〔19〕中华人民共和国专利局

[11]公开号 CN 1050220A

〔12〕发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90106811.X

[51] Int.Cl[5]
C12N 9/24

〔43〕公开日 1991年3月27日

[22]申请日 90.6.29

[30]优先权

[32]89.6.29 [33]EP [31]89201735.1

[71]申请人 吉斯特·布罗卡德斯股份有限公司

地址 荷兰代尔夫特

共同申请人 植物遗传工程股份公司

[72]发明人 威廉姆斯·约翰尼斯·奎斯 尤斯·拉罗克 艾德瑞那斯·威廉姆斯·赫尔曼斯·沃尔布赖 帕特里克·斯坦森 马克·劳韦里斯

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利代理部

代理人 李 瑛

C12N 9/28 C12N 15/56
C12N 15/75 C12N 15/00
//(C12N 9/28,C12R 1:07,1:10)
(C12N 15/56,1:10)

说明书页数: 31 附图页数: 25

[54]发明名称 提高了热酸和/或碱稳定性的突变微生物α淀粉酶

[57]摘要

提供了热稳定和酸稳定的α淀粉酶，该酶是从微生物特别是杆菌类微生物中分离之遗传工程化α淀粉酶基因的表达产物。其中对造成缺口的异源双链DNA进行的化学和酶促诱变方法可以是亚硫酸氢盐方法和酶促错误掺入法。该突变的α淀粉酶具有优越的特性，如其可在淀粉降解和纺织物脱浆的工业应用中，在宽pH条件下表现有改善了的热稳定性。

权　利　要　求　书

1．一种突变型α淀粉酶，其为突变的编码α淀粉酶之DNA顺序的表达产物，特征在于该突变型α淀粉酶至少有一个氨基酸不同于野生型酶的氨基酸顺序，且所说的突变型α淀粉酶在降解淀粉和／或纺织物脱浆应用中表现有改善的特性，其中改善的特性是由于氨基酸置换所致。

2．根据权利要求1的α淀粉酶，特征在于其表现有改善的热稳定性。

3．根据权利要求1的α淀粉酶，特征在于其在pH低于6．5和／或高于7．5时表现有改善的稳定性。

4．根据权利要求1的α淀粉酶，特征在于其表现有改善的热稳定性和酸稳定性。

5．根据权利要求1－4中任一项的α淀粉酶，其中由之衍生突变酶的原始基因得自于一种微生物，较好是芽孢杆菌菌株。

6．根据权利要求5的α淀粉酶，其中所说的基因是由选自脂肪嗜热芽孢杆菌、地衣形芽孢杆菌和淀粉液化芽孢杆菌之菌株的野生型基因衍生的。

7．根据权利要求6的α淀粉酶，特征在于该酶因为在111、133和149位上或任何同源α淀粉酶的相应位置上有一个或多个位置的氨基酸置换，而不同于得自地衣形芽孢杆菌的野生型α淀粉酶。

8．根据权利要求7的α淀粉酶，特征在于它含有一个或多个下列氨基酸置换：Ala－111－Thr、His－133－Tyr、

Thr－149－Ile。

9．如权利要求1－8中任一项中限定的编码α淀粉酶的突变基因。

10．包含根据权利要求9之突变基因的表达载体。

11．包含根据权利要求10之表达载体的宿主细胞。

12．在转化前基本上不能产生细胞外淀粉水解酶的宿主细胞，特征在于其被根据权利要求10的表达载体所转化。

13．根据权利要求12的宿主细胞为地衣形芽孢杆菌T9。

14．一种芽孢杆菌—大肠杆菌穿梭载体，其中物理上将调节顺序与结构基因分离后便不可能在大肠杆菌中表达已克隆的基因，且其中已克隆之基因在芽孢杆菌内的表达可因用单一限制酶消化并且继后重新连结成环形而得以恢复

15．一种制备在淀粉降解或织物脱浆应用中具有改善之特性的淀粉水解酶的方法，该方法包括下列步骤：

诱变编码有用淀粉水解酶的克隆的基因或其片段；

分离已得到的突变型淀粉酶基因；

将所说的突变型淀粉酶基因引入适于表达和生产的宿主菌株中；

回收已产生的突变型淀粉酶并鉴定那些具有适用于淀粉降解或织物脱浆之改善特性的突变型淀粉酶。

16．一种生产突变型α淀粉酶的方法，包括

在适当培养基中培养根据权利要求11－13的宿主细胞，回收所产生的α淀粉酶。

17．根据权利要求1－8中任一项的α淀粉酶在淀粉降解和织物脱浆中的应用

18．降解淀粉的方法，其包括使用根据权利要求1－8中任一项的突变的α淀粉酶

19．织物脱浆的方法，其包括使用根据权利要求1－8中任一项的突变的α淀粉酶

20．包含根据权利要求1－8中任一项之突变的α淀粉酶的淀粉降解组合物。

21．包含根据权利要求1－8中任一项之突变的α淀粉酶的织物脱浆组合物。

说　　明　　书

提高了热、酸和／或碱稳定性的突变微生物α淀粉酶

本发明涉及遗传工程领域并提供了新的ＤＮＡ分子，该分子含有编码有α淀粉酶活性酶的ＤＮＡ顺序。具体地说，即公开了有改善了在降解淀粉、纺织物脱浆及其他工业加工中之应用特性的突变型微生物α淀粉酶。所公开的α淀粉酶显示增加了对热、酸和碱的稳定性，使之能适于在迄今尚未使用过的工艺条件下完成其功能活性。

淀粉由直链淀粉（１５－３０％Ｗ／Ｗ）和支链淀粉（70-85%W/W)的混合物组成。直链淀粉由分子量约为60,000到800,000、以α－１；４键连接之葡萄糖单位的线性链组成。支链淀粉则是在每２４－３０个葡萄糖单位上含有α－１，６分支点的分支聚合物，其分子最可高至１００×１０^{6}。

目前用酶催化法由淀粉生产浓缩右旋糖浆形式的糖包括：(1)用α淀粉酶将固态淀粉液化成平均聚合度约７－１０的糊精，（２）用淀粉葡糖苷酶（也称葡糖淀粉酶或ＡＧ）使所得的已液化淀粉（即淀粉水解物）糖化。所得糖浆有高葡萄糖含量。商业上生产的大多数葡萄糖糖浆均被酶促异构化成右旋糖／果糖混合物（即所谓异构糖浆）。

α淀粉酶（ＥＣ３，２，１，１）借助随机裂解内部α－１，４－葡糖苷键而水解淀粉、糖原和相关的多糖。该酶具有许多重要的工业用途，如用于制糖、酿造、酒精及纺织工业。α淀粉酶是从多种细菌、真菌、植物或动物来源分离的。工业上最重要的α淀粉酶是从细

菌中分离的。

在淀粉降解工艺的第一个步骤中，是于相对高温度高达110℃下加热使淀粉浆凝胶化，接下来的两个连续步骤是用热稳定的α淀粉酶使凝胶化的淀粉液化及糊精化。主要的工艺变量是淀粉浓度、α淀粉酶剂量、温度及pH。在液化－糊精化反应中，工艺变量必须保持在很窄的范围内，以达到良好转化率，因为否则会引起严重的过滤问题（参见L．E．Coker and K.Venkatasubramanian, Biotechnology, P. 165-171, Ed. P.N. Cheremisinoff, P.B. Quellette, Technicom.Publ. Corp. Lancaster Renn. 1985)。在降解过程初始阶段常常遇到的一个问题是适当调节温度的问题： 过度加热常常造成α淀粉酶变性，使最终的稀薄度不足。为避免这一问题，一个办法是使用对热更为稳定的α淀粉酶。

为此目的，已提出加入钙离子或两亲性离子（如参见EP－A－0189838），但这一办法似乎也不能令人满意。

因此，仍要试图提供一种提高了热稳定性的α淀粉酶。

EP－A－057976描述了从脂肪嗜热杆菌（B．stearothermophilus)中分离编码热稳定性α淀粉酶的基因，将该基因克隆到含有芽孢杆菌或大肠杆菌复制原点的质粒中。为得到用以生产α淀粉酶的嵌合质粒，而分离并不加修饰地使用了α淀粉酶基因。

EP－A－0134048描述了α淀粉酶本身之商业化生产的方法，特征是克隆并在工业芽胞杆菌菌株中表达一个或多个α淀粉酶基因。

EP－A－252666描述了结构通式为Q－R－L的嵌合α淀粉酶，其中Q是有55－60个氨基酸残基的N末端多肽，其至少

有７５％同源于淀粉液化杆菌（B．amyloliquefaciens）α淀粉酶的３７个N末端残基，R是已知的多肽，L是有３９０至４００个氨基酸残基的C末端多肽，其至少有７５％同源于地衣形 芽孢杆菌（B．licheniformis）α淀粉酶的３９５个C末端残基。

Gray 等人(J.Bacteriol., 1986, 166, 635)描述了由脂肪嗜热芽孢杆菌α淀粉酶之NH_2末端部分和地衣形芽孢杆菌α淀粉酶之COOH末端部分形成的嵌合α淀粉酶。大多数杂合酶分子都显示比亲代野生型酶的稳定性差。另外，所有已知的杂合分子都不具有改善的稳定性。

上面列出的文献都没有述及通过单个氨基酸置换来得到新的α淀粉酶。

ＥＰ－Ａ－０２８５１２３公开了核酸顺序完全诱变的方法。其中作为例子描述了脂肪嗜热芽孢杆菌α淀粉酶的诱变。虽然其中提到可用该方法得到改善了稳定性的脂肪嗜热芽孢杆菌突变株，但没有给出有关实施例。

本发明提供了突变的α淀粉酶及得到该突变型的方法。所说的突变型α淀粉酶的特征在于，它们至少有一个氨基酸不同于野生型酶。此外，还提供了编码这些突变型的ＤＮＡ，含有这些可表达之ＤＮＡ的载体及含有这些载体的宿主细胞。

本发明的一个方面公开了对已克隆的α淀粉酶基因的随机诱变，使用适当的载体系统在适当宿主微生物中表达突变的基因。

本发明的另一个方面描述并应用了筛选突变型α淀粉酶的方法。所说的方法可得到对热和酸更为稳定的α淀粉酶。此外，使用该方法稍加修饰而得到对碱更稳定的α淀粉酶。然后可分离并纯化得到如此确定的克隆表达产物。

本发明的再一个方面提供了有较高热稳定性的α淀粉酶，这些突变型α淀粉酶在淀粉降解的应用条件下减少了过滤问题。

本发明的再一个方面提供了有较高酸稳定性的α淀粉酶，从而可在与淀粉葡糖苷酶反应之前，降低所加酸的量，同时降低不利的副产物的生成。该新的α淀粉酶最好就热稳定性和酸稳定性两者来说具有改善了的性质，或者就热稳定性和碱稳定性两者来说具有改善的性质。

本发明的再一个方面是显示突变型蛋白质在淀粉液化的应用条件下具有更好的性能。碱稳定性对于在织物脱浆中的应用是特别有宜的。

在对发明的详细描述及下文的实施例中将进一步述及这些方面。

图1：pMa5－8的核苷酸顺序

Stanssens等人，1987，EMBO Laboratory Course Martinsried, July 1987。有关不同结构元件的描述详见该文献。

图2：质粒pPROM SP02插入段的核苷酸顺序

EP－A-0224294中已描述了该载体的构建。下面的三联体描述α淀粉酶氨基酸顺序。顺序编号由成熟蛋白质（Kuhn et al. 1982, J.Bacteriol, 149, 372)的第一个氨基酸开始。由61至344位是SP02启动子插入部分。

图3：pMaTLia6的核苷酸顺序

由pMa5-8、pPROM SP02的插入段和编码TAC启动子的合成DNA片段构建该载体。TAC启动子DNA片段由位置3757至3859。α淀粉酶氨基酸顺序用下面的三联子表示。

图4：pMaTLia6的限制性酶切图

下列独特的限制性酶切位点用于α淀粉酶基因中的缺口构建：BamHI、SpeI, SacII、KpnI、ClaI、NarI、SalI、Tht111I、

XmaIII和BstE11。为了能够容易地确定突变，已合成了适于所有可能之缺口的顺序测定引物。质粒pMcTLia6与pMaTLia6大致相同，不同的是在氨苄青霉素基因中存在琥珀密码子（除去ＳｃａＩ位点），而在氯霉素基因中则没有琥珀密码子（与存在ＰｖｕⅡ位点有关）。

图５：芽孢杆菌／大肠杆菌穿梭载体pBMa/c的简略图解

（左侧）pMa/c部分能够容易地在大肠杆菌中诱变。（右侧）枯草芽孢杆菌基因盒含有α淀粉酶基因(或其他芽孢杆菌基因)加上在枯草芽孢杆菌中增殖的最小复制子。在大肠杆菌中成功地诱变后，枯草芽孢杆菌基因盒可成环，从而使ＳＰＯ２启动子在转化到芽孢杆菌后移到α淀粉酶基因的前面。

图６：pBMa/c1的限制性酶切图

该载体是图５所示诱变表达载体的一个特定例子。

（１）和（２）：多克隆位点。靶基因被插入（２）中。借助改变（１）和（２）处的位点，可以构建适于形成缺口之双链的方便的限制性位点；

ＦＤＴ：　转录终止密码子

F1.ORI：　来源于噬菌体Ｆ１的复制原点

E.coli ORI：来自pBR322的复制原点

ＢＬＡ：　氨苄青霉素抗性基因

ＣＡＴ：　氯霉素抗性基因

BAC ORI：　pUB１１０的复制原点

KANAMYCIN：　pUB110的卡那霉素（新霉素）抗性基因

SPO2：　噬菌体ＳＰＯ２的启动子

图７：　pBMa/c6Lia6的限制性酶切图

将地衣形芽孢杆菌α淀粉酶基因于图6所示的多克隆位点（2）切接到pBMa/cl中。该图中的（2）标示SPO2启动子，（4）标示E．Coli ORI。

图8：pMa/c TPLia6中phoA信号顺序片段的顺序

给出了从TAC－启动子上游之EcoRI 位点至成熟α淀粉酶第一个氨基酸的顺序。phoA氨基酸顺序在DNA顺序的下面示出。

图9：WT和2D5 α淀粉酶的米氏(Michaelis-Menten)方程图

该图显示酶活性的初始速率对WT和2D5α淀粉酶之底物浓度的作图。检测条件如实施例8所述。

图10：WT和D7α淀粉酶的热失活

该图显示于pH5．5及90．5℃时，作为Ca^{2+}浓度的函数之WT和D7α淀粉酶半衰期的变化。

图11：WT和D7α淀粉酶的热失活

其大致同图10，不同的是pH为7．0。

图12：WT和2D5α淀粉酶的热失活

该图显示于pH7．0和95℃时，作为Ca^{2+}浓度的函数，WT和2D5α淀粉酶的半衰期变化情况。

图13：显示作为pH的函数，WT和D7α淀粉酶的热失活。

图14：显示作为pH的函数，WT和2D5α淀粉酶的热失活。

图15：显示DE对110℃液化后测得之最终pH的作图。

本说明书中，所说的突变型α淀粉酶“表现出改善的性质”是指该酶在淀粉液化、纺织物脱浆及其他工业加工条件下具有较高的酶促

活性或较长的半衰期。

有“改善了的热稳定性”是指该突变酶在较高的加工温度下保留其活性，或者与产生该酶的野生型酶相比，在同一温度下能较长时间地维持其活性。

有“改善了的酸（或碱）稳定性”是指突变酶在较低（或较高）pH值可比衍生它的野生型酶更好地完成其功能。

应明确的是，这种改善的特性是经置换一个或多个氨基酸所导致的。

可由含α淀粉酶的微生物中分离染色体DNA。较好使用芽孢杆菌属的微生物，更好是地衣形芽孢杆菌，最好是地衣形芽孢杆菌T5（参见EP-A-134048）。用适当的限制性酶消化染色体DNA并克隆到载体中。可用多种方法选择，如杂交、免疫检测和测定酶促活性。可根据所利用的筛选方法来选择用于克隆被消化之染色体DNA的载体。如用杂交法筛选时，没有特殊的要求。但如果进行免疫学检测或基于酶促活性进行测定，载体应含有适当的表达信号。实际检测含α淀粉酶的克隆是在含淀粉的琼脂平皿上进行的。生长并通入碘蒸汽保温后检测阳性克隆。下一步是测定基因的顺序。将所衍生的氨基酸顺序同其他已知的α淀粉酶顺序相比较，以得到有关其重要氨基酸的第一个印象（如活性部位、Ca^{2+}结合、可能的S-S键）。当测定其3D结构时，可得到更明确的指征。因为这项工作很繁复，所以常常要采用另一方法。在没有3D结构检时，可成功地使用确定二级结构单元如α螺旋、β片层的检测程序来最后测得三级结构单元（如β套桶结构，β-barrel）。（参见Janin, J. and Wodack. S. J., Prog. Biophys. molec. Biol., 1983, 42, 21-78）。

可以预见有价值的氨基酸置换蛋白质结构的稳定性是由蛋白质之折迭与伸展构象之间自由能的净差决定的。由于脯氨酸残基被限制于比其他氨基酸有较少构象，所以当用脯氨酸取代某氨基酸时，就降低了伸展蛋白质的构型熵（从而提高了稳定性）。另一个有用的置换是用甘氨酸取代丙氨酸。苏氨酸、缬氨酸和异亮氨酸等残基 具有分支的β碳，所以可比非分支残基更多地限制骨架构象。

因为某些蛋白质之部分热稳定性是基于形成盐桥，故引入赖氨酸和精氨酸可能是有利的（Tomozic S. J. and Klibanov A. M., J. Biol. Chem., 1988, 263,3092-3096）。另外，由精氨酸残基取代赖氨酸时，由于精氨酸能够形成另一个氢键，故可改善盐桥的稳定性（如参见Wigby, D. B. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1987, 149, 927-929）。该文述及天冬酰胺和谷氨酰胺脱氨基化可导致酶结构的严重破坏，而用非酰胺残基取代则可避免之。氨基酸置换是在ＤＮＡ水平上进行诱变的最好方式。

原则上可直接对分离的克隆进行诱变实验。但更好是将插入段克隆到诱变／表达载体中。随机诱变是可能的，而且可能造成定点诱变。鉴于用前述方法得到了大量突变的克隆，并且由于不知道α淀粉酶的三维结构以对其完成可能的定点诱变，所以我们决定在特定区域中进行“随机”诱变。

下面是实施本发明的可能手段。

首先通过引入“沉默”限制性位点来修饰基因。也可以引入非沉默限制性位点，从而有可能缺失基因的特定区域。然后将基因克隆到质粒中。噬菌体与质粒的这种结合便容易产生单链ＤＮＡ。也可使用其他方法得到单链ＤＮＡ。使熔解的双链载体（加插入段）ＤＮＡ与

插入段中含有缺口的载体／插入段结合物杂交，即得到有缺口的异源双链ＤＮＡ（详见Morinaga, Y et al. 1984, Biotechnology, 2, 636）。

利用缺口进行化学或酶促诱变。我们优选亚硫酸氢盐法（Folk and Hofstetter,cell,1983,33,585)和酶促 错误掺入法（Lehtovaara等人的改良法，Prot. Eng., 1988, 2, 63)。使用这些方法应使缺口中的每个单个核苷酸都能被所有三个其他核苷酸取代（饱和诱变）。后一种方法可以以几种方式完成。其中之一是将合成引物杂交到缺口上。然后进行延伸反应，其中丢失了互补于来自引物之第一个脱氧核苷酸３′的脱氧核苷酸。原则上所有三个其他脱氧核苷酸均可被掺入。此可使用三个脱氧核苷酸的混合物或者使用分别只含一个脱氧核苷酸的三个分离的反应来完成。实施该方法的另一个方式是产生随机克隆。这里，四个分立的反应中每个都包含一个限速脱氧核苷酸。如此便产生了在每一单个核苷酸之前终止的第二链。可按上述方法进行继后的步骤。使用亚硫酸氢盐法和酶促诱变法都能得到突变型。

为了检验酶促特性，可使用诱变实验期间使用的同一宿主来表达已克隆的基因。原则上其可以是任何宿主细胞，条件是可得到这些细胞所适用的诱变／表达载体系统。大部分大肠杆菌均可适用，例如大肠杆菌ＷＫ６。菌落在微量滴定板中生长之后，将这些滴定板之小井中的样品点在添加了淀粉并以不同ｐＨ值缓冲的琼脂板上。可根据晕环的形成来确定阳性克隆。可用适当的缓冲液进行筛选，以选择热稳定性、酸稳定性、碱稳定性、盐水稳定性或任何其他稳定性的克隆。

用于生产突变型α淀粉酶的适当宿主菌株包括可在其中表达α淀粉酶的可转化微生物。特别适用的是由其中衍生α淀粉酶的同一种或

属的微生物，如芽孢杆菌菌株。较好是α淀粉酶阴性芽孢杆菌菌株，更好是α淀粉酶和蛋白酶阴性芽孢杆菌菌株。

例如已使用地衣形芽孢杆菌产生高水平的突变型α淀粉酶。

所产生的α淀粉酶最好能分泌到培养基中（在发酵期间），从而有利于产物回收。可使用适当的信号顺序达到分泌目的。

由细胞中分泌表达的α淀粉酶并以任何适当方法纯化之（如使用凝胶过滤法和Mono Q层析法）。于不同的Ca^{2+}浓度（0.5-15mM）和宽pH范围（5．5－8．0）下试验已分离之α淀粉酶的热失活作用。也可于实用条件下进行试验。特别是在pH5．5和5．25的淀粉液化条件下试验突变的α淀粉酶。此外也试验了其在纺织物脱浆中的应用。

被选择的某些突变型特性使之能更好地在实用条件下使用。

本发明公开了有较好热稳定性、酸稳定性和碱稳定性的α淀粉酶

一般说来，只要突变蛋白质与其野生型酶的活性相同或较之更好，氨基酸取代的数目并不是很重要的。突变型α淀粉酶至少有一个且更好有1至10个氨基酸不同于野生型酶。改善了性能的特定突变型包括在位置111、133和149（按地衣形芽孢杆菌α淀粉酶的序号）处含一个或多个氨基酸取代的突变型α淀粉酶。较好的氨基酸取代是Ala－111－Thr、His－133－Tyr和Thr－149－Ile。

这些突变酶在低于6．5和/或高于7．5的pH条件下表现有改善的性能。这种性能也可在高温度下得以提高，从而在例如高达110℃时具有较长的半衰期。

许多适用的α淀粉酶产物系得自于细菌来源，特别是芽孢杆菌，

如枯草芽孢杆菌、地衣形芽孢杆菌、脂肪嗜热芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌和淀粉液化芽孢杆菌。这些酶显示有高度的同源性和相似性（Yuuki et al., J. Biochem., 1985, 98, 1147; Nakajima et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1986, 23, 355)。因此可利用由这些α淀粉酶之一获得的有利突变的知识来改善其他淀粉酶。本发明提供了获得这种知识的途径。

以下是对所用实验方法的描述及举例阐明本发明的实施例。实施例旨在进一步阐明而不是限定本发明。

实验

材料和方法

1．一般克隆技术

所使用的克隆技术可参见T.Maniatis et_al., 1982, Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory; F.M.Ausubel et al., 1987, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc., New York; B.Perbal, 1988, A practical Guide to Molecular Cloning, 2nd edition, John Wiley & sons Inc., New York 等手册。这些手册详细描述了构建和增殖重组ＤＮＡ分子的方法，制备基因库的方法顺序分析和诱变ＤＮＡ的方法以及以酶学手段处理ＤＡＮ分子的方法。

2．化学诱变

可在体外用化学试剂处理已克隆的ＤＮＡ，以在该ＤＮＡ中引入突变。如果这些突变是针对编码氨基酸之三联体的，即可由突变的克隆ＤＮＡ产生突变蛋白质。Shortle和Botstein(Methods Enzymol., 1983, 100, 457)描述了借助亚硫酸氢钠进行化学诱变的方法。Folk

和Hofstetter(cell 1983, 33, 585)描述了一种改良方法。Smith (Ann. Rev. Genet., 1985, 19, 423) 描述了诱变的其他方法。Ausubel等人（文献出处同上）则描述了一种特别有用的方法。

3．对形成缺口之双链DNA的诱变

使用一种基于造成双股缺口的方法（Kramer et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12, 9441)及所谓噬质体（phasmid, 一种质粒／噬菌体杂合体）。该方法基本上是建立在一种形成缺口的双股DNA中间体基础上，所说的中间体由含有野生型抗生素抗性标志的缺口链(负链)及携带琥珀突变(在贡献抗生素抗性的基因中)的模板链（正链）组成。退火后，在体外缺口填补及封闭反应期间，使诱变寡核苷酸掺入有缺口的链中。用所得分子转化错配修复缺陷性（Muts)宿主，并在其中保留有预定突变与抗生素抗性标志之间的连结。由该菌株中分离混合的噬质体群，然后使之在抑制基因阴性宿主菌株中分离。将转化体铺敷在含抗生素培养基上，从而得以选择由形成缺口链衍生的子代。

1．Stanssens等人(Nucl. Acids Res., 1989, 17, 4441)所述的双载体系统pMa／c5－8由下列单元组成：

pos 11-105: 噬菌体fd，终止子

pos 121-215: 噬菌体fd，终止子

pos 221-307: 质粒pBR322 （pos2069-2153)

pos 313-768: 噬菌体f1，复制原点（pos 5432-5943)

pos 772-2571: 质粒pBR322，复制原点和β内酰胺酶基因

pos 2572-2685: 转座子Tn903

pos 2519-2772: 色氨酸终止子（双股）

pos 2773-3729: 转座子Tn9，氯霉素乙酰转移酶基因

pos 3730-3803: 多克隆位点

该顺序如图1所示。

在pMa型载体中，核苷酸3409由G改变为A；而在pMc型载体中，核苷酸2238由G改变为C，从而分别在乙酰转移酶基因和β内酰胺酶基因中产生琥珀终止密码子，使所说的基因失活。

提到的所有顺序均得自Genbank(TM)(release 54), National Nucleic Acid Sequence Data Bank, NIH USA。质粒pMc5－8已以保藏号DSM4566保藏。为了完成诱变，将靶DNA片段克隆到pMa5－8的多克隆位点中。然后在含有靶DNA的pMa5－8和pMc5－8之间构建一个形成缺口的双链。

可用诱变寡核苷酸、长的合成寡核苷酸、低水平错误掺入的核苷酸、化学物质或核苷酸的酶促错误掺入使含靶DNA的单股缺口致突变，但也可使用随机诱变PCR（详见Ausubel等人，和Perbal的前述文献）。作为体外诱变的一个替代方法是借助紫外光或化学试剂或用大肠杆菌致突变菌株进行体内诱变（Fowler et al., J.Bacteriol., 1986, 167, 130）。

可使用得自Applied Bio Systems的装置合成诱变核苷酸。

4．借助核苷酸的酶促错误掺入随机诱变

可对pMa／PMC缺口双链进行引物延伸和错误掺入诱变，该方法最初是由Shortle等人（Proc, Natl、Acad. Sci. USA, 1982, 79, 1588)、B．C．Cunningham和J.A. Wells (Prot. Eng., 1987, 1, 319)描述的，Lehtovaara等人（Prot. Eng., 1988, 2,63)则描述了相应的改良方法。

该方法是基于控制地使用聚合酶。首先经pMa/pMc之缺口双链的引

物延长而产生四个DNA 分子群体，使它们在缺口中，但又总是在已知类型碱基的前面（分别在A、C、G或T之前）随机终止。然后在分离的错误掺入反应中诱变各个群体，这样即可删去正确的碱基。以这种方法，可在缺口的每个位置产生所有类型的碱基置换突变。使用顺序（TM）(U.S.Biochemical Corporation)时，最好使用Klenow聚合酶。而且可使用Lehtovaara等人（文献出处同上）用过的MoMuLV逆转录酶代替A．M．V．逆转录酶。

为了确保单个位点置换，我们对Lehtovaara等人（文献出处同上）所述的方法作了如下改动：在逆转录酶缓冲液中不是有三种而是只有一种错误掺入核苷酸。例如在三个分离的反应中使A特异性有限碱基延长混合物分别与250μM dCTP、250μM dGTP和250μMdTTP进行反应。对于整组4碱基特异性有限延长混合物，总共要完成12次分离的错误掺入反应。于42℃保温1.5小时后，加入所有四种浓度为0．5mM的脱氧核苷酸，并继续于37℃下保温至少20分钟。然后按Lehtovaara等人（文献出处同上）的方法进一步加工处理，所作改动是没有对含尿嘧啶DNA链作反选择，而是基于pMa／c载体进行反选择。

5．突变型α淀粉酶的生产

在TB培养基（10ml）中30℃下接种含携带任何一种α淀粉酶构建物之表达载体的大肠杆菌菌株WK6（Zell,R. and Fritz, H.J., EMBO J., 1987, 6, 1809)的转化株。TB培养基包含0.017M KH_2PO_4、0.072M K_2HPO_4、12g/L Bactotryptone、24g/L Bacto 酵母浸膏、0．4%甘油和抗生素(对pMa用氨苄青霉素，对pMc构建物用氯霉素）。用培养物样品在2升烧瓶内接种250ml TB。在OD_{600}

为10-20时加入0．1mM　IPTG（异丙基－β－d－硫代半乳吡喃糖苷）并继续保温12－16小时。

6．突变型α淀粉酶的纯化

离心收获细胞并再悬浮于含有20%蔗糖的缓冲液中（0℃）。第二次离心后将细胞再悬浮于水中。第三次离心除去细胞碎片并用20mM　TRIS缓冲液将上清液调至pH 8．0。加入$CaCl_2$至终浓度为50mM。将材料于70℃加热处理15分钟并离心除去不溶性物质。通过0．22μ微孔过滤器过滤上清液并浓缩至原体积的1／10。

使用凝胶过滤法（TSK　HW－55－Merck柱）和Mono Q层析法进一步纯化在MonoS上层析前用乙酸钠将含酶活性部分的pH调到4.8。用250mM NaCl洗脱α淀粉酶。为避免失活而将pH直接调到8．0。

实施例1

地衣形芽孢杆菌α淀粉酶基因的分子克隆

用限制酶EcoRI消化由地衣形芽孢杆菌（EP－A－134048：CBS470．83）分离的染色体DNA并连接到pUB110 (Gryczan, T.J., et al., J. Bacteriol, 1978, 134, p.318)的EcoRI位点上。用连接混合物转化枯草芽孢杆菌1A40（Bacillus Genetic Stock Center)。检验在添加0．4g／L淀粉（Zulkowsky Starch, Merck)的HI琼脂平皿(DIFCO)上产生α淀粉酶的新霉素抗性菌落生长并与I_2蒸汽保温后，选择产生大的清晰晕环的阳性菌落并作进一步的定性分析。由该阳性菌落分离的质粒显示含有来源于地衣形芽孢杆菌T5的3．4kb　EcoRI－EcoRI片段。该质粒被定名为pGB33 (EP－A－134048；CBS466．83）。将编码α淀粉酶的插入段连接到合成的Shine-Dalgarno顺序和噬菌体SPO2启动

子上，产生质粒pProm SPO_2（参见EP－A－0224294；CBS 696.85）。用Sanger(Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 1977, 74, 6463)方法测得的pProm SPO_2插入段的核苷酸顺序如图2所示。该顺序显示有一个编码α淀粉酶的单一的大的开放读码，它实际上相同于由Yuuki等人（文献同上）测得的地衣形芽孢杆菌的α淀粉酶顺序。前29个氨基酸是信号顺序，其在α淀粉酶分泌期间被切掉。本说明书中的氨基酸顺序编号均参照成熟蛋白质的氨基酸序号。

在下列位置上与Yuuki的顺序不同：134位上以Arg代替了Leu，310位上以Ser代替了Gly，320位上以Ala代替了Ser。

实施例2

诱变／表达载体pMaTLia6的构建

用EcoRI和BclI消化质粒pPROM SPO_2，纯化1.8Kb EcoRI-BclI插入段并克隆到EcoRI-BamHI消化的pMa5-8中。此pMa5-8载体在使用前已经过修饰，带有多克隆位点。图1中由位置3767到位置3786的Bam HI-HindIII片段被换成如图3所示从位置5647至5660的合成DNA顺序。完成这一步骤后即可使α淀粉酶基因内的某些限制性位点变为独有的。用EcoRI和BamHI消化所得含α淀粉酶的pMa5-8衍生物并连接到携带TAC启动子(De Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80,21)拷贝的合成DNA片段上该合成DNA片段的顺序连同最后的α淀粉酶诱变／表达载体pMa TLia6一起示于图3中（从位置3757至位置3859）。经引入几个沉默限制性位点以构建成最后的α淀粉酶诱变 表达载体，从而可在诱变实验期间在α淀粉酶基因中产生缺口（图4）。为此目的，使用定点寡核苷酸诱变法造成下列突变：

经沉默突变引入了SpeI位点：

T 4 9 T　　和　　S 5 0 S

A C G－－→A C T　　A G C－→A G T

经沉默突变引入了N a r I 位点：

A 2 6 9 T

G C G－→G C C

在T A G终止密码子下游引入了BstEII位点

T A G A A G A G C －－→T A G G T G A C C

该α淀粉酶诱变载体 p M a T L i a 6 适于用缺口双链法进行诱变。对用适当限制酶消化所制得的双链pMaTLia6 D N A 作退火处理，使之成为单股pMcTLia6 DNA。

按实验部分所述对所得单链缺口进行定点诱变、化学诱变、及随机酶促诱变。

经加入 I P T G，使α淀粉酶基因前面的T A C启动子能够用于诱导α淀粉酶在大肠杆菌内的表达。

质粒pMaTLia6（在大肠杆菌W K 6 中）已于 1 9 8 9 年 6 月 2 日保藏，保藏登记号为C B S 2 5 5 . 8 9 。

实施例 3

用于诱变和表达的芽孢杆菌／大肠杆菌穿梭载体的构建

该载体可使被插入的基因在大肠杆菌中致突变并在芽孢杆菌中直接表达。适于载体构建的战略是以下列方式使pUB110衍生物（Gryczan，文献出处同上）与pMa/c双载体系统结合：

1．可经单一限制／再连接实验除去枯草芽孢杆菌基因暗盒。

2．可很容易地将不同的α淀粉酶基因和不同的启动子克隆在该载体中。

3．重新连接成环形之后，已克隆的基因将处于适当的芽孢杆菌启动子的控制下。

4．在大肠杆菌中致突变期间，芽孢杆菌启动子和结构α淀粉酶基因在物理上是分离的，以防止α淀粉酶在大肠杆菌内可能造成的有害积聚。

图5中显示了穿梭载体的构建程序。图6中显示了载体pBMa/c1之最后型式的结构。载体pBMa1已于1989年6月2日以保藏登记号CBS252.89保藏。已按下列步骤构建了该载体。

--纯化携带REP基因和Neo^R基因之pUB110的EcoRI-SnaBI片段，并克隆到EcoRI-SmaI消化的pUC8中。

--将该pUC8衍生物的EcoRI-HindⅢ片段克隆到EcoRI-HindⅢ消化的pMa5-8中，得到质粒pMa5-80。

--用编码噬菌体SPO_2之SPO_2启动子 (Williams et al., J. Bacteriol., 1981, 146, 1162)加SacⅡ、ApaI、XhoI、SacI、BglI、MluI和XbaI之限制性识别位点的合成DNA片段取代BamHI-XbaI多聚接头片段。

--使用pMa5-80的唯一EcoRI位点，以插入构成下列识别位点的多聚接头片段:EcoRI、SmaI、SacI、EcoRV、SphI、KpnI、XbaI和HindⅢ。

为特定目的，已由pBMa/c1衍生得到了pBMa/c2和pBMa/c6。

-在pBMa/c2中，用pUC19的相应多聚接头置换了pBMa/c1的EcoRI-HindⅢ多聚接头。

--在pBMa/c6中，除合理的SacⅡ位点外，已通过Klenow反应除去pBMa/c1的多聚接头。

构建pBMa/c6 Lia6后，对地衣形芽孢杆菌α淀粉酶基因进行定点

诱变。该载体是将从pMaTLia6中分离的BamHI-HindⅢ片段连接到用BamHI和HindⅢ切割的上述pBMa／c6中而构建的。可用所得质粒（图7）构建适于在大肠杆菌中诱变的造成缺口的双链。

按Chang和Cohen(Mol. Gen. Genet., 1979, 168, 111)所述方法用SacI限制性切割，重新连接并转化后，已在枯草芽孢杆菌1A40(BGSC 1A40)中表达了所得的突变型。

实施例4

在大肠杆菌中表达正确成熟的地衣形芽孢杆菌α淀粉酶

鉴定由pMaTLia6产生的α淀粉酶（实施例2），表明α淀粉酶的一部分在分泌期间受到了不正确的加工。NH_2末端顺序分析显示在大肠杆菌WK6中产生的α淀粉酶有一个多余的丙氨酸残基。

虽然没有证明这一改变使该淀粉酶产生了不同的特性，但我们还是用碱性磷酸酶PhoA信号顺序取代了α淀粉酶信号顺序。为此目的，进行了一个诱变实验，以便在pMaTLia6中的信号肽和成熟α淀粉酶的接合处引入一个FspI限制性位点。经FspI和BamHI消化后，插入一编码phoA信号顺序的合成DNA片段（Michaelis et al. J. Bacteriol., 1983, 154, 366)。该构建物顺序如图8所示。显示由pMa/cTPLia6产生的α淀粉酶具有正确的NH_2-末端顺序。

实施例5

筛选稳定的α淀粉酶

A．筛选酸稳定的α淀粉酶突变型

可在用碘溶液使淀粉染色后，在以不同pH缓冲的淀粉平皿上比较各自的晕环，以选择在低pH下比野生型α淀粉酶更好或更差的α淀粉酶突变型。

方法

1．生长

使可能的突变体生长于微量滴定板中。生长培养基为250μl脑心灌注液（DIFCO）。同时加入下列成分：

氯霉素	50μg／ml
I．P．T．G（SIGMA）	0.2mM
$CaCl_2$	2mM

用无菌牙签由琼脂平皿上采集菌落并接种在微量滴定板的各小井（96个）内。每个平板包括4个野生型菌落作为对照。

将这些微量滴定板置于37℃下保温40小时（不振荡）。

2．平皿试验

保温后产生α淀粉酶，由各小井取5μl样品并点在两种不同类型的琼脂平皿（144×140mm）上。第一种类型的平皿是富心灌注液琼脂平皿(DIFCO)+0.4%淀粉(Zulkowsky starch-Merck)+氯霉素50μg／ml。37℃保温16小时后，将该平皿作为突变的储备物。

第二种类型平皿是实际筛选平皿，它含有：Bacto琼脂（DIFCO）1.5% + Zulkowsky 淀粉0．2%。琼脂和淀粉溶解于合成的自来水（STW）即软化水+2mM $CaCl_2$、1mM $MgCl_2$、2.5mM $NaHCO_3$和10μg/ml BSA中。

用100倍稀释的5M醋酸钾储备缓冲溶液在该培养基中缓冲筛选平皿。储备溶液的pH值为4．80、5．0和5．2（室温）测定时，琼脂平皿的最后pH值稍低于储备溶液的pH值。自各小井取5μl培养物点在3个有不同pH值的筛选平皿上。

所选用的pH值范围应使野生型α淀粉酶在有最低pH值的平皿

上有很小或没有活性。

3．显色

将筛选平皿于55℃下保温2小时。然后将碘溶液滴加在平皿上。10X碘溶液含有30g碘和70gKI／L。

斑点的清除量与该pH值下的残留α淀粉酶活性相关联。选择比野生型对照物有更好功能的突变型以进行第二轮筛选。该实验中野生型的晕环有很好的再现性。

4．第二次筛选

由富集平皿上采集阳性突变体并在新鲜HI平皿＋氯霉素上纯化。由其中各采集4个菌落并按第一次筛选的相似方法再次检验之。此外还用STW对这些培养物作一系列稀释并将这些稀释物点在中性pH筛选平皿（pH7．0）上。经与野生型培养物比较，便可确定这种在低pH下表现出的更好性能是由于总体上产生了更好的α淀粉酶，还是由于产生了本质上更为稳定的α淀粉酶。

经测定受到诱变的那部分基因的核苷酸顺序来进一步鉴定“经受得住”第二轮筛选的突变型。

B．筛选碱稳定性α淀粉酶

按照筛选酸稳定性α淀粉酶的相似方法来筛选碱稳定性α淀粉酶。在微量滴定板上生长后，由各小井中取出5μl样品点在储备平皿上及实际筛选平皿上。后者含有

Bacto 琼脂(DIFCO)	1．5%
Zulkowsky 淀粉	0．2%

并用加有2mM $CaCl_2$、1mM $MgCl_2$、2．5mM $NaHCO_3$ 和10μg／ml BSA的软化水补足体积。

用50mM碳酸盐／碳酸氢盐缓冲液缓冲筛选平皿，pH值为9.0、9.5和和10.0。选择的pH值范围应使野生型α淀粉酶在最高pH值时有很小或没有活性。在55℃保温2小时后，将碘溶液滴加到平皿上。选择那些能比野生型酶产生更好晕环的突变型，以进行第二轮筛选。第二轮筛选也是按筛选酸稳定性的相似方法进行的。

C．筛选热稳定性α淀粉酶突变型

也可比较于加热后由培养液中残留淀粉酶活性在淀粉平皿上造成的晕环，来选择在高温度下比野生型α淀粉酶有较好或较差性能的α淀粉酶突变型。

方法

1．以进行pH筛选的同样方法培养突变体。

2．以进行pH筛选的同样方法在HI琼脂平皿上复制突变体。

3．用随意使用的帽（Flow Laboratories）封住微量滴定板的各小井，以防止加热期间培养液的蒸发。

4．在95℃水浴中将微量滴定板加热1小时。加热后置于离心机中离心以收集微量滴定板底部的总样品。

5．按下述方法筛选热稳定性突变酶：由各小井取5μl培养物点在中性筛选平皿上（参见pH筛选程序）。然后于55℃保温1小时。用碘溶液染色淀粉之后，比较斑点（晕环）的清除率，筛选有不同残留α淀粉酶活性的突变组和对照组。当对照组的残留活性太高时，须作系列稀释并点在筛选平皿上，以能够将比野生型酶有更好热稳定性的突变酶区别出来。

6．按进行pH筛选的相似方法检验期望得到的突变酶。

如期望有联合特性，可将A或B型与C型筛选方法合用。例如可

在第一轮筛选碱稳定性α淀粉酶后，就热稳定性进行第二轮筛选。可选择在两次试验中记录为阳性的那些突变型作为表现有两种预期特性的候选者。

实施例6

pMaTLia6的亚硫酸氢盐诱变

使pMaTLia6的单链DNA与SacII－ClaI消化的pMcTLia6一起退火，以得到从4315位到4569位有缺口的异源双链（图3）。对该异源双链进行亚硫酸氢盐诱变（见实验部分）。

转化到大肠杆菌WK6 mut S(Zell, R. and Fritz H.J., 文献同上）中之后，分离在含氯霉素琼脂平皿（50μg／ml）上选择的质粒库并转化到大肠杆菌WK6中。大肠杆菌WK6 Mut S和大肠杆菌WK6已分别以保藏登记号CBS472.88和CBS473.88保藏。使所得转化株在含有2.0mM $CaCl_2$、50μg／ml氯霉素和0.2mM IPTG（SIGMA）的培养基中于微量滴定板小井内37℃下生长40小时（不振荡）。按实施例5所述方法筛选pH稳定性突变体。

筛选到大约*300*个Cm^R转化体。经DNA顺序分析确定突变频率平均为每分子缺口上产生0.4个突变。经pH筛选后鉴定一个酸稳定的突变体D7。对该突变体的筛选顺序分析揭示了起源于从CAC至TAC之编码三联子突变的突变H133Y。

发现突变体D7在热稳定性筛选试验（实施例5)中也是阳性的。

用设计恰好定位在SacII－ClaI片段前面的特异寡核苷酸对单股DNA进行DNA顺序分析。在一分离的诱变实验中，筛选了*1000*个Cm^R转化体经pH筛选后鉴定了另一个酸稳定的突变体*2D5*。该

突变体具有下列突变：

H133Y CAC→TAC；T149I ACA→ATA

按已述的相似方法，在图3所示从4569位至4976位的ClaI-SalI缺口上进行亚硫酸氢盐诱变。筛选出大约300个Cm^R转化体（突变频率为0.6个突变／分子）。没有找到对酸稳定的转化体，但发现了许多对酸不稳定的突变体。在这些对酸不稳定的突变体中，有些可能有移动的pH谱，而出现对碱更稳定的表型。

实施例7

对pMaTLia6的酶促诱变

将单股pMaTLia6（图4）与ClaI-SalI消化的pMcTLia6一起退火，以得到从4569位至4976位（图3）的异源双链。按实验部分所述对造成缺口的双链进行酶促错误掺入诱变。

将经过dATP限制的引物延长之后得到的样品切成三个部分，并在逆转录酶存在下分别与dCTP、dGTP和dTTP保温。37℃保温10分钟后，用所有四种dNTP和Klenow聚合酶造成追击掺入，加入T4DNA连接酶以完成延长，得到完整的双链分子。

将这些分子转化到大肠杆菌WK6 Mut S中并回收质粒库。然后将这些质粒库转化到大肠杆菌WK6中并在含氯霉素（50μg／ml）的琼脂平皿上选择菌落，按实施例5所述，根据α淀粉酶的稳定性筛选所得突变体。

在另一实验中，分别用dATP、dCTP、dGTP和dTTP对SpeI-SacII缺口进行有限的引物延长。用错误掺入法（见实验部分）对这些引物库进行诱变。在pH平皿（实施例5）上检验100个Cm^R转化体，并鉴定出于低pH下更为稳定的突变体M29。确

定突变的顺序为：ＡＩＩＩＴ　ＧＣＧ－→ＴＣＧ。

实施例 8

稳定突变体的特性

对由亚硫酸氢盐诱变实验得到的两种突变体作进一步的鉴定。如上所述，在DNA顺序测定之前提示有下列氨基酸置换：

-Ｄ７之１３３位上含有的酪氨酸被组氨酸取代（Ｄ７＝Ｈ１３３Ｙ）

－－２Ｄ５含有Ｄ７突变，另外１４９位的苏氨酸被异亮氨酸取代（２Ｄ５＝Ｈ１３３Ｙ，Ｔ１４９Ｉ）。

ａ）对酶促活性的检测

使用４－硝基苯基－麦芽戊糖苷（４ＮＰ－ＤＰ５）作底物检测地衣形芽孢杆菌α淀粉酶ＷＴ和突变体的酶促活性，反应中生成４－硝基苯酚和麦芽戊糖，然后即可检测ＯＤ４０５的改变。该方法是在50 mM ＭＯＰＳ、５０mM　ＮａＣｌ、２mM　$CaCl_2$（ｐＨ７．１５）和０－１mM　４ＮＰ－ＤＰ５中于３５℃下进行的。测定初始速率并以　１０，０００l／Ｍ／ｃｍ收取４－硝基苯酚。图９显示了对ＷＴ和２Ｄ５α淀粉酶所作检测的结果。表１中给出了计算的Vmax和Km值。

表　1

	Vmax(μM/min./mg)	Km(mM)
WT	66.7±0.9	0.112±0.005
2D5	66.3±0.7	0.119±0.004

由表１可以看出，α淀粉酶２Ｄ５的突变并没有以显著的方式影响酶促活性。

b ）Ca^{2+}对热失活作用的影响

在不同的钙浓度下对WT、D7和2D5进行热失活实验。实验程序如下：

1 ）去金属化

酶（2－3mg／ml）对3×1L 20mM MOPS、5mM EDTA、5mM EGTA（pH7.0）和3×1L 20mM MOPS（pH7.0）透析24小时。

2 ）再金属化

－－500μl缓冲液100mM（如MES、MOPS、EPPS）*

－－145μl去金属的酶（如2.15mg／ml）

－100μl $CaCl_2$（100、50、30、20、10、5或2.5mM）

－－Xμl K_2SO_4（100mM）

－－（25.5－X）μl H_2O

[$CaCl_2$] 终mM数	[K_2SO_4] 终mM数
0.25	14.75
0.5	14.5
1	14
2	13
3	12
5	10

* --pH MES，如于室温下为6.77，90℃将为6.0 (pKa6.15 pKa/℃=-0.011)

--pKa摘自Merck公司的表(Zwitterionische Puffersubstanzen)

3）热失活

1ml室温预保温的酶溶液以0.2mg／ml的浓度在密封的Pierce小瓶（特氟隆涂封）中90.5℃或95℃下加热。于0至6小时之间以一定时间间隔用注射器取出50μl样品，并在冰上冷却，然后用4NP－DP5(0.5mM)作底物测定残留活性。

使用单指数式衰变配合程序（GRAPHPAD)测定半衰期。

图10和11分别给出了作为90.5℃下Ca^{2+}浓度的函数，WT和D7α淀粉酶在pH5.5和7.0时的半衰期。只测定了2D5在pH7.0和95℃下的Ca^{2+}依赖性（图12）。从中还可看出突变型α淀粉酶的Ca^{2+}依赖性不同于野生型。

C．突变型α淀粉酶在不同pH值条件下的热稳定性

已使用上述缓冲液（Ca^{2+}浓度为1mM），分别测定了D7和2D5在90.5℃和95℃下热失活作用的pH依赖性。可以看出，在整个pH范围内D7和2D5的热稳定性有很大提高（其中2D5提高两倍，见图13和14）。

实施例9

芽孢杆菌中突变型酶的产生

以下述两种方式将地衣形芽孢杆菌α淀粉酶中的突变（其业已通

过大肠杆菌ＷＫ６中表达得以鉴定）转移到芽孢杆菌表达载体中。

ａ）借助α淀粉酶基因内的独特限制性位点(图4)，自pMaTLia6突变体中分离携带突变的片段并再克隆到pBMa6.Lia6的同源位置中。然后用SacI消化后一质粒（其可以在大肠杆菌或芽孢杆菌中复制）并用Ｔ４ＤＮＡ连接酶重新连接成环形。转化到枯草芽孢杆菌１Ａ４０中之后，得以在SPO_2启动子的控制下大量产生α淀粉酶。重新连接成环的pBMa6.Lia6被定名为pB6.Lia6,以表明除去了载体的大肠杆菌部分。

ｂ）由大肠杆菌中再次收集pBMa6.Lia6单股ＤＮＡ，并与限制酶消化的pBMc6.Lia6双链ＤＮＡ一起退火，得到在α淀粉酶基因上有预定缺口的双链。然后用编码所需突变的寡核苷酸（如实验部分所述）对该缺口进行定点诱变。按前述方法将pBMc6.Lia6载体转化到pB6.Lia6型载体中。可借助方法ａ）使不同的单一位点突变结合起来，但如果突变发生在不同的缺口上，则较好使用方法ｂ）。

借助方法ａ）通过交换ＳａｃⅡ－ＳａｌⅠ片段而将突变体D7和２Ｄ５的突变转移到pBMa6.Lia6上，并由被转化的枯草芽孢杆菌１Ａ４０的培养基中回收α淀粉酶。按前述实施例给出的程序筛选两种突变体的上清液，从而进一步证实两种突变体所产生的α淀粉酶比野生型pB6.Lia6产生的α淀粉酶对酸和热的稳定性更好。

因此可见，芽孢杆菌中α淀粉酶突变的表型不同于大肠杆菌中的表型。

最后将pB6.Lia6突变体转化到地衣形芽孢杆菌Ｔ９中，该菌株是地衣形芽孢杆菌Ｔ５的蛋白酶阴性、α淀粉酶阴性衍生株（ＥＰ－０２５３４５５，ＣＢＳ４７０．８３）。已在同源系统中用宿主Ｔ９产生了高含量水平的α淀粉酶突变型。除去染色体α淀粉酶基因后，

因没有野生型α淀粉酶污染，故使该菌株很适于生产突变型α淀粉酶。已将由该菌株产生的酶用于工业应用试验，并证明了突变体pB6.Lia6.2D5和pB6.Lia6.D7的工业实用性。

实施例10

突变型α淀粉酶在淀粉液化条件下的应用试验

为了在更实际的环境下试验突变型α淀粉酶2D5，我们用超滤法纯化了发酵液（实施例9）并将酶与50%丙二醇配在一起。

试验了三种样品：

893701：WT地衣形芽孢杆菌T5α淀粉酶1530TAU/g

893703：2D5按WT制备的突变体　　2820TAU/g

Maxamyl0819　商业样品　　7090TAU/g

1　TAU（热稳定性α淀粉酶单位）是指在与碘反应后，在620nm处与参考颜色有相等吸光率的产品中，于标准化条件下每分钟转化1mg淀粉所需酶的量。标准条件是pH6.6、30℃、反应时间20分钟。参考颜色是将25g　$COCl_2.6H_2O$、3.84g $K_2Cr_2O_7$和1ml　HCl（1M）溶于100ml蒸馏水中得到的。

1．低pH（5.5和5.25）下的液化试验

尽可能快地使淀粉浆的温度提高到110±0.5℃，并在该温度下保持6分钟。

在连续流动（5.41／小时）下实现液化。液化45、60和75分钟后取3份135ml样品（液化1.5分钟）并于95℃下保持2小时。然后用0.4ml　H_2SO_4(1N)酸化50ml样品达到pH3.5，并在沸水浴中保持10分钟，以便在进行D．E．测定之前终止酶活性　。

冷却剩余的样品，以测定残留的酶活性。

淀粉浆组成：

3．3Kg玉米淀粉，D．S．88%（2.904Kg干淀粉）

5．45升井水（40T．H．）

淤浆的干物质为33%

用1N硫酸或1N NaOH将pH调到5．5。

酶浓度：4．4TAU／克干淀粉。

在试验期间检查流速二或三次。

2．D．E．的测定

用屈光度仪检查液化之淀粉的干物质（约34%）。用已知的Lane Eynon方法测定D．E．值。结果如图15所示。

3．残留的酶活性

用Brabender面粉糊粘度图示仪测定液化淀粉中的残留淀粉酶活性。

40g马铃薯淀粉

390ml蒸馏水（50℃）

50ml Tris缓冲液（0．05M，pH6．50）

5ml $CaCl_2.2H_2O$（30g／L）

当粘度稳定后（10分钟），将温度提高到80℃（1．5°分钟），加入5ml稀释的液化淀粉（7g．用蒸馏水配到50ml），20分钟后测知粘度下降，这种下降与酶活力呈函数关系。用已知酶浓度划出标准曲线，以估计残留活性的TAU数。

在pH＜5．5和110℃条件下，突变的2D5明显优于WT酶。用突变的2D5，在pH5．25下可提高2－3个DE单位。

实施例11

突变型α淀粉酶在织物脱浆条件下的应用试验

为了试验碱性α淀粉酶突变型的工业应用，在下列溶液中就稳定性进行试验：

1．4%　　H_2O_2（35%）

1．0－1．5%　苛性苏打（100%）

15－20ml／L　硅酸钠（38Be'）

0．3－0．5%　烷基苯磺酸盐（Lanaryl N.A.-ICI）

0．5－1．0%　有机稳定剂（Tinoclarite G）

保温2．5小时后，根据其所需特性选择的α淀粉酶突变型应具有余留的酶活性。

```
        10         20         30         40         50         60
AATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTT

        70         80         90        100        110        120
TTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCAAGCTAATTCACCTC

       130        140        150        160        170        180
GAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAG

       190        200        210        220        230        240
ATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCAAGCTCTGCCTCGCGCGTTTCGGTG

       250        260        270        280        290        300
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG

       310        320        330        340        350        360
CGGATGCAGATCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGC

       370        380        390        400        410        420
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTT

       430        440        450        460        470        480
CCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAG

       490        500        510        520        530        540
GGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTT

       550        560        570        580        590        600
CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT

       610        620        630        640        650        660
TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATT

       670        680        690        700        710        720
CTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTT

       730        740        750        760        770        780
AACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTGATCTGCGCTCG

       790        800        810        820        830        840
GTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA

       850        860        870        880        890        900
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC

       910        920        930        940        950        960
CGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCAC

       970        980        990       1000       1010       1020
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG

      1030       1040       1050       1060       1070       1080
TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC

      1090       1100       1110       1120       1130       1140
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTAT
```

图 1

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAG

1210 1220 1230 1240 1250 1260
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC

1270 1280 1290 1300 1310 1320
TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT

1330 1340 1350 1360 1370 1380
GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA

1510 1520 1530 1540 1550 1560
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC

1630 1640 1650 1660 1670 1680
CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT

1690 1700 1710 1720 1730 1740
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCA

1750 1760 1770 1780 1790 1800
TCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT

1810 1820 1830 1840 1850 1860
GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA

1870 1880 1890 1900 1910 1920
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC

1930 1940 1950 1960 1970 1980
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG

1990 2000 2010 2020 2030 2040
CGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCT

2050 2060 2070 2080 2090 2100
TCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAA

2110 2120 2130 2140 2150 2160
AAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA

2170 2180 2190 2200 2210 2220
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC

2230 2240 2250 2260 2270 2280

图 1 (续 -)

TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG

2290 2300 2310 2320 2330 2340
AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA

2350 2360 2370 2380 2390 2400
GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG

2410 2420 2430 2440 2450 2460
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTC

2470 2480 2490 2500 2510 2520
ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG

2530 2540 2550 2560 2570 2580
GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCAGACAG

2590 2600 2610 2620 2630 2640
TTTTATTGTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGA

2650 2660 2670 2680 2690 2700
CACAACGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGACTCCCCGCGCGCGATG

2710 2720 2730 2740 2750 2760
GGTCGAATTTGCTTTCGAAAAAAAAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTAAAAAAAAGCCCGCT

2770 2780 2790 2800 2810 2820
CATTAGGCGGGCTCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGC

2830 2840 2850 2860 2870 2880
AACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACT

2890 2900 2910 2920 2930 2940
CATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGG

2950 2960 2970 2980 2990 3000
CATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGC

3010 3020 3030 3040 3050 3060
CCATAGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTCGCCACGTTTAAATCAAAACTGG

3070 3080 3090 3100 3110 3120
TGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTAGGGA

3130 3140 3150 3160 3170 3180
AATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCC

3190 3200 3210 3220 3230 3240
GGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAA

3250 3260 3270 3280 3290 3300
CGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATAC

3310 3320 3330 3340 3350 3360
GAAATTCCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACT

图 1 (续)

```
      3370       3380       3390       3400       3410       3420
TGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTAAACGGTCTGGT

      3430       3440       3450       3460       3470       3480
TATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG

      3490       3500       3510       3520       3530       3540
ATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG

      3550       3560       3570       3580       3590       3600
AAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGT

      3610       3620       3630       3640       3650       3660
TGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCC

      3670       3680       3690       3700       3710       3720
CGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTA

      3730       3740       3750       3760       3770       3780
TTTATTCGAAGACGAAAGGGCATCGCGCGCGGGGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCA

      3790       3800
GCCAAGCTTGGTCTAGAGGTCGA
```

图 1（续）

```
        10         20         30         40         50         60
GTCTACAAACCCCTTAAAAACGTTTTTAAAGGCTTTTAAGCCGTCTGTACGTTCCTTAAG

        70         80         90        100        110        120
GAATTCACACTGGCCTTGGTTAAGGTTAAGATGTGGACGGAATGGGTAAAGTGTAGTAAA

       130        140        150        160        170        180
GTACAATTAATCGGGAGCTTAGATGTCCCTTCAACATCTTATATAGAAGGGAAGGTTGGC

       190        200        210        220        230        240
AAATGGAAATTGAAAGAATTAACGAGCATACAGTAAAATTTTATATGTCTTACGGAGATA

       250        260        270        280        290        300
TTGAAGATCGCGGTTTTGACAGAGAAGAAATTTGGTATAACCGTGAGCGCAGTGAAGAAC

       310        320        330        340        350        360
TTTTCTGGGAAGTCATGGATGAAGTTCATGAAGAAGAGGAATTCGAGCTCGCCCGGGGAT

       370        380        390        400        410        420
CCAAGGAGGTGATCTAGAGTCATGAAACAACAAAAACGGCTTTACGCCCGATTGCTGACG
                          M  K  Q  Q  K  R  L  Y  A  R  L  L  T

       430        440        450        460        470        480
CTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCAGCGGCGGCAAATCTTAAT
 L  L  F  A  L  I  F  L  L  P  H  S  A  A  A  A  A  N  L  N
                                                   +1
       490        500        510        520        530        540
GGGACGCTGATGCAGTATTTTGAATGGTACATGCCCAATGACGGCCAACATTGGAAGCGT
 G  T  L  M  Q  Y  F  E  W  Y  M  P  N  D  G  Q  H  W  K  R
 5
       550        560        570        580        590        600
TTGCAAAACGACTCGGCATATTTGGCTGAACACGGTATTACTGCCGTCTGGATTCCCCCG
 L  Q  N  D  S  A  Y  L  A  E  H  G  I  T  A  V  W  I  P  P
25
       610        620        630        640        650        660
GCATATAAGGGAACGAGCCAAGCCGATCTGGGCTACGGTGCTTACGACCTTTATGATTTA
 A  Y  K  G  T  S  Q  A  D  L  G  Y  G  A  Y  D  L  Y  D  L
45
       670        680        690        700        710        720
GGGGAGTTTCATCAAAAAGGGACCGTTCGGACAAAGTACGGCACAAAGGAGAGCTGCAA
 G  E  F  H  Q  K  G  T  V  R  T  K  Y  G  T  K  G  E  L  Q
65
       730        740        750        760        770        780
TCTGCGATCAAAAGTCTTCATTCCCGCGACATTAACGTTTACGGGGATGTGGTCATCAAC
 S  A  I  K  S  L  H  S  R  D  I  N  V  Y  G  D  V  V  I  N
85
       790        800        810        820        830        840
CACAAAGGCGGCGCTGATGCGACCGAAGATGTAACCGCGGTTGAAGTCGATCCCGCTGAC
 H  K  G  G  A  D  A  T  E  D  V  T  A  V  E  V  D  P  A  D
105
       850        860        870        880        890        900
CGCAACCGCGTAATTTCAGGAGAACACTTAATTAAAGCCTGGACACATTTTCATTTTCCG
 R  N  R  V  I  S  C  E  H  L  I  K  A  W  T  H  F  H  F  P
125
       910        920        930        940        950        960
GGGCGCGGCAGCACATACACCGATTTTAAATGGCATTGGTACCATTTTGACGGAACCGAT
 G  R  G  S  T  Y  S  D  F  K  W  H  W  Y  H  F  D  G  T  D
145
```

FIG. 2

```
      970        980        990       1000       1010       1020
TGGGACGAGTCCCGAAAGCTGAACCGCATCTATAAGTTTCAAGGAAAGGCTTGGGATTGG
 W  D  E  S  R  K  L  N  R  I  Y  K  F  Q  G  K  A  W  D  W
165
     1030       1040       1050       1060       1070       1080
GAAGTTTCCAATGAAAACGGCAACTATGATTATTTGATGTATGCCGACATCGATTATGAC
 E  V  S  N  E  N  G  N  Y  D  Y  L  M  Y  A  D  I  D  Y  D
185
     1090       1100       1110       1120       1130       1140
CATCCTGATGTCGCAGCAGAAATTAAGAGATGGGGCACTTGGTATGCCAATGAACTGCAA
 H  P  D  V  A  A  E  I  K  R  W  G  T  W  Y  A  N  E  L  Q
205
     1150       1160       1170       1180       1190       1200
TTGGACGGTTTCCGTCTTGATGCTGTCAAACACATTAAATTTTCTTTTTTGCGGGATTGG
 L  D  G  F  R  L  D  A  V  K  H  I  K  F  S  F  L  R  D  W
225
     1210       1220       1230       1240       1250       1260
GTTAATCATGTCAGGGAAAAAACGGGGAAGGAAATGTTTACGGTAGCTGAATATTGGCAG
 V  N  H  V  R  E  K  T  G  K  E  M  F  T  V  A  E  Y  W  Q
245
     1270       1280       1290       1300       1310       1320
AATGACTTGGGCGCGCTGGAAAACTATTTGAACAAAACAAATTTTAATCATTCAGTGTTT
 N  D  L  G  A  L  E  N  Y  L  N  K  T  N  F  N  H  S  V  F
265
     1330       1340       1350       1360       1370       1380
GACGTGCCGCTTCATTATCAGTTCCATGCTGCATCGACACAGGGAGGCGGCTATGATATG
 D  V  P  L  H  Y  Q  F  H  A  A  S  T  Q  G  G  G  Y  D  M
285
     1390       1400       1410       1420       1430       1440
AGGAAATTGCTGAACGGTACGGTCGTTTCCAAGCATCCGTTGAAATCGGTTACATTTGTC
 R  K  L  L  N  G  T  V  V  S  K  H  P  L  K  S  V  T  F  V
305
     1450       1460       1470       1480       1490       1500
GATAACCATGATACACAGCCGGGGCAATCGCTTGAGTCGACTGTCCAAACATGGTTTAAG
 D  N  H  D  T  Q  P  G  Q  S  L  E  S  T  V  Q  T  W  F  K
325
     1510       1520       1530       1540       1550       1560
CCGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCACAAGGGAATCTGGATACCCTCAGGTTTTCTACGGG
 P  L  A  Y  A  F  I  L  T  R  E  S  G  Y  P  Q  V  F  Y  G
345
     1570       1580       1590       1600       1610       1620
GATATGTACGGGACGAAAGGAGACTCCCAGCGCGAAATTCCTGCCTTGAAACACAAAATT
 D  M  Y  G  T  K  G  D  S  Q  R  E  I  P  A  L  K  H  K  I
365
     1630       1640       1650       1660       1670       1680
GAACCGATCTTAAAAGCGAGAAAACAGTATGCGTACGGAGCACAGCATGATTATTTCGAC
 E  P  I  L  K  A  R  K  Q  Y  A  Y  G  A  Q  H  D  Y  F  D
385
     1690       1700       1710       1720       1730       1740
CACCATGACATTGTCGGCTGGACAAGGGAAGGCGACAGCTCGGTTGCAAATTCAGGTTTG
 H  H  D  I  V  G  W  T  R  E  G  D  S  S  V  A  N  S  G  L
405
     1750       1760       1770       1780       1790       1800
GCGGCATTAATAACAGACGGACCCGGTGGGGCAAAGCGAATGTATGTCGGCCGGCAAAAC
 A  A  L  I  T  D  G  P  G  G  A  K  R  M  Y  V  G  R  Q  N
425
```

图 2（续）

```
      1810       1820       1830       1840       1850       1860
GCCGGTGAGACATGGCATGACATTACCGGAAACCGTTCGGAGCCGGTTGTCATCAATTCG
 A  G  E  T  W  H  D  I  T  G  N  R  S  E  P  V  V  I  N  S
445
      1870       1880       1890       1900       1910       1920
GAAGGCTGGGGAGAGTTTCACGTAAACGGCGGGTCGGTTTCAATTTATGTTCAAAGATAG
 E  G  W  G  E  F  H  V  N  G  G  S  V  S  I  Y  V  Q  R
465                                                        483
      1930       1940       1950       1960       1970       1980
AAGAGCAGAGAGGACGGATTTCCTGAAGGAAATCCGTTTTTTTATTTTGCCCGTCTTATA

      1990       2000       2010       2020       2030       2040
AATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAACAAAGTGTCATCAGCCCTCAGGAAGG

      2050       2060       2070       2080       2090       2100
ACTTGCTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGGCGGGGATGAAATGGCAACGTTATCTGAT

      2110       2120       2130       2140
GTAGCAAAGAAAGCAAATGTGTCGAAAATGACGGTATCGCGGGTGATCA
```

图 2 (续)

```
        10         20         30         40         50         60
AATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTT

        70         80         90        100        110        120
TTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCAAGCTAATTCACCTC

       130        140        150        160        170        180
GAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAG

       190        200        210        220        230        240
ATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCAAGCTCTGCCTCGCGCGTTTCGGTG

       250        260        270        280        290        300
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG

       310        320        330        340        350        360
CGGATGCAGATCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGC

       370        380        390        400        410        420
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTT

       430        440        450        460        470        480
CCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAG

       490        500        510        520        530        540
GGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTT

       550        560        570        580        590        600
CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT

       610        620        630        640        650        660
TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATT

       670        680        690        700        710        720
CTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTT

       730        740        750        760        770        780
AACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTGATCTGCGCTCG

       790        800        810        820        830        840
GTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA

       850        860        870        880        890        900
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC

       910        920        930        940        950        960
CGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCAC

       970        980        990       1000       1010       1020
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG

      1030       1040       1050       1060       1070       1080
TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC

      1090       1100       1110       1120       1130       1140
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTAT
```

Fig 3

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAG

1210 1220 1230 1240 1250 1260
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC

1270 1280 1290 1300 1310 1320
TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT

1330 1340 1350 1360 1370 1380
GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA

1510 1520 1530 1540 1550 1560
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC

1630 1640 1650 1660 1670 1680
CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT

1690 1700 1710 1720 1730 1740
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCA

1750 1760 1770 1780 1790 1800
TCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT

1810 1820 1830 1840 1850 1860
GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA

1870 1880 1890 1900 1910 1920
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC

1930 1940 1950 1960 1970 1980
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG

1990 2000 2010 2020 2030 2040
CGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCT

2050 2060 2070 2080 2090 2100
TCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAA

2110 2120 2130 2140 2150 2160
AAAGCCGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA

2170 2180 2190 2200 2210 2220
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC

2230 2240 2250 2260 2270 2280

图 3 (续)

TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG

2290 2300 2310 2320 2330 2340
AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA

2350 2360 2370 2380 2390 2400
GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG

2410 2420 2430 2440 2450 2460
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTC

2470 2480 2490 2500 2510 2520
ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG

2530 2540 2550 2560 2570 2580
GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCAGACAG

2590 2600 2610 2620 2630 2640
TTTTATTGTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGA

2650 2660 2670 2680 2690 2700
CACAACGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGACTCCCCGCGCGCGATG

2710 2720 2730 2740 2750 2760
GGTCGAATTTGCTTTCGAAAAAAAAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTAAAAAAAAGCCCGCT

2770 2780 2790 2800 2810 2820
CATTAGGCGGGCTCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGC

2830 2840 2850 2860 2870 2880
AACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACT

2890 2900 2910 2920 2930 2940
CATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGG

2950 2960 2970 2980 2990 3000
CATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGC

3010 3020 3030 3040 3050 3060
CCATAGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTCGCCACGTTTAAATCAAAACTGG

3070 3080 3090 3100 3110 3120
TGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTAGGGA

3130 3140 3150 3160 3170 3180
AATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCC

3190 3200 3210 3220 3230 3240
GGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAA

3250 3260 3270 3280 3290 3300
CGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATAC

3310 3320 3330 3340 3350 3360
GAAATTCCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACT

图 3 (续)

```
      3370       3380       3390       3400       3410       3420
TGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTAAACGGTCTGGT

      3430       3440       3450       3460       3470       3480
TATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG

      3490       3500       3510       3520       3530       3540
ATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG

      3550       3560       3570       3580       3590       3600
AAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGT

      3610       3620       3630       3640       3650       3660
TGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCC

      3670       3680       3690       3700       3710       3720
CGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTA

      3730       3740       3750       3760       3770       3780
TTTATTCGAAGACGAAAGGGCATCGCGCGCGGGGAATTCGAGCTCGAGCTTACTCCCCAT

      3790       3800       3810       3820       3830       3840
CCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAA

      3850       3860       3870       3880       3890       3900
TTTCACACAGGAAACAGGATCCAAGGAGGTGATCTAGAGTCATGAAACAACAAAAACGGC
                                                  M  K  Q  Q  K  R

      3910       3920       3930       3940       3950       3960
TTTACGCCCGATTGCTGACGCTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAG
L  Y  A  R  L  L  T  L  L  F  A  L  I  F  L  L  P  H  S  A

      3970       3980       3990       4000       4010       4020
CAGCGGCGGCAAATCTTAATGGGACGCTGATGCAGTATTTTGAATGGTACATGCCCAATG
A  A  A  A  N  L  N  G  T  L  M  Q  Y  F  E  W  Y  M  P  N
         +1
      4030       4040       4050       4060       4070       4080
ACGGCCAACATTGGAAGCGTTTGCAAAACGACTCGGCATATTTGGCTGAACACGGTATTA
D  G  Q  H  W  K  R  L  Q  N  D  S  A  Y  L  A  E  H  G  I
18
      4090       4100       4110       4120       4130       4140
CTGCCGTCTGGATTCCCCCGGCATATAAGGGAACTAGTCAAGCGGATGTGGGCTACGGTG
T  A  V  W  I  P  P  A  Y  K  G  T  S  Q  A  D  V  G  Y  G
38
      4150       4160       4170       4180       4190       4200
CTTACGACCTTTATGATTTAGGGGAGTTTCATCAAAAAGGGACGGTTCGGACAAAGTACG
A  Y  D  L  Y  D  L  G  E  F  H  Q  K  G  T  V  R  T  K  Y
58
      4210       4220       4230       4240       4250       4260
GCACAAAAGGAGAGCTGCAATCTGCGATCAAAAGTCTTCATTCCCGCGACATTAACGTTT
G  T  K  G  E  L  Q  S  A  I  K  S  L  H  S  R  D  I  N  V
78
      4270       4280       4290       4300       4310       4320
ACGGGGATGTGGTCATCAACCACAAAGGCGGCGCTGATGCGACCGAAGATGTAACCGCGG
Y  G  D  V  V  I  N  H  K  G  G  A  D  A  T  E  D  V  T  A
98
```

图 3 (续)

```
      4330       4340       4350       4360       4370       438
TTGAAGTCGATCCCGCTGACCGCAACCGCGTAATTTCAGGAGAACACCTAATTAAAGCCT
V  E  V  D  P  A  D  R  N  R  V  I  S  G  E  H  L  I  K  A
118
      4390       4400       4410       4420       4430       4440
GGACACATTTTCATTTTCCGGGGCGCGGCAGCACATACAGCGATTTTAAATGGCATTGGT
W  T  H  F  H  F  P  G  R  G  S  T  Y  S  D  F  K  W  H  W
138
      4450       4460       4470       4480       4490       4500
ACCATTTTGACGGAACCGATTGGGACGAGTCCCGAAAGCTGAACCGCATCTATAAGTTTC
Y  H  F  D  G  T  D  W  D  E  S  R  K  L  N  R  I  Y  K  F
158
      4510       4520       4530       4540       4550       4560
AAGGAAAGGCTTGGGATTGGGAAGTTTCCAATGAAAACGGCAACTATGATTATTTGATGT
Q  G  K  A  W  D  W  E  V  S  N  E  N  G  N  Y  D  Y  L  M
178
      4570       4580       4590       4600       4610       4620
ATGCCGACATCGATTATGACCATCCTGATGTCGCAGCAGAAATTAAGAGATGGGGCACTT
Y  A  D  I  D  Y  D  H  P  D  V  A  A  E  I  K  R  W  G  T
198
      4630       4640       4650       4660       4670       4680
GGTATGCCAATGAACTGCAATTGGACGGTTTCCGTCTTGATGCTGTCAAACACATTAAAT
W  Y  A  N  E  L  Q  L  D  G  F  R  L  D  A  V  K  H  I  K
218
      4690       4700       4710       4720       4730       4740
TTTCTTTTTTGCGGGATTGGGTTAATCATGTCAGGGAAAAAACGGGGAAGGAAATGTTTA
F  S  F  L  R  D  W  V  N  H  V  R  E  K  T  G  K  E  M  F
238
      4750       4760       4770       4780       4790       4800
CGGTAGCTGAATATTGGCAGAATGACTTGGGCGCCCTGGAAAACTATTTGAACAAAACAA
T  V  A  E  Y  W  Q  N  D  L  G  A  L  E  N  Y  L  N  K  T
258
      4810       4820       4830       4840       4850       4860
ATTTTAATCATTCAGTGTTTGACGTGCCGCTTCATTATCAGTTCCATGCTGCATCGACAC
N  F  N  H  S  V  F  D  V  P  L  H  Y  Q  F  H  A  A  S  T
278
      4870       4880       4890       4900       4910       4920
AGGGAGGCGGCTATGATATGAGGAAATTGCTGAACGGTACGGTCGTTTCCAAGCATCCGT
Q  G  G  G  Y  D  M  R  K  L  L  N  G  T  V  V  S  K  H  P
298
      4930       4940       4950       4960       4970       4980
TGAAATCGGTTACATTTGTCGATAACCATGATACACAGCCGGGGCAATCGCTTGAGTCGA
L  K  S  V  T  F  V  D  N  H  D  T  Q  P  G  Q  S  L  E  S
318
      4990       5000       5010       5020       5030       5040
CTGTCCAAACATGGTTTAAGCCGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCACAAGGGAATCTGGAT
T  V  Q  T  W  F  K  P  L  A  Y  A  F  I  L  T  R  E  S  G
338
      5050       5060       5070       5080       5090       5100
ACCCTCAGGTTTTCTACGGGGATATGTACGGGACGAAAGGAGACTCCCAGCGCGAAATTC
Y  P  Q  V  F  Y  G  D  M  Y  G  T  K  G  D  S  Q  R  E  I
358
      5110       5120       5130       5140       5150       5160
CTGCCTTGAAACACAAAATTGAACCGATCTTAAAAGCGAGAAAACAGTATGCGTACGGAG
P  A  L  K  H  K  I  E  P  I  L  K  A  R  K  Q  Y  A  Y  G
378
```

图 2 （续一）

```
      5170       5180       5190       5200       5210       5220
CACAGCATGATTATTTCGACCACCATGACATTGTCGGCTGGACAAGGGAAGGCGACAGCT
A  Q  H  D  Y  F  D  H  H  D  I  V  G  W  T  R  E  G  D  S
398
      5230       5240       5250       5260       5270       5280
CGGTTGCAAATTCAGGTTTGGCGGCATTAATAACAGACGGACCCGGTGGGGCAAAGCGAA
S  V  A  N  S  G  L  A  A  L  I  T  D  G  P  G  G  A  K  R
418
      5290       5300       5310       5320       5330       5340
TGTATGTCGGCCGGCAAAACGCCGGTGAGACATGGCATGACATTACCGGAAACCGTTCGG
M  Y  V  G  R  Q  N  A  G  E  T  W  H  D  I  T  G  N  R  S
438
      5350       5360       5370       5380       5390       5400
AGCCGGTTGTCATCAATTCGGAAGGCTGGGGAGAGTTTCACGTAAACGGCGGGTCGGTTT
E  P  V  V  I  N  S  E  G  W  G  E  F  H  V  N  G  G  S  V
458
      5410       5420       5430       5440       5450       5460
CAATTTATGTTCAAAGATAGGTGACCAGAGAGGACGGATTTCCTGAAGGAAATCCGTTTT
S  I  Y  V  Q  R
478
      5470       5480       5490       5500       5510       5520
TTTATTTTGCCCGTCTTATAAATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAACAAAGT

      5530       5540       5550       5560       5570       5580
GTCATCAGCCCTCAGGAAGGACTTGCTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGGCGGGGATG

      5590       5600       5610       5620       5630       5640
AAATGGCAACGTTATCTGATGTAGCAAAGAAAGCAAATGTGTCGAAAATGACGGTATCGC

      5650       5660       5670
GGGTGATCCTCTAGAAGAAGCTTGGTCTAGAGGTCGA
```

图 3 (续)

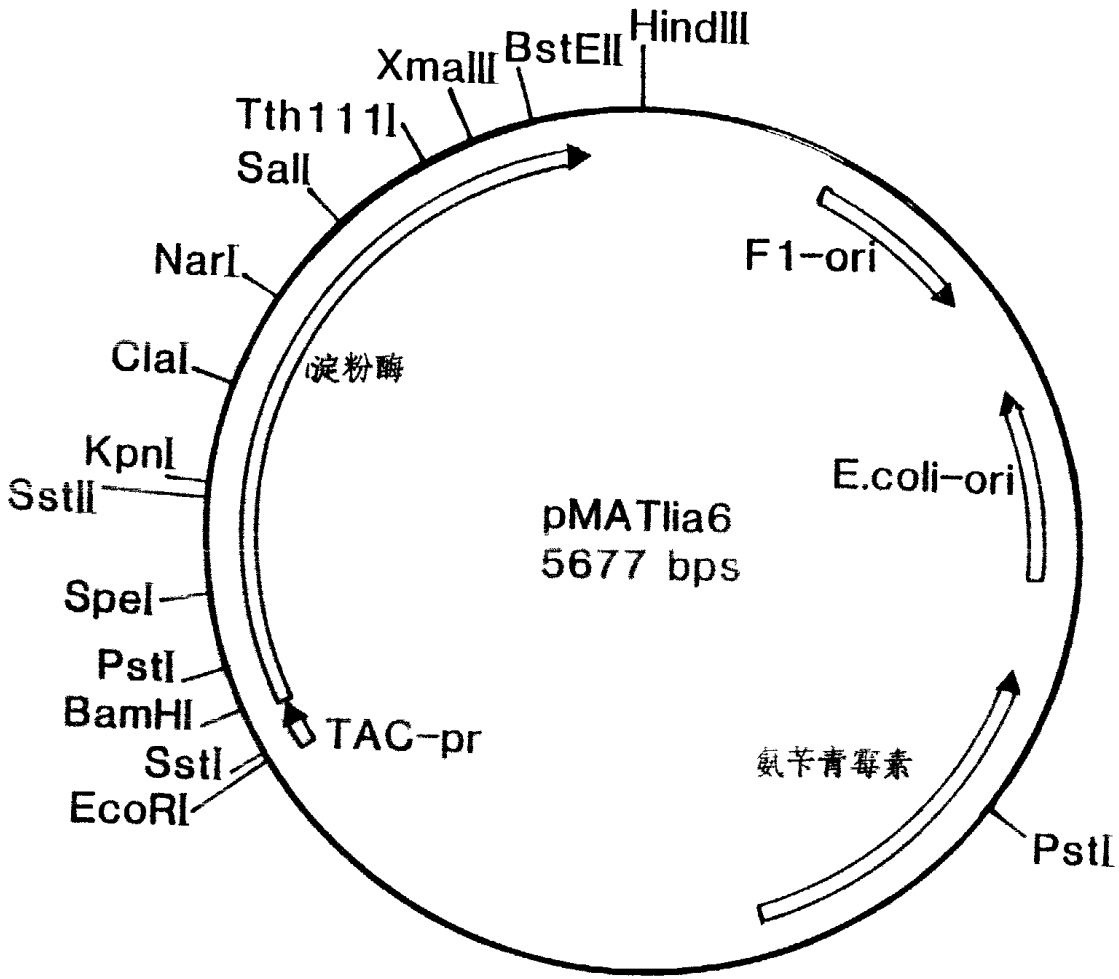

HindIII
BstEII
XmaIII
Tth111I
SalI
NarI
ClaI
KpnI
SstII
SpeI
PstI
BamHI
SstI
EcoRI
淀粉酶
TAC-pr
pMATlia6
5677 bps
F1-ori
E.coli-ori
氨苄青霉素
PstI

图 4

枯草芽孢杆菌基因盒
R.
α－淀粉酶
（野生型和／或突变的）
REP B (ORI B.S.)
（来自 pUB110）
KANR
（来自 pUB110）
P
（例如 SPO2）
R
fdT
F1-ORI
ORI
BLA
CAT
pBMa/c
~8kb
pMa/c 部分

图 5

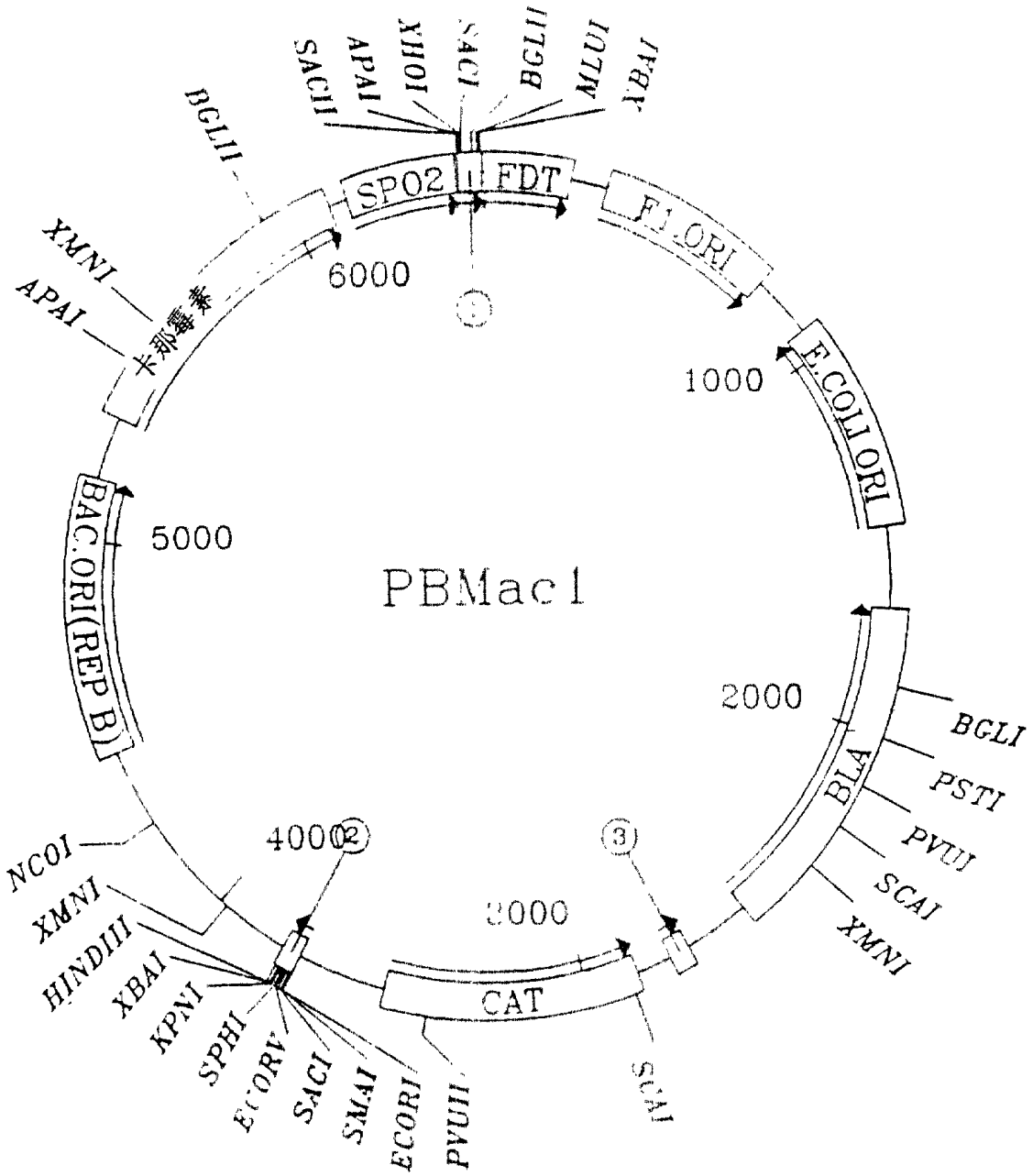

PBMac1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
SP02
FDT
F1 ORI
E.COLI ORI
BLA
CAT
BAC.ORI(REP B)
卡那霉素
BGLII
XMNI
APAI
SACII
APAI
XHOI
SACI
BGLII
MLUI
XBAI
BGLI
PSTI
PVUI
SCAI
XMNI
SCAI
PVUII
ECORI
SMAI
SACI
ECORV
SPHI
KPNI
XBAI
HINDIII
XMNI
NCOI

图 6

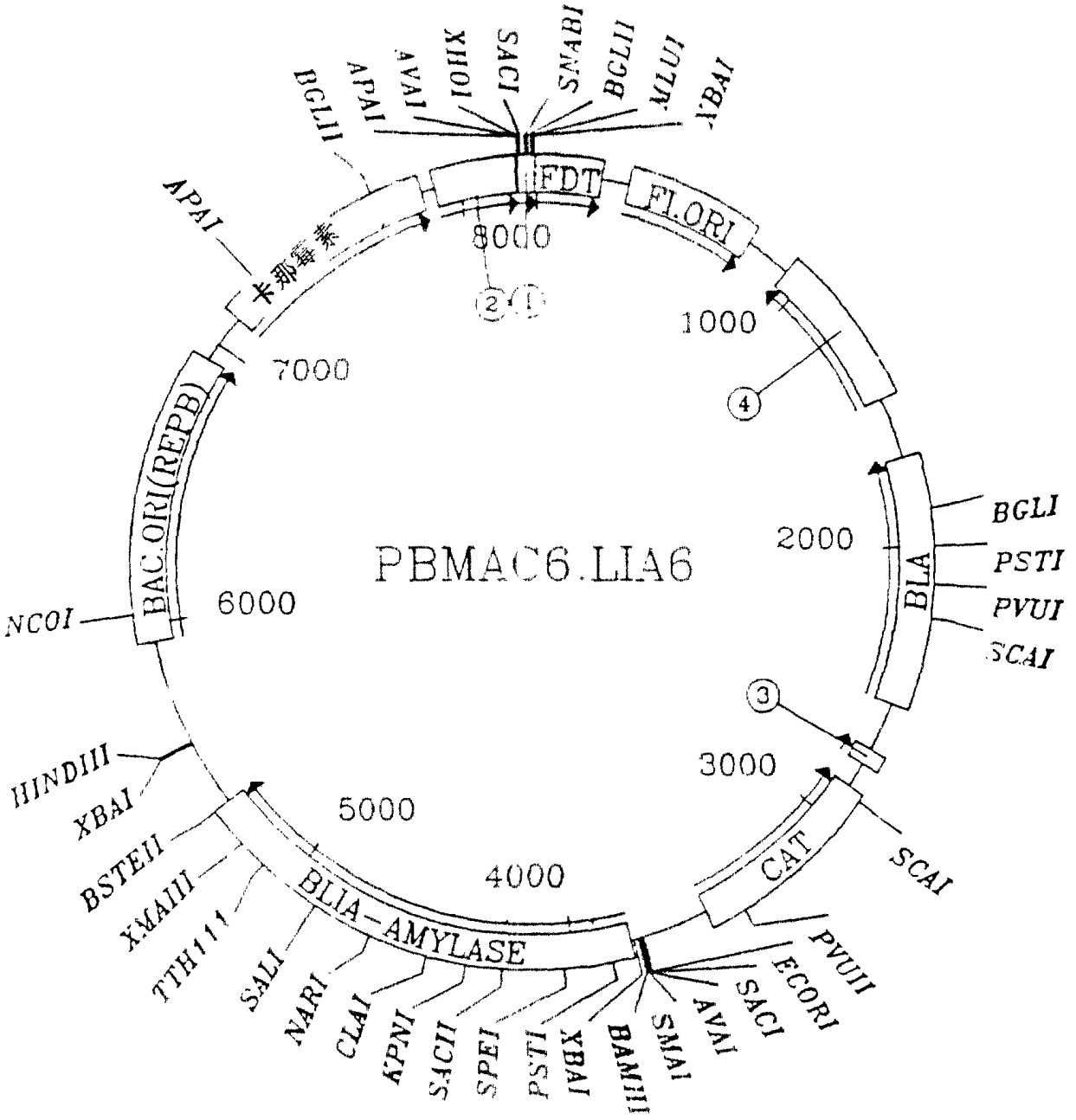

PBMAC6.LIA6
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
FDT
F1.ORI
BLA
CAT
BLIA-AMYLASE
卡那霉素
BAC.ORI(REPB)
BGLI
PSTI
PVUI
SCAI
SCAI
PVUII
ECORI
SACI
AVAI
SMAI
BAMHI
XBAI
PSTI
SPEI
SACII
KPNI
CLAI
NARI
SALI
TTH111
XMAIII
BSTEII
XBAI
HINDIII
NCOI
APAI
BGLII
APAI
AVAI
XHOI
SACI
SNABI
BGLII
MLUI
XBAI

图 7

EcoR1

GAATTCGAGCTCGAGCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATA

BamHI

ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGGATCCGCGGATCCGTG

------>phoA

GAGAAAATAAA GTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC

M K Q S T I A L A L L P L L F T

CCTGTGACAAAAGCG GCAAAT

P V T K A A N

------>淀粉酶

图 3

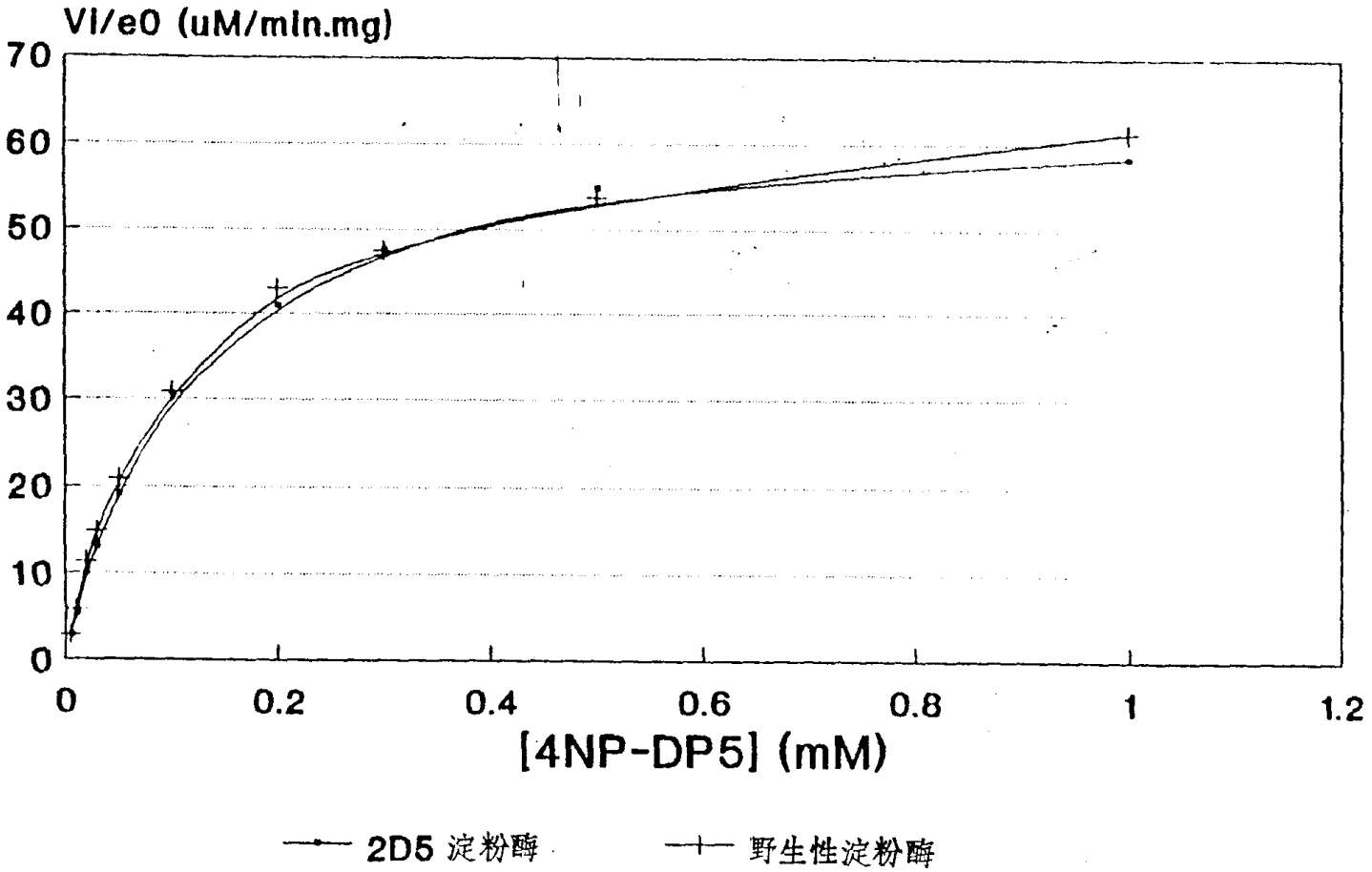

Vl/e0 (uM/mln.mg)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
[4NP-DP5] (mM)
2D5 淀粉酶
野生性淀粉酶

图 9

PH 5・5条件下的热失活

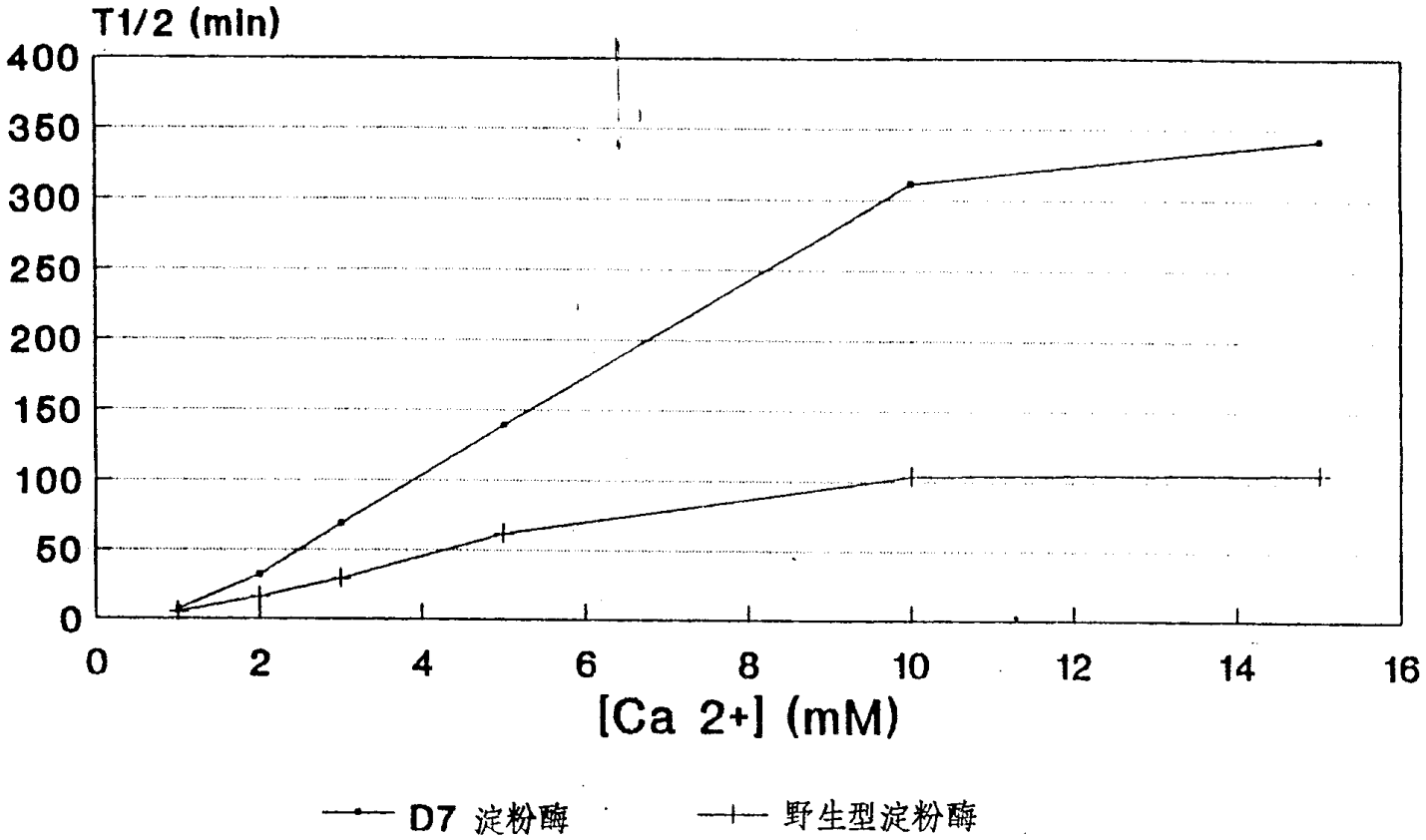


图 10

PH7·0条件下的热失活

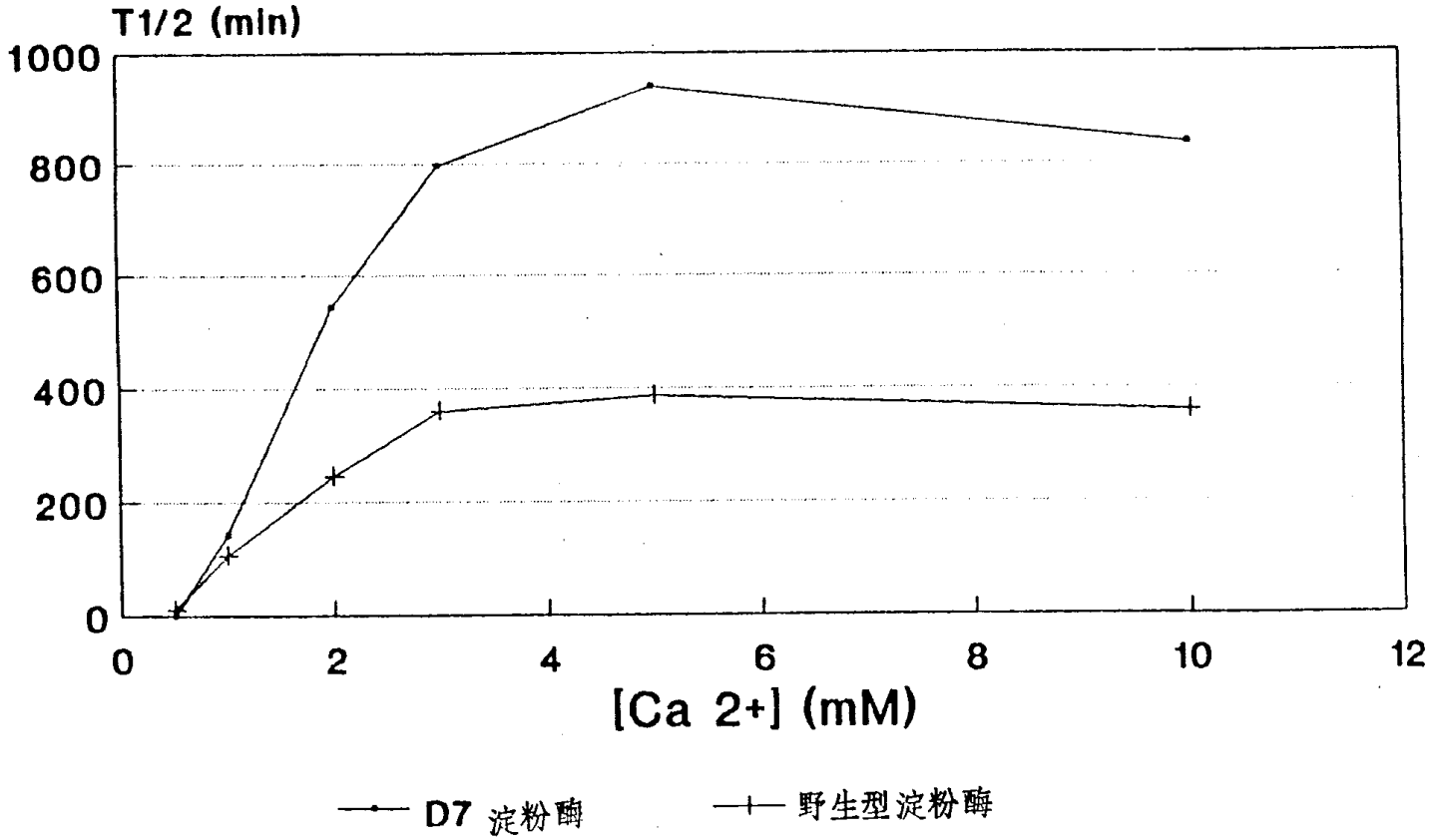


图 11

2 D 5 淀粉酶的热失活

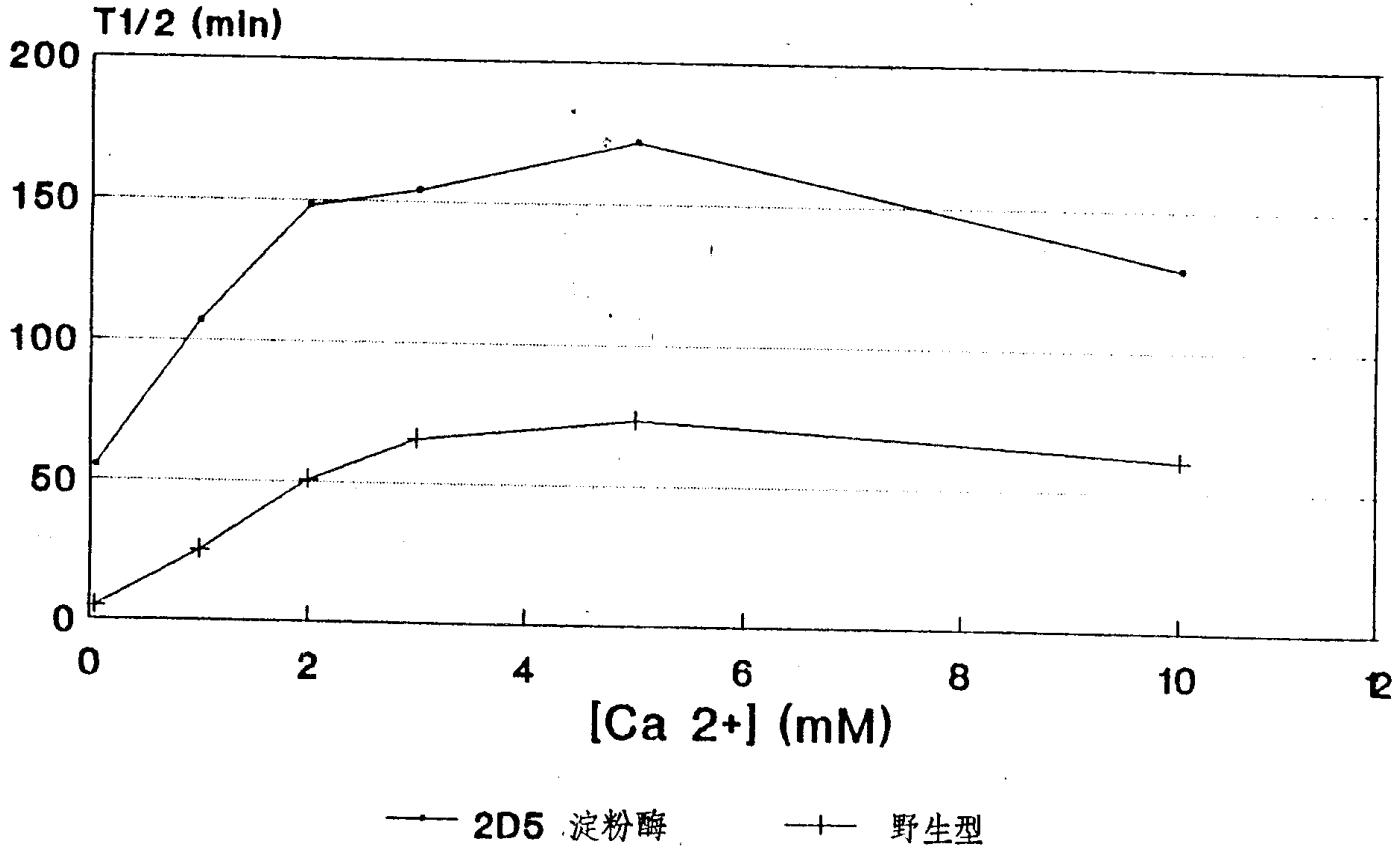


图 12

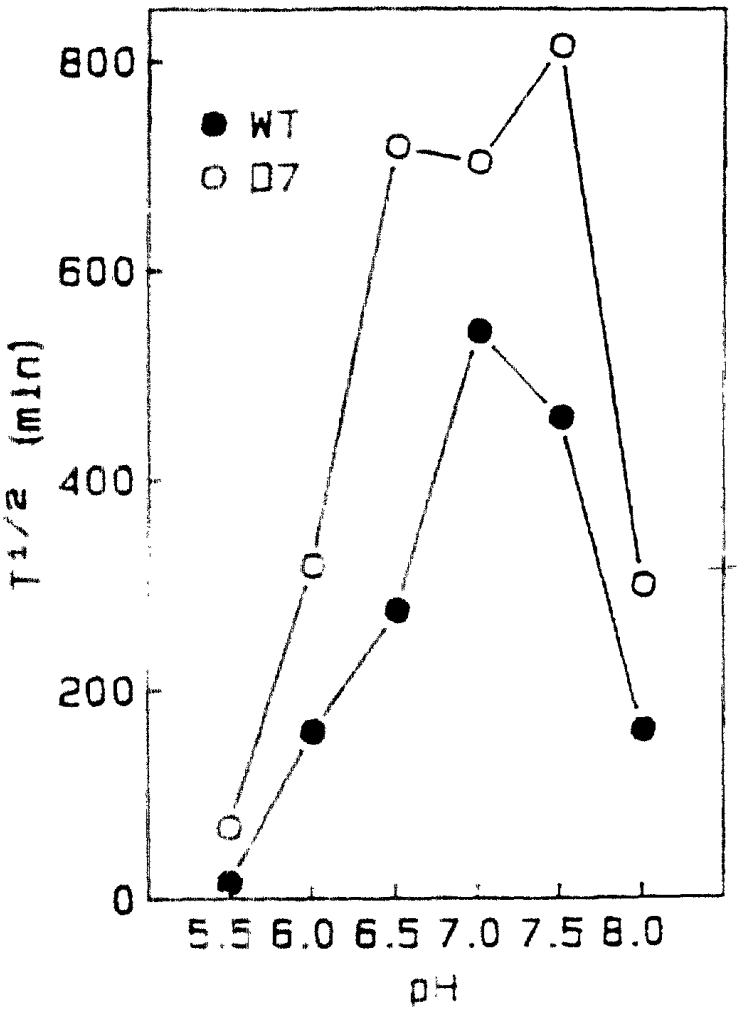


図 13

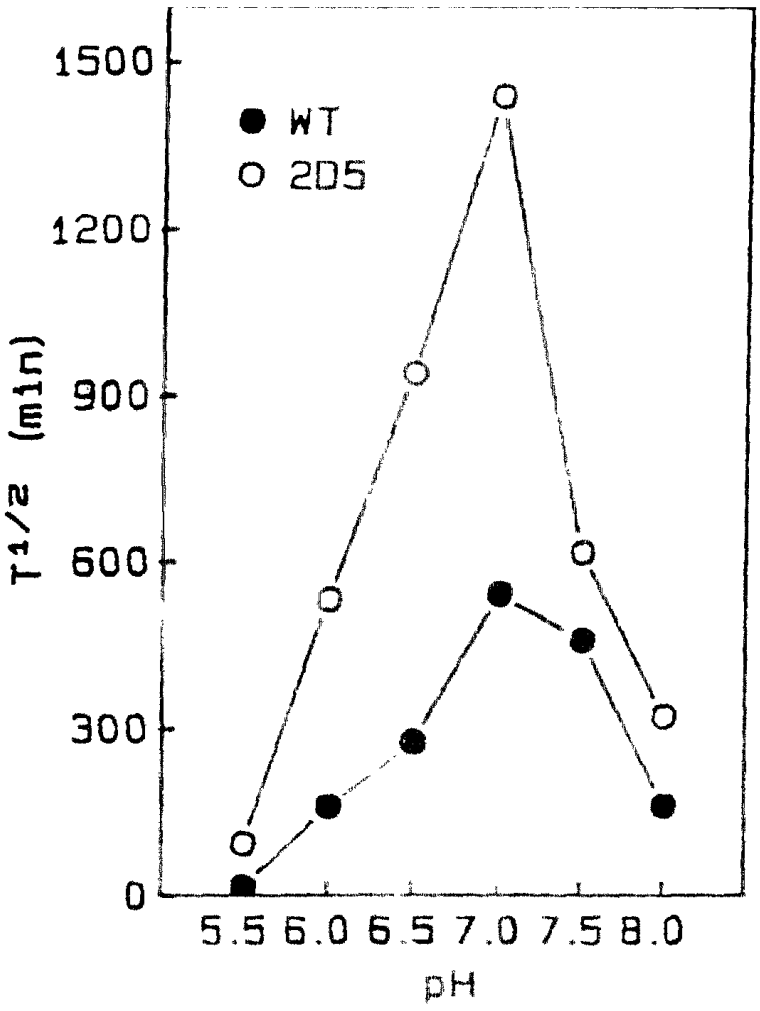


図 14

110℃条件下液化

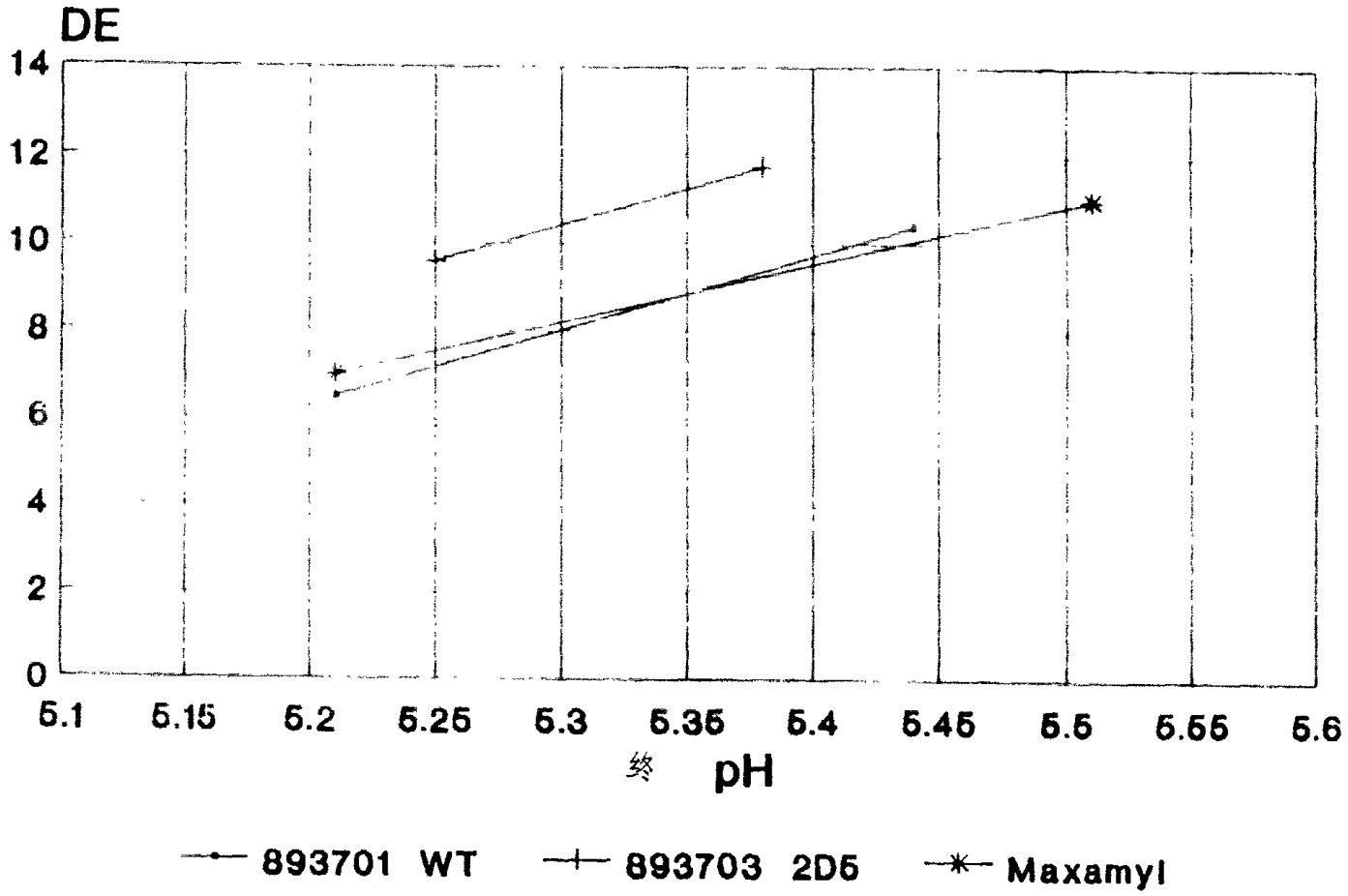


图 15