



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101341248 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 200680045537. 3

(22) 申请日 2006. 10. 12

(30) 优先权数据

60/726, 448 2005. 10. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 06. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/040695 2006. 10. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/044993 EN 2007. 04. 19

(73) 专利权人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 宝洁公司

(72) 发明人 A·肖 L·华莱士 D·A·埃斯特拉

R·霍莫斯 S-K·李

E·S·萨德洛夫斯基 H·欧

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 刘金辉

(51) Int. Cl.

C12N 9/54(2006. 01)

(56) 对比文件

CHO SEONG-JUN ET AL. Purification and characterization of proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from traditional soybean fermentation starter. 《JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY》. 2003, 第51卷(第26期), 第7664-7670页.

VASANTHA N ET AL. GENES FOR ALKALINE PROTEASE AND NEUTRAL PROTEASE FROM *BACILLUS-AMYLOLIQUEFACIENS* CONTAIN A LARGE OPEN READING FRAME BETWEEN THE REGIONS CODING FOR SIGNAL SEQUENCE AND MATURE PROTEIN. 《JOURNAL OF BACTERIOLOGY》. 1984, 第59卷(第3期), 第811-819页.

STRONGIN A ET AL. SEQUENCE REGIONS OF BACILLI METALLOPROTEINASES THAT CAN AFFECT ENZYME THERMOSTABILITY. 《PROTEIN SEQUENCES AND DATA ANALYSIS》. 1991, 第4卷(第6期), 第355-361页.

审查员 姚进孝

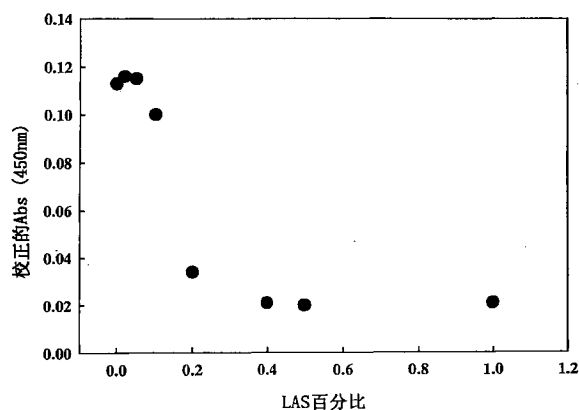
权利要求书1页 说明书114页 附图18页

(54) 发明名称

储存稳定的中性金属蛋白酶的用途和制备

(57) 摘要

本发明提供含有至少一种中性金属蛋白酶的方法和组合物,所述中性金属蛋白酶具有改善的储存稳定性。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶在清洗和其它应用中应用。在一些特别优选的实施方式中,本发明提供含有从芽胞杆菌属某种得到的中性金属蛋白酶(一种或多种)的方法和组合物。在一些更特别优选的实施方式中,中性金属蛋白酶是从解淀粉芽胞杆菌中得到的。在又进一步优选的实施方式中,中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的变体。又在其它实施方式中,中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的同系物。本发明在包括但不限于清洗、漂白和消毒的应用中具体应用。



1. 一种分离的芽孢杆菌中性金属蛋白酶变体,其相对于 SEQ ID NO:18 的亲本多肽具有取代,所述取代选自 Q45E, T59P, S66E, S129I, S129V, F130L, M138I, V190I, S199E, D220P, D220E, K211V, K214Q, G222C, T004V/S023N, T059K/S66Q/S129I, T059R/S66N/S129I, 和 T059K/S66Q/S129V,其中与该亲本多肽相比,该变体具有提高的热稳定性。

2. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其中所述取代选自 S129I 和 S129V。

3. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其中所述取代选自 D220P 和 D220E。

4. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其中该芽孢杆菌中性金属蛋白酶是解淀粉芽孢杆菌中性金属蛋白酶。

5. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其中与亲本多肽相比,在洗涤剂组合物中该变体的热稳定性高至少 1℃。

6. 权利要求 5 的中性金属蛋白酶变体,其中该洗涤剂组合物为 **TIDE®**。

7. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其中热稳定性在 220 或 440ppm 多肽的浓度下通过差示扫描量热法测定。

8. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其与亲本多肽相比还具有提高的洗涤性能。

9. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其与亲本多肽相比还具有在较低或较高 pH 条件下提高的洗涤性能。

10. 权利要求 1 的中性金属蛋白酶变体,其与亲本多肽相比还具有提高的储存稳定性。

11. 包含权利要求 1-10 之任一项的中性金属蛋白酶变体的清洁组合物。

储存稳定的中性金属蛋白酶的用途和制备

[0001] 本发明要求 2005 年 10 月 12 日提交的在审美国临时专利申请序列第 60/726,448 号的优先权。发明领域

[0002] 本发明提供含有至少一种具有改善储存稳定性的中性金属蛋白酶的方法和组合物。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶在清洗和其它应用中找到应用。在一些特别优选的实施方式中,本发明提供含有从芽胞杆菌属某种 (*Bacillus* sp) 得到的中性金属蛋白酶 (一种或多种) 的方法和组合物。在一些更特别优选的实施方式中,中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 中得到。在又进一步优选的实施方式中,中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的变体。在又其它实施方式中,中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶同系物。本发明在包括但不限于清洗、漂白和消毒的应用中找到具体用途。发明背景

[0003] 洗涤剂和其它清洗组合物一般包括活性成分的复合结合。例如,大多数清洗产品包括表面活性剂系统、用于清洗的酶、漂白剂、助洗剂、泡沫抑制剂 (sudssuppressors)、悬污剂 (soil-suspending agents)、去污剂 (soil-release agents)、荧光增白剂 (optical brighteners)、软化剂、分散剂、染料传递抑制化合物、研磨剂、杀菌剂和香料。尽管目前洗涤剂的复杂性,但是仍有许多污迹难以完全除去。而且通常存在残余物积聚,其导致变色 (例如变黄),并且由于清洗不完全使美感降低。由于低 (例如冷水) 洗涤温度和较短洗涤循环的增加使用,这些问题被增加。而且,许多污迹由纤维材料复合混合物构成,所述纤维材料复合混合物主要包括碳水化合物和碳水化合物衍生物、纤维和细胞壁成分 (例如植物材料、木材、泥土 / 基于粘土的土壤和果实)。这些污迹给清洗组合物的配制和使用提出了难以解决的挑战。

[0004] 另外,彩色衣服倾向于变旧,并表现出外观变差 (appearance loss)。一部分这种颜色的损失是由于洗烫过程中的磨损,特别是在自动洗衣机和烘干机中的磨损。此外,织物拉伸强度的损失似乎是由于使用、穿戴和 / 或洗涤以及干燥引起的机械和化学作用的不可避免的结果。因此需要一种有效率和有效果地洗涤彩色衣服以使这些外观损失最小化的工具 (方法)。

[0005] 总之,尽管清洗组合物能力改善,但本领域仍需要去除污迹、保持织物色彩和外观、并且抑制染料传递的洗涤剂。另外,仍需要这样的洗涤剂和 / 或织物护理组合物 (fabric care compositon),其提供和 / 或恢复拉伸强度,以及提供织物的抗皱性能、抗起毛 (anti-bobbling) 性能和 / 或抗收缩性能,以及提供静电控制 (staticcontrol)、织物柔软、保持期望的颜色外观和织物防磨损的特性和益处。特别地,仍需要包括能除去污迹的彩色组分的组合物,所述污迹的彩色组分通常仍附养到正被洗烫的织物上。另外,仍需要适合漂白纺织品的改善的方法和组合物。发明概述

[0006] 本发明提供含有至少一种具有改善储存稳定性的中性金属蛋白酶的方法和组合物。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶在清洗和其它应用中找到应用。在一些特别优选的实施方式中,本发明提供含有从芽胞杆菌属某种得到的中性金属蛋白酶 (一种或多种) 的方法和组合物。在一些更特别优选的实施方式中,中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌中

得到。又在进一步优选的实施方式中,中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的变体。又在其它实施方式中,中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的同系物。本发明在包括但不限于清洗、漂白和消毒的应用中找到具体用途。

[0007] 本发明提供新型中性金属蛋白酶、编码所述中性金属蛋白酶的新型遗传物质、和从芽胞杆菌属某种特别是解淀粉芽胞杆菌获得的中性金属蛋白酶蛋白,以及从它们开发的变体蛋白。特别地,本发明提供从芽胞杆菌属某种特别是解淀粉芽胞杆菌获得的中性金属蛋白酶组合物、编码该蛋白酶的 DNA、含有该编码中性金属蛋白酶的 DNA 的载体、用载体 DNA 转化的宿主细胞和通过宿主细胞产生的酶。本发明也提供清洗组合物(例如洗涤剂组合物)、动物饲料组合物(animal feedcompositions)和纺织品以及皮革处理组合物,其包括从芽胞杆菌属的种特别是解淀粉芽胞杆菌获得的中性金属蛋白酶(一种或多种)。在可选的实施方式中,本发明提供从本文描述的野生型中性金属蛋白酶衍生的突变体(即变体)中性金属蛋白酶。这些突变体中性金属蛋白酶同样可应用于多种应用。

[0008] 本发明提供从芽胞杆菌属的种特别是解淀粉芽胞杆菌获得的分离的中性金属蛋白酶。在进一步实施方式中,中性金属蛋白酶包括如在 SEQ ID NOS :3、4 或 18 列出的氨基酸序列。在另外的实施方式中,本发明提供分离的中性金属蛋白酶,其包括与包含 SEQ ID NOS :3、4 或 18 的中性金属蛋白酶具有至少 45% 的氨基酸同一性。在一些实施方式中,分离的中性金属蛋白酶与包含 SEQ ID NOS :3、4 或 18 的中性金属蛋白酶具有至少 50% 同一性、优选至少 55%、更优选至少 60%、又更优选至少 65%、甚至更优选至少 70%、更优选至少 75%、仍更优选至少 80%、更优选 85%、又更优选 90%、甚至更优选至少 95% 以及最优选 99% 的同一性。

[0009] 本发明也提供与从解淀粉芽胞杆菌获得的金属蛋白酶具有免疫交叉反应性的分离的中性金属蛋白酶,以及包含这些中性金属蛋白酶的组合物。在可选的实施方式中,中性金属蛋白酶与包含 SEQ ID NOS :3、4 或 18 所列出的氨基酸序列的中性金属蛋白酶具有免疫交叉反应性。在进一步的实施方式中,中性金属蛋白酶与解淀粉芽胞杆菌的中性金属蛋白酶的片段(即部分)和/或包含 SEQ ID NOS :3、4 或 18 所列出的氨基酸序列的中性金属蛋白酶具有交叉反应性。实际上,本发明意欲包括解淀粉芽胞杆菌金属蛋白酶的片段(例如表位),其在动物(包括但不限于人)中刺激免疫应答,和/或被任何类的抗体所识别。本发明进一步包括金属蛋白酶上的表位,其与解淀粉芽胞杆菌金属蛋白酶表位交叉反应。在一些实施方式中,金属蛋白酶表位被抗体所识别,但是在动物(包括但不限于人)中不刺激免疫应答,而在其它实施方式中,金属蛋白酶表位在至少一种动物种类(包括但不限于人)中刺激免疫应答,并且被任何类的抗体所识别。本发明也提供鉴别和评估交叉反应表位的方法和组合物。

[0010] 在一些实施方式中,本发明提供 SEQ ID NOS :3、4 或 18 所列出的氨基酸序列。在可选的实施方式中,序列包括在 SEQ ID NOS :3、4 或 18 的至少一个氨基酸位置的取代。在一些特别优选的可选实施方式中,序列包括在 SEQ ID NO :18 的至少一个氨基酸位置的取代。在一些优选的实施方式中,本发明提供中性金属蛋白酶变体,所述变体含有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该取代在与含有 SEQ ID NOS :3、4 或 18 所列出的氨基酸序列的解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。在一些另外优选的实施方式中,本发明提供中性金属蛋白酶变体,所述变体含有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序

列,该取代在与含有 SEQ ID NO:18 所列出的氨基酸序列的解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置。在可选的实施方式中,本发明提供中性金属蛋白酶变体,所述变体含有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该取代在与含有 SEQ ID NOS:3、4 或 18 至少一部分的解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。在一些可选的优选的实施方式中,中性金属蛋白酶在 SEQ ID NOS:3、4 或 18 的至少一部分含有多个突变。在一些可选的优选的实施方式中,中性金属蛋白酶在 SEQ ID NO:18 的至少一部分含有多个突变。

[0011] 又在其它实施方式中,本发明提供在 SEQ ID NO:18 列出的氨基酸序列。在可选的实施方式中,序列在 SEQ ID NO:18 的至少一个氨基酸位置包括取代。在一些优选的实施方式中,本发明提供中性金属蛋白酶变体,所述变体含有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该取代在与含有 SEQ ID NO:18 所列出的氨基酸序列的解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。在可选的实施方式中,本发明提供中性金属蛋白酶变体,所述变体含有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该取代在与含有 SEQ ID NO:18 至少一部分的解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。在一些可选的优选的实施方式中,中性金属蛋白酶在 SEQ ID NO:18 的至少一部分含有多个突变。

[0012] 在一些特别优选的实施方式中,与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比,这些变体具有提高的性能。本发明也提供中性金属蛋白酶变体,其与野生型中性金属蛋白酶相比,具有至少一个提高的性能。在一些另外特别优选的实施方式中,与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比,这些变体具有提高的稳定性。在一些进一步优选的实施方式中,与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比,这些变体具有提高的热稳定性。在又另外优选的实施方式中,与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比,这些变体在较低或较高 pH 条件下具有提高的性能。

[0013] 本发明也提供中性金属蛋白酶,其包括 SEQ ID NOS:3、4 或 18 所列出的氨基酸序列的至少一部分。在一些实施方式中,编码这些中性金属蛋白酶的核苷酸序列包括选自 SEQ ID NOS:1、2、12 和 / 或 13 的核苷酸序列。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶是具有与在 SEQ ID NOS:3、4 或 18 列出的氨基酸序列相似的氨基酸序列的变体。又在其它实施方式中,中性金属蛋白酶是变体和 / 或同系物。在进一步的实施方式中,中性金属蛋白酶是图 3 到图 5 任何一个所列出的中性金属蛋白酶。在其它实施方式中,中性金属蛋白酶是在图 3、4 和 / 或 5 列出的中性金属蛋白酶的变体。

[0014] 本发明也提供表达载体,其包括编码 SEQ ID NOS:3、4 或 18 所列出的中性金属蛋白酶的至少一部分的多核苷酸序列。本发明进一步提供含有编码至少一种中性金属蛋白酶变体的多核苷酸序列的表达载体,所述变体含有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列(一个或多个),该取代在与含有 SEQ ID NOS:3、4 或 18 所列出的氨基酸序列的芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。在进一步的实施方式中,本发明提供包括这些表达载体的宿主细胞。在一些特别优选的实施方式中,宿主细胞选自芽胞杆菌属某种。本发明也提供宿主细胞产生的中性金属蛋白酶。

[0015] 本发明也提供组合物,其包含从芽胞杆菌属某种特别是解淀粉芽胞杆菌获得的分离的中性金属蛋白酶的至少一部分,其中中性金属蛋白酶的至少一部分是由选自 SEQ ID NOS:1、2、12 和 / 或 13 的多核苷酸序列编码的。在进一步的实施方式中,本发明也提供包括这些表达载体的宿主细胞。在一些特别优选的实施方式中,宿主细胞是芽胞杆菌属某种。

本发明也提供宿主细胞产生的中性金属蛋白酶。

[0016] 本发明也提供变体中性金属蛋白酶,其中中性金属蛋白酶在相应于 SEQ ID NO:3 和 / 或 SEQ ID NO:18 中的氨基酸位置含有至少一个取代,并且与野生型解淀粉芽胞杆菌金属蛋白酶相比,其中变体金属蛋白酶在至少一个特性上具有更好的性能。在一些特别优选的实施方式中,本发明也提供变体中性金属蛋白酶,其中中性金属蛋白酶在相应于 SEQ ID NO:18 中的氨基酸位置含有至少一个取代,并且与野生型解淀粉芽胞杆菌金属蛋白酶相比,其中变体金属蛋白酶在至少一个特性上具有更好的性能。

[0017] 本发明也提供变体氨基酸,其中所述变体含有至少一个氨基酸取代,所述取代在与含有 SEQ ID NO:18 所列出的氨基酸的中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行,其中所述位置(一个或多个)选自位置 1,3,4,5,6,11,12,13,14,16,21,23,24,25,31,32,33,35,36,38,44,45,46,47,48,49,50,51,54,55,58,59,60,61,62,63,65,66,69,70,76,85,86,87,88,90,91,92,96,97,98,99,100,102,109,110,111,112,113,115,117,119,127,128,129,130,132,135,136,137,138,139,140,146,148,151,152,153,154,155,157,158,159,161,162,169,173,178,179,180,181,183,184,186,190,191,192,196,198,199,200,202,203,204,205,210,211,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,228,229,237,239,240,243,244,245,248,252,253,260,261,263,264,265,267,269,270,273,277,280,282,283,284,285,286,288,289,290,292,293,296,297,和 299。

[0018] 本发明也提供分离的中性金属蛋白酶变体,其具有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,所述取代在与含有 SEQ ID NO:18 所列出的氨基酸序列的中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。在一些实施方式中,分离的中性金属蛋白酶变体具有在与含有 SEQ ID NO:18 中列出的氨基酸序列的中性金属蛋白酶的下列位置相同的位置进行的取代:1,3,4,5,6,11,12,13,14,16,21,23,24,25,31,32,33,35,36,38,44,45,46,47,48,49,50,51,54,55,58,59,60,61,62,63,65,66,69,70,76,85,86,87,88,90,91,92,96,97,98,99,100,102,109,110,111,112,113,115,117,119,127,128,129,130,132,135,136,137,138,139,140,146,148,151,152,153,154,155,157,158,159,161,162,169,173,178,179,180,181,183,184,186,190,191,192,196,198,199,200,202,203,204,205,210,211,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,228,229,237,239,240,243,244,245,248,252,253,260,261,263,264,265,267,269,270,273,277,280,282,283,284,285,286,288,289,290,292,293,296,297,和 299。

[0019] 在另外的实施方式中,分离的中性金属蛋白酶变体包括选自下列的至少一个突变:T004C, T004E, T004H, T004I, T004K, T004L, T004M, T004N, T004P, T004R, T004S, T004V, T004W, T004Y, G012D, G012E, G012I, G012K, G012L, G012M, G012Q, G012R, G012T, G012V, G012W, K013A, K013C, K013D, K013E, K013F, K013G, K013H, K013I, K013L, K013M, K013N, K013Q, K013S, K013T, K013V, K013Y, T014F, T014G, T014H, T014I, T014K, T014L, T014M, T014P, T014Q, T014R, T014S, T014V, T014W, T014Y, S023A, S023D, S023F, S023G, S023I, S023K, S023L, S023M, S023N, S023P, S023Q, S023R, S023S, S023T, S023V, S023W, S023Y, G024A, G024D, G024F, G024G, G024H, G024I, G024K, G024L, G024M, G024N, G024P, G024R, G024S, G024T, G024V, G024W, G024Y, K033H, Q045C, Q045D, Q045E, Q045F, Q045H, Q045I, Q045K, Q045L, Q045M, Q045N, Q045P, Q045R, Q045T, Q045W, N046A, N046C, N046E, N046F,

N046G, N046H, N046I, N046K, N046L, N046M, N046P, N046Q, N046R, N046S, N046T, N046V, N046W, N046Y, R047E, R047K, R047L, R047M, R47Q, R047S, R047T, Y049A, Y049C, Y049D, Y049E, Y049F, Y049H, Y049I, Y049K, Y049L, Y049N, Y049R, Y049S, Y049T, Y049, Y049W, N050D, N050F, N050G, N050H, N050I, N050K, N050L, N050M, N050P, N050Q, N050R, N050W, N050Y, T054C, T054D, T054E, T054F, T054G, T054H, T054I T054K, T054L, T054M, T054N, T054P, T054Q, T054R, T054S, T054V, T054W, T054Y, S058D, S058H, S058I, S058L, S058N, S058P, S058Q, T059A, T059C, T059E, T059G, T059H, T059I, T059K, T059L T059M, T059N, T059P, T059Q, T059R, T059S, T059V, T059W, T060D, T060F, T060I, T060K, T060L, T060N, T060Q, T060R, T060V, T060W, T060Y, T065C, T065E, T065F, T065H, T065I, T065K, T065L, T065M, T065P, T065Q, T065R, T065V, T065Y, S066C, S066D, S066E, S066F, S066H, S066I, S066K, S066L, S066N, S066P, S066Q, S066R, S066T, S066V, S066W, S066Y, Q087A, Q087D, Q087E, Q087H, Q087I, Q087K, Q087L, Q087M, Q087N, Q087R, Q087S, Q087T, Q087V, Q087W, N090C, N090D, N090E, N090F, N090G, N090H, N090K, N090L, N090R, N090T, N096G, N096H, N096K, N096R, K097H, K097Q, K097W, K100A, K100D, K100E, K100F, K100H, K100N, K100P, K100Q, K100R, K100S, K100V, K100Y, R110A, R110C, R110E, R110H, R110K, R110L, R110M, R110N, R110Q, R110S, R110Y, D119E, D119H, D119I, D119L, D119Q, D119R, D119S, D119T, D119V, D119W, G128C, G128F, G128H, G128K, G128L, G128M, G128N, G128Q, G128R, G128W, G128Y, S129A, S129C, S129D, S129F, S129G, S129H, S129I, S129K, S129L, S129M, S129Q, S129R, S129T, S129V, S129W, S129Y, F130I, F130K, F130L, F130M, F130Q, F130R, F130T, F130V, F130Y, S135P, G136I, G136L, G136P, G136V, G136W, G136Y, S137A, M138I, M138K, M138L, M138Q, M138V, D139A, D139C, D139E, D139G, D139H, D139I, D139K, D139L, D139M, D139P, D139R, D139S, D139V, D139W, D139Y, V140C, Q151I, E152A, E152C, E152D, E152F, E152G, E152H, E152L, E152M, E152N, E152R, E152S, E152W, N155D, N155K, N155Q, N155R, D178A, D178C, D178G, D178H, D178K, D178L, D178M, D178N, D178P, D178Q, D178R, D178S, D178T, D178V, D178W, D178Y, T179A, T179F, T179H, T179I, T179K, T179L, T179M, T179N, T179P, T179Q, T179R, T179S, T179V, T179W, T179Y, E186A, E186C, E186D, E186G, E186H, E186K, E186L, E186M, E186N, E186P, E186Q, E186R, E186S, E186T, E186V, E186W, E186Y, V190H, V190I, V190K, V190L, V190Q, V190R, S191F, S191G, S191H, S191I, S191K, S191L, S191N, S191Q, S191R, S191W, L198M, L198V, S199C, S199D, S199E, S199F, S199I, S199K, S199L, S199N, S199Q, S199R, S199V, Y204H, Y204T, G205F, G205H, G205L, G205M, G205N, G205R, G205S, G205Y, K211A, K211C, K211D, K211G, K211M, K211N, K211Q, K211R, K211S, K211T, K211V, K214A, K214C, K214E, K214I, K214L, K214M, K214N, K214Q, K214R, K214S, K214V, L216A, L216C, L216F, L216H, L216Q, L216R, L216S, L216Y, N218K, N218P, T219D, D220A, D220E, D220H, D220K, D220N, D220P, A221D, A221E, A221F, A221I, A221K, A221L, A221M, A221N, A221S, A221V, A221Y, G222C, G222H, G222N, G222R, Y224F, Y224H, Y224N, Y224R, T243C, T243G, T243H, T243I, T243K, T243L, T243Q, T243R, T243W, T243Y, K244A, K244C, K244D, K244E, K244F, K244G, K244L, K244M, K244N, K244Q, K244S, K244T, K244V, K244W, K244Y, V260A, V260D, V260E, V260G, V260H, V260I, V260K, V260L, V260M, V260P, V260Q, V260R, V260S, V260T, V260W, V260Y, Y261C, Y261F, Y261I, Y261L, T263E, T263F, T263H, T263I,

T263L, T263M, T263Q, T263V, T263W, T263Y, S265A, S265C, S265D, S265E, S265K, S265N, S265P, S265Q, S265R, S265T, S265V, S265W, K269E, K269F, K269G, K269H, K269I, K269L, K269M, K269N, K269P, K269Q, K269S, K269T, K269V, K269W, K269Y, A273C, A273D, A273H, A273I, A273K, A273L, A273N, A273Q, A273R, A273Y, R280A, R280C, R280D, R280E, R280F, R280G, R280H, R280K, R280L, R280M, R280S, R280T, R280V, R280W, R280Y, L282F, L282G, L282H, L282I, L282K, L282M, L282N, L282Q, L282R, L282V, L282Y, S285A, S285C, S285D, S285E, S285K, S285P, S285Q, S285R, S285W, Q286A, Q286D, Q286E, Q286K, Q286P, Q286R, A289C, A289D, A289E, A289K, A289L, A289R, A293C, A293R, N296C, N296D, N296E, N296K, N296R, N296V, A297C, A297K, A297N, A297Q, A297R 和 G299N。

[0020] 在又进一步的实施方式中,本发明提供分离的变体中性金属蛋白酶,其中所述金属蛋白酶包括选自下列的多个突变:S023W/G024M, T004V/S023W/G024W, S023W/G024Y/A288V, T004L/S023W/G024Y, N046Q/N050F/T054L, N050Y/T059R/S129Q, S023W/G024W, A273H/S285P/E292G, S023Y/G024Y, S023Y/G024W, T004S/S023Y/G024W, N046Q/T054K, S023W/G024Y, T004V/S023W, T059K/S066N, N046QQ/050W/T054H/T153A, T004V/S023W/G024Y, L282M/Q286P/A289R, N046Q/R047K/N050Y/T054K, L044Q/T263W/S285R, T004L/S023W/G024W, R047K/N050F/T054K, A273H/S285R, N050Y/T059K/S066Q, T054K/Q192K, N046Q/N050W, L282M/Q286K, T059K/S066Q, T004S/S023W, L282M/Q286R/A289R/K011N, L282M/A289R, N046Q/N050W/T054H, T059K/S129Q, T004S/S023N/G024Y/F210L, T004V/S023W/G024M/A289V, L282M/Q286K/A289R/S132T, N050W/T054H, L282M/Q286R, L282F/Q286K/A289R, T059R/S066Q, R047K/N050W/T054H, S265P/L282M/Q286K/A289R, L282M/Q286R/T229S, L282F/Q286K, T263W/S285R, S265P/L282M/Q286K, T263H/A273H/S285R, T059R/S129V, S032T/T263H/A273H/S285R, T059R/S066Q/S129Q, T004S/G024W, T004V/S023W/G024M, T059K/S066Q/S129Q, L282M/Q286K/A289R/I253V, T004V/S023Y/G024W, T059R/S066N/S129Q, N050F/T054L, T004S/S023N/G024W, T059R/S066N, T059R/S066N/S129V, Q286R/A289R, N046Q/R047K/N050F/T054K, S265P/L282M/Q286P/A289R, S265P/L282M/Q286R/A289R Q062K/S066Q/S129I, S023N/G024W, N046Q/R047K/N050W/T054H, R047K/T054K, T004L/G024W, T014M/T059R/S129V, T059R/S066Q/N092S/S129I, R047K/N050W/T054K, T004V/G024W, N047K/N050F/T054K, S265P/L282F/Q286K/N061Y, L282F/Q286K/E159V, T004V/S023Y/G024M, S265P/L282F/A289R/T065S, T059K/F063L/S066N/S129V, T004L/S023W, N050F/T054H, T059R/S066Q/S129M, V190I/D220E/S265W/L282F, T004S/S023Y/G024M, T004L/S023N/G024Y, T059K/S066N/S129I, T059R/S066N/S129I, L282M/Q286R/A289R/P162S, N046Q/N050F/T179N, T059K/Y082C/S129V, T059K/S129I, N050Y/T054K, T059K/S066Q/V102A/S129Q, T059R/S066Q/S129I, T059W/S066N/S129V/S290R, T059R/S129I, T059K/S066Q/S129I, T059K/S066Q/S129V, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T004V/S023N/G024W, S265P/Q286K, S265P/L282F/A289R, D220P/S265W, L055F/T059W/S129V, T059R/S129Q/S191R, N050W/T054K, T004S/S023W/G024M, R047K/N050F/T054H, T059K/S066N/K088E, T059K/S066Q/S129I/V291L, L282M/Q286R/A289R, T059R/S066N/F085S/S129I, L282F/Q286P/A289R, L282F/Q286R/A289R, G099D/S265P/L282F/Q286K/A289R, N046Q/N050F, N050Y/T059W/S066N/S129V, T009I/D220P/

S265N, V190F/D220P/S265W, N157Y/T263W/A273H/S285R, T263W/A273H/S285R, T263W/S285W, T004V/S023Y, N046Q/R047K/N050W, N050W/T054L, N200Y/S265P/L282F/Q286P/A289R, T059R/S066Q/P264Q, T004V/G024Y, T004L/G024Y, N050Y/S191I, N050Y/T054L, T004L/S023W/G024Y/N155K, F169I/L282F/Q286R/A289R, L282M/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152W/D183N, N046Q/R047K/N050Y/T054H, T004V/G024M, N050Y/T059W/S066Q/S129V, S023N/G024Y, T054H/P162Q, T004S/S023W/G024Y, N050Y/T054H, L282F/Q286R/A289R/F169I, R047K/N050W, V190F/D220P, L282M/F173Y, T004L/S023Y, N050W/A288D, V190I/D220P/S265Q, S265P/L282F/Q286P/A289R, S265P/L282F/Q286R/A289R, N046Q/N050Y/T054K, T059W/S066Q, T263W/A273H/S285W T263W/A273H/S285P, S023Y/G024M, T004L/S023N/G024W, T004V/S023N/G024Y, T059W/S066N/S129Q, T004S/S023Y, T004S/S023N/G024M, T059W/S066N/A070T, T059W/S066Q/S129Q, T263W/A273H, A273H/285P, N046Q/R047K/N050Y/T054L, N046Q/R047K/N050Y, R047K/N050Y, T263H/S285W, R047K/N050F, N046Q/R047K/N050F/T054H, S023N/G024M, T004S/G024Y, R047K/N050Y/T054H, T059W/S066N/S129I, R047K/T054L, T004S/S023W/G024W, M138L/E152F/T146S, D220P/S265N, T004S/G024M, T004V/S023N, N046Q/N050F/T054K, N046Q/N050Y/T054H, Q062H/S066Q/S129Q, T059W/S129Q, T059W/S129V, N050F/T054K, R047K/N050F/T054L, V190I/D220P/S265W, N112I/T263H/A273H/S285R, T059W/S066N/S129V, T059W/S066Q/S129I, T059W/S129I, T263W/S285P, V190I/D220P, A289V/T263H/A273H, T263H/A273H/S285P, N90S/A273H/S285P, R047K/N050Y/T054L, T004S/S023N, T059R/S129Q, N046Q/R047K/T054H, T059W/S066Q/S129V, E152W/T179P, N050Y/S066Q/S129V, T202S/T263W/A273H, T263W/A273H/S285P, M138L/E152W/T179P, N046Q/R047K, N046Q/T054H/F176L, T004L/G024M, T004S/L282M, T263H/A273H, T263H/A273H/S285W, T004L/S023Y/G024M, L282F/Q286P, T004V/S023Y/G024Y, V190F/S265W, M138L/E152F, V190F/D220E/S265W, N046Q/N050F/T054H, N157Y/S285W, T004F/S023Y/G024M, T004V/S023N/G024M, L198I/D220E/S265Q, N046Q/N050Y/T054K/A154T, S016L/D220E/S265W, D220E/S265W, D220E/A237S/S265W, S066Q/S129Q, V190F/D220E/S265Q/T267I, L282M/F173Y/T219S, E152F/T179P, V190I/S265W, M138L/S066Q, M138L/E152W, T059W/S066Q/A070T/S129I, V190F/D220E/S265N, V190F/S265N, N046Q/N050Y 和 M138L/E152F/T179P。

[0021] 在又进一步实施方式中, 本发明提供分离的变体中性金属蛋白酶, 其中所述金属蛋白酶包括选自下列的多个突变: V190I/D220P, V190I/D220P/S265Q, V190L/D220E, V190I/D220E/S265Q, V190I/D220E/S265W/L282F, V190L/D220E/S265Q, V190I/D220E/S265W, V190L/D220E/S265N, T059R/S066Q/S129I, V190I/D220E/S265N, V190L/D220E/S265W, V190I/D220E, T059W/S066N/S129V, T059K/S066Q/S129V, T059K/Y082C/S129V, T059R/S066N/S129I, S066Q/S129V, T059R/S066Q/S129V, T059R/S129I, N050Y/T059W/S066N/S129V, D220P/S265N, S066Q/S129I, T059W/S066Q/S129V, T059K/S066Q/S129I, T059R/S129V, N050Y/S066Q/S129V, T059W/S066Q/S129I, N050Y/T059W/S066Q/S129V, T059K/S129I, D220P/S265W, F130L/M138L/T179P, S066N/S129I, T059R/S066N/S129V, F130I/M138L/T179P, T059R/S066Q/N092S/S129I, S066N/S129V, D220E/S265Q, F130L/M138L/E152W/T179P, T059W/S129V, S265P/L282M/Q286R/A289R, S265P/L282F/Q286R/A289R,

T059W/S066N/S129I, V190I/D220P/S265W, F130L/E152W/T179P, F130L/M138L/E152F/T179P, Q062K/S066Q/S129I, T059K/S066N/S129I, E152H/T179P, S265P/L282M/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152H/T179P, T263W/A273H/S285R, D220E/S265N, F130I/M138L/E152H/T179P, F130V/M138L/E152W/T179P, F130I/M138L/E152W/T179P, T059W/S129I, D220E/S265W, F130V/M138L/T179P, F130L/E152V/T179P, T059R/S129Q, T263W/S285P, F130I/M138L/E152F/T179P, E152W/T179P, V190L/S265Q, F130L/E152F/T179P, L282M/Q286R/A289R/P162S, D220P/S265Q, M138L/E152F/T179P, F130I/E152H/T179P, M138L/E152W/T179P, F130L/T179P, F130L/M138L/E152W/T179P/Q286H, F130L/M138L/E152H, T263W/A273H/S285W, S265P/Q286K, T059W/S066Q/S129Q, T263W/S285R, T059W/S066N/S129Q, T263W/S285W, T059R/S066N/S129Q, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T059W/S129Q, Q062H/S066Q/S129Q, L282M/Q286R/A289R, V190L/D220E/S265N/V291I, V190L/S265N, F130L/M138L/E152W, N050Y/T059R/S129Q, F130I/179P, T059K/S066Q/S129Q, T059K/S129Q, S265P/L282M/Q286P/A289R, S265P/L282F/Q286P/A289R, T263W/A273H/S285P, S265P/L282M/Q286K, S016L/D220E/S265W, S066Q/S129Q, S265P/L282M/Q286P, L282F/Q286R/A289R, F130V/E152W/T179P, L044Q/T263W/S285R L055F/T059W/S129V, V190L/S265W, Q286R/A289R, G99D/S265P/L282F/Q286K/A289R, F130L/M138L/E152F, T059R/S066Q/S129Q, F130L/E152H, S066N/S129Q, T004S/S023N/G024M/K269N, S265P/L282M, E152F/T179P, T059W/S066N/S129V/S290R, L282F/Q286K/A289R, F130L/M138L, F130I/M138L/E152W, S265P/L282F, F130I/M138L/E152H, F130V/M138L/E152H, V190I/S265Q, M138L/E152M, S265P/L282F/Q286P, M138L/E152H, T059K/S066N/K088E, V190I/S265W, F130L/E152W, L282M/Q286K/A289R, L282M/Q286K/A289R/I253V, T263W/A273H, V190I/S265N, M138L/E152W, A273H/S285R, F130I/M138L, F130L/E152F, F130V/M138L/E152W, T059K/S066Q/V102A/S129Q, F130V/E152H/T179P, F130I/M138L/E152F, F130V/M138L/E152F, M138L/E152F, L282M/Q286R, F130I/E152H, S265P/L282F/A289R/T065S, T263H/A273H/S285R, F130V/M138L, T014M/T059R/S129V, L282M/Q286R/A289R/K11N, A273H/S285P, L282M/Q286K/A289R/S132T, T263H/A273H/S285W, F130V/E152W, S265P/L282F/Q286K/N061Y, F130I/E152W, L198I/D220E/S265Q, V190I/S265L, T263H/S285W, S265P/L282F/A289R, M138L/S066Q, F130I/E152F, N90S/A273H/S285P, S032T/T263H/A273H/S285R, L282F/Q286P/A289R, N157Y/T263W/A273H/S285R, V105A/S129V, T263H/A273H/S285P, S129Q/L282H, T059W/S066Q, F130V/E152H, S023W/G024Y, T004V/S023N, T059R/S066Q, N050W/T054L, L282M/Q286P/A289R, A115V/V190L/S265W, L282M/Q286K, T059R/S066N, L282F/Q286P, T004V/S023W/G024M, S265P/L282F/Q286R/L78H, L282F/Q286K, T004V/S023W/G024Y, S023W/G024M, T059R/R256S, F130V/E152F, T004V/G024W, N050W/T054K, S023Y/G024M, T004V/S023Y, T004V/S023Y/G024M, N050Y/T054H, S023W/G024W, T004V/S023Y/G024Y, T004V/S023N/G024W, F130L/M138L/E152F/T179P/V291I, N050Y/T059K/S066Q, T004V/S023Y/G024W, T059K/S066N, T004V/S023N/G024Y, S023Y/G024W, N050F/T054L, R047K/T054K, S023N/G024W, L282M/A289R, S023Y/G024Y, T004V/G024M, R047K/N050F/T054K, N050F/T054K, T059K/S066Q, S023N/G024M, S023N/G024Y, T004L/S023N, R047K/N050W/T054H, T004L/S023W/G024Y, T004S/S023W, N046Q/N050W/T054H/A142T, T004L/S023Y,

T004V/S023WN050W/T054H, T004S/S023N, T004S/L282M, T004L/S023W, N050F/T054H, N050Y/T054L 和 R047K/N050W/T054K。

[0022] 在又进一步实施方式中, 本发明提供分离的中性金属蛋白酶, 其包括选自下列的多个突变: S066Q/S129V, S066Q/S129I, N050Y/S066Q/S129V, S066N/S129I, T059K/S066Q/S129V, S066N/S129V, F130L/E152W/T179P, S265P/L282M/Q286R/A289R, F130L/E152V/T179P, T059K/S066Q/S129I, T263W/S285P, T059K/S066N/S129I, T263W/A273H/S285P, S265P/L282F/Q286R/A289R, F130V/E152W/T179P, T263W/A273H/S285R, V190I/D220P/S265W, F130L/E152H, S066N/S129Q, S265P/L282M/Q286K/A289R, V190I/D220E, T059R/S066N/S129I, V190I/D220E/S265W, T059K/S129I, T059R/S066Q/S129I, F130I/M138L/E152H/T179P, F130I/T179P, T263W/A273H/S285W, S016L/D220E/S265W, S066Q/S129Q, V190I/D220E/S265Q, T059R/S066Q/S129V, D220E/S265N, V190L/D220E, D220E/S265W, V190I/D220P, V190L/D220E/S265N, L044Q/T263W/S285R, S265P/L282M/Q286P/A289R, F130L/M138L/E152H/T179P, T263W/S285R, L282M/Q286R/A289R, T263W/S285W, F130I/E152H/T179P, V190I/D220E/S265N, V190L/D220E/S265W, V190I/D220P/S265Q, T059R/S066N/S129V, V190L/D220E/S265Q, E152H/T179P, F130L/M138L/E152F/T179P, Q062H/S066Q/S129Q, T059R/S129V, V190I/D220E/S265W/L282F, V190I/S265Q, F130L/E152F/T179P, D220E/S265Q, E152W/T179P, T059K/S066Q/S129Q, F130L/M138LL/179P, F130I/M138L/E152F/T179P, F130L/M138L/E152W/T179P, N050Y/T059W/S066Q/S129V, S265P/L282M/Q286K, T059R/S129I, F130V/E152H/T179P, D220P/S265N, S265P/L282M/Q286P, F130I/E152H, T059R/S066Q/N092S/S129I, F130L/T179P, G99D/S265P/L282F/Q286K/A289R, T263W/A273H, V190I/S265N, D220P/S265W, F130L/E152W, F130L/M138L/E152H, S265P/L282M, V190I/S265Q, F130L/E152F, T059K/S129Q, Q286R/A289R, M138L/E152W/T179P, F130I/M138L/E152H, D220P/S265Q, V190L/S265N, F130I/M138L/E152W, S265P/Q286K, V190L/S265Q, V190I/S265W, F130L/M138L/E152F, F130V/E152H, E152F/T179P, N050Y/T059W/S066N/S129V, T059R/S066N/S129Q, F130I/E152W, F130V/E152W, T059R/S066Q/S129Q, T263H/A273H/S285P, N90S/A273H/S285P, V190L/D220E/S265N/V291I, T059R/S129Q, A273H/S285P, F130I/M138L/E152W/T179P, F130V/M138L/E152F, N050Y/T059R/S129Q, T059W/S066Q/S129I, F130V/M138L/T179P, F130V/M138L/E152W/T179P, V190L/S265W, F130V/M138L/E152W, T059W/S066Q/S129V, V190I/S265Q, F130V/M138L/E152H, F130I/E152F, N157Y/T263W/A273H/S285R, T263H/S285W, M138L/E152F/T179P, A115V/V190L/S265W, M138L/E152M, T263H/A273H/S285W, F130L/M138L/E152W, T059K/S066N/K088E, F130I/M138L/E152F, F130I/M138L/T179P, T004V/S023N, T059K/S066Q/V102A/S129Q, F130L/M138L, N047K/N050F/T054K, T263H/A273H/S285R, F130L/M138L/E152W/T179P/Q286H, M138L/E152H, M138L/S066Q, L282M/Q286R/A289R/P162S, L282F/Q286R/A289R, Q062K/S066Q/S129I, A273H/S285R, S265P/L282F/Q286P, S265P/L282F/Q286P/A289R, S265P/L282M/Q286R/A289R/T202S/K203N, T059W/S066N/S129I, V190I/S265L, T059W/S066N/S129V, F130I/M138L, L282M/Q286K/A289R/I253V, R047K/N050F/T054K, M138L/E152F, N050W/T054K, L198I/D220E/S265Q, L282F/Q286K/A289R, N050F/T054K, L282M/Q286R, M138L/E152W, S265P/L282F, F130V/E152F, T059W/S066N/S129Q, F130V/M138L,

T263H/A273H, L282M/Q286K/A289R, N046Q/N050W/T054H/A142T, T059W/S066Q/S129Q, S265P/L282F/A289R/T065S, N050F/T054H, S129Q/L282H, L282M/Q286K/A289R/S132T, L282M/Q286R/A289R/K11N, T059K/S066N, R047K/N050W/T054K, T059K/S066Q, T004V/S023Y, T059W/S066N/S129V/S290R, N050Y/T059K/S066Q 和 R047K/N050Y。

[0023] 本发明也提供分离的多核苷酸,其包括下列核苷酸序列:(i) 与 SEQ ID NOS:1、2、12 和 / 或 13 具有至少 70% 的同一性,或者 (ii) 在具有中到高严谨性的条件下,能与从本文列出的任何核苷酸序列得到的探针杂交,包括在实施例提供的引物序列,或 (iii) 与 SEQ ID NOS:1、2、12 和 / 或 13 列出的核苷酸序列互补。在一些实施方式中,本发明提供编码至少一种这类多核苷酸的表达载体。在进一步的实施方式中,本发明提供含有这些表达载体的宿主细胞。在一些特别优选的实施方式中,宿主细胞是芽胞杆菌属某种。本发明也提供宿主细胞产生的中性金属蛋白酶。在进一步的实施方式中,本发明提供与 SEQ ID NOS:1、2、12 和 / 或 13 列出的序列的至少一部分互补的多核苷酸。

[0024] 本发明也提供制造具有中性金属蛋白酶活性的酶的方法,包括:用含有与 SEQ ID NOS:1、2、12 和 / 或 13 具有至少 70% 序列同一性的多核苷酸的表达载体转化宿主细胞;在适合于宿主细胞的条件下,培养转化的宿主细胞。在一些优选的实施方式中,宿主细胞是芽胞杆菌属的种。

[0025] 本发明也提供探针,其含有与 SEQ ID NOS:1、2、12 和 / 或 13 的相应片段基本上相同的 4 到 150 个核苷酸的序列,其中所述探针被用于检测编码具有金属蛋白酶活性的酶的核酸序列。在一些实施方式中,核酸序列从芽胞杆菌属某种获得。

[0026] 本发明也提供清洗组合物 (cleaning composition),其含有从芽胞杆菌属某种获得的至少一种中性金属蛋白酶。在一些实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌获得。在一些特别优选的实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶包括 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 列出的氨基酸序列。在一些进一步的实施方式中,本发明提供分离的中性金属蛋白酶,其包括与含有 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 的中性金属蛋白酶至少 45% 的氨基酸同一性。在一些实施方式中,分离的中性金属蛋白酶包括与 SEQ ID NOS:3、4 或 18 至少 50% 同一性、优选至少 55%、更优选至少 60%、又更优选至少 65%、甚至更优选至少 70%、更优选至少 75%、仍旧更优选至少 80%、更优选 85%、又更优选 90%、甚至更优选至少 95% 以及最优选 99% 的同一性。

[0027] 本发明进一步提供含有至少一种中性金属蛋白酶的清洗组合物,其中至少一种中性金属蛋白酶与从芽胞杆菌属某种获得的中性金属蛋白酶具有免疫交叉反应性。在一些优选的实施方式中,中性金属蛋白酶与从解淀粉芽胞杆菌获得的中性金属蛋白酶具有免疫交叉反应性。在可选的实施方式中,中性金属蛋白酶与含有 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 列出的氨基酸序列的中性金属蛋白酶具有免疫交叉反应性。在进一步的实施方式中,中性金属蛋白酶与芽胞杆菌属某种中性金属蛋白酶和 / 或含有 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 列出的氨基酸序列的中性金属蛋白酶的片段 (即部分) 具有交叉反应性。本发明进一步提供含有至少一种中性金属蛋白酶的清洗组合物,其中中性金属蛋白酶是变体中性金属蛋白酶,其具有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该取代在与含有 SEQ ID NOS:3、4 或 18 所列出的氨基酸序列的芽胞杆菌属某种中性金属蛋白酶,特别是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。在一些特别优选的实施方式中,本发明也提供含有至少一

种中性金属蛋白酶的清洗组合物,其中中性金属蛋白酶是变体中性金属蛋白酶,其具有包括至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该取代在与含有 SEQ ID NO:18 所列出的氨基酸序列的芽胞杆菌属某种中性金属蛋白酶,特别是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶中位置相同的位置进行。

[0028] 又在其它实施方式中,清洗组合物包括含有 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 的一组突变的至少一种中性金属蛋白酶。在一些特别优选的实施方式中,变体中性金属蛋白酶在相应于 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 中氨基酸位置具有至少一个取代,并且与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶比较,其中变体中性金属蛋白酶在至少一个特性上具有更好的性能。

[0029] 本发明也提供含有清洗有效量的至少一种金属蛋白水解酶和适当的清洗制剂的清洗组合物,该酶含有与 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 具有至少 70% 序列同一性的氨基酸序列。在一些优选的实施方式中,清洗组合物进一步包括一种或多种另外的酶或酶衍生物,其选自蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、甘露聚糖酶 (mannanases)、果胶酶、角质酶 (cutinases)、氧化还原酶、半纤维素酶和纤维素酶。

[0030] 本发明也提供含有从芽胞杆菌属某种特别是解淀粉芽胞杆菌获得的至少一种中性金属蛋白酶的组合物,其中组合物进一步包括至少一种稳定剂。在一些实施方式中,稳定剂选自硼砂、甘油、锌离子、钙离子和甲酸钙。在一些实施方式中,本发明提供适合将本发明的酶稳定到阴离子表面活性剂的竞争性抑制剂。在一些实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶从芽胞杆菌属某种获得。在一些特别优选的实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌获得。在一些特别优选的实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶包括 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 列出的氨基酸序列。

[0031] 本发明进一步提供含有从芽胞杆菌属某种获得的至少一种中性金属蛋白酶的组合物,其中中性金属蛋白酶是自溶稳定的变体。在一些实施方式中,至少一种变体中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌获得。在一些特别优选的实施方式中,至少一种变体中性金属蛋白酶包括 SEQ ID NOS:3、4 和 / 或 18 列出的氨基酸序列。

[0032] 本发明也提供含有至少 0.0001 重量百分比的本发明中性金属蛋白酶以及任选地含有辅助成分 (adjunct ingredient) 的清洗组合物。在一些实施方式中,组合物含有辅助成分。在一些优选的实施方式中,组合物含有足够量的 pH 调节物,以提供组合物大约 3 到大约 5 的净 pH (neat pH), 该组合物基本上不含在大约 3 到大约 5 的 pH 下水解的物质。在一些特别优选的实施方式中,该水解的物质包括表面活性剂物质。在另外的实施方式中,清洗组合物是液体组合物,而在其它实施方式中,清洗组合物是固体组合物,在进一步的实施方式中,清洗组合物是凝胶。实际上,本发明不意欲限于任何具体的制剂和 / 或组合物,因为各种制剂和 / 或组合物在本发明中都可使用。在进一步的实施方式中,表面活性剂物质包括含有环氧乙烷部分的烷基硫酸钠表面活性剂。

[0033] 本发明另外提供清洗组合物,所述清洗组合物除了本发明的至少一种中性金属蛋白酶,进一步包括至少一种酸稳定的酶,该清洗组合物含有足够量的 pH 调节物,以提供组合物大约 3 到大约 5 的净 pH, 该组合物基本上不含大约 3 到大约 5 的 pH 下水解的物质。在进一步实施方式中,该水解的物质包括表面活性剂物质。在一些优选的实施方式中,清洗组合物是液体组合物。又在其它实施方式中,表面活性剂物质包括含有环氧乙烷部分的烷基硫酸钠表面活性剂。在一些实施方式中,清洗组合物含有适当的辅助成分。在一些另外

的实施方式中,组合物含有适当的辅助成分。在一些优选的实施方式中,组合物含有大约 0.001wt% 到大约 0.5wt% 的中性金属蛋白酶。

[0034] 在一些可选的优选实施方式中,组合物含有大约 0.01wt% 到大约 0.1wt% 的中性金属蛋白酶。

[0035] 本发明也提供清洗的方法,其包括下列步骤:a) 将含有织物的表面和 / 或物品与适当浓度的含有本发明中性金属蛋白酶的清洗组合物接触;和 b) 任选地洗涤和 / 或冲洗表面或材料。在可选的实施方式中,本文提供的任何适当的组合物在这些方法中找到应用。在一些实施方式中,织物含有至少一种草污迹。在一些特别优选的实施方式中,本发明的清洗组合物在从织物除去草和其它污迹中找到应用。

[0036] 本发明也提供含有从芽胞杆菌属某种获得的至少一种中性金属蛋白酶的动物饲料。在一些实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌获得。在一些特别优选的实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶包括 SEQ ID NOS :3、4 或 18 列出的氨基酸序列。在一些可选的特别优选的实施方式中,至少一种中性金属蛋白酶包括 SEQ ID NO :18 列出的氨基酸序列。

[0037] 本发明提供具有金属蛋白水解活性的分离的多肽,(例如中性金属蛋白酶)其具有 SEQ ID NO :18 列出的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明提供与 SEQ ID NO :18 列出的序列具有大约 40% 到 98% 同一性的分离的多肽。在一些优选的实施方式中,该多肽与 SEQ ID NO :18 列出的序列具有大约 50% 到 95% 的同一性。在一些另外优选的实施方式中,多肽与 SEQ ID NO :18 列出的序列具有大约 60% 到 90% 的同一性。又在其它实施方式中,多肽与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 列出的序列具有大约 65% 到 85% 的同一性。在一些特别优选的实施方式中,多肽与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 列出的序列具有大约 90% 到 95% 的同一性。

[0038] 本发明进一步提供分离的多核苷酸,其编码含有与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 具有至少 40% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列的中性金属蛋白酶。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶与 SEQ ID NOS :3、4 和 / 或 18 具有至少 50% 氨基酸序列同一性。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 具有至少 60% 氨基酸序列同一性。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 具有至少 70% 氨基酸序列同一性。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 具有至少 80% 氨基酸序列同一性。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 具有至少 90% 氨基酸序列同一性。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶与 SEQ ID NOS :3、4 或 18 具有至少 95% 氨基酸序列同一性。本发明也提供含有上面提供的任何多核苷酸的表达载体。

[0039] 本发明进一步提供用本发明的表达载体转化的宿主细胞,以致至少一种中性金属蛋白酶被宿主细胞所表达。在一些实施方式中,宿主细胞是细菌,而在其它实施方式中,宿主细胞是真菌。

[0040] 本发明也提供包括下列核苷酸序列的分离的多核苷酸:(i) 与 SEQ ID NO :1、2、12 和 / 或 13 具有至少 70% 的同一性,或 (ii) 在具有中到高严谨性的条件下,能与从 SEQ ID NO :1、2、12 和 / 或 13 的核苷酸序列得到的探针杂交,或 (iii) 与 SEQ ID NO :1、2、12 和 / 或 13 的核苷酸序列互补。在一些实施方式中,本发明提供含有这类多核苷酸的载体。在进一步的实施方式中,本发明提供用这类载体转化的宿主细胞。

[0041] 本发明进一步提供产生具有中性金属蛋白酶活性的至少一种酶的方法,包括步

骤:用含有与 SEQ ID NO:1、2、12 和 / 或 13 具有至少 70% 序列同一性的多核苷酸的表达载体转化宿主细胞,在适合于宿主细胞的条件下培养转化的宿主细胞以产生中性金属蛋白酶;和回收中性金属蛋白酶。在一些优选的实施方式中,宿主细胞是芽胞杆菌属某种,而在一些可选的实施方式中,宿主细胞是解淀粉芽胞杆菌。

[0042] 本发明也提供编码本文提供的中性金属蛋白酶的 DNA 片段(即部分)。这些片段可用于获得局部长 DNA 片段,该局部长 DNA 片段能被用来从解淀粉芽胞杆菌分离或鉴定编码本文所述的成熟中性金属蛋白酶的多核苷酸,或其具有蛋白水解活性的片段。在一些实施方式中,在 SEQ ID NO:2 提供的 DNA 部分可用于从其它物种获得编码中性金属蛋白酶或其具有金属蛋白水解活性的部分的同源 DNA 片段。

[0043] 本发明进一步提供至少一种探针,该探针含有与 SEQ ID NOS:1,2,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 的片段,和 / 或本文列出的任何引物序列基本上相同的多核苷酸,其中探针被用来检测编码具有金属蛋白水解活性的酶的核酸序列,并且其中核酸序列从细菌源获得。在一些实施方式中,细菌源是芽胞杆菌属某种。在一些优选的实施方式中,细菌源是解淀粉芽胞杆菌。

[0044] 本发明进一步提供含有本文提供的至少一种中性金属蛋白酶的组合物。在一些优选的实施方式中,组合物是清洗组合物。在一些实施方式中,本发明提供含有清洗有效量的至少一种中性金属蛋白酶的清洗组合物,所述中性金属蛋白酶包含与 SEQ ID NO:18 具有至少 40% 序列同一性、与 SEQ ID NO:18 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列,和 / 或具有 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列。在一些实施方式中,清洗组合物进一步包括至少一种适合的清洗辅助剂。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶从芽胞杆菌属某种获得。在一些优选的实施方式中,芽胞杆菌属某种是解淀粉芽胞杆菌。

[0045] 在进一步的实施方式中,清洗组合物进一步包括至少一种另外的酶或酶衍生物,其选自蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、甘露聚糖酶和纤维素酶。

[0046] 本发明也提供分离的天然发生的中性金属蛋白酶,其包括与 SEQ ID NO:18 具有至少 45% 序列同一性的氨基酸序列,与 SEQ ID NO:18 具有至少 60% 序列同一性的氨基酸序列,与 SEQ ID NO:18 具有至少 75% 序列同一性的氨基酸序列,与 SEQ ID NO:18 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列,与 SEQ ID NO:18 具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列,和 / 或具有 SEQ ID NO:18 序列的氨基酸序列,该中性金属蛋白酶从芽胞杆菌属某种分离。在一些实施方式中,中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌分离。

[0047] 在另外的实施方式中,本发明提供本发明的中性金属蛋白酶的基因工程变体。在一些实施方式中,该基因工程变体使用重组 DNA 技术进行基因修饰,而在其它实施方式中,该变体是天然发生的。本发明进一步包括同源酶的基因工程变体以及分离的酶同系物。在一些实施方式中,使用重组 DNA 技术基因修饰基因工程变体同源中性金属蛋白酶,而在其它实施方式中,变体同源中性金属蛋白酶是天然发生的。

[0048] 本发明也提供制造中性金属蛋白酶的方法,包括:(a) 用含有多核苷酸的表达载体转化宿主细胞,该多核苷酸与 SEQ ID NO:2 具有至少 70% 序列同一性、与 SEQ ID NO:2 具有至少 95% 序列同一性和 / 或具有 SEQ ID NO:2 的多核苷酸序列;(b) 在适合于宿主细胞的条件下培养该转化的宿主细胞以产生中性金属蛋白酶;和(c) 回收中性金属蛋白酶。在一些实施方式中,宿主细胞是芽胞杆菌属的种(例如枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)、克劳氏

芽胞杆菌 (*B. clausii*) 或藓杨芽胞杆菌 (*B. licheniformis*)。在可选的实施方式中, 宿主细胞是解淀粉芽胞杆菌。

[0049] 在进一步的实施方式中, 本发明提供制造能相对大量产生本发明的中性金属蛋白酶的宿主细胞的方法。在特别优选的实施方式中, 本发明提供制造具有需要多肽降解或合成的各种商业应用的中性金属蛋白酶的方法, 所述商业应用包括清洗组合物, 以及食物和/或饲料成分、纺织品处理、皮革修饰 (leather finishing)、谷物处理 (grain processing)、肉类处理、清洗、蛋白水解产物的制备、消化助剂、杀微生物组合物、制菌组合物、制真菌组合物、个人护理产品 (例如, 口腔护理 (oralcare)、头发护理 (hair care) 和/或皮肤护理)。

[0050] 本发明也提供与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比具有提高性能的变体中性金属蛋白酶。在一些优选的实施方式中, 与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比, 提高的性能包括提高的热稳定性。在可选的优选实施方式中, 与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比, 提高的性能包括在较低或较高 pH 条件下提高的性能。在另外优选的实施方式中, 与野生型解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶相比, 提高的性能包括提高的自溶稳定性。在一些特别优选的实施方式中, 与目前使用的中性金属蛋白酶相比, 本发明的酶组合物具有比得上或提高的洗涤性能。本发明的其它目标和益处在本文是显而易见的。

附图说明

[0051] 图 1 提供如此图, 该图示出分别使用荧光染料 Fluo-Zn3 和 Fluo-3 确定锌和钙阳离子的纯化 MULTITECT® 中性结合蛋白的亲和和常数的结果。

[0052] 图 2 提供如此图, 该图示出使用 QuantiCleave™ 蛋白酶分析法分析的直链烷基苯磺酸酯 (LAS) 对 0.36mg/ml 配制的重组解淀粉芽胞杆菌的蛋白酶活性的抑制。

[0053] 图 3 提供在本发明发现用途的多种金属蛋白酶同系物的序列对比 (SEQ ID NOS : 173-181)。

[0054] 图 4 提供在本发明发现用途的多种金属蛋白酶同系物的序列对比 (SEQ ID NOS : 182-191)。在该图中, 编号针对嗜热菌蛋白酶 (嗜热溶蛋白芽胞杆菌 (*B. thermoproteolyticus*))。如在图 3 中所示, " *" 表示保守残基, " : " 表示保守取代的残基, 和 " . " 表示相似的残基。

[0055] 图 5 提供通过同源建模方法 (homology modeling) 鉴别的多种金属蛋白酶同系物的序列对比 (SEQ ID NOS : 192-195)。

[0056] 图 6 提供质粒 pJ4 :G01905 的图。

[0057] 图 7 提供质粒 pJ4 :G01906 的图。

[0058] 图 8 提供质粒 pJ4 :G01907 的图。

[0059] 图 9 提供质粒 pJ4 :G01908 的图。

[0060] 图 10 提供质粒 pJ4 :G01909 的图。

[0061] 图 11 提供质粒 pJ4 :G01938 的图。

[0062] 图 12 提供质粒 pJHT 的图。

[0063] 图 13 提供质粒 pAC 的图。

[0064] 图 14 提供 pUBnprE 的图。

[0065] 图 15 提供示意图, 其示出 aprE 启动子和枯草芽胞杆菌 nprE 基因片段的扩增。

[0066] 图 16 提供质粒 pEL501 的图。

[0067] 图 17 提供示意图,其示出 aprE 启动子和枯草芽胞杆菌 nprB 基因片段的扩增。

[0068] 图 18 提供质粒 pEL508 的图。

[0069] 图 19 提供示意图,其示出 aprE 启动子和嗜热脂肪芽胞杆菌 (*B. stearothermophilus*)nprT 基因片段的扩增,其被用于菌株 EL560 的生产。

[0070] 图 20 提供示出菌株 EL560 构建的图。

[0071] 图 21 提供示意图,其示出 aprE 启动子和热溶芽胞杆菌 (*B. caldolyticus*)npr 基因片段的扩增,其被用于菌株 EL561 的生产。

[0072] 图 22 提供示出菌株 EL561 构建的图。

[0073] 图 23 提供示意图,其示出 aprE 启动子和结核芽胞杆菌 (*B. thuringiensis*)nprB 基因片段的扩增。

[0074] 图 24 提供质粒 pEL568 的图。

[0075] 图 25 提供如此图,该图示出在 32℃ 下,在锌和钙离子的存在下,被设计以确定 TIDE® 2005 基本成分中 0.36mg/ml UF 浓度的中性金属蛋白酶 (nprE) 长期储存的实验结果。出于比较的目的,提供在没有盐和过量钙情况下检测得到的结果。

[0076] 图 26 提供使用 Terg-O-Tometer (TOM) 和不同的污染基底的洗涤性能检测数据。图 A 提供的结果表示在 15℃ 下、在 TIDE®-2005 洗涤液中洗涤后,枯草菌溶素 (BPN' Y217L) 和纯化的 MULTIFECT® Neutral 对 EMPA 116 (固定和没有固定在棉织品 (cotton) 上) 的 Δ (delta) 污染物除去率 (%)。图 B 提供的结果表示在 15℃ 下、在 TIDE®-2005 洗涤液中洗涤后,枯草菌溶素 (BPN' Y217L) 和纯化的 MULTIFECT® Neutral 对棉织品上污染的 Equest® 草介质的 Δ 污染物除去率 (%)。图 C 提供的结果表示在 15℃ 下、在 TIDE®-2005 洗涤液中洗涤后,枯草菌溶素 (BPN' Y217L) 和纯化的 MULTIFECT® Neutral 对 CFT C-10 (颜料、油、牛奶在棉织物上) 的 Δ 污染物除去率 (%)。

[0077] 图 27 提供示出使用 VP-Cap DSC (MicroCal™) 获得的 440ppm NprE 和变体的 DSC 扫描结果的图。

[0078] 图 28 提供示出使用 VP-Cap DSC (MicroCal™) 所得到的 440ppm NprE 和变体在存在 130mM 柠檬酸盐的情况下的 DSC 扫描结果的图。

[0079] 图 29 提供示出在存在多种添加剂的情况下并使用 VP-Cap DSC (MicroCal™) 获得的 440ppm NprE 的热熔点的图。在该图中,水平线表示在没有添加剂的情况下野生型 NprE 的 T_m。

[0080] 图 30 提供示出 25℃ 下,在 25% TIDE® 中 90 分钟后, nprE 和 nprE 同系物的残留活性的图。

[0081] 图 31 提供示出 nprE 和 nprE 同系物的 BMI 洗涤性能的图。

[0082] 图 32 提供示出在多种制剂混合物中 NprE 稳定性测量结果的图。

[0083] 图 33 提供示出固定甲酸钙浓度下用不同 DTPA% 浓度的 NprE 失活速率的图 (图 A、B 和 C)。

[0084] 图 34 提供的图表示 DOE 分析软件产生的基于响应目标 (response goal) (衰变速率) 的 DTPA 和甲酸钙组合物的预测曲线 (图 A、B 和 C)。

[0085] 图 35 提供 NprE 的柠檬酸诱导的自溶片段的氨基酸序列 (SEQ IDNOS:222-226),

其突出显示自溶位点。片段 1 和 2 是第一夹子 (clip), 片段 3-5 表示第二夹子。斜体字表示测序的 N- 末端, 粗体字突出显示从各自片段的凝胶内消化 (in-gel digestion) 鉴别的肽。发明描述

[0086] 本发明提供含有至少一种中性金属蛋白酶的方法和组合物, 所述中性金属蛋白酶具有改善的储存稳定性。在一些实施方式中, 中性金属蛋白酶在清洗和其它应用中找到应用。在一些特别优选的实施方式中, 本发明提供含有从芽胞杆菌属某种得到的中性金属蛋白酶 (一种或多种) 的方法和组合物。在一些更特别优选的实施方式中, 中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌中得到。在又进一步优选的实施方式中, 中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的变体。又在其它实施方式中, 中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的同系物。本发明在包括但不限于清洗、漂白和消毒的应用中找到具体用途。

[0087] 除非另有说明, 本发明的实践包括通常用于分子生物学、微生物学、蛋白质纯化、蛋白质工程、蛋白质和 DNA 测序和重组 DNA 领域的传统技术, 这些技术在本领域普通技术人员的范围内。这些技术对本领域技术人员是已知的, 并且在大量教材和参考文件中描述 (参见, 例如 Sambrook 等, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 第二版 (Cold Spring Harbor), [1989]); 和 Ausubel 等, "Current Protocols in Molecular Biology" [1987])。本文提到的所有专利、专利申请、文章和出版物——前面提到和后面将提到的, 在此明确地引入本文作为参考。

[0088] 而且, 本文所提供的标题并非是对本发明的各个方面或各种实施方式的限制, 其可以通过整体参考说明书而被拥有。因此, 通过整体参考说明书, 紧接下面被定义的术语被更加充分地定义。但是, 为了帮助理解本发明, 下面定义了许多术语。定义

[0089] 除非本文中另外定义, 本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的含义相同的含义。例如, Singleton 和 Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2d Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); 以及 Hale 和 Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) 为本领域普通技术人员提供了在本文中使用的许多术语的一般性诠释。尽管和本文中描述的那些相似或等同的任何方法和材料在本发明的实践中可以使用, 但是优选的方法和材料仍在本文中被描述。因此, 通过整体参考说明书, 紧接下面被定义的术语被更全面地描述。同样, 如本文所使用, 单数形式的 "一 (a)"、"一 (an)" 和 "该 (所述, the)" 包括复数含义, 除非上下文另外地明确指出。除非另外指出, 分别地, 核酸以 5' 到 3' 的方向从左到右书写; 氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左到右书写。可以理解, 本发明并不限于所述的具体方法、方案和试剂, 因为根据本领域技术人员使用它们的情况, 它们可以进行变化。

[0090] 在本说明书中给出的每一个最大数字限制拟包括每一个更小的数字限制, 如同这些更小的数字限制在本文明确写出。在本说明书中给出的每一最小的数字限制将包括每一个更大的数字限制, 如同这些更大数字限制在本文明确写出。在本说明书中给出的每一数字范围将包括落在该更宽数字范围的每个更窄的数字范围, 如同这些更窄数字范围在本文明确写出。

[0091] 所有引用的文献在相关的部分引入本文作为参考; 任何文献的引入不能被理解为承认其是相对于本发明的现有技术。

[0092] 如本文使用,术语“漂白”指处理材料(例如织物、衣物、纸浆等)或表面足够长的时间并且在适当的 pH 和温度条件下,以实现材料的增亮(即增白)和/或清洗。适合漂白的化学品的实例包括但不限于 ClO_2 、 H_2O_2 、过酸、 NO_2 等。

[0093] 如本文使用的术语“消毒”指从表面除去污染物,以及抑制或杀死物品表面上的微生物。本发明不拟限于任何具体的表面、物品、或待除去的污染物(一种或几种)或微生物。

[0094] 如本文使用的术语“多聚体(multimer)”指共价或非共价结合并在溶液中以复合物的形式存在的两种或多种蛋白质或肽。“二聚体”是包含两个蛋白质或肽的多聚体;“三聚体”包含三个蛋白质或肽,等。如本文使用的“八聚体”指 8 个蛋白质或肽的多聚体。

[0095] 如本文使用的“个人护理产品(personal care product)”指用于清洗、漂白和/或消毒毛发、皮肤、头皮和牙齿的产品,其包括但不限于洗发水、润肤露(bodylotion)、沐浴乳、局部保湿霜(moisturizer)、牙膏和/或局部洗涤剂。在一些特别优选的实施方式中,这些产品被用于人,而在其它实施方式中,这些产品可用于非人类动物(例如在兽医应用中)。

[0096] 如本文使用的“清洗组合物(cleaning composition)”和“清洗制剂(cleaning formulation)”,除非另有说明,指可用于从待被清洗的物品除去不想要的化合物的组合物,所述待被清洗的物品例如织物、器皿、隐形眼镜、其它固体基底、毛发(洗发水)、皮肤(肥皂和面霜)、牙齿(漱口水、牙膏)等。该术语包括选择用于期望的具体类型的清洗组合物和具体形式的产品(例如液体、凝胶、颗粒或喷雾组合物)的任何材料/化合物,只要该组分与用于该组合物中的中性金属蛋白酶和其它酶(一种或多种)相容。通过考虑待被清洗的表面、物品或织物以及对于应用过程中清洗条件(cleaning conditions)考虑组合物的期望形式,可以容易进行清洗组合物材料的选择。

[0097] 该术语进一步指适合对物体和/或表面清洗、漂白、消毒和/或灭菌的任何组合物。该术语拟包括但不限于洗涤剂组合物(例如液体和/或固体的衣物洗涤剂和细薄织物洗涤剂;硬表面的清洗制剂如用于玻璃、木头、陶瓷和金属台面板(countertops)和窗;地毯清洗剂;炉子洗涤剂;织物增鲜剂;织物软化剂;以及纺织品和衣物预洗剂、以及器皿洗涤剂)。

[0098] 实际上,如本文使用的术语“清洗组合物”包括,除非另有说明,颗粒或粉末形式的通用(all-purpose)或重垢(heavy-duty)洗涤剂,特别是清洗洗涤剂;液体、凝胶或糊状通用洗涤剂特别是所谓的重垢液(LDL)型;液体细薄织物洗涤剂;手用洗碟剂(hand dishwashing agents)或轻垢(light duty)洗碟剂,特别是那些高发泡型的洗碟剂;机用洗碟剂(machine dishwashing agents),包括用于家用和公共机构的各种片、颗粒、液体和漂洗助剂的类型;液体清洗剂和消毒剂,包括抗菌手洗类型、洁肤皂(cleaning bars)、漱口水、牙齿清洗剂、车或地毯洗洁剂、洁厕剂(bathroom cleaners);洗发水和护发素;沐浴乳和泡浴用品(foam baths)和金属清洗剂;以及洗涤助剂如漂白添加剂和“去污棒(stain-stick)”或预处理类型。

[0099] 如本文使用的术语“洗涤剂组合物”和“洗涤剂制剂”被用于指混合物,该混合物拟被用在清洗污染物体的洗涤介质中。在一些优选的实施方式中,该术语被用于指洗涤织物和/或服装(例如“衣物洗涤剂”)。在可选的实施方式中,该术语指其它洗涤剂,例

如那些用来清洗器皿、餐具等的洗涤剂（例如“洗碟剂”）。本发明不拟限于任何具体的洗涤剂制剂或组合物。实际上，除了中性金属蛋白酶，该术语拟包括这样的洗涤剂，其含有表面活性剂、转移酶（一种或多种）、水解酶、氧化还原酶、助洗剂、漂白剂、漂白活性剂、上蓝剂和荧光染料、结块抑制剂、掩蔽剂、酶活化剂、抗氧化剂和加溶剂。

[0100] 如本文使用的“申请人酶 (Applicant Enzyme)”指本发明的中性金属蛋白酶。

[0101] 如本文使用，洗涤剂中的“增强的性能”被定义为增加了漂白敏感污迹（例如草、茶、酒、血、脏等）的清洗，如在标准洗涤循环后通常评估所确定的。在具体的实施方式中，本发明的中性金属蛋白酶在除去有色污迹和污垢方面提供增强的性能。在进一步实施方式中，本发明的酶在除去污迹和 / 或使污迹脱色方面提供增强的性能。

[0102] 如本文使用的术语“硬表面的清洗组合物”指清洗硬表面的洗涤剂组合物，所述硬表面如地板、墙壁、瓷砖、浴室和厨房固定设备等。以任何形式提供该组合物，所述形式包括但不限于固体、液体、乳液等。

[0103] 如本文使用的“洗碟剂组合物”指清洗器皿的组合物的所有形式，包括但不限于颗粒和液体形式。

[0104] 如本文使用的“织物清洗组合物”指清洗织物的洗涤剂组合物的所有形式，包括但不限于颗粒、液体和条状形式。

[0105] 如本文使用的“纺织品”指机织物，以及适合转化为或用作纱线、机织物、编织物和非机织物的短纤维和细丝。该术语包括由天然以及合成（例如制造的）纤维制造的纱线。

[0106] 如本文使用的“纺织品材料”是纤维、纱线中间产物、纱线、织物和由织物制造的产品（例如服装和其它制品）的总括。

[0107] 如本文使用的“织物”包括任何纺织品材料。因此，该术语拟包括衣物以及织物、纱线、纤维、非 - 机织材料、天然材料、合成材料和任何其它纺织品材料。

[0108] 如本文使用的术语“相容的”指清洗组合物材料不将中性金属蛋白酶的酶活性减少至这样的程度：在正常应用情况中，中性金属蛋白酶不如预期的有效。下文详细示例了具体的清洗组合物材料。

[0109] 如本文使用的“有效量的酶”指在具体应用（例如个人护理产品、清洗组合物等）中要求的预期酶活性必需的酶的量。该有效量容易被本领域普通技术人员所确定，并且该有效量基于许多因素，例如使用的具体酶的变体、清洗应用、清洗组合物的具体成分和是需要液体还是干燥的（例如粒状或条状）组合物等。

[0110] 如本文使用的“非织物清洗组合物”包括硬表面清洗组合物、洗碟组合物、个人护理清洗组合物（例如口腔清洗组合物、牙齿清洗组合物、个人清洗组合物等）和适合用于纸浆和造纸工业的组合物。

[0111] 如本文使用的“口腔清洗组合物”指洁齿剂 (dentifrices)、牙膏、洁牙胶 (toothgels)、牙粉 (toothpowders)、漱口水、口腔喷雾剂 (mouth sprays)、口腔凝胶 (mouthgels)、口香糖、锭剂、囊剂、片剂、生物凝胶、预防糊剂、牙齿处理溶液等。

[0112] 如本文使用的术语“转移酶”指催化功能化合物转移到底物范围的酶。

[0113] 如本文使用的“离去基团”指在被另一亲核基团取代后，从酰基供体分离的亲核基团。

[0114] 如本文使用的术语“酶转化”指通过将底物或中间物与酶接触，将底物修饰为中

间物或者将中间物修饰为终产物。在一些实施方式中,通过直接将底物或中间物暴露于适当的酶进行接触。在其它实施方式中,接触包括将底物或中间物暴露于表达和 / 或分泌该酶的生物体,和 / 或将预期的底物和 / 或中间物分别代谢为预期的中间物和 / 或终产物。

[0115] 如本文使用的短语“洗涤剂稳定性”指洗涤剂组合物的稳定性。在一些实施方式中,在应用洗涤剂期间评价稳定性,而在其它实施方式中,该术语指在储存期间洗涤剂组合物的稳定性。

[0116] 如本文使用的短语“对蛋白质水解的稳定性”指蛋白质(例如酶)耐受蛋白质水解作用的能力。该术语不拟限于使用任何具体蛋白酶去评估蛋白质的稳定性。

[0117] 如本文使用的“氧化稳定性(oxidative stability)”指在氧化条件下,蛋白质行使功能的能力。具体地,该术语指在存在各种浓度 H_2O_2 和 / 或过酸的条件下,蛋白质行使功能的能力。通过本领域技术人员已知的标准方法和 / 或通过本文描述的方法测量各种氧化条件下的稳定性。与在不存在氧化化合物下存在的酶活性相比,通过至少大约 5% 或更多的酶活性半衰期的增加或减少(在大多数实施方式中,优选增加),证明氧化稳定性的基本改变。

[0118] 如本文使用的“pH 稳定性”指在具体 pH 下,蛋白质行使功能的能力。一般而言,大多数酶具有有限的行使功能的 pH 范围。除了在中等范围 pH 内(即在大约 pH7)行使功能的酶之外,存在能在非常高或非常低 pH 的条件下发挥作用的酶。通过本领域技术人员已知的标准方法和 / 或本文描述的方法可以测量各种 pH 条件下的稳定性。与在酶的最适 pH 下的酶活性相比,通过至少大约 5% 或更多的酶活性半衰期的增加或减少(在大多数实施方式中,优选为增加),证明 pH 稳定性基本改变。然而,本发明不拟限于任何 pH 稳定性水平或 pH 范围。

[0119] 如本文使用的“热稳定性”指在具体温度下,蛋白质行使功能的能力。一般而言,大多数酶具有有限的行使功能的温度范围。除了在中等范围温度内(即在大约室温)行使功能的酶之外,存在能在非常高或非常低温度下发挥作用的酶。通过本领域技术人员已知的标准方法和 / 或本文描述的方法可以测量热稳定性。与暴露于酶活性的最适宜温度相比,通过当暴露于不同的温度(即更高或更低)下时至少大约 5% 或更多的突变体催化活性的半衰期的增加或减少(在大多数实施方式中,优选增加),证明热稳定性基本改变。然而,本发明不拟限于任何温度稳定性水平或温度范围。

[0120] 如本文使用的术语“化学稳定性”指蛋白质(例如酶)对不利地影响其活性的化学品的稳定性。在一些实施方式中,这类化学品包括但不限于过氧化氢、过酸、阴离子洗涤剂、阳离子洗涤剂、非离子洗涤剂、螯合剂等。然而,本发明不拟限于任何具体的化学稳定性水平或化学稳定性范围。

[0121] 如本文使用的术语“中性金属蛋白酶活性提高”指与标准酶相比较,中性金属蛋白酶活性的相对提高。在一些实施方式中,该术语指产物形成的提高速率,而在其它实施方式中,该术语包括产生更少水解产物的组合物。在另外的实施方式中,该术语指具有改变了的底物特异性的中性金属蛋白酶组合物。

[0122] 如本文使用的短语“底物特异性的改变”指酶的底物特异性的变化。在一些实施方式中,底物特异性的变化被定义为用酶与酶变体或其它酶组合物比较所观察到的 $K_{\text{催化剂}} / K_m$ 比率之间的差异。酶底物特异性依赖于被检测的底物而变化。通过对不同底物表现的催

化效力进行比较,测定酶的底物特异性。在评估突变体酶的功效中,这些测定具有特别的用途,因为通常期望产生对特定目的底物更大比率的变体酶。然而,本发明不拟限于任何具体的底物组成和任何具体的底物特异性。

[0123] 如本文使用的“表面特性”被用于指静电电荷以及特性例如蛋白质的表面所表现的疏水性和/或亲水性。

[0124] 如本文使用的短语“独立地选自....”指选自提及的 Markush(马库什)组的部分或成分可以是相同的,可以是不同的,或者可以是成分的任何混合物,如下列实例表示的:

[0125] 具有 3 个 R 基团的分子,其中每一个 R 基团独立地选自 A、B 和 C。这里三个 R 基团可以是:AAA、BBB、CCC、AAB、AAC、BBA、BBC、CCA、CCB 或 ABC。

[0126] 关于化学组分,如本文使用的术语“取代的”指用到该术语的有机组分或基团是:(a) 通过去除至少一种成分或基团产生不饱和;或(b) 化合物或者基团中的至少一个氢被含有一个或多个(i) 碳、(ii) 氧、(iii) 硫、(iv) 氮或(v) 卤原子的部分所取代;(c) (a) 和(b)。在紧接上面(b)中描述的可以取代氢的部分——其仅包括碳和氢原子——是烃部分,其包括但不限于烷基、链烯基、炔基、烷基二烯基(alkyldienyl)、环烷基、苯基、烷基苯基、萘基、蒽基、菲基、芴基、甾族基团和这些基团彼此以及与多价烃基如亚烯基、烷叉基(alkylidene)和次烷基(alkylidyne)的组合。在紧接上面(b)中描述的可以取代氢的含有氧原子的部分包括但不限于羟基、酰基或含有酮、醚、环氧、羧基和酯的基团。在紧接上面(b)中描述的可以取代氢的含有硫原子的部分包括但不限于含硫的酸和酸性酯基团、硫醚基团、巯基和硫酮基团。在紧接上面(b)中描述的可以取代氢的含有氮原子的部分包括但不限于氨基、硝基、偶氮基、铵基、酰胺基、叠氮基、异氰酸酯基团、氰基和腈基团。在紧接上面(b)中描述的可以取代氢的含有卤原子的部分包括氯、溴、氟、碘的基团和任何前面描述的部分——其中氢或侧链烷基被卤素基团所取代以形成稳定的取代部分。

[0127] 应当理解,上述(b)(i)到(b)(v)部分的任一个可以以单价取代或在多价取代中失去氢的方式彼此取代,以形成可在有机化合物或基团中取代氢的另一单价部分。

[0128] 如本文使用的术语“纯化的”和“分离的”指从样品除去污染物。例如,通过除去溶液或制备物中污染的蛋白质和其它化合物——其不是中性金属蛋白酶,可纯化中性金属蛋白酶。在一些实施方式中,在细菌或真菌宿主细胞中表达重组中性金属蛋白酶,并且通过除去其它的宿主细胞成分,纯化这些重组中性金属蛋白酶;从而,重组中性金属蛋白酶多肽的百分比在样品中增加。在特别优选的实施方式中,本发明的金属蛋白酶基本上被纯化到至少大约 99% 的蛋白质组分的水平,如通过本领域已知的 SDS-PAGE 或其它标准方法测定。在可选的优选实施方式中,本发明的金属蛋白酶占组合物蛋白酶成分的至少大约 99%。在另一可选的实施方式中,金属蛋白酶存在的范围是总蛋白和/或蛋白酶的大约至少 90-95%。

[0129] 如本文使用的“目的蛋白(protein of interest)”指被分析、鉴别和/或修饰的蛋白质(例如酶或“目的酶”)。天然发生的以及重组蛋白质在本发明中可应用。

[0130] 如本文使用的“蛋白质”指由氨基酸组成并被本领域普通技术人员识别为蛋白质的任何组分。术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”在本文中可以互换使用。其中,肽是蛋白质的一部分,本领域普通技术人员理解该术语在上下文中的应用。

[0131] 如本文使用,功能和/或结构上相似的蛋白质被考虑为“相关蛋白质”。在一些实施方式中,这些蛋白质衍生自不同的属和/或种,包括在有机体类型之间的差异(例如细菌蛋白质和真菌蛋白质)。在一些实施方式中,这些蛋白质衍生自不同的属和/或种,包括在有机体类型之间的差异(例如细菌酶和真菌酶)。在另外的实施方式中,相关蛋白从同一种提供。实际上,本发明不拟限于来自任何具体来源(一个或多个)的相关蛋白质。另外,术语“相关蛋白质”包括三级结构同系物和一级序列同系物(例如本发明的中性金属蛋白酶)。例如,本发明包括在图 3-5 中提供的这类同系物。另外的同系物被考虑,包括但不限于从蜡样芽胞杆菌 (*B. cereus*)、蜡样芽胞杆菌 E33L、热溶芽胞杆菌 (*B. caldolyticus*)、短小芽胞杆菌 (*B. pumilis*)、巨大芽胞杆菌 (*B. megaterium*)、枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* amylosacchariticus)、短短芽胞杆菌 (*Brevibacillus brevis*)、多粘类芽胞杆菌 (*Paenibacillus Polymyxa*) (多粘芽胞杆菌 (*Bacillus polymyxa*))、嗜热脂肪芽胞杆菌 (*B. stearothermophilus*)、结核芽胞杆菌 (*B. thuringiensis*)、枯草杆菌 (*B. subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 得到的金属蛋白酶,以及 aureolysin、细胞外弹性蛋白酶和中性蛋白酶 B。在进一步实施方式中,该术语包括免疫交叉反应的蛋白质。

[0132] 如本文使用的术语“衍生物”指来源于一种蛋白质的蛋白质,通过如下方式形成:在 C 末端和 N 末端(一个或多个末端)的任一端或两端上加入一个或多个氨基酸,在氨基酸序列中一个或多个不同位置上取代一个或多个氨基酸,和/或在蛋白质的两个末端中的任意一个末端或两个末端上、或者在氨基酸序列的一个或多个位点上删除一个或多个氨基酸,和/或在氨基酸序列的一个或多个位点上插入一个或多个氨基酸。蛋白质衍生物的制备优选地通过修饰编码天然蛋白质的 DNA 序列、将该 DNA 序列转化进入合适的宿主以及表达被修饰的 DNA 序列以形成衍生的蛋白质而实现。

[0133] 相关(和衍生物)蛋白质包括“变体蛋白质 (variant protein)”。在一些优选的实施方式中,变体蛋白质与亲本蛋白质以及变体蛋白质彼此之间在少量氨基酸残基上不同。不同的氨基酸残基的数量可以是一个或更多个,优选地为 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50 或更多个氨基酸残基。在一些优选的实施方式中,变体之间不同的氨基酸的数量在 1 到 10 之间。在一些特别优选的实施方式中,相关蛋白质和特定的变体蛋白质含有至少 35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列同一性。此外,如本文使用的相关蛋白质或变体蛋白质,指在显著区域 (prominent regions) 的数量上不同于另一个相关蛋白质或亲本蛋白质的蛋白质。例如,在一些实施方式中,变体蛋白质具有不同于亲本蛋白质的 1、2、3、4、5 或 10 个相应的显著区域。

[0134] 适合产生本发明的酶的变体的几种方法是本领域已知的,所述方法包括但不限于点饱和突变 (site-saturation mutagenesis)、扫描诱变、插入诱变 (insertional mutagenesis)、随机诱变 (random mutagenesis)、定点诱变 (site-directed mutagenesis)、和定向进化,以及各种其它的重组方法。

[0135] 野生型和突变蛋白质的特性描述通过任何适合的方法完成,并且优选地基于目的特性的评估。例如 pH 和/或温度、以及洗涤剂 and/或氧化稳定性在本发明的一些实施方式中得到确定。事实上,预期在这些一个或多个特性 (pH、温度、水解稳定性、洗涤剂稳定性和/或氧化稳定性) 中具有不同程度稳定性的酶将得到应用。

[0136] 如本文使用的“表达载体”指含有 DNA 序列的 DNA 构建物,所述 DNA 序列可操作地连接到能实现该 DNA 在合适的宿主中表达的合适的控制序列上。这样的控制序列包括实现转录的启动子、控制这样的转录的任选的操纵子序列、编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列,和控制转录和翻译的终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、或简单地是潜在基因组插入物。一旦转化到合适的宿主中,载体就可以复制,并且独立于宿主基因组而发挥功能,或者在某些情况下可以整合到基因组本身中。在本说明书中,“质粒”、“表达质粒”和“载体”通常可被交换使用,因为质粒目前是最普遍使用的载体形式。然而,本发明拟包括起着等效功能的其它形式的这类表达载体,它们在本技术领域是已知的,或者正在成为已知的。

[0137] 在一些优选的实施方式中,中性金属蛋白酶基因被连接到适当的表达质粒。随后,克隆的中性金属蛋白酶基因被用于转化或转染宿主细胞,以便表达中性金属蛋白酶基因。该质粒可在宿主中复制,在这方面,其包含对于质粒复制所必需的已知元件,或者可以设计质粒以整合入宿主染色体中。提供必需的元件用于有效的基因表达(例如可操作地连接到目的基因的启动子)。在一些实施方式中,被提供的这些必需元件是基因自身的同源启动子,如果它可以被识别的话(即,被宿主转录);转录终止子(对于真核宿主细胞,为多腺苷酸化区域),该转录终止子是外源的,或者由中性金属蛋白酶基因的内源终止子区域提供。在一些实施方式中,选择性基因如抗生素抗性基因也包括在内,所述抗生素抗性基因能维持在含有抗微生物物质的培养基中进行培养的质粒感染宿主细胞的连续培养。

[0138] 尽管可以使用其它方法,但下述的盒式诱变方法可用来帮助本发明的中性金属蛋白酶变体的构建。首先,如本文所述,获得天然发生的编码中性金属蛋白酶的基因,并对其完全或部分地进行测序。然后,扫描该序列,扫描到这样一个点,在该点处期望在被编码的中性金属蛋白酶中产生一个或多个氨基酸的突变(缺失、插入或取代)。对该点侧翼的序列,评价限制酶切位点的存在,以便用寡核苷酸库代替该基因的一个短片段,当其被表达时将编码各种突变体。这样的限制酶切位点优选地是蛋白质基因内的独特位点,以便有助于基因片段的取代。然而,可以使用在中性金属蛋白酶基因中非过度丰富的任何便利的限制酶切位点,只要限制酶切消化所产生的基因片段可以以适当顺序被重装配。如果在距离所选择的点的一个便利距离内(10 个到 15 个核苷酸)的位置上不存在限制酶切位点,这样的位点通过以这样的方式取代基因中的核苷酸来产生——在最后的构建物中阅读框和被编码的氨基酸均不被改变。为了改变其序列以符合期望序列而对基因进行的突变,是通过与通常已知的方法一致的 M13 引物延伸来实现的。定位合适的侧翼区域以及为了获得两个便利的限制酶切位点序列而评价所需改变的任务,是通过遗传密码的冗余性、基因的限制酶切图谱和大量不同的限制酶,常规地进行。需要注意的是,如果便利的侧翼限制酶切位点是可以利用的,上述方法仅仅需要在不含位点的侧翼区域的情况下使用。

[0139] 一旦天然发生的 DNA 和 / 或合成的 DNA 被克隆,用关联限制酶消化位于将要被突变的位置侧翼的限制酶切位点,并将一系列末端互补的寡核苷酸序列盒连接进基因中。该方法可以简化诱变,这是由于所有寡核苷酸可以被合成,使它们具有相同的限制酶切位点,并且不需要合成的接头来产生限制酶切位点。

[0140] 如本文使用的“对应于”是指蛋白质或肽中位于列出的位置处的残基,或者与蛋白质或肽中列出的残基类似的、同源的或等价的残基。

[0141] 如本文使用的“对应的区域”通常是指沿着相关蛋白质或亲本蛋白质的类似位置。

[0142] 术语“编码……的核酸分子”、“编码……的核酸序列”、“编码……的 DNA 序列”和“编码……的 DNA”是指沿着脱氧核糖核酸链的脱氧核苷酸的次序或序列。这些脱氧核苷酸的次序决定了沿着多肽（蛋白质）链的氨基酸的次序。因而 DNA 序列编码氨基酸序列。

[0143] 如本文使用的术语“类似序列 (analogous sequence)”是指，提供与目的蛋白质（即，典型地是目的原始蛋白质）相类似的功能、三级结构和 / 或保守残基的蛋白质内的序列。例如，在含有 α 螺旋或 β 折叠结构的表位区域中，在类似序列中的取代氨基酸优选地保留了相同的特异结构。该术语也指核苷酸序列，以及氨基酸序列。在一些实施方式中，类似序列被开发，以便取代氨基酸产生显示出相似或提高功能的变体酶。在一些优选的实施方式中，目的蛋白质中氨基酸的三级结构和 / 或保守残基位于目的节段或片段处或附近。因此，目的节段或片段含有例如 α 螺旋或 β 折叠结构，取代氨基酸优选地维持该特异结构。

[0144] 如本文使用的“同源蛋白质”是指，与目的蛋白质（例如来自另一来源的中性金属蛋白酶）具有相似作用和 / 或结构的蛋白质（例如中性金属蛋白酶）。同系物 (homolog)（本文也称为“同系物 (homologues)”）不拟必须是进化相关的。因此，该术语拟包括从不同物种获得的相同或相似的酶（一种或多种）（即在结构和功能方面）。在一些优选实施方式中，期望鉴定出具有与目的蛋白质类似的四级、三级和 / 或一级结构的同系物，这是由于用来自同系物的类似片段取代目的蛋白质中的节段和片段将降低变化的破坏性。

[0145] 如本文使用的“同源基因”是指来自不同物种的至少一对基因，该基因彼此对应，并且彼此具有同一性或非常相似。该术语包括通过物种形成过程（即，新物种的进化）分离开的基因（例如直向同源基因），以及通过遗传复制业已分离的基因（例如旁向同源基因）。这些基因编码“同源蛋白质”。

[0146] 如本文使用的“直向同源物”和“直向同源基因”是指存在于不同物种中的基因，这些基因是通过物种形成过程，从一个共同的祖先基因（即，一个同源基因）进化而来的。通常地，直向同源物在进化过程中保留了相同的功能。直向同源物的鉴定，在最新测序的基因组中基因功能的可靠预测中是有用的。

[0147] 如本文使用的“旁向同源物”和“旁向同源基因”是指在基因组内通过复制而相关的基因。直向同源物通过进化过程保留了相同的功能，而旁向同源物进化出了新的功能，即使一些功能与原始功能通常是相关的。旁向同源基因的实例包括，但不限于，编码胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶的基因，这些酶都是丝氨酸蛋白酶，并且在相同的物种中一起发生。

[0148] 如本文使用的“野生型”和“天然”蛋白质是那些在自然界发现的蛋白质。术语“野生型序列”和“野生型基因”本文可以交替使用，用来指在宿主细胞中自然或天然发生的序列。在一些实施方式中，野生型序列是指，作为蛋白质工程项目的起始点的目的序列。编码天然发生的蛋白质的基因，可以通过本领域的普通技术人员已知的一般方法来获得。这些方法通常包括合成具有目的蛋白质的推定序列编码区域的标记探针，制备来自表达该蛋白质的生物的基因组文库，以及通过与探针杂交来筛选文库中目的基因。然后，对阳性杂交克隆作图并测序。

[0149] 如本文使用的术语“重组 DNA 分子”是指由通过分子生物学技术结合在一起的 DNA

片段构成的 DNA 分子。

[0150] 术语“重组寡核苷酸”指使用分子生物学操作产生的寡核苷酸,所述分子生物学操作包括但不限于,通过多核苷酸序列的限制酶消化所产生的两个或更多个寡核苷酸序列的连接,寡核苷酸的合成(例如引物或寡核苷酸的合成)等。

[0151] 序列之间的同源性程度可以使用本技术领域已知的任何合适的方法来确定(例如参见 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482[1981]; Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443[1970]; Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444[1988]; 程序例如 Wisconsin Genetics Software Package 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA (Genetics Computer Group, Madison, WI); 和 Devereux 等人, *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395[1984])。

[0152] 例如, PILEUP 是一个确定序列同源性水平的有用程序。PILEUP 使用渐进、两两比对的方式,由一组相关的序列产生多序列比对。它也可以绘出用于产生该比对的显示了成簇关系 (clustering relationship) 的树。PILEUP 使用了 Feng 和 Doolittle 渐进比对方法的简化方法 (Feng 和 Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35:351-360[1987])。该方法类似于由 Higgins 和 Sharp 描述的方法 (Higgins 和 Sharp, *CABIOS* 5:151-153[1989])。有用的 PILEUP 参数包括 3.00 的缺省空位权重,0.10 的缺省空位长度权重和加权的末端空位。有用算法的另一个实例是 BLAST 算法,由 Altschul 等人描述 (Altschul 等人, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, [1990]; 和 Karlin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787[1993])。一个特别有用的 BLAST 程序是 WU-BLAST-2 程序(参见 Altschul 等人, *Meth. Enzymol.*, 266:460-480[1996])。参数“W”、“T”和“X”决定了比对的灵敏度和速度。作为缺省参数, BLAST 程序使用字符长度 (W) 为 11, BLOSUM62 计分矩阵(参见 Henikoff 和 Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915[1989]) 比对 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, M' 5, N' -4, 以及两个链的比较。

[0153] 如本文使用的“核酸序列同一性百分比(%)”被定义为,候选序列中与序列的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。

[0154] 如本文使用的术语“杂交”指通过碱基配对,核酸链与互补链发生结合的过程,正如本领域所已知的。

[0155] 如本文使用的短语“杂交条件”指杂交反应进行的条件。这些条件通过杂交被测量时条件的“严紧性 (stringency)”程度来分类。例如,严紧性程度可以例如基于核酸结合复合体或探针的解链温度 (T_m)。例如,“最大严紧性”通常在大约 $T_m-5^{\circ}\text{C}$ 发生(比探针的 T_m 低 5°C);“高度严紧性”发生在低于 T_m 大约 $5-10^{\circ}\text{C}$;“中度严紧性”发生在低于探针 T_m 大约 $10-20^{\circ}\text{C}$;和“低度严紧性”发生在低于 T_m 大约 $20-25^{\circ}\text{C}$ 。可以选择地,或另外地,杂交条件可以基于杂交的盐或离子强度条件和/或一次或多次的严紧性洗涤。例如,6xSSC = 非常低的严紧性;3xSSC = 低度到中度严紧性;1xSSC = 中度严紧性;和 0.5xSSC = 高度严紧性。从功能上来说,最大严紧性条件可以用于鉴定与杂交探针具有严格的同一性或近似严格的同一性的核酸序列;而高度严紧性条件被用于鉴定与探针具有大约 80% 或更高的序列同一性的核酸序列。

[0156] 对于要求高度选择性的应用,通常期望应用相对严紧的条件来形成杂交体(例如使用相对低的盐和/或高温条件)。

[0157] 在至少两个核酸或多肽的情形中,短语“基本上相似的”和“基本上同一的”通常

指,多核苷酸或多肽包含与参考(即野生型)序列相比具有至少大约 40%同一性、更优选地至少大约 50%同一性、又更优选地至少大约 60%同一性、优选地至少大约 75%同一性、更优选地至少大约 80%同一性、又更优选地至少大约 90%、仍然更优选地大约 95%、最优选地大约 97%同一性,有时高达大约 98%和大约 99%的序列同一性的序列。序列同一性使用已知的程序如 BLAST、ALIGN 和 CLUSTAL 来确定,这些程序使用标准参数。(参见例如 Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215 :403-410[1990];Henikoff 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915[1989];Karin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873[1993];和 Higgins 等人, Gene 73 :237-244[1988])。进行 BLAST 分析的软件可以通过 National Center for Biotechnology Information 公开获得。也可以使用 FASTA 来搜索数据库 (Pearson 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :2444-2448[1988])。两个多肽是基本上同一的一个指征是,第一个多肽与第二个多肽是免疫交叉反应的。典型地,由于保守的氨基酸取代而有所不同的多肽是免疫交叉反应的。因此,例如,在两个肽的不同之处仅仅在于保守的取代时,该多肽与该第二个多肽是基本上同一的。两个核酸序列基本上同一的另一个指征是,这两个分子在严紧条件(例如,中度到高度严紧)下彼此杂交。

[0158] 如本文使用的“等价残基 (equivalent residues)”指共有特定的氨基酸残基的蛋白质。例如,等价残基可以通过在蛋白质(例如中性金属蛋白酶)的三级结构水平上确定同源性来鉴定,所述蛋白质的三级结构已经通过 X 射线晶体学确定。等价残基被定义为如此的残基,即对于这些等价残基,具有推定的等价残基的蛋白质和感兴趣的蛋白质的特定氨基酸残基的两个或多个主链原子的原子坐标 (N 对 N、CA 对 CA、C 对 C、和 O 对 O),在对齐之后,是在 0.13nm 以内,优选地在 0.1nm 以内。在对最佳模型进行定向和定位以获得被分析蛋白质的非氢蛋白原子的原子坐标的最大重叠之后,实现对齐。优选的模型是结晶学模型,其以可获得的最分辨率给出了实验衍射数据的最低 R 因子,如使用结晶学和蛋白质表征/分析技术领域的普通技术人员已知的方法所测定。

[0159] 如本文使用的术语“杂合中性金属蛋白酶”和“融合中性金属蛋白酶”是指,从至少两个不同的蛋白质或“亲本”蛋白质进行遗传工程而得到的蛋白质。在优选的实施方式中,这些亲本蛋白质是彼此的同系物。例如,在一些实施方式中,优选的杂合中性金属蛋白酶或融合蛋白质含有蛋白质的 N 末端和该蛋白质的同系物的 C 末端。在一些优选实施方式中,这两个末端被组合在一起,以对应于全长的活性蛋白质。

[0160] 如本文使用的术语“调控元件 (regulatory element)”指控制核酸序列表达的一些方面的遗传元件。例如,启动子是有助于可操作连接的编码区域的转录起始的调控元件。其它调控元件包括剪接信号、多腺苷酸化信号和终止信号。

[0161] 如本文使用的“宿主细胞”通常是原核宿主或真核宿主,采用本领域已知的重组 DNA 技术构建的载体转化或转染宿主细胞。转化的宿主细胞能够复制编码蛋白突变体的载体或表达期望的蛋白突变体。在编码蛋白突变体的前形式或前原形式的载体的情况中,此类突变体当被表达时通常从宿主细胞分泌到宿主细胞培养基中。

[0162] 在将核酸序列插入到细胞中的情形中,术语“被导入”是指转化、转导或转染。转化的手段包括原生质体转化、氯化钙沉淀、电穿孔、裸 DNA 以及本技术领域已知的类似手段。(参见 Chang 和 Cohen Mol. Gen. Genet. 168 :111-115[1979];Smith 等人, Appl. and Env. Microbiol. 51 :634[1986];和 Ferrari 等人的综述文章,在 Harwood, *Bacillus*, Plenum

Publishing Corporation pp.57-72[1989])。

[0163] 术语“启动子/增强子”表示含有能提供启动子和增强子功能的序列的 DNA 片段（例如，反转录病毒的长末端重复单元既含有启动子，也含有增强子功能）。增强子/启动子可以是“内源的”或“外源的”或“异源的”。内源增强子/启动子是基因组中给定的基因天然连接的增强子/启动子。外源（异源）增强子/启动子是通过遗传操作方法（即分子生物学技术）与基因并列放置的增强子/启动子。

[0164] 表达载体上“剪接信号 (splicing signal)”的存在，通常导致重组转录物更高水平的表达。剪接信号介导从初始 RNA 转录物中去除内含子，它由剪接供体位点和受体位点组成 (Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York[1989], 16.7-16.8 页)。通常使用的剪接供体位点和受体位点是来自 SV40 的 16S RNA 的剪接点。

[0165] 术语“稳定的转染”或“被稳定地转染”是指，将外来 DNA 引入和整合到被转染细胞的基因组中。术语“稳定的转染子”指已经将外来 (foreign) 或外源性 (exogenous) DNA 稳定地整合到被转染细胞的基因组 DNA 中的细胞。

[0166] 如本文使用的术语“选择性的标记物”或“选择性的基因产物”指编码酶活性的基因的应用，一旦细胞中的选择性标记物被表达，该酶活性赋予对抗生素或药物的抗性。

[0167] 如本文使用的术语“扩增”和“基因扩增”是指特定的 DNA 序列被不成比例地复制的过程，这样，被扩增的基因以比在基因组中初始存在的拷贝数量高的拷贝数量存在。在一些实施方式中，通过在存在药物（例如可抑制酶的抑制剂）的情况下的生长来选择细胞，导致编码在存在药物的情况下生长所需要的基因产物的内源基因的扩增，或者编码该基因产物的外源（即，输入的）序列的扩增，或者两者的扩增。通过在存在药物（例如可抑制酶的抑制剂）的情况下的生长来选择细胞，可导致编码在存在药物的情况下生长所需要的基因产物的内源基因的扩增，或者编码该基因产物的外源（即，输入的）序列的扩增，或者两者的扩增。

[0168] “扩增”是涉及模板特异性的核酸复制的特殊情况。这与非特异性的模板复制（即依赖于模板，但不依赖于特异性模板的复制）形成对照。模板的特异性在这里与复制的保真度（即，正确多核苷酸的合成）和核苷酸（核糖-或脱氧核糖-）特异性有所区别。模板的特异性通常是就“靶”特异性而描述的。就它们被寻求以从其它核酸中分选出来而言，靶序列是“靶”。主要针对这种分选，已设计出扩增技术。

[0169] 如本文使用的术语“共扩增”是指，可扩增的标记物与其它基因序列（即，包括一个或多个非选择性的基因，如那些包含在表达载体中的基因）一起引入到单一细胞中，并应用适当的选择压力，这样，该细胞既扩增可扩增的标记物，也扩增其它的非选择性的基因序列。可扩增的标记物可以物理地连接到其它的基因序列上；或者可选择地，两个分离的 DNA 元件可以被引入到相同的细胞中，其中一个 DNA 元件含有可扩增的标记物，另一个 DNA 元件含有非选择性的标记物。

[0170] 如本文使用的术语“可扩增的标记物”、“可扩增的基因”和“扩增载体”是指标记物、基因、或编码基因的载体，该载体允许该基因在适当的生长条件下进行扩增。

[0171] 如本文使用的术语“可扩增的核酸”是指可以通过任何扩增方法进行扩增的核酸。应该预期到，“可扩增的核酸”通常包括“样品模板”。

[0172] 如本文使用的术语“样品模板”指来源于被用来分析“靶”(在下面被定义)的存在的样品的核酸。相反,“背景模板”被用来指代除了样品模板以外的核酸,其可能存在于或可能不存在于样品中。背景模板是最通常容易被疏忽的。它可能是物质遗留(carryover)的结果,或者可能是由于存在需要从样品中纯化去掉的核酸污染物。例如,来自生物的但不是那些将被检测的核酸,可能在测试样品中作为背景而存在。

[0173] “模板特异性”在大多数扩增技术中是通过酶的选择来实现的。扩增酶是在它们被使用的条件下,在核酸的异源混合物中仅仅处理核酸的特异性序列的酶。例如,在Q β 复制酶的情况下,MDV-1 RNA是该复制酶的特异性模板(例如参见Kacian等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69:3038[1972])。其它核酸不被该扩增酶复制。类似地,在T7 RNA聚合酶的情况下,该扩增酶对其本身的启动子具有严格的特异性(参见Chamberlin等人,Nature 228:227[1970])。在T4 DNA连接酶的情况下,当寡核苷酸或多核苷酸底物与模板之间在连接处存在错配时,该酶不会将这两个寡核苷酸或多核苷酸连接(参见Wu和Wallace,Genomics 4:560[1989])。最后,Taq和Pfu聚合物,由于它们在高温下发挥作用的能力,被发现对于由引物结合而因此被限定的序列显示出高度特异性;高温导致有助于引物与靶序列杂交、而不与非靶序列杂交的热力学条件。

[0174] 如本文使用的术语“引物”是指寡核苷酸,不管是在纯化的限制消化物中自然存在,还是合成产生,当置于与核酸链互补的引物延伸产物的合成被诱导的条件下(即,在存在核苷酸和诱导剂如DNA聚合酶的情况下,以及在合适的温度和pH下)时,它能作为合成的起始点发挥作用。为了在扩增上具有最大效率,引物优选地是单链的,但可选择地,可以是双链的。如果是双链的,首先对该引物进行处理,以便在被用于制备延伸产物之前分离其链。优选地,引物是寡脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长,以便在存在诱导剂的情况下启动延伸产物的合成。引物的精确长度将依赖于许多因素,包括温度、引物的来源和方法的使用。

[0175] 如本文使用的术语“探针”指寡核苷酸(即,核苷酸序列),不管是在纯化的限制消化物中天然存在,还是合成产生、重组产生或通过PCR扩增产生,所述寡核苷酸能与别的目的寡核苷酸杂交。探针可以是单链或双链的。探针在特定基因序列的检测、鉴定和分离中是有用的。应该考虑到,本发明中使用的任何探针都可以用任何“报告分子”标记,以便在任一检测系统中可检测到,包括但不限于酶(例如ELISA,以及基于酶的组织化学测定法)、荧光、放射性和发光的系统。本发明不拟限于任何具体的检测系统或标记物。

[0176] 如本文使用的术语“靶”,当关于扩增方法(例如聚合酶链式反应)使用时,是指用于聚合酶链式反应的引物所结合的核酸区域。因此,“靶”寻求从其它核酸序列中分选出来。“片段”被定义为靶序列内的核酸区域。

[0177] 如本文使用的术语“聚合酶链式反应”(“PCR”)指美国专利4,683,195、4,683,202和4,965,188的方法,此处引入作为参考,这些专利包括,不通过克隆或纯化,增加靶序列的片段在基因组DNA混合物中的浓度的方法。用于扩增靶序列的该过程,包括将大大过量的两种寡核苷酸引物引入到含有期望的靶序列的DNA混合物中,随后,在存在DNA聚合酶的情况下,进行精确顺序的热循环。这两个引物与双链靶序列中它们各自的链是互补的。为了实现扩增,对混合物进行变性,然后引物被退火到它们在靶分子内的互补序列。在退火之后,用聚合酶延伸引物,以便形成一对新的互补链。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可

以多次重复（即变性、退火和延伸构成一个“循环”；可以有多个“循环”），以获得高浓度的期望靶序列的扩增片段。期望的靶序列的扩增片段的长度由引物相对于彼此的相对位置决定，因此，该长度是一个可控制的参数。由于该过程的重复特征，该方法被称作“聚合酶链式反应”（下文为“PCR”）。由于靶序列的期望的扩增片段成为混合物中的优势序列（就浓度而言），所以它们被称作是“PCR 扩增的”。

[0178] 如本文使用的术语“扩增试剂”是扩增需要的那些试剂（脱氧核糖核苷三磷酸、缓冲液等），引物、核酸模板和扩增酶除外。典型地，扩增试剂以及其它反应组分被放置和装在反应容器（试管、微孔等）中。

[0179] 借助 PCR，在基因组 DNA 中将单个拷贝的特定靶序列扩增到可检测的水平是可能的，所述检测通过数个不同的方法进行（例如与标记探针的杂交；生物素化引物的整合，随后进行抗生物素蛋白-酶偶联物检测；将 ^{32}P 标记的脱氧核苷三磷酸如 dCTP 或 dATP 整合到扩增的片段中）。除了基因组 DNA，任何的寡核苷酸或多核苷酸序列也可以用适当的引物分子组扩增。特别地，由 PCR 方法本身产生的扩增片段，它们本身可以是随后的 PCR 扩增的有效模板。

[0180] 如本文使用的术语“PCR 产物”、“PCR 片段”和“扩增产物”指变性、退火和延伸的 PCR 步骤的两个或更多个循环完成后得到的化合物混合物。这些术语包括这样的情况，其中已经存在一个或多个靶序列的一个或多个片段的扩增。

[0181] 如本文使用的术语“限制性内切酶”和“限制酶”指细菌酶，每一种这样的酶在特异性核苷酸序列处或在其附近切割双链 DNA。本发明详述

[0182] 本发明提供含有至少一种中性金属蛋白酶的方法和组合物，所述中性金属蛋白酶具有改善的储存稳定性。在一些实施方式中，中性金属蛋白酶在清洗和其它应用中具有用途。在一些特别优选的实施方式中，本发明提供含有从芽胞杆菌属某种得到的中性金属蛋白酶（一种或多种）的方法和组合物。在一些更特别优选的实施方式中，中性金属蛋白酶从解淀粉芽胞杆菌中得到。在又进一步优选的实施方式中，中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的变体。又在其它实施方式中，中性金属蛋白酶是解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的同系物。本发明在包括但不限于清洗、漂白和消毒的应用中具有具体用途。

[0183] 此外，如在下面的实施例中更详细的描述，本发明提供清洗许多对象的许多益处，所述对象包括但不限于衣服、织物、医疗器械等。另外，本发明提供在宽范围洗涤温度和 pH 内有效清洗、漂白和消毒的组合物。

[0184] 一般而言，蛋白酶通过将水分子加入到肽键（一个或多个）水解酰胺键。在肽键的羰基基团发生切割。在细菌种类中，例如芽胞杆菌，有两种主要类型的细胞外蛋白酶，即碱性或丝氨酸蛋白酶和中性金属蛋白酶。

[0185] 中性金属内切肽酶（即中性金属蛋白酶）(EC 3.4.24.4) 属于绝对需要锌离子的催化活性的蛋白酶类。这些酶在中性 pH 和在 30 到 40kDa 大小的范围内，具有最佳活性。中性金属蛋白酶结合 2 到 4 个钙离子，其有助于蛋白结构的稳定性。在金属蛋白酶活性位点的结合金属离子是允许水分子活化的必要特征。然后，水分子作为亲核试剂行使功能，并且切割肽键的羰基基团。

[0186] 该中性结合锌的金属蛋白酶家族包括细菌嗜热菌蛋白酶和类嗜热菌蛋白酶（“TLPs”），以及羧肽酶 A（一种消化酶），和在组织重塑和降解中催化反应的基质金属蛋

白酶。关于稳定性和功能,这些蛋白酶唯一良好表征的是嗜热菌蛋白酶和其变体(TLPs)。事实上,大多数研究集中在人工改造枯(基因工程)草芽胞杆菌中性蛋白酶以提高该酶的热稳定性(参见例如 Vriend 等,在 Tweel 等(eds)的 *Stability and Stabilization of enzymes*, Elsevier 中, pp. 93-99[1993])。

[0187] 大多数尝试集中于通过改变由提出的分子模型的应用确定的结构决定子,增加蛋白酶的稳定性,以防止局部解折叠过程,该解折叠过程将导致蛋白质自溶,并引起中性蛋白酶在高温下变性(参见例如 van den Burg 等,在 Hopsu-Havu 等(eds)的 *Proteolysis in Cell Functions Manipulating the Autolytic Pathway of a Bacillus Protease* 中, Biomedical and Health Research Vol.13, IOS Press[1997]p. 576)。

[0188] 本文提供人工改造中性金属蛋白酶具有提高的特性的组合物和方法。如本文指出,对于其它蛋白酶如嗜热菌蛋白酶,已报到钙离子防止自溶。通过加入钙,已稳定化嗜热脂肪芽胞杆菌中性蛋白酶以对抗自溶和蛋白水解降解(参见 Durrschmidt 等 FEBS J., 272: 1523-1534[2005])。

[0189] 事实上,本发明提供适于人工改造中性金属蛋白酶的组合物和方法,其不依赖于钙以便保持其结构稳定性。在一些实施方式中,人工改造在特定二级结构元件中防止了局部解折叠,其可防止蛋白质水解。

[0190] 天然和人工改造蛋白酶如枯草菌溶素通常在枯草芽胞杆菌中表达并且一些已被应用于洗涤剂配方以除去蛋白污迹。其它的已被应用于例如烘烤工业(例如源自嗜热溶蛋白芽胞杆菌的嗜热菌蛋白酶;参见例如 Galante 和 Formantici, Curr. Organic Chem., 7, 1399-1422[2003])。一般而言,丝氨酸蛋白酶已被更广的用于洗涤剂,这至少部分由于这些蛋白酶可相对容易地被稳定。

[0191] 事实上,由于许多原因,金属蛋白酶在工业中较少使用,特别是在洗涤剂工业。因为该酶具有对分别用于稳定和功能的钙和锌离子的绝对需要,所以这些酶涉及更复杂的蛋白质系统。此外,在洗衣过程中使用的洗涤剂溶液以及水通常含有经常干扰所述离子通过酶结合或螯合这些离子的成分,这导致水解功能的减少或损失和蛋白酶不稳定性。

[0192] 与目前使用的金属蛋白酶系统相比,本发明提供中性金属蛋白酶,其充分被稳定以有助于液体洗衣洗涤剂组合物的长期上架储存。在特别优选的实施方式中,通过用其必需的活性位点分子络合该酶,保存金属蛋白酶稳定性和活性。重要地,钙和锌离子的组合对于酶的功能没有不良影响。在一些实施方式中,稳定的中性金属蛋白酶是源自解淀粉芽胞杆菌(例如纯化的 MULTIFECT® Neutral; "PMN")的野生型金属蛋白酶。在可选的优选实施方式中,重组中性金属蛋白酶(例如克隆到枯草芽胞杆菌("nprE")的解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶)。在另外的实施方式中,具有提高稳定性的金属蛋白酶包括对酶的一个或多个钙结合位点具有增加的亲和力的酶。在优选的实施方式中,本发明的中性金属蛋白酶在普通洗涤剂应用中得到使用,所述普通洗涤剂应用包括但不限于冷水温度、草污迹和/或低 pH 条件。

[0193] 本发明提供稳定化结合锌的中性金属蛋白酶,以在洗涤剂基本成分和/或组合物中增加储存稳定性的条件。在优选的实施方式中,洗涤剂组合物包括至少一种金属蛋白酶(例如任何芽胞杆菌中性金属蛋白酶),通过洗涤剂配方内包括必需的锌和/或钙离子,该金属蛋白酶被稳定以对抗自溶和解折叠。在一些特别优选的实施方式中,源自解淀粉芽胞

杆菌 (PMN) 的中性金属蛋白酶和在枯草芽胞杆菌 (nprE) 中表达的重组体——其对锌离子结合的亲和力比对钙离子的亲和力大 10 倍——在本发明中得到应用。当与不存在离子、相同蛋白酶的情况下相对比时,在存在必需的锌离子的情况下,稳定的蛋白酶具有对抗蛋白质水解的提高了的稳定性。

[0194] 尽管一些实验结果表明在加入洗涤剂基本成分一小时后,nprE 损失了一些蛋白水解活性 ($\sim 20\%$),但是在 32°C 下,在存在锌离子的情况下温育的 nprE 显示出在没有加入盐或钙离子的实验条件下明显的稳定性。钙和锌离子都存在没有显示出叠加的效果。在锌离子浓度在 15mM 以下时,中性金属蛋白酶足够稳定大约 4 周。因此,本发明提供含有加入锌的组合物,以在存在洗涤剂成分的情况下,增加中性金属蛋白酶的储存时间。

[0195] 此外,在可选的实施方式中,用 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Fe^{2+} 取代锌阳离子,因为所有这些离子已表现出结合并恢复中性金属蛋白酶的蛋白酶活性。然而,已确定 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 没有恢复所有的天然活性。尽管 Co^{2+} 恢复了最高百分比的活性,但是其明显不如 Zn^{2+} 结合稳定。在所有中性金属蛋白酶的活性位中,锌阳离子是必要特征,因为已知其在底物结合和酶催化中起作用 (参见例如 Holmquist 和 Vallee, J. Biol. Chem., 249:4601-4607 [1974])。对于锌阳离子 ($\sim \mu\text{M}$ 范围),中性金属蛋白酶相对紧的亲和力,和对该离子的亲和力比对钙的亲和力大约高 10 倍,表明锌行使稳定剂的功能,从而防止自溶、蛋白质水解和解折叠。然而,本发明不拟限于任何具体的机制。

[0196] 对于在工业洗涤剂的生产和开发中的应用,本发明提供极有利的机会。由于具有除去蛋白质、淀粉和油迹的高度特异性,许多洗涤剂是可行的。具体而言,Equest Grass (Warwick) 上的 PMN 或源自解淀粉芽胞杆菌的中性金属蛋白酶的更好的洗涤性能表明,同样含有锌的洗涤剂基本成分中本发明的中性金属蛋白酶在改善的洗涤剂组合物中具有用途。本发明的清洗和洗涤剂制剂的详细描述

[0197] 除非另有注释,本文提供的所有成分或组合物水平 (含量) 根据成分或组合物的活性水平产生,并且排除杂质,例如残留溶剂或副产品——其可能在商业可获得的来源中存在。

[0198] 酶成分的重量基于全部活性蛋白。

[0199] 除非另有说明,按重量计算所有的百分比和比例。除非另有说明,基于总组合物计算所有的百分比和比例。

[0200] 在示例性的洗涤剂组合物中,按照纯酶占总组合物的重量表达酶水平,并且除非另有说明,按照总组合物的重量表达洗涤剂成分。包括中性金属蛋白酶的清洗组合物

[0201] 本发明的稳定的中性金属蛋白酶在配制多种洗涤剂组合物中是有用的。本发明的清洗组合物可被有利地用于例如洗衣应用、硬表面清洗、自动洗碟应用以及化妆品应用如假牙、牙齿、头发和皮肤。然而,由于其在较低温度溶液中提高的有效性和较高颜色安全属性 (color-safety profile) 方面的独特优势,本发明的酶理想地适用于洗衣应用例如织物漂洗。而且,本发明的酶在颗粒和液体组合物中具有用途。

[0202] 本发明的酶也在清洗用添加剂产品中得到应用。当需要额外的漂白效果时,包括本发明至少一种酶的清洗用添加剂产品理想地适用于包括洗涤过程中。这类情况包括但不限于低温溶液清洗应用。在其最简单的形式中,添加剂产品可以是本发明提供的一种或多种中性金属蛋白酶。在一些实施方式中,添加剂被包装为加入到清洗过程中的剂型,在该清

洗过程中使用过氧 (peroxygen) 并且需要增加漂白效力。在一些实施方式中,单一剂型包括丸剂、片剂、胶囊 (gelcap) 或其它单一剂量单位,其包括预测定的 (pre-measured) 粉末和 / 或液体。在一些实施方式中,包括填料和 / 或载体物质 (一种或多种),以便增加这类组合物的体积。适合的填料或载体物质包括但不限于各种硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐以及滑石、粘土等。在一些实施方式中,液体组合物的填料和 / 或载体物质包括水和 / 或小分子量伯醇和仲醇,其包括多元醇和二醇。这类醇的实例包括但不限于甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇。在一些实施方式中,组合物包含大约 5% 到大约 90% 的该类物质。在另外的实施方式中,使用酸性填料来降低组合物的 pH。在一些可选的实施方式中,清洗添加剂包括至少一种活化的如下面描述的过氧源和 / 或下面更充分描述的辅助成分。

[0203] 本发明的清洗组合物和清洗添加剂需要如本发明提供的有效量的中性金属蛋白酶。在一些实施方式中,通过加入一种或多种本发明提供的中性金属蛋白酶达到需要的酶的水平。典型地,本发明的清洗组合物包括至少 0.0001 重量百分比、从大约 0.0001 到大约 1、从大约 0.001 到大约 0.5、或者甚至从大约 0.01 到大约 0.1 重量百分比的本发明提供的至少一种中性金属蛋白酶。

[0204] 在一些优选的实施方式中,本文提供的清洗组合物一般配制成如此:在含水清洗操作中使用期间,洗涤水具有从大约 5.0 到大约 11.5 的 pH,或者在可选的实施方式中,甚至从大约 6.0 到大约 10.5。在一些优选的实施方式中,液体产品制剂通常被配制成具有从大约 3.0 到大约 9.0 的净 pH,而在一些可选的实施方式中,制剂具有从大约 3.0 到大约 5 的净 pH。在一些优选的实施方式中,粒状洗衣产品通常被配制成具有从大约 8 到大约 11 的 pH。控制 pH 在推荐使用的水平的技术包括应用缓冲液、碱、酸等,其是本领域普通技术人员所熟知的。

[0205] 在一些特别优选的实施方式中,当在颗粒组合物或液体中使用至少一种中性金属蛋白酶时,中性金属蛋白酶是封装颗粒 (encapsulated particle) 形式,以保护酶在储存期间免于颗粒组合物其它成分的破坏。另外,封装也提供了在清洗过程中控制中性金属蛋白酶 (一种或多种) 有效性的方法,并且可以增强中性金属蛋白酶 (一种或多种) 的性能。预期本发明的封装的中性金属蛋白酶将在多种情形 (settings) 中得到应用。中性金属蛋白酶也拟使用本领域已知的任何适合的封装材料 (一种或多种) 和方法 (一种或多种) 进行封装。

[0206] 在一些优选的实施方式中,封装材料一般封装至少部分中性金属蛋白酶催化剂。在一些实施方式中,封装材料是水溶的和 / 或水分散的。在一些另外的实施方式中,封装材料具有 0°C 或更高的玻璃化转变温度 (Tg) (参见,例如 WO 97/11151,特别是从第 6 页第 25 行到第 7 页第 2 行,关于玻璃化转变温度的更多信息)。

[0207] 在一些实施方式中,封装材料选自糖类、天然或合成橡胶、壳多糖和壳聚糖、纤维素和纤维素衍生物、硅酸酯 (盐)、磷酸酯 (盐)、硼酸酯 (盐)、聚乙烯醇、聚乙二醇、石蜡和它们的组合。在其中封装材料是糖类的一些实施方式中,其选自单糖、寡糖、多糖和它们的组合。在一些优选的实施方式中,封装材料是淀粉 (参见,例如 EP 0 922 499; US 4,977,252、US 5,354,559 和 US 5,935,826,对于一些示例性适当淀粉的描述)。

[0208] 在另外的实施方式中,封装材料包括由塑料制成的微球体 (例如热塑性塑料、丙烯酸腈、甲基丙烯酸腈、聚丙烯腈、聚甲基丙烯酸腈和它们的混合物;得到应用的商业可获得的微

球体包括但不限于 EXPANCEL® [Casco Products, Stockholm, Sweden], PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®和 Q-CEL® [PQ Corp., Valley Forge, PA], LUXSIL®和 SPHERICEL® [Potters Industries, Inc., Carlstadt, NJ and Valley Forge, PA])。制造和使用本申请人的清洗组合物的方法

[0209] 在一些优选的实施方式中,本发明的清洗组合物被配制成任何合适的形式,并且通过配制者选择的任何方法制备(参见,例如 U. S. 5, 879, 584, U. S. 5, 691, 297, U. S. 5, 574, 005, U. S. 5, 569, 645, U. S. 5, 565, 422, U. S. 5, 516, 448, U. S. 5, 489, 392 和 U. S. 5, 486, 303, 对于一些非限定性的实例)。在其中期望低 pH 清洗组合物的一些实施方式中,通过加入酸性物质如 HCl, 调节这类组合物的 pH。辅助物质

[0210] 尽管对于本发明的目的不是必需的,在一些实施方式中,本文描述的辅助物的非限制性清单适合用于本发明的清洗组合物。事实上,在一些实施方式中,辅助物被掺入本发明的清洗组合物。在一些实施方式中,辅助物质帮助和/或增强清洗性能,处理待清洗的基底,和/或修饰清洗组合物的美观性(例如,香料、着色剂、染料等)。应该理解,此类辅助物是除本发明的中性金属蛋白酶之外的。这些额外的组分的精确特性和其掺入的水平取决于组合物的物理形式和它待被使用的清洗操作性质。合适的辅助物质包括但不限于表面活性剂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂(dye transfer inhibiting agents)、沉淀助剂、分散剂、额外的酶、和酶稳定剂、催化物质、漂白活化剂、漂白促进剂、过氧化氢、过氧化氢源、预制过酸、聚合物分散剂、粘土清除剂/抗再沉淀剂、增亮剂、抑泡剂、染料、香料、结构增弹剂(structure elasticizing agents)、织物柔软剂、载体、水溶助长剂、加工助剂和/或色素。除了本文明确提供的,其它的实例是本领域已知的(参见美国专利第 5, 576, 282, 6, 306, 812B1 和 6, 326, 348B1 号)。在一些实施方式中,上述辅助成分构成本发明的清洗组合物的余量。

[0211] 表面活性剂——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物可以包括至少一种表面活性剂或表面活性剂系统,其中表面活性剂选自非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、两性离子表面活性剂、半极性非离子表面活性剂和它们的混合物。在一些低 pH 清洗组合物实施方式(诸如具有从大约 3 至大约 5 的净 pH 的组合物)中,组合物通常不含烷基乙氧基化物硫酸盐,因为认为此类表面活性剂可以被此类组合物的酸性内含物水解。

[0212] 以清洗组合物重量计,在一些实施方式中,表面活性剂通常以从大约 0.1% 到大约 60% 的水平存在,而在可选的实施方式中,该水平为从大约 1% 到大约 50%,而在进一步的实施方式中,该水平从大约 5% 到大约 40%。

[0213] 助洗剂——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物可以包括一种或多种洗涤剂助洗剂或助洗剂系统。在掺入至少一种助洗剂的一些实施方式中,以清洗组合物的重量计,清洗组合物包括至少大约 1%、从大约 3% 到大约 60%、或甚至从大约 5% 到大约 40% 的助洗剂。

[0214] 助洗剂包括但不限于多磷酸的碱金属盐、铵盐和烷醇铵盐,碱金属硅酸盐、碱土金属和碱金属碳酸盐、硅铝酸盐助洗剂聚羧酸化合物、羟基聚羧酸醚酯(etherhydroxypolycarboxylates)、马来酸酐和乙烯或乙烯基甲基醚的共聚物、1,3,5-三羟基苯-2,4,6-三磺酸和羧甲氧基琥珀酸(carboxymethyloxysuccinic acid),聚乙酸的

各种碱金属盐、铵盐和取代铵盐,诸如乙二胺四乙酸和氨三乙酸,以及聚羧酸,诸如苯六甲酸、琥珀酸、柠檬酸、羟二琥珀酸(oxydisuccinic acid)、聚马来酸、苯1,3,5-三甲酸、羧甲氧基琥珀酸和它们的可溶性盐。事实上,预期任何适合的助洗剂将在本发明的多种实施方式中得到应用。

[0215] **螯合剂**——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物含有至少一种螯合剂。合适的螯合剂包括但不限于铜、铁和/或锰螯合剂和它们的混合物。在至少一种螯合剂被使用的实施方式中,以目标清洗组合物的重量计,本发明的清洗组合物含有从大约0.1%到大约15%或甚至从大约3.0%到大约10%的螯合剂。

[0216] **沉淀助剂**——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物含有至少一种沉淀助剂。合适的沉淀助剂包括但不限于聚乙二醇、聚丙二醇、聚羧酸酯、去污聚合物(soil release polymers)诸如聚对苯二甲酸,粘土诸如高岭土、蒙脱石、绿坡缕石、伊利石、膨润土、多水高岭土以及它们的混合物。

[0217] **染料转移抑制剂**——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物包括一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于:聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚胺N-氧化物聚合物(polyamine N-oxide polymer)、N-乙烯吡咯烷酮和N-乙烯咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮(polyvinylloxazolidone)和聚乙烯咪唑或它们的混合物。

[0218] 在至少一种染料转移抑制剂被使用的实施方式中,以清洗组合物的重量计,本发明的清洗组合物包括从大约0.0001%到大约10%、从大约0.01%到大约5%或甚至从大约0.1%到大约3%的染料转移抑制剂。**分散剂**——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物含有至少一种分散剂。合适的水溶性有机物质包括但不限于:均聚物酸或共聚物酸或它们的盐,其中,聚羧酸包括至少两个羧基,相互之间被不超过两个的碳原子分开。

[0219] **酶**——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物包括一种或多种洗涤剂酶,它们提供清洗性能和/或织物护理益处。合适的酶的例子包括但不限于半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂加氧酶、木质素酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶和淀粉酶或它们的混合物。在一些实施方式中,使用酶组合(即“混合物”),使用的酶组合包括常规适用的酶如蛋白酶、脂酶、角质酶和/或纤维素酶以及淀粉酶。

[0220] **酶稳定剂**——在本发明的一些实施方式中,用于本发明洗涤剂制剂的酶被稳定化。预期多种酶稳定化技术将在本发明得到应用。例如,在一些实施方式中,本文中利用的酶可以通过锌(II)、钙(II)和/或镁(II)离子的水溶性来源——所述锌(II)、钙(II)和/或镁(II)离子的水溶性来源为酶提供此类离子——以及其它金属离子(例如钡(II)、铈(II)、铁(II)、锰(II)、铝(III)、锡(II)、钴(II)、铜(II)、镍(II)和氧络钒(oxovanadium)(IV))在成品组合物中的存在来稳定化。

[0221] **催化性金属络合物**——在一些实施方式中,本发明的清洗组合物包括一种或多种催化性金属络合物。在一些实施方式中,含金属的漂白催化剂得到应用。在一些优选的实施方式中,金属漂白催化剂包括这样的催化系统,该系统包括具有确定的漂白催化活性的过渡金属阳离子(例如铜、铁、钛、钨、钼或锰阳离子)、具有较低或没有漂白催化活性的辅助金属阳离子(例如锌或铝阳离子)、以及对催化和辅助金属阳离子具有确定的稳定常数

的螯合剂,特别是使用乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)和它们的水溶性盐(参见,例如 US 4,430,243)。

[0222] 在一些实施方式中,本发明的清洗组合物借助锰化合物来催化。此类化合物和使用水平是本领域熟知的(参加,例如 5,576,282)。

[0223] 在另外的实施方式中,钴漂白催化剂在本发明的清洗组合物中得到应用。多种钴漂白催化剂是本领域已知的(参见,例如 U.S. 5,597,936 和 U.S. 5,595,967)。此类钴催化剂通过已知的方法容易制备(参见,例如 U.S. 5,597,936 和 U.S. 5,595,967)。

[0224] 在另外的实施方式中,本发明的清洗组合物包括大多环刚性配体(macropolycyclic rigid ligand)(“MRL”)的过渡金属络合物。作为实例,而不是为了限制,在一些实施方式中,本发明提供的组合物和清洗方法被调整,以在含水洗涤介质中提供至少一亿分之一数量级的活性 MRL 种类,在一些优选的实施方式中,在洗涤液体中提供从大约 0.005ppm 到大约 25ppm、更优选地从大约 0.05ppm 到大约 10ppm、和最优选地从大约 0.1ppm 到大约 5ppm 的 MRL。

[0225] 在本过渡金属漂白催化剂中优选的过渡金属包括但不限于锰、铁和铬。优选的 MRL 也包括但不限于交联的特殊超刚性配体(例如 5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂双环[6.6.2]十六烷)。通过已知的方法(参见,例如 WO 00/32601 和 U.S. 6,225,464),容易制备适合的过渡金属 MRLs。制备和使用清洗组合物的方法

[0226] 本发明的清洗组合物被配制成任何合适的形式,并且通过配制者选择的任何方法制备,(对于一些非限制性例子,参见例如 U.S. 5,879,584, U.S. 5,691,297, U.S. 5,574,005, U.S. 5,569,645, U.S. 5,565,422, U.S. 5,516,448, U.S. 5,489,392, U.S. 5,486,303, U.S. 4,515,705, U.S. 4,537,706, U.S. 4,515,707, U.S. 4,550,862, U.S. 4,561,998, U.S. 4,597,898, U.S. 4,968,451, U.S. 5,565,145, U.S. 5,929,022, U.S. 6,294,514 和 U.S. 6,376,445,所有这些被引入本文作为参考)。使用方法

[0227] 在优选的实施方式中,本发明的清洗组合物在清洗表面和/或织物中得到应用。在一些实施方式中,至少一部分的表面和/或织物与本发明的清洗组合物的至少一个实施方式相接触,所述组合物为纯的形式或稀释在洗涤液体中,然后表面和/或织物被任选地洗涤和/或漂洗。对于本发明的目的,“洗涤”包括但是不限于擦洗和机械搅拌。在一些实施方式中,织物包括能够在正常的消费者使用条件下被洗涤的任何织物。在优选的实施方式中,本发明的清洗组合物通常以在溶液中从大约 500ppm 到大约 15,000ppm 的浓度被应用。在其中洗涤溶剂是水的一些实施方式中,水温通常在从大约 5°C 到大约 90°C 范围内。在一些织物清洗的优选实施方式中,水与织物的质量比通常为大约 1:1 到大约 30:1。实验

[0228] 提供下面的实施例以便展示和进一步阐明本发明的某些优选的实施方式和方面,这些实施例不能解释为限制其范围。

[0229] 在下面的实验公开内容中,下面的缩写词被应用:°C(摄氏度);rpm(每分钟转速);H₂O(水);HCl(盐酸);aa 和 AA(氨基酸);bp(碱基对);kb(千碱基对);kD(千道尔顿);gm(克);μg 和 ug(微克);mg(毫克);ng(纳克);μl 和 ul(微升);ml(毫升);mm(毫米);nm(纳米);μm 和 um(微米);M(摩尔);mM(毫摩尔);μM 和 uM(微摩尔);U(单位);V(伏特);MW(分子量);sec(秒);min(s)(分钟/几分钟);hr(s)(小时/几小时);MgCl₂(氯化镁);NaCl(氯化钠);OD₂₈₀(280nm 处的光密度);OD₄₀₅(405nm

处的光密度);OD₆₀₀(600nm 处的光密度);PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳);EtOH(乙醇);PBS(磷酸盐缓冲盐水 [150mM NaCl、10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2]);LAS(十二烷基磺酸钠);SDS(十二烷基硫酸钠);Tris(三[羟甲基]氨基甲烷);TAED(N, N, N' N' - 四乙酰基乙二胺);BES(聚酯磺(polyestersulfone));MES(2- 吗啉乙磺酸, 一水合物; f. w. 195.24; Sigma # M-3671);CaCl₂(氯化钙, 无水; f. w. 110.99; Sigma#C-4901);DMF(N, N- 二甲基甲酰胺, f. w. 73.09, d = 0.95);Abz-AGLA-Nba(2- 氨基苯甲酰基 -L- 丙氨酰甘氨酸 -L- 亮氨酸 -L- 丙氨酸基 (alanino)-4- 硝基苄基酰胺, f. w. 583.65; Bachem # H-6675, VWR catalog # 100040-598);SBG1% (" 含有葡萄糖的超级培养基 (Super Broth with Glucose) "; 6g Soytone[Difco], 3g 酵母提取物, 6g NaCl, 6g 葡萄糖);在使用本领域已知的方法灭菌以前用 NaOH 将 pH 调节到 7.1;w/v(重量与体积之比);v/v(体积与体积之比);Npr 和 npr(中性金属蛋白酶);SEQUEST®(SEQUEST 数据库搜索软件, University of Washington);Npr 和 npr(中性金属蛋白酶基因);nprE 和 NprE(解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶);PMN(纯化的 MULTIFECT®金属蛋白酶);MS(质谱仪);SRI(污迹除去指标 (Stain Removal Index));TIGR(The Institute for Genomic Research, Rockville, MD);AATCC(American Association of Textile and Coloring Chemists);Amersham(Amersham LifeScience, Inc. Arlington Heights, IL);Corning(Corning International, Corning, NY);ICN(ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA);Pierce(Pierce Biotechnology, Rockford, IL);Equest(Equest, Warwick International Group, Inc., Flintshire, UK);EMPA(Eidgenossische Material Prüfungs und Versuch Anstalt, St. Gallen, Switzerland);CFT(Center for Test Materials, Vlaardingen, The Netherlands);Amicon(Amicon, Inc., Beverly, MA);ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA);Becton Dickinson(Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ);Perkin-Elmer(Perkin-Elmer, Wellesley, MA);Rainin(Rainin Instrument, LLC, Woburn, MA);Eppendorf(Eppendorf AG, Hamburg, Germany);Waters(Waters, Inc., Milford, MA);Geneart(Geneart GmbH, Regensburg, Germany);Perseptive Biosystems(Perseptive Biosystems, Ramsey, MN);Molecular Probes(Molecular Probes, Eugene, OR);BioRad(BioRad, Richmond, CA);Clontech(CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA);Cargill(Cargill, Inc., Minneapolis, MN);Difco(Difco Laboratories, Detroit, MD);GIBCO BRL 或 GibcoBRL(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD);New Brunswick(New Brunswick Scientific Company, Inc., Edison, NJ);Thermoelectron(Thermoelectron Corp., Waltham, MA);BMG(BMG Labtech, GmbH, Offenbourg, Germany);Greiner(GreinerBio-One, Kremsmuenster, Austria);Novagen(Novagen, Inc., Madison, WI);Novex(Novex, San Diego, CA);Finnzymes(Finnzymes OY, Finland);Qiagen(Qiagen, Inc., Valencia, CA);Invitrogen(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA);Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);DuPont Instruments(Asheville, NY);Global Medical Instrumentation 或 GMI(Global Medical Instrumentation; Ramsey, MN);MJ Research(MJ Research, Waltham, MA);Infors(Infors AG, Bottmingen, Switzerland);Stratagene(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA);Roche(Hoffmann La Roche, Inc., Nutley, NJ);Agilent(Agilent Technologies, Palo Alto, CA);S-Matrix(S-Matrix

Corp., Eureka, CA) ;US Testing(United States Testing Co., Hoboken, NY) ;West Coast Analytical Services(West Coast Analytical Services, Inc., Santa Fe Springs, CA) ;Ion Beam Analysis Laboratory(Ion Beam Analysis Laboratory, The University of Surrey Ion Beam Centre(Guildford, UK) ;TOM(Terg-o-Meter) ;BMI(blood, milk, ink) ;BaChem(BaChem AG, Bubendorf, Switzerland) ;Molecular Devices(Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA) ;Corning(Corning International, Corning, NY) ;MicroCal(Microcal, Inc., Northampton, MA) ;Chemical Computing(Chemical Computing Corp., Montreal, Canada) ;NCBI(National Center for Biotechnology Information) ;Argo Bioanalytica(Argo Bioanalytica, Inc, New Jersey) ;Vydac(Grace Vydac, Hesperia, CA) ;Minolta(Konica Minolta, Ramsey, NJ) ; 和 Zeiss(Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)。

[0230] 在这些实验中,在反应完成后,使用分光光度计测量形成产品的吸光度。使用反射计测量样品的反射系数。除非另有说明,通过 Coomassie Plus(Pierce),使用 BSA 作为标准,估计蛋白质浓度。

[0231] 在下面描述的实施例中,使用下列分析。A. 在 96 孔微量滴定板 (MTPs) 中对蛋白质含量进行测定的考马斯亮蓝染色法 (Bradford Assay)

[0232] 在这些分析中,使用考马斯亮蓝染料试剂 (Bradford dye reagent) (Quick Start) 分析,以确定在 MTP 规模上 NprE 蛋白酶样品的蛋白质浓度。在该分析系统中,使用的化学品和试剂溶液是:Quick Start 考马斯亮蓝染料试剂 BIO-RAD, #500-0205 稀释缓冲液 10mM NaCl, 0.1mM CaCl₂, 0.005% TWEEN®-80

[0233] 使用的设备是 Biomek FX Robot(Beckman) 和 SpectraMAX(340 型)MTP 读数器;MTPs 得自 Costar(9017 型)。

[0234] 在检测中,200 μ l 考马斯亮蓝染料试剂被移入每个孔,然后加入 15 μ l 稀释缓冲液。最后将 10 μ l 过滤的培养物肉汤加入到孔中。充分混合后,将 MTP 在室温下温育至少 10 分钟。将可能的气泡吹掉,并且在 595nm 下读出孔的 OD。

[0235] 为了确定蛋白质浓度,从样品读数中减去背景读数(即,未接种的孔的读数)。所得到的 OD₅₉₅ 值提供样品中蛋白质含量的相对测量。在 0 到 5 μ g 之间的 NprE 校准线的线性使得能用 OD_{595nm} 值作为蛋白含量的相对测量。当在上清液中预期的 NprE 含量是 200-300 μ g/ml 时,在该检测中使用的 10 μ l 样品体积含有 5 μ g 以下的蛋白质,这提供线性范围内的值。B. 用于检测蛋白酶性能的微型样本分析 (Microswatch Assay)

[0236] 用于该分析的洗涤剂不含有酶。使用的设备是 Biomek FX Robot(Beckman) 和 SpectraMAX(340 型)MTP 读数器;MTPs 得自 Costar(9017 型)。洗涤剂制备(冷水液体洗涤剂;US 条件):

[0237] 将 Milli-Q 水调节到 6gpg 水硬度 (Ca/Mg = 3/1),加入 0.78g/l TIDE® 2007-2x 洗涤剂。强烈搅拌洗涤剂溶液至少 15 分钟。然后加入 5mM HEPES(游离酸)并将 pH 调节为 8.2。微型样品

[0238] 从 CFT 得到 1/4" 圆形直径的微型样本。在将样品切割之前,用水洗涤织物 (EMPA 116)。将两份微型样本垂直置于 96 孔微量滴定板的每个孔中,以暴露整个表面积(即,不是平放在孔底上)。检测方法

[0239] 将培养箱设定为 20℃。通过用 10mM NaCl、0.1mM CaCl₂和 0.005% TWEEN®-80 溶液的混合物稀释,在适当浓度下,检测过滤的培养物肉汤样品。期望的洗涤剂溶液依照上面描述制备。然后,将 190 μl 的洗涤剂溶液加入到含有微型样品的 MTP 的每一个孔中。向该混合物,加入 10 μl 稀释的酶溶液(以使得总体积为 200 μl/孔)。用胶带密封 MTP,并置于培养箱中 30 分钟,以 1400rpm 的速度搅拌。在合适的条件下温育之后,从每一个孔移出 100 μl 溶液,并置入新的 MTP 中。在 405nm,在 MTP 读数器中,读出含有 100 μl 溶液/孔的新 MTP。也包括空白对照,以及含有微型样品和洗涤剂但是不含酶的对照。BMI 性能计算:

[0240] 获得的吸光度值用空白值(即,在无酶情况下温育微型样品后所获得的值)校正。所得的吸光度是水解活性的量度。对每一样品(例如 nprE 或变体),计算性能指数。性能指数比较了同样蛋白质浓度的变体的性能(实际值)和标准酶的性能(理论值)。此外,使用标准酶的 Langmuir 方程的参数,计算理论值。大于 1 的 (PI > 1) 性能指数 (PI) 表示较好的变体(如与标准[例如野生型]相比),而 PI 为 1 (PI = 1) 表示性能与标准相同的变体,小于 1 的 PI (PI < 1) 表示性能不如标准的变体。因此,PI 鉴定了优胜者,以及在某些环境中较不期望使用的变体。C. NprE 蛋白酶柠檬酸盐稳定性分析

[0241] 在将野生型 NprE 和变体在存在 50mM 柠檬酸盐的情况下温育后,测量柠檬酸盐稳定性。使用 DMC 水解分析法确定初始和残留活性。在该分析系统中,使用的化学品和试剂溶液是:

柠檬酸一水合物	Merck 1.00244
Pipes(游离酸)	Sigma P-1851
Tris(游离酸)	Sigma T-1378
HEPES(超纯>99.5%)	Sigma-H7523
TWEEN®-80	Sigma P-8074
二甲基酪蛋白(DMC)	Sigma C-9801
Tris 缓冲液(游离酸)	6.04 g 溶于 1000 ml 水中(= 50 mM)
HEPES 缓冲液	11.9 g 溶于 1000 ml 水中(= 50 mM)
柠檬酸盐缓冲液(游离酸)	21.0 g 溶于 1000 ml 水中(= 100 mM),
PIPES 缓冲液(游离酸):	3.32 g 溶于大约 960 ml 水中,
DMC 溶液	55 mM PIPES 缓冲液中 1 % w/v, 终 pH = 6.0
稀释缓冲液 1	0.1 mM CaCl ₂ /25 mM Tris; pH 8.2
稀释缓冲液 2	0.1 mM CaCl ₂ /50 mM 柠檬酸盐/25 mM Tris; pH8.2

[0242] 这些稀释缓冲液的浓度被表示为终浓度。初始浓度按比例得更高并且依赖于稀释比率。在可选的实验中,HEPES 用于替换 Tris。使用的设备是 Biomek FXRobot (Beckman) 和培养箱/摇床 (Innova, 4230 型; New Brunswick)。用 4N HCl 调节 PIPES 缓冲液至 pH 5.8 (终浓度为 55mM)。用 4N HCl 调节 Tris 缓冲液至 pH8.2 (终浓度为 25mM)。用 4N NaOH 调节 50mM 柠檬酸盐/25mM Tris 缓冲液至 pH 8.2。用 4N NaOH 调节 HEPES 缓冲液至 pH 8.2 (终浓度为 25mM)。用 4N NaOH 调节 50mM 柠檬酸盐/25mM HEPES 缓冲液至 pH 8.2。蛋白质测定

[0243] 为了在柠檬酸盐稳定性分析中确定期望的稀释比率,使用 TCA 分析,确定每一平板野生型 NprE 对照的蛋白酶浓度。在该方法中,将 25 μl 过滤的培养物肉汤加入到 200 μl

16.875% (w/v) 的 TCA。在环境温度下温育 10 到 15 分钟后,在 405nm 下确定光散射 / 吸光度。通过应用纯 NprE 构建的校准线,测定蛋白质浓度。检测方法

[0244] 如上所述,使用 TCA 分析确定过滤的培养物肉汤的稀释比率。应激条件 (Stressed Conditions) :

[0245] 用稀释缓冲液 2 稀释过滤的培养物肉汤。用胶带覆盖 MTP,摇动几秒并且将其置于 200rpm、25℃ 的培养箱中 60 分钟。温育后,从每一个孔取出 20 μ l 混合物,并转移入含有 180 μ l 11% 的 DMC 预热底物溶液 (该底物在 25℃ 下预热) 的新 MTP 中。将 MTP 直接置于培养箱 / 摇床中,并在 200rpm 搅拌下于 25℃ 培养 30 分钟。使用二甲基酪蛋白水解分析,确定残留蛋白酶活性,如下所述。无应激条件 (Unstressed Conditions)

[0246] 用稀释缓冲液 1 稀释过滤的培养物肉汤。立即地,从每一个孔取出 20 μ l 混合物,并转移入含有 180 μ l 11% 的 DMC 预热底物溶液 (该底物在 25℃ 下预热) 的新 MTP 中。将 MTP 直接置于培养箱 / 摇床中,并在 200rpm 搅拌下于 25℃ 培养 30 分钟。使用二甲基酪蛋白水解分析,用 TNBS 确定残留蛋白酶活性,如下所述。

[0247] 使用下列等式,计算所有残留活性值 (用二甲基酪蛋白水解分析确定)。残留活性 % = $OD_{60min} \text{ 值} * 100 / OD_{00min} \text{ 值}$ D. 二甲基酪蛋白水解分析

[0248] 在该分析系统中,使用的化学品和试剂溶液是 :

二甲基酪蛋白(DMC)	Sigma C-9801
TWEEN®-80	Sigma P-8074
PIPES 缓冲液(游离酸)	Sigma P-1851; 15.1g 溶于大约 960ml 水中; 用 4N NaOH 将 pH 调节到 6.0, 加入 1 ml 的 5% TWEEN®-80 并且使体积达到 1000 ml。PIPES 和 TWEEN®-80 的终浓度分别为 50 mM 和 0.005%。
三硝基苯磺酸(TNBS)	Sigma P-2297 (5%水溶液)
试剂 A	45.4 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (Merck 6308)和 15 ml 的 4N NaOH 一起溶解, 最终体积为 1000 ml (如果需要通过加热完成)
试剂 B	35.2 g $NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$ (Merck 6346)和 0.6 g Na_2SO_3 (Merck 6657)一起溶解, 最终体积为 1000 ml。

方法

[0249] 为了制备底物,将 4g 二甲基酪蛋白溶解在 400ml PIPES 缓冲液中。将过滤的培养物上清液用 PIPES 缓冲液稀释。然后,将 10 μ l 的每一份稀释的上清液加入到 MTP 孔的 200 μ l 底物中。MTP 用胶带覆盖,振荡数秒,置于 25℃ 烘箱中 30 分钟,不搅动。从烘箱移出第一个板之前约 15 分钟,通过将每 50ml 试剂 A 混合以 1ml TNBS 溶液,制备 TNBS 试剂。MTPs 每孔充以 60 μ l TNBS 试剂 A。温育过的板振荡数秒,之后,将 10 μ l 转移到含有 TNBS 试剂 A 的 MTP。板用胶带覆盖,在室温以 500rpm 在台式摇床 (BMG ThermoStar) 中摇动 20 分钟。最后,将 200 μ l 的试剂 B 加入到孔中,在摇床上混合 1 分钟,并用 MTP 读数器确定在 405nm 的吸光度。

[0250] 获得的吸光度值用空白值 (即无酶底物) 校正。所得的吸光度是水解活性的量度。

通过除吸光度和测定的蛋白质浓度,计算(任意单位的)样品比活性。E. TIDE®稳定性分析

[0251] 在存在 25% TIDE®浓缩洗涤剂下的温育步骤后,测量 NprE 和变体的稳定性。使用下面描述的 AGLA 分析,测定初始和残留活性。使用的设备是 Biomek FXRobot (Beckman)、荧光计 (FLUOstar Optima; BMG)、培养箱 / 摇床 (iEMS; Thermoelectron) 和培养箱 / 摇床 (Innova; New Brunswick (4230 型)); MTP 得自 Costar (9017 型) 和 Greiner (黑色平板, 655076 型)。化学品和试剂: 在该分析系统中,使用的化学品和试剂溶液是:

TIDE®-浓缩洗涤剂	具有和不具有 DTPA
TIDE®-浓缩洗涤剂溶液	125 g TIDE®-浓缩型溶于 50g 的 50 mM HEPES pH 8.2 和 275 ml 水的混合物中; 用 25% 上清液稀释后, TIDE® 的浓度是 27.7%
MES 稀释缓冲液	52.6 mM MES/NaOH, 2.6 mM CaCl ₂ , 0.005% TWEEEN®-80, pH 6.5
AGLA 底物	BaChem, 目录编号 H-6675 或 American Peptide Company, 目录编号 81-0-31
AGLA 底物溶液	451 mg 的 AGLA 溶解于 16 ml N,N-二甲基甲酰胺; 搅拌下, 将该溶液倒入 304ml 的 MES-缓冲液 (52.6 mM MES/NaOH, 2.6 mM CaCl ₂ , 0.005% TWEEEN®-80, pH 6.5) 中

检测方法: 无应激条件:

[0252] 首先,用 180 μ l MES 稀释缓冲液稀释 20 μ l 过滤的培养物肉汤。然后,用 180 μ l MES 稀释缓冲液稀释 20 μ l 该稀释的肉汤。然后在 25°C 下预热的平板中,用 190 μ l AGLA-底物溶液稀释 10 μ l 该稀释的溶液。吹掉任何存在的气泡,并且根据 AGLA 蛋白酶分析方法测量该板。应激条件:

[0253] 首先,用不含 DTPA 的 180 μ l TIDE®-浓缩洗涤剂溶液稀释 20 μ l 过滤的培养物肉汤,并且在 iEMS 摇床中预混 5 分钟后,进一步在 Innova 摇床中温育。在 200rpm、32°C 下温育该板总共 60 分钟。另外,用含有 DTPA 的 180 μ l TIDE®-浓缩洗涤剂溶液稀释 20 μ l 过滤的培养物肉汤,并且在 iEMS 摇床中预混 5 分钟后,进一步在 Innova 摇床中温育。在 200rpm、20°C 下温育该板总共 40 分钟。然后用 180 μ l MES 稀释缓冲液稀释 20 μ l 这些溶液中的任一个,并在 25°C 下预热的平板中,用 190 μ l AGLA-底物溶液稀释 10 μ l 该稀释的溶液。吹掉任何存在的气泡,并且根据 AGLA 蛋白酶分析方法测量该板。计算:

[0254] 在 350nm 激发和 415nm 发射下,进行荧光测量。对于每一孔,根据线性回归线,分荧光计软件计算毫 RFU/min 的荧光增加的反应速率:残留活性百分比:(应激条件的斜率)*100/(无应激条件的斜率)F. 2-氨基苯甲酰基-L-丙氨酰甘氨酸-L-亮氨酸-L-丙氨酸-4-硝基苄基酰胺蛋白酶分析 (Abz-AGLA-Nba)

[0255] 下面提供的方法提供产生独立于时间和空间的可重复蛋白酶分析数据的一定程度的技术细节。尽管该分析可改变用于给定实验室条件,但是通过修改的方法所获得的任何数据必须符合通过原始方法产生的结果。中性金属蛋白酶切割 2-氨基苯甲酰基-L-丙

氨酰甘氨酸-L-亮氨酸-L-丙氨酸基-4-硝基苄基酰胺 (Abz-AGLA-Nba) 的甘氨酸和亮氨酸之间的肽键。溶液中游离 2-氨基苯甲酰基-L-丙氨酸甘氨酸 (Abz-AG) 具有 415nm 处的最大荧光发射和 340nm 处的最大激发。完整 Abz-AGLA-Nba 分子中的硝基苄基酰胺猝灭了 Abz-AG 的荧光。

[0256] 在这些实验中,通过荧光光谱学 (340 激发 /415 发射),监控通过 Abz-AGLA-Nba 蛋白酶切割对的 Abz-AG 释放。Abz-AG 出现的比率是水解活性的量度。在非底物限制的初始比率条件下进行分析。

[0257] 需要具有温度控制的微板混合器 (例如 Eppendorf Thermomixer),以得到可重复的分析结果。在加入酶之前,在微板混合器中将分析溶液温育到期望温度 (例如 25℃)。将酶溶液加入到混合器中的平板上,强力混合并快速转移到平板读数器。

[0258] 需要能连续记录数据、线性回归分析并具有温度控制的分光荧光计 (例如 SpectraMax M5, Gemini EM, Molecular Devices)。读数器总是保持在期望温度 (例如 25℃)。设定读数器,以进行顶部读取荧光探测 (top-read fluorescence detection),并且将激发设定为 350nm,发射设定为 415nm,而没有使用截止滤波器。设定 PMT 至中度灵敏,并且每个孔读 5 个数。打开自动校准,但是仅在第一次读数前校准。根据选择来被监控的孔的数量,最小化读数间隔,测量该试样 3 分钟。设定读数器以计算毫 RFU/min (每分钟千分之一的相对荧光单位) 的速率。设定用于计算速率 (V_{max} 点) 的读数数量为相当于 2 分钟的数量,如通过读数间隔所确定 (例如,每 10 秒读数将使用 12 个点计算该速率)。最大的 RFU 被设定为 50,000。

[0259] 所有酶和底物原液的吸取用正位移移液管 (positive displacement pipets) (Rainin Microman) 进行。缓冲液、试样溶液和酶工作溶液被单路或多路排气移液管 (air-displacement pipets) (Rainin LTS) 从试管、试剂贮液器 (reagent reservoirs) 或原液微板 (stock microplates) 吸取。当使用很少孔时,可重复用吸管 (repeater pipet) (Eppendorf) 可用于将试样溶液转移到微平板孔中,以最小化试剂损失。自动吸取仪器如 Beckman FX 或 Cybio Cybi-well 也应用于将酶溶液从工作原液微板转移到分析微平板,以立刻启动整个微平板。试剂和溶液:52.6mM MES/NaOH, 2.6mM CaCl_2 , pH 6.5-MES 缓冲液

[0260] 将 MES 酸 (10.28g) 和 292mg 无水 CaCl_2 溶解于大约 900mL 的纯化水中。用 NaOH 滴定该溶液至 pH 6.5 (在 25℃或使用温度调节 pH 探针)。使 pH 已调节的缓冲液达到 1L 的总体积。通过 0.22 μm 无菌过滤器过滤最终溶液,并且将其保持在室温。DMF 中 48mM Abz-AGLA-Nba-Abz-AGLA-Nba 原液

[0261] 将大约 28mg 的 Abz-AGLA-Nba 置于小的试管中。其被溶于 mL 级的 DMF 中 (体积根据聚集的 Abz-AGLA-Nba 变化),并且旋转数分钟。将溶液避光储存在室温下。50mM MES, 2.5mM CaCl_2 , 5% DMF, 2.4mM Abz-AGLA-Nba pH 6.5- 试样溶液

[0262] 将 1mL Abz-AGLA-Nba 原液加入到 19mL MES 缓冲液并旋转。将溶液避光储存在室温下。50mM MES, 2.5mM CaCl_2 , pH 6.5- 酶稀释缓冲液

[0263] 通过将 5mL 纯化水加入到 95mL MES 缓冲液中产生该缓冲液。50mM MES, 2.5mM CaCl_2 , 5% DMF, pH 6.5- 底物稀释缓冲液

[0264] 将 5mL 纯 DMF 加入到 95mL MES 缓冲液中。该缓冲液被用于确定动力学参数。酶溶液

[0265] 用酶稀释缓冲液稀释酶原液至大约 1ppm(1ug/mL) 的浓度。MULTTTECT®中性蛋白酶(野生型 NprE) 被稀释至 6ppm(6ug/mL) 以下浓度。优选连续稀释。在室温下 1 小时,溶液是稳定的,但是对于更长时期的储存,溶液被保持在冰上。过程

[0266] 首先,制备所有缓冲液、原液和工作溶液。除非另有说明,分析每一酶稀释溶液三次。当没有完全满时,酶工作溶液原液微板被排列成从平板左边开始的完全垂直的列(为了适应平板读数器)。相似地放置相应的分析平板。如前所述,放置微平板分光荧光计。

[0267] 首先,将 200uL 等分试样溶液置于 96-孔微平板的孔中。在温度控制的微平板混合器中、25℃下,避光温育该平板 10 分钟。通过将 10uL 的工作酶溶液从原液微平板转移到混合器中的分析微平板,开始分析。最理想地,应用 96-孔移液管头(pipetting head),或者使用 8-孔多路移液管,首先转移最左边的列。强力混合溶液 15 秒(Eppendorf 热混合器中 900rpm)。立刻,将分析微平板转移到微平板分光荧光计,并且开始在 350nm 激发和 415nm 发射下记录荧光测量。对于每一孔根据线性回归线,分光荧光计软件计算毫 RFU/min 的荧光增加的反应速率。在一些实验中,当第一块平板被读数时,将第二块平板置于微平板混合器中以便温度平衡。

[0268] 对于达 0.3mM 产物的产物浓度(即释放的 2-氨基苯甲酰基荧光),比率初始速度是线性的,这相应于开始 2.3mM 的 Abz-AGLA-Nba 的溶液中大约 50,000RFU,背景荧光大约 22,000RFU。将 Abz-AGLA-Nba 溶解于 DMF 中,并且在制备的当日使用。洗涤剂组合物:

[0269] 在示例性的洗涤剂组合物中,酶水平用总组合物重量中含有的纯酶量表达,除非另外指出,洗涤剂成分基于总组合物的重量来表达。其中,缩写的成分标识(abbreviated component identifications)具有下述含义:

缩写	成分
LAS:	线型 C ₁₁₋₁₃ 烷基苯磺酸钠。
NaC16-17HSAS :	C ₁₆₋₁₇ 高度可溶的烷基硫酸钠。
TAS:	牛脂烷基硫酸钠。
CxyAS:	C _{1x} -C _{1y} 烷基硫酸钠。
CxyEz:	C _{1x} -C _{1y} 主要为线性的伯醇, 与平均为 z 摩尔的环氧乙烷缩合。
CxyAEzS:	C _{1x} -C _{1y} 烷基硫酸钠, 与平均为 z 摩尔的环氧乙烷缩合。 实施例中增加分子名称。
非离子:	混合的乙氧基化/丙氧基化脂肪醇, 例如 Plurafac LF404, 为平均乙氧基化程度为 3.8 和平均丙氧基化程度为 4.5 的醇。
QAS:	R ₂ .N+(CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH), R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄ 。
硅酸盐:	无定型的硅酸钠(SiO ₂ : Na ₂ O 比=1.6-3.2:1)。
正硅酸盐:	正硅酸钠(SiO ₂ : Na ₂ O 比= 1.0)。
A 型沸石:	水合硅铝酸盐, 分子式为 Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ ·27H ₂ O
SKS-6:	结晶分层硅酸盐, 分子式为 δ-Na ₂ Si ₂ O ₅ 。
硫酸盐:	无水硫酸钠。
STPP:	三聚磷酸钠。
MA/AA:	4: 1 丙烯酸酯/马来酸酯的无规共聚物, 平均分子量约 70,000-80,000。
AA:	聚丙烯酸钠聚合物, 平均分子量 4,500。
聚羧酸酯:	包括羧化单体诸如丙烯酸酯、马来酸酯和甲基丙烯酸酯的混合物的共聚物, MW 在 2,000-80,000 范围内,

	诸如通过商业渠道购自 BASF 的 Sokolan, 为丙烯酸的共聚物, MW 4,500。
BB1:	3-(3,4-二氢异喹啉鎓)丙烷硫酸酯。
BB2:	1-(3,4-二氢异喹啉鎓)-癸烷-2-硫酸酯。
PB1:	过硼酸钠一水合物。
PB4:	过硼酸钠四水合物, 名义分子式 $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。
过碳酸盐:	过碳酸钠, 名义分子式 $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$ 。
TAED:	四乙酰乙二胺。
NOBS:	钠盐形式的壬酰氧杂苯磺酸盐(Nonanoyloxybenzene sulfonate)。
DTPA:	二亚乙基三胺五乙酸。
HEDP:	1,1-羟乙烷二膦酸(hydroxyethane diphosphonic acid)。
DETPMP:	二乙三胺五(亚甲基)膦酸盐, 由 Monsanto 以商品名 Dequest 2060 出售。
EDDS:	乙二胺-N,N'-二琥珀酸, 其钠盐形式的(S,S)异构体。
二胺:	二甲基氨基丙胺; 1,6-hexane diamine (1,6-己二胺); 1,3-丙二胺; 2-甲基-1,5-戊二胺; 1,3-戊二胺; 1-甲基-二氨基丙烷。
DETBCHD:	5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂二环[6,6,2]十六烷, 二氯化物, Mn(II)盐。
PAAC:	五胺醋酸钴(III)盐。
石蜡:	石蜡油, 由 Wintershall 以商品名 Winog 70 出售。
石蜡烃磺酸盐:	石蜡油或石蜡, 其中一些氢原子已被磺酸基团取代。
醛糖氧化酶:	氧化酶, 由 Novozymes A/S 以商品名 Aldose Oxidase 出售。
半乳糖氧化酶:	来自 Sigma 的半乳糖氧化酶。
nprE:	在枯草芽胞杆菌表达的重组形式的中性金属蛋白酶。
PMN:	从解淀粉芽胞杆菌纯化的中性金属蛋白酶。
淀粉酶:	淀粉水解酶, 由 Genencor 以描述于 WO 94/18314、WO 96/05295 中的商品名 PURAFECT® Ox 出售; Natalase®、Termamyl®、Fungamyl®和 Duramyl®, 都来自 Novozymes A/S。
脂肪酶:	脂水解酶, 由 Novozymes A/S 以商品名 Lipolase®、Lipolase® Ultra 出售, 和 Gist-Brocades 出售的 Lipomax™。

纤维素酶:	纤维素水解酶, 由 Novozymes A/S 以商品名 Carezyme、Celluzyme 和/或 Endolase 出售。
果胶裂解酶:	来自 Novozymes A/S 的 Pectaway®和 Pectawash®。
PVP:	聚乙烯吡咯烷酮, 平均分子量为 60,000。
PVNO:	聚乙烯吡啶-N-氧化物, 平均分子量为 50,000。
PVPVI:	乙烯咪唑和乙烯吡咯烷酮的共聚物, 平均分子量为 20,000
增亮剂 1:	4,4'-二(2-磺基苯乙烯基)联苯基二钠 (Disodium 4,4'-bis(2-sulphostyryl) biphenyl)。
有机硅消泡剂:	聚二甲基硅氧烷泡沫控制剂(foam controller), 用硅氧烷-氧化烯共聚物作为分散剂, 所述泡沫控制剂与所述分散剂的比率是 10:1 至 100:1。
泡沫抑制剂:	12%硅氧烷/硅石、18%十八烷醇、70%淀粉, 粒状。
SRP 1:	阴离子封端的聚酯(Anionically end capped poly ester)
PEG X:	聚乙二醇, 分子量为 x。
PVP K60®:	乙烯吡咯烷酮均聚物(平均 MW 160,000)。
Jeffamine®ED-2001:	来自 Huntsman 的封端聚乙二醇。
Isachem®AS:	来自 Enichem 的支链醇烷基硫酸酯。
MME PEG (2000):	来自 Fluka Chemie AG 的单甲基醚聚乙二醇(MW 2000)
DC3225C:	有机硅泡沫抑制剂, Dow Corning 的有机硅油和硅石的混合物。
TEPAE:	四亚乙基戊胺乙氧基化物。
BTA:	苯并三唑。
甜菜碱:	$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ 。
糖:	工业级 D-葡萄糖或食品级糖。
CFAA:	C ₁₂ -C ₁₄ 烷基 N-甲基葡糖酰胺(glucamide)。
TPKFA:	C ₁₂ -C ₁₄ 拔顶全切脂肪酸(topped whole cut fatty acids)。
粘土:	水合硅酸铝, 通式 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 。类型: 高岭土、蒙脱石、绿坡缕石、伊利石、膨润土、多水高岭土。
pH:	在 20°C, 作为蒸馏水中的 1%溶液所测量。

实施例 1 从解淀粉芽胞杆菌克隆中性金属蛋白酶基因

[0270] 在该实施例中, 描述了用于克隆解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶基因的方法。使用本领域良好确立的方法从解淀粉芽胞杆菌克隆该编码中性金属蛋白酶的基因。非免选(non-exempt)(即菌株携带非遗传 DNA(除在免选菌株中允许的氯霉素选择标记之外), 特别是质粒 pJM102 序列)菌株 BC91504(BG3594::comK 中 aprE/nprE-pJM102) 携带枯草芽胞杆菌 aprE 启动子和在整合质粒 pJM102 中与解淀粉芽胞杆菌 nprE 前肽 / 成熟基因融合的

信号序列。

[0271] 枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的下列两个序列 (SEQ ID NO :1 和 SEQ IDNO :2) 通过与相应于下划线序列的寡核苷酸引物进行 PCR 而产生。

[0272] 枯草芽胞杆菌染色体 EcoRI 限制性位点 (GAATTC) 和 aprE 起始密码子 (GTG) 和解淀粉芽胞杆菌 nprE 终止密码子在下方的序列中以黑体类型表述, 并且合成引入的 HindIII 限制性位点 (AAGCTT) 被设计到引物 #4 中。

[0273] 解淀粉芽胞杆菌 aprE 5' 上游序列、启动子和信号序列编码区在下方的序列 (SEQ ID NO :1) 中显示。引物 1 (apr-f ;GAGCTGGGTAAAGCCTATGAAT ;SEQ IDNO :5) 在序列的起点以下划线表示, 而引物 2 和 3 (npr-f 和 npr-r ;GTTCAAGCAACATGTCTGCGCAGGCT ;SEQ ID NO :6) 的 aprE 部分在序列的结尾以双下划线表示。

GAGCTGGGTAAAGCCTATGAAT**TTCTCCATTTTCTTCTGCTATCAAAATAACAGACTCG**
TGATTTTCCAAACGAGCTTTCAAAAAAGCCTCTGCCCTTGCAAATCGGATGCCTGT
CTATAAAATCCCGATATTGGTTAAACAGCGGCGCAATGGCGGCCGCATCTGATGTCT
TTGCTTGGCGAATGTTTCATCTTATTTCTTCTCCCTCTCAATAATTTTTTCATTCTATCC
CTTTTCTGTAAAGTTTATTTTTCAGAATACTTTTATCATCATGCTTTGAAAAATATCAC
GATAATATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGA
CAGGAATTTGCCGGGACTCAGGAGCATTTAACCTAAAAAAGCATGACATTTTCAGCAT
AATGAACATTTACTCATGTCTATTTTCGTTCTTTTCTGTATGAAAATAGTTATTTTCGAGT
CTCTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACCTAAATAGAGATAAAATCATCTCAAAAAA
ATGGGTCTACTAAAATATTATTCCATCTATTACAATAAATTCACAGAATAGTCTTTTAAG
TAAGTCTACTCTGAATTTTTTTTAAAGGAGAGGGTAAAGAG**TGAGAAGCAAAAAAT**
TGTGGATCAGCTTGTTGTTTTCGTTAACGTTAATCTTTACGATGGC**GTTCAAGCAACAT**
GTCTGCGCAGGCT (SEQ ID NO:1)

[0274] 解淀粉芽胞杆菌前肽序列和编码成熟 nprE 的序列以及转录终止子在下方的序列中提供。在该序列中, 引物 2 和 3 的 nprE 部分被下划线表示 (GCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTG ;SEQ ID NO :7), 而引物 4 的 npr-r 部分 (GGCTTACCAT GATCATATATGTCAAGCTTGGGGG ;SEQ ID NO :8) 被双下划线表示。

GCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTGACGAATTTTGTACCGAAGCATTCTTTG
GTGCAATCAGAATTGCCTTCTGTCAGTGACAAAGCTATCAAGCAATACTTGAAACAA
AACGGCAAAGTCTTTAAAGGCAATCCTTCTGAAAGATTGAAGCTGATTGACCAAAC
GACCGATGATCTCGGCTACAAGCACTTCCGTTATGTGCCTGTCGTAAACGGTGTGCCT
GTGAAAGACTCTCAAGTCATTATTCACGTCGATAAATCCAACAACGTCTATGCGATTA
ACGGTGAATTAAACAACGATGTTTCCGCCAAAACGGCAAACAGCAAAAAATTATCT
GCAAATCAGGCGCTGGATCATGCTTATAAAGCGATCGGCAAATCACCTGAAGCCGTT
TCTAACGGAACCGTTGCAAACAAAAACAAAGCCGAGCTGAAAGCAGCAGCCACAA
AAGACGGCAAATACCGCCTCGCCTATGATGTAACCATCCGCTACATCGAACCGGAAC
CTGCAAACCTGGGAAGTAACCGTTGATGCGGAAACAGGAAAAATCCTGAAAAAGCA
AAACAAAGTGGAGCATGCCGCCACAACCGGAACAGGTACGACTCTTAAAGGAAAA
ACGGTCTCATTAATATTTCTTCTGAAAGCGGCAAATATGTGCTGCGCGATCTTTCTA
AACCTACCGGAACACAAATTATTACGTACGATCTGCAAACCGCGAGTATAACCTGC
CGGGCACACTCGTATCCAGCACCAAAACCAGTTTACAACCTTCTTCTCAGCGCGCTG
CCGTTGATGCGCATTACAACCTCGGCAAAGTGTATGATTATTTCTATCAGAAGTTTAAT
CGCAACAGCTACGACAATAAAGGCGGCAAGATCGTATCCTCCGTTCAATACGGGCAGC
AGATACAATAACGCAGCCTGGATCGGCGACCAAATGATTTACGGTGACGGCGACGGT
TCATTCTTCTCACCTCTTCCGGTTCAATGGACGTAACCGCTCATGAAATGACACATG
GCGTTACACAGGAAACAGCCAACCTGAACTACGAAAATCAGCCGGGCGCTTTAAAC
GAATCCTTCTCTGATGTATTCGGGTACTTCAACGATACTGAGGACTGGGATATCGGTG
AAGATATTACGGTCAGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCTTATCCAATCCGACAAAATACG
GACAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGAACACTGATGCCGGCGACT
ACGGCGGCGTGCATACAAACAGCGGAATCCCGAACAAGCCGCTTACAATACGATTA
CAAAAATCGGCGTGAACAAAGCGGAGCAGATTTACTATCGTGCTCTGACGGTATACC
TCACTCCGTCATCAACTTTTAAAGATGCAAAAGCCGCTTTGATTCAATCTGCGCGGG
ACCTTTACGGCTCTCAAGATGCTGCAAGCGTAGAAGCTGCCTGGAATGCAGTCGGAT
TGTAACAAGAAAAGAGACCGGAAATCCGGTCTCTTTTTTATATCTAAAAACATTC
ACAGTGGCTTCACCATGATCATATATGTCAAGCTTGGGGGG (SEQ ID NO:2)。

[0275] 全长 NprE 的氨基酸序列 (前 -、原 -(pre-, pro-) 和成熟序列) 在下面提供：
MGLGKKLSVAVAASFMSLTISLPGVQAAENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPVSDKAIAK
QYLKQNGKVKGNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFRYVPVNVGPVKDSQVHHVDKSNV
YAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNKAELKAAA
TKDGKYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVD AETGKILKKQNKVEHAATTGTGTTLKGKT
VSLNISSESGKYVLRDL SKPTGTQIITYDLQ NREYNLPGLV SSTTNQFTTSSQRAAVDA
HYNLGKVYDYFYQKFN RNSYDNKGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDGSFF
SPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDTEDWDIGEDIT
VSQPALRSLSNPTKYGPDPNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGIPNKAAYNTITKIGVN
KAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASVEAAWNAVGL (SEQ ID
NO:3)

[0276] 在一些可选的实施方式中, 下列 NprE 序列用于本发明。

VRSKKLWISLLFALTLLIFTMAFSNMSAQAAENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPVSDKA
 IKQYLKQNGKVFKGNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFYVVPVNVGVPVKDSQVHHVDKS
 NNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNKAELK
 AAATKDGKYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVD AETGKILKKQNKVEHAATTGTGTTLK
 GKTVSLNISSESGKYVLRDL SKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTNQFTTSSQRAAV
 DAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDG
 SFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDTEDWDIGE
 DITVSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGIPNKAAYNTITKI
 GVNKAEQIYYRALT VYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASVEAAWNAVGL
 (SEQ ID NO:4)

[0277] 在下面提供在这些 PCR 实验中使用的引物序列：

在 PCR 实验中使用的引物		
引物编号	序列	SEQ ID NO:
1	5'-GAGCTGGGTAAAGCCTATGAAT-3'	SEQ ID NO:5
2	5'-CAGGTTTTCTTTAAGCTGAGGATTCTCAGC- AGCCTGCGCAGACATGTTGCTGAAC-3'	SEQ ID NO:9
3	5'-GTTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCT- GCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTG-3'	SEQ ID NO:10
4	5'-CCCCCAAGCTTGACATATATGATCATGGTGAAGCC-3'	SEQ ID NO:11

[0278] 引物 2 和 3 是彼此的反向互补序列,并且相应于染色体 DNA 的非编码 (#2) 或编码 (#3) 链。对于编码链,它们相应于 aprE 信号序列的最后 25 个碱基对和 nprE 前肽的前 30 个碱基对。引物 #4 与下划线序列反向互补,包括 nprE 终止密码子的 3' 的 24 个碱基对和在引入的 HindIII 位点之前具有 6 个 dCTP 残基的终止子,以提供所谓的“夹 (clamp)”,这允许使用 HindIII 限制性内切核酸酶更有效切割,因为如果限制性内切酶的识别序列恰好位于 DNA 片段的末端,一些限制性内切酶的切割无效。

[0279] 使用下面的方法和试剂 (除了 DNA 模版和寡核苷酸引物),从 Applied Biosystems' 的 rTth DNA 聚合酶 XL 试剂盒产生两个 PCR 片段:40.6 μ l H₂O 30 μ l 3.3x rTth PCR 缓冲液 10 μ l 2mM dNTP 混合物 4.4 μ l 25mM Mg- 乙酸盐 5 μ l 50 μ M 引物 #1 或 #3 (正向引物) 5 μ l 50 μ M 引物 #2 或 #4 (反向引物) 2 μ l 枯草芽胞杆菌或解淀粉芽胞杆菌染色体 DNA 2 μ l rTth 聚合酶 1 μ l Pfu Turbo 聚合酶 总共 100 μ l 反应体积

[0280] 在这些实验中使用的 PCR 条件是 (95 $^{\circ}$ C, 30sec./58 $^{\circ}$ C, 30sec/68 $^{\circ}$ C, 1min.) x30 循环,然后快速冷却到 4 $^{\circ}$ C。在 1.2% 琼脂糖 /TBE 制备型凝胶上进行反应,使用 QIAGEN® 凝胶提取试剂盒 (Gel Extraction Kit) 剪切和纯化适当大小的片段。在第二步的融合中,进行 PCR 反应,其中染色体 DNA 用 1 μ l 两个分离片段中的每一个进行取代,并且仅使用外部引物 #s 1 和 #2。使用如上面描述的相同的 PCR 条件。由于从第一次 PCR 中应用互补引物 2 和 3 得到的两个片段上形成的互补端,该两个片段精确融合。

[0281] 用 EcoRI 和 HindIII 消化该融合片段,并且如上所述凝胶纯化。也用 EcoRI 和 HindIII 消化整合质粒 pJM102,然后线型质粒被凝胶纯化并且通过标准技术连接到消化的 apr/npr 融合片段。接下来使用该连接反应直接转化木糖诱导的枯草芽胞杆菌菌株。

[0282] 在纯化后,用源自野生型枯草芽胞杆菌染色体 DNA 的引物 1 和 2 以及源自解淀粉芽胞杆菌菌株的染色体 DNA 的引物 3 和 4,通过 PCR 产生两种片段。该片段又如上述纯化,然后用如在整合质粒 pJM102 同样消化中的 EcoRI 和 HindIII 进行切割,并接下来将融合片段连接到质粒。数种转化体具有融合,从染色体测序以证实不存在任何 PCR- 来源的突变。然后,从 5-25mg/mL 氯霉素——pJM102 选择标记,逐步扩增这些转化体中的一个,以共扩增连接的表达盒。

[0283] 通过在含 5mg/ml 氯霉素 (CMP) 的 LB/ 琼脂板上,选择对 pJM102' s 氯霉素抗性的标记,获得选定序列证实的转化体。然后,在 10mg/ml CMP、37°C 下将其接种入 LB 培养基过夜并伴随 250RPM 摇动。然后用 10mg/ml CMP 将该培养物划线 (接种) 到 LB/ 琼脂板上以分离单一菌落。在 25mg/ml CMP、37°C 下将一个菌落接种入 LB 培养基过夜并伴随 250RPM 摇动。然后用 25mg/ml CMP 将该培养物划线 (接种) 到 LB/ 琼脂板上以分离单一菌落。收集这些菌群并将其储存在 -70°C 甘油中,直到使用,如本领域所知。

[0284] 存在于枯草芽胞杆菌 (aprE 和 nprE) 中的两种非必要蛋白酶以及淀粉酶的缺失,在金属蛋白酶产生过程中减少了总细胞外蛋白酶水平。将编码中性金属蛋白酶的 DNA 克隆到淀粉酶缺失的宿主中。用于感受态形成 (competence development) 的可诱导 comK 被插入到淀粉酶位置的中间,使得菌株是“amy⁻ (淀粉酶的)”。通过将编码信号序列的核苷酸插入到基因的编码序列之前,确保表达蛋白的分泌。实施例 2 纯化的 MULTIFECT® 中性和重组中性金属蛋白酶 (nprE) 的表达和发酵

[0285] 如实施例 1 描述产生的重组枯草芽胞杆菌通过传统的批式发酵在营养培养基中进行培养,如下所述。含有解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的枯草芽胞杆菌培养物的一甘油小瓶 (如按实施例 1 中描述制备) 被用来接种 600ml 含有 200mg/L 氯霉素的 SBG1% 培养基。在 37°C 下,生长该培养物 48 小时,然后,通过 12,000rpm 的离心回收该培养物流体,如在本领域已知的。该过程重复进行。得到的最终酶浓度在大约 1.4 和 2g/L 的范围内。实施例 3 中性金属蛋白酶的纯化和表征

[0286] 该实施例描述了用于纯化实施例 2 描述的生物体表达的中性金属蛋白酶的方法。在 37°C 下温育 36 小时后,回收发酵培养基,并且在 12000rpm (SORV ALL® 离心机 RC5B 型) 下离心。从培养物流体分离分泌的中性金属蛋白酶,并且使用具有 BES (聚醚砜) 10KDa 截流 (cutoff) 的 Amicon 过滤器系统 8400 浓缩大约 10 倍。

[0287] 浓缩的上清液在 4°C 下相对于含有 10mM NaCl、pH 5.4 的 25mM MES 缓冲液透析整夜。然后,将透析液加载到阳离子交换柱 Porous HS20 (总体积 ~ 83mL; 结合量 ~ 4.5g 蛋白质 /mL 柱; Waters), 如下所述。用含有 10mM NaCl、pH 5.4 的 25mM MES 缓冲液预平衡该柱。然后,将大约 200-300mL 样品加载到该柱上。使用 5.4 到 6.2 的 pH 梯度,通过 10 柱体积的 MES 缓冲液洗脱结合的蛋白质。蛋白洗脱液在 pH 5.82 和 6.0 之间,并且使用本文所述的蛋白水解活性和 10% (w/v) NUPAGE® SDS-PAGE (Novex) 对其进行评估。然后聚集含有中性蛋白酶的部分。在将 pH 调节到 5.8 之前,钙和锌的氯化物盐以 3 : 1 的比率加入。使用 Perceptive Biosystems BIOCAD® Vision (GMI) 进行蛋白质纯化。

[0288] 使用 10% (w/v) NUPAGE® SDS-PAGE 评估的纯化蛋白质被确定为同源的,并具有 95% 以上的纯度。典型地,当使用标准蛋白酶分析法、用小底物 suc-p-AAPF-pNA (N-琥珀酰-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-硝基苯胺) (Sigma) 时,1% 以下的纯化制品表现出丝氨

酸蛋白酶活性。在微量滴定平板形式(96孔)中,使用含有10mM CaCl_2 和0.005% TWEEN®-80的100mM、pH 8.5的Tris-HCl缓冲液,实施该分析。通过使160mM原液溶于DMSO(二甲基亚砜)(100mg/ml)和用含有 CaCl_2 和0.005% TWEEN®-80的Tris-HCl缓冲液将该原液稀释100倍,制备该底物(p-AAPF NA)。然后,将10 μL 稀释的蛋白酶溶液(使用含有10mM CaCl_2 和0.005% TWEEN®-80的100mM、pH 8.5的Tris-HCl缓冲液制备稀释物)加入到190 μL 11mg/ml p-AAPF 溶液中。混合该试样5分钟,并且在2到5分钟内读取410nm下的动力学变化。测量反应的斜率,并且将其用作丝氨酸蛋白酶活性的量的表示。使用含有1mM氯化锌、4mM氯化钙和40%丙二醇的25mM、pH 5.8的MES缓冲液配制该蛋白以便储存。实施例4纯化的MULTIFECT®中性金属蛋白酶(PMN)对钙和锌阳离子的亲和力

[0289] 在该实施例中,描述确定按上述实施例所述制备的中性金属蛋白酶(PMN)的亲合力的方法。使用分别从Molecular Probes获得的荧光指示剂Fluo-3和FluoZin-3,实施PMN对钙和锌阳离子的亲和力。所有的荧光测量被记录在LS50B发光分光光度计(Perkin-Elmer)上。通过在500nm的激发,监控Fluo-3的结合,并且记录505到550nm的发射光谱。相似地,通过在495nm的激发,监控FluoZin-3的结合,并且收集500到550nm的发射光谱。激发和发射缝宽都被设定为2.5nm。

[0290] 在这些测定中,用增加量的相关指示剂滴定pH 8.4的50mM Tris-HCl缓冲液中的100 μM 中性金属蛋白酶。在图1中示出滴定曲线。在该图中,三角表示使用FluoZin-3染料在516nm下监控的对于 Zn^{2+} 得到的曲线结合数据,而圆圈表示使用Fluo-3染料在522nm下监控的对于 Ca^{2+} 得到的数据。测定锌和钙(假设单一结合位点)的结合常数(K_a' s)分别为0.401nM和0.037nM。这些结果表明,纯化的MULTIFECT®中性金属蛋白酶结合锌离子的亲和力比钙离子大约10倍。基于钙的较弱结合,设计初始蛋白质工程学实验,以包括或者(i)设计更紧密的钙结合位点(一个或多个)和/或消除钙的结构稳定性需要(例如为了稳定蛋白质至80%以上)。实施例5储存稳定性

[0291] 在该实施例中,描述评估在枯草芽胞杆菌中表达的PMN和重组解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶储存稳定性所进行的实验。在存在增加的LAS(十二烷基硫酸钠;Sigma)溶液(0%上至包含10%)的情况下,评估这些中性金属蛋白酶制剂的蛋白水解。使用10%(w/v)NUPAGE® SDS-PAGE,观察从纯化MULTIFECT®中性金属蛋白酶(PMN)产生的蛋白水解片段。

[0292] 在单独的缓冲液(50mM Tris-HCl缓冲液,pH 8.4)中和在存在得自Procter & Gamble的洗涤剂基本成分的情况下,测定如上所述产生的在枯草芽胞杆菌中表达的重组解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶的储存稳定性。缓冲液和/或洗涤剂基本成分含有锌离子、钙离子或它们的组合。锌离子和钙离子的浓度都在0到25mM变化。这些结果总是与在单独的缓冲液中温育的中性金属蛋白酶的结果进行比较。蛋白酶分析偶氮-酪蛋白分析:

[0293] 偶氮-酪蛋白终点分析(azo-casein endpoint assay)被用来评估在某些条件下发生的蛋白水解的量。在这些分析中,75 μL 的酶与被加入到250 μL 的1%(w/v)偶氮-酪蛋白(Sigma)的过量钙或锌离子或者这两种离子一起温育。在30°C下,进行该反应15分钟,然后加入10%(w/v)三氯乙酸以停止该反应。通过在14000rpm下离心10分钟,除去沉淀的蛋白质和未反应的偶氮-酪蛋白。通过加入750 μL 1M氢氧化钠,显现偶氮基团的颜色。该颜色显现进行5分钟,然后,停止反应并且测量440nm下的吸光度。琥珀酰化酪蛋白

和 TNBSA 分析:

[0294] 使用 QuantiCleave Protease Assay Kit™(Pierce) 测定中性金属蛋白酶的活性。该分析基于酶消化琥珀酰化酪蛋白。然后,形成的伯氨基与三硝基苯磺酸 (TNBSA) 反应,并且形成在 450nm 具有最大吸光度的有颜色的络合物。在 96-孔微量滴定板形式中实施该分析。该分析需要与琥珀酰化酪蛋白温育 15 分钟,并且与 TNBSA 反应 15 分钟。在两次温育中,将样品置于摇床。TPCK-胰蛋白酶 (Pierce) 是用于总蛋白酶活性测定的通常标准。然而,具体蛋白酶活性的最佳条件需要应用目的蛋白酶。在这些实验中实施分析的情况下,胰蛋白酶和目的蛋白酶都被使用,以便校准分析。分析的精确性要求由 0.5mg/mL 胰蛋白酶制成的标准稀释物总是产生 0.5 以下的吸光值(在 450nm)。

[0295] 相对于不含酪蛋白的对照,测量每一样品。报告的吸光度变化 ($\Delta \text{Abs}(450\text{nm})$) 说明了酪蛋白的氨基干扰。此外,缓冲液和 / 或洗涤剂的其它成分中的伯氨基可能的干扰也以这种方式修正。在相同的时间长度和在相同的温度下,相对于没有加入中性金属蛋白酶的洗涤剂,以及对于温育在随同试剂盒提供的 BupH™ 硼酸盐缓冲液中的酶,检测所有样品的活性。

[0296] 该检测是终点分析,其中 pH 8.5 的 50mM 硼酸盐缓冲液在 32℃ 下应用。蛋白酶分析一般实施两次。尽管在一些实验中稀释也为 1 : 500 或 1 : 200,但是在大多数测定稳定性量的实验中,使用上述的缓冲液按 1 : 1000 稀释蛋白质和洗涤剂,以便得到空白的吸光度在 0.5 以下的读数。在这些实验中使用的微量滴定分光光度计是 SpectraMax250® (Molecular Devices),并且所有分析在培养基蛋白结合的 96 孔平板 (Corning) 中进行。

[0297] 在这些分析中得到的标准蛋白样品(例如胰蛋白酶和纯化的金属蛋白酶)的结果表明,存在非线性反应(仅在窄的分析范围内,线性数值范围可能是合适的)。因此,将曲线拟合为二次函数,其中 $f = y_0 + ax^2 + bx$; f 是对 y 的拟合 (SigmaPlot® v. 9 ;SPSS, Inc.)。因此,如果使用线性方程对蛋白质的数量定量,那么得到不精确的数据;发现需要二次方程以便得到精确的结果。注意,制造商 (Pierce) 的试剂盒插入物表明,可用为对数标度的 " x " 拟合该结果。实施例 6pH 和 LAS 对中性金属蛋白酶活性的影响

[0298] 也确定对于 0.36mg/mL 配制的 nprE 的活性的最适 pH。在该研究中调查的缓冲液是 pH 范围在 3.5-5.5 的 50mM 乙酸钠 ($pK_a = 4.76$)、pH 范围在 5.5 到 7.0 的 50mM MES 缓冲液 ($pK_a = 6.10$) 和 pH 8.4 的 50mM Tris-HCl 缓冲液。配制的 nprE 的最适 pH 被确定为在 5.5 和 6.0 之间。

[0299] 通过在 0 到 1% (w/v) LAS 中温育,研究洗涤剂成分 LAS 对 0.36mg/ml 配制的 nprE 活性的影响。在图 2 提供的图表中示出该结果。如这些结果所表明的,蛋白酶明显被洗涤剂成分失活,从而必须一种手段来稳定蛋白酶以对抗这种有害影响。

[0300] 在一些实验中,使用 Procter & Gamble 提供的、称为 " TIDE® 2005 " 的高密度液体洗涤剂 (HDL) 组合物。如所提供的,该洗涤剂包含除了本发明的中性金属蛋白酶之外的所有必需成分。作为时间函数的在液体洗涤剂基本成分中的储存稳定性

[0301] 以小型储存方式进行该稳定性检测。使用用 FusionPro™(S-Matrix) 软件设计的矩阵 (matrix),评估待改变的条件和待加入的氯化钙和氯化锌盐的不同浓度。下面的表格总结了被检测的条件以确定解淀粉芽胞杆菌的中性金属蛋白酶的长期储存稳定性。

表 6 长期储存检测条件

条件	[CaCl ₂] (mM)	[ZnCl ₂] (mM)
1	15	-
2	7.5	7.5
3	-	15
4	-	-
5	12	3
6	-	-
7	-	15
8	7.5	7.5
9	15	-
10	15	15
11	12	3

[0302] 每一个检测条件的最终体积是 1mL。给予 TIDE® 2005_0 ÷ 36mg 酶 /mL。配制的培养物液体和纯化的重组金属蛋白酶在 32℃ 下 TIDE® 2005 基本成分中温育大约 4 周期间。将洗涤剂中金属蛋白酶的储存稳定性与 pH 5.8 的 50mM MES 缓冲液中的中性金属蛋白酶的稳定性比较。

[0303] 在检测之前,使用分析缓冲液 (pH 8.5 的 50mM 硼酸盐缓冲液) 以 5 : 1000 稀释样品。测定残留活性,并且相对于分析缓冲液中的中性金属蛋白酶进行比较。所有的测量一式两份加以确定。每一样品与适当的空白对照 (即检测的洗涤剂、缓冲液和任何必需的添加剂) 平行检测。然后如 QuantiCleave™ Protease Assay Kit (Pierce) 提供的说明书所述,分析样品。

[0304] 进行了 3-4 周期间的这些稳定性检测的结果在图 22 中示出。TIDE® 2005 中,不存在离子 (即没有加入盐) 时的中性金属蛋白酶快速失去其对酪蛋白的全部蛋白水解 / 水解活性。实际上,确定的是,在 1 小时以内温育后,保留了 20% 以下的活性。与之相反,在含有锌离子 (上至 15mM 并包括 15mM) 的 TIDE® 2005 中温育,在 7 天的时期内稳定蛋白酶和防止蛋白水解。因此,在该制剂中存在锌离子在保持至少 60% 的蛋白酶活性方面起良好的功能。同样地,7.5mM 锌离子浓度产生相似的稳定效果。该浓度的锌离子是非常低的,并且被考虑应用于多种洗涤剂制剂中。在这些实验中,钙离子的包括没有提供附加的效果。而且,加入超过 15mM 和多至 25mM 以及包括 25mM 的钙离子,当加入到 TIDE® 2005 基本成分中时,引起沉淀。尽管本发明不拟限于任何特定机制,但是预期在这些实验中,加入的钙离子缺乏对蛋白酶稳定性的影响是洗涤剂组合物的原因。

[0305] 对于嗜热菌蛋白酶——其表现与解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶具有 55% 的氨基酸序列同一性 (使用 CLUSTAL W, v. 1.82 进行的序列对比),其已明显表示出锌离子对于活性是必须的,而钙离子和钙离子结合位点工程已经表现起稳定作用 (参见,例如 Mansfield. 等, J. Biol. Chem., 272 :11152-11156 [1997] ;和 Van den Berg 等, Biotechnol. Appl. Biochem., 30 :35-40 [1999])。

[0306] 在可选的实施方式中,其它阳离子 (例如 Co²⁺、Mn²⁺和 Fe²⁺) 应用于本发明以稳定解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶。这与现有数据对比,该现有数据已表明这些离子没有一种导致特异性活性的 100% 恢复 (Holmquist. 和 Vallee, J. Biol. Chem., 249 : 4601-4607 [1974])。预期这些离子将通过防止解折叠和接下来的金属蛋白酶的蛋白水解降

解来影响稳定性。然而,本发明不拟限于任何特定的作用机制。实施例 7 在枯草芽胞杆菌中使用 nprE 表达载体 pUBnprE 产生 NprE 蛋白酶

[0307] 在该实施例中,描述了在枯草芽胞杆菌产生 NprE 蛋白酶所进行的实验,具体而言,描述了用于将质粒 pUBnprE 转化入枯草芽胞杆菌的方法。如本领域已知,进行转化(参见例如 WO 02/14490,其被引入本文作为参考)。下面提供的 DNA 序列(源自解淀粉芽胞杆菌的 nprE 前导序列、nprE 前 DNA 序列和 nprE 成熟 DNA 序列)编码 NprE 前体蛋白:

GTGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCTGTTGCTGTCGCCGCTTCCTTTATGAGTTTAACCA
TCAGTCTGCCGGGTGTTTCAGGCCGCTGAGAATCCTCAGCTTAAAGAAAACCTGACG
AATTTTGTACCGAAGCATTCTTTGGTGCAATCAGAATTGCCTTCTGTCAGTGACAAAG
CTATCAAGCAATACTTGAAACAAAACGGCAAAGTCTTTAAAGGCAATCCTTCTGAAA
GATTGAAGCTGATTGACCAAACGACCGATGATCTCGGCTACAAGCACTTCCGTTATG
TGCCTGTCGTAAACGGTGTGCCTGTGAAAGACTCTCAAGTCATTATTCACGTCGATA
AATCCAACAACGTCTATGCGATTAACGGTGAATTAAACAACGATGTTTCCGCCAAAA
CGGCAAACAGCAAAAAATTATCTGCAAATCAGGCGCTGGATCATGCTTATAAAGCGA
TCGGCAAATCACCTGAAGCCGTTTCTAACGGAACCGTTGCAAACAAAAACAAAGCC
GAGCTGAAAGCAGCAGCCACAAAAGACGGCAAATACCGCCTCGCCTATGATGTAAC
CATCCGCTACATCGAACCGBAACCTGCAAACCTGGGAAGTAACCGTTGATGCGGAAA
CAGGAAAAATCCTGAAAAAGCAAAACAAAGTGGAGCATGCCGCCACAACCGGAA
CAGGTACGACTCTTAAAGGAAAAACGGTCTCATTAAATATTTCTTCTGAAAGCG
GCAAATATGTGCTGCGCGATCTTTCTAAACCTACCGGAACACAAATTATTACGTA
CGATCTGCAAAACCGCGAGTATAACCTGCCGGGCACACTCGTATCCAGCACCA
CAAACCAGTTTACAACCTTCTCTCAGCGCGCTGCCGTTGATGCGCATTACAACC
TCGGCAAAGTGTATGATTATTTCTATCAGAAGTTTAATCGCAACAGCTACGACAA
TAAAGGCGGCAAGATCGTATCCTCCGTTTCATTACGGCAGCAGATACAATAACGC
AGCCTGGATCGGCGACCAAATGATTTACGGTGACGGCGACGGTTTCATTCTTCT
CACCTCTTTCCGGTTCAATGGACGTAACCGCTCATGAAATGACACATGGCGTTA
CACAGGAAACAGCCAACCTGAACTACGAAAATCAGCCGGGCGCTTTAAACGAA
TCCTTCTCTGATGTATTCGGGTACTTCAACGATACTGAGGACTGGGATATCGGT
GAAGATATTACGGTCAGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCTTATCCAATCCGACAAAA
TACGGACAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGAACACTGATGCC
GGCGACTACGGCGGCGTGCATACAAACAGCGGAATCCCGAACAAAGCCGCTTA
CAATACGATTACAAAAATCGGCGTGAACAAAGCGGAGCAGATTTACTATCGTGC
TCTGACGGTATACCTCACTCCGTCATCAACTTTTAAAGATGCAAAAGCCGCTTT
GATTCAATCTGCGCGGGACCTTTACGGCTCTCAAGATGCTGCAAGCGTAGAAG
CTGCCTGGAATGCAGTCGGATTGTAA (SEQ ID NO:12)

[0308] 在上述序列中,黑体表示编码成熟 NprE 蛋白酶的 DNA,标准字体表示前导序列(nprE 前导序列),下划线表示前序列(nprE 前序列)。下面提供的氨基酸序列(NprE 前导序列、NprE 前和 NprE 成熟 DNA 序列)(SEQ ID NO:13)编码 NprE 前体蛋白。在该序列中,下划线表示前序列,黑体表示成熟 NprE 蛋白酶。SEQ ID NO:17 提供了与成熟 NprE 序列分离的 NprE 前序列,SEQ ID NO:18 提供了成熟 NprE 序列。该序列被用作制造本文描述的变体文库的基础。

MGLGKKLSVAVAASFMSLTISLPGVQAAENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPSVSDKA
IKQYLKQNGKVFKGNPSERLKLIDQTTDDLGYKHFYVPVNVGVPVKDSQVIIHVDKSNN
VYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNKAELKAA
ATKDGKYRLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVDAETGKILKKQNKVEHAATTGTGTTLKG
KTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTTNQFTTSSQRA
AVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYG
DGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDT
EDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGIPN
KAAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASVE
AAWNAVGL (SEQ ID NO:13)

AENPQLKENLTNFVPKHSLVQSELPSVSDKAIKQYLKQNGKVFKGNPSERLKLIDQTTD
 DLGYKHFYVPVNVGVPVKDSQVIIHVDKSNNVYAINGELNNDVSAKTANSKKLSANQ
 ALDHAYKAIGKSPEAVSNGTVANKNKAELKAAATKDGKYRLAYDVTIRYIEPEPANWE
 VTVDAETGKILKKQNKVEH (SEQ ID NO:17)

AATTGTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSSTT
 NQFTTSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNAAWI
 GDQMIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGY
 FNDTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGIP
 NKAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASVEA
 AWWNAVGL (SEQ ID NO:18)

[0309] 使用下列两种特异性引物,通过 PCR 从解淀粉芽胞杆菌的染色体 DNA 扩增 nprE 基因,构建 pUBnprE 表达载体:Oligo AB1740:CTGCAGGAATTCAGATCTTAACATTTTTCCCCTATCATTTTCCCG (SEQ IDNO:19)Oligo AB1741:GGATCCAAGCTTCCCGGAAAAGACATATATGATCATGGTGAAGC (SEQ IDNO:20)。

[0310] 使用 Phusion High Fidelity DNA 聚合酶 (Finnzymes),在热循环仪上实施 PCR。该 PCR 混合物含有 10 μ l 5x 缓冲液 (Finnzymes Phusion),1 μ l 10mM dNTP's,1.5 μ l DMSO,1 μ l 的每一种引物,1 μ l Finnzymes Phusion DNA 聚合酶,1 μ l 50ng/ μ l 的染色体 DNA 溶液,34.5 μ l MilliQ 水。使用下列方案:PCR 方案:1)30sec 98°C;2)10sec 98°C;3)20sec 55°C;4)1min 72°C;5)第 2 步到第 4 步 25 个循环;和 6)5min 72°C。

[0311] 这产生使用 BglIII 和 BclI DNA 限制性酶消化的 1.9kb DNA 片段。使用 BamHI 消化多拷贝芽胞杆菌载体 pUB110 (参见例如 Gryczan, J. Bacteriol., 134:318-329[1978])。然后,在 pUB110x BamHI 载体中连接 PCR 片段 x BglIII x BclI 以形成 pUBnprE 表达载体 (参见图 14)。

[0312] 将 pUBnprE 转化到枯草芽胞杆菌 (Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIE, degUHy32, Δ amyE:: (xylR,pxylA-comK) 菌株。按照 WO 02/14490 中描述,进行转化到枯草芽胞杆菌,其被引入本文作为参考。在含有 25ml MBD 培养基 (基于 MOPS 的确定成分培养基)、20mg/L 新霉素的摇动烧瓶中,进行选择性生长容纳有 pUBnprE 载体的枯草芽胞杆菌转化体。基本上按照本领域已知的方法 (参见 Neidhardt 等, J. Bacteriol., 119:736-747[1974]) 制

备 MBD 培养基,除了 NH_4Cl_2 、 FeSO_4 和 CaCl_2 从基础培养基 (base medium) 中省去,使用 3mM K_2HPO_4 并对该基础培养基补充 60mM 尿素、75g/L 葡萄糖和 1% 大豆胨 (soytone)。同样,微量营养素被制成为 100X 原液,其在 1 升中含有 400mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、50mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、10ml 的 1M CaCl_2 和 10ml 的 0.5M 柠檬酸钠。在 37℃ 下,在培养箱 / 摇床 (Infors) 中,温育该培养物 3 天。该培养物导致具有按蛋白酶分析所显示的水解活性的分泌型 NprE 蛋白酶的产生。使用 NuPage Novex 10% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen, 目录编号 NP0301BOX), 实施凝胶分析。为了制备用于分析的样品,将 2 体积上清液与 1 体积 1M HCl、1 体积 4xLDS 样品缓冲液 (Invitrogen, 目录编号 NP0007) 和 1% PMSF (20mg/ml) 一起混合,接下来将其在 70℃ 下加热 10 分钟。然后,将 25 μL 的每一样品和 10 μL 的 SeeBlueplus 2 预先染色蛋白质标准品 (Invitrogen, 目录编号 LC5925) 一起加载到凝胶上。结果清楚表明,在该实施例中描述的 nprE 克隆方法得到枯草芽胞杆菌产生的活性 NprE。实施例 8nprE 位点评估文库 (Site Evaluation Libraries) (SELS) 的产生

[0313] 在该实施例中,描述了在构建 nprE SELs 中使用的方法。包括上面描述的 nprE 表达盒的 pUBnprE 载体被用作模板 DNA。该载体含有独特的 BglIII 限制性位点,其被用于位点评估文库构建中。

[0314] 在 Invitrogen 合成的 pUBnprE 表达载体、引物 (脱盐的, 50nmol 水平) 被用于产生文库。引物的序列在表 8-1 中提供。

[0315] 为了构建 nprE 位点评估文库,实施 3 个 PCR 反应,包括两个诱变 PCR,以将突变的目的密码子引入成熟 nprE DNA 序列和使用第三个 PCR 融合该两个诱变 PCRs,以便构建 pUBnprE 表达载体,其在成熟 nprE 序列中包括期望的突变密码子。

[0316] 诱变的方法基于密码子特异性突变方法,其中使用正向和反向寡核苷酸引物在特异性 DNA 三联体中同时产生所有可能的突变,所述寡核苷酸引物具有 25 到 45 核苷酸长度,其包含特异性设计的三联 DNA 序列 NNS((A、C、T 或 G)、(A、C、T 或 G)、(C 或 G))——相应于待被突变的密码子序列,并且在特异性 nprE 成熟密码子处随机引入核苷酸。在引物名称 (参见表 8-1) 中列出的数字与特异性 nprE 成熟密码子位置相对应。

[0317] 用于构建位点评估文库的两种另外的引物包括 BglIII 限制性位点和一部分位于 BglIII 限制性位点两侧的 pUBnprE DNA 序列。Invitrogen 制造了这些引物 (50 纳摩尔水平, 脱盐的), 并将其在表 8-1 中列出。

表 8-1 引物序列

引物名称	引物序列和 SEQ ID NO:
pUB-BglII-FW	GTCAAGTCAGATCTTCCTTCAGGTTATGACC (SEQ ID NO:21)
pUB-BglII-RV	GTCTCGAAGATCTGATTGCTTAACTGCTTC (SEQ ID NO:22)
特异性nprE正向诱变引物	
nprE4F	GTGGAGCATGCCGCCACANNSGGAACAGGTACGACTCTTAA (SEQ ID NO:23)
nprE12F	CAGGTACGACTCTTAAANNSAAAACGGTCTCATTAATAT (SEQ ID NO:24)
nprE13F	GTACGACTCTTAAAGGANNSACGGTCTCATTAATATTTC (SEQ ID NO:25)
nprE14F	CGACTCTTAAAGGAAAANNSGTCTCATTAATATTTC (SEQ ID NO:26)
nprE23F	CATTAAATATTTCTTCTGAANNSGGCAAATATGTGCTGCG (SEQ ID NO:27)
nprE24F	TAAATATTTCTTCTGAAAGCNNSAAATATGTGCTGCGCGATC (SEQ ID NO:28)
nprE33F	GTGCTGCGCGATCTTTCTNNSCCTACCGGAACACAAATTAT (SEQ ID NO:29)
nprE45F	AAATTATTACGTACGATCTGNNSAACCGCGAGTATAACCTG (SEQ ID NO:30)
nprE46F	TTATTACGTACGATCTGCAANNSCGCGAGTATAACCTGCC (SEQ ID NO:31)
nprE47F	CGTACGATCTGCAAAACNNSGAGTATAACCTGCCGGG (SEQ ID NO:32)
nprE49F	GATCTGCAAAACCGCGAGNNSAACCTGCCGGGCACACTC (SEQ ID NO:33)

表 8-1 引物序列

引物名称	引物序列和 SEQ ID NO:
nprE50F	CTGCAAACCGCGAGTATNNSCTGCCGGGCACACTCGTATC (SEQ ID NO:34)
nprE54F	GAGTATAACCTGCCGGGCNNSCTCGTATCCAGCACCAC (SEQ ID NO:35)
nprE58F	CGGGCACACTCGTATCCNNSACCACAAACCAGTTTAC (SEQ ID NO:36)
nprE59F	GCACACTCGTATCCAGCNNSACAAACCAGTTTACAAC (SEQ ID NO:37)
nprE60F	CACTCGTATCCAGCACCNNSAACCAGTTTACAAC TTC (SEQ ID NO:38)
nprE65F	CCACAAACCAGTTTACANNSTCTTCTCAGCGCGCTGC (SEQ ID NO:39)
nprE66F	CAAACCAGTTTACAAC TNNSTCTCAGCGCGCTGCCGTTG (SEQ ID NO:40)
nprE87F	GTGTATGATTATTTCTATNNSAAGTTTAATCGCAACAG (SEQ ID NO:41)
nprE90F	ATTATTTCTATCAGAAGTTTNNSCGCAACAGCTACGACAATA A (SEQ ID NO:42)
nprE96F	TTAATCGCAACAGCTACGACNNSAAAGGCGGCAAGATCGTA TC (SEQ ID NO:43)
nprE97F	GCAACAGCTACGACAATNNSGGCGGCAAGATCGTATC (SEQ ID NO:44)
nprE100F	CTACGACAATAAAGGCGGCNNSATCGTATCCTCCGTTTCATTA (SEQ ID NO:45)
nprE186F	GAGGACTGGGATATCGGTNNSGATATTACGGTCAGCCAG (SEQ ID NO:46)
nprE196F	GTCAGCCAGCCGGCTCTCNNSAGCTTATCCAATCCGAC (SEQ ID NO:47)
nprE211F	GACAGCCTGATAATTCNNSAATTACAAAAACCTTCC (SEQ ID NO:48)
nprE214F	GATAATTTCAAAAATTACNNSAACCTTCCGAACACTGATG (SEQ ID NO:49)
nprE228F	GCGACTACGGCGGCGTGNN SACAAACAGCGGAATCCC (SEQ ID NO:50)
nprE280F	CTTTGATTCAATCTGCGNNSGACCTTACGGCTCTCAAG (SEQ ID NO:51)
特异性nprE反向诱变引物	
nprE4R	TTAAGAGTCGTACCTGTTCCSNNTGTGGCGGCATGCTCCAC (SEQ ID NO:52)
nprE12R	ATATTTAATGAGACCGTTTTSNNTTTAAGAGTCGTACCTG (SEQ ID NO:53)
nprE13R	GAAATATTTAATGAGACCGTSNNTCCTTTAAGAGTCGTAC (SEQ ID NO:54)
nprE14R	GAAATATTTAATGAGACSNNTTTTCCTTTAAGAGTCG (SEQ ID NO:55)

表 8-1 引物序列

引物名称	引物序列和 SEQ ID NO:
nprE23R	CGCAGCACATATTTGCCSNNTTCAGAAGAAATATTTAATG (SEQ ID NO:56)
nprE24R	GATCGCGCAGCACATATTTSNNGCTTTCAGAAGAAATATTTA (SEQ ID NO:57)
nprE33R	ATAATTTGTGTTCCGGTAGGSNNAGAAAGATCGCGCAGCAC (SEQ ID NO:58)
nprE45R	CAGGTTATACTCGCGGTTSNNCAGATCGTACGTAATAATTT (SEQ ID NO:59)
nprE46R	GGCAGGTTATACTCGCGSNNTTGCAGATCGTACGTAATAA (SEQ ID NO:60)
nprE47R	CCCGGCAGGTTATACTCSNNGTTTTGCAGATCGTACG (SEQ ID NO:61)
nprE49R	GAGTGTGCCCGGCAGGTTSNNCTCGCGGTTTTGCAGATC (SEQ ID NO:62)
nprE50R	GATACGAGTGTGCCCCGGCAGSNNATACTCGCGGTTTTGCAG (SEQ ID NO:63)
nprE54R	GTGGTGCTGGATACGAGSNNGCCCGGCAGGTTATACTC (SEQ ID NO:64)
nprE58R	GTAAACTGGTTTGTGGTSNNGGATACGAGTGTGCCCCG (SEQ ID NO:65)
nprE59R	GTTGTAAACTGGTTTGTSNNGCTGGATACGAGTGTGC (SEQ ID NO:66)
nprE60R	GAAGTTGTAAACTGGTTSNNGGTGCTGGATACGAGTG (SEQ ID NO:67)
nprE65R	GCAGCGCGCTGAGAAGASNNTGTAAACTGGTTTGTGG (SEQ ID NO:68)
nprE66R	CAACGGCAGCGCGCTGAGASNAGTTGTAAACTGGTTTG (SEQ ID NO:69)
nprE87R	CTGTTGCGATTAAACTTSNNATAGAAATAATCATACAC (SEQ ID NO:70)
nprE90R	TTATTGTCGTAGCTGTTGCGSNNAACCTTCTGATAGAAATAA T (SEQ ID NO:71)
nprE96R	GATACGATCTTGCCGCCCTTSNNGTCGTAGCTGTTGCGATT A (SEQ ID NO:72)
nprE97R	GATACGATCTTGCCGCCSNNATTGTCGTAGCTGTTGC (SEQ ID NO:73)
nprE100R	TAATGAACGGAGGATACGATSNNGCCGCCCTTTATTGTCGTAG (SEQ ID NO:74)
nprE186R	CTGGCTGACCGTAATATCSNNACCGATATCCCAGTCCTC (SEQ ID NO:75)
nprE196R	GTCGGATTGGATAAGCTSNNGAGAGCCGGCTGGCTGAC (SEQ ID NO:76)
nprE211R	GGAAGGTTTTTGTAAATTSNNGAAATTATCAGGCTGTC (SEQ ID NO:77)
nprE214R	CATCAGTGTTCCGAAGGTTSNNGTAATTTTTGAAATTATC (SEQ ID NO:78)

表 8-1 引物序列

引物名称	引物序列和 SEQ ID NO:
nprE228R	GGGATTCCGCTGTTTGTSSNNCACGCCGCCGTAGTCGC (SEQ ID NO:79)
nprE280R	CTTGAGAGCCGTAAAGGTCSNNCGCAGATTGAATCAAAG (SEQ ID NO:80)

[0318] 每一位点评估文库的构建开开始于使用 pUB-BglIII-FW 引物和特异性 nprE 反向诱变引物的两个初级 PCR 扩增。对于第二个 PCR, 使用 pUB-BglIII-FW 引物和特异性 nprE 正向诱变引物 (对于正向和反向诱变引物, 相同的 nprE 成熟密码子位置)。

[0319] 使用 Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶 (Finnzymes; 目录编号 F-530L), 实施将突变引入成熟 nprE 序列。根据提供聚合酶的 Finnzymes 方案, 实施所有的 PCRs。初级 PCRs 的 PCR 条件是:

[0320] 对于初级 PCR 1:pUB-BglIII-FW 引物和特异性 NPPE 反向诱变引物——都为 1 μ L (10 μ M);

[0321] 对于初级 PCR 2:pUB-BglIII-RV 引物和特异性 NPPE 正向诱变引物——都为 1 μ L (10 μ M); 以及

5 x Phusion HF 缓冲液	10 μ L
10 mM dNTP 混合物	1 μ L
Phusion DNA 聚合酶	0.75 μ L (2 单位/ μ L)
DMSO, 100%	1 μ L
pUBnprE 模板 DNA	1 μ L (0.1 – 1 ng/ μ L)
蒸馏的、高压灭菌水	多至 50 μ L

[0322] PCR 程序是: 30 秒 98 $^{\circ}$ C、30x (10 秒 98 $^{\circ}$ C、20 秒 55 $^{\circ}$ C、1, 5 分钟 72 $^{\circ}$ C) 和 5 分钟 72 $^{\circ}$ C, 在 PTC-200Peltier 热循环仪 (thermal cycle) (MJ Research) 中实施。PCR 实验产生大约 2 到 3kb 的两种片段, 其在目的 NPPE 成熟密码子周围具有大约 30 个核苷酸碱基重叠。在第三个 PCR 反应中使用前述的两种片段以及正向和方向 BglIII 引物融合片段。在下列溶液中实行融合 PCR 反应:

pUB-BglIII-FW 引物和 pUB-BglIII-RV 引物——都为 1 μ L (10 μ M)

5 x Phusion HF 缓冲液	10 μ L
10 mM dNTP 混合物	1 μ L
Phusion DNA 聚合酶	0.75 μ L (2 单位/ μ L)
DMSO, 100%	1 μ L
初级 PCR 1 反应混合物	1 μ L
初级 PCR 2 反应混合物	1 μ L
蒸馏的、高压灭菌水	多至 50 μ L

[0323] PCR 融合程序如下: 30 秒 98 $^{\circ}$ C、30x (10 秒 98 $^{\circ}$ C、20 秒 55 $^{\circ}$ C、2:40 分钟 72 $^{\circ}$ C) 和 5 分钟 72 $^{\circ}$ C, 在 PTC-200Peltier 热循环仪 (thermal cycler) (MJ Research) 中。

[0324] 使用 QiaquickPCR 纯化试剂盒 (Qiagen, 目录编号 28106) 纯化扩增的线型 6.5Kb 片段, 并且用 BglIII 限制性酶消化, 以在融合片段的两端上产生粘性末端: $-35\mu\text{L}$ 纯化的线型 DNA 片段 $-4\mu\text{L}$ REACT®3 缓冲液 (Invitrogen) $-1\mu\text{L}$ BglIII, 10 单位 /ml (Invitrogen) 反应条件: 1 小时、 30°C 。

[0325] BglIII 消化的和使用 QiaquickPCR 纯化试剂盒 (Qiagen, 目录编号 28106) 纯化的片段的连接产生含有期望突变的环状和多聚体 DNA: $-30\mu\text{L}$ 纯化的 BglIII 消化的 DNA 片段 $-8\mu\text{L}$ T4 DNA 连接酶缓冲液 (Invitrogen® 目录编号 46300-018) $-1\mu\text{L}$ T4 DNA 连接酶, 1 单位 / μL (Invitrogen® 目录编号 15224-017) 反应条件: 16-20 小时、 16°

[0326] 接下来, 将连接混合物转化到枯草芽胞杆菌 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$ 菌株。按照在 WO 02/14490 中描述的转化到枯草芽胞杆菌, 其被引入本文作为参考。对于每一文库, 挑选 96 个单一菌落, 并且在含有新霉素和 1.25g/L 的酵母提取物的 MOPS 培养基中生长, 以进行序列分析 (BaseClear) 和筛选目的。每一文库包括最大 19 个 $nprE$ 位点特异突变体。

[0327] 通过将枯草芽胞杆菌 SEL 转化体在含有 20mg/L 新霉素和 1.25g/L 的酵母提取物的 MBD 培养基 (参见上面)、96 孔 MTP 中 37°C 下生长 68 小时, 产生所述变体。实施例 9 $nprE$ 组合文库 (RCLs) 的产生

[0328] 在该实施例中, 描述用于产生 $nprE$ 组合文库的方法。对于这种酶, 选择一种特性作为需要最大改变的特性。该特性在本文被称为“主要特性 (primaryproperty)”。为了组合文库设计的目的, 所有其它的特性是“次要特性 (secondaryproperties)”。如本文使用的改进蛋白质的基本方法是结合提高主要特性并且也保持或提高次要特性的突变。使用位点评估数据识别提高主要特性同时保持或提高次要特性的那些突变。被结合的突变通过其性能指数 (Performance Index) (PI 或 P_i) 和相关的 $\Delta\Delta G_{app}$ 值进行识别。

[0329] 如本文使用的“表观自由能变化 (apparent Free Energy Change)” ($\Delta\Delta G_{app}$) 被定义为: $\Delta\Delta G_{app} = -RT \ln(P_{\text{变体}}/P_{\text{亲本}})$ 其中 $P_{\text{变体}}$ 是变体的性能值, $P_{\text{亲本}}$ 是相同条件下亲本酶的性能值。 $P_{\text{变体}}/P_{\text{亲本}}$ 的比被定义为特性的性能指标 (P_i)。对于数据分布和可加性, 预期 $\Delta\Delta G_{app}$ 值以与实际 $\Delta\Delta G$ 值相似的方式表现。然而, 因为 $\Delta\Delta G$ 表示相比于亲本酶, 变体可实行的最大量功, 所以量 $\Delta\Delta G_{app}$ 通常低估 $\Delta\Delta G$, 并且可导致表现增效的结果, 这是因为两个附加位置的特性可以比通过将它们的 $\Delta\Delta G_{app}$ 值加在一起预测的值大。

[0330] 例如, 当 TIDE® 稳定性是主要特性并且 BMI 活性是次要特性时, 具有 $\Delta\Delta G_{app}$ 值 < 0 ($P_i > 1$) 和 BMI $\Delta\Delta G_{app}$ 值 < 0.06 ($P_i > 0.9$) 的突变可被选择用于结合。事实上, 在这些实验中探究了这些联系。

[0331] 为了产生用于这些实验的变体, 通过 GeneArt (Geneart) 产生在多个 $nprE$ 成熟 DNA 位置含有多个突变的合成 $nprE$ 文库片段。用 DNA 限制性内切酶 PvuI 和 AvaI 消化这些 1.5kb $nprE$ 文库片段, 并且通过连接酶反应、使用 T4 DNA Ligase (Invitrogen® 目录编号 15224-017) 在 5kb pUB 载体片段中进行纯化和连接 (也用 DNA 限制性内切酶 PvuI 和 AvaI 消化)。

[0332] 为了将连接反应混合物直接转化入芽胞杆菌细胞, 使用 TempliPhi 试剂盒 (Amersham 目录编号 25-6400) 扩增文库 DNA (在 pUB 载体片段中连接的 $nprE$ 文库片段混合物)。为了该目的, $1\mu\text{L}$ 的连接反应混合物与得自 TempliPhi 试剂盒的 $5\mu\text{L}$ 样品缓冲液混

合,并且在 95℃下加热 3 分钟,以使 DNA 变性。将该反应置于冰上冷却 2 分钟,然后短时间旋转。接下来,加入 5 μL 的反应缓冲液和得自 TempliPhi 试剂盒的 0.2 μL 的 phi29 聚合酶,在 30℃下、MJ Research PCR 仪中温育反应 4 小时。在反应中通过在 65℃下、PCR 仪中温育 10 分钟,使 phi29 酶热失活。

[0333] 对于将文库转化入芽胞杆菌,混合 0.1 μL 的 TempliPhi 扩增反应产物与 500 μL 的感受态枯草芽胞杆菌细胞 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE:: (xylR, pxyIA-comK)$),然后在 37℃下强力摇动 1 小时。然后,将 100 和 500 μL 铺于含有 20mg/L 新霉素和 0.5%脱脂乳的 HI-琼脂板。一般而言,如 W002/14490 中描述,进行到枯草芽胞杆菌的转化,其被引入本文作为参考。预期通过这种方法构建的枯草芽胞杆菌 $nprE$ 组合文库,在诱变靶向的一个或多个位置包括野生型氨基酸。

[0334] 然后,检测在这些文库中得到的变体在 TIDE[®]中的稳定性,和在 BMI 洗涤性能检测中的它们的性能,如本文描述的。表 9 提供在 BMI 分析中检测的变体的性能指数。在该表中,“Pos.”表示被改变的 $NprE$ 氨基酸序列的位置,“AA”表示每一个变体所进行的氨基酸取代。

表 9 检测变体的结果(性能指标)

Pos.(位置)	变体	AA	TIDE (-)	TIDE(-) $\Delta\Delta G$	TIDE(+)	TIDE(+) $\Delta\Delta G$	BMI Pi	BMI $\Delta\Delta G$
4	T004L	L	0.80	0.13	1.13	-0.07	1.01	0.00
23	S023Y	Y	1.08	-0.05	1.13	-0.07	1.02	-0.01
23	S023W	W	1.12	-0.07	1.13	-0.07	1.29	-0.15
23	S023N	N	1.33	-0.17	1.10	-0.06	0.95	0.03
23	S023T	T	0.88	0.07	1.06	-0.03	0.91	0.05
23	S023G	G	1.29	-0.15	1.06	-0.03	0.92	0.05
23	S023R	R	0.98	0.01	1.06	-0.03	1.46	-0.22
23	S023L	L	0.90	0.06	1.03	-0.02	1.24	-0.13
23	S023M	M	1.04	-0.02	1.03	-0.02	1.09	-0.05
23	S023V	V	0.82	0.12	1.02	-0.01	0.93	0.04
23	S023K	K	1.01	-0.01	1.02	-0.01	1.50	-0.24
24	G024Y	Y	0.60	0.30	1.11	-0.06	1.10	-0.06
24	G024W	W	0.36	0.60	1.10	-0.06	1.20	-0.11
24	G024M	M	0.71	0.20	1.09	-0.05	1.12	-0.07
24	G024F	F	0.50	0.41	1.08	-0.04	1.19	-0.10
24	G024L	L	0.49	0.42	1.07	-0.04	1.22	-0.12
24	G024H	H	0.80	0.13	1.05	-0.03	1.17	-0.09
24	G024K	K	0.55	0.35	1.04	-0.02	1.55	-0.26
24	G024T	T	0.57	0.33	1.03	-0.02	0.94	0.04
24	G024R	R	0.56	0.34	1.02	-0.01	1.47	-0.23
46	N046Q	Q	0.88	0.08	1.07	-0.04	1.22	-0.12
47	R047K	K	1.12	-0.07	1.09	-0.05	1.15	-0.08
50	N050F	F	1.07	-0.04	1.07	-0.04	1.38	-0.19
50	N050Y	Y	1.00	0.00	1.04	-0.02	1.27	-0.14
50	N050W	W	1.01	-0.01	1.04	-0.02	1.46	-0.22
50	N050P	P	1.23	-0.12	1.03	-0.02	1.12	-0.07
54	T054H	H	1.08	-0.04	1.11	-0.06	1.17	-0.09
54	T054K	K	1.03	-0.02	1.11	-0.06	1.47	-0.23
54	T054L	L	1.09	-0.05	1.08	-0.05	1.26	-0.14
54	T054N	N	0.97	0.02	1.07	-0.04	1.25	-0.13
54	T054Y	Y	1.14	-0.08	1.07	-0.04	1.08	-0.04
54	T054W	W	1.02	-0.01	1.07	-0.04	1.22	-0.12
54	T054S	S	0.99	0.01	1.05	-0.03	1.03	-0.02
54	T054I	I	1.09	-0.05	1.04	-0.02	1.34	-0.17
54	T054R	R	0.96	0.02	1.04	-0.02	1.46	-0.22
54	T054Q	Q	1.09	-0.05	1.03	-0.02	1.23	-0.12

表 9 检测变体的结果(性能指标)

Pos.(位置)	变体	AA	TIDE (-)	TIDE(-) $\Delta\Delta G$	TIDE(+)	TIDE(+) $\Delta\Delta G$	BMI Pi	BMI $\Delta\Delta G$
54	T054F	F	0.98	0.01	1.03	-0.02	1.16	-0.09
54	T054V	V	1.14	-0.08	1.01	-0.01	1.11	-0.06
59	T059R	R	0.76	0.16	1.28	-0.14	1.56	-0.26
59	T059W	W	0.56	0.34	1.26	-0.14	1.32	-0.16
59	T059K	K	0.99	0.00	1.16	-0.09	1.60	-0.28
59	T059N	N	0.98	0.01	1.15	-0.08	1.16	-0.09
59	T059G	G	0.94	0.04	1.13	-0.07	1.11	-0.06
59	T059P	P	1.18	-0.10	1.12	-0.07	1.19	-0.10
59	T059M	M	1.04	-0.02	1.10	-0.06	1.10	-0.05
59	T059H	H	0.98	0.01	1.07	-0.04	1.32	-0.16
59	T059S	S	1.09	-0.05	1.04	-0.03	0.91	0.06
59	T059A	A	1.05	-0.03	1.04	-0.02	0.96	0.03
59	T059Q	Q	1.05	-0.03	1.04	-0.02	1.31	-0.16
59	T059I	I	0.64	0.26	1.01	-0.01	1.43	-0.21
60	T060N	N	0.79	0.14	1.03	-0.02	1.07	-0.04
66	S066Q	Q	0.75	0.17	1.01	-0.01	1.12	-0.07
66	S066N	N	1.08	-0.05	1.01	-0.01	1.00	0.00
110	R110K	K	1.08	-0.04	1.04	-0.02	1.05	-0.03
119	D119H	H	1.03	-0.02	1.15	-0.08	1.16	-0.09
129	S129I	I	2.32	-0.49	1.68	-0.30	0.98	0.01
129	S129V	V	2.34	-0.50	1.55	-0.26	1.01	0.00
129	S129Q	Q	1.86	-0.37	1.44	-0.21	0.99	0.00
129	S129T	T	1.59	-0.27	1.36	-0.18	1.04	-0.02
129	S129L	L	1.70	-0.31	1.35	-0.18	1.01	-0.01
129	S129H	H	1.60	-0.28	1.30	-0.15	1.17	-0.09
129	S129Y	Y	1.28	-0.14	1.06	-0.04	1.25	-0.13
129	S129A	A	1.13	-0.07	1.06	-0.03	1.12	-0.07
129	S129K	K	1.18	-0.10	1.05	-0.03	1.33	-0.17
130	F130L	L	1.29	-0.15	1.52	-0.25	0.91	0.05
130	F130I	I	1.18	-0.10	1.14	-0.08	1.03	-0.02
130	F130V	V	1.05	-0.03	1.06	-0.03	0.99	0.00
130	F130K	K	0.99	0.00	1.04	-0.02	1.26	-0.14
138	M138L	L	1.11	-0.06	1.43	-0.21	0.95	0.03
152	E152H	H	1.53	-0.25	1.36	-0.18	1.15	-0.08
152	E152W	W	1.32	-0.16	1.31	-0.16	1.06	-0.03
152	E152F	F	1.32	-0.16	1.15	-0.08	1.09	-0.05
179	T179P	P	1.33	-0.17	1.50	-0.24	1.04	-0.03
190	V190I	I	1.37	-0.18	1.68	-0.30	1.16	-0.09
220	D220P	P	2.24	-0.47	2.66	-0.57	1.05	-0.03
220	D220E	E	2.23	-0.47	2.44	-0.52	1.05	-0.03
243	T243I	I	1.13	-0.07	1.17	-0.09	1.06	-0.03
263	T263W	W	1.37	-0.18	1.40	-0.20	0.92	0.05
263	T263H	H	1.03	-0.02	1.01	-0.01	1.05	-0.01
273	A273H	H	1.10	-0.06	1.14	-0.08	0.98	0.01
282	L282M	M	1.03	-0.01	1.16	-0.09	1.01	-0.01

表 9 检测变体的结果(性能指标)

Pos.(位置)	变体	AA	TIDE (-)	TIDE(-) $\Delta\Delta G$	TIDE(+)	TIDE(+) $\Delta\Delta G$	BMI Pi	BMI $\Delta\Delta G$
282	L282F	F	0.91	0.05	1.06	-0.04	1.09	-0.05
282	L282Y	Y	0.83	0.11	1.04	-0.02	0.92	0.05
285	S285R	R	1.08	-0.04	1.38	-0.19	1.23	-0.12
285	S285P	P	1.11	-0.06	1.30	-0.16	0.98	0.01
285	S285W	W	1.08	-0.05	1.28	-0.14	0.95	0.03
285	S285Q	Q	1.06	-0.03	1.10	-0.05	0.98	0.01
285	S285K	K	0.89	0.07	1.00	0.00	1.20	-0.10
286	Q286R	R	0.95	0.03	1.18	-0.10	1.14	-0.08
286	Q286P	P	0.98	0.01	1.15	-0.08	0.97	0.02
286	Q286K	K	0.93	0.04	1.09	-0.05	1.22	-0.12

实施例 10 通过 QuikChange[®]诱变产生 nprE 位点评估文库 (SELS) 的另一种方法

[0335] 在该实施例中,描述产生 nprE SELs 的另一种方法。如在上面实施例 8 中, pUBnprE 载体用作产生 nprE SELs 的模板 DNA 来源。在这两种方法之间的主要差异是该方法需要使用互补的位点定向诱变引物扩增整个载体。材料:含有 pUBnprE 载体的芽胞杆菌菌株 Qiagen 质粒中量试剂盒 (Midi Kit) (Qiagen 目录编号 12143) Ready-Lyse 溶菌酶 (Epicentre 目录编号 R1802M) 雌亲甲基化酶试剂盒 (dam Methylase Kit) (New England Biolabs 目录编号 M0222L) Zymoclean 凝胶 DNA 回收试剂盒 (Gel DNA Recovery Kit) (Zymo Research 目录编号 D4001) nprE 位点定向诱变引物, 100nmole (纳摩尔) 水平, 5' 磷酸化, PAGE 纯化 (IntegratedDNA Technologies, Inc.) QuikChange 多位点定向诱变试剂盒 (Multi Site-Directed Mutagenesis Kit) (Stratagene 目录编号 200514) MJ Research PTC-200 Peltier 热循环仪 (Thermal Cycler) (Bio-Rad Laboratories) 1.2% 琼脂糖 E-gels (Invitrogen 目录编号 G5018-01) TempliPhi 扩增试剂盒 (GE Healthcare 目录编号 25-6400-10) 感受态枯草芽胞杆菌细胞 ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoIIE$, $degUHy32$, $\Delta amyE::(xylR, pxylA-comK)$) 方法:

[0336] 为了得到 pUBnprE 载体, 含有 pUBnprE 载体的单一菌落的芽胞杆菌菌株被用来接种 5ml LB+10ppm 新霉素管。这是在這些方法中使用的起始培养物。37°C 下伴随 225rpm 的摇动, 生长该培养物 6 小时。然后, 将 100ml 新鲜的 LB+10ppm 新霉素与 1ml 起始培养物接种。37°C 下伴随 225rpm 的摇动, 生长该培养物整夜。在该温育后, 通过足够的离心, 收集细胞团以提供细胞团。将该细胞团悬浮于 10ml 缓冲液 P1 (Qiagen 质粒中量试剂盒) 中。然后, 将 10 μ l Ready-Lyse 溶菌酶加入到重悬的细胞团中, 并且在 37°C 下温育 30 分钟。然后, 继续 Qiagen 质粒中量试剂盒方案 (使用 10ml 缓冲液 P2 和 P3 以导致细胞培养物增加体积)。在从芽胞杆菌分离 pUBnprE 载体后, 量化 pUBnprE 载体的浓度。然后使用雌亲甲基化酶试剂盒 (New England Biolabs), 用试剂盒方案中列出的方法, 将该载体雌亲甲基化, 以每管甲基化大约 2ug 的 pUBnprE 载体。使用 Zymoclean 凝胶 DNA 回收试剂盒纯化和浓缩雌亲甲基化的 pUBnprE 载体。量化该雌亲甲基化的 pUBnprE 载体, 然后将其稀释到 50ng/ μ l 的工作浓度。遵照制造商的方案 (例如 1ul 雌亲甲基化的 pUBnprE 载体 (50ng/ μ l), 1ul nprE 位点定向正向诱变引物 (10uM), 1ul nprE 位点定向反向诱变引物 (10uM), 2.5ul 10x QuikChange 多反应缓冲液, 1ul dNTP 混合物, 1ul QuikChange 多酶混合物 (2.5U/ μ l) 和

17.5ul 蒸馏高压灭菌水,以提供 25ul 总反应混合物),在 QuikChange 多位点定向诱变试剂盒(Stratagene)中,在 PCR 反应中使用互补的位点定向诱变引物(10uM,每种引物 1ul)(参见表 10-1)。使用下面的反应条件扩增 nprE 位点评估文库:95℃持续 1min.(仅第一个循环),然后 95℃持续 1min.、55℃持续 1min、65℃持续 13.5min,并且重复循环 23 次。将反应产物在 4℃下储存过夜。然后,使用制造商的方案(即将 1.5ul DpnI 限制性酶加入到每一管中,并且在 37℃下温育 3 小时;然后,对于每一 nprE SEL,在 1.2% E-gel 上分析 2ul DpnI 消化的 PCR 反应物,以确保 PCR 反应运作并且降解亲本模板),反应混合物经过 DpnI 消化处理(用 QuikChange 多位点定向诱变试剂盒提供)以消化亲本 pUBnprE 载体。然后,使用制造商的方案(即对于总反应物~11ul,1ul DpnI 处理的 QuikChange 多位点定向诱变 PCR,5ul TempliPhi 样品缓冲液,5ul TempliPhi 反应缓冲液和 0.2ul TempliPhi 酶混合物;在 30℃下温育 3 小时;通过加入 200ul 蒸馏的、高压灭菌水稀释 TempliPhi 反应物,并短暂旋转。然后,将 1.5ul 稀释的 TempliPhi 物质转化入感受态枯草芽胞杆菌细胞,并且使用 LA+10ppm 新霉素 +1.6%脱脂乳平板选择 nprESELs),使用 TempliPhi 滚环扩增,产生大量 DNA,以增加每一 nprE SEL 的文库大小。表 10-1 提供在这些实验中使用的引物的名称、序列和 SEQ ID NOS。通过整合 DNA 技术(Integrated DNA Technologies),100nmole 水平上合成所有的引物、5' - 磷酸化并且 PAGE 纯化。

表 10-1 引物

引物	序列
nprE-T4F	GTGGAGCATGCCGCCACANNSSGGAACAGGTACGACTCTTAAAGG (SEQ ID NO:81)

表 10-1 引物

引物	序列
nprE-G12F	CCGGAACAGGTACGACTCTTAAANNSSAAAACGGTCTCATTAAATATTCTTCTGAAAGC (SEQ ID NO:82)
nprE-Q45F	CGGAACACAAAATTATTACGTACGATCTGNNSAACCGCGAGTATAACCTGCC (SEQ ID NO:83)
nprE-Y49F	GTACGATCTGCAAAACCGCGAGNNSAACCTGCCGGGCACACTCGTATCC (SEQ ID NO:84)
nprE-N50F	GTACGATCTGCAAAACCGCGAGTATNNSCTGCCGGGCACACTCGTATCCAG (SEQ ID NO:85)
nprE-T65F	CCAGCACCACAAACCAGTTTACANNSTCTTCTCAGCGCGTGGCGTTG (SEQ ID NO:86)
nprE-D119F	GCAGATACAATAACGCAGCCTGGATCGGCNNSCAAATGATTTACGGTGACGGCGAC (SEQ ID NO:87)
nprE-G128F	CCAAATGATTTACGGTGACGGCGACNNSTCATTCTTCTCACCTCTTTCCGGTTC (SEQ ID NO:88)
nprE-F130F	GGTGACGGCGACGGTTCANNSTTCTCACCTCTTTCCGGTCC (SEQ ID NO:89)
nprE-Q151F	CATGAAATGACACATGGCGTTACANNSGAAACAGCCAACTGAACTAC (SEQ ID NO:90)
nprE-E152F	CATGAAATGACACATGGCGTTACACAGNNSACAGCCAACTGAACTACG (SEQ ID NO:91)
nprE-N155F	CATGGCGTTACACAGGAAACAGCCNNSCTGAACTACGAAAATCAGCCG (SEQ ID NO:92)
nprE-T179F	CTGATGTATTCCGGTACTTCAACGATNNSGAGGACTGGGATATCGGTG (SEQ ID NO:93)
nprE-Y204F	GCAGCTTATCCAATCCGACAAAANNSSGACAGCCTGATAATTTCAAAAATTAC (SEQ ID NO:94)
nprE-G205F	GCAGCTTATCCAATCCGACAAAATACNNSCAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAACC (SEQ ID NO:95)
nprE-Y224F	GAACACTGATGCCGGCGACNNSGGCGGCGTGATACAAAC (SEQ ID NO:96)
nprE-T243F	GAACAAAGCCGCTTACAATACGATTNNSAAAATCGGCGTGAAACAAAGCG (SEQ ID NO:97)
nprE-V260F	GCAGATTACTATCGTCTGACGNNSCTCACTCCGTCATCAACTTTTAAAG (SEQ ID NO:98)
nprE-Y261F	GATTACTATCGTCTGACGGTANNSTCACTCCGTCATCAACTTTTAAAG (SEQ ID NO:99)
nprE-T263F	GTGCTCTGACGGTATACCTCNNSCCGTCATCAACTTTTAAAGATGC (SEQ ID NO:100)
nprE-A273F	CCGTCATCAACTTTTAAAGATGCAAAANNSSGCTTTGATTCAATCTGCGCGG (SEQ ID NO:101)
nprE-L282F	GATTCAATCTGCGCGGGACNNSTACGGCTCTCAAGATGCTGC (SEQ ID NO:102)
nprE-S285F	CGCGGGACCTTTACGGCNNSCAAGATGCTGCAAGCGTAG (SEQ ID NO:103)
nprE-A289F	CCTTTACGGCTCTCAAGATGCTNNSAGCGTAGAAGCTGCCTGGAATG (SEQ ID NO:104)
nprE-A293F	CTCAAGATGCTGCAAGCGTAGAANNSSGCTGGAATGCAGTCGGATTG (SEQ ID NO:105)
nprE-N296F	GCAAGCGTAGAAGCTGCCTGGNNSGACGTCGGATTGTAAACAAGAAAAG (SEQ ID NO:106)
nprE-G299F	GAAGCTGCCTGGAATGCAGTCNNSTGTAAACAAGAAAAGAGACCGGAAATCC (SEQ ID NO:107)
nprE-T60F	CACACTCGTATCCAGCACCNNSAACCAGTTTACAACCTTCTCTCAG (SEQ ID NO:108)
nprE-R110F	CTCCGTTTACATACGGCAGCNNSACAATAACGCAGCCTGGATC (SEQ ID NO:109)
nprE-D139F	CTCACCTCTTTCCGGTTCAATGNNSGTAACCGCTCATGAAATGACAC (SEQ ID NO:110)
nprE-T4R	CCTTTAAGAGTCGTACCTGTTCCSNNTGTGGCGCATGCTCCAC (SEQ ID NO:111)
nprE-G12R	GCTTTCAAGAAATATTTAATGAGACCGTTTTSNNTTTAAGAGTCGTACCTGTTCCGG (SEQ ID NO:112)
nprE-Q45R	GGCAGGTTATACTCGCGGTTSNNCAGATCGTACGTAATAATTTGTGTTCCG (SEQ ID NO:113)
nprE-Y49R	GGATACGAGTGTGCCGGCAGGTTSNNCTCGCGGTTTTCAGATCGTAC (SEQ ID NO:114)
nprE-N50R	CTGGATACGAGTGTGCCGGCAGSNNACTCGCGGTTTTCAGATCGTAC (SEQ ID NO:115)
nprE-T65R	CAACGGCAGCGCGCTGAGAAGASNNGTGAACTGGTTTGTGGTGCTGG (SEQ ID NO:116)
nprE-D119R	GTCGCCGTCACCGTAAATCATTTGSNNGCCGATCCAGGCTGCGTTATTGTATCTGC (SEQ ID NO:117)
nprE-G128R	GAACCGGAAAGAGGTGAGAAGAATGASNNGTCGCCGTCACCGTAAATCATTTGG (SEQ ID NO:118)
nprE-F130R	GGACCGGAAAGAGGTGAGAASNNTGAACCGTCGCCGTCACC (SEQ ID NO:119)
nprE-Q151R	GTAGTTCAGGTTGGCTGTTTCSNNTGTAAACGCCATGTGTCATTTCATG (SEQ ID NO:120)
nprE-E152R	CGTAGTTCAGGTTGGCTGTSNNCTGTGTAACGCCATGTGTCATTTCATG (SEQ ID NO:121)
nprE-N155R	CGGCTGATTTTCGTAGTTCAGSNNGGCTGTTTCTGTGTAACGCCATG (SEQ ID NO:122)
nprE-T179R	CACCGATATCCAGTCTCSNNATCGTTGAAGTACCCGAATACATCAG (SEQ ID NO:123)
nprE-Y204R	GTAATTTTGTAAATTATCAGGCTGTCCSNNTTTTGTCCGATTGGATAAGCTGC (SEQ ID NO:124)
nprE-G205R	GGTTTTGTAAATTTTGTAAATTATCAGGCTGSNNGTATTTGTCCGATTGGATAAGCTGC (SEQ ID NO:125)
nprE-Y224R	GTTTGTATGCACGCCGCCSNNGTCGCCGGCATCAGTGTTTC (SEQ ID NO:126)

表 10-1 引物

引物	序列
nprE-T243R	CGCTTTGTTACGCCGATTTTSNNAATCGTATTGTAAGCGGCTTTGTTT (SEQ ID NO:127)
nprE-V260R	CTTTAAAAGTTGATGACGGAGTGAGGTASNNGTCAGAGCACGATAGTAAATCTGC (SEQ ID NO:128)
nprE-Y261R	CTTTAAAAGTTGATGACGGAGTGAGSNNTACCGTCAGAGCACGATAGTAAATC (SEQ ID NO:129)
nprE-T263R	GCATCTTTAAAAGTTGATGACGGSNNGAGGTATACCGTCAGAGCAC (SEQ ID NO:130)
nprE-A273R	CCGCGCAGATTGAATCAAAGCSNNTTTTGCATCTTTAAAAGTTGATGACGG (SEQ ID NO:131)
nprE-L282R	GCAGCATCTTGAGAGCCGTASNNGTCCCGCGCAGATTGAATC (SEQ ID NO:132)
nprE-S285R	CTACGCTTGACGATCTTGSNNGCCGTAAAGGTCCCGCG (SEQ ID NO:133)
nprE-A289R	CATTCCAGGCAGCTTCTACGCTSNNAGCATCTTGAGAGCCGTAAAGG (SEQ ID NO:134)
nprE-A293R	CAATCCGACTGCATTCCAGGCSNNTTCTACGCTTGACGATCTTGAG (SEQ ID NO:135)
nprE-N296R	CTTTCTTGTTTACAATCCGACTGCSNCCAGGCAGCTTCTACGCTTGC (SEQ ID NO:136)
nprE-G299R	GGATTTCGGTCTCTTTTCTTGTTTACAASNNGACTGCATTCCAGGCAGCTTC (SEQ ID NO:137)
nprE-T60R	CTGAGAAGAAGTTGTAAGTGGTTSNNGGTGCTGGATACGAGTGTG (SEQ ID NO:138)
nprE-R110R	GATCCAGGCTGCGTTATTGTASNNGCTGCCGTAATGAACGGAG (SEQ ID NO:139)
nprE-D139R	GTGTCATTTTCATGAGCGGTTACSNNCATTGAACCGGAAAGAGGTGAG (SEQ ID NO:140)
nprE-S135F	GCGACGGTTCATTCTTCTCACCTCTTNNSGGTTCAATGGACGTAACCGCTC (SEQ ID NO:141)
nprE-G136F	GCGACGGTTCATTCTTCTCACCTCTTTCNNSTCAATGGACGTAACCGCTCATG (SEQ ID NO:142)
nprE-S137F	CTTCTCACCTCTTTCGGTNNSTATGGACGTAACCGCTCATG (SEQ ID NO:143)
nprE-V140F	CCTCTTTCGGTTCATGGACNNSTACCGCTCATGAAATGACAC (SEQ ID NO:144)
nprE-S197F	CAGCCAGCCGGCTCTCCGCNNSTTATCCAATCCGACAAAATACGGACAG (SEQ ID NO:145)
nprE-L198F	CAGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCNSSTCCAATCCGACAAAATACGGACAG (SEQ ID NO:146)
nprE-S199F	CAGCCAGCCGGCTCTCCGCAGCTTANNSAATCCGACAAAATACGGACAGCC (SEQ ID NO:147)
nprE-L216F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACNNSCCGAACACTGATGCCGGCGAC (SEQ ID NO:148)
nprE-P217F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTNSAACACTGATGCCGGCGAC (SEQ ID NO:149)
nprE-N218F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGNSACTGATGCCGGCGACTAC (SEQ ID NO:150)
nprE-T219F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGAACACTNNSGCCGGCGACTACGG (SEQ ID NO:151)
nprE-D220F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGAACACTNNSGCCGGCGACTACGGCGGCG (SEQ ID NO:152)
nprE-A221F	CAGCCTGATAATTTCAAAAATTACAAAAACCTTCCGAACACTGATNNSGCCGGCGACTACGGCGGCGTG (SEQ ID NO:153)
nprE-G222F	CCTTCCGAACACTGATGCCNSGACTACGGCGGCGTGTCATAC (SEQ ID NO:154)
nprE-Q286F	CGGGACCTTACGGCTCTNNSGATGCTGCAAGCGTAGAAGCTG (SEQ ID NO:155)
nprE-A297F	GCGTAGAAGCTGCCGTGAATNNSGTCGGATTGTAACAAGAAAAGAGACCGG (SEQ ID NO:156)
nprE-S135R	GAGCGGTTACGTCCATTGAACCSNNAAGAGGTGAGAAGAATGAACCGTCGC (SEQ ID NO:157)
nprE-G136R	CATGAGCGGTTACGTCCATTGASNNGGAAAGAGGTGAGAAGAATGAACCGTCGC (SEQ ID NO:158)
nprE-S137R	CATGAGCGGTTACGTCCATSNNACCGGAAAGAGGTGAGAAG (SEQ ID NO:159)
nprE-V140R	GTGTCATTTTCATGAGCGGTSNNGTCCATTGAACCGGAAAGAGG (SEQ ID NO:160)
nprE-S197R	CTGTCCGTATTTTGTCCGATTGGATAASNNGCGGAGAGCCGGCTGGCTG (SEQ ID NO:161)
nprE-L198R	CTGTCCGTATTTTGTCCGATTGGASNNGCTGCGGAGAGCCGGCTGGCTG (SEQ ID NO:162)
nprE-S199R	GGCTGTCCGTATTTTGTCCGATTSSNTAAGCTGCGGAGAGCCGGCTGGCTG (SEQ ID NO:163)
nprE-L216R	GTCGCCGGCATCAGTGTTCCGSNNGTTTTTGTAATTTTGAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:164)
nprE-P217R	GTCGCCGGCATCAGTGTTSNNAAGGTTTTTGTAATTTTGAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:165)
nprE-N218R	GTAGTCGCCGGCATCAGTSNNGGAAAGGTTTTTGTAATTTTGAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:166)
nprE-T219R	CCGTAGTCGCCGGCATCSNNGTTCGGAAGGTTTTTGTAATTTTGAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:167)
nprE-D220R	CGCCGCCGTAGTCGCCGCSNNAAGTGTTCCGAAGGTTTTTGTAATTTTGAATTATCAGGCTG (SEQ ID NO:168)
nprE-A221R	CACGCCGCCGTAGTCGCCSNNATCAGTGTTCCGAAGGTTTTTGTAATTTTGAATTATCAGGCTG

表 10-1 引物	
引物	序列
	(SEQ ID NO:169)
nprE-G222R	GTATGCACGCCCGCGTAGTCSNNGGCATCAGTGTTCCGGAAGG (SEQ ID NO:170)
nprE-Q286R	CAGCTTCTACGCTTGCAGCATCSNNAGAGCCGTAAAGGTCCCG (SEQ ID NO:171)
nprE-A297R	CCGGTCTCTTTTCTTGTTTACAATCCGACSNNAATCCAGGCAGCTTCTACGC (SEQ ID NO:172)

实施例 11nprE 同系物的识别

[0337] 在该实施例中,描述识别 nprE 同系物所进行的实验。具体而言,在该实施例中,进行实验以从不同且紧密相关的芽胞杆菌种克隆中性蛋白酶 (npr) 同系物。选择不同的种以便探究差异和特性,从这些特性分离这些不同的种。探究的多种 npr 同系物包括:热溶芽胞杆菌 npr (P23384) 蜡样芽胞杆菌 nprC (P05806) 蜡样芽胞杆菌 E33L npr (AAY60523) 嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT 枯草芽胞杆菌 nprB 枯草芽胞杆菌 nprE 结核芽胞杆菌 nprB (AAK00602) 金黄色葡萄球菌 aur (P81177)

[0338] 图 3 提供这些同系物 (SEQ ID NOS:173-181) 的序列比对,图 4 (SEQ ID NOS:182-191) 提供多种其它同系物的另一序列比对。

[0339] 在这些实验中,物质包括:枯草芽胞杆菌菌株 I168 的染色体 DNA 在 DNA2.0,使用枯草芽胞杆菌密码子优化,合成下列 DNA 质粒:pJ4:G01905 (结核芽胞杆菌 nprB) (参见,图 6)pJ4:G01906 (蜡样芽胞杆菌 E33L npr) (参见,图 7)pJ4:G01907 (蜡样芽胞杆菌 nprC) (参见,图 8)pJ4:G01908 (热溶芽胞杆菌 npr) (参见,图 9)pJ4:G01909 (金黄色葡萄球菌 aur) (参见,图 10)pJ4:G01938 (嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT) (参见,图 11)pJHT 载体 (参见,图 12)pAC 载体 (参见,图 13)MJ Research PTC-200 Peltier 热循环计 (Bio-Rad Laboratories) 引物 (Operon Inc)PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶 (Stratagene) 限制性内切核酸酶 (Roche)TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen) 枯草芽胞杆菌感受态细胞 ((Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIE, degUHy32, Δ amyE:: (xylR, pxylA-comK)

表 11 引物	
引物名称	引物序列和 SEQ ID NO:
EL-689	CGTCTTCAACAATTGTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:196)
EL-693	CAGACAATTTCTTACCTAAACCCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTC (SEQ ID NO:197)
EL-694	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCTG (SEQ ID NO:198)
EL-695	GCTTATGGATCCCGTCGTTTCAGCTGAGAGAG (SEQ ID NO:199)
EL-696	GATGTCTTGGTCAAGTTGCGCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTC (SEQ ID NO:200)
EL-697	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGCGCAACTTGACCAAGACATC (SEQ ID NO:201)
EL-698	CCAAGGCCGTTTTTTTATGTAAGCTTATAGAATGCCGACAGCCTCATACG (SEQ ID NO:202)
EL-699	CGTATGAGGCTGTTCGGCATTCTATAAGCTTACATAAAAAACCGGCCTTGG (SEQ ID NO:203)
EL-700	AATGGTGCATGCAAGGAGATGGCG (SEQ ID NO:204)
EL-755	CGTCTTCAAGAATTCCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:205)
EL-733	GCACCCAACATTGCACGTTTATTCACCTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATT C (SEQ ID NO:206)
EL-734	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAATAAACGTGCAATGTTGGGTGC (SEQ ID NO:207)
EL-735	GCTTATAAGCTTAATATACTCCAACCGCGTTG (SEQ ID NO:208)
EL-739	CCAGCATAGCGCGTTTGTTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTC (SEQ ID NO:209)
EL-740	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAACAAACGCGCTATGCTGG (SEQ ID NO:210)
EL-741	GCTTATAAGCTTAATAGACACCCACGGCATTAAACGCC (SEQ ID NO:211)
EL-742	CAGGACAAGAGCTAAGGACTTTTTTTTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAA AATTC (SEQ ID NO:212)
EL-743	GAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAAAAAAGTCCTTAGCTCTT GTCCTG (SEQ ID NO:213)
EL-744	GCTTATAAGCTTAATTAATGCCGACGGCAC (SEQ ID NO:214)

A. 枯草芽胞杆菌 nprE 的克隆

[0340] 为了构建枯草芽胞杆菌 nprE 质粒,分别制备扩增的 aprE 启动子片段(得自 pJHT 载体)和具有终止子片段(得自枯草芽胞杆菌菌株 I168)的枯草芽胞杆菌 nprE 基因。图 15 提供示意图,图解了单独的 DNA 片段的扩增。

[0341] 使用重叠延伸拼接 (Splice Overlap Extension) (SOE) PCR 反应将 2 个分离的 DNA 片段连接在一起。在该反应中,组合下列试剂:1ul aprE 启动子 DNA 片段,1ul 枯草芽胞杆菌 nprE 基因+终止子片段,1ul 引物 EL-689 (25uM),1ul 引物 EL-695 (25uM),5ul 10x PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶缓冲液,1ul dNTP (10mM),1ul PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶和 39ul 蒸馏的、高压灭菌水以提供 50ul 的总体积。PCR 循环是:95℃持续 2 分钟(仅第一个循环),然后是 95℃持续 30 秒、54℃持续 30 秒和 72℃持续 0:45 秒的 28 个循环。

[0342] 使用 MfeI 和 BamHI 限制性内切核酸酶消化 aprE 启动子-枯草芽胞杆菌 nprE 基因+终止子的 PCR 融合片段。使用 EcoRI 和 BamHI 限制性内切核酸酶消化 pJHT 载体。然后,使用限制性内切核酸酶消化的 pJHT 载体连接限制性内切核酸酶消化的 aprE 启动子-枯草

芽胞杆菌 nprE 基因 + 终止子 DNA 片段。然后,将连接混合物转化入 TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞,以针对 LA+50ppm 羧苄青霉素选择。在识别含有对于质粒 pEL501(参见,图 16) 正确的 DNA 构建序列的质粒后,将其转化入感受态枯草芽胞杆菌细胞,以整合入 aprE 启动子位置。针对在 LA+5ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板上的蛋白酶活性(即脱脂乳清除),选择转化体。然后,将扩增的菌株转移到 LA+25ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板。然后将菌株转移到 LA+25ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板,进行扩增。B. 枯草芽胞杆菌 nprB 的克隆

[0343] 为了构建枯草芽胞杆菌 nprB 质粒,分别制备扩增的 aprE 启动子片段(得自 pJHT 载体)和枯草芽胞杆菌 nprB 基因片段(得自枯草芽胞杆菌菌株 I168)以及终止子片段(得自 pJHT 载体)。图 17 提供了扩增单独 DNA 片段的示意图。

[0344] 使用重叠延伸拼接(SOE)PCR 反应将 3 个分离的 DNA 片段连接在一起。在该反应中,组合下列试剂:1ul aprE 启动子 DNA 片段,1ul 枯草芽胞杆菌 nprB 基因 + 终止子片段,1ul 终止 DNA 片段,1ul 引物 EL-689(25uM),1ul 引物 EL-700(25uM),5ul 10x PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶缓冲液,1ul dNTP(10mM),1ul PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶和 38ul 蒸馏的、高压灭菌水以提供 50ul 的总体积。PCR 循环是:95℃持续 2 分钟(仅第一个循环),然后是 95℃持续 30 秒、54℃持续 30 秒和 72℃持续 0:45 秒的 28 个循环。

[0345] 使用 MfeI 和 SphI 限制性内切核酸酶消化 aprE 启动子 - 枯草芽胞杆菌 nprB 基因 + 终止子的 PCR 融合片段。使用 EcoRI 和 SphI 限制性内切核酸酶消化 pJHT 载体。然后,使用限制性内切核酸酶消化的 pJHT 载体连接限制性内切核酸酶消化的 aprE 启动子 - 枯草芽胞杆菌 nprB 基因 + 终止子 DNA 片段。然后,将连接混合物转化到 TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞,以针对 LA+50ppm 羧苄青霉素选择。在识别含有对于质粒 pEL508(参见,图 18) 正确的 DNA 构建序列的质粒后,将其转化入感受态枯草芽胞杆菌细胞,以整合入 aprE 启动子位置。针对在 LA+5ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板上的蛋白酶活性(即脱脂乳清除),选择转化体。然后,将扩增的菌株转移到 LA+25ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板。然后将菌株转移到 LA+25ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板,进行扩增。C. 嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT 的克隆

[0346] 为了构建嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT 质粒,分别制备扩增的 aprE 启动子片段(得自 pJHT 载体)和嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT 基因片段(得自质粒 pJ4 :G01938)。图 19 提供了扩增该单独 DNA 片段的示意图。

[0347] 使用重叠延伸拼接(SOE)PCR 反应将 2 个分离的 DNA 片段连接在一起。在该反应中,组合下列试剂:1ul aprE 启动子 DNA 片段,1ul 嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT 基因片段,1ul 引物 EL-755(25uM),1ul 引物 EL-735(25uM),5ul 10x PfuUltra II FusionHS DNA 聚合酶缓冲液,1ul dNTP(10mM),1ul PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶和 39ul 蒸馏的、高压灭菌水以提供 50ul 的总体积。PCR 循环是:95℃持续 2 分钟(仅第一个循环),然后是 95℃持续 30 秒、54℃持续 30 秒和 72℃持续 0:45 秒的 28 个循环。

[0348] 使用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶消化 aprE 启动子 - 嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT 基因 + 终止子的 PCR 融合片段。使用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶消化 pAC 载体。然后,使用限制性内切核酸酶消化的 pAC 载体连接限制性内切核酸酶消化的 aprE 启动子 - 嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT DNA 片段。然后,采用制造商的方案(即对于~11ul 总反应物,1ul aprE 启动子 - 嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT pAC 连接反应物,5ul TempliPhi 样品缓冲液,5ul TempliPhi 反应缓冲液和 0.2ul TempliPhi 酶混合物;在 30℃下温育 3 小时),使

用 TempliPhi 滚环扩增产生大量连接的 aprE 启动子-嗜热脂肪芽胞杆菌 nprT pAC DNA 分子。然后,将 TempliPhi 反应物直接转化入感受态枯草芽胞杆菌细胞以整合入 aprE 启动子位置,从而产生芽胞杆菌菌株 EL560,这通过 DNA 测序分析得以证实(参见,图 20)。针对在 LA+5ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板上的蛋白酶活性(即脱脂乳清除),选择转化体。然后,将菌株转移到 LA+25ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板进行扩增。D. 热溶芽胞杆菌 npr 的克隆 [0349] 为了构建热溶芽胞杆菌 npr 质粒,分别制备扩增的 aprE 启动子片段(得自 pJHT 载体)和热溶芽胞杆菌 npr 片段(得自质粒 pJ4 :G01908)。图 21 提供了扩增该单独 DNA 片段的示意图。

[0350] 使用重叠延伸拼接(SOE)PCR 反应将 2 个分离的 DNA 片段连接在一起。在该反应中,组合下列试剂:1ul aprE 启动子 DNA 片段,1ul 热溶芽胞杆菌 npr 基因片段,1ul 引物 EL-755(25uM),1ul 引物 EL-741(25uM),5ul 10x PfuUltra II Fusion HSDNA 聚合酶缓冲液,1ul dNTP(10mM),1ul PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶和 39ul 蒸馏的、高压灭菌水以提供 50ul 的总体积。PCR 循环是:95℃持续 2 分钟(仅第一个循环),然后是 95℃持续 30 秒、54℃持续 30 秒和 72℃持续 0:45 秒的 28 个循环。

[0351] 使用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶消化 aprE 启动子-热溶芽胞杆菌 npr 基因+终止子的 PCR 融合片段。使用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶消化 pAC 载体。然后,使用限制性内切核酸酶消化的 pAC 载体连接限制性内切核酸酶消化的 aprE 启动子-热溶芽胞杆菌 npr DNA 片段。然后,采用制造商的方案(即对于~11ul 总反应物,1ul aprE 启动子-热溶芽胞杆菌 npr pAC 连接反应物,5ul TempliPhi 样品缓冲液,5ul TempliPhi 反应缓冲液和 0.2ul TempliPhi 酶混合物;在 30℃下温育 3 小时),使用 TempliPhi 滚环扩增产生大量连接的 aprE 启动子-热溶芽胞杆菌 npr pACDNA 分子。然后,将 TempliPhi 反应物直接转化入感受态枯草芽胞杆菌细胞以整合入 aprE 启动子位置,从而产生芽胞杆菌菌株 EL561(参见,图 22),这通过 DNA 测序分析得以证实。针对在 LA+5ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板上的蛋白酶活性(即脱脂乳清除),选择转化体。然后,将菌株转移到 LA+25ppm 氯霉素 +1.6%脱脂乳平板,进行扩增。E. 结核芽胞杆菌 nprB 的克隆

[0352] 为了构建结核芽胞杆菌 nprB 质粒,分别制备扩增的 aprE 启动子片段(得自 pJHT 载体)和结核芽胞杆菌 nprB 片段(得自质粒 pJ4 :G01905)。图 23 提供了扩增该单独 DNA 片段的示意图。

[0353] 使用重叠延伸拼接(SOE)PCR 反应将 2 个分离的 DNA 片段连接在一起。在该反应中,组合下列试剂:1ul aprE 启动子 DNA 片段,1ul 结核芽胞杆菌 nprB 基因片段,1ul 引物 EL-755(25uM),1ul 引物 EL-744(25uM),5ul 10x PfuUltra II FusionHS DNA 聚合酶缓冲液,1ul dNTP(10mM),1ul PfuUltra II Fusion HS DNA 聚合酶和 39ul 蒸馏的、高压灭菌水以提供 50ul 的总体积。PCR 循环是:95℃持续 2 分钟(仅第一个循环),然后是 95℃持续 30 秒、54℃持续 30 秒和 72℃持续 0:45 秒的 28 个循环。

[0354] 使用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶消化 aprE 启动子-结核芽胞杆菌 nprB 基因+终止子的 PCR 融合片段。使用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶消化 pAC 载体。然后,使用限制性内切核酸酶消化的 pAC 载体连接限制性内切核酸酶消化的 aprE 启动子-结核芽胞杆菌 nprB DNA 片段。然后,将连接混合物转化入 TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞。在识别含有对于质粒 pEL568 正确的 DNA 构建序列的质粒后,将其转化入感受态枯草芽胞杆

菌细胞。针对在 LA+5ppm 氯霉素 +1.6% 脱脂乳平板上的蛋白酶活性（即脱脂乳清除），选择转化体。DNA 质粒制品表明在枯草芽胞杆菌中质粒 pEL568 是稳定的，并且不整合入 aprE 启动子位置。图 24 提供质粒 pEL568 的图。E. 同源模建

[0355] 在又其它实施方式中，提供得自解淀粉芽胞杆菌的 NprE 的成熟结构域的同源模型。在这些实验中，NprE 序列 (SEQ ID NO:192) 的成熟结构域的蛋白质序列通过程序 BlastP (NCBI) 处理。该程序将该序列与不同序列同一性的其它已知序列匹配。从该结果，鉴别 X-射线晶体结构已知的序列。这些序列包括金黄色葡萄球菌 Npr (pdb id 1BQB)、绿脓杆菌 Npr (pdb id 1EZM)、*B. thermolyticus* 嗜热菌蛋白酶 (pdb id 1KEI) 和蜡样芽胞杆菌 Npr (pdb id 1NPC)。图 5 提供所分析的各种序列的序列比对 (SEQ ID NOS:192-195)。

[0356] 发现蜡样芽胞杆菌 Npr 的序列与 NprE 最具有同一性。在接下来的步骤，排除 *B. thermolyticus* 嗜热菌蛋白酶 (pdb id 1KEI)，因为其与蜡样芽胞杆菌 Npr 非常相似。然后，如下详述，制备同源模型，并且使用程序 MOE (Chemical Computing) 进行所有计算。首先，使用已知的结构，比对金黄色葡萄球菌 Npr (pdb id 1BQB; SEQ ID NO:193)、绿脓杆菌 Npr (pdb id 1EZM) (SEQ ID NO:194) 和蜡样芽胞杆菌 Npr (pdb id 1NPC) (SEQ ID NO:195) 序列，以便得到最精确的序列比对（即，产生基于序列比对的结构）。接下来，将 NprE 成熟序列与基于序列比对的该结构进行比对。然后，使用蜡样芽胞杆菌 Npr (pdb id 1NPC) 作为模板并且使用上面产生的 NprE 与蜡样芽胞杆菌 Npr 的序列比对，产生 NprE 的最初同源模型。从该比对的检查，明显的是尽管蜡样芽胞杆菌 Npr 含有 4 个 Ca^{2+} 离子结合位点，然而 NprE 仅含有 2 个 Ca^{2+} 离子结合位点。

[0357] 最后，在建立最初同源模型后，将金属离子（即 Zn^{2+} 和两个 Ca^{2+} ）在计算上固定，也固定它们各自的蛋白质配体。使用 CHARMM22 参数设定，在计算上最小化剩余的模型结构，产生最后的同源模型。实施例 12 洗涤性能检测

[0358] 在该实施例中，描述确定本发明金属蛋白酶的洗涤性能所进行的实验。所有的洗涤性能检测在美国洗涤条件实施，如下面表示：洗衣洗涤性能检测

- 设备: Terg-O-Tometer (US Testing) 6 罐台式型(pot bench top model)
- 温度: 15°C / 60°F
- 洗涤时间: 12 分钟
- 搅拌: 100 rpm
- 漂洗时间: 3 分钟
- 水硬度: CaCO_3 , 每加仑 6 格令/ 105 ppm ($3/1 \text{ Ca}^{+2} / \text{Mg}^{+2}$)
- 肥皂水(Sud)浓度: 1.6 g/l TIDE® 2005 液体洗涤剂基本成分
- 酶剂量: 0.00 – 0.55 – 2.75 – 5.50 mg 活性蛋白/l 洗涤溶液
- 样品: 固定的 EMPA 116, 在 20°C 固定: 在棉织品上的血液、牛奶、墨水(10 x 7.5 cm)
未固定的 EMPA 116: 在棉织品上的血液、牛奶、墨水(10 x 7.5 cm)
Equest 草: 在棉织品上擦洗过的草介质(10 x 7.5 cm)
CFT C-10: 在棉织品上的颜料、油、牛奶(10 x 7.5 cm)
EMPA 221: 使用清洁的棉织品作为纺织品增重物 (10 x 10 cm)
将固定的 6 EMPA 116 + 2 EMPA 221 置入一容器
将未固定的 6 EMPA 116 + 2 EMPA 221 置入一容器
将 6 Equest 草 + 2 EMPA 221 置入一容器
将 6 CFT C-10 + 2 EMPA 221 置入一容器
- 干燥条件: 脱水机, 草污迹在空气中干燥, 用深色衣物覆盖。其它污迹被熨干。
- 测量样品: 使用程式 $L(L*a*b)$ 的 Tristimulus Minolta Meter CR-300, D65 Std. 照明, 在白色背景上。以 Δ 污染除去率%表示。
每个样品读数 3 次(在洗涤之前和洗涤之后)

$$\text{污染除去率}\% = (\text{洗涤后 } L \text{ 值} - \text{洗涤前 } L \text{ 值}) / (L_{0 \text{ 白棉织品}} - \text{洗涤前 } L \text{ 值}) \times 100\%$$

[0359] 所有实验重复四次

[0360] 使用由下列污染的 3 种不同的棉织品样品, 在特别开发的洗涤检测中检测蛋白酶: (a) 牛奶、血液和墨水 (10.0×7.5cm; EMPA), 用数字 116 表示, 未固定的和固定的 (污迹在 20°C 固定); (b) 草介质 (10.0×7.5cm; Equest); 和 (c) 颜料、油和牛奶 (10.0×7.5cm, 用数字 C-10 CFT 表示)。

[0361] 下面更详细的描述这些实验。洗涤检测在装备有 6 个不锈钢检测容器的台式 Terg-O-Tometer (US Testing) 上实施。每一不锈钢检测容器含有 1.6g 的 TIDE® 2005 液体洗涤剂基本成分, 其被溶于 1000ml 105ppm/ 每加仑 6 格令的水中, 并且每一不锈钢检测容器加载 6 份相同的污染的棉织品样品和 2 份额外的纺织品增重物棉织品样品 (EMPA 221)。将选定的蛋白酶 (例如中性金属蛋白酶或其它的蛋白酶) 以每升肥皂水 0.00 到 5.50mg 活性蛋白的浓度加入到每一容器中。

[0362] 在 15°C / 60 °F 下, 伴随 100rpm 搅拌, 实行该检测 12 分钟。洗涤后, 在冷的自来水下漂洗样品 3 分钟, 并将其置于脱水机中。草样品被风干, 并且用深色衣服覆盖, 以限制草

污迹对光的敏感性。其它所有样品被熨干。所有的实验实施四次。

[0363] 使用程式 $L(L^*a^*b)$, 用 Tristimulus Minolta Meter CR-300, 测量检测的样品的反射率。使用下列关系计算洗涤性能值: 污染除去率% = (洗涤后 L 值 - 洗涤前 L 值) / ($L_{0\text{白棉织品}}$ - 洗涤前 L 值) $\times 100\%$

[0364] 对于纯化的 MULTIFECT[®], Terg-O-Tometer (TOM) 分析的结果在图 26 中示出, 并且将其与枯草菌溶素 (BPN' Y217L)、丝氨酸碱性蛋白酶的那些结果进行比较。TOM 提供充分胜任和有效的方法, 以鉴别各种蛋白酶 (例如丝氨酸蛋白酶、中性金属蛋白酶和它们的变体) 的不同洗涤性能。使用 TIDE[®] 2005 作为基本洗涤剂, 在 BMI 和 Equest 介质污染的草表面, 实施 TOM 检测。

[0365] 如在图 26 中所示, 明显地, 纯化的中性金属蛋白酶在洗涤检测中比丝氨酸蛋白酶 (BPN' Y217L) 明显地表现得更好。具体地, 对于 Equest 草污迹, 需要 2.75ppm 的纯化的中性金属蛋白酶以表示出相比于仅 0.55ppm 的丝氨酸蛋白酶 (BPN' Y217L) 的 $\sim 10\%$ 的 Δ 污染除去率%。也检测了低温下中性金属蛋白酶的洗涤性能, 发现其对介质固体 Equest 污迹织物表现很好。用纯化的商业可获得的 MULTIFECT[®] 中性蛋白酶以及用前面描述产生的重组 nprE 得到相似的结果。实施例 13BMI-TIDE[®] 2X 性能分析中 nprE 变体的性能

[0366] 在该实施例中, 描述了在上面列出的 BMI 分析中评估各种 nprE 变体的性能所进行的实验。使用在实施例 1 前提供的方法 (参见, "用于检测蛋白酶性能的微型样本分析")。在下面的表中, 提供了性能指数大于 1 ($PI > 1$) 和性能指数小于 1 ($PI < 1$) 的多取代变体的结果。

[0367] 在表 13.1 中, 提供了在 BMI-TIDE[®] 2X 性能分析中从所选择的单一取代变体得到的数据。该表提供了性能指数, 对于变体当性能指数如上所述计算时, 其相比于 WT 酶显示了提高的性能。性能指数大于 1 的那些变体具有提高的性能。

[0368] 在表 13.2, 提供了在 BMI-TIDE[®] 2X 性能分析中从所选择的多取代变体得到的数据。该表提供了性能指数, 对于变体当性能指数如上所述计算时, 其相比于 WT 酶显示出提高的性能。性能指数大于 1 的那些变体具有提高的性能。

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
T004H	1.07
T004I	1.25
T004K	1.62
T004L	1.01
T004M	1.05
T004N	1.03
T004P	1.18
T004R	1.65
T004V	1.18
T004W	1.21
T004Y	1.32
G012I	1.24
G012K	1.64
G012L	1.25
G012M	1.11
G012Q	1.09
G012R	1.54
G012T	1.38
G012V	1.18
G012W	1.46
T014F	1.17
T014G	1.17
T014I	1.28
T014K	1.53
T014L	1.19
T014M	1.11
T014P	1.04
T014Q	1.24

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
T014R	1.48
T014S	1.07
T014V	1.14
T014W	1.17
T014Y	1.11
E022K	1.79
S023F	1.30
S023I	1.20
S023K	1.67
S023L	1.27
S023M	1.04
S023P	1.23
S023Q	1.22
S023R	1.75
S023V	1.09
S023W	1.41
S023Y	1.06
G024F	1.26
G024H	1.33
G024I	1.24
G024K	1.70
G024L	1.23
G024M	1.14
G024N	1.28
G024P	1.18
G024R	1.67
G024T	1.07
G024V	1.12

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
G024W	1.42
G024Y	1.12
K033H	1.01
Q045F	1.25
Q045H	1.25
Q045I	1.40
Q045K	1.64
Q045L	1.24
Q045N	1.07
Q045R	1.68
Q045T	1.09
Q045W	1.60
N046A	1.06
N046F	1.11
N046G	1.07
N046H	1.32
N046K	1.61
N046L	1.14
N046M	1.13
N046Q	1.22
N046R	1.19
N046S	1.02
N046T	1.20
N046W	1.24
N046Y	1.21
R047K	1.15
Y049F	1.06
Y049I	1.08

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
Y049K	1.10
Y049L	1.06
Y049R	1.54
Y049W	1.34
N050F	1.38
N050H	1.13
N050I	1.36
N050K	1.65
N050L	1.35
N050M	1.05
N050P	1.12
N050Q	1.16
N050R	1.81
N050W	1.46
N050Y	1.27
T054F	1.16
T054G	1.12
T054H	1.17
T054I	1.34
T054K	1.47
T054L	1.26
T054N	1.25
T054Q	1.23
T054R	1.46
T054S	1.03
T054V	1.11
T054W	1.22
T054Y	1.08
S058H	1.03
S058N	1.12
S058Q	1.08
T059G	1.11
T059H	1.32
T059I	1.43
T059K	1.60
T059L	1.31
T059M	1.10
T059N	1.16
T059P	1.19
T059Q	1.31
T059R	1.56
T059V	1.13
T059W	1.32
T060F	1.07
T060I	1.09
T060K	1.49

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
T060L	1.13
T060N	1.07
T060Q	1.10
T060R	1.42
T060V	1.13
T060W	1.23
T060Y	1.07
T065F	1.06
T065H	1.07
T065I	1.12
T065K	1.32
T065L	1.10
T065M	1.09
T065P	1.11
T065Q	1.01
T065R	1.28
T065V	1.15
T065Y	1.09
S066F	1.05
S066H	1.06
S066I	1.24
S066K	1.44
S066L	1.09
S066N	1.00
S066Q	1.12
S066R	1.47
S066V	1.19
S066W	1.21
S066Y	1.06
Q087H	1.06
Q087I	1.17
Q087K	1.30
Q087L	1.07
Q087M	1.00
Q087N	1.06
Q087R	1.35
Q087T	1.08
Q087V	1.04
Q087W	1.15
N090F	1.05
N090H	1.09
N090K	1.37
N090L	1.18
N090R	1.37
N096G	1.00
N096H	1.04

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
N096K	1.54
N096R	1.06
K097H	1.03
K097Q	1.05
K097W	1.02
K100R	1.26
R110K	1.05
D119E	1.05
D119H	1.16
D119I	1.09
D119L	1.21
D119Q	1.17
D119R	1.14
D119S	1.10
D119T	1.23
D119V	1.24
D119W	1.09
G128F	1.10
G128H	1.27
G128K	1.90
G128L	1.20
G128M	1.11
G128N	1.23
G128Q	1.22
G128R	1.94
G128W	1.48
G128Y	1.42
S129A	1.12
S129F	1.11
S129G	1.03
S129H	1.17
S129K	1.33
S129L	1.01
S129R	1.37
S129T	1.04
S129V	1.01
S129W	1.28
S129Y	1.25
F130I	1.03
F130K	1.26
F130R	1.37
F130Y	1.31
S135P	1.03
M138K	1.36
M138Q	1.03
M138V	1.10

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
V140C	1.03
Q151I	1.02
E152A	1.14
E152C	1.15
E152D	1.14
E152F	1.09
E152G	1.03
E152H	1.15
E152L	1.15
E152M	1.12
E152N	1.11
E152R	1.19
E152S	1.02
E152W	1.06
N155D	1.13
N155K	1.05
N155R	1.14
T179A	1.03
T179F	1.15
T179H	1.20
T179I	1.21
T179K	1.62
T179L	1.20
T179M	1.12
T179N	1.04
T179P	1.04
T179Q	1.23
T179R	1.49
T179S	1.02
T179V	1.12
T179W	1.05
T179Y	1.07
V190H	1.02
V190I	1.16
V190K	1.75
V190Q	1.23
V190R	1.67
S191F	1.18
S191G	1.03
S191H	1.29
S191I	1.12
S191K	1.58
S191L	1.07
S191N	1.13
S191Q	1.13
S191R	1.74

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
S191W	1.16
L198M	1.19
L198V	1.05
S199F	1.10
S199I	1.08
S199K	1.64
S199L	1.15
S199N	1.14
S199Q	1.14
S199R	1.68
S199V	1.06
Y204H	1.03
G205F	1.13
G205H	1.61
G205L	1.14
G205M	1.14
G205N	1.39
G205R	2.07
G205S	1.25
G205Y	1.21
K211R	1.23
K214R	1.19
L216F	1.13
L216H	1.05
L216Q	1.05
L216R	1.64
L216Y	1.02
N218K	1.57
N218P	1.27
D220E	1.05
D220H	1.00
D220N	1.04
D220P	1.05
A221F	1.13
A221I	1.14
A221K	1.49
A221L	1.05
A221M	1.01
A221N	1.05
A221V	1.14
A221Y	1.17
G222H	1.01
G222N	1.01
G222R	1.04
Y224F	1.05
Y224H	1.29

表 13.1 对于性能指数
>1 的所有突变的性能分
析结果

变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
Y224N	1.23
Y224R	1.12
T243G	1.13
T243H	1.48
T243I	1.06
T243K	1.87
T243L	1.11
T243Q	1.36
T243R	1.62
T243W	1.25
T243Y	1.14
V260A	1.69
V260D	1.59
V260E	1.17
V260G	2.00
V260H	1.36
V260I	2.09
V260K	1.45
V260L	1.18
V260M	1.41
V260P	1.45
V260Q	1.73
V260R	1.47
V260S	1.59
V260T	1.66
V260W	1.83
V260Y	1.20
T263H	1.06
S265K	1.30
S265N	1.04
S265R	1.28
S265W	1.00
A273I	1.19
A273K	1.47
A273L	1.14
A273N	1.10
A273Q	1.00
A273R	1.78
A273Y	1.07
L282F	1.09
L282G	1.14
L282H	1.17
L282I	1.23
L282K	1.67
L282M	1.01
L282N	1.08

表 13.1 对于性能指数 >1 的所有突变的性能分 析结果	
变体编号	BMI Tide 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
L282Q	1.17
L282R	1.41
L282V	1.22
S285K	1.20
S285R	1.23
Q286K	1.22
Q286R	1.14
A289K	1.23
A289R	1.32
A293R	1.36
N296K	1.28
N296R	1.42
A297K	1.56
A297N	1.02
A297Q	1.02
A297R	1.50
G299N	1.02

表 13.2 对于性能指数>1 的所有变体的 BMI 性能分析结果

变体编号	BMI TIDE® 2X 液体洗涤剂 [性能指数]
S023W-G024M	2.36
T004V-S023W-G024W	2.25
S023W-G024Y-A288V	2.14
T004L-S023W-G024Y	2.09
N046Q-N050F-T054L	2.03
N050Y-T059R-S129Q	1.97
S023W-G024W	1.97
A273H-S285P-E292G	1.94
S023Y-G024Y	1.93
S023Y-G024W	1.92
T004S-S023Y-G024W	1.91
N046Q-T054K	1.90
S023W-G024Y	1.90
T004V-S023W	1.89
T059K-S066N	1.88
N046Q-N050W-T054H-T153A	1.87
T004V-S023W-G024Y	1.85
L282M-Q286P-A289R	1.83
N046Q-R047K-N050Y-T054K	1.82
L044Q-T263W-S285R	1.81
T004L-S023W-G024W	1.79
R047K-N050F-T054K	1.78
A273H-S285R	1.78
N050Y-T059K-S066Q	1.78
T054K-Q192K	1.76
N046Q-N050W	1.75
L282M-Q286K	1.75
T059K-S066Q	1.74
T004S-S023W	1.74
L282M-Q286R-A289R-K11N	1.73
L282M-A289R	1.73
N046Q-N050W-T054H	1.73
T059K-S129Q	1.72
T004S-S023N-G024Y-F210L	1.71
T004V-S023W-G024M-A289V	1.70
L282M-Q286K-A289R-S132T	1.70
N050W-T054H	1.70
L282M-Q286R	1.69
L282F-Q286K-A289R	1.69
T059R-S066Q	1.68

表 13.2 对于性能指数>1 的所有变体的 BMI 性能分析结果

变体编号	BMI TIDE® 2X 液体洗涤剂
R047K-N050W-T054H	1.68
S265P-L282M-Q286K-A289R	1.66
L282M-Q286R-T229S	1.66
L282F-Q286K	1.66
T263W-S285R	1.65
S265P-L282M-Q286K	1.65
T263H-A273H-S285R	1.65
T059R-S129V	1.64
S032T-T263H-A273H-S285R	1.64
T059R-S066Q-S129Q	1.64
T004S-G024W	1.64
T004V-S023W-G024M	1.64
T059K-S066Q-S129Q	1.63
L282M-Q286K-A289R-I253V	1.63
T004V-S023Y-G024W	1.63
T059R-S066N-S129Q	1.62
N050F-T054L	1.62
T004S-S023N-G024W	1.62
T059R-S066N	1.62
T059R-S066N-S129V	1.60
Q286R-A289R	1.60
N046Q-R047K-N050F-T054K	1.60
S265P-L282M-Q286R-A289R	1.57
S265P-L282M-Q286P-A289R	1.68
Q062K-S066Q-S129I	1.59
S023N-G024W	1.59
N046Q-R047K-N050W-T054H	1.58
R047K-T054K	1.58
T004L-G024W	1.58
T014M-T059R-S129V	1.58
T059R-S066Q-N092S-S129I	1.58
R047K-N050W-T054K	1.58
T004V-G024W	1.58
N047K-N050F-T054K	1.57
S265P-L282F-Q286K-N061Y	1.57
L282F-Q286K-E159V	1.57
T004V-S023Y-G024M	1.57
S265P-L282F-A289R-T	1.55

表 13.2 对于性能指数>1 的所有变体的 BMI 性能分析结果	
变体编号	BMI TIDE® 2X 液体洗涤剂
065S	
T059K-F063L-S066N-S129V	1.55
T004L-S023W	1.55
N050F-T054H	1.55
T059R-S066Q-S129V	1.54
V190I-D220E-S265W-L282F	1.54
T004S-S023Y-G024M	1.53
T004L-S023N-G024Y	1.53
T059K-S066N-S129I	1.53
T059R-S066N-S129I	1.53
L282M-Q286R-A289R-P162S	1.52
N046Q-N050F-T179N	1.52
T059K-Y082C-S129V	1.52
T059K-S129I	1.52
N050Y-T054K	1.51
T059K-S066Q-V102A-S129Q	1.51
T059R-S066Q-S129I	1.51
T059W-S066N-S129V-S290R	1.51
T059R-S129I	1.50
T059K-S066Q-S129I	1.50
T059K-S066Q-S129V	1.50
S265P-L282M-Q286R-A289R-T202S-K203N	1.49
T004V-S023N-G024W	1.49
S265P-Q286K	1.49
S265P-L282F-A289R	1.49
D220P-S265W	1.49
L055F-T059W-S129V	1.49
T059R-S129Q-S191R	1.49
N050W-T054K	1.49
T004S-S023W-G024M	1.49
R047K-N050F-T054H	1.48
T059K-S066N-K088E	1.48
T059K-S066Q-S129I-V291L	1.48
L282M-Q286R-A289R	1.48
T059R-S066N-F085S-S129I	1.47
L282F-Q286P-A289R	1.45
L282F-Q286R-A289R	1.47
G099D-S265P-L282F-Q286K-A289R	1.46
N046Q-N050F	1.46

表 13.2 对于性能指数>1 的所有变体的 BMI 性能分析结果	
变体编号	BMI TIDE® 2X 液体洗涤剂
N050Y-T059W-S066N-S129V	1.45
T009I-D220P-S265N	1.45
V190F-D220P-S265W	1.45
N157Y-T263W-A273H-S285R	1.44
T263W-A273H-S285R	1.44
T263W-S285W	1.44
T004V-S023Y	1.43
N046Q-R047K-N050W	1.42
N050W-T054L	1.42
N200Y-S265P-L282F-Q286P-A289R	1.42
T059R-S066Q-P264Q	1.42
T004V-G024Y	1.40
T004L-G024Y	1.40
N050Y-S191I	1.39
N050Y-T054L	1.39
T004L-S023W-G024Y-N155K	1.39
F169I-L282F-Q286R-A289R	1.39
L282M-Q286K-A289R	1.38
F130L-M138L-E152W-D183N	1.38
N046Q-R047K-N050Y-T054H	1.38
T004V-G024M	1.38
N050Y-T059W-S066Q-S129V	1.37
S023N-G024Y	1.37
T054H-P162Q	1.37
T004S-S023W-G024Y	1.37
N050Y-T054H	1.36
L282F-Q286R-A289R-F169I	1.35
R047K-N050W	1.35
V190F-D220P	1.35
L282M-F173Y	1.34
T004L-S023Y	1.33
N050W-A288D	1.33
V190I-D220P-S265Q	1.33
S265P-L282F-Q286P-A289R	1.24
S265P-L282F-Q286R-A289R	1.39
N046Q-N050Y-T054K	1.33
T059W-S066Q	1.31

表 13.2 对于性能指数>1 的所有变体的 BMI 性能分析结果

变体编号	BMI TIDE® 2X 液体洗涤剂
T263W-A273H-S285R	1.44
T263W-A273H-S285W	1.27
S023Y-G024M	1.30
T004L-S023N-G024W	1.30
T004V-S023N-G024Y	1.30
T059W-S066N-S129Q	1.30
T004S-S023Y	1.29
T004S-S023N-G024M	1.29
T059W-S066N-A070T	1.29
T059W-S066Q-S129Q	1.29
T263W-A273H	1.29
A273H-S285P	1.28
N046Q-R047K-N050Y-T054L	1.28
N046Q-R047K-N050Y	1.28
R047K-N050Y	1.27
T263H-S285W	1.26
R047K-N050F	1.25
N046Q-R047K-N050F-T054H	1.25
S023N-G024M	1.25
T004S-G024Y	1.24
R047K-N050Y-T054H	1.24
T059W-S066N-S129I	1.22
R047K-T054L	1.21
T004S-S023W-G024W	1.21
M138L-E152F-T146S	1.21
D220P-S265N	1.21
T004S-G024M	1.20
T004V-S023N	1.20
N046Q-N050F-T054K	1.19
N046Q-N050Y-T054H	1.19
Q062H-S066Q-S129Q	1.19
T059W-S129Q	1.19
T059W-S129V	1.19
N050F-T054K	1.18
R047K-N050F-T054L	1.18
V190I-D220P-S265W	1.18
N112I-T263H-A273H-S285R	1.17
T059W-S066N-S129V	1.17
T059W-S066Q-S129I	1.17
T059W-S129I	1.17
T263W-S285P	1.17
V190I-D220P	1.16
A289V-T263H-A273H	1.16
T263H-A273H-S285P	1.16
N90S-A273H-S285P	1.15

表 13.2 对于性能指数>1 的所有变体的 BMI 性能分析结果

变体编号	BMI TIDE® 2X 液体洗涤剂
R047K-N050Y-T054L	1.15
T004S-S023N	1.15
T059R-S129Q	1.14
N046Q-R047K-T054H	1.14
T059W-S066Q-S129V	1.13
E152W-T179P	1.13
N050Y-S066Q-S129V	1.13
T202S-T263W-A273H	1.13
T263W-A273H-S285P	1.13
M138L-E152W-T179P	1.11
N046Q-R047K	1.10
N046Q-T054H-F176L	1.10
T004L-G024M	1.10
T004S-L282M	1.10
T263H-A273H	1.10
T263H-A273H-S285W	1.10
T004L-S023Y-G024M	1.09
L282F-Q286P	1.09
T004V-S023Y-G024Y	1.09
V190F-S265W	1.09
M138L-E152F	1.08
V190F-D220E-S265W	1.07
N046Q-N050F-T054H	1.06
N157Y-S285W	1.06
T004F-S023Y-G024M	1.06
T004V-S023N-G024M	1.06
L198I-D220E-S265Q	1.05
N046Q-N050Y-T054K-A154T	1.05
S016L-D220E-S265W	1.05
D220E-S265W	1.04
D220E-A237S-S265W	1.04
S066Q-S129Q	1.04
V190F-D220E-S265Q-T267I	1.04
L282M-F173Y-T219S	1.04
E152F-T179P	1.04
V190I-S265W	1.03
M138L-S066Q	1.01
M138L-E152W	1.01
T059W-S066Q-A070T-S129I	1.01
V190F-D220E-S265N	1.01
V190F-S265N	1.01
N046Q-N050Y	1.01
M138L-E152F-T179P	1.00

实施例 14nprE 变体稳定性

[0369] 在该实施例中,描述了确定 nprE 变体稳定性所进行的实验。在这些实验中,使用

在实施例 1 前描述的方法来确定性能指标（参见，前面“在存在洗涤剂情况下，NprE 稳定性分析”）。下面的表提供了具有和不具有 DTPA 检测的性能指数大于 1 ($PI > 1$) 的那些变体的结果。

[0370] 通过在升高温度下，在温育之前和温育之后确定 AGLA 活性，测量稳定性。该表含有相比于在这些条件下 WT 的相对稳定性值。其是（变体残留活性 / WT 残留活性）的商。大于 1 的值表示在存在洗涤剂下具有更高的稳定性。在表 14.1 和 14.2 中，提供数据示出：在这些条件下，具有和不具有 DTPA，相对于 WT NprE 稳定性，NprE 的单取代变体的相对稳定性数据。

[0371] 在表 14.3 和 14.4 中，提供数据示出：在这些条件下，具有和不具有 DTPA，相对于 WT NprE 稳定性，NprE 的多取代变体的相对稳定性数据。

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
T004C	1.19
T004E	1.05
T004L	1.13
T004S	1.00
G012D	1.06
G012E	1.06
K013A	1.39
K013C	1.57
K013D	1.09
K013F	1.30
K013G	1.41
K013H	1.34
K013I	1.33
K013L	1.56
K013M	1.28
K013N	1.39
K013Q	1.34
K013S	1.35

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
K013T	1.22
K013V	1.40
K013Y	1.34
S023A	1.01
S023D	1.08
S023F	1.05
S023G	1.11
S023I	1.05
S023K	1.07
S023L	1.04
S023M	1.11
S023N	1.09
S023Q	1.03
S023R	1.10
S023S	1.45
S023T	1.06
S023V	1.05
S023W	1.08

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
S023Y	1.15
G024A	1.01
G024D	1.05
G024F	1.08
G024G	1.46
G024H	1.05
G024K	1.08
G024L	1.06
G024M	1.10
G024N	1.11
G024R	1.07
G024S	1.02
G024S	1.02
G024T	1.04
G024W	1.11
G024Y	1.08
Q045D	1.02
Q045E	1.28

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
N046C	1.29
N046E	1.35
N046Q	1.07
R047K	1.09
R047L	1.13
R047M	1.00
R047S	1.21
N050D	1.04
N050F	1.07
N050P	1.03
N050W	1.04
N050Y	1.04
T054C	1.04
T054D	1.04
T054E	1.03
T054F	1.03
T054H	1.11
T054I	1.04
T054K	1.11
T054L	1.08
T054M	1.06
T054N	1.07
T054Q	1.03
T054R	1.04
T054S	1.05
T054V	1.01
T054W	1.07
T054Y	1.07
T059A	1.04
T059C	1.04
T059E	1.02
T059G	1.13
T059H	1.07
T059I	1.01
T059K	1.16
T059M	1.10
T059N	1.15
T059P	1.12
T059Q	1.04
T059R	1.28

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
T059S	1.04
T059W	1.26
T060N	1.03
T065E	1.01
S066C	1.36
S066D	1.42
S066E	1.58
S066N	1.01
S066Q	1.01
Q087D	1.25
Q087E	1.32
N090C	1.10
N090D	1.01
K100H	1.09
K100P	1.01
R110A	1.17
R110C	1.28
R110E	1.20
R110H	1.12
R110K	1.04
R110L	1.23
R110M	1.23
R110N	1.11
R110Q	1.28
R110S	1.10
R110Y	1.12
D119H	1.15
G128C	1.00
S129A	1.06
S129C	1.38
S129D	1.23
S129H	1.30
S129I	1.68
S129K	1.05
S129L	1.35
S129M	1.33
S129Q	1.44
S129T	1.36
S129V	1.55
S129Y	1.06

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
F130I	1.14
F130K	1.04
F130L	1.52
F130M	1.66
F130Q	1.10
F130T	1.41
F130V	1.06
S137A	1.46
M138L	1.43
E152F	1.15
E152H	1.36
E152W	1.31
T179P	1.50
V190I	1.68
V190L	1.93
S199C	1.27
S199E	1.95
Y204T	1.03
K211A	1.96
K211C	1.30
K211D	1.89
K211M	1.20
K211N	1.29
K211Q	2.00
K211S	1.43
K211T	1.18
K211V	1.52
K214A	1.74
K214C	1.62
K214I	1.17
K214M	1.27
K214N	1.35
K214Q	2.09
K214V	2.00
L216C	1.35
T219D	1.05
D220A	1.11
D220E	2.44
D220P	2.66
A221D	1.04

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体 编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况 下的稳定性
A221E	1.57
G222C	1.72
T243C	1.30
T243I	1.17
K244A	1.61
K244C	1.75
K244D	2.00
K244E	1.77
K244F	1.27
K244G	1.23
K244L	1.55
K244M	1.79
K244N	1.25
K244Q	1.82
K244S	1.87
K244T	1.65
K244V	1.82
K244W	1.01
K244Y	1.45
V260E	1.07
V260K	1.17
V260L	1.28
V260M	1.21
V260P	1.22
V260S	1.00
V260T	1.03
V260W	1.02
Y261C	1.28
Y261F	1.07
Y261I	1.20
Y261L	1.14
T263E	1.12
T263F	1.19
T263H	1.01
T263L	1.02
T263Q	1.12
T263V	1.25
T263W	1.40
T263Y	1.06
S265A	1.04

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体 编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况 下的稳定性
S265C	1.11
S265D	1.11
S265E	1.34
S265P	1.72
S265Q	1.00
S265T	1.15
S265V	1.17
K269E	1.61
K269F	1.21
K269G	1.32
K269H	1.63
K269I	1.73
K269L	1.53
K269M	1.52
K269N	1.60
K269P	1.47
K269Q	1.55
K269S	1.51
K269T	1.89
K269V	1.43
K269W	1.00
K269Y	1.38
A273C	1.19
A273D	1.29
A273H	1.14
R280A	1.33
R280C	1.96
R280D	1.82
R280E	1.77
R280F	1.46
R280G	1.21
R280H	1.52
R280K	1.14
R280L	1.78
R280M	1.78
R280S	1.46
R280T	1.35
R280W	1.51
R280Y	1.56
L282F	1.06

表 14.1 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性结果

变体 编号	在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况 下的稳定性
L282M	1.16
L282Y	1.04
S285A	1.16
S285C	1.27
S285D	1.39
S285E	1.59
S285K	1.00
S285P	1.30
S285Q	1.10
S285R	1.38
S285W	1.28
Q286A	1.04
Q286D	1.08
Q286E	1.31
Q286K	1.09
Q286P	1.15
Q286R	1.18
A289C	1.24
A289D	1.04
A289E	1.15
A289L	1.05
A293C	1.11
N296D	1.11
N296E	1.87
N296V	1.37
A297C	1.07

表 14.2 在不含有 DTPA 的
TIDE® 2X 中变体
的稳定性

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存 在的情况下的 稳定性
T004C	1.16
T004V	1.04
K013A	1.52
K013C	1.83
K013D	1.47
K013F	1.02
K013G	1.61
K013H	1.62
K013I	1.19
K013L	1.54
K013M	1.48
K013N	1.70
K013Q	1.55
K013S	1.56
K013T	1.39
K013V	1.49
K013Y	1.39
S023A	1.03
S023D	1.23
S023G	1.25
S023M	1.05
S023N	1.25
S023Q	1.10
S023S	1.50
S023W	1.02
S023Y	1.07
G024D	1.05
G024G	1.41
Q045C	1.01
Q045D	1.02
Q045E	1.41
Q045M	1.01
N046C	1.53
N046E	1.41
R047K	1.12
R047L	1.20
R047M	1.08
R047Q	1.13
R047S	1.25
Y049D	1.16
Y049H	1.02

表 14.2 在不含有 DTPA 的
TIDE® 2X 中变体
的稳定性

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存 在的情况下的 稳定性
Y049N	1.07
Y049S	1.01
N050D	1.08
N050F	1.07
N050G	1.02
N050P	1.23
N050W	1.01
T054C	1.07
T054D	1.01
T054E	1.08
T054H	1.08
T054I	1.09
T054K	1.03
T054L	1.09
T054Q	1.09
T054V	1.14
T054W	1.02
T054Y	1.14
T059A	1.05
T059C	1.07
T059E	1.25
T059M	1.04
T059P	1.18
T059Q	1.05
T059S	1.09
T065C	1.04
T065E	1.07
S066C	1.61
S066D	1.61
S066E	1.80
S066N	1.08
Q087D	1.27
Q087E	1.30
N090C	1.09
N090D	1.00
N090E	1.03
K100A	1.00
K100D	1.07
K100E	1.03
K100F	1.07
K100H	1.16

表 14.2 在不含有 DTPA 的
TIDE® 2X 中变体
的稳定性

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存 在的情况下的 稳定性
K100N	1.06
K100P	1.06
K100Q	1.06
K100S	1.05
K100Y	1.10
R110A	1.11
R110C	1.24
R110E	1.19
R110H	1.09
R110K	1.08
R110L	1.11
R110M	1.12
R110N	1.18
R110Q	1.25
R110S	1.09
R110Y	1.16
D119H	1.03
G128C	1.15
S129A	1.13
S129C	1.86
S129D	1.52
S129H	1.60
S129I	2.32
S129K	1.18
S129L	1.70
S129M	1.64
S129Q	1.86
S129T	1.59
S129V	2.34
S129Y	1.28
F130I	1.18
F130L	1.29
F130M	1.44
F130Q	1.17
F130T	1.32
F130V	1.05
S137A	1.37
M138L	1.11
E152A	1.01
E152C	1.16
E152F	1.32

表 14.2 在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 中变体的稳定性

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
E152H	1.53
E152N	1.12
E152W	1.32
N155Q	1.07
T179P	1.33
V190I	1.37
V190L	1.40
S199C	1.18
S199D	1.11
S199E	1.71
K211A	1.77
K211C	1.18
K211D	1.67
K211G	1.06
K211M	1.17
K211N	1.44
K211Q	1.51
K211S	1.44
K211T	1.17
K211V	1.26
K214A	1.47
K214C	1.54
K214E	1.42
K214I	1.14
K214M	1.19
K214N	1.15
K214Q	1.84
K214V	1.79
L216C	1.31
D220A	1.07
D220E	2.23
D220P	2.24
A221D	1.15
A221E	1.47
G222C	1.89
T243C	1.34
T243I	1.13
K244A	1.57
K244C	1.40
K244D	1.58
K244E	1.56
K244F	1.05

表 14.2 在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 中变体的稳定性

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
K244G	1.01
K244L	1.38
K244M	1.37
K244N	1.18
K244Q	1.42
K244S	1.55
K244T	1.51
K244V	1.42
K244Y	1.19
V260K	1.09
V260L	1.08
V260P	1.12
V260Y	1.02
Y261I	1.19
Y261L	1.11
T263F	1.11
T263H	1.03
T263M	1.08
T263Q	1.04
T263V	1.22
T263W	1.37
T263Y	1.05
S265C	1.03
S265D	1.02
S265E	1.22
S265N	1.07
S265P	1.43
S265T	1.10
S265V	1.09
K269E	1.33
K269F	1.10
K269G	1.17
K269H	1.52
K269I	1.34
K269L	1.34
K269M	1.34
K269N	1.25
K269P	1.26
K269Q	1.39
K269S	1.50
K269T	1.32
K269V	1.39

表 14.2 在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 中变体的稳定性

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性
K269Y	1.38
A273C	1.12
A273D	1.16
A273H	1.10
R280A	1.32
R280C	1.77
R280D	1.52
R280E	1.67
R280F	1.37
R280G	1.16
R280H	1.31
R280K	1.07
R280L	1.64
R280M	1.60
R280S	1.46
R280T	1.28
R280V	1.10
R280W	1.42
R280Y	1.49
L282M	1.03
S285A	1.03
S285C	1.10
S285D	1.25
S285E	1.36
S285P	1.14
S285Q	1.05
S285R	1.10
S285W	1.12
Q286D	1.05
Q286E	1.17
Q286P	1.04
Q286R	1.02
A289C	1.05
A289E	1.13
A289L	1.06
N296C	1.01
N296D	1.02
N296E	1.67
N296V	1.32
A297C	1.02

表 14.3 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性 [性能指数]
V190I-D220P	3.08
V190I-D220P-S265Q	2.63
V190L-D220E	2.59
V190I-D220E-S265Q	2.57
V190I-D220E-S265W-L282F	2.52
V190L-D220E-S265Q	2.43
V190I-D220E-S265W	2.38
V190L-D220E-S265N	2.34
T059R-S066Q-S129I	2.33
V190I-D220E-S265N	2.32
V190L-D220E-S265W	2.30
V190I-D220E	2.29
T059W-S066N-S129V	2.28
T059K-S066Q-S129V	2.27
T059K-Y082C-S129V	2.27
T059R-S066N-S129I	2.27
S066Q-S129V	2.25
T059R-S066Q-S129V	2.25
T059R-S129I	2.24
N050Y-T059W-S066N-S129V	2.21
D220P-S265N	2.21
S066Q-S129I	2.21
T059W-S066Q-S129V	2.20
T059K-S066Q-S129I	2.20
T059R-S129V	2.19
N050Y-S066Q-S129V	2.19
T059W-S066Q-S129I	2.19
N050Y-T059W-S066Q-S129V	2.18
T059K-S129I	2.17
D220P-S265W	2.17
F130L-M138L-T179P	2.16
S066N-S129I	2.15
T059R-S066N-S129V	2.15
F130I-M138L-T179P	2.14
T059R-S066Q-N092S-S129I	2.13
S066N-S129V	2.11
D220E-S265Q	2.11
F130L-M138L-E152W-T179P	2.10
T059W-S129V	2.10
S265P-L282M-Q286R-A289R	2.09
S265P-L282F-Q286R-A289R	2.09
T059W-S066N-S129I	2.08
V190I-D220P-S265W	2.08
F130L-E152W-T179P	2.06

表 14.3 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性 [性能指数]
F130L-M138L-E152F-T179P	2.06
Q062K-S066Q-S129I	2.04
T059K-S066N-S129I	2.04
E152H-T179P	2.03
S265P-L282M-Q286K-A289R	2.03
F130L-M138L-E152H-T179P	2.02
T263W-A273H-S285R	2.00
D220E-S265N	1.99
F130I-M138L-E152H-T179P	1.99
F130V-M138L-E152W-T179P	1.99
F130I-M138L-E152W-T179P	1.99
T059W-S129I	1.97
D220E-S265W	1.97
F130V-M138L-T179P	1.96
F130L-E152V-T179P	1.96
T059R-S129Q	1.95
T263W-S285P	1.94
F130I-M138L-E152F-T179P	1.93
E152W-T179P	1.93
V190L-S265Q	1.93
F130L-E152F-T179P	1.92
L282M-Q286R-A289R-P162S	1.91
D220P-S265Q	1.91
M138L-E152F-T179P	1.91
F130I-E152H-T179P	1.91
M138L-E152W-T179P	1.91
F130L-T179P	1.90
F130L-M138L-E152W-T179P-Q286H	1.90
F130L-M138L-E152H	1.89
T263W-A273H-S285W	1.89
S265P-Q286K	1.88
T059W-S066Q-S129Q	1.87
T263W-S285R	1.85
T059W-S066N-S129Q	1.83
T263W-S285W	1.83
T059R-S066N-S129Q	1.83
S265P-L282M-Q286R-A289R-T202S-K203N	1.81
T059W-S129Q	1.81
Q062H-S066Q-S129Q	1.81
L282M-Q286R-A289R	1.80
V190L-D220E-S265N-V291I	1.80
V190L-S265N	1.80

表 14.3 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性 [性能指数]
F130L-M138L-E152W	1.79
N050Y-T059R-S129Q	1.79
F130I-T179P	1.78
T059K-S066Q-S129Q	1.78
T059K-S129Q	1.78
S265P-L282M-Q286P-A289R	1.77
S265P-L282F-Q286P-A289R	1.77
T263W-A273H-S285P	1.77
S265P-L282M-Q286K	1.76
S016L-D220E-S265W	1.76
S066Q-S129Q	1.76
S265P-L282M-Q286P	1.75
L282F-Q286R-A289R	1.75
F130V-E152W-T179P	1.74
L044Q-T263W-S285R	1.74
L055F-T059W-S129V	1.74
V190L-S265W	1.74
Q286R-A289R	1.74
G99D-S265P-L282F-Q286K-A289R	1.73
F130L-M138L-E152F	1.73
T059R-S066Q-S129Q	1.72
F130L-E152H	1.71
S066N-S129Q	1.71
T004S-S023N-G024M-K269N	1.71
S265P-L282M	1.71
E152F-T179P	1.71
T059W-S066N-S129V-S290R	1.68
L282F-Q286K-A289R	1.67
F130L-M138L	1.66
F130I-M138L-E152W	1.65
S265P-L282F	1.65
F130I-M138L-E152H	1.65
F130V-M138L-E152H	1.64
V190I-S265Q	1.64
M138L-E152M	1.61
S265P-L282F-Q286P	1.59
M138L-E152H	1.59
T059K-S066N-K088E	1.59
V190I-S265W	1.59
F130L-E152W	1.59
L282M-Q286K-A289R	1.58
L282M-Q286K-A289R-I253V	1.57
T263W-A273H	1.56

表 14.3 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性 [性能指数]
V190I-S265N	1.55
M138L-E152W	1.55
A273H-S285R	1.52
F130I-M138L	1.51
F130L-E152F	1.50
F130V-M138L-E152W	1.50
T059K-S066Q-V102A-S129Q	1.48
F130V-E152H-T179P	1.47
F130I-M138L-E152F	1.47
F130V-M138L-E152F	1.44
M138L-E152F	1.44
L282M-Q286R	1.43
F130I-E152H	1.43
S265P-L282F-A289R-T065S	1.43
T263H-A273H-S285R	1.43
F130V-M138L	1.42
T014M-T059R-S129V	1.42
L282M-Q286R-A289R-K11N	1.41
A273H-S285P	1.41
L282M-Q286K-A289R-S132T	1.40
T263H-A273H-S285W	1.39
F130V-E152W	1.38
S265P-L282F-Q286K-N061Y	1.37
F130I-E152W	1.36
L198I-D220E-S265Q	1.36
V190I-S265L	1.36
T263H-S285W	1.35
S265P-L282F-A289R	1.34
M138L-S066Q	1.32
F130I-E152F	1.32
N90S-A273H-S285P	1.31
S032T-T263H-A273H-S285R	1.31
L282F-Q286P-A289R	1.28
N157Y-T263W-A273H-S285R	1.27
V105A-S129V	1.26
T263H-A273H-S285P	1.25
S129Q-L282H	1.23
T059W-S066Q	1.23
F130V-E152H	1.21
S023W-G024Y	1.21
T004V-S023N	1.21
T059R-S066Q	1.21
N050W-T054L	1.20
L282M-Q286P-A289R	1.20

表 14.3 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性 [性能指数]
A115V-V190L-S265W	1.19
L282M-Q286K	1.19
T059R-S066N	1.18
L282F-Q286P	1.15
T004V-S023W-G024M	1.15
S265P-L282F-Q286R-L78H	1.15
L282F-Q286K	1.14
T004V-S023W-G024Y	1.14
S023W-G024M	1.13
T059R-R256S	1.13
F130V-E152F	1.12
T004V-G024W	1.12
N050W-T054K	1.11
S023Y-G024M	1.11
T004V-S023Y	1.11
T004V-S023Y-G024M	1.11
N050Y-T054H	1.10
S023W-G024W	1.10
T004V-S023Y-G024Y	1.10
T004V-S023N-G024W	1.09
F130L-M138L-E152F-T179P-V291I	1.09
N050Y-T059K-S066Q	1.09
T004V-S023Y-G024W	1.09
T059K-S066N	1.09
T004V-S023N-G024Y	1.09
S023Y-G024W	1.09

表 14.3 在含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性 [性能指数]
N050F-T054L	1.08
R047K-T054K	1.08
S023N-G024W	1.07
L282M-A289R	1.07
S023Y-G024Y	1.07
T004V-G024M	1.07
L282F	1.06
R047K-N050F-T054K	1.06
N050F-T054K	1.05
T059K-S066Q	1.05
S023N-G024M	1.05
S023N-G024Y	1.04
T004L-S023N	1.04
R047K-N050W-T054H	1.04
T004L-S023W-G024Y	1.04
T004S-S023W	1.03
N046Q-N050W-T054H-A142T	1.03
T004L-S023Y	1.03
T004V-S023W	1.03
N050W-T054H	1.02
T004S-S023N	1.02
T004S-L282M	1.02
T004L-S023W	1.02
N050F-T054H	1.01
N050Y-T054L	1.00
R047K-N050W-T054K	1.00

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
S066Q-S129V	2.24
S066Q-S129I	2.19
N050Y-S066Q-S129V	2.12
S066N-S129I	2.08
T059K-S066Q-S129V	2.06

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
S066N-S129V	2.05
F130L-E152W-T179P	1.98
S265P-L282M-Q286R-A289R	1.96
F130L-E152V-T179P	1.96

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
T059K-S066Q-S129I	1.91
T263W-S285P	1.85
T059K-S066N-S129I	1.84
T263W-A273H-S285P	1.83
S265P-L282F-Q286R-A289R	1.83
F130V-E152W-T179P	1.83
T263W-A273H-S285R	1.82
V190I-D220P-S265W	1.79
F130L-E152H	1.78
S066N-S129Q	1.77
S265P-L282M-Q286K-A289R	1.77
V190I-D220E	1.76
T059R-S066N-S129I	1.76
V190I-D220E-S265W	1.75
T059K-S129I	1.75
T059R-S066Q-S129I	1.75
F130I-M138L-E152H-T179P	1.74
F130I-T179P	1.74
T263W-A273H-S285W	1.73
S016L-D220E-S265W	1.72
S066Q-S129Q	1.72
V190I-D220E-S265Q	1.72
T059R-S066Q-S129V	1.71
D220E-S265N	1.69
V190L-D220E	1.69
D220E-S265W	1.68
V190I-D220P	1.68
V190L-D220E-S265N	1.68

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
L044Q-T263W-S285R	1.67
S265P-L282M-Q286P-A289R	1.67
F130L-M138L-E152H-T179P	1.66
T263W-S285R	1.66
L282M-Q286R-A289R	1.65
T263W-S285W	1.65
F130I-E152H-T179P	1.65
V190I-D220E-S265N	1.64
V190L-D220E-S265W	1.63
V190I-D220P-S265Q	1.63
T059R-S066N-S129V	1.62
V190L-D220E-S265Q	1.62
E152H-T179P	1.62
F130L-M138L-E152F-T179P	1.61
Q062H-S066Q-S129Q	1.59
T059R-S129V	1.58
V190I-D220E-S265W-L282F	1.58
V190I-S265Q	1.58
F130L-E152F-T179P	1.58
D220E-S265Q	1.57
E152W-T179P	1.56
T059K-S066Q-S129Q	1.56
F130L-M138L-T179P	1.55
F130I-M138L-E152F-T179P	1.55
F130L-M138L-E152W-T179P	1.54
N050Y-T059W-S066Q-S129V	1.54

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
S265P-L282M-Q286K	1.54
T059R-S129I	1.53
F130V-E152H-T179P	1.53
D220P-S265N	1.52
S265P-L282M-Q286P	1.51
F130I-E152H	1.51
T059R-S066Q-N092S-S129I	1.51
F130L-T179P	1.49
G99D-S265P-L282F-Q286K-A289R	1.48
T263W-A273H	1.48
V190I-S265N	1.48
D220P-S265W	1.47
F130L-E152W	1.47
F130L-M138L-E152H	1.46
S265P-L282M	1.45
V190I-S265Q	1.45
F130L-E152F	1.45
T059K-S129Q	1.45
Q286R-A289R	1.45
M138L-E152W-T179P	1.44
F130I-M138L-E152H	1.43
D220P-S265Q	1.42
V190L-S265N	1.42
F130I-M138L-E152W	1.42
S265P-Q286K	1.41
V190L-S265Q	1.41
V190I-S265W	1.40
F130L-M138L-E152F	1.40
F130V-E152H	1.40
E152F-T179P	1.39
N050Y-T059W-S066N-S129V	1.38

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
T059R-S066N-S129Q	1.38
F130I-E152W	1.37
F130V-E152W	1.37
T059R-S066Q-S129Q	1.37
T263H-A273H-S285P	1.36
N90S-A273H-S285P	1.36
V190L-D220E-S265N-V291I	1.36
T059R-S129Q	1.35
A273H-S285P	1.34
F130I-M138L-E152W-T179P	1.34
F130V-M138L-E152F	1.34
N050Y-T059R-S129Q	1.34
T059W-S066Q-S129I	1.34
F130V-M138L-T179P	1.34
F130V-M138L-E152W-T179P	1.33
V190L-S265W	1.33
F130V-M138L-E152W	1.32
T059W-S066Q-S129V	1.32
V190I-S265Q	1.32
F130V-M138L-E152H	1.32
F130I-E152F	1.31
N157Y-T263W-A273H-S285R	1.31
T263H-S285W	1.30
M138L-E152F-T179P	1.30
A115V-V190L-S265W	1.29
M138L-E152M	1.29
T263H-A273H-S285W	1.29

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
F130L-M138L-E152W	1.28
T059K-S066N-K088E	1.28
F130I-M138L-E152F	1.27
F130I-M138L-T179P	1.27
T004V-S023N	1.26
T059K-S066Q-V102A-S129Q	1.26
F130L-M138L	1.26
N047K-N050F-T054K	1.24
T263H-A273H-S285R	1.24
F130L-M138L-E152W-T179P-Q286H	1.23
M138L-E152H	1.22
M138L-S066Q	1.22
L282M-Q286R-A289R-P162S	1.21
L282F-Q286R-A289R	1.21
Q062K-S066Q-S129I	1.21
A273H-S285R	1.20
S265P-L282F-Q286P	1.20
S265P-L282F-Q286P-A289R	1.20
S265P-L282M-Q286R-A289R-T202S-K203N	1.19
T059W-S066N-S129I	1.19
V190I-S265L	1.18
T059W-S066N-S129V	1.18
F130I-M138L	1.16
L282M-Q286K-A289R-I253V	1.16

表 14.4 在不含有 DTPA 的 25% TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果

变体编号	在不含有 DTPA 的 TIDE® 2X 存在的情况下的稳定性分析结果 [性能指数]
R047K-N050F-T054K	1.15
M138L-E152F	1.15
N050W-T054K	1.15
L198I-D220E-S265Q	1.13
L282F-Q286K-A289R	1.13
N050F-T054K	1.13
L282M-Q286R	1.13
M138L-E152W	1.13
S265P-L282F	1.12
F130V-E152F	1.12
T059W-S066N-S129Q	1.10
F130V-M138L	1.09
T263H-A273H	1.09
L282M-Q286K-A289R	1.07
N046Q-N050W-T054H-A142T	1.07
T059W-S066Q-S129Q	1.07
S265P-L282F-A289R-T065S	1.07
N050F-T054H	1.07
S129Q-L282H	1.06
L282M-Q286K-A289R-S132T	1.03
L282M-Q286R-A289R-K11N	1.03
T059K-S066N	1.02
R047K-N050W-T054K	1.01
T059K-S066Q	1.01
T004V-S023Y	1.01
T059W-S066N-S129V-S290R	1.00
N050Y-T059K-S066Q	1.00
R047K-N050Y	1.00

[0372] 下列表中(表 14.5)的数据表示,在柠檬酸盐稳定性分析中,相对于 WT NprE 稳定性的稳定性,NprE 变体的相对稳定性数据。通过在升高温度下,在温育之前和温育之后,确

定 AGLA 活性而确定酪蛋白活性来测量稳定性（参见上文“柠檬酸盐稳定性分析”）。该表含有在这些条件下相比于 WT 的相对稳定性值。其表示为（变体残留活性 / WT 残留活性）的商。大于 1 的值表示在存在洗涤剂下具有更高的稳定性。

表 14.5 柠檬酸盐稳定性
分析结果

变体编号	相对柠檬酸盐稳定性
K013C	1.22
K013D	1.32
K013E	1.07
K013H	1.50
K013Q	1.38
K013S	1.11
T014G	1.31
T014H	1.75
T014K	1.62
T014M	1.09
T014P	1.07
T014Q	2.01
T014R	1.32
T014V	1.03
S023A	1.12
S023G	1.13
S023I	1.13
S023K	1.39
S023M	1.00
S023N	1.42
S023T	1.15
S023V	1.20
S023W	1.22
G024D	1.38
G024F	1.90
G024H	1.09
G024M	1.23
G024R	1.03
G024S	1.11
G024T	1.03
G024W	1.03
Q045D	1.07
Q045E	1.12
Q045M	1.02
Q045N	1.16
Q045P	1.44

表 14.5 柠檬酸盐稳定性
分析结果

变体编号	相对柠檬酸盐稳定性
N046G	1.10
N046H	1.05
N046I	1.46
N046P	1.47
N046V	1.11
N046Y	1.01
R047E	1.09
R047T	1.07
Y049A	1.02
Y049C	1.03
Y049D	1.01
Y049E	1.04
Y049I	1.08
Y049K	1.04
Y049T	1.16
Y049V	1.19
Y049W	1.00
T054D	1.01
T054H	1.09
T054K	1.02
T054L	1.06
T054P	1.63
T054Q	1.17
T054R	1.11
T054S	1.09
T054W	1.02
S058I	1.23
S058L	1.71
S058N	1.08
S058P	2.53
T059E	1.08
T059H	1.19
T059I	1.02
T059K	1.21
T059L	1.16
T059M	1.04

表 14.5 柠檬酸盐稳定性
分析结果

变体编号	相对柠檬酸盐稳定性
T059S	1.07
S066D	1.03
S066E	1.03
S066P	1.13
S066Q	1.05
S066T	1.17
S066V	1.00
Q087A	1.05
Q087L	1.08
Q087S	1.15
Q087T	1.19
N090D	1.17
N090F	1.02
N090G	1.04
N090L	1.25
N090T	1.02
N096G	1.02
K100D	1.30
K100N	1.28
K100P	1.04
K100V	1.01
D119H	1.05
D119T	1.03
D119W	1.00
G136I	1.10
G136L	1.20
G136P	2.19
G136V	2.03
G136W	2.23
G136Y	1.56
M138L	1.48
D139A	2.52
D139C	2.22
D139E	1.51
D139G	2.54
D139H	1.88

表 14.5 柠檬酸盐稳定性
分析结果

变体编号	相对柠檬酸盐稳定性
D139I	2.40
D139K	2.27
D139L	1.53
D139M	2.49
D139P	2.21
D139R	2.54
D139S	2.22
D139V	1.51
D139W	1.94
D139Y	2.54
E152C	1.17
E152F	1.21
E152G	1.09
E152H	1.29
E152R	1.12
E152S	1.17
E152W	1.21
D178A	2.07
D178C	1.79
D178G	2.35
D178H	2.07
D178K	1.73
D178L	1.74
D178M	2.40
D178N	2.34
D178P	1.83
D178Q	1.22
D178R	2.00
D178S	2.58
D178T	1.75
D178V	1.73
D178W	1.02
D178Y	1.78
E186A	2.31
E186C	2.42
E186D	2.03
E186G	2.09
E186H	1.87
E186K	2.69
E186L	1.75
E186M	2.62
E186N	1.72
E186P	2.60
E186Q	1.92
E186R	2.69
E186S	2.57
E186T	2.69

表 14.5 柠檬酸盐稳定性
分析结果

变体编号	相对柠檬酸盐稳定性
E186V	2.10
E186W	2.47
E186Y	2.48
V190I	1.38
V190L	1.41
K211A	1.33
K211M	1.26
K211Q	1.16
K211S	1.28
K214A	1.38
K214C	1.12
K214E	1.08
K214I	1.30
K214L	1.14
K214M	1.03
K214Q	1.47
K214R	1.12
K214S	1.05
K214V	1.49
L216A	1.05
L216C	1.04
L216S	1.19
D220E	1.69
D220H	1.17
D220K	1.17
D220N	1.01
D220P	1.20
A221D	1.11
A221S	1.05
G222C	1.01

实施例 15 与 BPN' 217L 相比, nprE 的 pH 性能曲线

[0373] 在该实施例中, 描述评估 nprE 和 BPN' Y217L 比较性能所进行的实验。在这些实验

中,使用 EMPA 116(BMI) 和 Equest 草污迹。材料:NprE,8mg/mL BPN' Y217L,25.6mg/mL EMPA 116 污 染 衣 物,3"×4.5"(Testfabrics)Equest 草 (med.),3"×4"(Warwick Equest) EMPA221 白色棉织品样品,3"×4.5"Minolta Chromameter CR200TIDE® 2005(Procter & Gamble 提供)水硬浓缩物:每加仑 15,000 格令 (gpg),3 : 1 Ca : Mg 1M Bis-TRIS- 丙烷缓冲液浓硫酸具有塞子和搅拌器的 50L 混合罐 Terg-0-Tometer DI 水

[0374] 制备样品进行处理。每个处理使用 18 个样品,进行三次平行测定。在暗室制备草样品以防止褪色。使用 Minolta Chromameter 得到大约 18 份污染的样品的反射度值。每个样品得到三个读数。记录 L 值、平均 L 值和标准差。其是 $L_{\text{初始}}$ 值。

[0375] 如下制备洗涤剂溶液(总共 40L)。优选在检验前的晚上制备该溶液。将该溶液冷藏储存过夜。通过加入 39.724Kg 的 DI 水至 50L 混合物罐中、启动搅拌器、在 60 克的 TIDE® 液体洗涤剂混合、在 16mL 的水硬性溶液中混合、以及混合 200mL 的 1M Bis-TRIS- 丙烷,制备溶液。使用浓硫酸调节 pH(如果溶液储存过夜,那么将 pH 调节到期望 pH 以下 0.2pH 单位,因为 pH 过夜缓慢升高)。终浓度是:TIDE® = 1.5g/L;水硬度 = 6gpg;和 Bis-TRIS- 丙烷 = 5mM。

[0376] 对于在 Terg-0-Tometer 的检测,将 1L 的洗涤剂溶液加入每一 Terg 罐,并且使达到温度。将不同浓度的酶加入到罐内。对于 BMI 检测,使用的酶浓度为 0mg/L、0.275mg/L、0.55mg/ml、1.65mg/L、2.65mg/L 和 5.50mg/L。对于草污迹,使用的 nprE 浓度为 0mg/L、0.1925mg/L、0.385mg/L、1.155mg/L、1.925mg/L 和 3.85mg/L(BPN' Y217L 的浓度与在 BMI 检测中使用的浓度相同)。开始搅拌并加入样品。在同一 Terg-0-Tometer 中,并排进行所有的平行测定(例如第一轮中 0X&1/2X,第二轮 1X&3X 以及第 3 轮 5X&10X)。温度为 15°C,搅拌速度是 100cpm,并且洗涤时间是 12 分钟。在 4L 自来水(~6gpg)中漂洗处理的样品 3 遍。在纸巾上风干样品过夜。用纸巾覆盖草样品,并且使其在暗室中干燥。如上所述,确定干燥的样品的反射度值。每个样品得到三个读数。记录 L 值、平均 L 值和标准差。其是 $L_{\text{最终}}$ 值。

[0377] 对于每一检测条件和两种酶,使用下面的等式,确定污染除去百分比(%SR):

$$\%SR = \frac{(L_{\text{最终}} - L_{\text{初始}})}{(L_0 - L_{\text{初始}})} \times 100\%$$

其中: L_0 = 清洁样品的反射度 $L_{\text{初始}}$ = 污染样品的反射度 $L_{\text{最终}}$ =

洗涤样品的反射度

[0378] 使用下面的式子,确定相对于无酶对照的 $\Delta SR\%$: $\Delta SR\% = SR_{\text{处理}}\% - SR_{\text{无酶对照}}\%$

[0379] 对于 EMPA 116(BMI),在 pH 值 6.7、7.5、8.5 和 9.5 下,将 BPN' Y217L 与 nprE 比较。对于 EMPA 116,nprE 的性能在大约 pH 8 出现峰值,而 BPN' Y217L 的性能大约在 pH 8.8 出现峰值。结果表明,尽管在 pH 6.7 下 nprE 表现得不如 BPN' Y217L 好,但是在 pH 7.5 和 8.5, nprE 表现得比 BPN' Y217L 好。在 pH 9.5,这些酶的性能相同。另外,在 pH 7.8-8.4,这些酶对于 Equest 草 (med) 的性能没有差异。实施例 16 在液体洗涤剂中 PMN 和 nprE 酶的比较

[0380] 该实施例描述了确定 PMN 和 nprE 清洗性能的实验。对于蛋白酶敏感污迹,在液体 TIDE® 洗涤剂中检测 PMN 和 nprE 酶的清洗性能,并与基准丝氨酸蛋白酶(蛋白酶 A)进行比较。如在下面的表中所示,甚至在低酶水平,PMN 和 nprE 比蛋白酶 A 除去污迹好得多。在下列的表中,SRI 值越高,表明清洗性能越好。表 16.1 在液体 TIDE® (标准大小洗涤机中)

中 PMN 与蛋白酶 A 清洗性能的比较

洗涤溶液中的活性酶蛋白	0.55 ppm 蛋白酶 A	0.55 ppm PMN	5.50 ppm 蛋白酶 A	5.50 ppm PMN
对于轻度污染的草污迹的 SRI	53.1	60.8	60.7	67.2
对于中度污染的草污迹的 SRI	46.5	55.0	54.2	59.8

表 16.1 在液体 TIDE® (标准大小洗涤机中) 中 PMN 与蛋白酶 A 清洗性能的比较

对于重度污染的草污迹的 SRI	39.1	45.8	44.5	51.6
-----------------	------	------	------	------

表 16.2. 在液体 TIDE® (小尺寸洗涤机中) 中 PMP 与蛋白酶 A 清洗性能的比较

洗涤溶液中的活性酶蛋白	0.55 ppm 蛋白酶 A	0.55 ppm PMN
对于轻度污染的草污迹的 SRI	28.1	52.8
对于中度污染的草污迹的 SRI	22.8	33.1
对于重度污染的草污迹的 SRI	19.9	24.2

表 16.3 在液体 TIDE® (小尺寸洗涤机中) 中 nprE 与蛋白酶 A 清洗性能的比较

洗涤溶液中的活性酶蛋白	0.55 ppm 蛋白酶 A	2.75 ppm 蛋白酶 A	5.50 ppm 蛋白酶 A	0.28 ppm nprE
对于轻度污染的草污迹的 SRI	26.3	30.8	30.7	31.5
对于 BMI 污迹的 SRI	19.4	24.9	21.4	25.0
婴儿食品牛肉污迹	63.2	68.8	69.4	71.1

实施例 17NprE 和 NprE 变体的热稳定性

[0381] 在该实施例中,描述了确定 NprE 和 NprE 变体的热稳定性所进行的实验。如上所述,制造和纯化酶。判断纯化的酶是充分同源的——具有 95% 以上的纯度,如使用 10% SDS-PAGE 确定的,因在凝胶上观察到唯一主要的蛋白质。该蛋白质大约 32kDa,其为成熟 nprE 序列的分子量。使用 25mM、pH 5.8、含有 1mM 氯化锌、4mM 氯化钙和 40% 丙二醇的 MES 缓冲液配制蛋白质以进行储存。用于这些实验中的分析是前面描述的使用荧光 AGLA 活性的蛋白酶分析和下面描述的差示扫描量热法 (DSC)。差示扫描量热法 (DSC)

[0382] 使用超灵敏扫描高通过量微热量计 VP-Cap DSC (Microcal), 测量过量热容曲线。对于 DSC 测量的标准过程和该技术的原理对本领域普通技术人员是公知的 (参见例如 Freire, 1995) Meth. Mol. Biol., 41, 191-218 [1995])。简言之,需要大约 500uL 的 200-400ppm 纯的或超滤浓度 (UFC) 蛋白样品。典型地,在 5mM HEPES、pH8.0 缓冲液中,使用 200°C /hr 的扫描速率在 20-100°C 温度范围内,扫描 400ppm 的 NprE 和变体蛋白 (在缺乏和存在 130mM 柠檬酸盐情况下)。然后,重新扫描同一样品以检查该过程的可逆性。对于 NprE,热解折叠过程是不可逆的。在 25 到 200°C /hr 的扫描速率内,评估 NprE 热解链的扫描速率依赖性数据。也评估多种添加剂 (例如伯醇和仲醇、盐、环糊精、PEG、山梨醇、甘油) 对 NprE 的热解链温度的影响。结果

[0383] 在两个不同浓度下,确定野生型 NprE 的热稳定性,以显示蛋白质浓度对热解链温

度的影响。确定 220ppm 和 440ppm 的 T_m 值分别为 $67.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 和 $69.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。蛋白质浓度作用突出了二级事件 (second-order event)。预期其为凝聚或自溶。然而,本发明不拟限于任何特定机制。但是,这些结果表明,对于 NprE 的热解链温度的精确测定和任何对比需要蛋白质浓度良好匹配。扫描速率对热解链温度的影响也表明了这样的依赖性: T_m 依赖于扫描速率上至 150°C/hr ,然后在 $150\text{--}200^\circ\text{C/hr}$ 之间变平。基于这些结果,对于所有研究,选择 200°C/hr 为扫描速率上限以最小化 T_m 对扫描速率的依赖性。

[0384] 对于 NprE 和变体,收集的所有数据在表 4 中示出。表 4 也包括在存在 130mM 柠檬酸盐情况下对于 NprE 和变体获得的 DSC 热解链温度。在多数情况下,扫描两个蛋白质浓度。如在该表表示的,在存在 130mM 柠檬酸盐的扫描情况下,不是所有蛋白质都表现出热解折叠情况。

表 17 DSC 结果			
被检测的酶	DSC 热解链浓度		
	220 ppm 蛋白质	440 ppm 蛋白质	440 ppm 蛋白质并具有 130 mM 柠檬酸盐
野生型 NprE	67.6 ± 0.5	69.2 ± 0.5	没有转变 (No transition)
嗜热菌蛋白酶	87.0000		52.1000
枯草芽孢杆菌 NprE	68.0000		55.0000
FNA	64.9000		51.7000
T14R	57.0000		51.7000
S23K	67.8000		无
S23R	67.8000		53.5000
G24R	63.7000		50.7
Q45E	70.6000	70.7000	53.0000
N46K	63.8000		50.7
S58D	63.3000		50.5000

表 17 DSC 结果

被检测的酶	DSC 热解链浓度		
	220 ppm 蛋白质	440 ppm 蛋白质	440 ppm 蛋白 质并具有 130 mM 柠檬酸盐
T59P	68.8000		49.1000
S58D,T60D	59.0000		没有转变
T60D	66.2000		没有转变
S66E	70.3000	71.6000	
S129I	70.2000	70.7000	50.3000
S129V	69.9000	70.3000	没有转变
F130L		69.8000	48.5000
M138I	69.2000		52.5000
M138L	67.8000		
V190I	69.0000	69.4000	51.5
L198M	68.2000	68.5000	53.3000
S199E	70.3000	70.3000	49.1000
D220P	69.3000	69.9000	49.4000
D220E	69.4000	69.8000	50.5000
K211V		69.8000	
K214Q		68.9000	
A221S	59.1000		52.5000
G222C	69.5000		没有转变
K244S		67.6000	
K269T		69.5000	51.5
R280D	67.4000	67.9000	49.2000
N296E	60.5000	69.8000	49.5000
N50W, N296E		62.4000	47.2000
G5C, N61C	67.8000		48.4
Q45K, S199E		67.7000	51.3000
F130L, D220P	62.7000	70.3000	50.8000
M138L, D220P	63.2000	68.2000	50.8000
S129I, V190I		70.3000	55.8000
S129V, V190I		69.9000	55.3000
S129V, D220P		70.6000	55.7000
S129I, D220P		70.7000	53.5000
S129V, R280L		69.5000	54.9000
V190I, D220P		69.8000	52.8000
Q45K, S199E		67.7000	51.3000
N50W, N296E		62.4000	47.2000
G24K K269T D220E		65.0000	51.5000
S129I, F130L, D220P		68.9000	56.6000
nprE-T004S-S023N-G024M(+K269N)		64.6000	没有
nprE-T004V-S023N		71.2000	49.0000
nprE-S023W-G024Y		64.0000	没有

表 17 DSC 结果

被检测的酶	DSC 热解链浓度		
	220 ppm 蛋白质	440 ppm 蛋白质	440 ppm 蛋白质并具有 130 mM 柠檬酸盐
nprE-T004V-S023W-G024M		65.5000	49.3000
nprE-T059K-S66Q-S129I		70.5000	49.3000
nprE-T059R-S66N-S129I		70.2000	54.0000
nprE-T059R-S129I		69.4000	54.0000
nprE-T059K-S66Q-S129V		70.3000	56.0000

[0385] 对于 NprE 的野生型和各种变体,热解折叠曲线(DSC 扫描)的代表性图在图 27 中示出。解折叠曲线表明了野生型中点(midpoint),并且显示了相对于野生型表现出增加的热解链温度的选择变体,以及相对于野生型表现出降低的解链温度的选择变体。该图明确表明,DSC 区分稳定和较不稳定 NprE 变体,并且可用作次级筛选。在洗涤剂中,观察到变体的热解链温度和它们的稳定性之间的大体趋势。例如,在 TIDE[®]中,变体 S66E、S199E、D220P/E、S 129I/V 都是优胜者,并且相比于野生型 NprE,其显示出大约 1°C 的热解链温度的增加。该 1°C 的热解链温度的增加是小的,但是重要的,因为热稳定性一般需要多氨基酸取代。

[0386] 图 28 表示 NprE 变体的热解折叠,其显示在存在 130mM 柠檬酸盐的情况下的热解折叠曲线。柠檬酸盐是在不存在钙的情况下,快速引起 NprE 自溶的洗涤剂成分。对于野生型 NprE,在存在柠檬酸盐的情况下,没有解折叠曲线,这与已经解折叠或缺少很好形成的疏水核的蛋白相一致。在存在柠檬酸盐的情况下,表现热解折叠曲线的变体被包括在表 17 中。这些变体在 47-56°C 的范围内,具有热解链温度。在存在 130mM 柠檬酸盐的情况下的 DSC 扫描表明了比野生型对柠檬酸盐更稳定的变体。例如,柠檬酸盐稳定的变体显示出含有 S129I 或 S129V 并且含有这些取代中的任一个的组合显示出 +5°C 的热解链温度增加。添加剂对 NprE 热解链温度的影响:

[0387] 图 29 表示包括各种添加剂的实验的结果。缓冲液是 5mM HEPES, pH 8.0。使用 200°C/hr 的扫描速率从 20-100°C 扫描样品。在该图中,水平线表示没有添加剂的野生型 NprE 的 T_m。在这些实验中,数据显示,在存在这些试剂时,对 NprE 的热解链温度(T_m)很少或没有影响。NprE 活性抑制剂即磷酸二肽的包括显示出增加了大约 1°C 的 T_m,这表明抑制剂可赋予 NprE 对抗热解折叠过程的一定稳定性。上面的条件没有一个有助于使热解折叠过程可逆。然而,本发明不拟限于任何特定的机制。实施例 18 在 TIDE[®]中 NprE 同源稳定性和同系物 BMI 洗涤性能

[0388] 在该实施例中,描述了在 TIDE[®]中评估 nprE 同系物稳定性以及这些同系物洗涤性能所进行的实验。将纯化的 NprE("NprE")、枯草芽胞杆菌 NprE(B. S. NprE)、结核芽胞杆菌 NprB(B. T. NprB) 和嗜热溶蛋白芽胞杆菌嗜热菌蛋白酶(TLN)以 110ug/ml 在 25°C 下,在 pH8 的 10mM HEPES 中的 200ul 25% tide 中温育 90 分钟。使用 AGLA 分析,测量初始活性和残留活性,如前所述。简言之,将 110 ul 的样品加入到 200ul 的 AGLA 缓冲液中(50mM MES, pH6.5, 0.005% TWEEN[®]-80, 2.5mM CaCl₂),然后将 10ul 稀释的样品加入到 200ul 的 AGLA 底物中(AGLA 缓冲液中的 2.4mM Abz-AGLA-Nba)。对于第一个 100 秒,监控在 350nm 的激发

和在 415nm 的发射,最初的斜率被记录为酶活性。通过将残留活性除以最初活性,计算残留活性的百分比。图 30 提供示出 90 分钟后残留活性的图。

[0389] 为了确定 TIDE[®]中这些同系物的洗涤性能,首先将预洗涤的 BMI 微量样品加入到 96 孔平板的每一孔中。然后,加入 190ul 的 1x 浓缩型 TIDE[®] (780ug/ml 浓缩型 TIDE[®]、5mM HEPES、pH8、6gpg 水硬度)。然后,将 10ul 的纯化 NprE、枯草芽胞杆菌 NprE、结核芽胞杆菌 NprB 和嗜热溶蛋白芽胞杆菌嗜热菌蛋白酶加入到孔中,以产生 0.25ug/ml 的终浓度。在 25℃,在热混合器上伴随 1400rpm 摇动,温育该平板 30 分钟。在温育最后,将 100ul 的上清液转移到新的 96 孔平板中。然后,测量在 405nm 下上清液的 OD。用上清液 OD 减去没有加入酶的空白对照的 OD。通过将每一同系物的 OD 除以 NprE 的 OD,计算性能指数。图 31 提供了图,其显示出 BMI 是 NprE 以及本文描述的 nprE 同系物的性能。实施例 19 野生型 nprE 和变体的金属分析

[0390] 在该实施例中,描述了确定 nprE 和 nprE 变体的锌和钙含量所进行的实验。在这些实验中,进行总痕量金属分析,以确认 NprE 的锌和钙含量,该分析通过感应耦合等离子体-质谱法 (inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICPMS)) 和利用微聚焦束的粒子激发 X 射线发射 (micro-PIXE) 进行。总的来说,一个锌和两个钙离子紧密结合。

[0391] 在不含金属的缓冲液中,制备所有的 ICPMS 和 micro-PIXE 样品,以除去任何外源的金属污染物。典型地,用 pH 8.2 的 20mM HEPES,使用 YM-10 微量透析仪器,缓冲液交换 250uL 的 40mg/mL NprE 样品 3 遍。通过将缓冲液通过用 Chelax 100 树脂填充的柱,产生不含金属的缓冲液。使用得自 Sigma 的 Bicinchoninic 酸蛋白测定分析试剂盒 (BCA 分析),检测最终蛋白质浓度。在 West Coast Analytical Services, Inc. 分析 ICPMS 样品。在 Ion Beam Analysis Laboratory 分析 Micro-PIXE 样品。

[0392] 表 19-1 表示对于野生型 NprE 的钙和锌离子的金属分析结果。相对于蛋白质浓度,发现在样品中存在两个钙离子和两个锌离子。

表 19-1 野生型 NprE 的 ICPMS 金属分析		
	Ca (ppm)	Zn (ppm)
ICPMS	73.8	156
Mol w (g/mol)	40.08	65.37
蛋白质(ppm)	833	833
比率/蛋白质	1.4	1.9

[0393] MicroPIXE 元素组成分析图测量了相对于蛋白质内标 (internal standard) 的金属浓度。相对于在 NprE 情况中三个甲硫氨酸引起的硫峰,计算使用 Micro-PIXE 检测的所有峰值。观察到的大氯离子峰是由于在缓冲液中存在盐。

[0394] 表 19-2 表示通过 Micro-PIXE 检测的金属含量,其表示一般而言,NprE 每个蛋白质分子含有两个紧密结合的钙离子和一个锌离子。野生型 NprE 表明 1 个锌离子和 2 个钙离子。预期,由于样品的制备,钙离子可能表示了低的占有率。S58D 和 T60D 显示每个蛋白质接近 2 个锌离子,表明可能的额外锌离子结合到位点。双变体 (double variant) 具有两个增加的半胱氨酸,这增加了该技术的精确性。然而,本发明不拟限于具有特定数量离子的任何具体实施方式。

表 19-2 Micro-PIXE 金属检测显示天然 NprE 和 NprE 变体的 Ca 和 Zn 含量

	#S	Ca/S	Ca/prot	Zn/S	Zn/prot	Ca/Zn
S58D	3	0.72	2.2	0.52	1.6	1.4
T60D	3	0.68	2.0	0.57	1.7	1.2
S58D.T60D	5	0.41	2.1	0.22	1.1	1.9
N46K	3	0.59	1.8	0.42	1.3	1.4
S23K	3	0.62	1.9	0.33	1.0	1.9
A221S	3	0.76	2.3	0.5	1.5	1.5
WT	3	0.54	1.6	0.34	1.0	1.6

[0395] 与其它很好表征的钙和锌依赖性中性蛋白酶例如嗜热菌蛋白酶或类嗜热菌蛋白酶的蛋白酶 (ILPs) (参见例如 Dahlquist 等, Biochem., 15:1103-1111[1976]; Srpington 等, (1995) Biochemistry 34, 15713-15720[1995]; 和 Willenbrock 等, (1995) FEBS Lett. 358:189-192[1995]) 一致, 发现 NprE 每个分子含有至少两个紧密结合的钙离子和一个锌离子。提出了可能的第三个钙离子结合位点, 但是期望其非常弱。因为对所用样品脱盐以除去任何外源的金属, 所以期望这些弱的钙结合位点没有被占据。实施例 20 在 TIDE® 浓缩型 HDL 洗涤剂中用甲酸钙稳定 NprE

[0396] 在该实施例中, 描述了在 TIDE® 浓缩型 HDL 洗涤剂中进行稳定 NprE 的方法所进行的实验。在这些实验中, 研究了稳定 NprE 的方法, 是通过在固定的柠檬酸盐浓度下增加甲酸钙水平同时降低实验用 TIDE® 浓缩型制剂 ("TIDE® 2x") 中 DTPA 含量进行的。使用统计学实验设计 (DOE) 的方法, 以便简化实验以及数据分析。显示存在于 TIDE® 的 DTPA 不利地影响了 NprE 稳定性, 而加入甲酸钙有助于在大力 (full strength) TIDE® 浓缩型制剂中克服有害影响。

[0397] 使用具有两个中心点的完全中心复合响应曲面模型 (full central composite response surface model) 作为 DOE 方法。根据在表 19.1 列出的组成变化, 预制四种成分变化的总共 16 个独特制剂。在固定浓度的柠檬酸 (1.9%) 下随着 DTPA (0-0.25%) 和甲酸钙 (0-0.2%), 从 0-6% (w/w) 改变 LAS。保持 TIDE® 洗涤剂的所有其它成分不变。基于不同混合物的相稳定性, 确定成分浓度边界条件。用 780ppm nprE 在大力 (~100%) 制剂混合物中进行蛋白质稳定性检测并将其在 32°C 下温育。测量失活直至 24 小时。使用 0.5ppm 蛋白浓度的红色荧光标记酪蛋白分析试剂盒 (Invitrogen) 进行所有的分析。在三个独立的实验中, 测量 NprE 失活的速率。使用 DOE Fusion Pro (S-Matrix) 分析 DOE 数据。

表 20.1 用于 DOE 研究的 16 个 TIDE®制剂的组分

	HLAS	柠檬酸	DTPA	甲酸钙
型 1	3	1.9	0	0.1
型 2	3	1.9	0.125	0.1
型 3	3	1.9	0.25	0.1
型 4	6	1.9	0.25	0.2
型 5	0	1.9	0	0.2
型 6	6	1.9	0	0.2
型 7	0	1.9	0.25	0.2
型 8	6	1.9	0.125	0.1

表 20.1 用于 DOE 研究的 16 个 TIDE®制剂的组分

	HLAS	柠檬酸	DTPA	甲酸钙
型 9	6	1.9	0.25	0
型 10	0	1.9	0.125	0.1
型 11	6	1.9	0	0
型 12	3	1.9	0.125	0
型 13	0	1.9	0.25	0
型 14	3	1.9	0.125	0.1
型 15	0	1.9	0	0
型 16	3	1.9	0.125	0.2

[0398] 表 20.2 和图 31 显示在各种制剂混合物中 NprE 稳定性测量的结果。平均速率和标准偏差是三个独立测量的平均 NprE 失活速率 (小时⁻¹)。定性地,具有低 DTPA 含量、高钙加载量的制剂在大力浓缩型 TIDE®中倾向更稳定。作为实例,剂型 #5——没有加入 DTPA 并具有高甲酸钙水平,表现最低的失活速率,这表明更高的 NprE 稳定性。与之相反,剂型 #9,其具有高 DTPA 浓度而没有加入甲酸钙,表现最低的稳定性。在表 20.2 中,排名是基于测量的稳定性 (即平均速率)。实验轮次来自三个独立的稳定性实验。

表 20.2 在 16 个制剂混合物中 NprE 的失活速率

	排名	轮次 1	轮次 2	轮次 3	平均速率 (小时 ⁻¹)	标准偏差
型 5	1	0.031	0.053	0.067	0.050	0.019
型 1	2	0.060	0.044	0.081	0.062	0.019
型 15	3	0.050	0.079	0.060	0.063	0.015
型 6	4	0.312	0.057	0.059	0.143	0.147
型 7	5	0.364	0.254	0.128	0.249	0.118
型 11	6	0.099	0.288	0.395	0.261	0.150
型 10	7	0.337	0.238	0.226	0.267	0.061
型 16	8	0.063	0.593	0.188	0.281	0.277
型 2	9	0.392	0.372	0.296	0.354	0.051
型 14	10	0.387	0.451	0.269	0.369	0.093
型 4	11	0.665	0.333	0.336	0.445	0.191
型 8	12	0.682	0.554	0.378	0.538	0.153
型 3	13	0.864	0.440	0.389	0.566	0.261
型 13	14	1.417	0.931	0.964	1.104	0.272
型 12	15	1.005	1.620	1.029	1.218	0.349
型 9	16	0.875	2.099	0.694	1.223	0.764

[0399] 图 33 表示在不同水平的固定浓度的甲酸钙溶液中 DTPA 对 NprE 失活的影响。图 A 表示没有加入甲酸钙的情况下, DTPA 引起的 NprE 失活速率。该相关性表明 DTPA 具有明显的有害影响。图 B 表示具有 0.1% 甲酸钙的情况下, DTPA 的影响有一些降低。图 C 表示具有 0.2% 甲酸钙的情况下, DTPA 的影响明显降低。

[0400] 图 34 表示基于 0.5hr⁻¹以下(图 A)、0.25hr⁻¹以下(图 B)和 0.05hr⁻¹以下(图 C)的响应目标(衰减速率), DOE 分析软件(Fusion Pro)产生的 DTPA 和甲酸钙组分的预测曲线。阴影区域表示 DTPA 和甲酸钙组分的比率, 预示该比率表示具有设定目标之下的衰减速率的稳定性。例如, 在存在 0.04% DTPA 情况下, 0.16% 甲酸钙提供具有 0.25 小时⁻¹之下衰减速率的 NprE 稳定性, 如图 34 图 B 所示。另一方面, 在存在 0.16% DTPA 情况下, 0.08% 甲酸钙不能维持具有至少 0.25 小时⁻¹的衰减速率的 NprE 稳定性。实施例 21 解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶 NprE 的柠檬酸盐诱导的自溶位点的识别

[0401] 在该实施例中, 描述了用来评估野生型和重组变体 nprE(例如枯草芽胞杆菌变体)的柠檬酸盐诱导的自溶的方法。在这些实验中, 使用柠檬酸钠(Sigma), 诱导解淀粉芽胞杆菌中性金属蛋白酶(在枯草芽胞杆菌中表达的天然和重组变体)的自溶。通过在 4°C

下,在 pH6.5 的 25mM MES 缓冲液中进行反应,控制自溶过程。在这些实验中,通过改变下列任一条件,优化 0.4mg/ml NprE 的自溶:(a) 在 10mM 柠檬酸盐中温育的时间(10-100 分钟);或者(b) 在 100 分钟内,柠檬酸盐浓度(10-100mM)。在单独的缓冲液中(即没有柠檬酸盐)稀释的中性金属蛋白酶的对照在相似的条件下游育。通过加入等体积的 1N HCl,终止自溶反应,使用 TCA 沉淀样品,并且使用丙酮洗涤沉淀物和干燥。将所形成的沉淀物重悬于 20 μ L、pH 6.5 的缓冲液和 4X LDS 样品缓冲液(NuPage, Invitrogen)中。

[0402] 用 10% (w/v) SDS-PAGE 解离自溶片段,并将其电印记到 PVDF 膜上。用 Edman 降解(Argo Bioanalytica),测序前 10 个氨基酸残基。使用胰蛋白酶凝胶内消化,检测自溶片段的部分氨基酸序列,并且使用 LCQ-MS(Agilent) 进行分析。凝胶内消化过程包括浸软含有蛋白质的凝胶片,除去考马斯蓝染色,然后在含有 2M 尿素的 25mM NH_4CO_3 中再水合凝胶片。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,将胰蛋白酶加入到再水合的凝胶片中大约 6 小时。在消化后,使用乙腈和 TCA 提取肽。在 C4- 疏水柱上(Vydac) 上,使用乙腈-水梯度,将肽进行分离。用 SEQUEST[®] 数据库检索程序,针对含有 Genencor 酶的数据库,检索所形成肽的图。

[0403] 每一片段的前 10 个氨基酸的氨基酸序列与已知的解淀粉芽胞杆菌 NprE 的氨基酸序列进行比较。这能识别在 N- 末端的氨基酸,因此识别切割位点(一个或多个)。

[0404] 柠檬酸盐诱导的片段的产生和它们的解离在 10% SDS-PAGE 上示出。使用得自 Invitrogen 的标准分子量标识,鉴别片段的大小。在存在 10mM 柠檬酸盐的情况下,在 100 分钟时间范围内,除了剩余的完整 NprE 外,观察两个片段。发现在低柠檬酸盐浓度下形成的两个片段在大小上为 24kDa 和 9kDa。完整的 nprE 为 32kDa。100 分钟时间范围产生良好比例的切割蛋白质(即,初级自溶片段(primary autolysis fragments))。在这些条件下,没有观察或检测到额外的片段。在存在增加柠檬酸盐的情况下实施 100 分钟的研究以得到次级自溶片段。在该实验中,当使用 10-30mM 柠檬酸盐的浓度时,观察到上面描述的两个片段。在 40mM 柠檬酸盐下,较少的 24-kDa 较大片段是明显的,然而 15-kDa 片段也是明显的。在 50-100mM 之间的柠檬酸盐,不再检测到 24kDa 片段和 9-kDa 片段,但是观察到三个其它大小的片段:21kDa、15kDa 和 11kDa。

[0405] 使用 Edman 降解(Argo Bioanalytica),检测 24kDa、9kDa(前两个片段)和 21kDa、15kDa 和 11kDa(后面的自溶片段)的 N- 末端的同一性。

表 21. 片段的 N-末端序列

样品名称	N-末端氨基酸序列 (5'-3') (SEQ ID NO:)	在 SDS-PAGE 上相应的分子量 (kDa)
带 A1	AATTGTGTTL (SEQ ID NO:215)	24
带 A2	DAGDYGGVHT (SEQ ID NO:216)	9
	AGDYGGVHTN (SEQ ID NO:217)	
	GDYGGVHTN (SEQ ID NO:218)	
带 A3	AATTGTGTTL (SEQ ID NO:219)	21
带 A4	AATTGTGTTL (SEQ ID NO:220)	15
带 A5	LSNPTKYGQP (SEQ ID NO:221)	11

[0406] 带 A1、A3 和 A4 具有与完整 NprE 的 N- 末端匹配的天然 N- 末端序列。带 A2 的测序报告显示三个片段,其中最不亮(least intense)的序列显示与较亮(more intense)的

序列相同,除了其比较亮序列分别少 2 个残基和 1 个残基。这与该具体蛋白质片段的碎片(fraying)相一致。凝胶片段的图案和大小表明 15kDa(带 A4)可衍生自 21-kDa 片段(带 A3),并且因此推测 C-末端在或靠近位置 198。然而,本发明不拟限于该具体实施方式。

[0407] 图 35 提供各种片段的氨基酸序列(对于 N-末端测序目标,1-5 或 **A11-5**)。片段 1(A1)具有等同于完整天然蛋白质(SEQ ID NO:222)N-末端残基的 N-末端残基,片段 2(Ad2)N-末端开始于或靠近 D220(SEQ ID NO:223)。也突出显示随后的两个氨基酸残基(A221 和 G222),因为该片段被识别为被磨碎的(frayed)。片段 3(A3)(SEQ ID NO:224)和片段 4(A4)(SEQ ID NO:225)具有完整蛋白质的 N-末端,片段 5(A5)(SEQ ID NO:226)起始于 L198。片段 4 的 C-末端可能在或靠近 M138(基于 A3 和 A4 之间的大小差异)。没有检测到 A3 相应的片段。

[0408] 胰蛋白酶消化,然后是片段 1 到 5 的肽图的 LCQ-MS,在各片段内明确地识别了数个氨基酸肽。在图 35 中将这突出显示。LCQ-MS 提供识别片段的阳性对照。

[0409] 基于切割片段的 N-末端和 LCQ-MS 分析,鉴别初级切割位点在氨基酸位置 D220、A221、G222、M138 和 L198。使用定点诱变靶向这些位点,并且产生 D220、A221、G222、L198 和 M138、D139 的位点评估文库。筛选变体蛋白质以增加在洗涤剂中的稳定性和 BMI 洗涤性能,如本文所指出的。在一些情况中,也筛选这些位点附近的氨基酸,进行蛋白质工程,以确保剪除位点(clip site)被真正靶向。

[0410] 蛋白质工程结果明显表明,在 D220 的 Pro 或 Glu 的氨基酸取代产生了在洗涤剂中更稳定的 NprE 分子。另外,通过用 Cys 取代 G222 和用 Ile 或 Leu 取代 M138,为 NprE 分子提供了额外的稳定性。一般而言,这些特异性氨基酸取代提供给 NprE 洗涤剂稳定性益处而没有损害 BMI 洗涤性能。因此,这些实验提供柠檬酸盐诱导的自溶位点的重要绘图数据,有助于对改变和影响 NprE 总稳定性的主要氨基酸残基的识别。柠檬酸盐(加入到洗涤剂基质中的助洗剂)去稳定化和自溶 NprE,并且建议通过螯合必要的钙结合原子进行该过程。在极端洗涤剂条件下,NprE 的应用需要在这些设置中使用更稳定的 NprE 分子。在这些实验中,取代 NprE 的一个或多个自溶位点导致用于这些极端洗涤剂中的更洗涤剂稳定的 nprE 分子。实施例 22 液体洗衣洗涤剂组合物

[0411] 在该实施例中,提供液体洗衣洗涤剂组合物的各种配方。制备下列本发明的液体洗衣洗涤剂组合物:

化合物	配方				
	I	II	III	IV	V
LAS	24.0	32.0	6.0	3.0	6.0
NaC ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5.0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	-	-	8.0	7.0	5.0
C ₈ -C ₁₀ 丙基二甲基胺	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₄ 烷基二甲基胺氧化物	-	-	-	-	2.0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17.0	-	8.0
CFAA	-	5.0	4.0	4.0	3.0
C ₁₂ -C ₁₄ 脂肪醇乙氧基化物	12.0	6.0	1.0	1.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₈ 脂肪酸	3.0	-	4.0	2.0	3.0
柠檬酸(无水)	4.5	5.0	3.0	2.0	1.0
DETPMP	-	-	1.0	1.0	0.5
单乙醇胺	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0
氢氧化钠	-	-	2.5	1.0	1.5
1 N HCl 水溶液	#1	#1	-	-	-
丙二醇	12.7	14.5	13.1	10.	8.0
乙醇	1.8	2.4	4.7	5.4	1.0
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
果胶裂合酶	-	-	-	0.005	-
淀粉酶	0.001	0.002	-		-
纤维素酶	-	-	0.0002		0.0001

化合物	配方				
	I	II	III	IV	V
脂肪酶	0.1	-	0.1	-	0.1
nprE	0.05	0.3	-	0.5	0.2
PMN	-	-	0.08	-	-
蛋白酶 A	-	-	-	-	0.1
醛糖氧化酶	-	-	0.3	-	0.003
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.05	0.05	0.02
甲酸钙	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07
DETBCHD	-	-	0.02	0.01	-
SRP1	0.5	0.5	-	0.3	0.3
硼酸	-	-	-	-	2.4
二甲苯磺酸钠	-	-	3.0	-	-
异丙基苯磺酸钠	-	-	-	0.3	0.5
DC 3225C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2-丁基-辛醇	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
增亮剂 1	0.12	0.10	0.18	0.08	0.10
香料/染料和/或水, 余量, 加至 100%					

#1: 加入 1N HCl 水溶液以调节该配方的净 pH 在大约 3 到大约 5 的范围内。

[0412] 上面 22(I)-(II) 的实施例的 pH 为大约 5 到大约 7, 以及 22(III)-(V) 的为大约 7.5 到大约 8.5。实施例 23 手用洗碟液体洗涤剂组合

[0413] 在该实施例中,提供各种手用洗碟液体洗涤剂配方。下面是本发明的手用洗碟液体洗涤剂组合物:

化合物	配方					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	30.0	28.0	25.0	-	15.0	10.0
LAS	-	-	-	5.0	15.0	12.0
石蜡烃磺酸盐	-	-	-	20.0	-	-
C ₁₀ -C ₁₈ 烷基二甲基胺氧化物	5.0	3.0	7.0	-	-	-
甜菜碱	3.0	-	1.0	3.0	1.0	-
C ₁₂ 多 OH 脂肪酸酰胺	-	-	-	3.0	-	1.0
C ₁₄ 多 OH 脂肪酸酰胺	-	1.5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2.0	-	4.0	-	-	20.0
DTPA	-	-	-	-	0.2	-
柠檬酸三钠二水合物	0.25	-	-	0.7	-	-

化合物	配方					
	I	II	III	IV	V	VI
二胺	1.0	5.0	7.0	1.0	5.0	7.0
MgCl ₂	0.25	-	-	1.0	-	-
nprE	0.02	0.01	-	0.01	-	0.05
PMN	-	-	0.03	-	0.02	-
蛋白酶 A	-	0.01	-	-	-	-
淀粉酶	0.001	-	-	0.002	-	0.001
醛糖氧化酶	0.03	-	0.02	-	0.05	-
异丙基苯磺酸钠	-	-	-	2.0	1.5	3.0
PAAC	0.01	0.01	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.01	0.02	0.01
香料/染料和/或水, 余量, 至 100%						

样品 23(I)-(VI) 的 pH 为大约 8 到大约 11 实施例 24 液体自动洗碟洗涤剂组合物

[0414] 在该实施例中,提供各种液体自动洗碟洗涤剂配方。下面是本发明的手用洗碟液体洗涤剂组合物:

化合物	配方				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
硫酸钾	-	10	8	-	10
1,2 丙二醇	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5
硼酸	-	-	-	4.0	3.0
CaCl ₂ 二水合物	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
非离子	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
nprE	0.1	0.03	-	0.03	-
PMN	-	-	0.05	-	0.06
蛋白酶 B	-	-	-	0.01	-
淀粉酶	0.02	-	0.02	0.02	-
醛糖氧化酶	-	0.15	0.02	-	0.01
半乳糖氧化酶	-	-	0.01	-	0.01
PAAC	0.01	-	-	0.01	-
DETBCHD	-	0.01	-	-	0.01

香料 / 染料和 / 或水, 余量, 至 100% 实施例 25 颗粒和 / 或片状洗衣组合物

[0415] 该实施例提供各种颗粒和 / 或片状洗衣洗涤剂的配方。制备下面的本发明的洗衣组合物, 其可以是颗粒状或片状。

化合物	配方				
	I	II	III	IV	V
基本产品					
C ₁₄ -C ₁₅ AS 或 TAS	8.0	5.0	3.0	3.0	3.0
LAS	8.0	-	8.0	-	7.0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0.5	2.0	1.0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ 或 E ₃	2.0	-	5.0	2.0	2.0
QAS	-	-	-	1.0	1.0
A 型沸石	20.0	18.0	11.0	-	10.0
SKS-6 (干燥加入)	-	-	9.0	-	-
MA/AA	2.0	2.0	2.0	-	-
AA	-	-	-	-	4.0
3 柠檬酸钠 2H ₂ O	-	2.0	-	-	-
柠檬酸(无水)	2.0	-	1.5	2.0	-
DTPA	0.2	0.2	-	-	-
EDDS	-	-	0.5	0.1	-
HEDP	-	-	0.2	0.1	-
PB1	3.0	4.8	-	-	4.0
过碳酸盐	-	-	3.8	5.2	-
NOBS	1.9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2.0	-	-
TAED	0.5	2.0	2.0	5.0	1.00
BB1	0.06	-	0.34	-	0.14
BB2	-	0.14	-	0.20	-
无水碳酸钠	15.0	18.0	-	15.0	15.0
硫酸盐	5.0	12.0	5.0	17.0	3.0
硅酸盐	-	1.0	-	-	8.0
nprE	0.03	-	0.1	0.06	-
PMN	-	0.05	-	-	0.1
蛋白酶 B	-	0.01	-	-	-
蛋白酶 C	-	-	-	0.01	-
脂肪酶	-	0.008	-	-	-
淀粉酶	0.001	-	-	-	0.001
纤维素酶	-	0.0014	-	-	-
果胶裂合酶	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
醛糖氧化酶	0.03	-	0.05	-	-
PAAC	-	0.01	-	-	0.05

水份和 / 或微量物质 *, 余量, 至 100% *香料、染料、增亮剂 /SRP1/ 羧甲基纤维素钠 / 光漂白 /MgSO₄/PVPVI/ 泡沫抑制剂 / 高分子 PEG/ 粘土。实施例 26 液体洗衣洗涤剂

[0416] 该实施例提供各种液体洗衣洗涤剂的配方。制备本发明的下面液体洗衣洗涤剂制剂：

化合物	配方					
	I	I	II	III	IV	V
LAS	11.5	11.5	9.0	-	4.0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2.85} S	-	-	3.0	18.0	-	16.0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2.5} S	11.5	11.5	3.0	-	16.0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3.0	2.0	2.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3.2	3.2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5.0	-	3.0
TPKFA	2.0	2.0	-	2.0	0.5	2.0
柠檬酸(无水)	3.2	3.2	0.5	1.2	2.0	1.2
甲酸钙	0.1	0.1	0.06	0.1	-	-
甲酸钠	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
异丙基苯磺酸钠	4.0	4.0	1.0	3.0	1.2	-
硼酸盐	0.6	0.6	1.5	-	-	-
氢氧化钠	6.0	6.0	2.0	3.5	4.0	3.0
乙醇	2.0	2.0	1.0	4.0	4.0	3.0
1,2 丙二醇	3.0	3.0	2.0	8.0	8.0	5.0
单乙醇胺	3.0	3.0	1.5	1.0	2.5	1.0
TEPAE	2.0	2.0	-	1.0	1.0	1.0
nprE	0.03	0.05	-	0.03	-	0.02
PMN	-	-	0.01	-	0.08	-
蛋白酶 A	-	-	0.01	-	-	-
脂肪酶	-	-	-	0.002	-	-
淀粉酶	-	-	-	-	0.002	-
纤维素酶	-	-	-	-	-	0.0001
果胶裂合酶	0.005	0.005	-	-	-	-
醛糖氧化酶	0.05	-	-	0.05	-	0.02
半乳糖氧化酶	-	0.04	-	-	-	-

化合物	配方					
	I	I	II	III	IV	V
PAAC	0.03	0.03	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.01	-
SRP 1	0.2	0.2	-	0.1	-	-
DTPA	-	-	-	0.3	-	-
PVNO	-	-	-	0.3	-	0.2
增亮剂 1	0.2	0.2	0.07	0.1	-	-
有机硅消泡剂	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1

香料 / 染料和 / 或水, 余量, 至 100% 实施例 27 高密度洗碟洗涤剂

[0417] 该实施例提供各种高密度洗碟洗涤剂的配方。制备下面本发明的浓缩高密度洗碟洗涤剂：

化合物	配方					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45.0	45.0	-	-	40.0
3 柠檬酸钠 2H ₂ O	17.0	-	-	50.0	40.2	-
碳酸钠	17.5	14.0	20.0	-	8.0	33.6
碳酸氢盐	-	-	-	26.0	-	-
硅酸盐(silicate)	15.0	15.0	8.0	-	25.0	3.6
正硅酸盐 (metasilicate)	2.5	4.5	4.5	-	-	-
PB1	-	-	4.5	-	-	-
PB4	-	-	-	5.0	-	-
过碳酸盐	-	-	-	-	-	4.8
BB1	-	0.1	0.1	-	0.5	-
BB2	0.2	0.05	-	0.1	-	0.6
非离子	2.0	1.5	1.5	3.0	1.9	5.9
HEDP	1.0	-	-	-	-	-

化合物	配方					
	I	II	III	IV	V	VI
DETPMP	0.6	-	-	-	-	-
PAAC	0.03	0.05	0.02	-	-	-
石蜡	0.5	0.4	0.4	0.6	-	-
nprE	0.072	0.053	-	0.026	-	0.01
PMN	-	-	0.053	-	0.059	-
蛋白酶 B	-	-	-	-	-	0.01
淀粉酶	0.012	-	0.012	-	0.021	0.006
脂肪酶	-	0.001	-	0.005	-	-
果胶裂合酶	0.001	0.001	0.001	-	-	-
醛糖氧化酶	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
BTA	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
聚羧酸酯	6.0	-	-	-	4.0	0.9
香料	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2

水份和 / 或微量物质 *, 余量, 至 100% *增亮剂 / 染料 / SRP1 / 羧甲基纤维素钠 / 光漂白剂 / MgSO_4 / PVPVI / 泡沫抑制剂 / 高分子 PEG / 粘土。

[0418] 实施例 27 (I) 到 (VI) 的 pH 从大约 9.6 到大约 11.3。实施例 28 片状洗涤剂组合物

[0419] 该实施例提供各种片状洗涤剂制剂。通过将颗粒状洗碟洗涤剂组合物在 $13\text{KN}/\text{cm}^2$ 压力下, 使用标准 12 头旋转压力机 (12 head rotary press) 压缩, 制备本发明的下列片状洗涤剂组合物:

化合物	配方							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48.8	44.7	38.2	-	42.4	46.1	46.0
3 柠檬酸钠 $2\text{H}_2\text{O}$	20.0	-	-	-	35.9	-	-	-
碳酸钠	20.0	5.0	14.0	15.4	8.0	23.0	20.0	-
硅酸盐	15.0	14.8	15.0	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
脂肪酶	0.001	-	0.01	-	0.02	-	-	-
蛋白酶 B	0.01	-	-	-	-	-	-	-

化合物	配方							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
蛋白酶 C	-	-	-	-	-	0.01	-	-
nprE	0.01	0.08	-	0.04	-	0.023	-	0.05
PMN	-	-	0.05	-	0.052	-	0.023	-
淀粉酶	0.012	0.012	0.012	-	0.015	-	0.017	0.002
果胶裂合酶	0.005	-	-	0.002	-	-	-	-
醛糖氧化酶	-	0.03	-	0.02	0.02	-	0.03	-
PB1	-	-	3.8	-	7.8	-	-	4.5
过碳酸盐	6.0	-	-	6.0	-	5.0	-	-
BB1	0.2	-	0.5	-	0.3	0.2	-	-
BB2	-	0.2	-	0.5	-	-	0.1	0.2
非离子	1.5	2.0	2.0	2.2	1.0	4.2	4.0	6.5
PAAC	0.01	0.01	0.02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2.1	-	1.6
HEDP	1.0	-	-	0.9	-	0.4	0.2	-
DETPMP	0.7	-	-	-	-	-	-	-
石蜡	0.4	0.5	0.5	0.5	-	-	0.5	-
BTA	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	-
聚羧酸酯	4.0	-	-	-	4.9	0.6	0.8	-
PEG 400-30,000	-	-	-	-	-	2.0	-	2.0
甘油	-	-	-	-	-	0.4	-	0.5
香料	-	-	-	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2

水份和 / 或微量物质 *, 余量, 至 100% * 增亮剂 / SRP1 / 羧甲基纤维素钠 / 光漂白剂 / MgSO_4 / PVPVI / 泡沫抑制剂 / 高分子 PEG / 粘土。

[0420] 实施例 28(I) 到 28(VII) 的 pH 是大约 10 到大约 11.5 ; 15(VIII) 的 pH 是 8-10。实施例 28(I) 到 28(VIII) 的片重量是从大约 20 克到大约 30 克。实施例 29 液体硬表面清洗洗涤剂

[0421] 该实施例提供各种液体硬表面清洗洗涤剂的配方。制备本发明下面的液体硬表面清洗洗涤剂组合物：

化合物	配方						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
$\text{C}_9\text{-C}_{11}\text{E}_5$	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
$\text{C}_{12}\text{-C}_{14}\text{E}_5$	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
$\text{C}_7\text{-C}_9\text{E}_6$	-	-	-	-	8.0	-	-
$\text{C}_{12}\text{-C}_{14}\text{E}_{21}$	1.0	0.8	4.0	2.0	2.0	1.0	2.0
LAS	-	-	-	0.8	0.8	-	0.8
异丙基苯磺酸钠	1.5	2.6	-	1.5	1.5	1.5	1.5

化合物	配方						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Isachem ® AS	0.6	0.6	-	-	-	0.6	-
Na ₂ CO ₃	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
3 柠檬酸钠 2H ₂ O	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5
脂肪酸	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-丁基-辛醇	0.3	0.3	-	0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000®	0.4	-	0.3	0.35	0.5	-	-
PVP	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	-	-
MME PEG (2000) ®	-	-	-	-	-	0.5	0.5
Jeffamine ® ED-2001	-	0.4	-	-	0.5	-	-
PAAC	-	-	-	0.03	0.03	0.03	-
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	-	-	-	-
nprE	0.07	-	0.08	0.03	-	0.01	0.04
PMN	-	0.05	-	-	0.06	-	-
蛋白酶 B	-	-	-	-	-	0.01	-
淀粉酶	0.12	0.01	0.01	-	0.02	-	0.01
脂肪酶	-	0.001	-	0.005	-	0.005	-
果胶裂合酶	0.001	-	0.001	-	-	-	0.002
ZnCl ₂	0.02	0.01	0.03	0.05	0.1	0.05	0.02
甲酸钙	0.03	0.03	0.01	-	-	-	-
PB1	-	4.6	-	3.8	-	-	-
醛糖氧化酶	0.05	-	0.03	-	0.02	0.02	0.05

香料 / 染料和 / 或水, 余量, 至 100 %

[0422] 实施例 29(1) 到 (VII) 的 pH 是从大约 7.4 到大约 9.5。

[0423] 尽管已经阐述了本发明的具体实施方式, 但是对本领域普通技术人员显而易见的是, 可以进行各种其它变化和修改, 而不背离本发明的精神和范围。因此所附权利要求拟覆盖所有这些在本发明范围内的变化和修改。

[0424] 本说明书中提及的所有专利和出版物表示了本发明所属技术领域的普通技术人员的水平。所有专利和出版物通过参考并入本文至这样的程度——如同每一单个的出版物都明确而独立地表明被通过引用并入本文。

[0425] 已经描述了本发明的优选实施方案, 对本领域普通技术人员显而易见的是, 可以对公开的实施方案作各种修改, 并且此种修改包括在本发明的范围内。

[0426] 本领域技术人员容易认识到, 本发明完全可以进行调整以实现目标并获得提及的以及其中固有的结果和优势。本文中描述的组合物和方法代表了优选的实施方案, 是示例性的, 并且不拟作为对本发明范围的限制。对本领域技术人员显而易见的是, 可以对本文中公开的发明进行各种替换和修改, 而不脱离本发明的范围和精神。

[0427] 本文中被例证性地描述的发明可以在缺少本文中未具体公开的任何要素或许多要素、限定或许多限定的情况下适宜地被实施。已被使用的术语和表述被用作描述性而不是限定性术语, 并且本发明的意图不是在使用这些术语和表述时排除所示出和描述的特征或其部分的任何等价物, 但是应认识到, 各种修改可能在要求保护的发明的范围内。因此, 应该理解, 尽管本发明通过优选的实施方式和任选的特征被具体公开, 但本领域技术人员可以对本文公开的概念进行修改和变化, 而这些修改和变化被认为在由所附权利要求限定

的本发明范围内。在本文中,对本发明宽泛和概括地进行了描述。落入概括性公开内容中的每一较窄类型和亚类也形成本发明的一部分。这包括带有从该类中排除任何主题的限制性条件或否定性限制条件的本发明概括性描述,而不管该排除的内容是否在本文中被具体叙述。

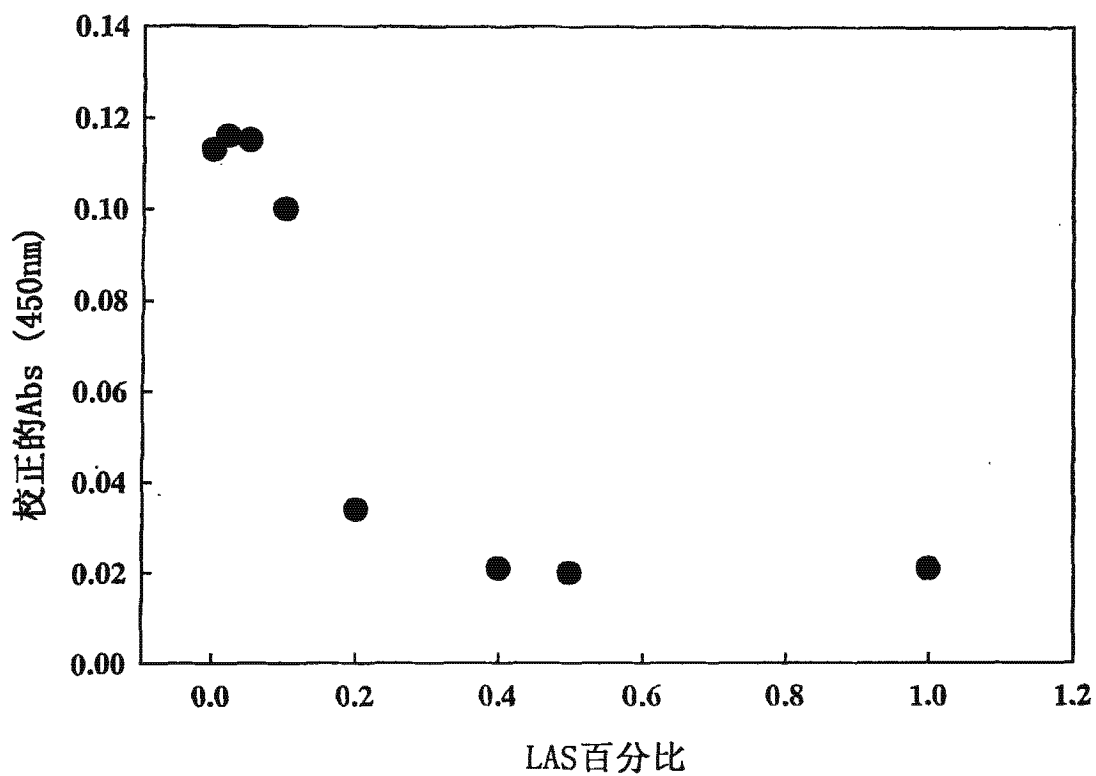


图 1

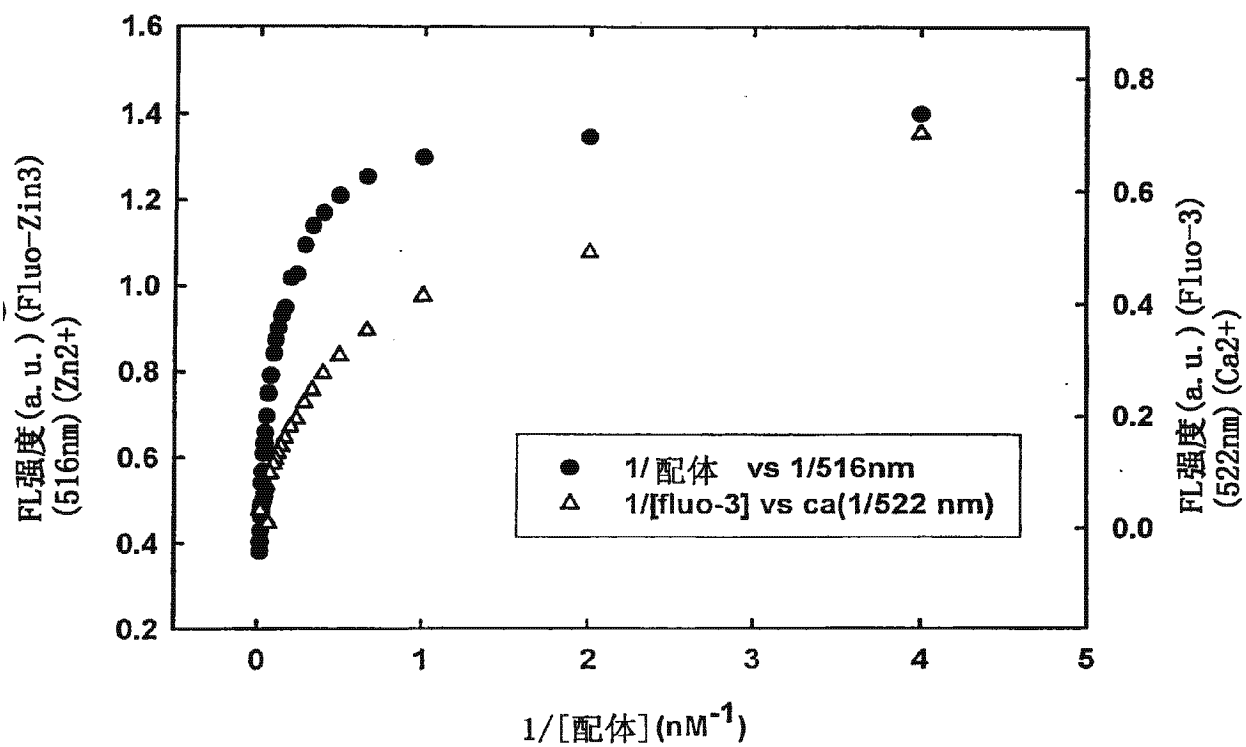


图 2

```

B.amylo_nprE -----MGLGKKLSVAVASFMSLTISLPGVQAAENPOLKENLTNFVPHKSHLVQSEL
B.sub_nprE -----MGLGKKLSVRVAAAFMSLSISLPGVQAAEGHQLKENQTNFLSKKPIAQSEL
B.aur_aur -----MRKFSRYAFTSMATVTLSSSLTPAALASDTNHPATSDINFEI
B.ste_nprT -----MNKRAMLGAIGLAFGLLAAPIGASAKGESIWNNEQWKTPSPFVSGSLNGGEQAL
B.cal_npr -----MNKRAMLGAIGLAFGLMAWPFGASAKGKSMVWNEQWKTPSPFVSGSLNG---RCS
B.thu_nprB MKKKSLALVLATGMAVTTFGGTGSFAFADSKNVLSTKKYNETVQSPFVSGDLTEATGKKA
B.cer_nprC MKKKSLALVLATGMAVTTFGGTGSFAFADSKNVLSTKKYNETVQSPFISGDLTEATGKKA
B.sub_nprB --MRNLTKTSLLAGLCTAAQMVVTHASAEESIEYDHTYQTPSYIIKSPQKPVQNTTQ
B.cerE33L_npr --MKNNKNFVKIGLTTGVMLSVIMPYGDAYAATEDLKVETKEDTFRGTGNLTVPSPQKSAEN

B.amylo_nprE PSVSDKAIKQYLKQNGKVFKNPSERLKLIQTTDDLGKXHFYRVPVWNGVFPKDSQVII
B.sub_nprE SAPNDKAVKQFLKKNNSNIFKGDPSKSVKLVESTTDALGYKHFRYAPVWNGVPIKDSQVIV
S.aur_aur TQKSD-AVKALKELPKSENKXHYQDYSVTDVKTDKKGFTHTYTLQPSVDGVHAPDKEVKV
B.ste_nprT EELVYQYVDRENGTFRLGGRARDRLALI--GKQTDDELGHTVMRFEQRHHGIPVYGTMLAA
B.cal_npr QELVYRYLDQEKNTFQLGGQARERLSLI--GNKLDELGHTVMRFEQAIASLCLMGAVLVA
B.thu_nprB ESUVFDYLNAAKGDYKLGKSAQDCFKVKQAKKDAVTDSTVLRLOQVYEGVPVWGSTQVA
B.cer_nprC ESUVFDYLNAAKGDYKLGKSAQDSFKVKQVKKDAVTDSTVVRMQVYEGVPVWGSTQVA
B.sub_nprB KESLPSYLDKHQTPQLKGNANSHFRVSK-TIKDPKTKQTFFKLTVYKGIPIYGFQAV
B.cerE33L_npr VAKDALGKTEQALSSKQVNTESKVNYNVTQSRKSYDGTTLVRLQQTVEGRDVGYYQLTA

B.amylo_nprE HVDKSNVYVINGELNNDVSAKTANSKKLSANQALDHAYKAIGKSPAEVSNGTVANKNKA
B.sub_nprE HVDKSDNVYAVNGELHNQSAAKTDNSQKVSSEKALALAFKAIGKSPDAVSNGAANKNSKA
S.aur_aur HADKSGKVLLING----DTDAKKVKPTNKVTLKDEAADKAFNAVKIDKNKAKNLQDDVI
B.ste_nprT HV-KDGEIALLSGSLIPNLGQPRLLKAKTVTVQQAIAEQDVTETVTKERPTTENGERR
B.cal_npr HV-NDGELSSLSGTLIPNLD-KRTLKTEAAISIQQAEMIAKQDVADRVTTERPAAEEGKP
B.thu_nprB HVSKDGSGLKVLSGTVAPDLKKEKLNKNKIEGAKAIEIAQKDLGTT----PKYEVEPK
B.cer_nprC HVSKDGSGLKVLSGTVAPDLKKEKLNKNKIEGAKAIEIAQQDLGVT----PKYEVEPK
B.sub_nprB AMKENKQVKSFPFGKVPQIKDVSVTPSISEKKAIHTARRELEASIGKI----EYLDGEPK
B.cerE33L_npr HINDDGVLTSVSGDSAQDLQQLQPI TLSEEDAKKQLFKIYGNLNT--FVEEPEIK
.. : . * :

B.amylo_nprE ELKAAATKDGKRYLAYDVTIRYIEPEPANWEVTVAETGKILKKQNKVE-----
B.sub_nprE ELKAIETKDGSYRLAYDVTIRYVEPEPANWEVLVAETGSILKKQNKVE-----
S.aur_aur KENKVEIDGDSNKYIYINIELITVTPEISHWKVKIDADTGAVVEKTNLVK-----
B.ste_nprT TRLVIYPTDGTARLAYEVNVRFLTVPVPGNWVYIIDATDGAILLNKFNQID-----
B.cal_npr TRLVIYPDEETPRLAYEVNVRFLTVPVPGNWIYIMDAADGKVLNKNWQMD-----
B.thu_nprB ADLYVYQNGEETTYAYVVNLNFLDPSPGNYFFIEADSGKVLNKNKLDHVANEDKSPVK
B.cer_nprC ADLYVYQNGEETTYAYVVNLNFLDPSPGNYFFIEADSGKVLNKNKNTIDHVTNDDKSPVK
B.sub_nprB GELYIYPHGDGYDLAYLVRSLTSEPEPGYWHYFIDAKNGKVIESFNAIH-----
B.cerE33L_npr QVVYVDENTNKATSAYQITFSASTPEYVSGTVLIDAFVGDLLKELVQKLGIQVDSI---
* : . * : : * * : :

B.amylo_nprE -----HAATGTGTGTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLKPTGTQIITYD
B.sub_nprE -----HAAATGSGTTLKGATVPLNISYEGGKYVLRDLKPTGTQIITYD
S.aur_aur -----EAAATGTGKGVLDGTDKIDINISIDGGFSLDLTHQGLKLSAYNFN
B.ste_nprT -----SRQPGGGQPVAGASTVGVGGRVLDGQKYINTTYSYYGYGYLQDNTRGSGIFTYD
B.cal_npr -----EAKPGGAQPVAGTSTVGVGGRVLDGQKYINTTYSYYGYGYLQDNTRGSGIFTYD
B.thu_nprB QEAPKQEVKPAVKPVTGTNAVGTGKGVLDGTDKSLNTLSS--SSYYLQDNTRGATIFTYD
B.cer_nprC QEAPKQDAKAVVKPVTGTNVGTGKGVLDGTDKSLNTLSS--SSYYLQDNTRGATIFTYD
B.sub_nprB -----EAACTGIGVSGDEKSPDVTEQN--GRFYLADETRGKGINTFD
B.cerE33L_npr -----VQSATSNKSQDPSKLTGTGKDDLGMNRTFGISQRS-DGTYTLADYSRGKGITET
* * * : . . :

B.amylo_nprE LQNREY-----NLPGLTVSSTTQFTTSSQRAAVDAHYNLGKVDYDFYQKFNRSYDN
B.sub_nprE LQNRQS-----RLPGLTVSSTTKTFTSSQRAAVDAHYNLGKVDYDFYENFKRNSYDN
S.aur_aur DQTGQ-----ATLTNEDENFVKDDQAGVDANYAKQTYDYKNTFGRESYDN
B.ste_nprT GRNR-----TVLPGLSWTDGDNQFTASYDAAVDAHYYAGVVYDYKXNVHGRLSYDG
B.cal_npr GRNR-----TVLPGLSWADGDNQFTASYDAAVDAHYYAGVVYDYKXNVHGRLSYDG
B.thu_nprB AKNR-----TTLPGTLWVDADNVFNAAAYDAAVDAHYYAGKTYDYKATFNRSIND
B.cer_nprC AKNR-----STLPGLTWADADNVFNAAAYDAAVDAHYYAGKTYDYKATFNRSIND
B.sub_nprB AKNLNETLFTLLSQLIGYTCKEIVSGTSVFNEPAAVDAHANAQAVDYDYKTFGRDSFDQ
B.cerE33L_npr ANYKDYNNYR--RNWGYLDDLVTNSNTNFTDPKAVSAHYLATKVYDFYQEKYSRNSFDN
. : . * : : * * : :

B.amylo_nprE KGGKIVSSVHYG-----SRYNNAAWIGDQMIYGDGDSFFSPLSGSMDVTAHEMT
B.sub_nprE KGSKIVSSVHYG-----TQYNNAAWIGDQMIYGDGDSFFSPLSGSLDVTAHEMT
S.aur_aur HGSPIVSLTHVNHYGQ-----DNRNNAAWIGDKMIYGDGGRFTTNLSGANDVVAHELT
B.ste_nprT SNAAIRSTVHYG-----RGYNNAFWNGSQMVYGDGQDTFLPFSSGIDVVGHELT
B.cal_npr SNAAIRSTVHYG-----RGYNNAFWNGSQMVYGDGQDTFLPFSSGIDVVGHELT
B.thu_nprB AGAPLKSTVHYG-----SKYNNAFWNGSQMVYGDGQDTFLPFSSGIDVVGHELT
B.cer_nprC AGAPLKSTVHYG-----SNYNNAFWNGSQMVYGDGQDTFLPFSSGIDVVGHELT
B.sub_nprB NGARITSTVHYG-----KQWNNAAWNGVQMVYGDGDSKFKPLSGSLDIVAHEIT
B.cerE33L_npr NGQKVISVVGWNTNGTNKGNPKQWFNAFNGAMLVYGD-----PIVRAFDVAGHEFT
. : * * : : * * : : * : :

```

图 3

图 3(续)

288

嗜热菌蛋白酶	KAAYLISQGGTHYGVSVVGIGRDKLGKIFYRALTQVLTPTSNFSQLRAAA
嗜热脂肪芽胞杆菌	KAAYLISQGGTHYGVSVVGIGRDKLGKIFYRALTQVLTPTSNFSQLRAAA
热溶芽胞杆菌	KAAYLLSQGGVHYGVSVVTGIGRDKMGKIFYRALVYYLTPTSNFSQLRAAC
蜡样芽胞杆菌	KQAYLLANGGTHYGVTVTGIGDKLGAIIYRANTQYFTQSTTFSQARAGA
短短芽胞杆菌	KAAYLLAEGGTHYGVVRVNGIGRTDTAKIIYHALTHYLTPYSNFSAMRRAA
多粘芽胞杆菌	KAYYLLAQGGTFHGVTVNGIGRDAAVQIYSAFTNYLTSSSDFSNARAAV
短小芽胞杆菌	KAAYN-----TITKLGVSQSQQIYYRALTTYLTTPSSTFKDAKAAL
枯草杆菌变体	KAAYN-----TITKLGVSQSQQIYYRALTTYLTTPSSTFKDAKAAL
枯草杆菌	KAAYN-----TITKLGVSQSQQIYYRALTTYLTTPSSTFKDAKAAL
解淀粉芽胞杆菌	KAAYN-----TITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTTPSSTFKDAKAAL

* * : ; * * : * . * : . .

316

嗜热菌蛋白酶	VQSATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK (SEQ ID NO:182)
嗜热脂肪芽胞杆菌	VQSATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK (SEQ ID NO:183)
热溶芽胞杆菌	VQAAADLYGSTSQEVNSVKQAFNAVGVY (SEQ ID NO:184)
蜡样芽胞杆菌	VQAAADLYGANSAEVAAVKQSFSAVGVN (SEQ ID NO:185)
短短芽胞杆菌	VLSATDLFGANSRQVQAVNAAYDAVGVK (SEQ ID NO:186)
多粘芽胞杆菌	IQAAKDLYGANSAEATAAAKSFDAVG- (SEQ ID NO:187)
短小芽胞杆菌	IQSARDLYGST--DAKVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:188)
枯草杆菌变体	IQSARDLYGST--DAKVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:189)
枯草杆菌	IQSARDLYGST--DAKVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:190)
解淀粉芽胞杆菌	IQSARDLYGSQ--DAASVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:191)

: : * * : : . . : : * * *

图 4(续)

NprE	---AATTGTGTTLK--GKTVSLNISSESGKYVLRDL SKPTGTQIITYDLQNREYNLPGT-
1BQB.A	---AAATGTGKGV--GDTKDININSIDGGFSLEDLT--HQGKLSAYNFNDQTGQ--AT-
1EZM	----AEAGGPGGNQKIGKYTYGSDYGPLIVNDRCEMD---DGNVITVDMN SSTDDSKTTP
1NPC	VTGTNKVGTGKGV--GDTKS--LNTTSLGSSYYLQDNTRGATIFTYDAKNRS-TLPGT-

1BQB.A	LVSSTTNQFTTSS---QRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRSYDNKGKIVSSVHYGS--
1EZM	LITNEDENFVKDD---QRAGVDANYAKQTYDYKNTFGRESYDNHGSPIVSLTHVNHYG
1NPC	FRFACPTNTYKQVNGAYSPLNDAHF-FGGVVFKLYRDWFGTSPLT--HKLYMKVHYGR--
	LWADADNVFNAAY---DAAAVDAHYAGKTYDYKATFNRRNSINDAGAPLKSTVHYGS-

NprE	---RYNNAAWIGDQMIYGDGDGSGFSPLSGSM DVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALN
1BQB.A	GQDNRRNNAWIGDKMIYGDGDGRFTNLSGANDVVAHEITHGVTQQTANLEYKDQSGALN
1EZM	---SVENAYWDGTAMLFGDGAT-MFYPLV-SLDVAAHEVSHGFTEQNSGLIYRGQSGGMN
1NPC	---NYNNAFWNGSQMVYGDGDGVTFSTLSGGIDVIGHELTHAVTENSNNLIYQNESGALN

NprE	ESFSDVFGYFND-----TEDWDIGEDITVS---QPALRSLSNPTKYG-QPDNFKNYKNLP
1BQB.A	ESFSDVFGYFVD-----DEDFLMGEDVYTPGKEGDALRSM SNPEQFG-QPSHMKDYVY--
1EZM	EAFSDMAGEAAEFYMRGKNDFLIGYDIKKG---SGALRYMDQPSRDGRSIDNASQYYNG-
1NPC	EAI SDIFGTLVEFYDNRNPDWEIGEDIYTFGKAGDALRSM SDPTKYG-DPDHYSKRYTGS

NprE	NTDAGDYGGVHTNSGIPNKAAYNTIT-----KIGVN--KAEQIYYRALTVYLTTPS
1BQB.A	--TEKDNGGVHTNSGIPNKAAYNVIQ-----AIGKS--KSEQIYYRALTEYLTSN
1EZM	-----IDVHSSGVYNRAFYLLAN-----SPGWDTRKA FEVFDANRYYTAT
1NPC	----SDNGGVHTNSGII NKQAYLLANGGTHYGVTVTGIGKD-KLGAIIYRANTQYFTQS

NprE	STFKDAKAALIQSARDLYG--SQDAASVEAAWNAVGL- (SEQ ID NO:192)
1BQB.A	SNFKDLKDALYQAAKDLYE--QQTAEQVYEAWNEVGVE (SEQ ID NO:193)
1EZM	SNYNSGACGVIRSAQNRY--SAADVTRAFSTVGVTCP (SEQ ID NO:194)
1NPC	TTFSQARAGAVQAAADLYGANSAEVAAVKQSFSAVGVN (SEQ ID NO:195)

图 5

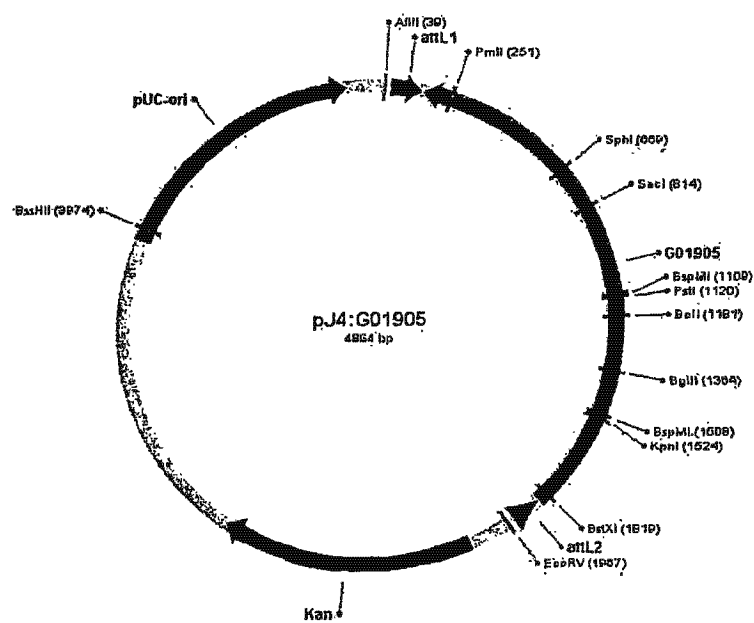


图 6

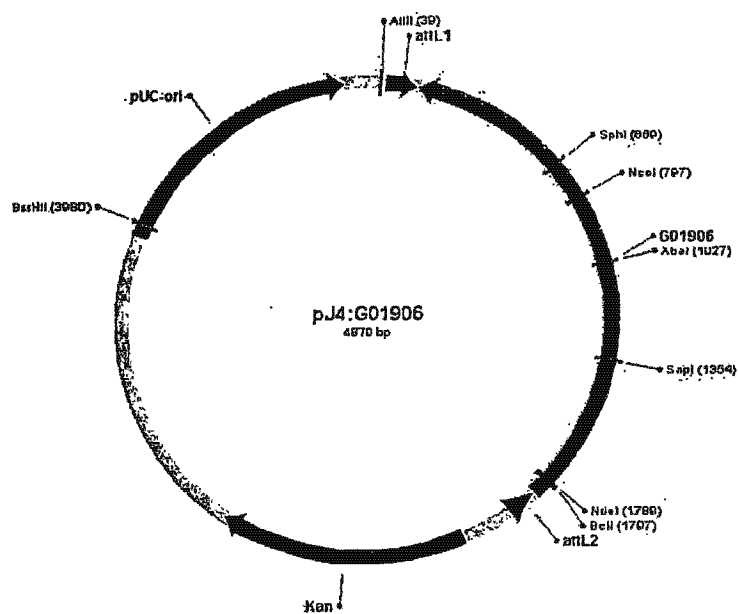


图 7

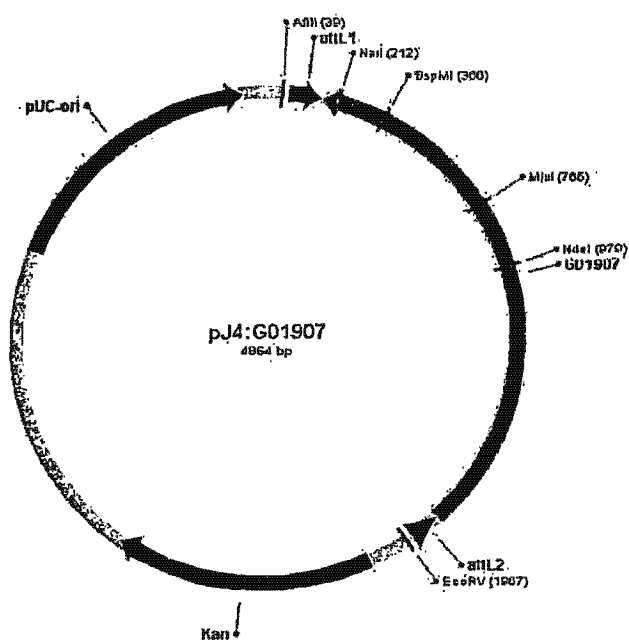


图 8

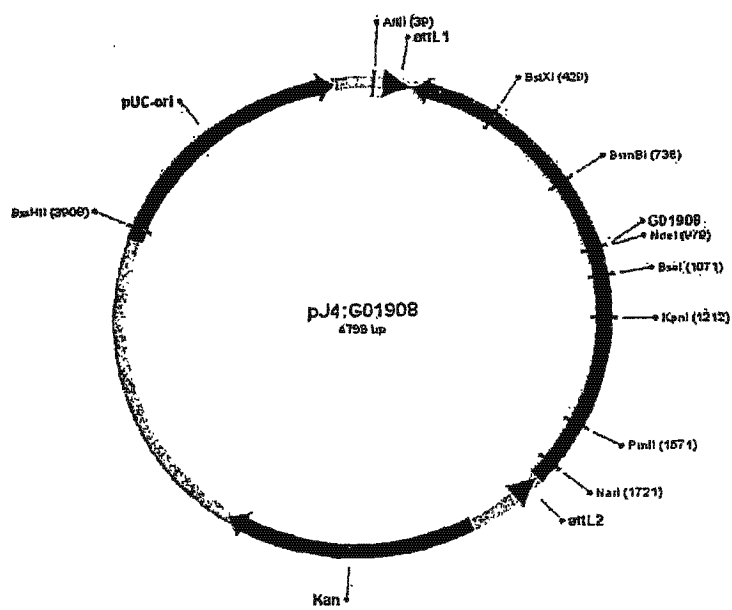


图 9

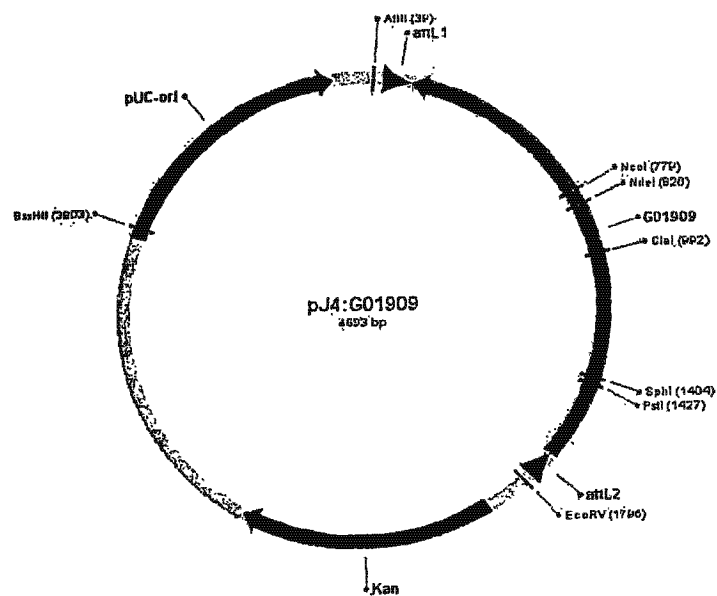


图 10

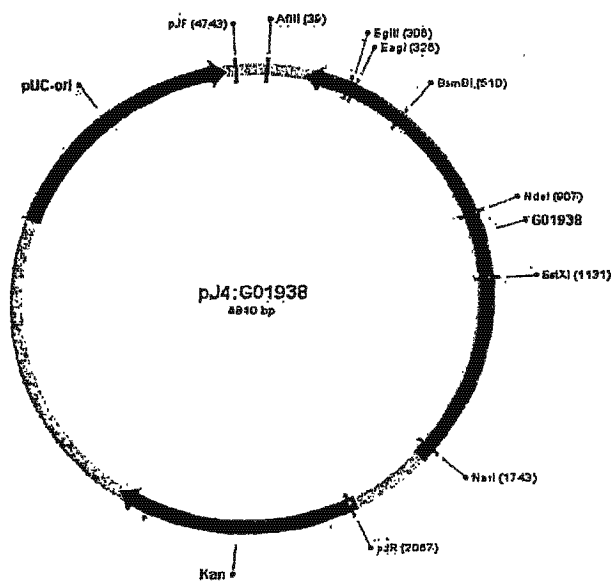


图 11

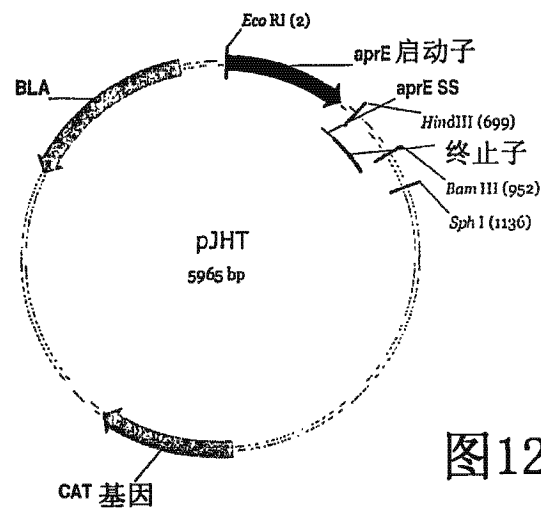


图12

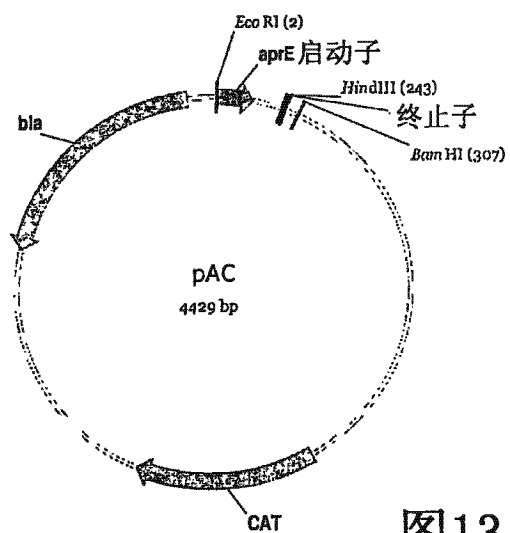


图13

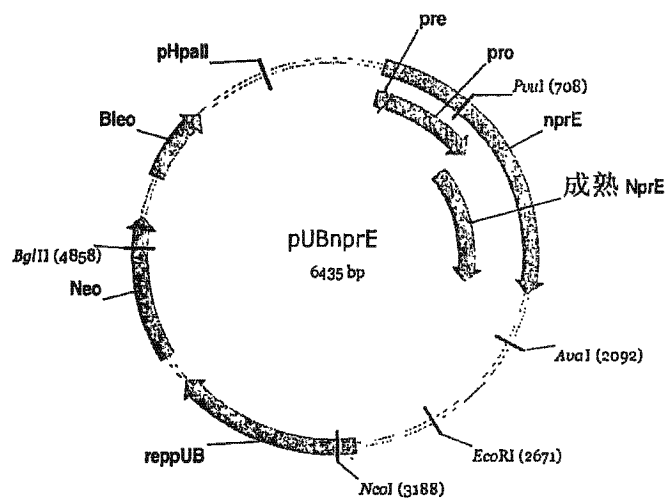


图14

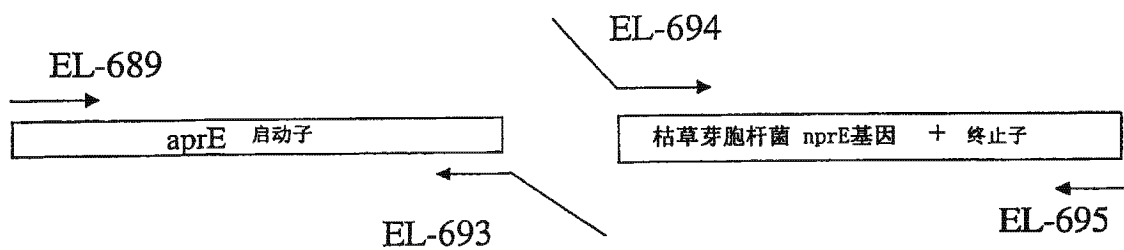


图15

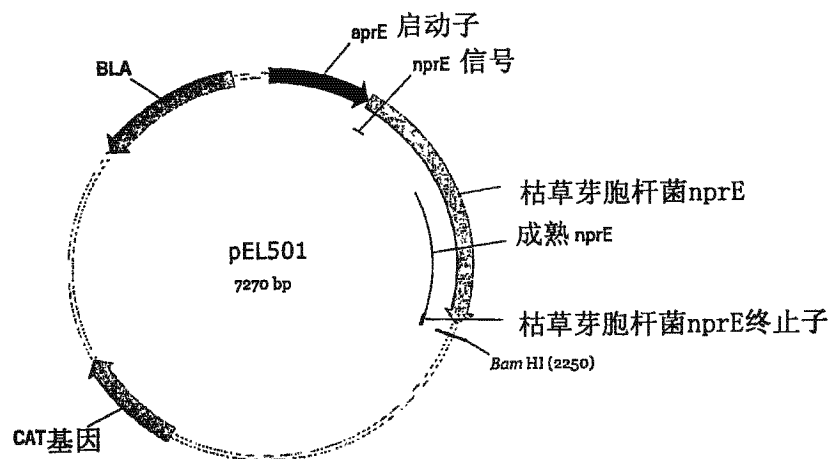


图16

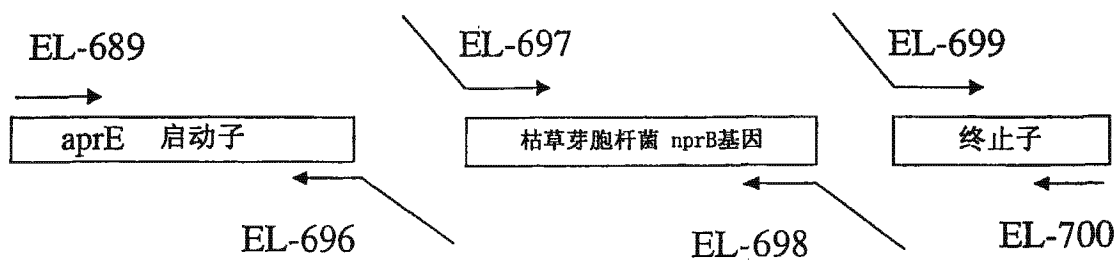


图 17

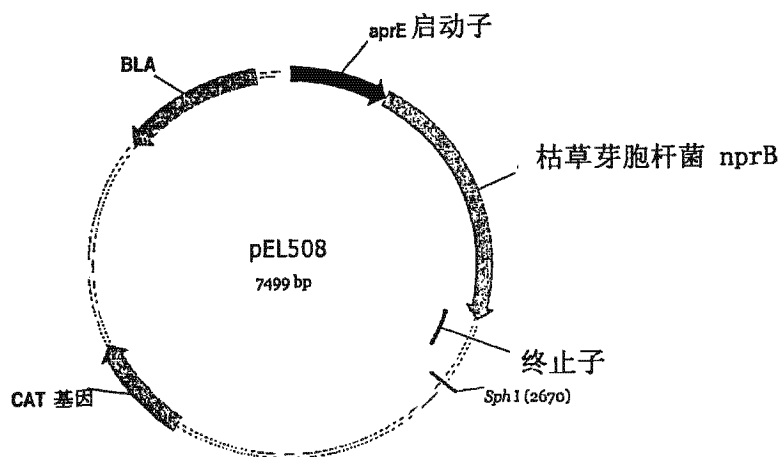


图 18

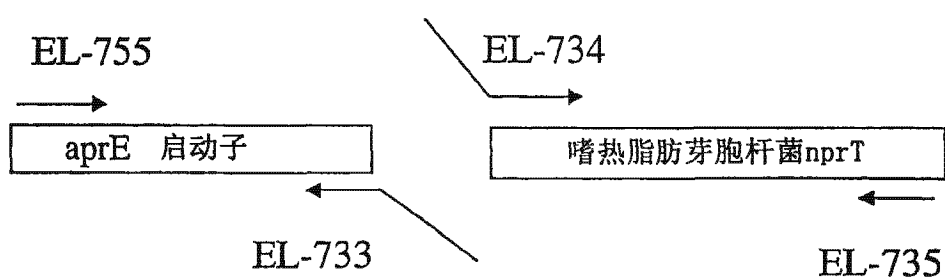


图 19

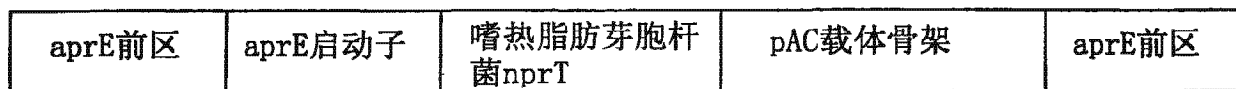


图 20

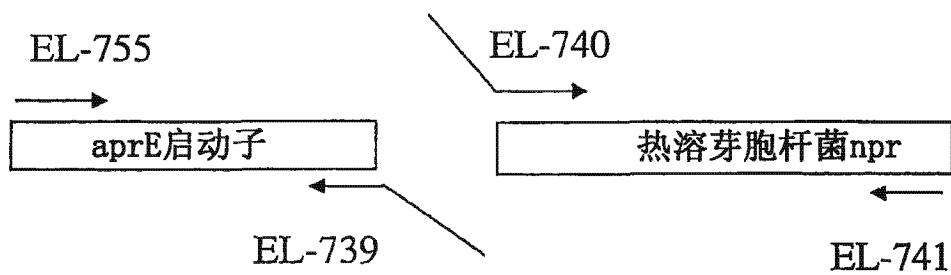


图 21

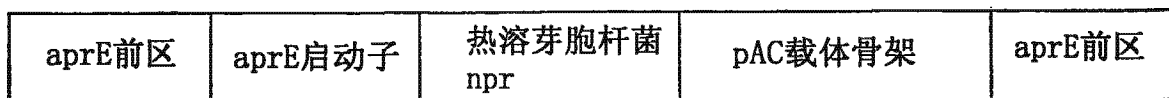


图 22

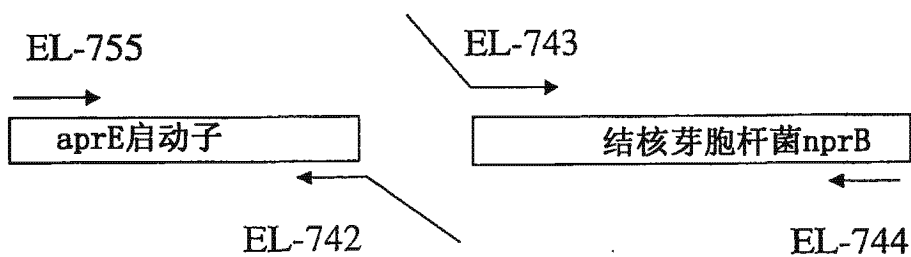


图 23

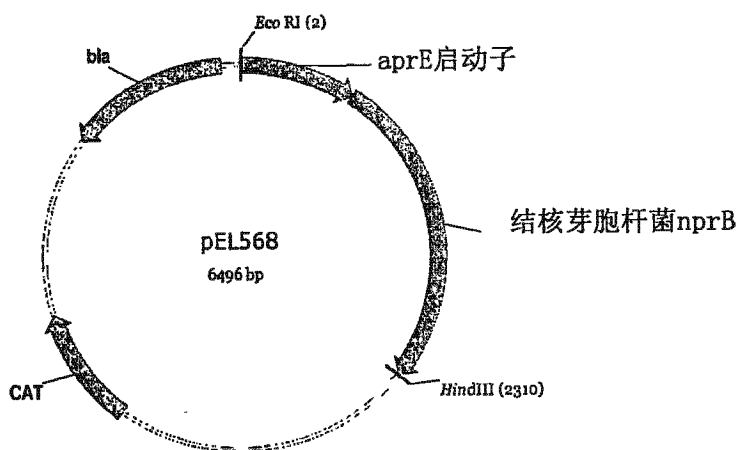


图 24

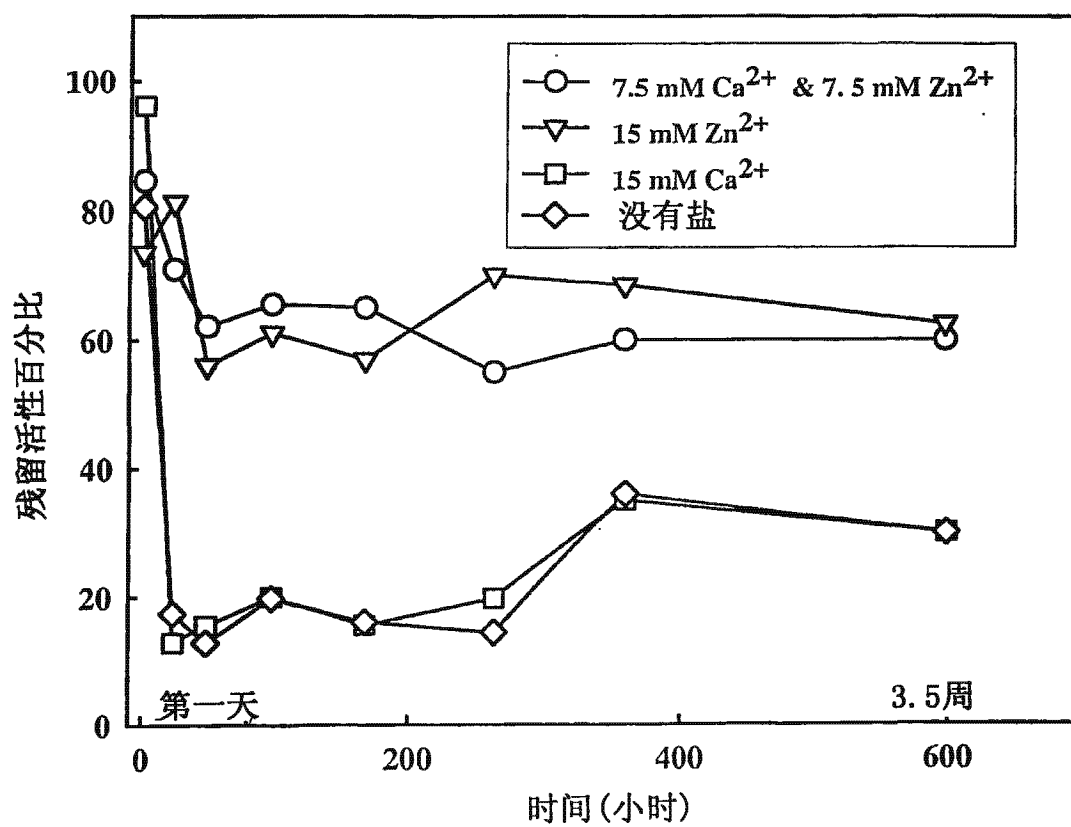
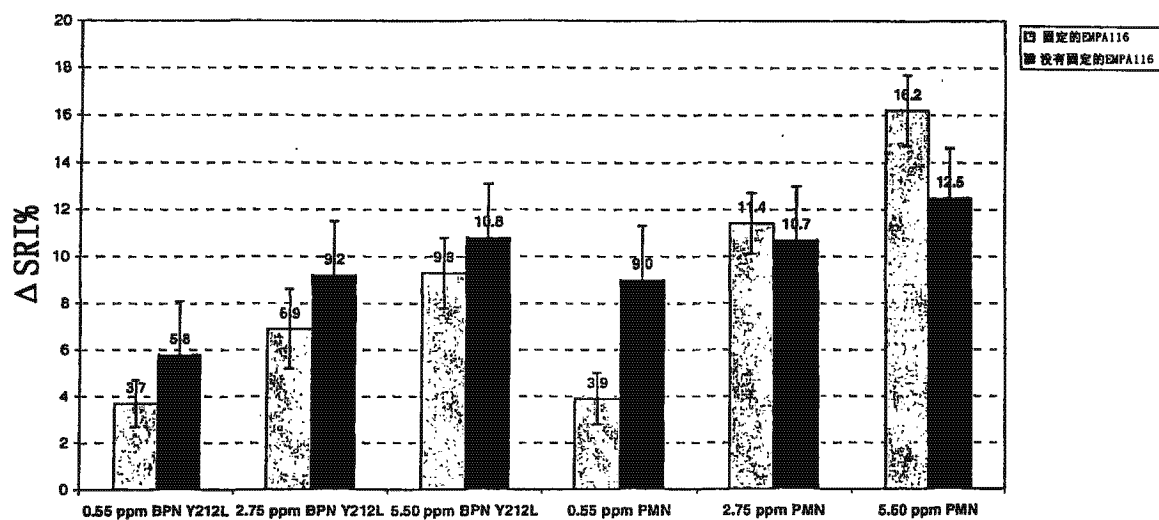
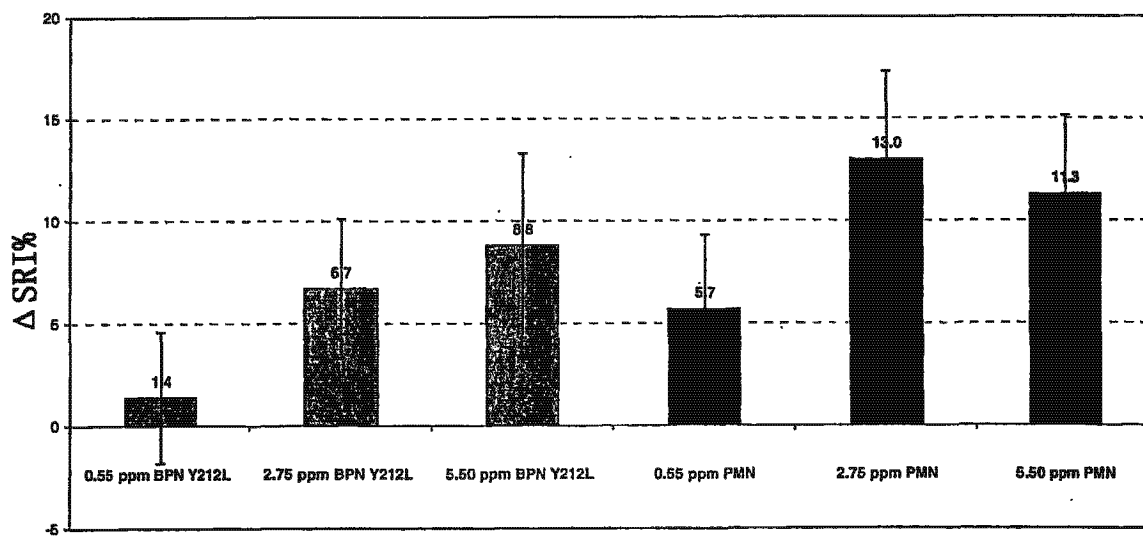


图 25

对EMPA116的洗涤性能
(n=24)

A

对Equest草介质污染的洗涤性能
(n=24)

B

图26

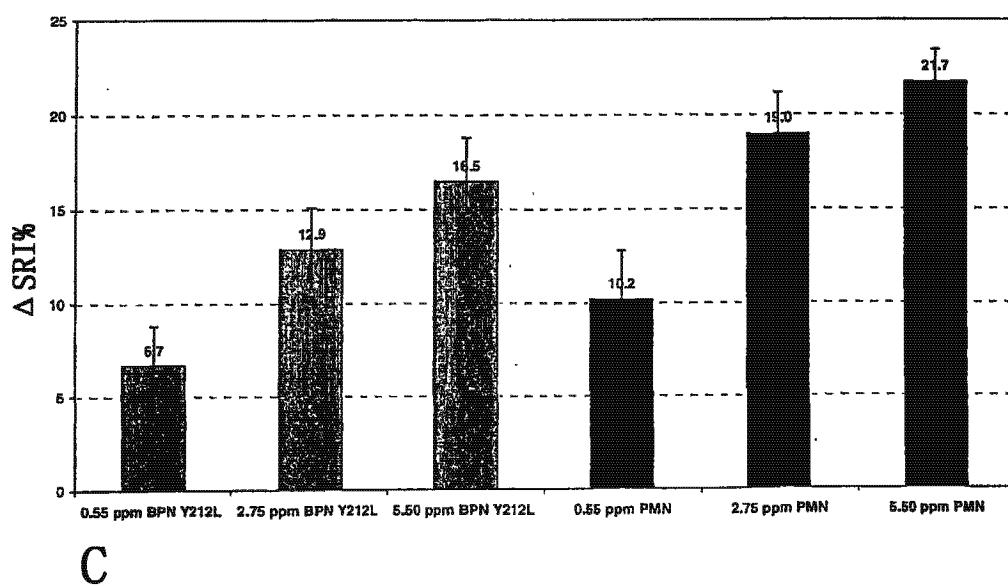
对CFT C-10的洗涤性能
(n=24)

图 26 (续)

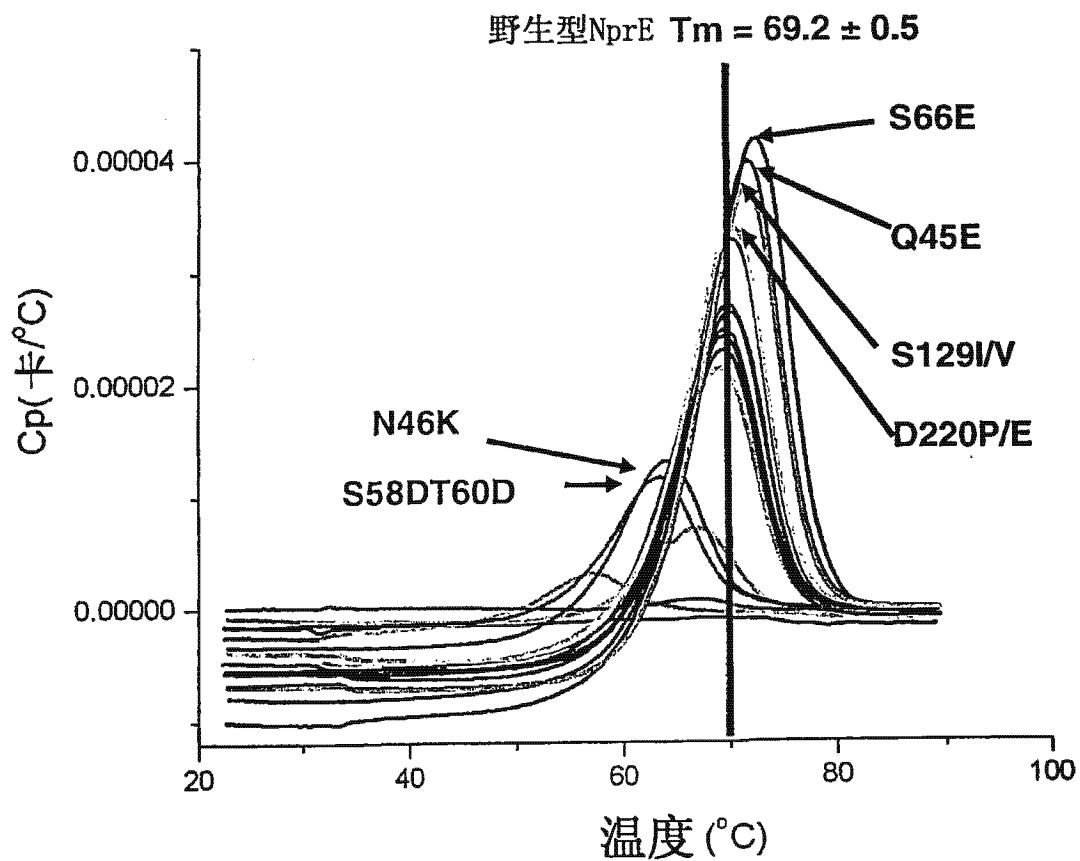


图 27

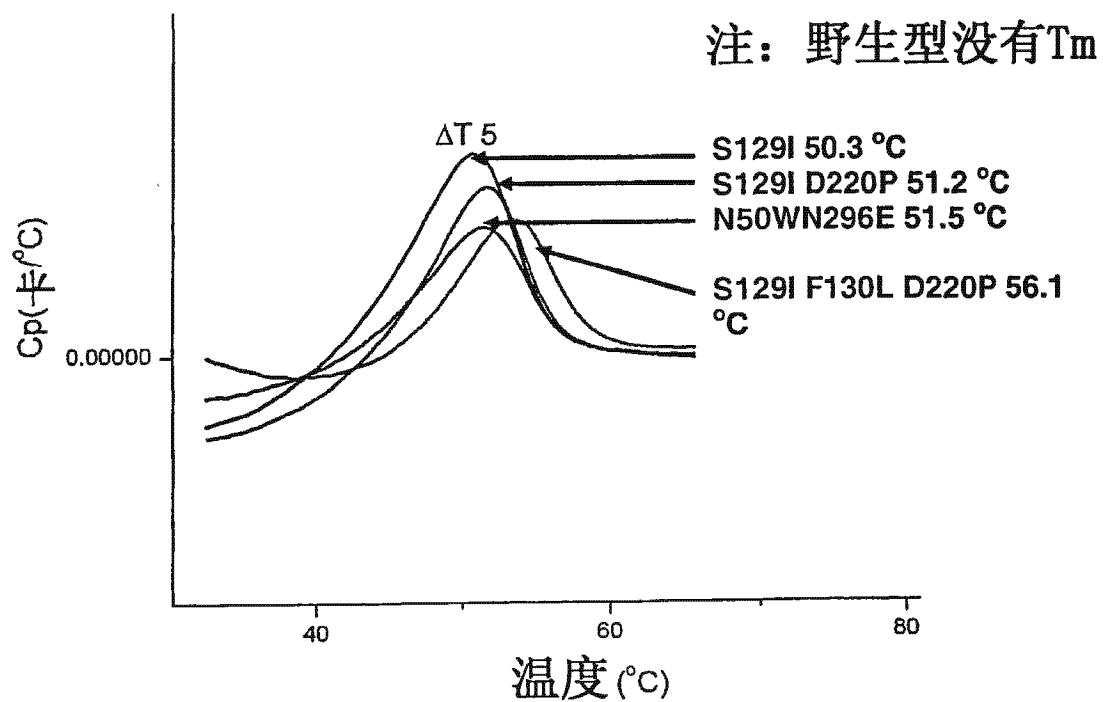


图 28

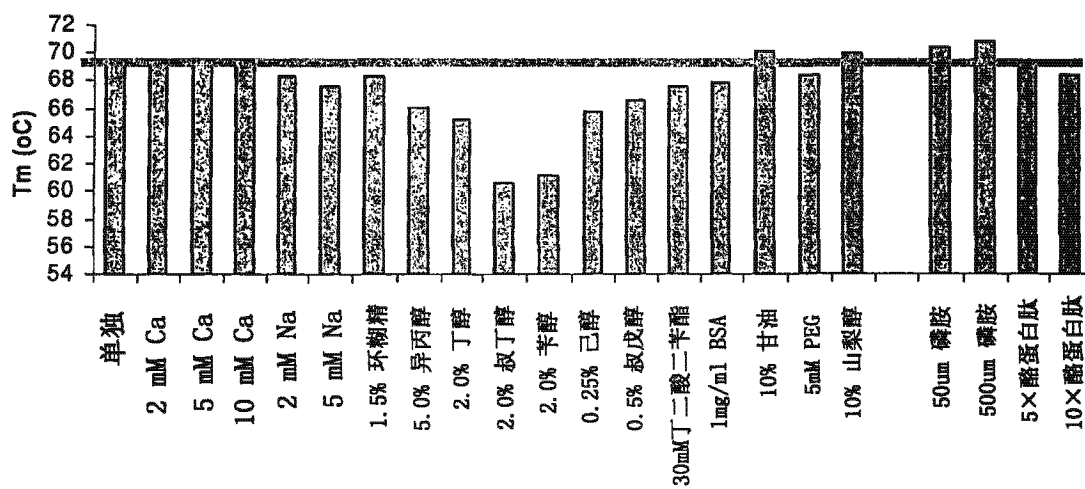


图 29

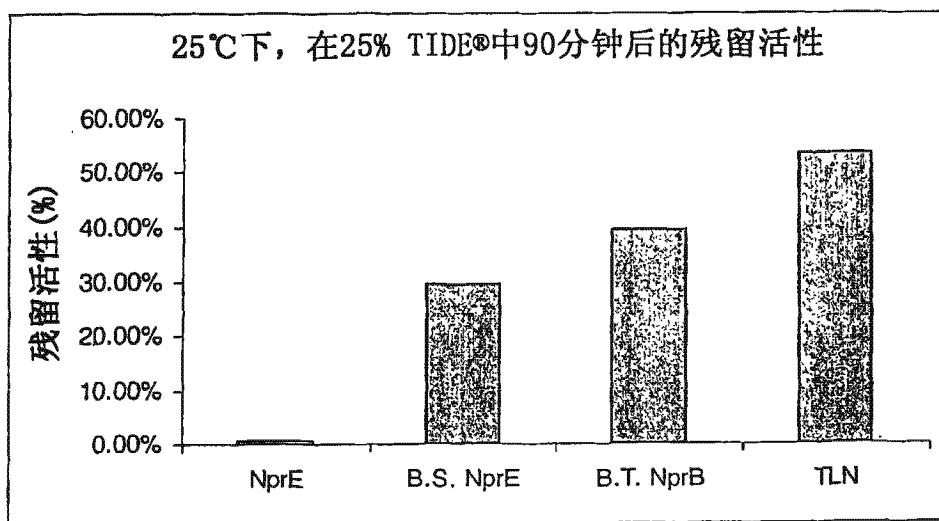


图 30

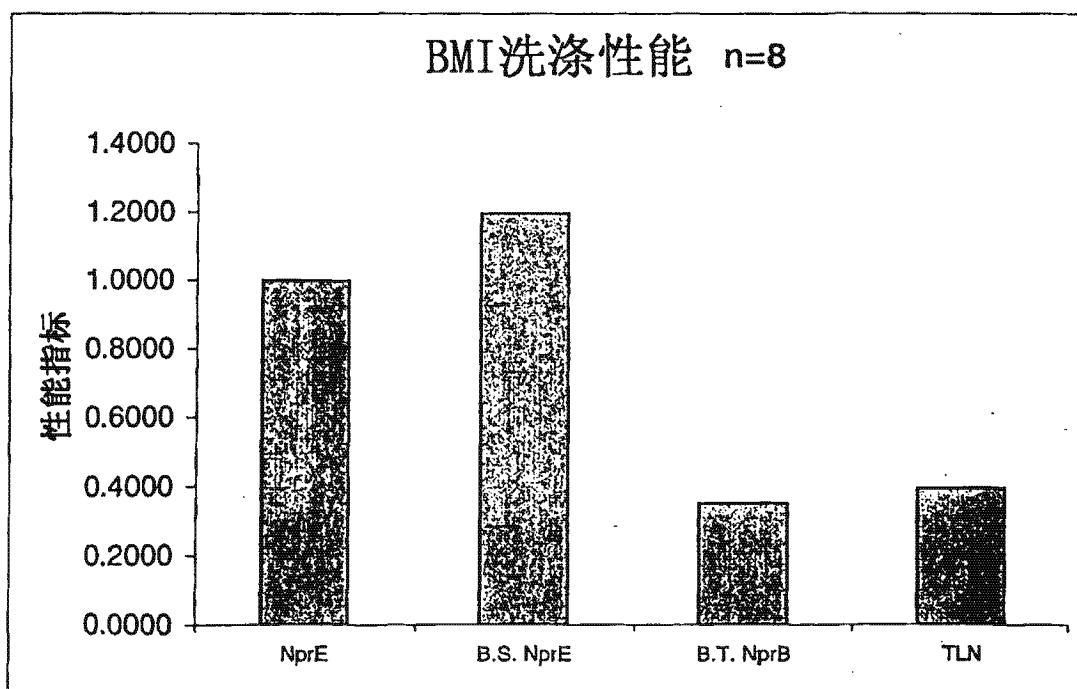


图 31

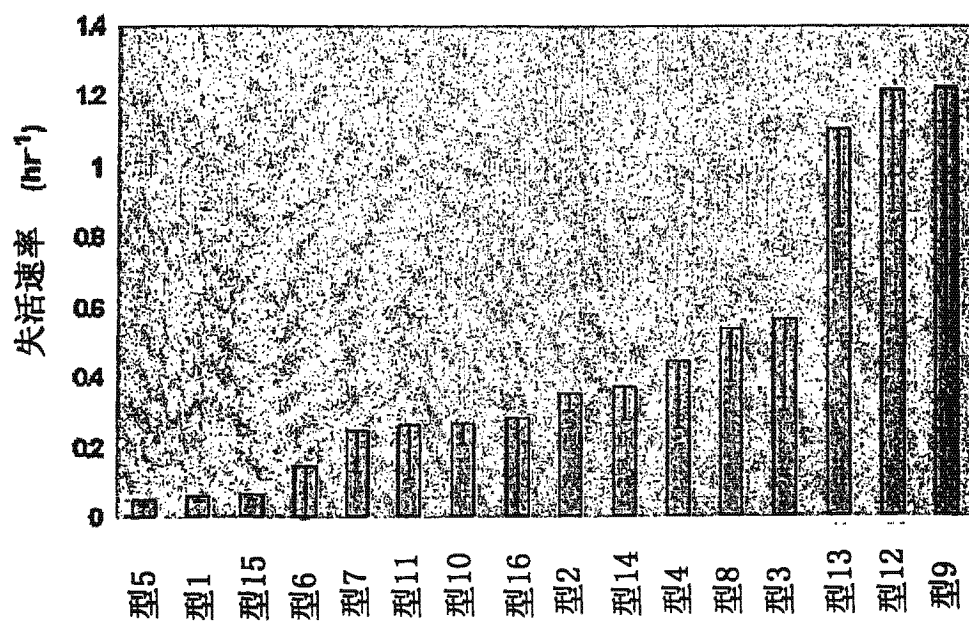


图 32

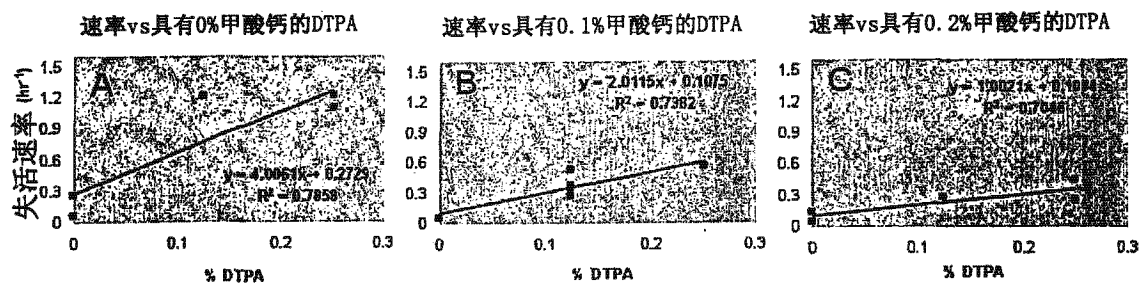


图33

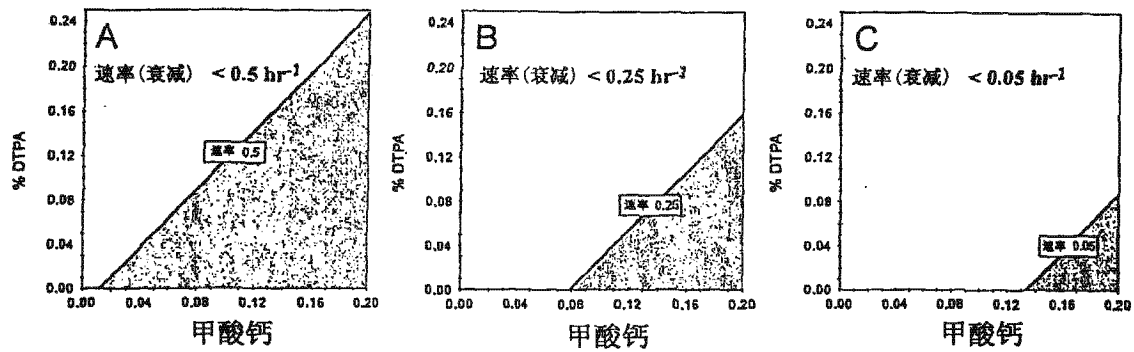


图34

片段1:

AATTGTTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGLTVSSTTNQFTTSSQRAAVDA
 HYNLGKVDYDFYQKFNRRNSYDNKGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDSFFSPLSGSMDVTAHEMTHG
 VTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDTEDWDIGEDITVSQPALRSLSNPTKYGPDNFKNYKNLPNT
 (SEQ ID NO:222)

片段2(磨碎的):

DAGDYGGVHTNSGIPNKAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYGSQDAASVEA
 AWWAVGL (SEQ ID NO:223)

片段3:

AATTGTTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGLTVSSTTNQFTTSSQRAAVDA
 HYNLGKVDYDFYQKFNRRNSYDNKGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDSFFSPLSGSMDVTAHEMTHG
 VTQETANLNYENQPGALNESFSDVFGYFNDTEDWDIGEDITVSQPALRS (SEQ ID NO:224)

片段4(基于大小推测):

AATTGTTGTTLKGKTVSLNISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGLTVSSTTNQFTTSSQRAAVDA
 HYNLGKVDYDFYQKFNRRNSYDNKGKIVSSVHYGSRYNNAAWIGDQMIYGDGDSFFSPLSGSMDV (SEQ ID
 NO:225)

片段5:

LSNPTKYGPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGIPNKAAYNTITKIGVNKAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDA
 KAALIQSARDLYGSQDAASVEAAWWAVGL (SEQ ID NO:226)

图 35