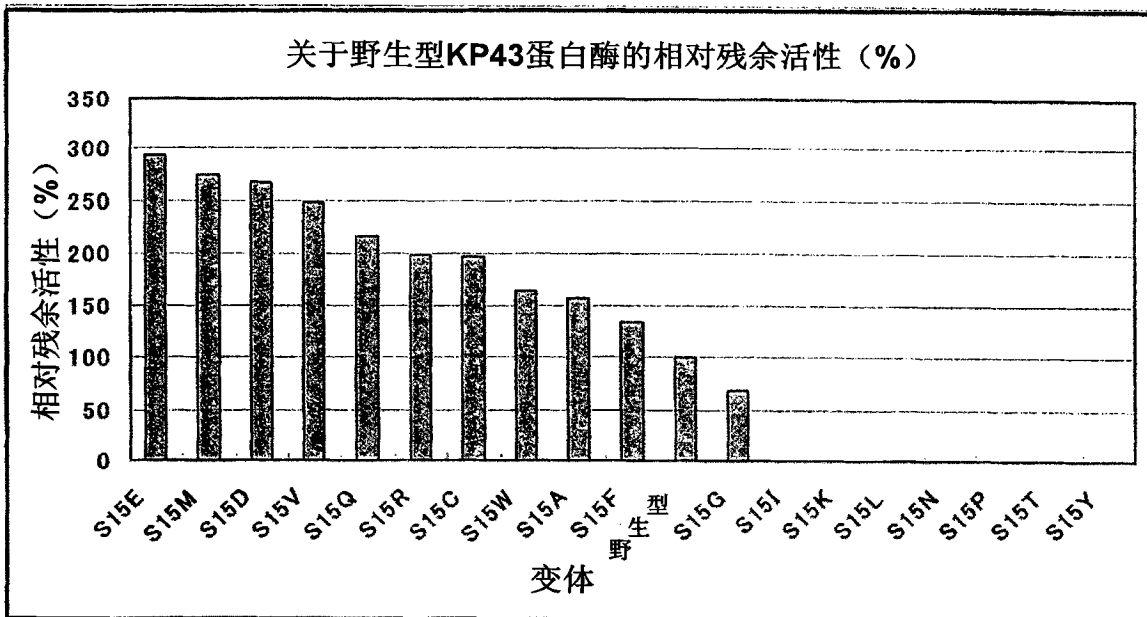


图 2

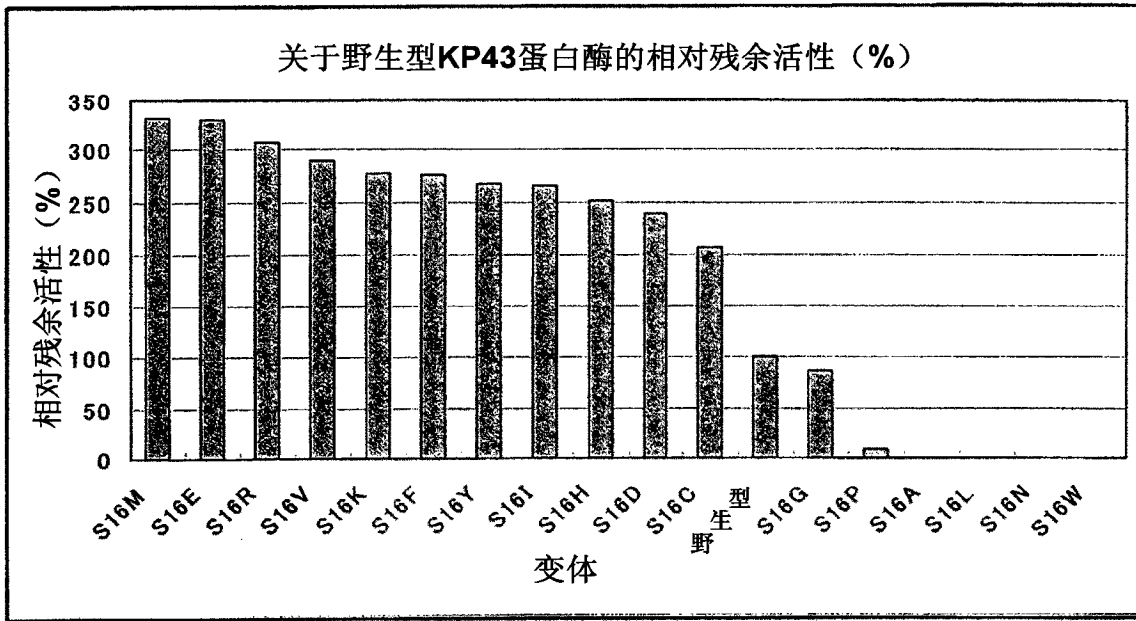


图 3

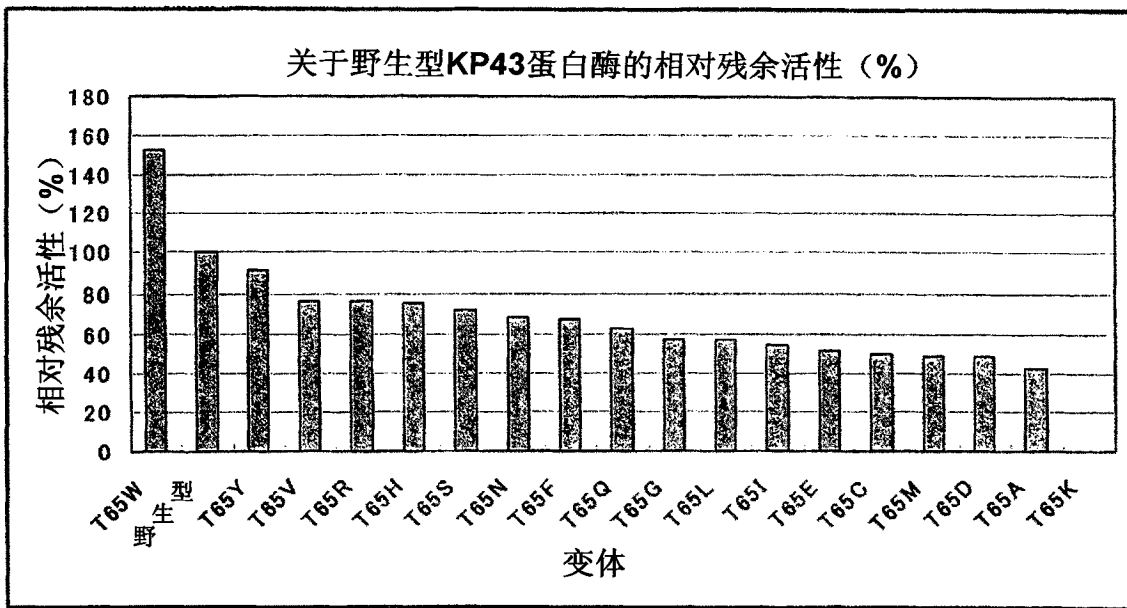


图 4

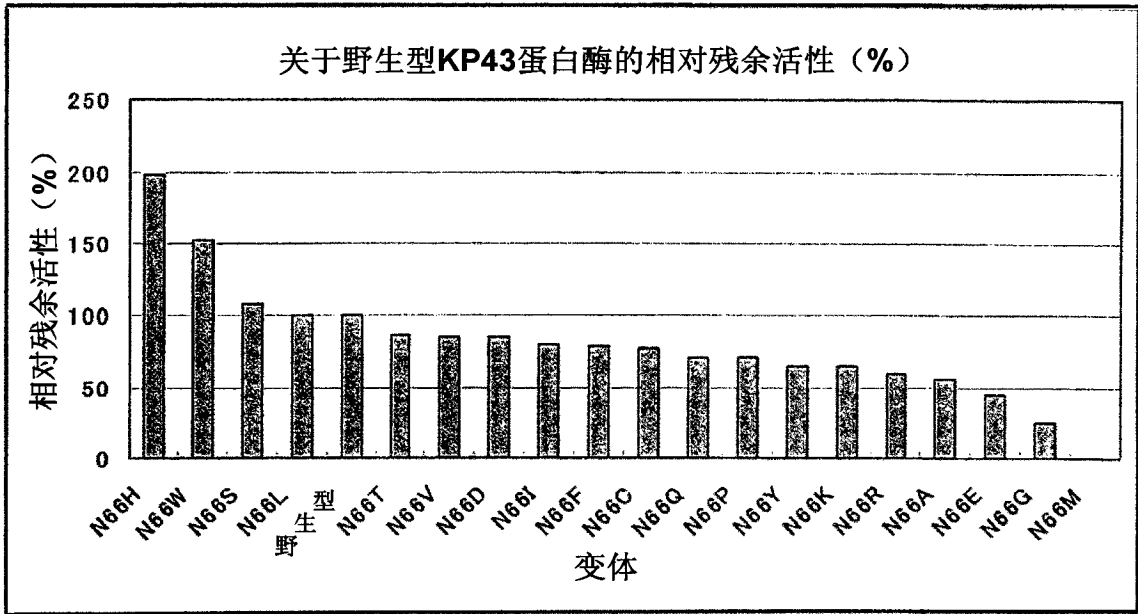


图 5

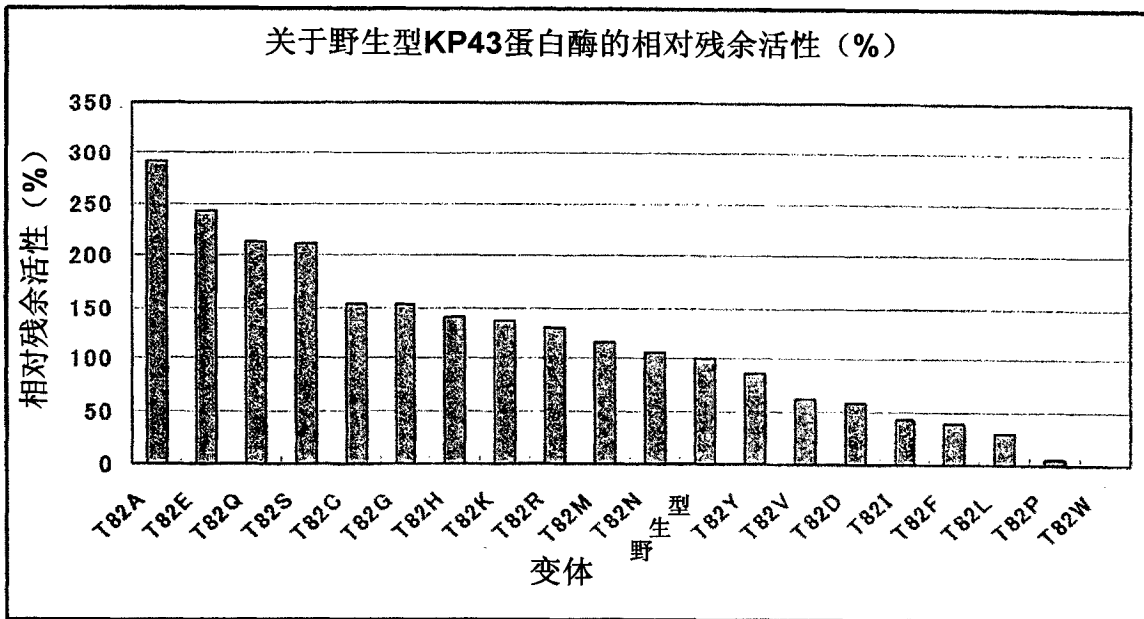


图 6

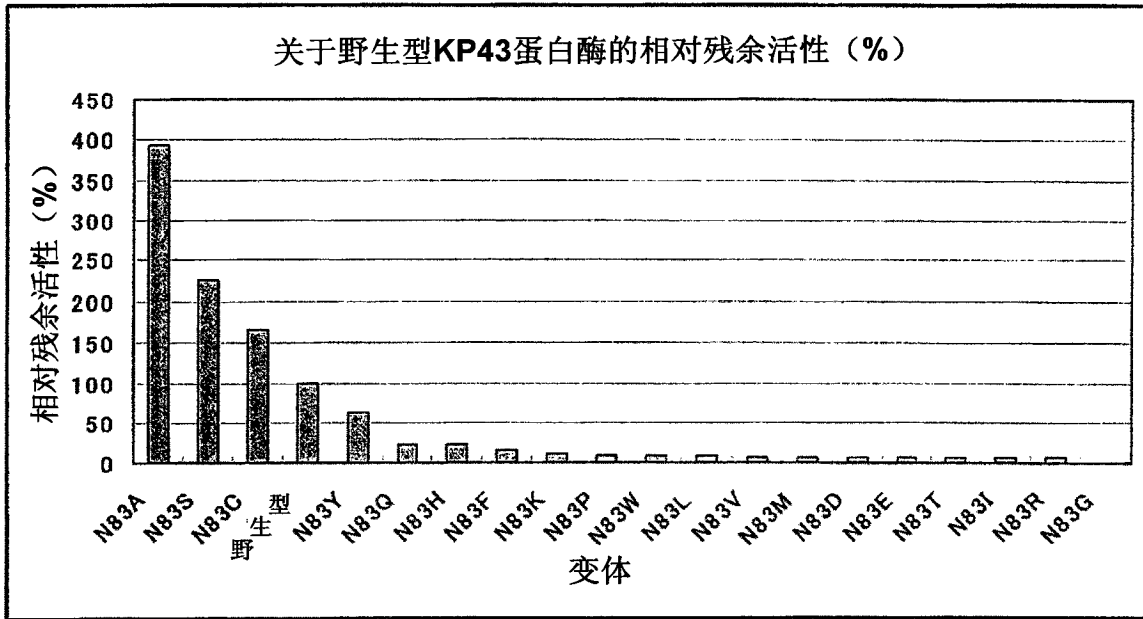


图 7

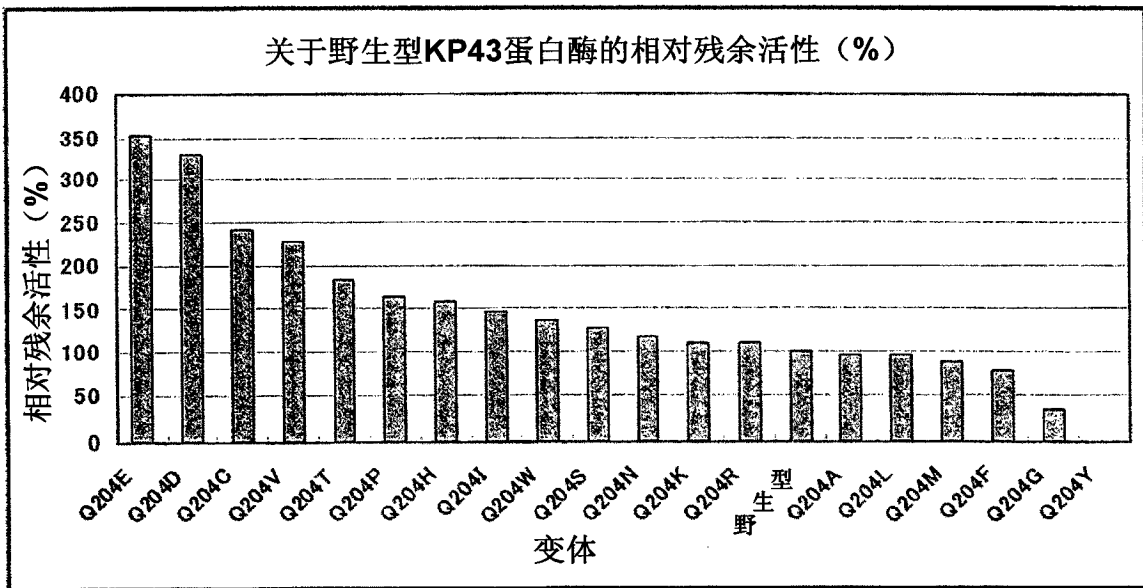


图 8

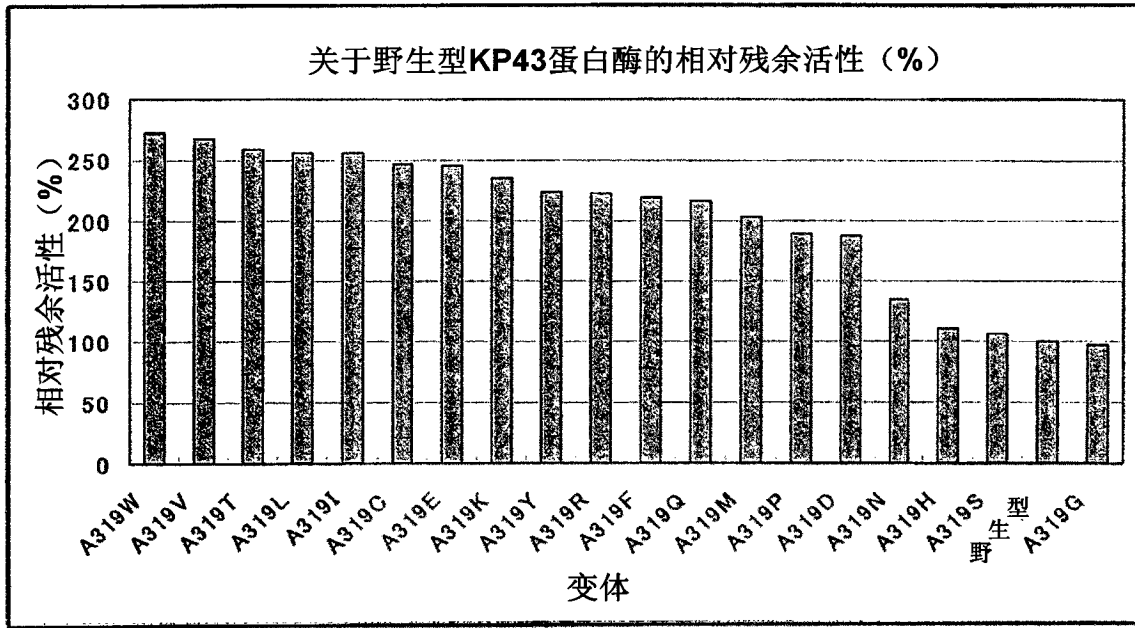


图 9

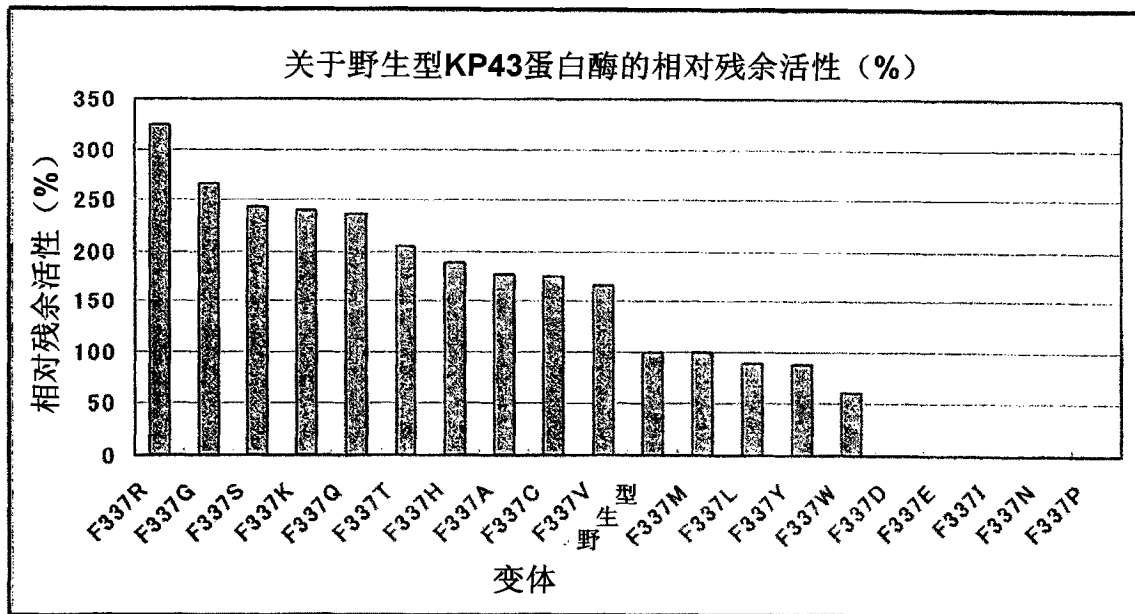


图 10