



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101945999 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 08

(21) 申请号 200980105640. 6

(22) 申请日 2009. 02. 19

(30) 优先权数据

08003054. 7 2008. 02. 19 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/001206 2009. 02. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/103540 DE 2009. 08. 27

(73) 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 D · 海因德尔 C · 霍恩

C · 加斯勒迪切 J · 霍内斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 权陆军 李连涛

(51) Int. Cl.

C12N 9/96(2006. 01)

C12N 9/06(2006. 01)

C12Q 1/32(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 9833936 A1, 1998. 08. 06,

WO 0149247 A2, 2001. 07. 12,

WO 2007012494 A1, 2007. 02. 01,

US 20070026476 A1, 2007. 02. 01,

审查员 赵鹏

权利要求书1页 说明书11页

序列表5页 附图25页

(54) 发明名称

使用稳定辅酶的脱氢酶稳定作用

(57) 摘要

本发明涉及通过在稳定辅酶的存在下贮藏酶用于使酶稳定的方法。此外,本发明涉及使用稳定辅酶稳定的酶及其在用于检测分析物的测试元件中的用途。

1. 用于使酶稳定的方法, 其特征在于所述酶在稳定辅酶的存在下进行贮藏, 其中所述酶是选自醇脱氢酶和葡萄糖脱氢酶的脱氢酶, 且所述稳定辅酶是carbaNAD。

2. 根据权利要求1的方法, 其特征在于葡萄糖脱氢酶用作酶。

3. 根据权利要求1-2中任一项的方法, 其特征在于用稳定辅酶稳定的酶贮藏至少2周的时间段。

4. 根据权利要求1-2中任一项的方法, 其特征在于用稳定辅酶稳定的酶贮藏于至少20℃的温度下。

5. 根据权利要求1-2中任一项的方法, 其特征在于用稳定辅酶稳定的酶无需干燥试剂进行贮藏。

6. 根据权利要求1-2中任一项的方法, 其特征在于用稳定辅酶稳定的酶贮藏于至少50%的相对湿度下。

7. 根据权利要求1-2中任一项的方法, 其特征在于用稳定辅酶稳定的酶的贮藏作为干物质发生。

8. 根据权利要求1-2中任一项的方法, 其特征在于用稳定辅酶稳定的酶的贮藏发生在液相中。

9. 根据权利要求1-2中任一项的方法, 其特征在于用稳定辅酶稳定的酶的贮藏发生在测试元件上。

10. 用稳定辅酶稳定的酶, 其特征在于它显示在至少20℃的温度下, 在合适时连同至少50%的相对湿度且无需干燥试剂, 贮藏至少2周后, 与最初水平相比较, 所述酶促活性中的下降小于50%, 其中所述酶是突变的葡萄糖脱氢酶, 且所述突变的葡萄糖脱氢酶与相应的野生型葡萄糖脱氢酶相比具有增加的热或水解稳定性, 其中所述突变的葡萄糖脱氢酶由SEQ ID NO.:1中所示的氨基酸序列或SEQ ID NO.:2中所示的氨基酸序列组成, 且其中所述稳定辅酶是carbaNAD。

11. 用于测定分析物的检测试剂, 其包括根据权利要求10的稳定的酶。

12. 测试元件, 其特征在于它包括根据权利要求10的稳定的酶或根据权利要求11的检测试剂。

使用稳定辅酶的脱氢酶稳定作用

[0001] 本发明涉及通过在稳定辅酶的存在下贮藏酶使酶稳定的方法。本发明进一步涉及用稳定辅酶稳定的酶,及其在用于检测分析物的测试元件中的用途。

[0002] 生物化学测量系统是临床相关的分析方法的重要组成成分。本文优先考虑的事是测量分析物例如代谢物或底物,其借助于酶直接或间接进行测定。分析物在这种情况下借助于酶-辅酶复合物进行转变,并且随后进行定量。这需要待测定的分析物与合适的酶和辅酶接触,其中酶通常以催化量使用。辅酶通过酶促反应得到改变,例如被氧化或还原。这个过程可以直接,或通过介质电化学或光度测定地进行检测。校准提供量度和待测定的分析物浓度之间的正相关关系。

[0003] 辅酶是与酶共价或非共价结合,并且通过分析物的转变而改变的有机分子。辅酶的突出例子分别是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP),由其通过还原分别产生NADH和NADPH。

[0004] 现有技术中已知的测量系统因对于有限时间段稳定,以及为了达到这种稳定性对环境的特定需求例如冷却贮藏或干燥贮藏而著称。对于具体应用,例如由最终用户自身执行的测试,例如在血糖的自我监控中,通过不正确、不引人注意的错误贮藏发生不正确的结果因此是可能的。通过主要包装打开太长时间的干燥剂耗尽特别可能导致错误测量,这对于一些系统几乎不会被用户鉴别出。

[0005] 用于增加生物化学测量系统的稳定性的一种已知措施是使用稳定的酶,例如使用来自嗜热生物的酶。进一步的可能性是通过化学修饰例如交联或通过诱变使酶稳定。此外,还可以添加酶稳定剂例如海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮和血清清蛋白,或可以在聚合物网络中例如通过光聚合而封入酶。

[0006] 还已进行通过使用稳定的介质来改善生物化学测量系统的稳定性的尝试。因此,通过使用具有尽可能低的氧化还原电位的介质,测试的特异性增加,并且在反应过程中的干扰被消除。然而,酶/辅酶复合物的氧化还原电位形成对于介质的氧化还原电位的下限。低于这些电位,与介质的反应减慢或甚至停止。

[0007] 可替代可能性也是使用不含介质的生物化学测量系统,其中例如存在辅酶例如辅酶NADH的直接检测。然而,此种测量系统的一个缺点是辅酶例如NAD和NADP是不稳定的。

[0008] NAD和NADP是对碱不稳定的分子,其降解途径在文献中得到描述(N.J.Oppenheimer in The Pyridine Nucleotide Coenzymes, Academic Press New York, London 1982, 编辑J.Everese, B.Anderson, K.You, 第3章, 第56-65页)。NAD和NADP的降解通过切割核糖和吡啶单位之间的糖基键分别基本上导致ADP-核糖。另一方面还原型NADH和NADPH是对酸不稳定的:例如,表异构化是一种已知的降解途径。在两种情况下,NAD/NADP和NADH/NADPH的不稳定性都来源于核糖单位和吡啶单位之间的糖基键的不稳定性。然而,即使在不急剧的条件下,例如在水溶液中,辅酶NAD和NADP分别仅通过环境水分而水解。这种不稳定性可能导致分析物测量中的不精确。

[0009] 许多NAD/NADP衍生物例如在B.M.Anderson in The Pyridine Nucleotide Coenzymes, Academic Press New York, London 1982, 编辑J.Everese, B.Anderson, K.You,

第4章中得到描述。然而,这些衍生物中的大多数不由酶良好接受。迄今为止因此已用于诊断测试的唯一衍生物是3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸(乙酰NAD),其在1956年首次得到描述(N.O.Kaplan,J.Biol.Chem.(1956),221,823)。这种辅酶也显示由酶的弱接受和氧化还原电位中的改变。

[0010] WO 01/94370描述了具有经修饰的吡啶基团的进一步NAD衍生物的使用。然而,烟酰胺基团的修饰一般而言对催化反应具有直接影响。在大多数情况下,这种影响是负面的。

[0011] 在关于稳定作用的进一步想法中,核糖单位已进行改变,以从而影响糖基键的稳定性。这个程序不直接干扰烟酰胺基团的催化反应。然而,一旦酶显示出与核糖单位的强烈和特异性结合,就可能存在间接影响。Kaufmann等人在这方面在WO 98/33936和US 5,801,006以及WO 01/49247中分别公开了许多硫代核糖(thioribose)-NAD衍生物。然而,迄今为止仍未显示出烟酰胺-核糖单位的修饰和衍生物在酶促反应中的活性之间的联系。

[0012] 不含糖基键的衍生物CarbNAD在1988年首次得到描述(J.T.Slama,Biochemistry 1989,27,183和Biochemistry 1989,28,7688)。其中的核糖由碳环糖单位替换。尽管carbNAD描述为脱氢酶的底物,但它的活性迄今为止仍未在临床上在生物化学检测方法中得到证实。

[0013] 类似方法随后由G.M.Blackburn,Chem.Comm.,1996,2765进行描述,以用亚甲基双磷酸盐化合物代替天然的焦磷酸盐制备carbNAD。亚甲基双磷酸盐显示对于磷酸酶增加的稳定性并且用作ADP-核糖基环化酶的抑制剂。水解稳定性中的增加不是目的(J.T.Slama,G.M.Blackburn)。

[0014] WO 2007/012494和US 11/460,366分别公开了稳定的NAD/NADH和NADP/NADPH衍生物,这些衍生物的酶复合物及其在生物化学检测方法和试剂盒中的用途。

[0015] 本发明所基于的目的是提供用于使酶稳定,特别是用于酶的长期稳定作用的方法。

[0016] 这个目的通过用于使酶稳定的方法来达到,其中酶在稳定辅酶的存在下进行贮藏。已令人惊讶地发现借助于稳定辅酶,在高相对湿度或甚至在液相中和在升高的温度下几周或几月的长期稳定作用是可能的。这个认识是令人惊讶的,因为已知尽管在天然辅酶的存在下酶具有数小时的增加的短期稳定性(Bertoldi等人,Biochem.J.389,(2005),885-898;van den Heuvel等人,(J.Biol.Chem.280(2005),32115-32121;和Pan等人,(J.Chin.Biochem.Soc.第3卷(1974),第1-8页),但它们显示在较长时间段期间的较低稳定性(Nutrition Reviews 36(1978),251-254)。

[0017] 与对于现有技术来说的这些认识相比较,令人惊讶的是,酶在稳定辅酶的存在下具有比酶在天然辅酶的存在下显然增加的长期稳定性,这尤其是因为稳定辅酶对于酶具有比天然辅酶更低的结合常数。

[0018] 通过本发明的方法得到稳定的酶是辅酶依赖性酶。合适的酶的例子是选自下述的脱氢酶:葡糖脱氢酶(E.C.1.1.1.47)、乳酸脱氢酶(E.C.1.1.1.27、1.1.1.28)、苹果酸脱氢酶(E.C.1.1.1.37)、甘油脱氢酶(E.C.1.1.1.6)、醇脱氢酶(E.C.1.1.1.1)、 α -羟丁酸脱氢酶、山梨糖醇脱氢酶或氨基酸脱氢酶,例如L-氨基酸脱氢酶(E.C.1.4.1.5)。进一步合适的酶是氧化酶,例如葡糖氧化酶(E.C.1.1.3.4)或胆固醇氧化酶(E.C.1.1.3.6)和氨基转移酶,分别地,例如天冬氨酸或丙氨酸氨基转移酶、5'-核苷酸酶或肌酸激酶。酶优选是葡糖脱

氢酶。

[0019] 已证明在本发明方法的背景中采用突变的葡萄糖脱氢酶是特别优选的。如在本申请的背景中使用的,术语“突变体”指天然酶的基因修饰变体,其尽管氨基酸数目是相同的,但具有与野生型酶相比较经修饰的氨基酸序列,即在至少一个氨基酸中不同于野生型酶。一个或多个突变的引入可以位点特异性地发生或非位点特异性地发生,优选通过使用本领域已知的重组方法位点特异性地发生,然而,适合于具体需求和条件,发生在天然酶的氨基酸序列内的至少一个氨基酸交换。与野生型酶相比较,突变体特别优选具有增加的热或水解稳定性。

[0020] 突变的葡萄糖脱氢酶原则上可以包括通过与相对应的野生型葡萄糖脱氢酶相比较,在其氨基酸序列中在任何位置处进行修饰的一个或多个氨基酸。突变的葡萄糖脱氢酶优选包括在野生型葡萄糖脱氢酶的氨基酸序列的位置96、170和252中至少一个处的突变,特别优选具有在位置96和位置170处的突变,以及在位置170和位置252处的突变的突变体。已证明对于突变的葡萄糖脱氢酶不包括除这些突变外的进一步突变是有利的。

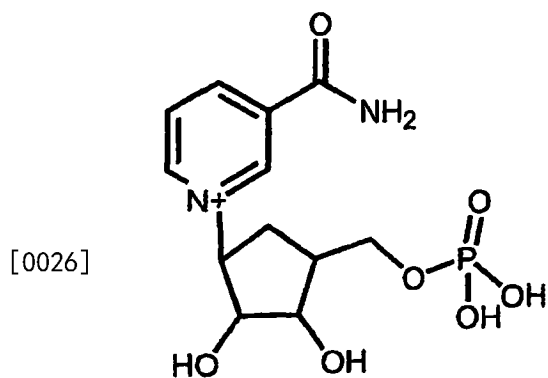
[0021] 在位置96、170和252处的突变原则上可以包括野生型酶的任何氨基酸交换,其导致稳定作用,例如热或水解稳定性中的增加。在位置96处的突变优选包括谷氨酸对于甘氨酸的氨基酸交换,而就位置170而言,谷氨酸对于精氨酸或赖氨酸的氨基酸交换,特别地谷氨酸对于赖氨酸的氨基酸交换是优选的。就在位置252处的突变而言,这优选包括赖氨酸对于亮氨酸的氨基酸交换。

[0022] 突变的葡萄糖脱氢酶可以通过衍生自任何生物学来源的野生型葡萄糖脱氢酶的突变而获得,其中术语“生物学来源”在本发明的背景中包括原核生物例如细菌,和真核生物例如哺乳动物和其他动物。野生型葡萄糖脱氢酶优选衍生自细菌,特别优选来自巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)特别是枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶。

[0023] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,突变的葡萄糖脱氢酶是通过来自枯草芽孢杆菌的野生型葡萄糖脱氢酶的突变获得的葡萄糖脱氢酶,其具有SEQ ID NO.:1(GlucDH_E96G_E170K)中所示的氨基酸序列或SEQ ID NO.:2(GlucDH_E170K_K252L)中所示的那种。

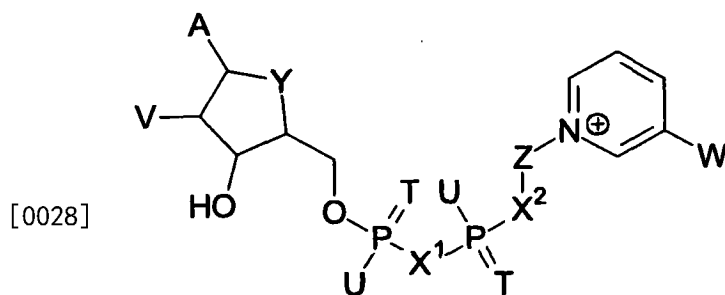
[0024] 稳定辅酶是通过与天然辅酶相比较已进行化学修饰,并且具有比天然辅酶更高的稳定性(例如,水解稳定性)的辅酶。稳定辅酶优选在测试条件下对水解是稳定的。与天然辅酶相比较,稳定辅酶可以具有对于酶减少的结合常数,例如减少二分之一或更多的结合常数。

[0025] 稳定辅酶的优选例子是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD/NADH)或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP/NADPH)的稳定衍生物,或截短的NAD衍生物,例如不含AMP部分或具有非核苷残基,例如疏水残基。在本发明的背景中同样优选作为稳定辅酶的是式(I)的化合物



(I)

[0027] NAD/NADH和NADP/NADPH的优选稳定衍生物在前述参考文献中得到描述,所述参考文献的公开内容在此特别引入作为参考。特别优选的稳定的辅酶分别在W02007/012494和US 11/460366中得到描述,所述专利的公开内容在此特别引入作为参考。稳定辅酶特别优选选自具有通式(II)的化合物



(II)

[0029] 其中

[0030] A=腺嘌呤或其类似物

[0031] T=在每种情况下独立地是O、S,

[0032] U=在每种情况下独立地是OH、SH、BH₃⁻、BCNH₂⁻,

[0033] V=在每种情况下独立地是OH或磷酸基,或形成环状磷酸基的2个基团;

[0034] W=COOR、CON(R)₂、COR、CSN(R)₂,其中R=在每种情况下独立地是H或C₁-C₂-烷基,

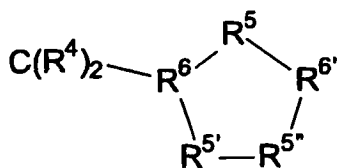
[0035] X¹、X²=在每种情况下独立地是O、CH₂、CHCH₃、C(CH₃)₂、NH、NCH₃,

[0036] Y=NH、S、O、CH₂,

[0037] Z=线性或环状有机原子团,条件是Z和吡啶残基不通过糖苷键连接,或其盐,或合适时,其还原形式。

[0038] 在式(II)的化合物中的Z优选是具有4-6个C原子、优选4个C原子的线性原子团,其中1或2个C原子任选由选自O、S和N的一个或多个杂原子替换,或包括环状基团和原子团CR⁴₂的原子团,所述环状基团具有5或6个C原子,并且任选包括选自O、S和N的杂原子和任选地一个或多个取代基,其中CR⁴₂与环状基团和X²键合,其中R⁴=在每种情况下独立地是H、F、Cl、CH₃。

[0039] Z特别优选是饱和或不饱和的碳环或杂环5-元环,特别是通式(III)的化合物,



[0040]

(III)

[0041] 其中在 $R^{5'}$ 和 $R^{5''}$ 之间可以存在单键或双键,其中

[0042] R^4 是在每种情况下独立地是H、F、Cl、 CH_3 ,

[0043] $R^5 = CR^4_2$,

[0044] 其中,如果在 $R^{5'}$ 和 $R^{5''}$ 之间存在单键,则 $R^{5'} = O$ 、S、NH、 NC_1-C_2 -烷基、 CR^4_2 、CHOH、 $CHOCH_3$,和

[0045] $R^{5''} = CR^4_2$ 、CHOH、 $CHOCH_3$,和

[0046] 其中,如果在 $R^{5'}$ 和 $R^{5''}$ 之间存在双键,则 $R^{5'} = R^{5''} = CR^4$,和

[0047] R^6 、 $R^{6'}$ 是在每种情况下独立地是CH或 CCH_3 。

[0048] 在优选实施方案中,本发明的化合物包括腺嘌呤或腺嘌呤类似物例如 C_8 -和 N_6 -取代的腺嘌呤、脱氮变体例如7-脱氮、氮杂变体例如8-氮杂或组合例如7-脱氮或8-氮杂或碳环类似物例如间型霉素,而7-脱氮变体可以在位置7中由卤素、 C_1-C_6 -炔基、-链烯基或-烷基取代。

[0049] 在进一步优选的实施方案中,化合物包括腺苷类似物,其代替核糖分别地包括例如2-甲氧基脱氧核糖、2'-氟脱氧核糖、己糖醇、阿卓糖醇和多环类似物,例如二环-、LNA-和三环-糖。

[0050] 特别在式(II)的化合物中对于二(磷酸盐)氧被各向同性(isotronically)替换也是可能的,例如 O^- 分别由 S^- 和 BH_3^- 替换, O 分别由NH、 NCH_3 和 CH_2 替换,以及 $=O$ 由 $=S$ 替换。

[0051] 在本发明的式(II)的化合物中,W优选是 $CONH_2$ 或 $COCH_3$ 。

[0052] 在式(III)的基团中的 R^5 优选是 CH_2 。对于 $R^{5'}$ 进一步优选选自 CH_2 、CHOH和NH。在特别优选的实施方案中, $R^{5'}$ 和 $R^{5''}$ 各自是CHOH。在再进一步优选的实施方案中, $R^{5'}$ 是NH,并且 $R^{5''}$ 是 CH_2 。优选的稳定的辅酶的特别例子在图1A和B中描述。

[0053] 在最优选的实施方案中,稳定辅酶是carbaNAD。

[0054] 本发明的方法特别适合于酶的长期稳定作用。这意味着用稳定辅酶稳定的酶在例如作为干物质贮藏例如至少2周、优选至少4周且特别优选至少8周的时间段时,相对于最初酶活性,显示出酶活性中优选小于50%、特别优选小于30%且最优选小于20%的下降。

[0055] 本发明的方法进一步包括用稳定辅酶稳定的酶在升高的温度下的贮藏,例如在至少20°C、优选至少25°C且特别优选至少30°C的温度。相对于其最初水平,在这种情况下酶活性下降优选小于50%、特别优选小于30%且最优选小于20%。

[0056] 通过根据本发明的稳定作用,如上所述甚至无需干燥试剂长期、和/或如上所述在高温下贮藏用稳定辅酶稳定的酶是可能的。进一步可能的是稳定的酶也在高相对湿度例如至少50%的相对湿度下贮藏,在所述情况下,相对于最初水平,酶活性下降优选小于50%、特别优选小于30%且最优选小于20%。

[0057] 用稳定辅酶稳定的酶的贮藏一方面可以作为干物质发生,并且另一方面可在液相中发生。稳定的酶的贮藏优选在测试元件上或测试元件中发生,所述测试元件适合于测定分析物。用稳定辅酶稳定的酶在这种情况下优选是检测试剂的组成成分,所述检测试剂在合适时也可以包括进一步的组成成分,例如盐、缓冲剂等。检测试剂在这种情况下优选不含介质。

[0058] 用稳定辅酶稳定的酶可以用于检测分析物,例如分别地在体液例如血液、血清、血浆或尿中,和在污水样品或食物产品中的参数。

[0059] 可以测定的分析物是可以通过氧化还原反应检测的任何生物学或化学物质,例如其为辅酶依赖性酶的底物或其自身为辅酶依赖性酶的物质。分析物的优选例子是葡萄糖、乳酸、苹果酸、甘油、醇、胆固醇、三酰甘油、抗坏血酸、半胱氨酸、谷胱甘肽、肽、尿素、铵、水杨酸盐、丙酮酸盐、5'-核苷酸酶、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、二氧化碳等。分析物优选是葡萄糖。

[0060] 本发明的另一个实施方案涉及本发明的化合物或根据本发明用稳定辅酶稳定的酶通过酶促反应用于检测样品中的分析物的用途。借助于葡萄糖脱氢酶(GlucDH)的葡萄糖检测在这方面是特别优选的。

[0061] 通过与分析物反应在稳定辅酶中的改变原则上可以以任何方式进行检测。原则上本文可能采用根据现有技术已知用于检测酶促反应的所有方法。然而,辅酶中的改变优选通过光学方法进行检测。光学检测法包括例如吸收、荧光、圆二色性(CD)、旋光色散(ORD)、折射法等测量。

[0062] 在本申请的背景中优选使用的光学检测法是光度测定法。然而,由于与分析物反应在辅酶中的改变的光度测定法测量需要另外存在至少一种介质,所述介质增加被还原辅酶的反应性,并且使得电子可能被转移给合适的光学指示剂或光学指示剂系统。

[0063] 适合于本发明的目的的介质尤其是亚硝基苯胺例如[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐,醌例如菲醌、菲咯啉醌或苯并[h]喹啉醌,吩嗪例如1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪鎓(phenazinium)三氟甲磺酸盐,或/和心肌黄酶(EC 1.6.99.2)。菲咯啉醌的优选例子包括1,10-菲咯啉-5,6-醌、1,7-菲咯啉-5,6-醌、4,7-菲咯啉-5,6-醌、及其N烷基化和N',N'-二烷基化盐,在N烷基化和N',N'-二烷基化盐的情况下作为抗衡离子分别优选卤化物、三氟甲磺酸盐或增加溶解度的其他阴离子。

[0064] 使用任何物质作为光学指示剂或作为光学指示剂系统都是可能的,所述任何物质是可还原的并且在还原时经历其光学性质中的可检测改变,所述光学性质例如颜色、荧光、反射度、透射、偏振化或/和折射率。样品中分析物的存在或/和量的测定可以用肉眼或/和借助于检测设备使用光度测定法来进行,所述光度测定法对于本领域技术人员看起来是合适的。

[0065] 杂多酸和特别地2,18-磷钼酸优选用作光学指示剂,并且被还原成相对应的杂多蓝。

[0066] 辅酶中的改变特别优选通过测量荧光进行检测。荧光测定是高度灵敏的,并且使得可能在小型化系统中检测甚至低浓度的分析物。

[0067] 一种可替代的可能性也是使用合适的测试元件例如电化学测试条电化学检测辅酶中的改变。关于这点的前提再次是合适介质的使用,所述合适介质可以通过电子的转移

通过被还原的辅酶转变成还原形式。通过测量电流来测定分析物,所述电流是再氧化被还原的介质所需的且与样品中的分析物浓度相关。

[0068] 可以用于电化学测量的介质的例子特别包括用于光度测定法测量的前述介质。

[0069] 可能使用液体测试以检测分析物,在这种情况下试剂是例如以在水或非水液体中的溶液或悬浮液的形式或作为粉末或冻干产物(lyophilisate)。然而,还可能使用干燥测试,在这种情况下将试剂应用于支持体——测试条。支持体可以包括例如包含由待研究的样品液体弄湿的吸收剂或/和可膨胀材料的测试条。

[0070] 特别优选的测试形式包括葡糖脱氢酶与稳定的NAD衍生物用于检测葡萄糖的用途,在这种情况下形成被还原的辅酶NADH的衍生物。NADH在UV激发后通过光学方法例如通过光度或荧光测定进行检测。特别优选的测试系统在US 2005/0214891中得到描述,本文特别参考所述文献。

[0071] 本发明还进一步涉及用稳定辅酶稳定的酶,其中稳定的酶显示在优选至少20℃、特别优选至少25℃且最优选至少30℃的温度下,在合适时连同高湿度且无需干燥试剂,贮藏优选至少2周、特别优选至少4周且最优选至少8周后,与最初水平相比较,酶促活性中的下降小于50%、优选小于30%且最优选小于20%。

[0072] 本发明还进一步涉及用于测定分析物的检测试剂,其包括如上所述用稳定辅酶稳定的酶。本发明另外涉及测试元件,其根据本发明分别包括根据本发明稳定的酶和检测试剂。检测试剂和测试元件分别可以适合于执行干燥或液体测试。测试元件优选是用于分析物的荧光测定或光度测定检测的测试条。此种测试条包括用稳定辅酶稳定且固定在吸收剂或/和可膨胀材料例如纤维素、塑料等上的酶。

[0073] 本发明通过下述附图和实施例更详细地加以解释:

[0074] 附图描述

[0075] 图1A:稳定辅酶carba-NAD(cNAD)的描述。

[0076] 图1B:稳定辅酶吡咯烷基-NAD的描述。

[0077] 图2:在贮藏前和后,分别地在NAD的存在下和在cNAD的存在下,葡糖脱氢酶酶动力学结果的描述。

[0078] 2A:在1天后,在NAD的存在下,GlucDH的动力学。

[0079] 2B:在1天后,在cNAD的存在下,GlucDH的动力学。

[0080] 2C:在32℃和85%相对湿度下贮藏5周后,在NAD的存在下,GlucDH的动力学。

[0081] 2D:在32℃和85%相对湿度下贮藏5周后,在cNAD的存在下,GlucDH的动力学。

[0082] 图3:在32℃和85%湿度下在最高达5周的时间段期间,分别关于在NAD的存在下的葡糖脱氢酶和在cNAD的存在下的GlucDH的空白值的比较。

[0083] 图4:葡糖脱氢酶在NAD的存在下在32℃和85%湿度下贮藏后,葡糖脱氢酶的各种功能曲线的描绘。贮藏时间在1天到5周之间变化。

[0084] 图5:葡糖脱氢酶在cNAD的存在下在32℃和85%湿度下贮藏后,葡糖脱氢酶的各种功能曲线的描绘。贮藏时间分别在1天到5周之间变化(图5A)以及在1天到24周之间变化(图5B)。

[0085] 图6:葡糖脱氢酶分别在NAD和cNAD的存在下在32℃和85%湿度下贮藏24周后,NAD和cNAD的残留含量的描述。

[0086] 图7:葡萄糖脱氢酶分别在NAD和cNAD的存在下在32℃和85%湿度下分别贮藏5周(图7A)和24周(图7B)后,GlucDH活性的描述。

[0087] 图8:葡萄糖脱氢酶(GlucDH-wt)、双重突变体GlucDH_E96G_E170K(GlucDH-Mut1)和双重突变体GlucDH_E170K_K252L(GlucDH-Mut2)分别在NAD和cNAD的存在下在32℃和83%相对湿度下在25周的时间段期间贮藏后,GlucDH活性的描述。

[0088] 图9:分别在NAD和cNAD的存在下贮藏后,通过凝胶电泳的葡萄糖脱氢酶分析。测试条件:MW,10-220kDa标记;1:GlucDH/NAD,在6℃下5周;2:GlucDH/NAD,在32℃/85%相对湿度下5周;3:GlucDH/cNAD,在6℃下5周;4:GlucDH/cNAD,在32℃/85%相对湿度下5周。

[0089] 图10:分别在NAD和cNAD的存在下在50℃下贮藏后,通过凝胶电泳的葡萄糖脱氢酶分析。测试条件:MW,10-220kDa标记;1:GlucDH 8.5mg/ml,NAD,0小时;2:GlucDH 8.5mg/ml,NAD,22小时;3:GlucDH 8.5mg/ml,NAD,96小时;4:GlucDH 8.5mg/ml,NAD,118小时;5:GlucDH 8.5mg/ml,NAD,140小时;6:GlucDH 8.5mg/ml,NAD,188小时;7:GlucDH 8.5mg/ml,NAD,476小时;8:GlucDH 8.5mg/ml,cNAD,0小时;9:GlucDH 8.5mg/ml,cNAD,188小时;10:GlucDH 8.5mg/ml,cNAD,476小时。

[0090] 图11:分别在NAD和cNAD的存在下分别在液相中在50℃下在4周(图11A)和14天(图11B)的时间段期间贮藏后,葡萄糖脱氢酶的稳定性的描述。测试条件:GlucDH 10mg/ml;NAD和cNAD分别为12mg/ml;缓冲液:0.1 M Tris、1.2 M NaCl,pH 8.5;温度50℃。

[0091] 图12:分别在NAD和cNAD的存在下贮藏后,通过凝胶电泳的来自酵母的醇脱氢酶分析。测试条件:MW,10-220kDa标记;1:ADH,在6℃下65小时;2:ADH/cNAD,在6℃下65小时;3:ADH/NAD,在6℃下65小时;4:ADH,在35℃下65小时;5:ADH/cNAD,在35℃下65小时;6:ADH/NAD,在35℃下65小时。

[0092] 图13:分别在NAD和cNAD的存在下在35℃下贮藏后,通过凝胶电泳的来自酵母的醇脱氢酶分析。测试条件:MW,10-220kDa标记;1:ADH/NAD,0天;2:ADH/NAD,1天;3:ADH/NAD,2天;4:ADH/NAD,3天;5:ADH/NAD,5天;6:ADH/cNAD,0天;7:ADH/cNAD,1天;8:ADH/cNAD,2天;9:ADH/cNAD,3天;10:ADH/cNAD,6天。

[0093] 图14:分别在NAD和cNAD的存在下在液相中在35℃下在65小时的时间段期间贮藏后,来自酵母的醇脱氢酶的稳定性的描述。测试条件:ADH 5mg/ml;NAD和cNAD分别为50mg/ml;缓冲液:75mM Na₄P₂O₇,甘氨酸,pH 9.0;温度35℃。

[0094] 图15:在NAD和各种介质的存在下在室温下贮藏11周后,葡萄糖脱氢酶的各种功能曲线的描绘。

[0095] 图16:在NAD和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪鎓三氟甲磺酸盐的存在下在各种葡萄糖浓度下,葡萄糖脱氢酶酶动力学结果的描述。

[0096] 图17:用GlucDH作为酶和心肌黄酶作为介质的葡萄糖检测的图解描述。

[0097] 图18:分别在吡咯并喹啉醌(PQQ)和[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐作为介质的存在下的葡萄糖染料氧化还原酶(GlucDOR),以及在NAD和心肌黄酶/[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐作为介质的存在下的葡萄糖脱氢酶的功能曲线的描绘。

[0098] 图19:在NAD和心肌黄酶的存在下在各种葡萄糖浓度下,葡萄糖脱氢酶酶动力学结果的描述。

[0099] 图20:分别在NAD和cNAD的存在下,在使用葡萄糖脱氢酶的葡萄糖电化学测定中,作

为葡萄糖浓度的函数测量的电流的描述。测试条件：分别地25mM NAD和cNAD；2.5秒延迟；5秒测量时间。

[0100] 图21：葡糖脱氢酶双重突变体GlucDH_E96G_E170K和GlucDH_E170K_K252L的氨基酸序列的描述。

[0101] 实施例1

[0102] 将carba-NAD(图1A)或NAD加入葡萄糖特异性GlucDH中。这些制剂在每种情况下都应用于PokaIon膜(Lonza)，并且在干燥后，贮藏于温暖且潮湿的条件下(32°C, 85%相对湿度)。随后以有规律的时间间隔测定反应动力学和功能曲线。平行地，在每次测量时间时，执行cNAD/NAD分析和酶残留活性的测定。

[0103] 在第一天时测定的关于NAD(图2A)和cNAD(图2B)的动力学曲线是可比较的，并且还显示在葡萄糖依赖性中的相似增加。然而，在动力学曲线中的明显差异在5周后是明显的。尽管关于NAD(图2C)的动力学在其动态方面极大减少，但用cNAD稳定的酶的动力学保持实际上不变(图2D)。

[0104] 如由图3显而易见的，还存在空白值(在应用血样前的干燥空白值)中的明显差异。对于NAD在干燥空白值中的升高可归因于荧光颗粒的形成(Oppenheimer(1982)，同上)。令人惊讶的是，这对于cNAD不发生。

[0105] 根据图4和5的比较，分别在NAD和cNAD的存在下葡糖脱氢酶的不同稳定性也是明显的。在5周后，关于用cNAD稳定的酶的功能曲线仍在先前测量结果的束中(图5A)，而关于用NAD处理的酶的曲线(图4)显示在较高浓度下的跌落，这是酶/辅酶量太低的一般标记。图5B显示用cNAD稳定的葡糖脱氢酶在24周的时间段期间的各种功能曲线。在这方面清楚的是，酶的功能在时间段自始至终仅在高葡萄糖浓度下略微改变，并且在24周后与在5周后获得的值大致相对应。

[0106] 辅酶结构及其在预定时间段期间的稳定性之间的关系根据图6是显而易见的。根据这点，在贮藏(在32°C和85%相对湿度下)24周后在葡萄糖检测试剂中cNAD的残留含量仍是最初水平的约80%，而在用NAD稳定的葡萄糖检测试剂中的NAD含量在仅5周后下降至最初水平的约35%，并且通过外推在约17周后减少至零。

[0107] 在32°C和85%相对湿度下5周后的活性GlucDH酶的残留活性的测定结果(图7A)是完全令人惊讶的。用NAD稳定的酶现在仅显示极低的酶活性(0.5%)，而用cNAD稳定的酶仍具有70%的残留活性(在每种情况下通过与在冰箱中用干燥剂贮存的样品相比较)。在32°C和85%相对湿度下24周后(图7B)，具有由cNAD的稳定作用的酶的残留活性仍为约25%。

[0108] 如果使用突变体代替野生型酶(来自枯草芽孢杆菌)，那么可能甚至进一步增加残留GlucDH活性。在32°C和85%相对湿度下在cNAD的存在下贮藏24周后，野生型酶的GlucDH_E96G_E170K突变体(具有在位置96处的氨基酸替换谷氨酸→甘氨酸和在位置170处的谷氨酸→赖氨酸)(GlucDH-Mut1)的残留活性为约70%，而GlucDH_E170K_K252L突变体(具有在位置170处的氨基酸替换谷氨酸→赖氨酸和在位置252处的赖氨酸→亮氨酸)(GlucDH-Mut2)的残留活性为约50%(图8)。

[0109] 在SDS凝胶中通过凝胶电泳的葡糖脱氢酶分析(图9和10)也清楚地显示分别在NAD和cNAD的存在下贮藏之间的差异。尽管在32°C和85%相对湿度下在cNAD的存在下贮藏5周后，酶仍可鉴定为具有预期迁移率的条带，但在NAD的存在下贮藏的酶已完全消失(图9)。同

时根据图10显而易见的是,通过NAD稳定且贮藏于50℃下的酶的条带随着贮藏时间增加而变得更弱,并且在476小时后实际上已消失,而与在实验开始时检测出的条带相比较,在cNAD的存在下贮藏的酶的相对对应条带显示仅轻微的改变。

[0110] 这个结果还可以在液相中贮藏后加以证实(图11A和11B)。在50℃下95小时后,在天然辅酶NAD的存在下葡萄糖脱氢酶的残留活性是 $\approx 5\%$,而在人工辅酶cNAD的存在下GlucDH的残留活性是75%(图11A)。在50℃下贮藏336小时后,用NAD稳定的酶的残留活性现在仅为约1%;观察到在cNAD的存在下贮藏的酶的残留活性仍为约70%。相应的SDS凝胶同样显示在天然辅酶NAD的存在下在GlucDH条带中的改变:出现在更高的分子量处的新条带,并且存在30kDa条带中的移动。

[0111] 总之,辅因子的稳定作用同时造成酶的稳定作用——并且不仅仅通过酶的更佳内聚的协同作用,这是极其令人惊讶的结果。辅因子NAD的分解对酶GlucDH的稳定性具有负面作用,并且事实上加速其灭活。通过人工类似物替换天然NAD允许GlucDH在应激状态下(例如,升高的温度)甚至在辅因子的存在下进行贮藏。

[0112] 用此种系统产生具有相当大改善的稳定性特性的血糖测试条是可能的,对于其无需干燥剂的形式是可能的。

[0113] 实施例2

[0114] 将cNAD或NAD加入醇检测溶液中。将这些混合物贮藏于35℃下。随后以有规律的时间间隔检查酶的稳定性,并且测定酶的残留活性。

[0115] 再次,在SDS凝胶中通过凝胶电泳的分析(图12和13)显示在NAD和cNAD的存在下贮藏之间的差异。因此,用cNAD稳定的醇脱氢酶的条带分别在6℃和35℃下贮藏65小时后仅轻微不同,从而指示酶通过人工辅酶的稳定作用。相比之下,在NAD的存在下在35℃下贮藏的酶的条带已完全消失(图12)。

[0116] 根据图13进一步显而易见的是,用NAD稳定且贮藏于35℃下的酶的条带随着贮藏时间增加而变得更弱,并且在5天后已几乎完全消失。在35℃下贮藏6天后检测出的用cNAD稳定的酶的条带显示酶明显更少的分解且因此增加的稳定性。

[0117] 这个结果还可以在液相中贮藏后加以证实(图14)。在35℃下65小时后,在天然辅酶NAD的存在下醇脱氢酶的残留活性是约6%,而在人工辅酶cNAD的存在下酶的残留活性仍是约60%。

[0118] 实施例3

[0119] 为了测定葡萄糖,光度测定法和电化学地测量各种测试系统,所述测试系统在每种情况下包括葡萄糖脱氢酶、NAD、介质和合适时光学指示剂。

[0120] 对于光度测定法测量,最初4种测试元件用各种葡萄糖浓度进行研究,所述测试元件在每种情况下已在室温下贮藏11周,并且除葡萄糖脱氢酶、NAD和介质外,还包括2,18-磷钼酸。

[0121] 如由图15显而易见的,对于采用的所有4种介质,即[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐(Med A)、1-甲基-5,6-二氧代-5,6-二氢-1,10-菲咯啉鎓(phenanthroline)三氟甲磺酸盐(Med B)、7-甲基-5,6-二氧代-5,6-二氢-1,7-菲咯啉鎓三氟甲磺酸盐(Med F)和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪鎓三氟甲磺酸盐(Med G),观察到随着增加的葡萄糖浓度在反射度中的下降,并且因此上述介质原则上适合于通过光度测定法测定葡萄糖。

[0122] 在800mg/dl的区域中的高葡萄糖浓度下,分别利用[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪鎓三氟甲磺酸盐时所测量样品的反射度仍为约20%,从而暗示这2种介质特别适合于使用葡萄糖脱氢酶/NAD系统的光度测定法测量,并且因此也适合于使用葡萄糖脱氢酶/cNAD系统的光度测定法测量。在0至800mg/dl的葡萄糖浓度下使用葡萄糖脱氢酶、NAD、1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪鎓三氟甲磺酸盐和2,18-磷钼酸系统的葡萄糖转变动力学描绘于图16中。

[0123] 如由图17中的图解描绘显而易见的,葡萄糖的光度测定法测定也可以(另外)使用心肌黄酶作为中间介质而进行。图18显示在关于葡萄糖脱氢酶、NAD、心肌黄酶、[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐和2,18-磷钼酸系统(系统1)的反射度中的浓度依赖性减少。充当比较的系统是葡萄糖染料氧化还原酶、吡咯并喹啉醌、[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐和2,18-磷钼酸系统(系统2),其同样引起反射度中的浓度依赖性减少,但具有由于葡萄糖染料氧化还原酶的低特异性的缺点。在0至800mg/dl的葡萄糖浓度下使用系统1的葡萄糖转变动力学描绘于图19中。

[0124] 作为光度测定法的可替代方法,还可能采用电化学测量用于测定分析物的目的。因此,对于除葡萄糖脱氢酶外还包括NAD作为辅酶和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪鎓三氟甲磺酸盐作为介质的测试元件,以及包括稳定的辅酶cNAD代替NAD的相应系统都发现再氧化被还原的介质所需的电流线性依赖于葡萄糖浓度(图20)。

[0125] 因此已显示使用脱氢酶/稳定辅酶系统的分析物测定借助于用另一个波长的电化学检测和评估也是可能的,所述另一个波长不依赖于辅酶。总体制剂还应通过使用稳定辅酶/辅酶对进行进一步稳定。

序列表

<110> F. Hoffmann - La Roche

<120> 使用稳定辅酶的脱氢酶稳定作用

<130> 40444P WO

<150> EP 08 003 054.7

<151> 2008-02-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0001] <223> 来自枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis) 的葡糖脱氢酶突变体

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (96).. (96)

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (170).. (170)

<400> 1

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
35 40 45

	Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	Val	Val	Gln	Gly	
	50					55						60					
	Asp	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Val	Gln	Thr	Ala	Ile	
	65				70					75					80		
	Lys	Glu	Phe	Gly	Thr	Leu	Asp	Ile	Met	Ile	Asn	Asn	Ala	Gly	Leu	Gly	
					85					90					95		
	Asn	Pro	Val	Pro	Ser	His	Glu	Met	Pro	Leu	Lys	Asp	Trp	Asp	Lys	Val	
				100					105					110			
	Ile	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ile	
				115				120						125			
[0002]	Lys	Tyr	Phe	Val	Glu	Asn	Asp	Ile	Lys	Gly	Asn	Val	Ile	Asn	Met	Ser	
	130						135					140					
	Ser	Val	His	Glu	Val	Ile	Pro	Trp	Pro	Leu	Phe	Val	His	Tyr	Ala	Ala	
	145					150					155					160	
	Ser	Lys	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Met	Thr	Lys	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Tyr	
					165					170					175		
	Ala	Pro	Lys	Gly	Ile	Arg	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Pro	Gly	Ala	Ile	Asn	
					180					185					190		
	Thr	Pro	Ile	Asn	Ala	Glu	Lys	Phe	Ala	Asp	Pro	Lys	Gln	Lys	Ala	Asp	
				195					200					205			
	Val	Glu	Ser	Met	Ile	Pro	Met	Gly	Tyr	Ile	Gly	Glu	Pro	Glu	Glu	Ile	
	210						215						220				

Ala Ala Val Ala Val Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ser Ser Tyr Val Thr
225 230 235 240

Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Lys Tyr Pro Ser Phe
245 250 255

Gln Ala Gly Arg Gly
260

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 来自枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis) 的葡糖脱氢酶突变体

[0003]

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (170).. (170)

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (252).. (252)

<400> 2

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
35 40 45

	Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	Val	Val	Gln	Gly	
	50					55						60					
	Asp	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Val	Gln	Thr	Ala	Ile	
	65				70					75					80		
	Lys	Glu	Phe	Gly	Thr	Leu	Asp	Ile	Met	Ile	Asn	Asn	Ala	Gly	Leu	Glu	
					85					90					95		
	Asn	Pro	Val	Pro	Ser	His	Glu	Met	Pro	Leu	Lys	Asp	Trp	Asp	Lys	Val	
				100					105					110			
	Ile	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ile	
				115				120					125				
[0004]	Lys	Tyr	Phe	Val	Glu	Asn	Asp	Ile	Lys	Gly	Asn	Val	Ile	Asn	Met	Ser	
	130					135						140					
	Ser	Val	His	Glu	Val	Ile	Pro	Trp	Pro	Leu	Phe	Val	His	Tyr	Ala	Ala	
	145					150					155					160	
	Ser	Lys	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Met	Thr	Lys	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Tyr	
					165					170					175		
	Ala	Pro	Lys	Gly	Ile	Arg	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Pro	Gly	Ala	Ile	Asn	
					180					185					190		
	Thr	Pro	Ile	Asn	Ala	Glu	Lys	Phe	Ala	Asp	Pro	Lys	Gln	Lys	Ala	Asp	
				195					200					205			
	Val	Glu	Ser	Met	Ile	Pro	Met	Gly	Tyr	Ile	Gly	Glu	Pro	Glu	Glu	Ile	
	210						215						220				

	Ala	Ala	Val	Ala	Val	Trp	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ser	Ser	Tyr	Val	Thr
	225					230					235					240
[0005]	Gly	Ile	Thr	Leu	Phe	Ala	Asp	Gly	Gly	Met	Thr	Leu	Tyr	Pro	Ser	Phe
					245					250					255	
	Gln	Ala	Gly	Arg	Gly											
					260											

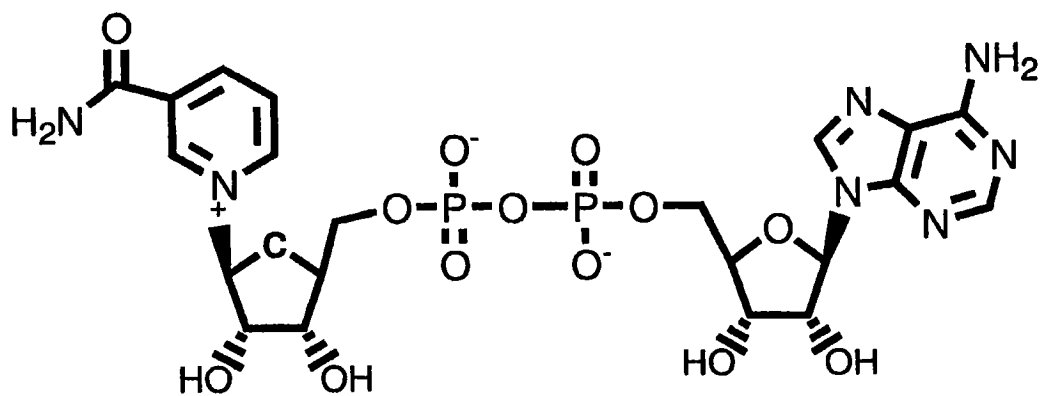


图1A

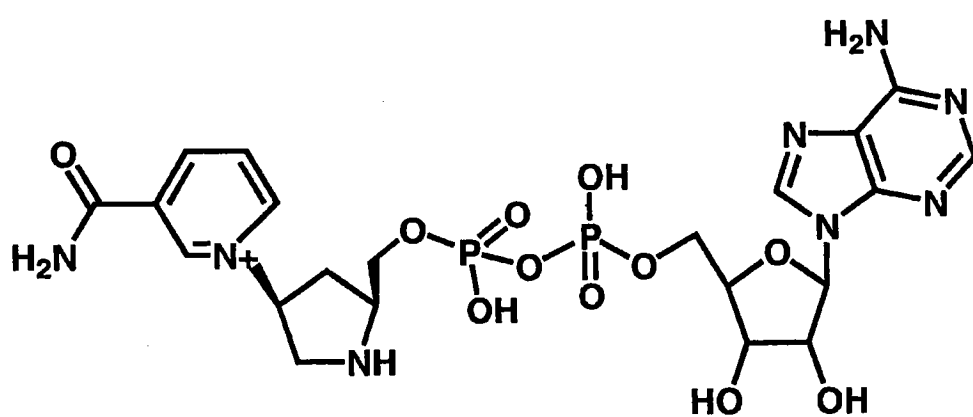


图1B

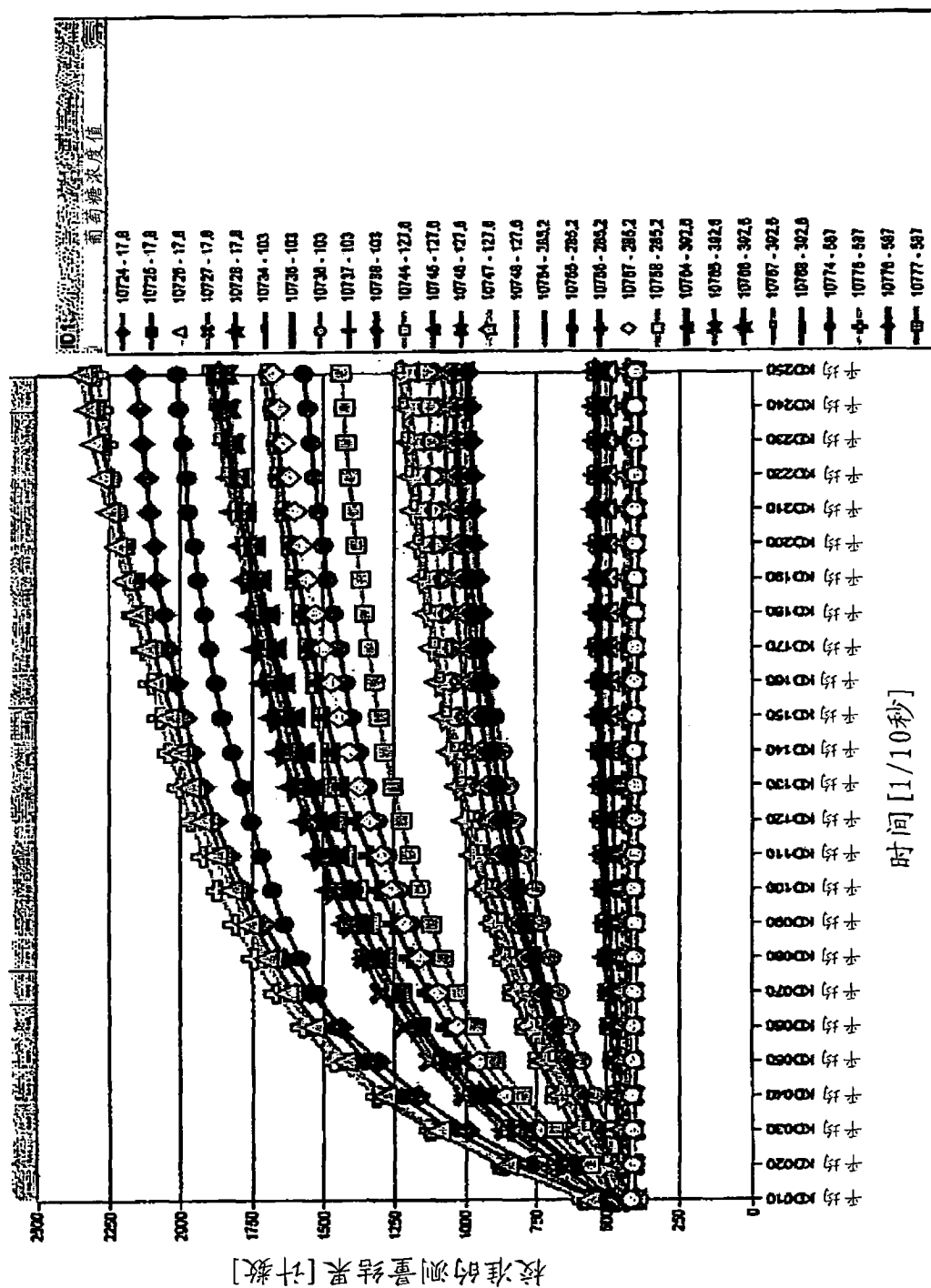


图2A

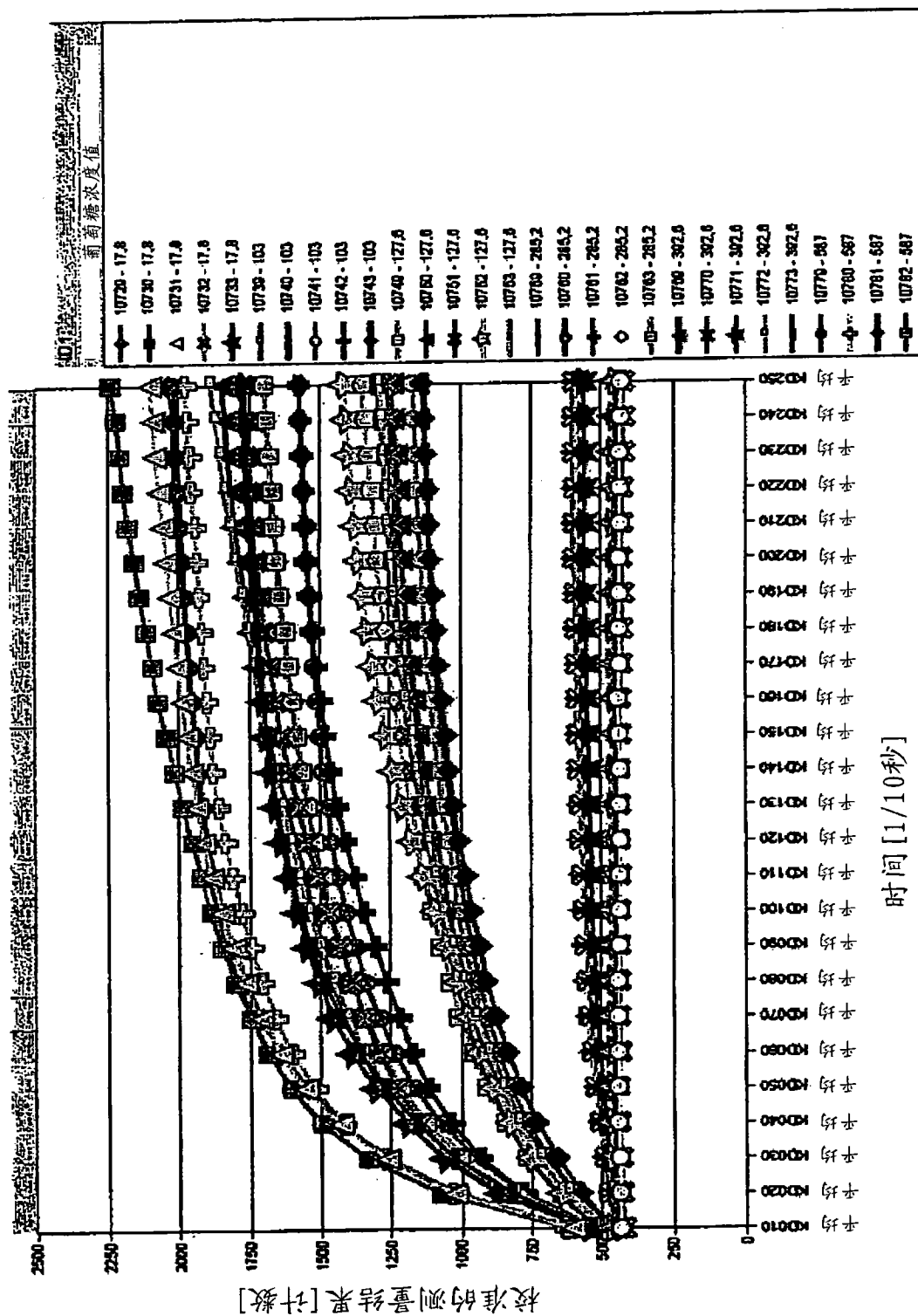


图2B

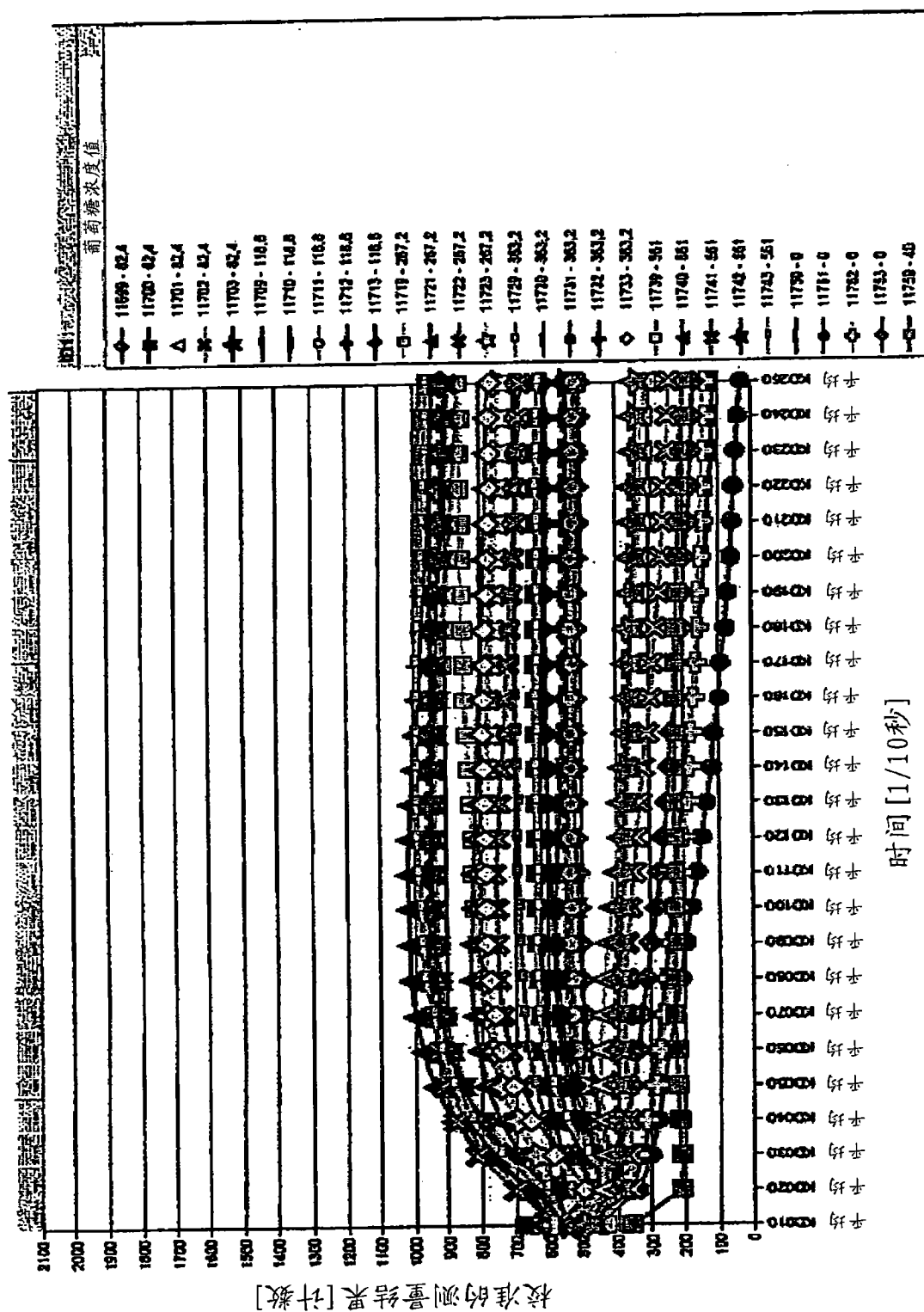


图2C

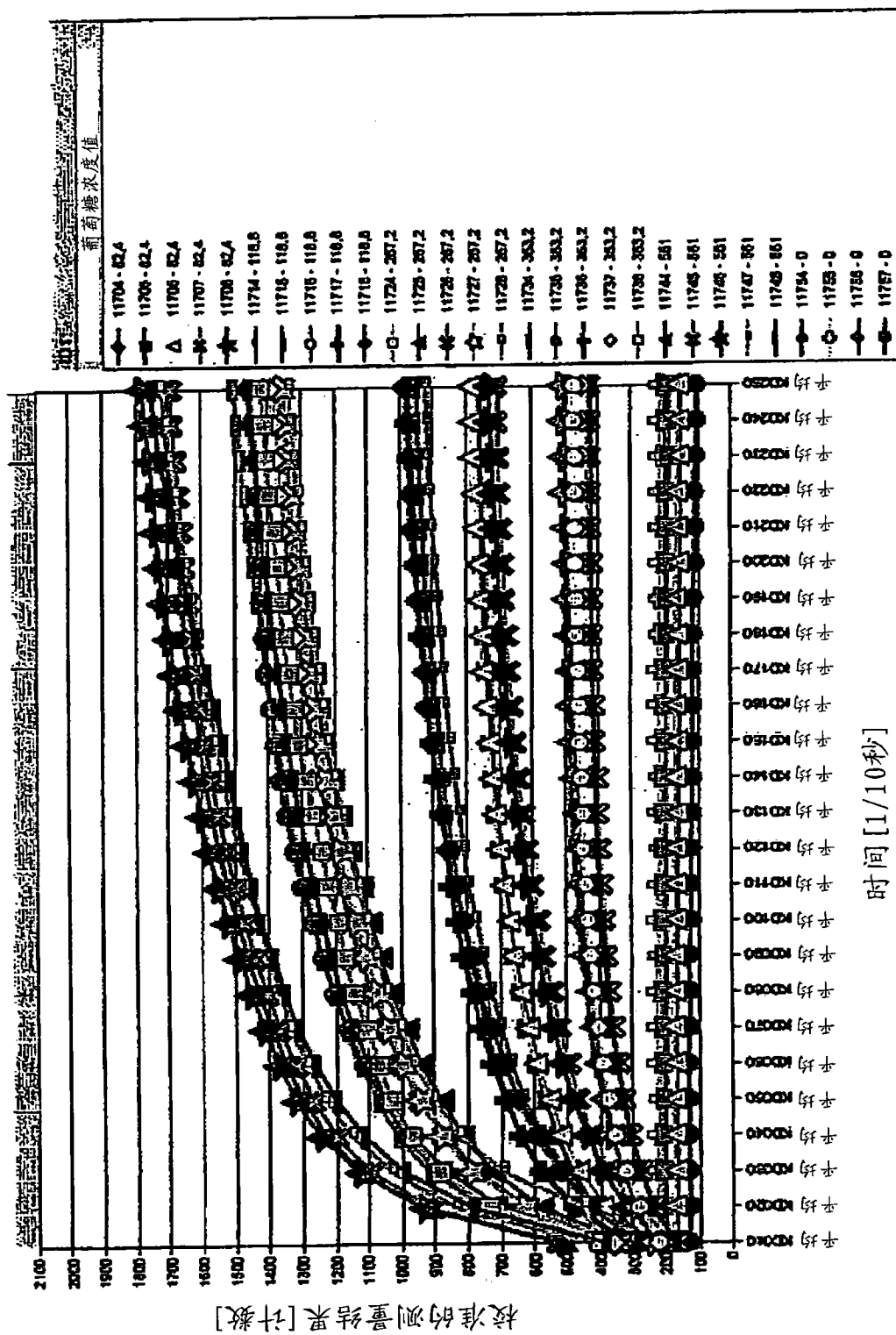


图2D

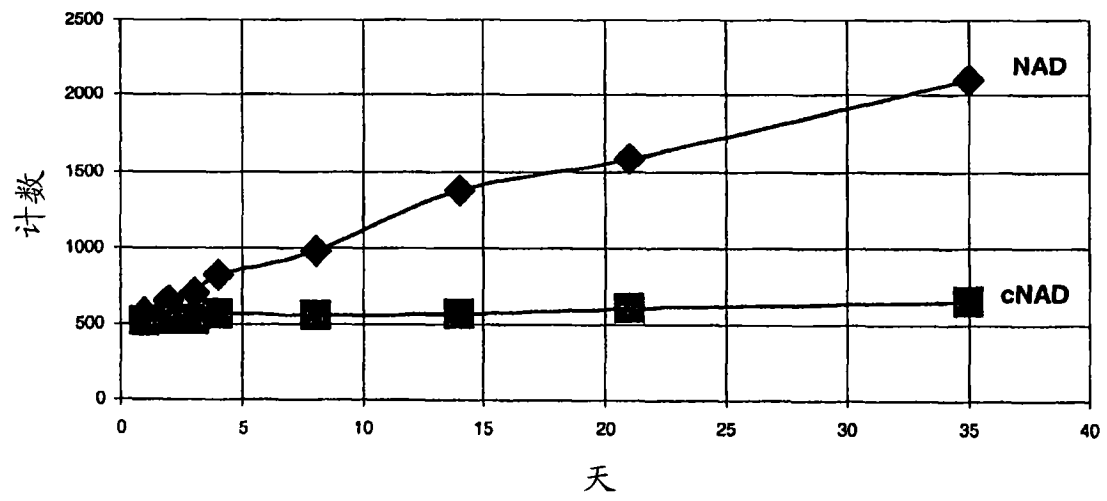


图3

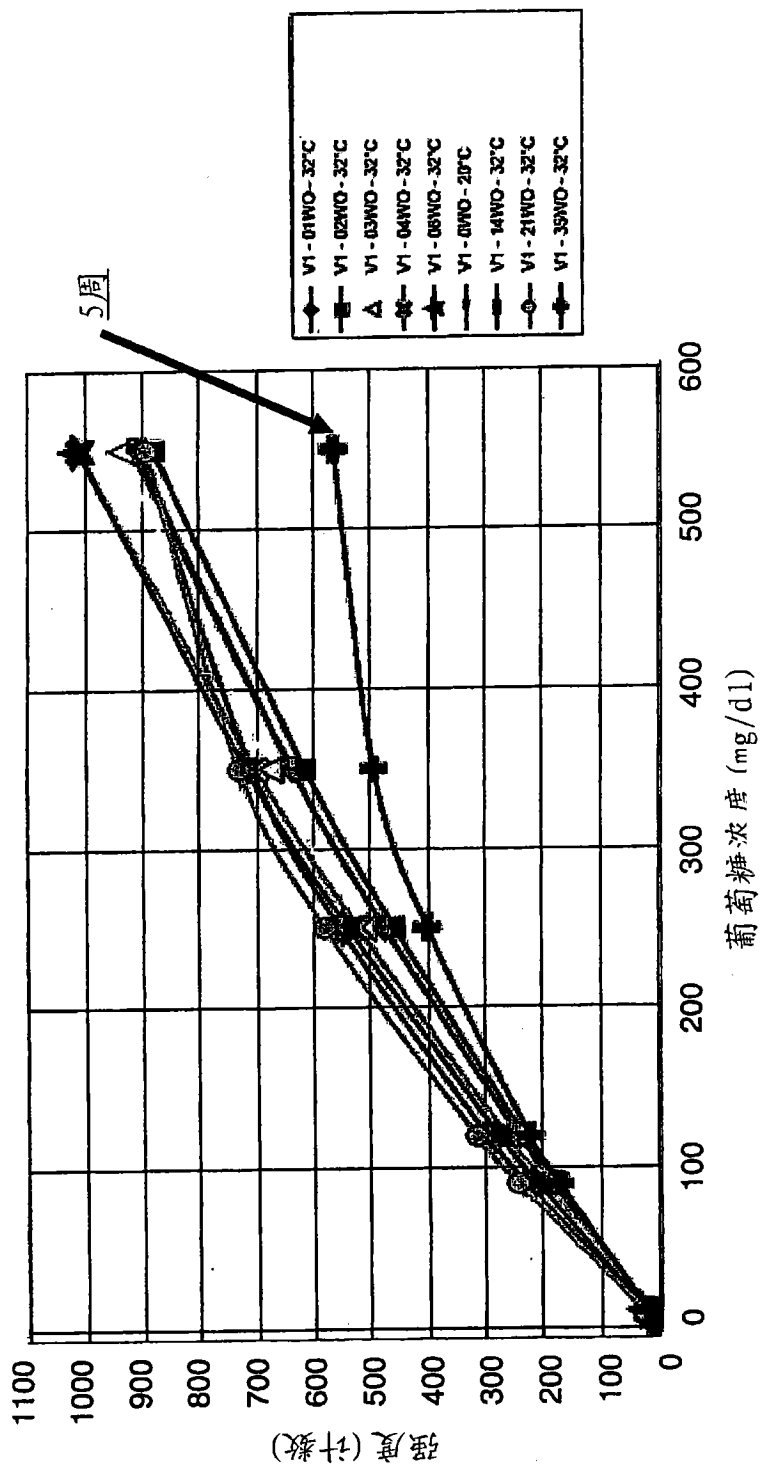


图4

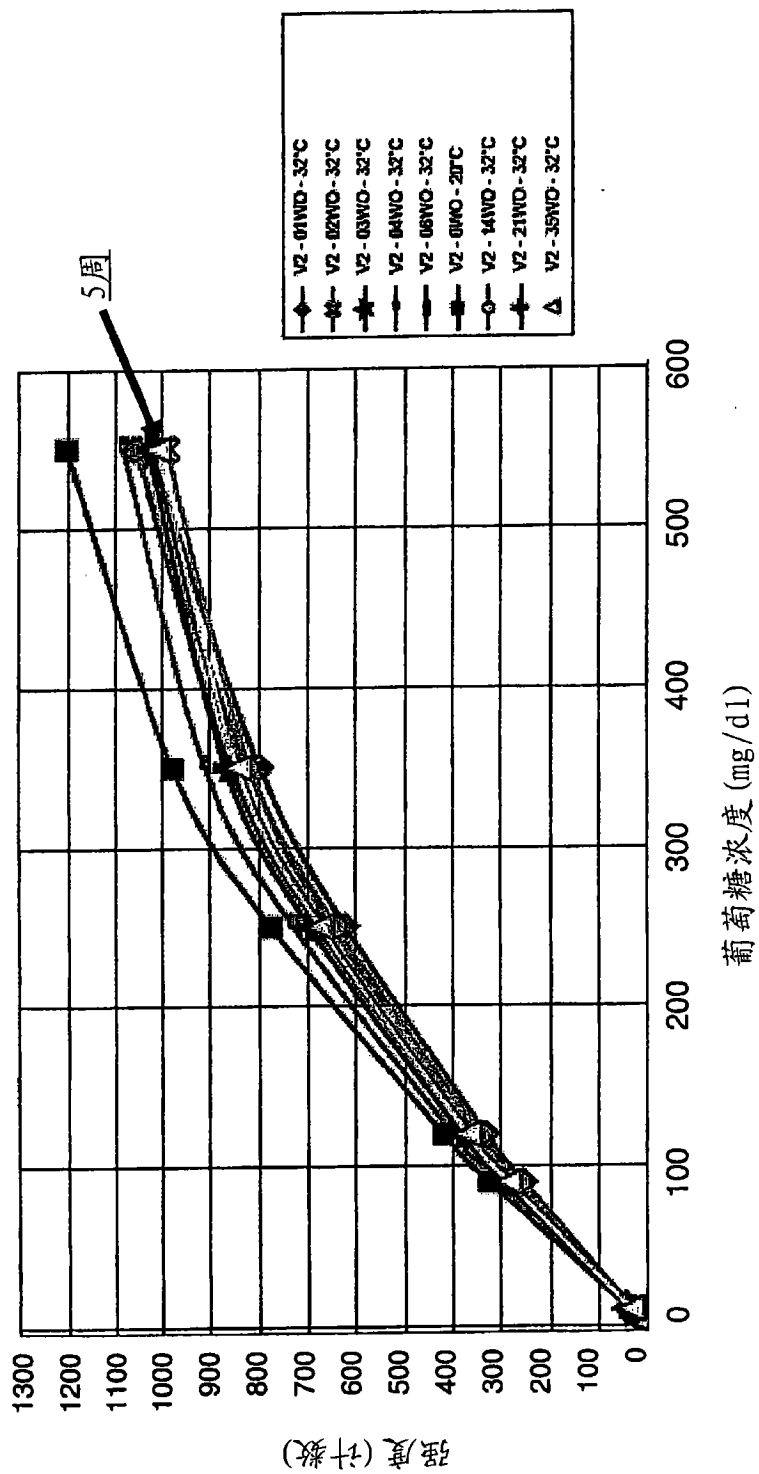


图5A

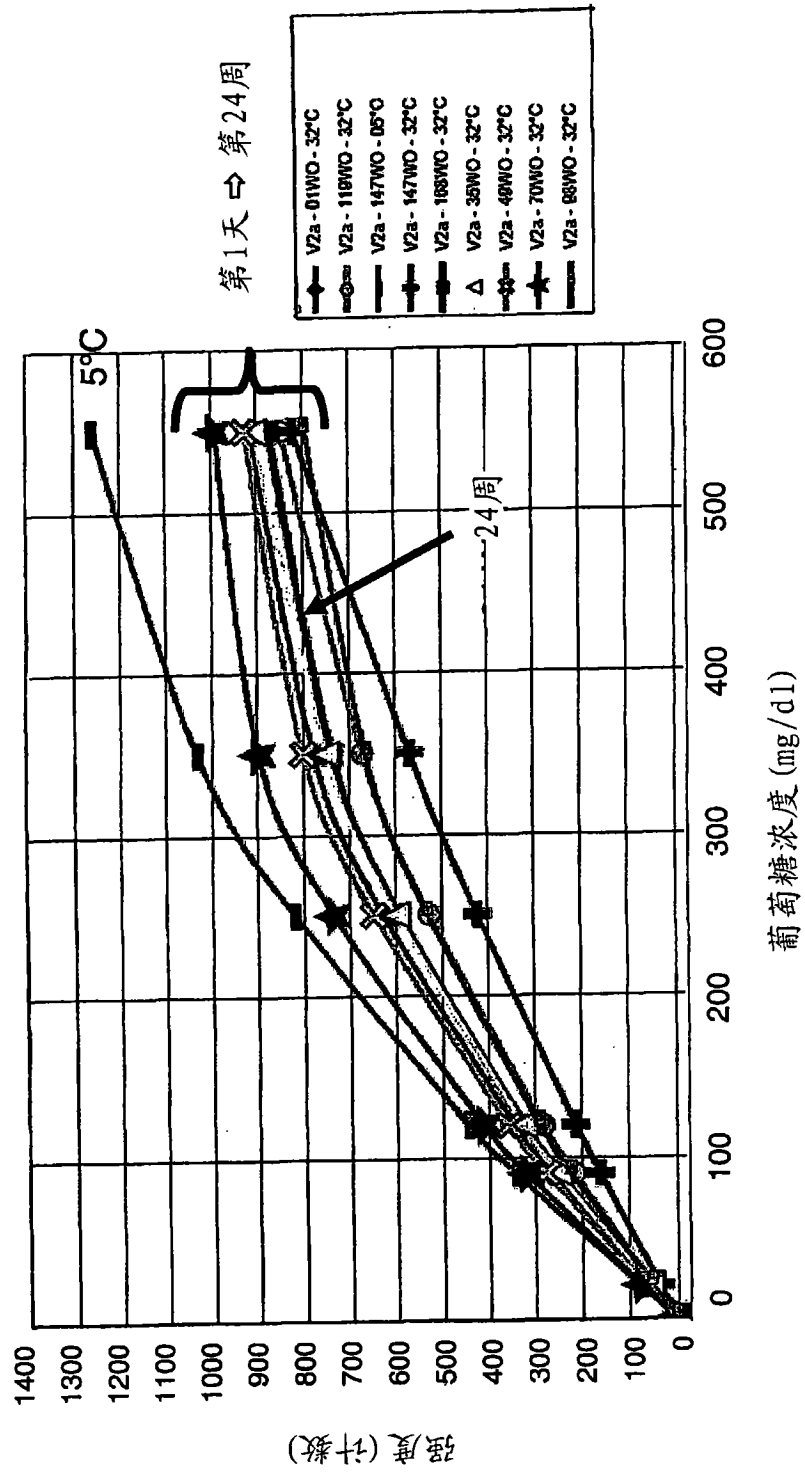


图5B

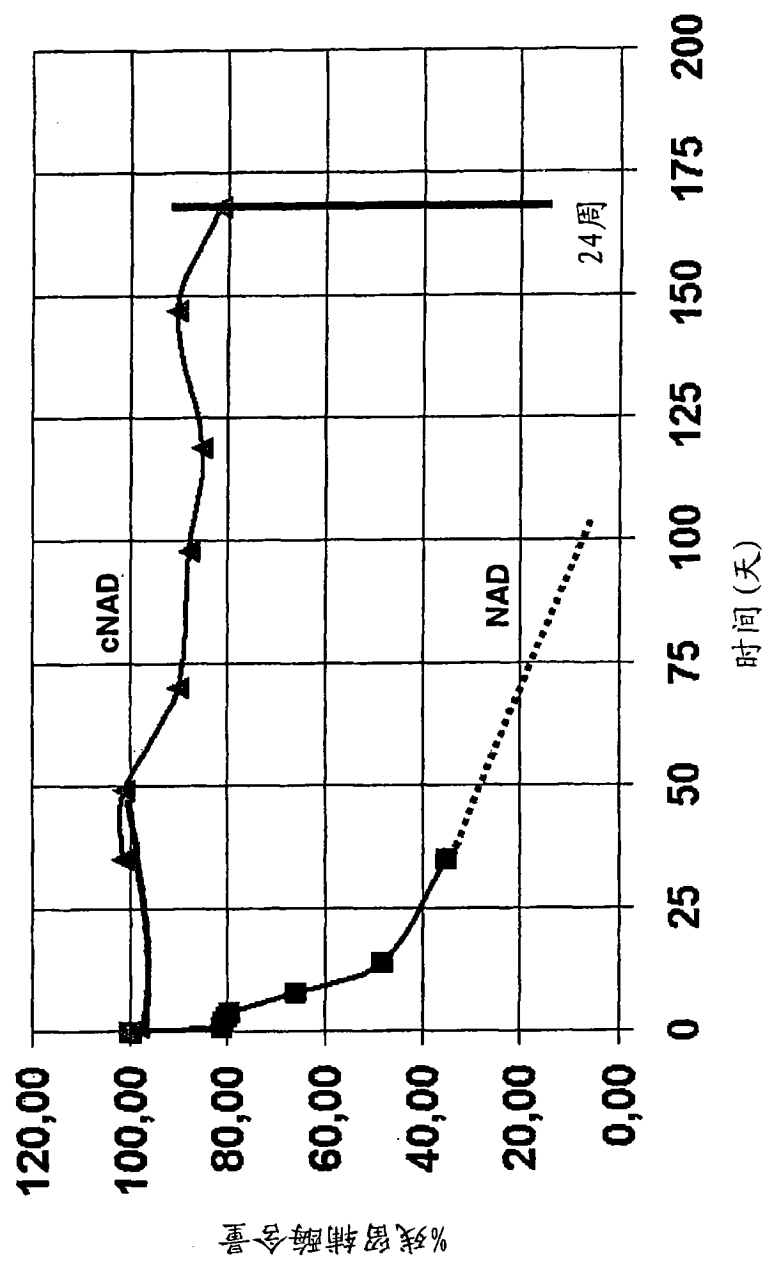


图6

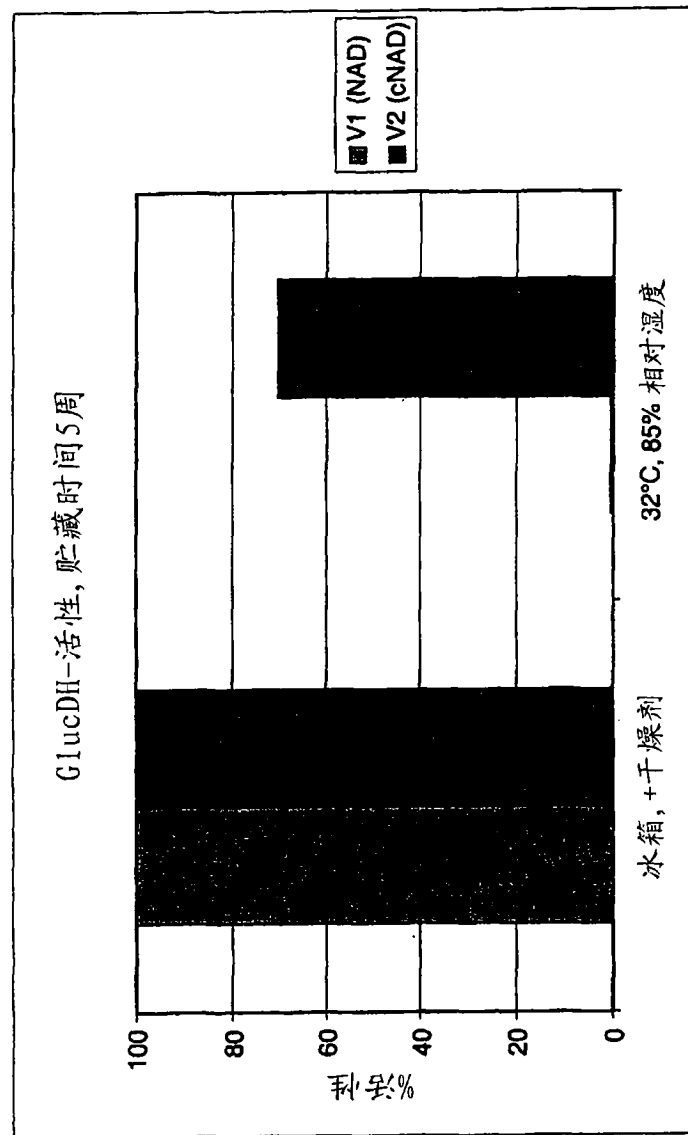


图7A

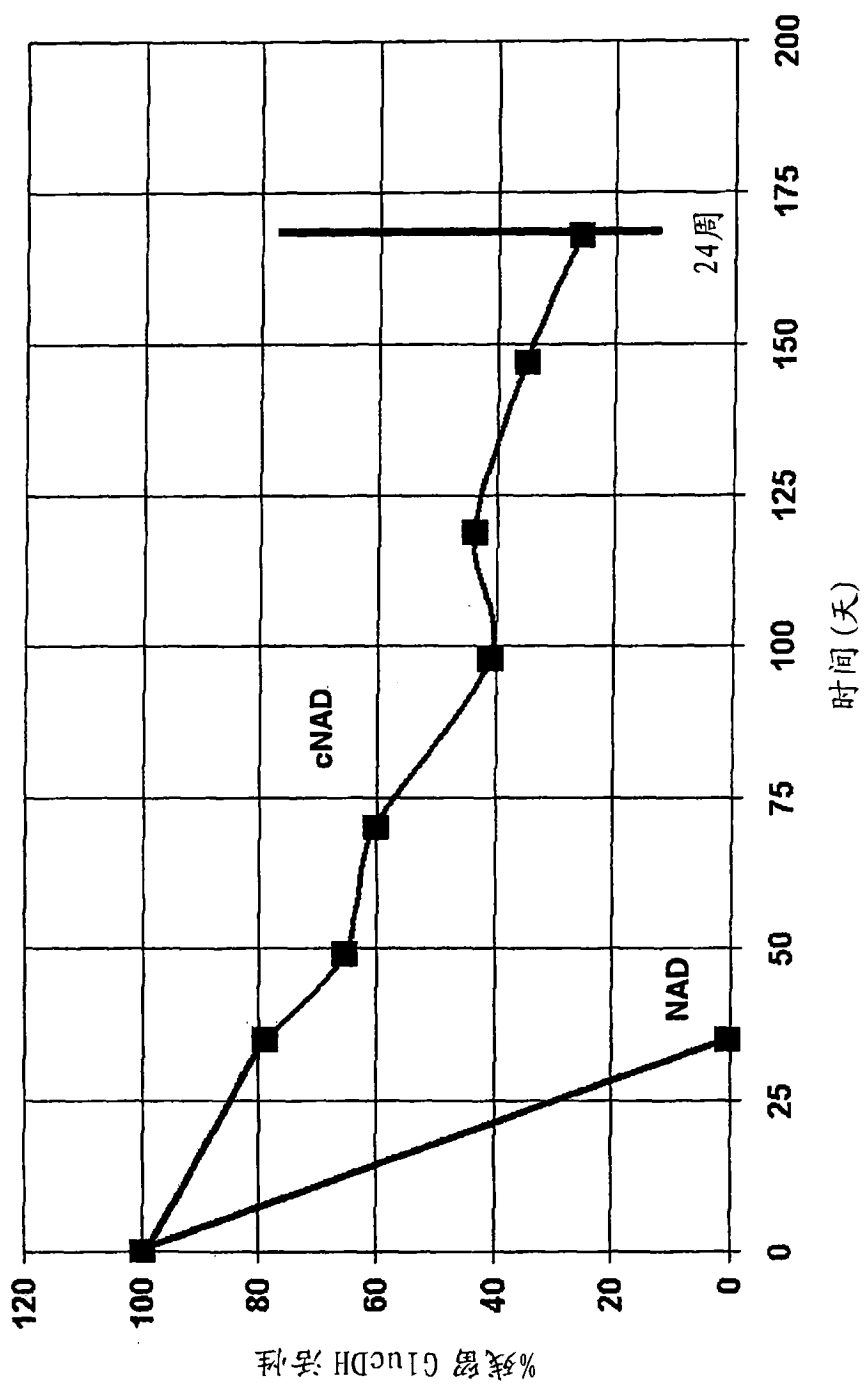


图7B

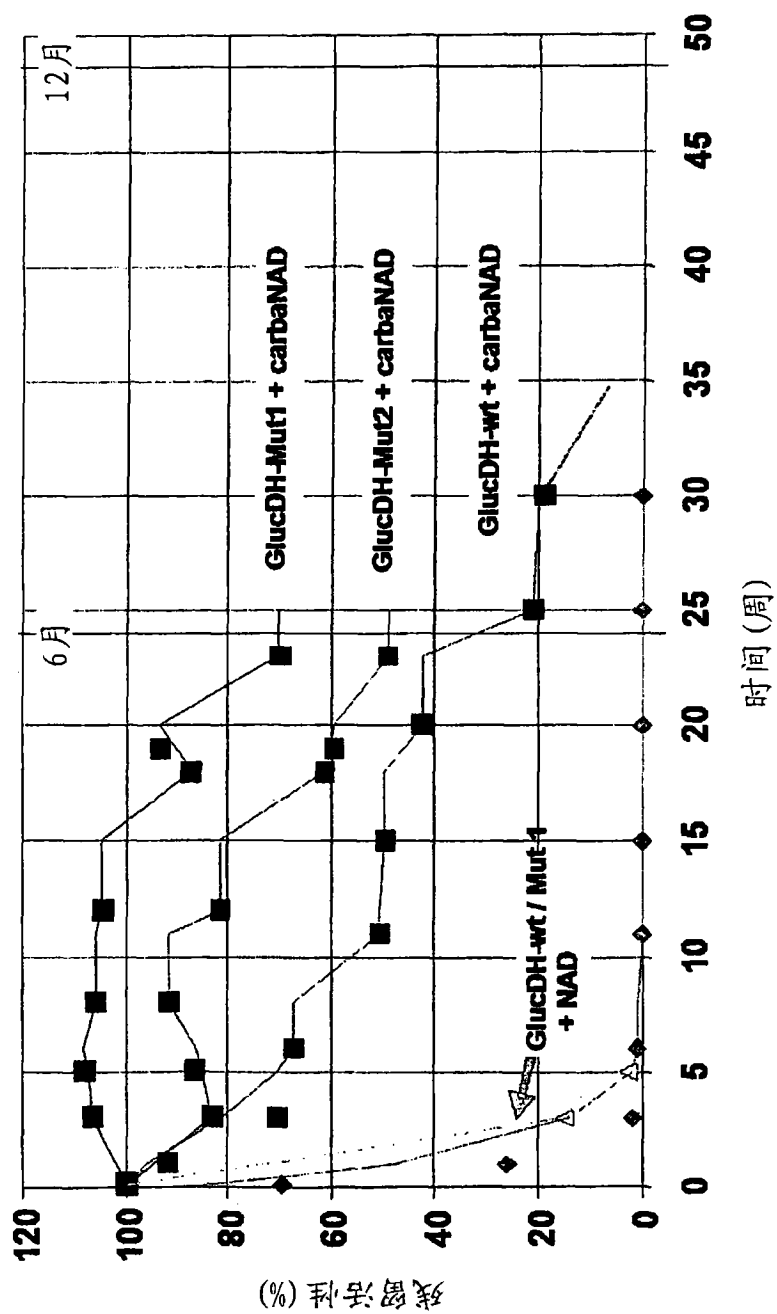


图8

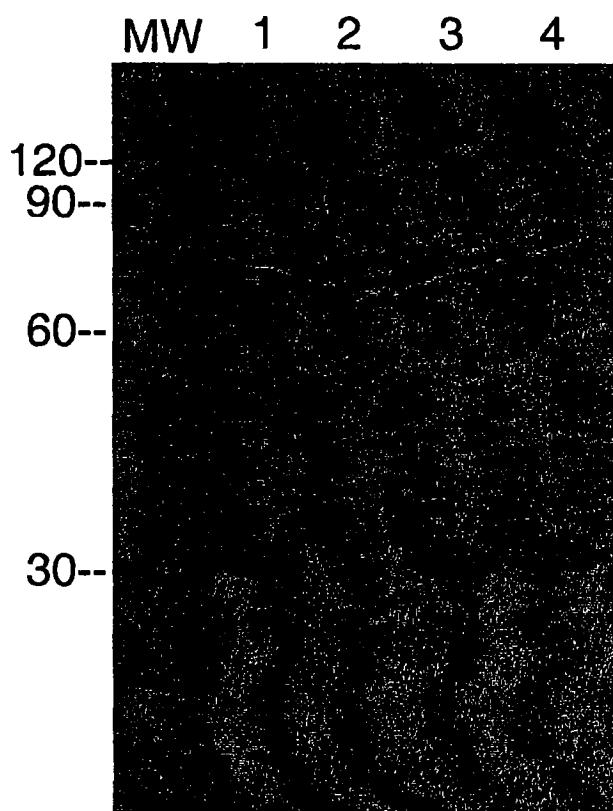


图9

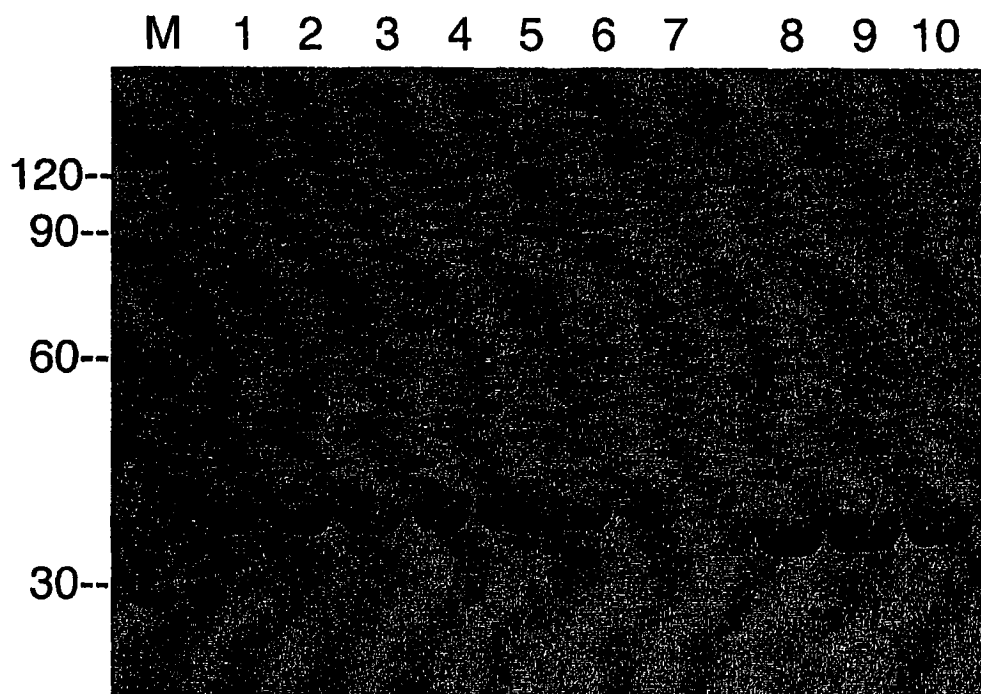


图10

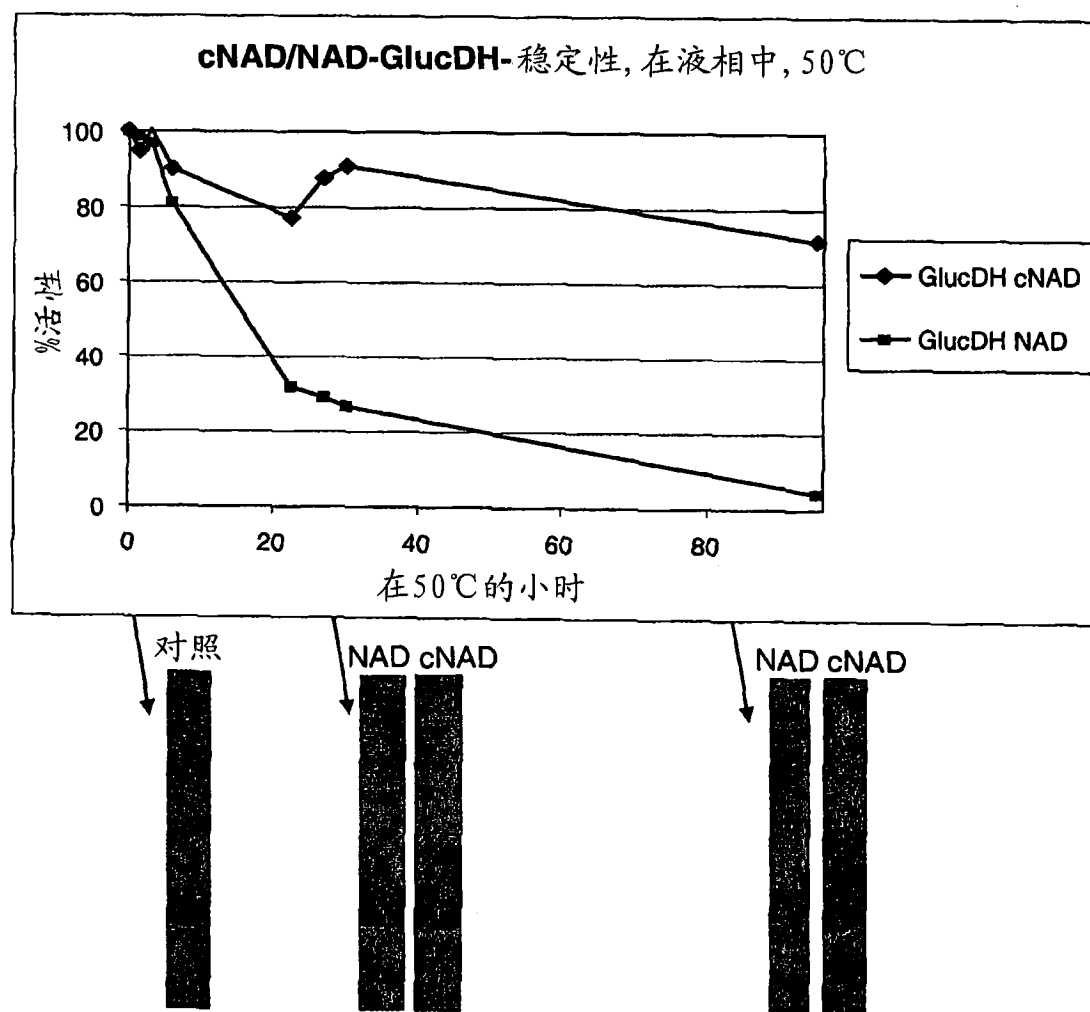


图11A

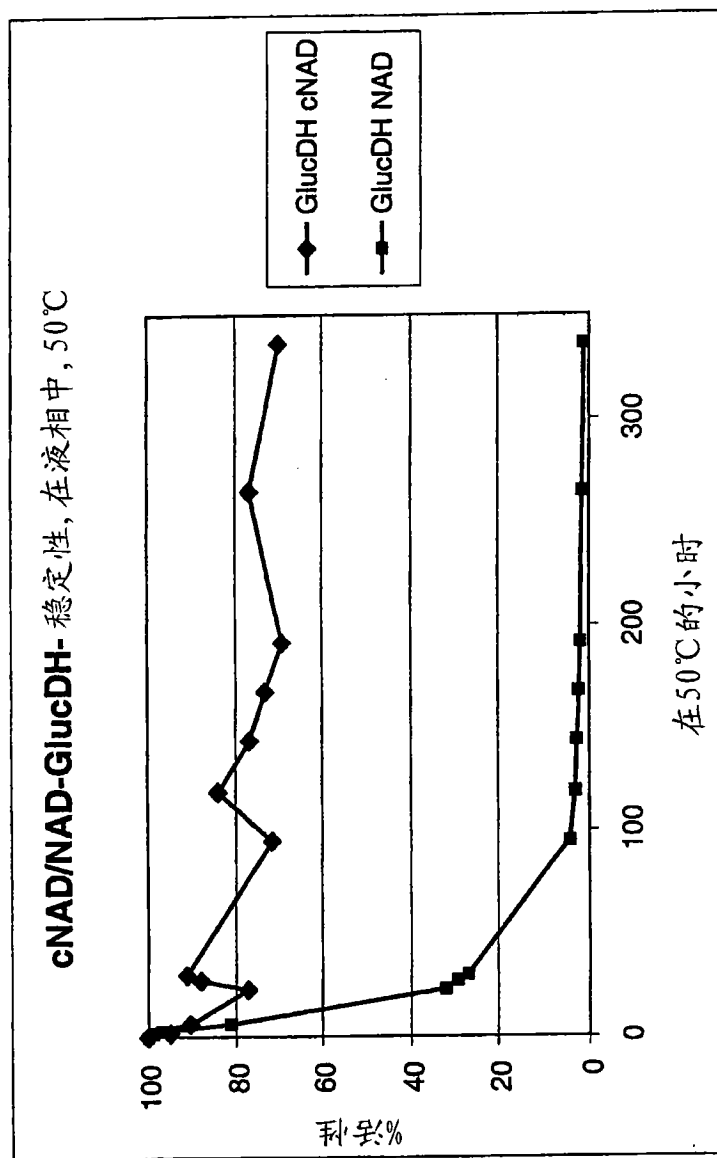


图11B

MW 1 2 3 4 5 6

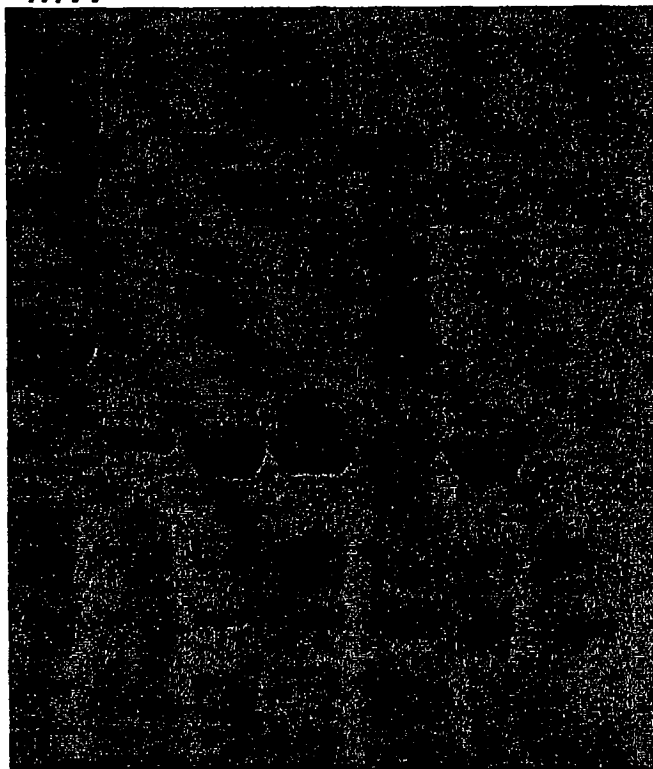


图12

MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



图13

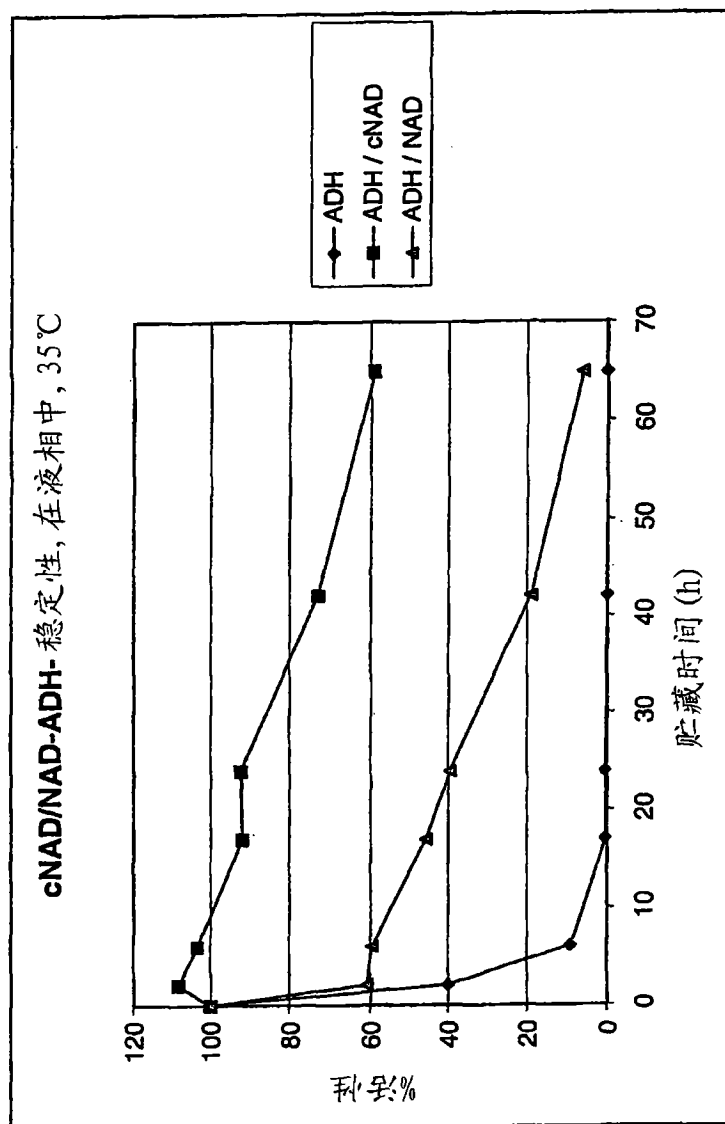


图14

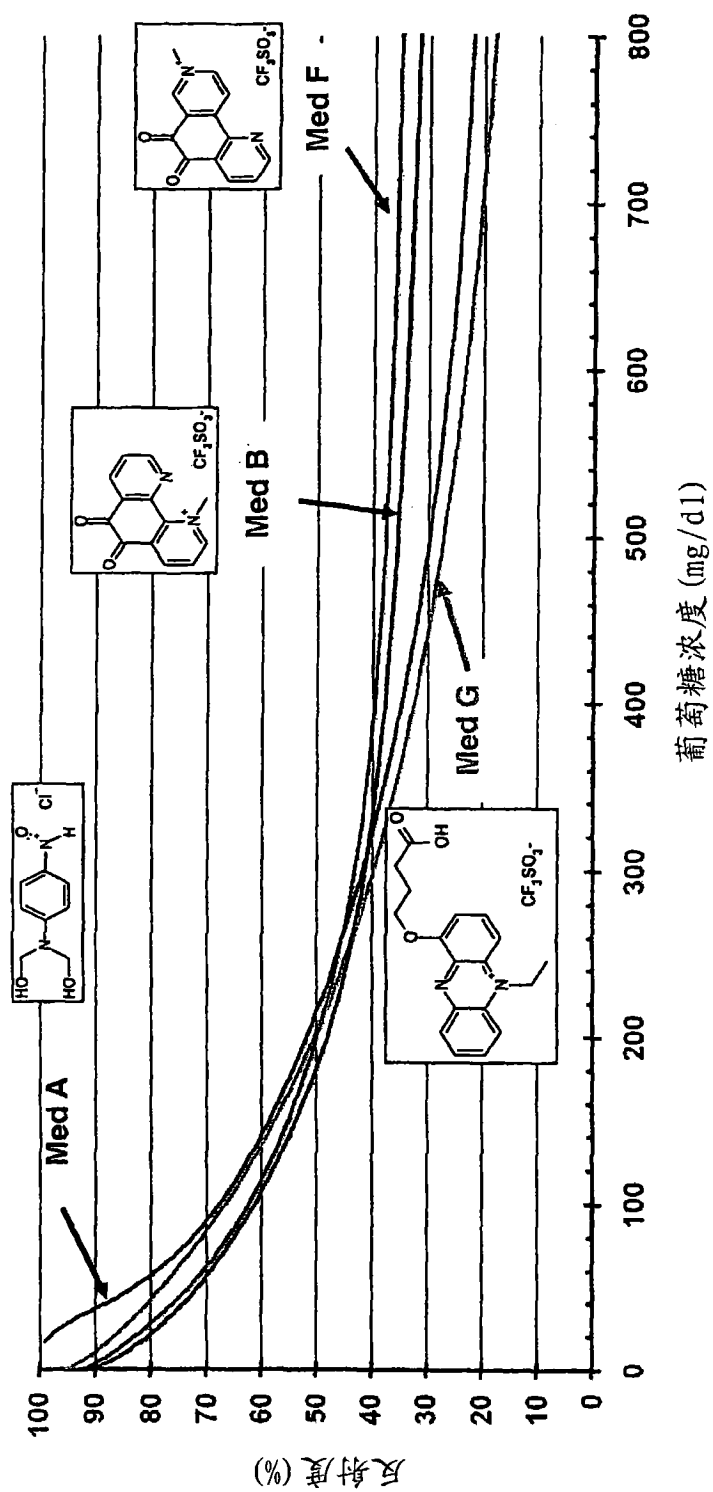


图15

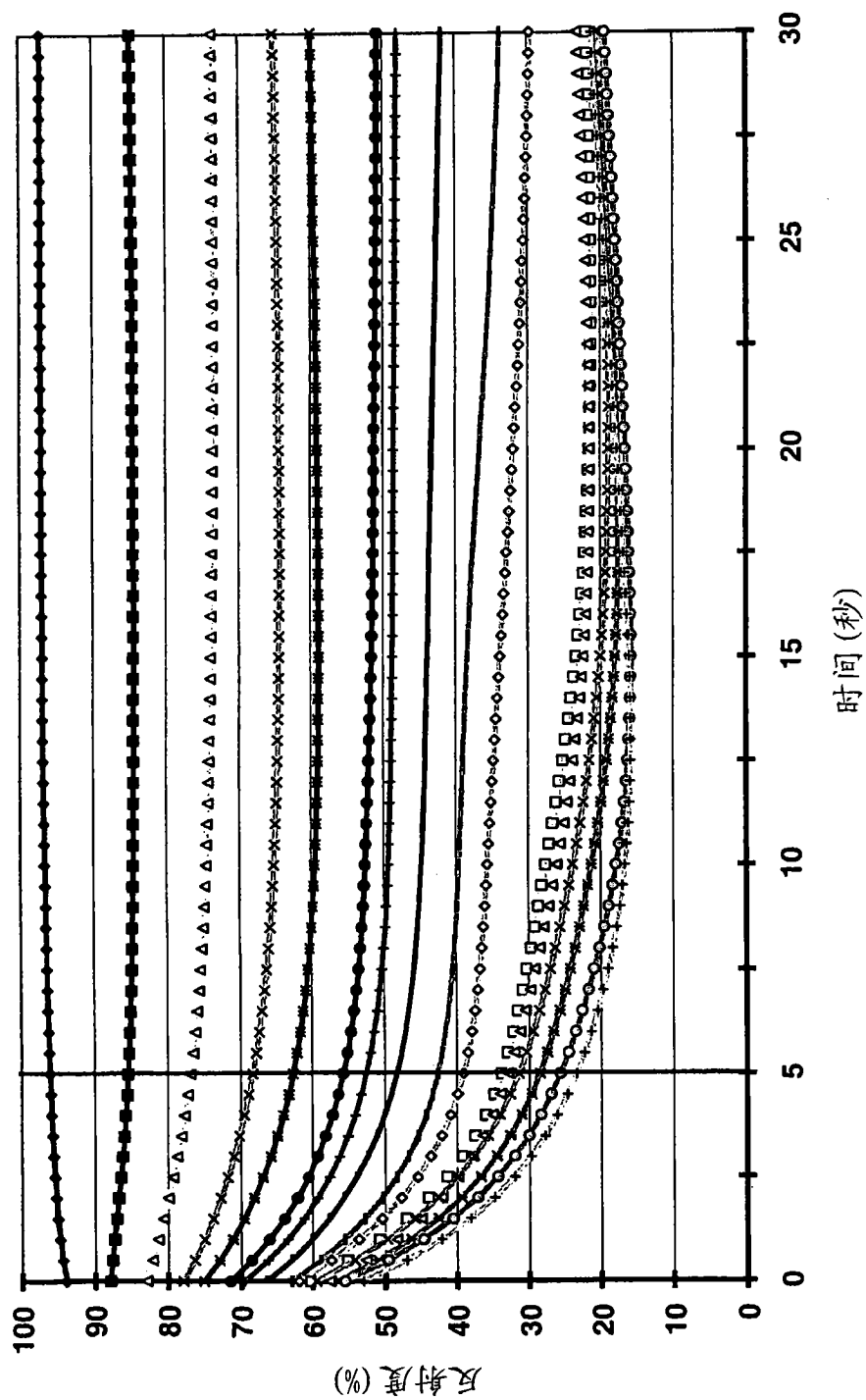


图16

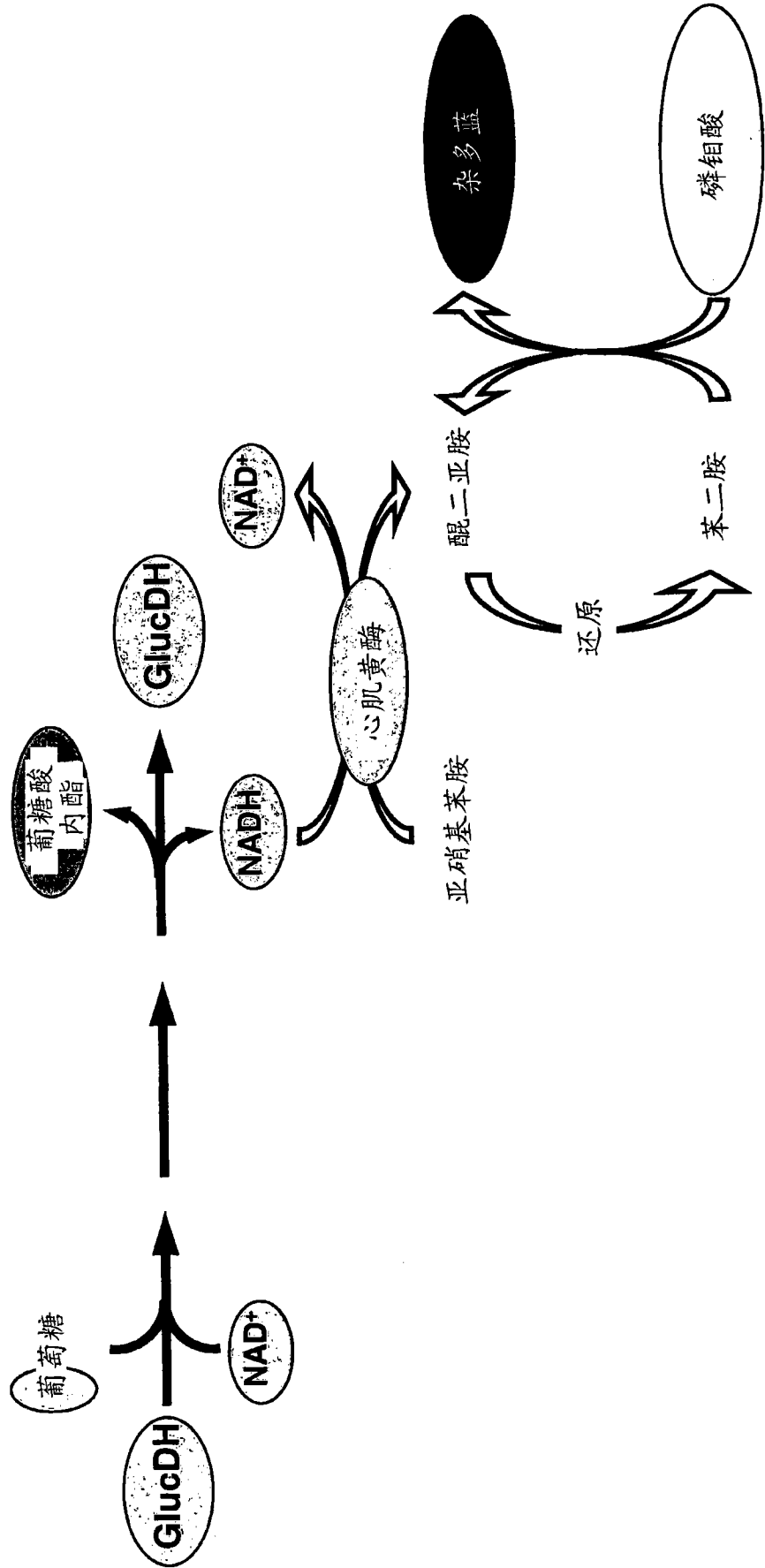


图17

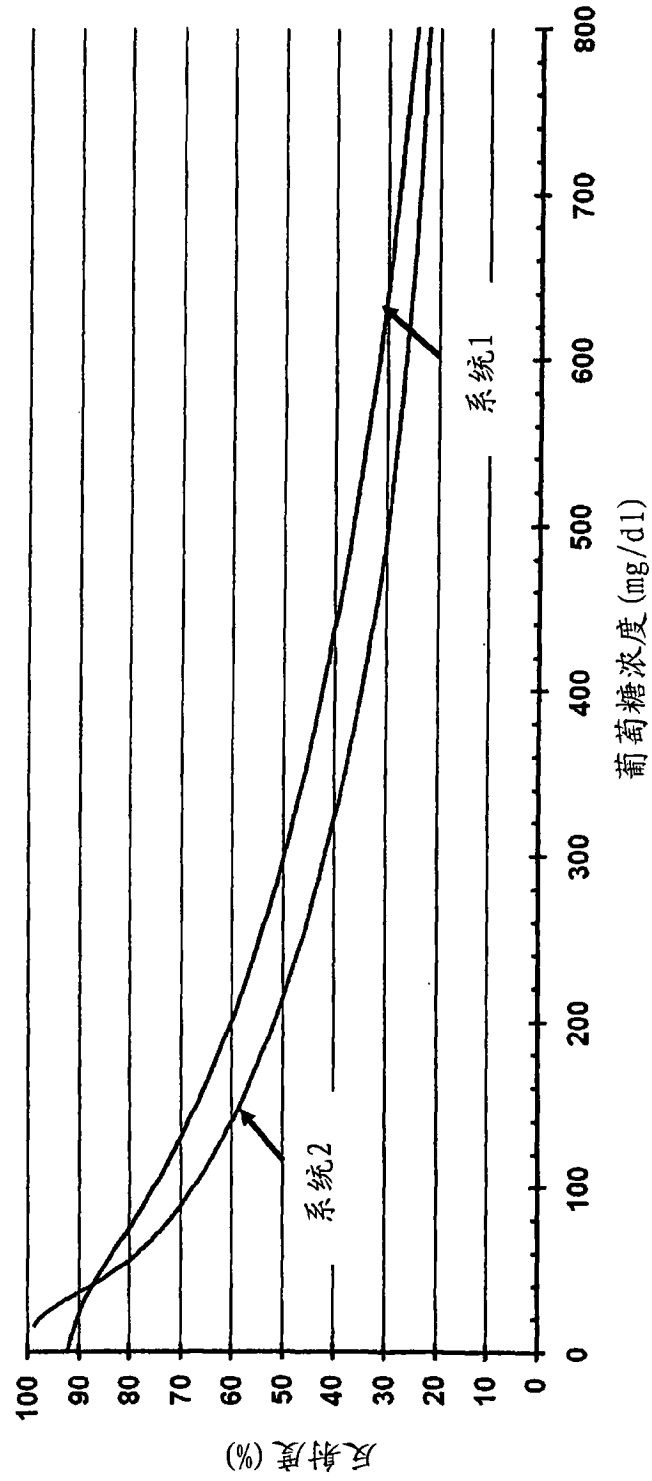


图18

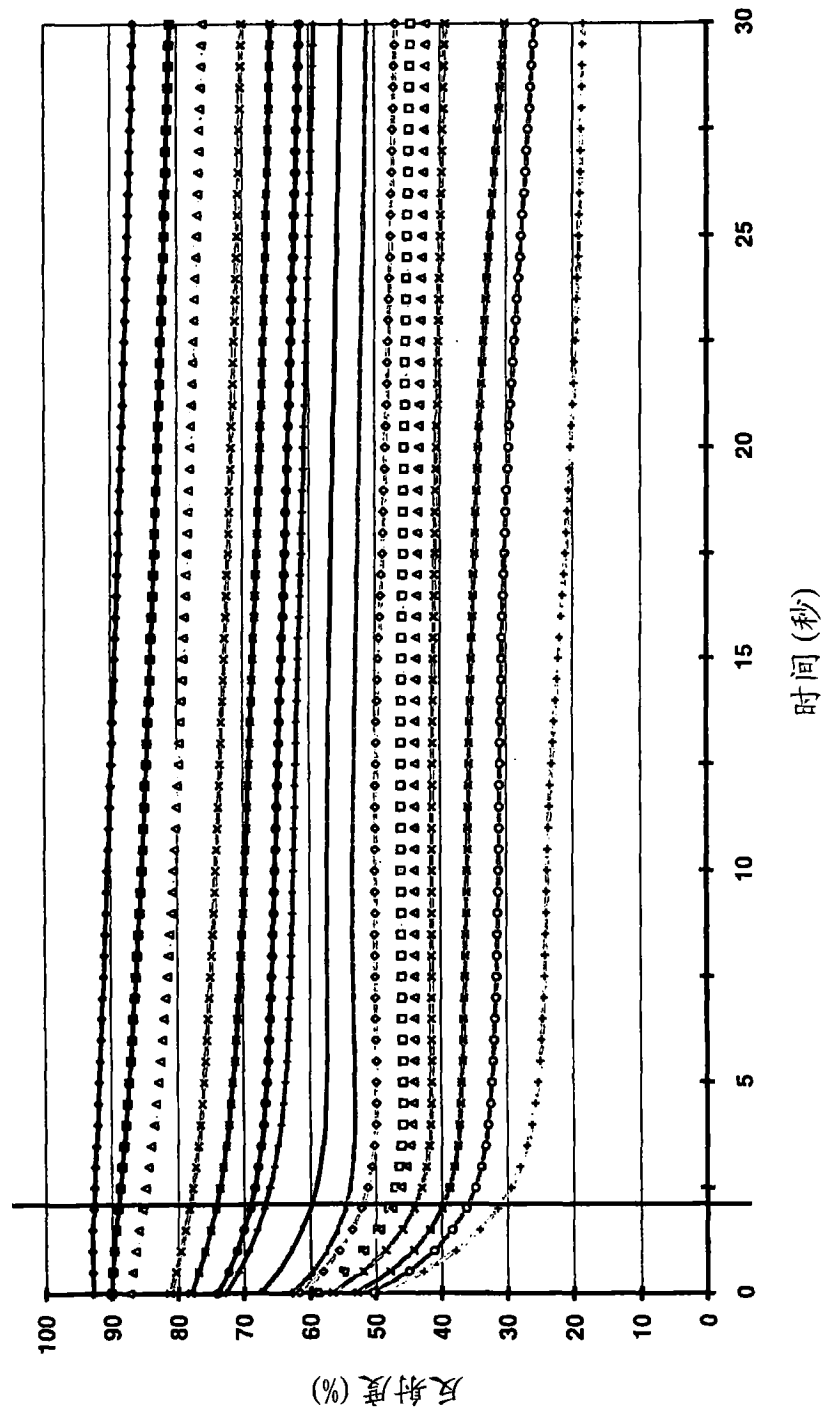


图19

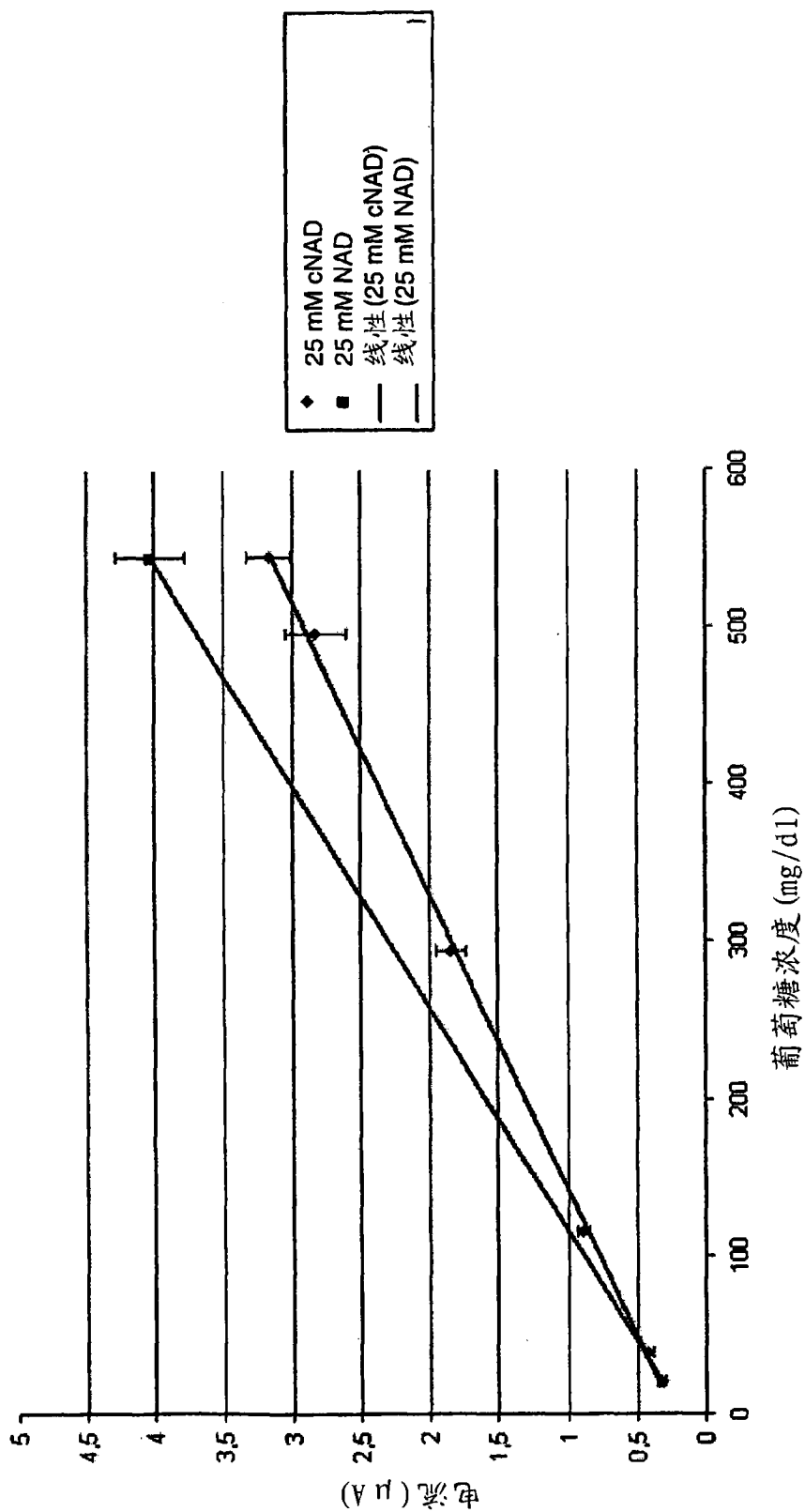


图20

GlucDH_E96G_E170K

M Y P D L K G K V V A I T G A A S G L G K A M A I R F G K E
Q A K V V I N Y Y S N K Q D P N E V K E E V I K A G G E A V
V V Q G D V T K E E D V K N I V Q T A I K E F G T L D I M I
N N A G L G N P V P S H E M P L K D W D K V I G T N L T G A
F L G S R E A I K Y F V E N D I K G N V I N M S S V H E V I
P W P L F V H Y A A S K G G I K L M T K T L A L E Y A P K G
I R V N N I G P G A I N T P I N A E K F A D P K Q K A D V E
S M I P M G Y I G E P E E I A A V A V W L A S K E S S Y V T
G I T L F A D G G M T K Y P S F Q A G R G

GlucDH_E170K_K252L

M Y P D L K G K V V A I T G A A S G L G K A M A I R F G K E
Q A K V V I N Y Y S N K Q D P N E V K E E V I K A G G E A V
V V Q G D V T K E E D V K N I V Q T A I K E F G T L D I M I
N N A G L E N P V P S H E M P L K D W D K V I G T N L T G A
F L G S R E A I K Y F V E N D I K G N V I N M S S V H E V I
P W P L F V H Y A A S K G G I K L M T K T L A L E Y A P K G
I R V N N I G P G A I N T P I N A E K F A D P K Q K A D V E
S M I P M G Y I G E P E E I A V A V W L A S K E S S Y V T
G I T L F A D G G M T L Y P S F Q A G R G

图21