[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 9/10
C12N 15/54
C12P 19/04

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97100343.2

[45]授权公告日 2002 年 4 月 24 日

[11]授权公告号 CN 1083487C

[22]申请日 1997.1.9 [24]颁证日 2002.4.24

[21]申请号 97100343.2

[30]优先权

[32]1996.4.18 [33]DE [31]19615336.0

[73]专利权人 电化学工业股份有限公司(国际)

地址 联邦德国慕尼黑

[72]发明人 格奥尔格·E·舒尔茨

格茨·帕西格拉 安东·坎杜西奥

冈特·维希

[56]参考文献

EP0291067A	1988.11.17	C08B37/16
EP0630967A1	1994.12.28	C12N9/10
US5409824A	1995. 4.25	C12N9/10

审查员 王朋飞

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 用于生产γ-环糊精的环糊精糖基转移酶

[57]摘要

在将淀粉或淀粉样底物转化为环糊精时,本发明的环糊精糖基转移酶产生的γ-环糊 精量在一定程度上有所提高,同时,与用于制备其的原型环糊精糖基转移酶相比较,其环 糊精糖基转移酶总比活仍显示出至少60%的活性,这些环糊精糖基转移酶的氨基酸序列 与已知的环糊精糖基转移酶的氨基酸序列的区别在于第155位至包括第195位氨基酸在内 的区域中,至少有1个氨基酸缺失,这种缺失导致蛋白的γ-环糊精糖基转移酶活性的提 高,此处,蛋白质序列的第1位为环糊精糖基转移酶的信号肽的起始位点。

ISSN1008-4274

权　利　要　求　书

1、一种环糊精糖基转移酶蛋白，其在将淀粉底物转化为环糊精时产生的γ－环糊精量比野生型高，同时，与用于制备其的原型环糊精糖基转移酶相比较，其环糊精糖基转移酶总比活仍显示出至少 60%的活性，该环糊精糖基转移酶蛋白包括环糊精糖基转移酶，所述环糊精糖基转移酶的氨基酸序列与原型环糊精糖基转移酶的氨基酸序列的区别在于第 155 位至包括第 195 位氨基酸在内的区域中，有 4－8 个氨基酸缺失，这种缺失导致所述蛋白的γ－环糊精糖基转移酶活性的提高，此处，蛋白质序列的第 1 位为环糊精糖基转移酶的信号肽的起始位点。

2、如权利要求 1 所述的环糊精糖基转移酶蛋白，其中其蛋白质序列的第 155 到第 195 位氨基酸区域中有 6 个氨基酸残基被缺失，这样的缺失导致蛋白的γ－环糊精糖基转移酶活性的提高，此处，蛋白质序列的第 1 位为环糊精糖基转移酶的信号肽的起始位点。

3、如权利要求 1 所述的环糊精糖基转移酶蛋白，其氨基酸序列不同于 SEQ ID NO:1－4 中所列环糊精糖基转移酶的氨基酸序列之处在于至少分别缺失了如下氨基酸残基：相对于 SEQ ID NO：1 缺失了 LETDPS，相对于 SEQ ID NO：2 缺失了 DRDNPG，相对于 SEQ ID NO：3 缺失了 LETNPN，相对于 SEQ ID NO：4 缺失了 METDTS，而其余的氨基酸序列与 SEQ ID NO：1－4 所列的各种微生物来源的环糊精糖基转移酶氨基酸序列同源，所述序列所显示的环糊精糖基转移酶活性与未缺失的原型环糊精糖基转移酶相同。

4、一种制备编码环糊精糖基转移酶的突变基因的方法，其中通过周知的诱变方法，使编码原型环糊精糖基转移酶的 DNA 序列发生突变，从而使得由突变基因的 DNA 序列所编码的第 155 到第 195 位区域的氨基酸序列与由未诱变的基因的 DNA 编码的氨基酸序列相比，缺失了 4－8 个氨基酸残基。

5、如权利要求 4 所述的方法，其中通过周知的诱变方法，使编码原型环糊精糖基转移酶的 DNA 序列发生突变，从而使得由突变基因的 DNA 序列所编码的第 155 到第 195 位区域的氨基酸序列与由未诱变的基因的 DNA 编码的氨基酸序列相比，缺失了 6 个氨基酸残基。

6、一种编码如权利要求 1 所述的环糊精糖基转移酶蛋白的 DNA 序列。

7、一种制备γ－环糊精糖基转移酶的方法，其中将至少一种如权利要求 6 所述的 DNA 序列在微生物中表达。

8、一种利用环糊精糖基转移酶通过转化淀粉来制备γ－环糊精的方法，其中采用至少一种如权利要求 1 至 3 任一项中所述的环糊精糖基转移酶蛋白作为环糊精糖基转移酶。

说　明　书

用于生产γ-环糊精的环糊精糖基转移酶

本发明涉及用于生产γ-环糊精的环糊精糖基转移酶(CGTase) EC2.4.1.19，并涉及 γ-环糊精糖基转移酶的制备方法及应用。

通常情况下，环糊精是由淀粉或淀粉样底物制备而得的。在这种制备过程中，CGTase被用作为催化剂，将淀粉转化为环糊精（CD）。当反应进行到热动力学平衡状态时（CD产量最大），由于热动力学的原因，不论反应中用的CGTase为何种类型，淀粉都将主要被转化为β－CD。然而在起始阶段，即淀粉转化反应刚刚开始时，使用不同类型的转移酶会使初级阶段产物混合物在组成上有所不同。依据此起始阶段中所产生的CD主要是α－，β－，还是γ－类型的，分别将对应的CGTase划分成α－，β－，和γ－类型。

这些酶适用于、并已经用于CD的工业化生产。迄今为止，只在细菌中检测到有这些酶的存在。到目前为止，α－CGTase仅在软化芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、和Klebsiella oxytoca中得到鉴定。在环状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、Bacillus ohbensis、微球菌、以及未精确分类的嗜碱性芽孢杆菌如：芽孢杆菌38-2, 17-1, 1011或1-1中，都已检测到β－CGTase。有报道说，在枯草芽孢杆菌313，芽孢杆菌A1-6和芽孢杆菌290-3中具有能在初始阶段催化γ－CD形成的高活性的天然转移酶。

由于环糊精的工业化生产过程中所用的CGTase总是将淀粉转化成多种环糊精的混合物，因而，人们发展出了各种方法以分离纯化环糊精（α－、β－或γ－型的）。这些方法描述如下:

通过色谱法，例如根据其分子量的差异（US-A-4，808，232）可从反应产物混合物中分离出特定的CD来。

通常，在将淀粉以酶学方法转化成环糊精时，可在反应体系中加入只与某一特定的CD发生反应的配位剂，从而使该种CD形成不溶性的配合物。然后，可以用物理学的方法，从反应混合物体系中将其分离出来。接着再将该配合物溶解以纯化出均一的CD（参见EP0291067）。

如果采用的是γ－CGTase，在反应混合物体系中加入有机溶剂，如乙醇，可使产物的组成向γ－CD的方向转移。（参见J. Ferm. Bioeng. (1990) 70(3), pp.150-154）

如果要制备某一种类型的纯化 CD，则在生产的每一个过程中都应对所使用的 CGTase 进行最优化选择，以使所形成的初始产物中该类型的 CD 尽可能地多。

关于α-和β - CGTase 特异性的现有知识已足以进行相应的环糊精的工业化生产。相比而言，没有一个已知的天然γ - CGTase 的产物特异性能允许进行相应规模的γ - CD 的工业化生产。

因此，要制备γ - CD，建议参照 CA115： 157165，通过添加γ - CD 特异性的配位剂糖基化甘草甜，麦芽糖和一种 CGTase，可将α - 和/或β - 环糊精酶促转化为γ - CD。

制备γ - CD 的另一种选择方案是通过对β - CGTase 的特定氨基酸残基进行置换以增强它的γ - CD 特异性，从而使该突变后的转移酶所产生的γ - CD 比例增加，以便能够进行工业化规模的γ - CD 的生产。已知可行的诱变方案参见 DE43 24 650 A1（相应于 US - A - 5， 474 917），Biochemistry (1994)33 (33), pp.9929-9936, Biochemistry (1995) 34 (10), pp.3368 - 3376,和 J. Biotech. (1994) 32, pp. 283-288。

通过对β - CGTase 进行诱变所获得的这种 CGTase 衍生物对γ-CD 的特异性增加，依据其产物类型分布的情况，理论上是适用于进行γ - CD 的工业化生产的。但它的一个不足之处是引入相应的突变之后，会使酶的比活下降。根据所引入的氨基酸残基的不同，诱变后的酶对γ - CD 的特异性虽然都提高了，但催化 CD 生成的活性只有原型转移酶的 25 %到 59 %(Biochemistry (1994) 33(33), pp. 9929-9936, Biochemistry (1995) 34(10), pp. 3368-3376)。

本发明的目的在于提供这样的环糊精糖基转移酶（ CGTase ），其在将淀粉或淀粉样底物转化为 CD 时，能形成更高比例的γ - CD，并且其比活不低于原型转移酶的 60 %。

本发明的另一个目的在于提供制备所述 CGTase 的方法。

本发明的再一个目的在于提供生产γ - CD 的方法。

上述的第一个目的是如下实现的：使已知 CGTase 的第 155 位至 195 位（包括 195 位）区域的氨基酸序列缺失至少 1 个氨基酸以获得具有不同氨基酸序列的 CGTase；此处所指的蛋白质序列的第 1 位是信号肽起始位点，这种缺失诱变增加了该蛋白的γ - CGTase 活性。

本发明的含义中，γ - CGTase 的活性提高的含义为在使用 CGTase 催化淀粉或淀粉样

底物所得到的产物混合物中:

$$\frac{\text{所产生的}\gamma\text{ - CD 量}}{\text{所产生的}\alpha\text{ - CD 量 + 所产生的}\beta\text{ - CD 量}}$$

的商值变大。

本发明的 CGTase 的优选的氨基酸序列是在已知 CGTase 的第 155 位 - 195 位氨基酸之间的区域缺失 4 到 8 个氨基酸残基，此处所指的蛋白质序列的第 1 位是 CGTase 信号肽的起始位点，这种缺失突变增加了该蛋白的γ - CGTase 活性。

本发明的 CGTase 的特别优选的氨基酸序列是在已知 CGTase 的第 155 位 - 195 位氨基酸之间的区域缺失 6 个氨基酸残基，此处所指的蛋白质序列的第 1 位是 CGTase 信号肽的起始位点，这种缺失突变增加了该蛋白的γ - CGTase 活性。

在本申请中，其它各处提及到氨基酸位置的情况时，其第 1 位都是指 CGTase 信号肽的起始位点。

此外，有几种 CGTase 是特别优选的，其氨基酸序列与表 1 中所列的 CGTase 序列的不同之处至少在于缺失了以粗体字母所表示的氨基酸残基，其余的氨基酸序列则与表 1 中所列的同源，其 CGTase 活性与未缺失的原型 CGTase 一致。

本发明的 CGTase 的实例是经由表 1 所列的 CGTase 诱变而得，或是由其他 CGTase 通过在第 155 位到 195 位区域缺失特定的氨基酸残基而获得的。在此区域中缺失 4 到 8 个残基的氨基酸残基的 CGTase 较为优选。特别优选的是根据表 1 所列，在此区域中缺失了 6 个以粗体字母表示的氨基酸残基后所获得的 CGTase 。

本发明的 CGTase 的其它实例是在序列中缺失与表 1 所指定的氨基酸相同的残基，而其 CGTase 活性仍与未经缺失的一致。

进一步，本发明的 CGTase 实例是在转移酶序列的 155 位到 195 位区域缺失表 1 以粗体字母表示的氨基酸残基，其余的氨基酸序列与表 1 所列的微生物来源的 CGTase 氨基酸序列同源，这些经缺失突变的转移酶具有 CGTase 活性。

表 1

β - CGTase 的来源	位置	氨基酸序列
Bacillus ohbensis	160	-PNHSSPA **LETDPS** YAENGAVYNDG-(SEQ ID NO.1)
软化芽孢杆菌	165	-PNHTSPA **DRDNPG** FAENGGMYDNG-(SEQ ID NO.2)
芽孢杆菌 1-1	160	-PNHSSPA **LETNPN** YVENGAIYDNG-(SEQ ID NO.3)
环状芽孢杆菌#8	172	-PNHTSPA **METDTS** FAENGRLYDNG-(SEQ ID NO.4)

意外的是本发明的 CGTase 较用来制备它们的原型 CGTase 而言，具有更高的γ - CD 特异性，同时，突变后的酶同原型酶相比在 CGTase 总比活上仅有微小的降低。

在转化淀粉或淀粉样底物时，本发明的 CGTase 所产生的 CDs 在产物种类分布上其γ - CD 除以α - CD 与β - CD 之和的商值，大于经由各种未经诱变的原型 CGTase 所得到的产物的商值。

表 1 举例列出了几种 CGTase，说明了普遍存在于 CGTase 中的同源氨基酸序列区域，以及此区域中对产物特异性有影响作用的 6 个氨基酸残基。

表 1 中所列的每一个氨基酸序列的第一个氨基酸的数字是标识其位置，在此，各特定 CGTase 序列信号肽的第一个氨基酸被记作第 1 位。利用周知的标准方法可以在所有的 CGTase 中发现相应的序列区域。例如，这可以通过计算各种序列对比的算法规则来达到。可从商业来源获得的 Wisconsin 序列分析软件包（ Genetic Computer Group, Madison ）中的序列分析程序，即是一个适宜的计算机算法规则。

通过诱变 CGTase 上述区域的方法，本发明的酶可用已知的标准方法从任何 CGTase 中制备而来，正如本申请实施例中所述。因此，通常编码某种 CGTase 的基因按此种方法诱变，从而得到编码本发明的 CGTase 的基因。

因此，本发明也涉及制备编码本发明的 CGTase 的突变基因的方法，其中通过周知的诱变方法，使编码原型 CGTase 的 DNA 序列发生诱变，从而使得由诱变的基因所编码第 155 到第 195 位区域的氨基酸序列与由未诱变的基因编码的氨基酸序列相比，至少缺失了 1 个氨基酸残基。

优选地，在本发明方法中，编码原型 CGTase 的基因的 DNA 序列通过已知的诱变方法诱变，从而使突变基因的 DNA 序列所编码的氨基酸序列与由未突变的基因的 DNA 编码的氨基酸序列相比，缺失了第 155 到 195 位区域中的 4 至 8 个氨基酸残基。

更优选地，在本发明方法中，编码原型 CGTase 的基因的 DNA 序列通过已知的诱变方

法诱变，从而使突变基因的DNA序列所编码的氨基酸序列与由未突变的基因的DNA编码的氨基酸序列相比，缺失了第155到195位区域中的6个氨基酸残基。

进一步，本发明涉及制备γ－CGTase的方法，其中至少一种所述的DNA序列于某一种微生物中得到表达。

所有的CGTase（原型CGTase）基因均适合制备本发明的CGTase。原型CGTase可以是所有天然CGTase，也可以是经突变获得的CGTase。例如那些产物类型分布发生改变，但其突变方式又不同于本发明的CGTase.(如: DE43 24 650 A1, 对应于US-A-5, 474, 917)。优选的原型CGTase是那些产物类型分布已发生改变，但其诱变方式又不同于本发明的CGTase。（参见DE43 24 650 A1）。

编码原型CGTase的基因经已知方法分离出，而本发明所述的突变则是经“体内”或“体外”诱变方法引入。这些方法在本领域也是周知的。

“体内”诱变方法可特定地理解为在某些微生物的染色体或附加体上已存在编码CGTase的基因，它们经诱变剂、紫外线、亚硝基胍、乙基甲基磺酸酯以非特异的方式发生突变。这些方法在如下资料中有阐述，如，Miller J. H. (1972)的“分子遗传学实验”，Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y..

随后，用已知方法如Sanger等在PNAS 74 (1977) 5463-5467中所阐述的链终止序列分析法，鉴定CGTase中至少一个编码氨基酸的密码子的缺失，这类缺失是在该CGTase的第155到195位区域中引入的。

优选的突变体是按本发明在所指定区域中缺失了4至8个密码子。

特别优选的突变体是缺失了6个密码子，最优选的突变体是编码如表1中粗体表示的氨基酸残基的6个密码子的缺失，或是编码其它CGTase中与这些同源的氨基酸残基的6个密码子发生缺失。

按本发明的含义，“体外”诱变方法是指分离出的CGTase基因或其片段以已知的方法加以修饰，使得该基因编码的CGTase在第155到195位区域中至少一个编码氨基酸残基的密码子缺失。

优选的突变体是指经修饰后在所指定区域中缺失了4至8个密码子。特别优选的突变体是缺失了6个密码子。特别是，最优选的突变体是经修饰后在所指定的区域内缺失了编

码如表 1 中粗体表示的氨基酸残基的 6 个密码子，或是编码其它 CGTase 中与这些同源的氨基酸残基的 6 个密码子发生缺失。

本发明因而还涉及编码本发明γ - CGTase 的 DNA 序列。

本领域所熟知的“体外”诱变方法的实例是用“ PCR ”技术进行特异的（生物技术 BioTechniques (1992) 13 (3), pp.342-346 ）或非特异的(生物技术 BioTechniques (1989) 1 (1), pp.11-15 ）诱变方法。也可以用合成的寡核苷酸片段以定点方式将突变引入目的基因。这一方法可按所谓的“单链法”(Ausubel F.M.等 (1987) ，分子生物学现有技术， Green Publishing Associates) 进行，或按“双链法”(Promega 1992-1993 Catalogue, 150)进行，还可以按其它描述的方法，如在“遗传学年度综述” Ann. Rev. Genet. (1985) 19, pp. 423-462 所述的方法。

本发明的 CGTase 的主要应用领域是其在从淀粉中分离γ - CD 中的应用。本发明的 CGTase 可根据现有的制备方法用作此目的.

本发明进而还涉及利用 CGTase 转化淀粉制备γ - CD 的方法，其中所使用的 CGTase 至少为权利要求 1 至权利要求 4 中所述的 CGTase 的一种。

例如，在以下文献中对目前生产γ-CD 的制备方法作了描述，其中本发明的 CGTases 可以用来替代这些方法中指定的 CGTases:

——发酵和生物工程杂志（ 1990 ） 70 （ 3 ）， pp. 190-192 : 利用来自芽孢杆菌 AL-6 的生成 β - 和γ-CD 的 CGTases ，在乙醇存在时制备γ-CD ，结果提高了γ-CD 的产量。

—— CA 107:57466 描述了利用来自芽孢杆菌 313 的γ-CGTase 制备γ-CD 。

—— EP291 ， 067 : 用来自软化芽孢杆菌的 CGTase 制备γ-CD 。γ-CD 产物特异性通过加入一种配位剂，如环十六 - 8 - 内 - 1 - 酮获得。

—— DE 40 09 822 （相应于 US-A-5,409, 824 ）: 利用来自芽孢杆菌 290-3 的γ-CGTase 生产γ-CD 。

与α-CD 和β-CD 相比较，γ-CD 具有特殊的优势，使其成为一系列应用中唯一可能或最适合的 CD 。

与由 6 个葡萄糖单位组成的α-CD 相比较，由 8 个葡萄糖单位组成的γ-CD 具有更大的

疏水孔穴，使其可以与由于空间原因不能与α-CD 配合的客体分子形成配位物。

与β-CD （室温下在水中的溶解度约 18.5g/L ）相比较，γ-CD 具有更高的可溶性（室温下约 232.0g/L ），因而比β-CD 更适合于水溶液中的配合反应。与β-CD 和β-CD 衍生物相比，γ-CD 的另一个优点是其低毒性。在动物模型中，无论是口服或是静脉注射，α-CD 衍生物和β-CD 衍生物都比γ-CD 更具有毒性。

以下的实施例是对本发明的进一步说明。

实施例 1　环状芽孢杆菌 # 8 (DSM10559) CGTase 的诱变

按照熟练技术人员已知的方法，缺失 CGTase 结构基因中编码相应氨基酸残基的碱基三联密码，得到了来源于环状芽孢杆菌 # 8（参见表 1；保藏在 Braunschweig 的 DSMZ（德国微生物和细胞培养物保藏中心），入藏号为 DSM 10559 ）的β - CGTase 的 155 - 195 位氨基酸残基间的区域中的任何氨基酸残基的缺失，特别是 179 - 184 位的六个氨基酸残基 METDTS （ SEQ ID NO.5 ）的缺失。

为了便于诱变，来自环状芽孢杆菌 # 8 的β - CGTase 基因首先克隆入商业化的 E.coli 载体 pUC19 （ Boehringer Mannheim ）。为达此目的，按 Ausubel F. M.，分子生物学通用方案， 1 卷； Greene Publishing Associates & Wiley -Interscience N.Y.所描述的方法从环状芽孢杆菌 # 8 中分离染色体 DNA，用限制性内切酶 HindIII 和 XbaI (Boehringer, Mannheim.) 酶切，分离 2 至 5kb 大小的片段，与经限制性内切酶 HindIII 和 XbaI (Boehringer, Mannheim.) 酶切的 pUC19 DNA 在 T4 连接酶作用下，于 16 ℃共孵育 12 小时。连接混合物用已知方法转化 E.coli K12 感受态细胞。转化后，从在含淀粉的指示平板上形成淀粉降解圈的 E.coli 细胞中 分离出携带相应于环状芽孢杆菌 # 8 的β - CGTase 基因的重组质粒（ Maniatis, 分子克隆实验手册，冷泉港实验室(1982) N.Y. pp86-92 ）。

利用 Amersham (Braunschweig)出售的并基于 Eckstein 开发的方法（核酸研究， 1986 ，14 ， pp9679-9698 ，核酸研究， 1988 ， 16 pp791-802 ）的 2.1 版寡核苷酸指导的体外诱变系统，进行基因诱变，诱变完全按照 Amersham 诱变系统所附的方案进行。方法概括如下，详细内容可从该诱变体系的方案手册获得。

克隆在 pUC19 中的环状芽孢杆菌 # 8 的β - CGTase 基因中编码本发明所指的 CGTase 第 155 - 195 位氨基酸残基间的区域的部分片段，利用商购可得的酶如限制性内切酶和 T4 连接酶(Boehringer, Mannheim.)，克隆入商业化的 E.coli 载体 M13 (New England Biolabs)。一条 1.6kb AccI 片段就是这类片段中的一个，该片段克隆入 AccI 切割的 M13 载体。

根据 Amersham 提供的实验方案与上述的诱变系统，从接纳了重组 M13 载体的 E.coli 宿主细胞中分离出单链重组 M13 DNA（初始 DNA）。

为了精确的诱变，合成了化学精制的诱变寡核苷酸，在每种情况下都含有目的序列。这种寡核苷酸可以例如，从 MWG(Ebersherg)购得。诱变寡核苷酸序列的选择应使其碱基顺序与初始 DNA 核苷酸序列的某一部分反向互补，该部分初始 DNA 位于准备缺失的环状芽孢杆菌 # 8 的 β - CGTase 基因的三联密码的上游 15 个碱基和下游 15 个碱基。

表 2 描述了所用的诱变寡核苷酸。

表 2

5' - CAC ACC TCT CCA GCG TTT GCC GAA AAT GGC - 3' (SEQ ID NO.6)

表 2 所描述的诱变寡核苷酸的使用结果产生了一个编码缺失六个氨基酸残基 METDTS（序列号 ID NO.5）的氨基酸片段的β - CGTase 基因片段。

利用 T4 多核苷酸激酶和 ATP(Amersham)对诱变寡核苷酸 5' 端磷酸化。磷酸化的诱变寡核苷酸与初始 DNA 同源区相结合。为此，5μg 的单链初始 DNA 与大约 4pmol 的磷酸化诱变寡核苷酸在 70 ℃共同孵育 3 分钟，再于 37 ℃孵育 30 分钟。这样以结合在初始 DNA 的诱变寡核苷酸作为合成起始点，以初始 DNA 作为合成突变 DNA 的模板，合成了除了缺失的核苷酸外与初始 DNA 互补的 DNA 链。合成本身是在加入了 DNA 聚合酶 Klenow 片段(Amersham)、T4DNA 连接酶和核苷酸混合物，在 16 ℃作用 15 小时进行的。其中的核苷酸混合物含有 dATP, dGTP, dTTP 和代替 dCTP 的硫代核苷酸 dCTPS(Amersham)。

残留的单链初始 DNA 分子从合成混合物中除去。为此，混合物用 NaCl 处理，并用一特异结合单链 DNA 的硝酸纤维素滤膜（Amersham）过滤。保留在滤过液中的双链杂合 DNA 通过乙醇沉降浓缩去盐。杂合 DNA 与 NciI(Amersham)（一种识别核苷酸序列 CC(G/C)GG 但仅作用于天然 DNA 链而不切割含有核苷酸类似物 dCTPS 的 DNA 链的限制性内切酶）在合适的孵育缓冲液（Amersham）中于 37 ℃作用 90 分钟。该处理只导致非诱变链（初始 DNA）的断裂。

初始 DNA 随后用从自由末端降解 DNA 链的核酸外切酶 III 在 37 ℃处理 30 分钟除去。核酸外切酶热失活后（70 ℃，15 分钟）剩下的单链诱变 DNA 链与 DNA 聚合酶 I（Amersham）、T4DNA 连接酶和核苷酸 dATP, dCTP, dTTP 及 dGTP 在 16 ℃共同孵育 3

小时。这使诱变的单链 DNA 变成双链 DNA 。进一步用乙醇沉降纯化后，诱变的 DNA 转化入 E.coli. K12 感受态细胞中。

通过转化所得 5 个克隆的重组 DNA 的相关区域的序列分析，检测诱变过程的成功。将最初为了诱变克隆入 M13 的 DNA 片段用限制性内切酶 XhoI 和 NdeI 从确证具有突变的载体中切下。

随后，相应的未诱变的 XhoI/NdeI 的片段从表达环状芽孢杆菌 # 8 β - CGTase 的 pUC19 质粒中去除，用 T4DNA 连接酶替换上诱变的片段。

实施例 2　芽孢杆菌 1-1 β-CGTase 的诱变

用表 3 所述的寡核苷酸，以类似与实施例 1 所描述的方法，使编码相应于 CGTase 167 - 172 位的氨基酸残基 LETNPN （序列号 ID. No.7 ）（参见表 1 ）的芽孢杆菌 Bacillus sp. 1-1 β-CGTase 基因中的六个密码子缺失(见实施例 8, 比较 2 , A))。相同的缺失还被用于导入 DE43 24 650 A1 所描述的该 CGTase 衍生物中，与野生型酶相比较，通过一个氨基酸替换(Tyr--->Trp) (见实施例 8, 比较 2 , B)) 增强了其γ - CD 的特异性。

表 3 :

5' - CAT TCA TCA CCG GCA TAT GTT GAA AAT GGG - 3' (SEQ ID NO.8)

实施例 3　在 E.coli 中生产环状芽孢杆菌 # 8 β-CGTase 及其根据本发明的衍生物

将实施例 1 所述的基于 pUC19 的表达质粒转化入分泌型 E.coli 菌株以生产环状芽孢杆菌 #8 β-CGTase, 及其根据实施例 1 所述制备的衍生物。E.coli WCM105 用作分泌型E.coli. 菌株，该菌株是用 EP338410 所述的 E.coli DS410 制备的。

因此，为了生产环状芽孢杆菌 #8 β-CGTase 或其衍生物，将携带适当的 CGTase 表达质粒的 E.coli WCM105 细胞在含 10g/l 乳糖和 0.1g/l 氨苄青霉素的 LB 培养基 (Maniatis, 分子克隆实验手册，冷泉港实验室(1982) N.Y.)中于 30 ℃水浴摇荡 72 小时 (250/rpm 转速)。细胞随后经 5000 × g 离心分离除去。无细胞的培养液上清含β - CGTase 或其衍生物。

实施例 4　在 E.coli.中生产芽孢杆菌 1-1 β-CGTase 及其根据本发明的衍生物

用实施例 2 所述的表达质粒，以类似实施例 3 的方法实现生产目的。

实施例 5　利用载体结合的β－环糊精吸附纯化 CGTase

以特异性的和温和的方式，利用 Sepharose 偶联的β－CD 分子亲和纯化 CGTase。

用 3 × 10ml H_2O 和 1 × 5ml 0.1N NaOH 先洗涤 1g 环氧基活化的 Sepharose 6B(Sigma)，Sepharose 6B 随后悬浮于 2ml 溶于 0.1N NaOH 的 2.8%(W/V)的β－CD 溶液，在 45 ℃孵育 20 小时，同时温和摇荡。含有β－CD 和 Sephadex 6B 的偶联产物用 2 × 5mlH_2O 洗涤，洗涤后的物质悬浮于 2.5%(W/V)葡萄糖水溶液中，悬浮液于室温孵育 1 小时以饱和残余的自由偶联位点。偶联产物依次用 2 × 5ml H_2O, 2 × 5ml 0.1M 硼酸盐缓冲液(pH8.0), 2 × 5ml 0.1M 乙酸盐缓冲液(pH4.0)和 2 × 2ml 20mM 三乙醇胺/Cl pH7.2 洗涤。偶联产物用 0.2ml 20mM 三乙醇胺/Cl pH7.2 (终体积约 2－2.5ml)处理，于 4 ℃保存备用。

为了使 CGTase 特异性结合到 Sepharose 6B 偶联的β－CD（CD－Sepharose）上，将实施例 3 或 4 获得的无细胞的含有 CGTase 的培养液上清用 0.2ml CD-Sepharose 处理，在 4 ℃孵育 1.5 小时，同时温和摇荡，在这期间，酶与 CD-Sepharose 相结合。酶/CD-Sepharose 复合物通过离心分离（4000 × g，5 分钟），并用 2 × 10ml 20mM 三乙醇胺/Cl pH7.2 洗涤。CGTase 酶随后通过将复合物与 2ml 1 %β-CD 的溶液在 4 ℃共孵育 1.5 小时加以洗脱。最后一次离心（5min 4000 × g）之后，上清中含有纯化的 CGTase。

在以这种方法纯化的 CGTase 进行定性前，溶液中所含的β－CD 和用于洗脱的β－CD 还有待除去。为此，用 35ml 20mM Tris/HCl pH7.2 和 5mM $CaCl_2$ (TC 缓冲液)平衡商购的 PD-10 柱（Sephadex G-25 M; Pharmacia）。含β-CD 的溶液用 TC 缓冲液配制成 2.5ml 并上柱。随后用 3.5mlTC 缓冲液洗脱柱。这一方法获得的洗脱液含纯化的无β－CD 的 CGTase。

实施例 6　淀粉到环糊精的转化

利用 Eur. J. Biochem. (1990) 191, pp. 177-185 所描述的方法测定 CGTase 活性。

不同含量的待测 CGTase 溶液与在由 20mM Tris/HCl pH7.2 和 5mM $CaCl_2$ 组成的缓冲液中的 5 %可溶淀粉（Merch, Darmstadt）溶液，于 45 ℃共同孵育一定时间。然后，加入 1.5 倍体积的甲醇终止反应。未反应的残留淀粉在 4 ℃孵育 1 小时沉降，再离心分离除去(10 分钟，12000g)。所得产物以已确定的环糊精(Sigma, Mnich)作为标准，用 Nucleosil 10-NH_2 柱(Macherey & Nagel, Duren)经 HPLC 测定。1 个单位（1U）的定义为在所述条件下每分钟由淀粉合成 1μM 环糊精所需的酶量。

实施例 7　纯化的 CGTase 的 CGTase 总比活的测定

纯化的 CGTase 的 CGTase 总比活定义为单位数量蛋白质的体积活性（ U/mg ）。

一种酶样品的 CGTase 体积活性（ U/mg ）按实施例 6 所述的方法确定。

纯化的 CGTase 溶液的蛋白含量（ mg/ml ）用 M. Bradford（“分析生化”(1976) 72, pp. 248 ff)所述的方法确定。为此目的所需的化学试剂来自 Bio-Rad 。

下面为环状芽孢杆菌 #8 、芽孢杆菌 1-1 和来源于它们的缺失突变（如实施例 1 和实施例 2 中所述）的 CGTase 总比活(比活)的测定结果:

酶	相对活性(%)	比活(U/mg)
来自环状芽孢杆菌#8 的野生型 CGTase	100	106
其缺失突变体	77	82
来自芽孢杆菌 1-1 的野生型 CGTase	100	120
其缺失突变体	65	78
芽孢杆菌 1-1 的 CGTase 的突变衍生物（ TyrTrp ）	100	23
其缺失突变体	73	17

实施例 8　利用来源于环状芽孢杆菌#8 、芽孢杆菌 1-1 和实施例 3 和 4 所述制备的衍生物的非突变β － CGTase 转化淀粉

为了比较非突变 CGTase 和实施例 3 、 4 所述通过缺失诱变而得到的衍生物的产物范围，采用相同的酶活性转化淀粉（实施例 6 ）。在一定时间里，按所述的方法检测产物组成。下面为所得的结果:

比较 1 : 环状芽孢杆菌 # 8

时间（分钟）	野生型 CGTase				其突变体			
	α-CD (%)	β-CD (%)	γ-CD (%)	γ/(α+β)	α-CD (%)	β-CD (%)	γ-CD (%)	γ/(α+β)
5	13	70	17	0.2	9	58.0	33	0.49
10	13.5	70.3	16.2	0.19	8.2	60.5	31.3	0.46
15	11.7	66.3	22.0	0.28	9.4	62.0	28.6	0.40

比较 2：芽孢杆菌 1－1

A）

时间（分钟）	野生型 CGTase				其突变体			
	α-CD (%)	β-CD (%)	γ-CD (%)	γ/(α+β)	α-CD (%)	β-CD (%)	γ-CD (%)	γ/(α+β)
5	0	100	0	0	0	68	32	0.47
10	0	88	12	0.14	0	68	32	0.47
15	0	88	12	0.14	0	67.7	32.3	0.48

B）

时间（分钟）	野生型 CGTase				其突变体			
	α-CD (%)	β-CD (%)	γ-CD (%)	γ/(α+β)	α-CD (%)	β-CD (%)	γ-CD (%)	γ/(α+β)
5	0	27	73	2.7	0	0	100	-
10	0	31	69	2.23	0	22	78	3.54
15	0	32.5	67.5	2.08	0	16.6	83.4	5.02

序列表

(1) 一般信息:

(i)申请人:

(A) 姓名: 电化学工业有限公司（国际）

(B) 街道: Zielstattstrasse 20

(C) 城市: 慕尼黑

(D) 联邦州: 巴伐利亚州

(E) 国家: Germany 德国

(F) 邮政编码: 81379

(G) 电话: 049-89-74844-0

(H) 电传: 049-89-74884-350

(ii) 发明名称: 用于生产γ-环糊精的环糊精糖基转移酶

(iii) 序列数目: 8

(iv) 计算机阅读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机类型: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIN Relase #1.0 # 1.30 版 (EPO)

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

（A） 长度: 24 个氨基酸

（B） 类型: 氨基酸

（C） 链性:

（D） 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(v) 片段类型: 内部片段

(vi) 最初来源:

（A）有机体: Bacillus ohbensis

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1

Pro Asn His Ser Ser Pro Ala Leu Glu Thr Asp Pro Ser Tyr Ala Glu
1 5 10 15

Asn Gly Ala Val Tyr Asn Asp Gly
20

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

（A） 长度: 24 个氨基酸

（B） 类型: 氨基酸

（C） 链性:

（D） 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(v) 片段类型: 内部片段

(vi) 最初来源:

（A）有机体: 软化芽孢杆菌

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Asp Arg Asp Asn Pro Gly Phe Ala Glu
1 5 10 15

Asn Gly Gly Met Tyr Asp Asn Gly
20

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

(i)序列特征:

（A） 长度: 24 个氨基酸

（B） 类型: 氨基酸

（C） 链性:

（D） 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(v) 片段类型: 内部片段

(vi) 最初来源:

（A）有机体: 芽孢杆菌 1-1

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

```
Pro Asn His Ser Ser Pro Ala Leu Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Val Glu
1               5                  10                  15

      Asn Gly Ala Ile Tyr Asp Asn Gly
                  20
```

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

(i)序列特征:

（A） 长度: 24 个氨基酸

（B） 类型: 氨基酸

（C） 链性:

（D） 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(v) 片段类型: 内部片段

(vi) 最初来源:

（A）有机体: 环状芽孢杆菌 #8

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

```
Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Met Glu Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu
1               5                  10                  15

      Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn Gly
                  20
```

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i)序列特征:

（A） 长度: 6 个氨基酸

（B） 类型: 氨基酸

（C） 链性: 单链

（D） 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: 内部片段

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5

Met Glu Thr Asp Thr Ser
1 5

(2) SEQ ID NO:6 的信息:

(i)序列特征:

（A） 长度: 30 个碱基对

（B） 类型: 核苷酸

（C） 链性: 单链

（D） 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

（A） 描述: /desc = “合成”

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 否

(viii) 基因组中位置:

（C）单位: bp

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6

CACACCTCTC CAGCGTTTGC CGAAAATGGC
30

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

(i)序列特征:

（A） 长度: 6 个氨基酸

（B） 类型: 氨基酸

（C） 链性: 单链

（D） 拓扑: 线性

(ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 否

(v)片段类型: 内部片段

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7

Leu Glu Thr Asn Pro Asn
1 5

(2) SEQ ID NO:8 的信息:

(i)序列特征:

（A） 长度: 30 个碱基对

（B） 类型: 核苷酸

（C） 链性: 单链

（D） 拓扑: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

（A） 描述: /desc = “合成”

(iii)假设: 无

(iv)反义: 否

(viii)基因组中位置:

（C）单位: bp

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8

```
CATTCATCAC CGGCATATGT TGAAAATGGG
  30
```