

# 公告本

申請日期	84.01.18
案 號	84100420
類 別	Int. Cl <sup>6</sup>

448230

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	枯草桿菌蛋白酶之變異體
	英 文	"SUBTILISIN VARIANTS"
二、發明 人	姓 名	1. 湯瑪斯·普·克拉卡 2. 理查·爾·伯特 3. 洛瑞·傑·威爾森
	國 籍	均美國
	住、居所	1. 美國加州太平洋城麻扎尼塔區1166號 2. 美國加州伯林米市山邊路3032號 3. 美國加州米伯市伯尼托路33號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商吉安克國際公司
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國紐約州羅徹斯特市南溫頓路1870號 劍橋廣場4區
	代 表 人 姓 名	韋恩·曲·皮奇爾

裝

訂

線

448230

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6  
B6

本案已向：  
 美國(地區) 申請專利，申請日期：1973.10.17 案號：08/130,240 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(1)

相關申請案交叉參考文獻

本發明為1993年10月14日所申請美國專利申請序號08/137,240號(尚未核准)之部份接續申請案,該申請案全文為本案之參考文獻。

發明範疇

本發明係有關新穎之羧基水解酶變異體,其胺基酸序列中多數對應於前驅體羧基水解酶之胺基酸殘基業經不同之胺基酸所取代,特別是對應或相當於解澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)枯草桿菌蛋白酶+76殘基與一或多個選自+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及/或+274之殘基。大體而言,該突變體/變異體羧基水解酶之製備係於活體外修飾可編碼天然或重組羧基水解酶之前驅體DNA序列,使其於前驅體胺基酸序列中編碼多數胺基酸殘基之單獨取代或連同前驅體胺基酸序列中其他取代、插入或摘除。

發明背景

絲胺酸蛋白酶為一羧基水解酶亞群。其包括多種之酵素,具廣範圍之特性及生物功能。請參考Stroud, R. *Sci. Amer.*, 131:74-88。儘管功能之差異性,絲胺酸蛋白酶之催化機制至少可分為兩族遺傳學相異之酵素:枯草桿菌蛋白酶及哺乳類胰凝乳蛋白酶相關及類似之細菌性絲胺酸蛋白酶(例如胰蛋白酶及*S. gresius*胰蛋白酶)。該二族絲

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( 2 )

胺酸蛋白酶之催化機制極相似。請參閱 Kraut, J.

(1977), Ann. Rev. Biochem., 46:331-358。此外，雖然其一級結構不相近，該二酵素族之三級結構之保留催化三元組 ( triad ) 相近，係由絲胺酸、組胺酸及天冬胺酸構成。

枯草桿菌蛋白酶為一種絲胺酸內蛋白酶 ( 分子量 27,500 )，其為多種芽孢桿菌 ( Bacillus ) 菌種及他種微生物所大量分泌。至少已從四種不同之芽孢桿菌菌種測定枯草桿菌蛋白酶之蛋白質序列。請參閱 Markland, F.S., et al. (1983), Honne-Sevler's Z. Physiol. Chem., 364:1537-1540。解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶解析至 2.5 Å 之三度空間結晶結構業經報告。請參閱 Wright, C. S., et al. (1969), Nature, 221:235-242; Drenth, J., et al. (1972), Eur. J. Biochem., 26:177-181。該等研究指出，雖然枯草桿菌蛋白酶與哺乳動物絲胺酸蛋白酶係遺傳學不相關者，但其活化位置之結構相似。含有共價鍵結之胛肽抑制劑 ( Robertus, J. D., et al. (1972), Biochemistry, 11:2439-2449) 或產物複合物 ( Robertus, J.D., et al. (1976, J. Biol. Chem., 251:1097-1103 ) 之枯草桿菌蛋白酶之 X-光結晶結構亦提供有關枯草桿菌蛋白酶活性位置及推測之基質結合之訊息。此外，亦有大量報導枯草桿菌蛋白酶動力學及化學修飾之研究 ( Philipp, M., et al. (1983), Mol. Cell. Biochem., 51:5-32; Svendsen, B.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(3)

(1976), Carlsberg Res. Comm., 41:237-291; Markland, F. S. Id. ), 且至少有一報導中枯草桿菌蛋白酶222位甲硫胺酸之支鏈被經由過氧化氫轉化成甲硫胺酸-亞磺(Stauffer, D.C., et al. (1965), J. Biol. Chem., 244:5333-5338), 而於221位之絲胺酸支鏈被經由化學修飾轉化為半胱胺酸(Polgar, et al. (1981), Biochimica et Biophysica Acta, 667:351-354)。

美國專利4,760,025(RE 34,606)揭示對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶位置酪胺酸-1, 天冬胺酸+32, 天冬醯胺+155, 酪胺酸+104, 甲硫胺酸+222, 甘胺酸+166, 組胺酸+64, 甘胺酸+169, 苯丙胺酸+189, 絲胺酸+33, 絲胺酸+221, 酪胺酸+217, 麩胺酸+156及丙胺酸+152之枯草桿菌蛋白酶胺基酸殘基修飾。美國專利第5,182,204號揭示於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶胺基酸+224殘基及於他種枯草桿菌蛋白酶對應位置之修飾, 其可經由取代、插入或摘除而修飾, 且可與美國專利第4,760,025(RE 34,606)號專利揭示之殘基之修飾結合, 以形成有用之枯草桿菌蛋白酶突變體或變異體。美國專利第5,155,033號揭示含有相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶+225位置經修飾之類似突變體枯草桿菌蛋白酶。美國專利第5,185,258及5,204,015號揭示於+123及/或+274位置經修飾之突變體枯草桿菌蛋白酶。此等專利之揭示併為本文之參考, 美國專利申請序號SN 07/898,382號亦同, 其揭示枯草桿菌蛋白酶中許多胺基酸殘基之修飾, 包括特別是

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(4)

+99, +101, +103, +107, +126, +128, +135, +197及  
+204。該等專利 / 申請案均為共同所有。美國專利第  
4,914,031 號揭示特定之枯草桿菌蛋白酶類似物，包括於  
+76 位置經修飾之枯草桿菌蛋白酶。該專利之揭示亦為本  
文之參考。然而，該等參考文獻中均未揭示本案所請之特  
定殘基及 / 或特定組合。

因此，本發明之目的係提供一種巰基水解酶（較佳為枯  
草桿菌蛋白酶）變異體，編碼其前驅體巰基水解酶之 DNA  
中，對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 +76 殘基與一  
或多個選自 +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27,  
+105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195,  
+197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222,  
+260, +265 及 / 或 +274 殘基之胺基酸殘基含有多數取代作  
用。一般而言，該變異體至少具有一種與衍生其胺基酸序  
列之巰基水解酶前驅體之對應性質不同之性質。

本發明之另一目的為提供一種可編碼該等巰基水解酶變  
異體之 DNA 序列，及含該變異體 DNA 序列之表現載體。

本發明之進一步目的為提供一種經該載體轉形之宿主細  
胞，及可表現該 DNA 以於細胞內或細胞外產生巰基水解酶  
變異體之宿主細胞。

前文所載參考文獻僅因其係於本案申請前揭示而於前文  
說明，發明人並不承認其經由先前之發明或基於較早申請  
案之優先權而無法預知其揭示之內容。

發明概述

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( 5 )

本發明包括非天然生成之巰基水解酶變異體，與衍生該變異體胺基酸序列之前驅體巰基水解酶相較，其具不同之蛋白質水解活性、安定性、基質特異性、pH性質及/或性能特徵。該前驅體巰基水解酶可為天然生成之巰基水解酶或重組水解酶。特言之，該巰基水解酶變異體之胺基酸序列在自然界不存在，係以不同之胺基酸取代前驅體巰基水解酶之多數胺基酸殘基所衍生得者。該前驅體酵素之多數胺基酸殘基相當於天然生成之解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之位置+76殘基與一或多個選自+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及/或+274之殘基，或他種巰基水解酶或枯草桿菌蛋白酶[如遲緩芽孢桿菌(*Bacillus lentus*)枯草桿菌蛋白酶]之對應胺基酸殘基。本發明之巰基水解酶變異體含有+76胺基酸殘基之取代及一或多個額外之修飾。較佳者，本發明變異體酵素含有下示組合之胺基酸殘基取代、摘除或插入：76/99；

76/101；76/103；76/104；76/107；76/123；

76/99/101；76/99/103；76/99/104；76/101/103；

76/101/104；76/103/104；76/104/107；76/104/123；

76/107/123；76/99/101/103；76/99/101/104；

76/99/103/104；76/101/103/104；76/103/104/123；

76/104/107/123；76/99/101/103/104；

76/99/103/104/123；76/99/101/103/104/123；

## 五、發明說明(6)

76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265;  
 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135;  
 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210;  
 76/103/104; 126/265及 / 或 76/103/104/222。本發明最佳  
 變異體酵素為含有下示組合之胺基酸殘基取代、摘除或插  
 入之解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶：76/99; 76/104;  
 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107;  
 76/101/103/104; 76/99/101/103/104及 76/101/104。

本發明亦包括可編碼該等巰基水解酶或枯草桿菌蛋白酶  
 變異體之變異體DNA序列。該等變異體DNA序列係衍生自  
 可編碼天然生成或重組前驅體酵素之前驅體DNA序列。該  
 變異體DNA序列係經由修飾前驅體DNA序列所衍生，使對  
 應於解澱粉芽孢桿菌位置76, 99, 101, 103, 104, 107,  
 123, 27, 105, 109, 126, 128, 135, 156, 166, 195,  
 197, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265及  
 / 或 274或其組合位置之前驅體DNA序列編碼一或多種特  
 定之胺基酸殘基取代作用。雖然本文所揭示之胺基酸殘基  
 修飾係對應於解澱粉芽孢桿菌(其已成為鑑定所有枯草桿  
 菌蛋白酶殘基位置之習用方法)，可用於本發明之較佳前  
 驅體DNA序列為如圖6(Seq ID No.11)所示之遲緩芽孢  
 桿菌DNA序列。

本發明變異體DNA序列可於胺基酸殘基76編碼插入或取  
 代，與一或多個額外之修飾。較佳者，該變異體DNA序列  
 可編碼下示組合之胺基酸殘基取代或插入：76/99;

## 五、發明說明( 7 )

76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123;  
 76/99/101; 76/99/013; 76/99/104; 76/101/103;  
 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123;  
 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104;  
 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123;  
 76/104/107/123; 76/99/101/103/104;  
 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123;  
 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265;  
 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135;  
 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210;  
 76/103/104/126/265及 / 或 76/103/104/222。最佳者，該  
 變異體 DNA 序列可編碼下示組合之殘基修飾：76/99;  
 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107;  
 76/101/103/104; 76/99/101/103/104及 76/101/104。該  
 等重組 DNA 序列可編碼具有新穎胺基酸序列之巰基水解酶  
 ，大體而言，其至少一種性質與由前驅體巰基水解酶 DNA  
 序列所編碼之酵素之對應性質實質上不相同。該等性質包  
 括蛋白質水解活性、基質特異性、安定性、改變之 pH 特性  
 及 / 或增強之性能特徵。

本發明包括於特定胺基酸殘基位置經 19 個天然 L-胺基酸  
 中任一者之取代作用。該取代作用可發生於任何前驅體枯  
 草桿菌蛋白酶（原核細胞、真核細胞或哺乳動物）。較佳  
 者，於特定胺基酸殘基位置進行之取代包括（但不限於  
 ）：76 位置之取代包括 D, H, E, G, F, K, P 及 N；99 位

## 五、發明說明(8)

置之取代包括 D, T, N, Q, G 及 S ; 101 位置之取代包括 G, D, K, L, A, E, S 及 R ; 103 位置之取代包括 Q, T, D, E, Y, K, G, R, S 及 A ; 104 位置之取代包括所有 19 個天然之胺基酸 ; 107 位置之取代包括 V, L, M, Y, G, E, F, T, S, A, N 及 I ; 123 位置之取代包括 N, T, I, G, A, C 及 S ; 27 位置之取代包括 K, N, C, V 及 T ; 105 位置之取代包括 A, D, G, R 及 N ; 107 位置之取代包括 A, L, V, Y, G, F, T, S 及 A ; 109 位置之取代包括 S, K, R, A, N 及 D ; 126 位置之取代包括 A, F, I, V 及 G ; 128 位置之取代包括 G, L 及 A ; 135 位置之取代包括 A, F, I, S 及 V ; 156 位置之取代包括 D, E, A, G, Q 及 K ; 166 位置之取代包括所有 19 個天然之胺基酸 ; 195 位置之取代包括 E ; 197 位置之取代包括 E ; 204 位置之取代包括 A, G, C, S 及 D ; 206 位置之取代包括 L, Y, N, D 及 E ; 210 位置之取代包括 L, I, S, C 及 F ; 216 位置之取代包括 V, E, T 及 K ; 217 位置之取代包括所有 19 個天然之胺基酸 ; 218 位置之取代包括 S, A, G, T 及 V ; 222 位置之取代作用包括所有 19 個天然之胺基酸 ; 260 位置之取代包括 P, N, G, A, S, C, K 及 D ; 265 位置之取代包括 N, G, A, S, C, K, Y 及 H ; 而 274 位置之取代包括 A 及 S 。 每一特定位置特佳之取代胺基酸示於下文表 I 中。雖然表 I 顯示特定之胺基酸，但應理解者，特定位置可由任何胺基酸所取代。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(9)

表 I

<u>胺基酸殘基</u>	<u>較佳之取代/插入胺基酸</u>
+76	D, H
+99	D, T, N, G
+101	R, G, D, K, L, A, E,
+103	A, Q, T, D, E, Y, K, G, R
+104	I, Y, S, L, A, T, G, F, M, W, D, V, N
+107	V, L, Y, G, F, T, S, A, N
+123	S, T, I
+27	K
+105	A, D
+109	S, K, R
+126	A, I, V, F
+128	G, L,
+135	I, A, S
+156	E, D, Q
+166	D, G, E, K, N, A, F, I, V, L
+195	E
+197	E
+204	A, G, C
+206	L
+210	I, S, C
+216	V
+217	H, I, Y, C, A, G, F, S, N, E, K

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

+218	S
+222	A, Q, S, C, I, K
+260	P, A, S, N, G
+265	N, A, G, S
+274	A, S

此外，本發明包括含有該等變異體巔基水解酶 DNA 序列之表現載體，及經該載體轉形可製備該變異體之宿主細胞。本發明亦有關於含本發明巔基水解酶變異體之清潔劑組合物。

圖式概述

- 圖 1 A - C 顯示解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之 DNA 及胺基酸序列，及該基因之部份切割圖譜 (Seq. ID No. 6)。
- 圖 2 顯示解澱粉芽孢桿菌 (BPN') 及遲緩芽孢桿菌 (野生型) 之枯草桿菌蛋白酶間之保留胺基酸殘基。
- 圖 3A 及 B 顯示四種枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列。最上方一行為解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 (有時亦稱為枯草桿菌蛋白酶 BPN') 之胺基酸序列 (Seq. ID No. 7)。第二行為枯草桿菌之枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列 (Seq. ID No. 8)。第三行為地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*) 之枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列 (Seq. ID No. 9)。第四行為遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶 (PCT W089/06276 號中亦稱為枯草桿菌蛋白酶 309) 之胺基酸序列 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( )

Seq. ID No. 10)。\* 符號表示與枯草桿菌蛋白酶 BPN' 相較缺少特定之胺基酸殘基。

圖 4 顯示質體 GGA274 之構築圖。

圖 5 顯示 GGT274 之構築，其為本案所用特定表現質體之中間體。

圖 6A 及 B 顯示遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之 DNA 及胺基酸序列 (Seq. ID No. 11)。該成熟之枯草桿菌蛋白酶蛋白質係由以對應於 Ala 之 GCG 密碼子 (334-336) 為首之密碼子所編碼。

圖 7A 及 B 顯示本發明較佳具體實施例 (N76D/S103A/V104I) 之 DNA 及胺基酸序列 (Seq. ID No. 12)。該圖中之 DNA 序列業經已知方法修飾，而可於 76 位置編碼天冬胺酸、103 位置編碼丙胺酸及 104 位置編碼異白胺酸。該成熟之枯草桿菌蛋白酶變異體蛋白質係由以對應於 Ala 之 GCG 密碼子 (334-336) 為首之密碼子所編碼。

圖 8 顯示載體 pBCDAICAT 之構築圖譜。

圖 9 顯示載體 pUCCATFNA 之構築圖譜。

圖 10 顯示較佳之變異體酵素與野生型酵素於液態清潔劑組合物中之安定性。

發明詳細說明

業經發現，遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 +76 位置之胺基酸殘基經活體外突變可產生具有較前驅體枯草桿菌蛋白酶改變之安定性 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

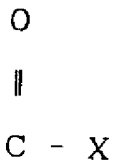
訂

## 五、發明說明 ( 12 )

如經修飾之自體蛋白質水解安定性 ) (請參閱表 IV 及 VI )

業經發現，相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶  
+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105,  
+109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197,  
+204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260,  
+265及 / 或 +274殘基之單獨或相互組合及與 +76 之任何組  
何之活體外突變可產生具有改變之蛋白質水解活性、經改  
變之熱安定性、經改變之 pH 性質、經改變之基質特異性及  
/ 或經改變之性能特徵之枯草桿菌蛋白酶變異體。

羰基水解酶為可水解含有



鍵之化合物之酵素，其中 X 為氧或氮。其包含天然生成之  
羰基水解酶及重組之羰基水解酶。天然生成之羰基水解酶  
主要包括水解酶，例如胜肽水解酶，諸如枯草桿菌蛋白酶  
或金屬蛋白酶。胜肽水解酶包括  $\alpha$ -胺基醯基胜肽水解酶  
， 胺基胺基酸水解酶，醯基胺基水解酶，絲胺酸羧基胜肽  
酶，金屬羧基胜肽酶，硫羰基蛋白酶，羧基蛋白酶及金屬  
蛋白酶。絲胺酸、金屬、硫羰基及酸性蛋白酶及內及外 -  
蛋白酶均包括。

" 重組羰基水解酶 " 係指編碼天然生成羰基水解酶之  
DNA 序列經修飾而產生可編碼羰基水解酶胺基酸序列一或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 13 )

多個胺基酸取代、插入或摘除之突變體 DNA 序列之胺基水解酶。適用之修飾法如本文所述，或如美國專利第 4,760,025 (RE 34,606)，美國專利第 5,204,015 及美國專利第 5,185,258 號揭示者，該等專利為本文之參考。

枯草桿菌蛋白酶為細菌性或真菌性胺基水解酶，其大體上可作用而裂解蛋白質或胜肽之肽鏈。本文所稱“枯草桿菌蛋白酶”係指天然生成之枯草桿菌蛋白酶或重組之枯草桿菌蛋白酶。已知多種微生物可產生及經常分泌一系列之天然生成枯草桿菌蛋白酶。該系列中蛋白酶之胺基酸序列不完全相似。然而，該系列之枯草桿菌蛋白酶具有相同或相似之蛋白質水解活性。該類絲胺酸蛋白酶均具有由相同胺基酸序列構成之催化三元組，使其與胰凝乳蛋白酶相關之絲胺酸蛋白酶明顯區別。枯草桿菌蛋白酶及與胰凝乳蛋白酶相關之絲胺酸蛋白酶均含有由天冬胺酸、組胺酸及絲胺酸構成之催化三元組。在與枯草桿菌蛋白酶相關之蛋白酶中，該等胺基酸由胺基端至羧基端之相對排列順序為天冬胺酸 - 組胺酸 - 絲胺酸。而在與胰凝乳蛋白酶相關之蛋白酶中，該相對順序則為組胺酸 - 天冬胺酸 - 絲胺酸。因此，本文所稱枯草桿菌蛋白酶係指具有與枯草桿菌蛋白酶相關之蛋白酶之催化三元組之絲胺酸蛋白酶。實例包括但不限於圖 3 所示之枯草桿菌蛋白酶。

“重組枯草桿菌蛋白酶”係指編碼枯草桿菌蛋白酶之 DNA 序列經修飾而產生可編碼對應於天然生成枯草桿菌蛋白酶胺基酸序列一或多個胺基酸取代、摘除或插入之變異

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

## 五、發明說明 ( 14 )

體 ( 或突變體 ) DNA 序列之枯草桿菌蛋白酶。產生該修飾之適用方法，且可與本發明揭示方法併用之方法包括美國專利第 4,760,025 ( RE 34,606 )，美國專利第 5,204,015 及美國專利第 5,185,258 號所揭示者。

" 非人類巰基水解酶 " 及其編碼 DNA 可得自多種原核及真核有機體。原核有機體之適當實例包括格蘭氏陰性菌，如大腸桿菌或假性單胞菌，及格蘭氏陽性菌，如微球菌或芽孢桿菌。可取得巰基水解酶及其基因之真核有機體之實例包括酵母菌，如釀酒酵母 ( *Saccharomyces cerevisiae* )，真菌，如麴菌，及非人類哺乳動物，如牛，其可產生編碼巰基水解酶凝乳酶之基因。如枯草桿菌蛋白酶一樣地，可由各種相關之種類取得一系列之巰基水解酶，該系列中各蛋白酶之胺基酸序列不完全相似，但具有相同或相似之生物活性。因此，本文所稱非人類巰基水解酶具有一功能性定義，係表示與原核及真核來源直接或間接相關之巰基水解酶。

" 巰基水解酶變異體 " 之胺基酸序列係衍生自 " 前驅體巰基水解酶 " 之胺基酸序列。該前驅體巰基水解酶 ( 如枯草桿菌蛋白酶 ) 包括天然生成之巰基水解酶 ( 枯草桿菌蛋白酶 ) 及重組之巰基水解酶 ( 枯草桿菌蛋白酶 )。該巰基水解酶變異體之胺基酸序列係經由取代、摘除或插入前驅體胺基酸序列一或多個胺基酸而 " 衍生 " 自前驅體巰基水解酶胺基酸序列。其係修飾可編碼前驅體巰基水解酶 ( 枯草桿菌蛋白酶 ) 之 " 前驅體 DNA 序列 " 而非改變該前驅體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

## 五、發明說明 ( 15 )

胺基水解酶 ( 枯草桿菌蛋白酶 ) 酵素本身。適用於改變前驅體 DNA 序列之方法包括本文所述方法，及此技藝已知之方法 ( 請參考例如歐洲專利第 0328299 號、W089/06279 號及本文已提及之美國專利及申請案 )。

本發明突變之特定殘基對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之位置 +76 及一或多個下示位置之組合：+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 及 / 或 +274。較佳者，該修飾殘基係選自下示之組合：76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123; 76/99/101; 76/99/013; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265 及 / 或 76/103/104/222; 最佳者為：76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 及 76/101/104。該等胺基酸位置數目係指圖 1 所示之成熟解澱粉芽孢桿菌枯

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 五、發明說明 ( 16 )

草桿菌蛋白酶之位置。然而，本發明不限於該特定枯草桿菌蛋白酶之修飾，而係包括含有相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之特定殘基位置之胺基酸殘基之前驅體羧基水解酶。本發明較佳之具體實施例中，前驅體枯草桿菌蛋白酶為遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶，且係於遲緩芽孢桿菌中對應於前述位置之胺基酸殘基進行取代、摘除或插入。

當前驅體羧基水解酶之(胺基酸)殘基與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之殘基相似(即一級或三級結構位置對應)或與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之殘基相近(即具有相同或相似之結合、反應或化學交互反應功能性)，即稱為對應。

為建立一級結構相似性，前驅體羧基水解酶之胺基酸序列直接與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之一級序列相較，特別是與序列已知之枯草桿菌蛋白酶之固定殘基比較。圖2顯示解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶與遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶間保留之殘基。排列該保留之殘基後，可允許必要之插入及摘除以維持其排列(即避免經主觀之摘除及插入損害保留之殘基)，界定對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶一級序列之特定胺基酸之殘基。保留殘基之排列較佳者可保留100%之該殘基。然而，大於75%或低至50%保留殘基之排列亦足夠界定對應之殘基。需維持催化三元組 Asp32/His64/Ser221之保留。

例如，圖3中排列解澱粉芽孢桿菌、枯草桿菌、地衣芽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 五、發明說明 ( 17 )

孢桿菌及遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列，其顯示該等胺基酸間之最大相似性。比較該等序列可知，各序列含多種保留殘基。該等保留殘基（如 BPN' 及遲緩芽孢桿菌間之保留殘基）示於圖 2。

因此，該等保留殘基可用以界定其他胺基水解酶對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之胺基酸殘基，如遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶（1989年7月13日公告之 PCT 公告號 W089/06279），其為本發明較佳之枯草桿菌蛋白酶前驅體酵素，或稱為 PB92（歐洲專利第 0 328 299 號）之枯草桿菌蛋白酶，其與較佳之遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶具高度之相似性。該等特定枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列示於圖 3 A 及 3 B 中，其顯示保留殘基之最大相似性。由其可看出，與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶相較，遲緩芽孢桿菌序列中有多數之摘除。因此，例如，衍生自遲緩芽孢桿菌及地衣芽孢桿菌之他種枯草桿菌蛋白酶中對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶中 Val165 之胺基酸為異白胺酸。

因此，例如，解澱粉芽孢桿菌及遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶第 +76 位置之胺基酸均為天冬醯胺 (N)。然而，本發明較佳之枯草桿菌蛋白酶變異體中對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 +76 之胺基酸係經天冬胺酸 (D) 所取代。為便於說明，茲以表 II 顯示本發明特定位置之胺基酸殘基取代作用與各該位置最佳之取代作用之比較。

## 五、發明說明 ( )

表 II

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
解澱粉芽孢桿菌 (野生型)	N	D	S	Q	Y	I	N
遲緩芽孢桿菌 (野生型)	N	S	S	S	V	I	N
最佳取代作用	D	D	R	A	I/Y	V	S

亦可利用測定與前驅體羰基水解酶三級結構 (業經 X-光結晶法測定三級結構) 之相似性以界定對應之殘基。對應之殘基定義為前驅體羰基水解酶與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之特定胺基酸殘基中二或多個主鍵原子之原子配位基 (N 對 N, CA 對 CA, C 對 C 及 O 對 O) 排列後在 0.13 毫微米內, 較佳為 0.1 毫微米。尋得可使羰基水解酶及解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之非氫蛋白質原子之原子配位基達最大重疊之最佳模氏後, 排列即完成。最佳模式為於最高解析態下產生實驗繞射值之最低 R 因子之結晶模式。

$$R \text{ 因子} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶特定殘基功能性類似之對應殘基之定義為構形可依影響解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之方式改變、修飾或影響蛋白質結構、基質結合或催化作用之前驅體羰基水解酶之胺基酸。此外, 其為前

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

訂

訂

## 五、發明說明 ( 19 )

驅體羧基水解酶 ( 其業經 X-光結晶法獲知三級結構 ) 中佔據類似位置之殘基，雖然該殘基之主鏈原子可能不符合佔據類似位置之對應基準，但該殘基主鏈原子中至少二者之原子配位基係介於對應之解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶支鏈原子之 0.13nm 內。解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶三度空間之配位基揭示於歐洲專利公告第 0 251 446 號 ( 其為美國專利申請序號 SN 08/212,291 案之對應申請案，其併為本文之參考 )，可依上述方法測定三級結構對應之殘基。

某些用以取代、插入或摘除之殘基係保留殘基，其餘則不是。在不是保留殘基之情況下，該一或多個胺基酸之置換作用限於取代作用，其產生胺基酸序列與天然生成者不對應之變異體。而於是保留殘基之情況下，該置換作用不可產生天然生成之序列。本發明之羧基水解酶變異體包括成熟型之羧基水解酶變異體及該等水解酶之原及前原型態。由於前原型態有助於羧基水解酶變異體之表現、分泌及成熟，其為較佳者。

" 原序列 " 係指接於成熟型羧基水解酶 N-端部份之胺基酸序列，當其被移除時，可產生 " 成熟 " 型之羧基水解酶。許多天然生成之蛋白質水解酵素為轉譯原酵素產物，缺少轉譯後處理而表現成該型態。製備羧基水解酶變異體 ( 特別是枯草桿菌蛋白酶變異體 ) 之較佳原序列為解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之推測原序列，但他種枯草桿菌蛋白酶原序列亦可使用。實例 1 及 2 係使用遲緩芽孢桿菌 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 20 )

ATCC 21536 ) 枯草桿菌蛋白酶之推測原序列。

" 訊號序列 " 或 " 前序列 " 係指任何接合至羧基水解酶 N-端部份或結合至可參與水解酶成熟或原型態分泌之原水解酶之 N-端部份之胺基酸序列。該種訊號序列之定義係功能性定義，其表示包括所有為枯草桿菌蛋白酶基因或他種參與枯草桿菌蛋白酶或他種羧基水解酶於天然條件下分泌之可分泌性羧基水解酶 N-端部份所編碼之胺基酸序列。本發明使用該等序列以分泌本文界定之羧基水解酶變異體。本案實例所用較佳之訊號序列包含解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶訊號序列之前七個胺基酸殘基，其係融合至遲緩芽孢桿菌 ( ATCC 21536 ) 枯草桿菌蛋白酶訊號序列之其餘部份。

羧基水解酶變異體之 " 前原 " 型態係由具有可操作連結至水解酶胺基端之原序列及可操作連結至該原序列胺基端之 " 前 " 或 " 訊號 " 序列之成熟型態水解酶所構成。

" 表現載體 " 係指含有一 DNA 序列之 DNA 構築子，其可操作連結至進行該 DNA 在適當宿主中表現之適當控制序列上。該控制序列包括進行轉錄之啟動子、控制該等轉錄之選擇性操縱子序列、編碼適當 mRNA 核糖體結合位置之序列及控制轉錄及轉譯終止之序列。該載體可為質體、噬菌體顆粒、或單純為潛在性之基因體插入物。一旦轉形至適當宿主後，該載體可獨立於該宿主基因體之外地複製及運作，或者有時可本身整合至該基因體中。本說明書中，" 質體 " 及 " 載體 " 有時交互地使用，因為質體為本發明使用

## 五、發明說明 ( 21 )

最多之載體。不過，本發明尚包括已為此技藝所知或將為此技藝所知之可表現相當功能之他種型態表現載體。

本發明所稱"宿主細胞"一般係指原核或真核宿主，其較佳者係經過如美國專利第4,760,025 (RE 34,606)號揭示之方法修飾，以使其無法分泌具酵素活性之內蛋白酶。用以表現枯草桿菌蛋白酶之較佳宿主細胞為芽孢桿菌品系BG2036，其缺少具酵素活性之中性蛋白酶及鹼性蛋白酶(枯草桿菌蛋白酶)。BG2036品系之構築詳情揭示於美國專利第5,264,366號。其他用以表現枯草桿菌蛋白酶之宿主細胞包括枯草桿菌I168[亦揭示於美國專利第4,760,025號(RE 34,606)及美國專利第5,264,366號，其併為本文之參考]，及任何適用之芽孢桿菌品系，如地衣芽孢桿菌，遲緩芽孢桿菌等。

宿主細胞係經使用重組DNA技術所構築之載體轉形或轉感染。該等轉形宿主細胞可複製編碼羧基水解酶變異體之載體，或表現所希望之羧基水解酶變異體。當載體係編碼羧基水解酶變異體之前或前原型態時，當該等變異體被表現時，其一般係由宿主細胞分泌至宿主細胞基質中。

當用以說明兩個DNA區域間之關係時，"可操作連結"僅表示其功能上相關聯。例如，當一前序列之功能為訊號序列時，其可操作連結至胜肽，參與成熟型態蛋白質之分泌，極可能涉及該訊號序列之裂解。當一啟動子控制序列之轉錄時，其可操作連結至一編碼序列；當一核糖體結合部位之位置適當可允許轉譯時，其可操作連結至一編碼

## 五、發明說明 ( 22 )

序列。

可依技藝人士所知之一般方法獲得可編碼天然生成之前驅體巰基水解酶之基因。該等方法一般而言包含合成具有可編碼所需水解酶區域之推測序列之經標記探針，由表現該水解酶之有機體製備基因庫，及使所需基因與該探針雜交以篩檢該基因庫。然後鑑定陽性雜交細胞系並定序。實例所用之遲緩芽孢桿菌基因係依美國專利第5,185,258號實例1所述者選殖者，該專利案為本文之參考。實例5所用之BPN'基因係依RE 34,606實例1所述者選殖者，該專利案為本文之參考。

然後使用所選殖之巰基水解酶轉形宿主細胞，以表現該水解酶。然後將該水解酶基因接合至高套數質體中。該質體含有為人熟知之質體複製要素，可於宿主中複製：一可操作連結至該基因之啟動子（如果可為宿主認知，亦即可為宿主所轉錄，則其可為該基因本身之類似啟動子），一轉錄終止及聚腺苷酸化區（其係使由宿主經某些真核宿主細胞之水解酶基因所轉錄之mRNA之安定性所需者），其可為外源性之區域，或為該水解酶基因之內源性終止區，及較佳者一選擇基因，如抗生素抗性基因，其可使經質體感染之宿主細胞在含抗生素基質之生長條件下持續地培養。高套數質體亦含有供宿主複製之區域，因而使大量之質體在細胞質中產生，而無染色體之限制。不過，將複數套之水解酶基因整合至宿主之基因體中亦涵括於本發明範圍中。其可為原核及真核有機體所進行，該等有機體特別易於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 23 )

進行類似之重組。

本發明實例所用之基因為天然之遲緩芽孢桿菌基因及天然之解澱粉芽孢桿菌基因。或者，可製備編碼天然或突變前驅體羧基水解酶（枯草桿菌蛋白酶）之合成基因。該方法中，該前驅體水解酶（枯草桿菌蛋白酶）之DNA及/或胺基酸序列經過測定。其後合成複數、重疊之合成單股DNA片段，其經雜交及連結後可產生編碼前驅體水解酶之合成DNA。美國專利第5,204,015號專利實例3揭示合成基因製備之實例，該專利案併為本文之參考。

一旦選殖天然生成或合成之前驅體羧基水解酶基因後，進行數種修飾作用以增強該基因超越合成天然前驅體羧基水解酶之用途。該等修飾作用包括以如美國專利第4,760,025號（RE34,606）及歐洲專利公告號第0 251 446號所揭示者製備重組羧基水解酶及製備本文所述之羧基水解酶變異體。

可使用下述匣式突變法（cassette mutagenesis）進行本發明羧基水解酶變異體之製備及鑑定，但其他方法亦可使用，包括位置導向突變法。首先，獲取編碼水解酶之天然生成基因，使其全部或部分定序。然後篩檢該序列，找出可進行所編碼酵素之一或多個胺基酸突變（摘除、插入或取代）之定點。檢視側接於該定點之序列是否含有切割位置，該位置可供以於表現時編碼各種突變之寡核苷酸庫置換一小段之該基因。該切割位置較佳者為存在於該水解酶基因中之特異位置，以利於該基因段之置換。不過，可

## 五、發明說明 ( 24 )

使用任何該水解酶基因中不過度重複之便利切割位置，只要經由切割作用所產生之基因片段可適當地重組即可。如果在所選定點適當距離內（10至15個核苷酸）無切割位置存在，可在不改變譯讀架或於最終架構內所編碼之胺基酸之情況下取代該基因之核苷酸以產生該位置。可使用一般之已知方法，藉由M13引子延伸而達到為改變序列得到所需序列而進行之基因突變。遺傳密碼之重覆性、基因之切割圖譜及大量之不同切割酶使得尋求適當之側接區域及評估獲得兩個便利切割位置序列所需改變之工作變為慣性工作。應瞭解，如果有便利之側接切割位置，僅在該側接區域不含切割位置時方需使用上述方法。

一旦選殖天然生成DNA或合成DNA後，以同源性切割酶水解側接於該位置之切割位置，將多數終端互補之寡核苷酸匣接合至該基因中。該方法可簡化突變作用，因為可使所合成之所有寡核苷酸均具相同切割位置，且無需連接子以產生切割位置。

本文所稱蛋白質水解活性係指每毫克活性酵素水解肽鍵之速率。已有許多為人熟知之方法可測量蛋白質水解活性（K. M. Kalisz, "Microbial Proteinases," Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter ed., 1988）。除經改良之蛋白質水解活性之外，本發明變異體酵素可具有其他之改良性質，如 $K_M$ ， $k_{cat}$ ， $k_{cat}/K_M$ 比及 / 或改良之基質特異性及 / 或改良之pH活性性質。該等酵素可用於預期中存在之特定基質，例

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

象

## 五、發明說明 ( 25 )

如，用於製備諸如洗衣之用之水解作用之胜肽。

本發明之一目的為確保變異體巰基水解酶具有與其前驅體巰基水解酶相較經改變之蛋白質水解活性，因為增加該等活性（數字上較大）可使該酵素之使用更有效地作用於標的基質。與前驅體相較具經改變熱安定性及/或經改變基質特異性之變異體酵素亦係為人所希冀者。較佳者，進行突變之巰基水解酶為枯草桿菌蛋白酶。本發明實例所示可用以獲得枯草桿菌蛋白酶 - 類巰基水解酶之特定胺基酸為對應於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265及/或+274之殘基或其組合。有些情形下係希望較低之蛋白質水解活性，例如，當需要巰基水解酶之合成活性時（如合成胜肽），蛋白質水解活性之降低係有用的。該蛋白質水解活性可破壞產物之合成，可能希望可降低該蛋白質水解活性。相反地，有些情況下係希望可增加變異體酵素相對於其前驅體之蛋白質水解活性。此外，無論係鹼性或熱安定性，有時需增加或降低（改變）變異體之安定性。對於用以測定  $k_{cat}$ ,  $K_M$  或  $k_{cat}/K_M$  等動力學參數之基質而言，該等參數之增加或降低係具特異性的。

本發明另一方面發現，枯草桿菌蛋白酶中對應於 +76 殘基及其他多數之修飾作用對調整該酵素之總體安定性及/或蛋白質水解活性係重要的。因此，如實例所示者，較佳

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 26 )

之具體實施例中，遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶對應之 +76 位置之天冬醯胺 (N) 為天冬胺酸 (D) 所取代，並結合一或多個下示胺基酸殘基之修飾作用：+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 及 / 或 +274, 以使所得突變酵素具有增強之安定性及 / 或增強之活性。

本發明最佳之具體實施例示於實例中。其包括下示之經取代殘基之特定組合：N76D/S99D; N76D/V104I; N76D/S99D/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V 及 N76D/S101R/S103A/V104I。本發明所請所有突變結合亦示於實例中。該等取代作用較佳者係於遲緩芽孢桿菌 ( 重組或天然型態 ) 枯草桿菌蛋白酶中進行者，但亦可於枯草桿菌之枯草桿菌蛋白酶中進行該等取代作用。

基於所得變異體枯草桿菌蛋白酶之結果，明顯地，巰基水解酶 ( 較佳為枯草桿菌蛋白酶 ) 中對應於解澱粉芽孢桿菌位置 +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 及 / 或 +274 之殘基對該等酵素之蛋白質水解活性、性能及 / 或安定性，及該變異體酵素之清潔或洗衣性能極重要。

## 五、發明說明 ( 27 )

本發明之多數巖基水解酶變異體 ( 特別是枯草桿菌蛋白酶 ) 可用於調配各種清潔劑組合物。多數已知之化合物為適用於含有本發明巖基水解酶突變體之組合物之界面活性劑。其包括非離子性，陽離子性，陰離子性或兩性清潔劑，如 Barry J. Anderson 之美國專利第 4,404,128 及 Jiri Flora 等人之美國專利第 4,261,868 所揭示者。美國專利第 5,204,015 ( 已於前文說明為本案之參考文獻 ) 實例 7 揭示一種適用之清潔劑配方。此技藝熟知可作為清潔組合物之不同配方。除典型之清潔組合物之外，應瞭解，本發明枯草桿菌蛋白酶變異體亦可用於任何需使用天然或野生型枯草桿菌蛋白酶之場合。因此，該等變異體可用於例如條狀或液態肥皂應用，洗碟精，隱形眼鏡清洗液或產物，胜肽水解，廢棄物處理，織物應用，蛋白質生產所用之融合 - 裂解酵素等。本發明變異體可於清潔劑組合物中表現增強之性能 ( 與其前驅體相較 )。本文所稱於清潔劑中之增強性能係指於標準洗衣循環後，以習用之評估法測定，可增加對特定酵素敏感型污漬 ( 如草或血液 ) 之清潔。

可將本發明枯草桿菌蛋白酶調配至已知 pH 介於 6.5 至 12.0 之粉狀或液態清潔劑中，添加量為約 0.01 至約 5 重量 % ( 較佳為 0.1 至 0.5 重量 % )。該等清潔劑清潔組合物亦可含有他種酵素，如已知之蛋白酶，澱粉酶，纖維素酶，脂肪酶或內糖苷酶，及助洗劑及安定劑。

將本發明枯草桿菌蛋白酶添加至習用之清潔劑組合物並不造成任何特別之使用限制。換言之，任何適用於該清潔

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

448230

A7

B7

### 五、發明說明 ( 28 )

劑之溫度及 pH 亦適用於本發明之組合物，只要該 pH 介於上述之範圍內，而溫度低於已知之枯草桿菌蛋白酶之變性溫度。此外，本發明枯草桿菌蛋白酶亦可用於不含清潔劑之清潔組合物，不論係單獨使用或係與助洗劑及安定劑併用。

下文所述僅為實例，其並非申請專利範圍之限制。

#### 實例 1

#### 於枯草桿菌中表現 GG36 基因

依美國專利第 5,185,258 號所述相同方法進行遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶基因之選殖及表現構築。依下文方法進一步修飾質體 GGA274 (示於圖 4)，如圖 5 所示。依下文所述寡核苷酸導向突變法，以具 5' GAAGCTGCAACTCGTTAAA 3' 序列之寡核苷酸 (Seq. ID No.1) 移除於質體 GGA274 製備過程中導入之 PstI 位置。劃底線之 "A" 殘基摘除切割酶 PstI 所確認之序列，使位置 274 之胺基酸殘基由丙胺酸變為蘇胺酸。位置 274 之蘇胺酸為所選殖遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶基因序列所見之野生型殘基。以 EcoRI 及 BamHI 水解，由質體 GGA274 或其衍生物 (如圖 5 所示之 GGT274) 切除編碼枯草桿菌蛋白酶之基因小節。將該 DNA 片段次選殖至噬菌體 M13-系列之載體中 (如 MP19)，進行突變。突變後，經選殖，進行 EcoRI 及 HindIII 水解，以使突變之枯草桿菌蛋白酶基因重接回 GGA274 類表現質體中，進行表現，回收所突變之枯草桿菌蛋白酶蛋白質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 29 )

## 實例 2

寡核甘酸 - 導向突變

依 Zoller, M., et al. (1983), Method Enzymol., 100:468-500所述方法進行寡核甘酸 - 導向突變。例如, 以 5' GCTGCTCTAGACAATTTCG 3' (Seq. ID No.2) 之合成寡核甘酸將 76 位置之胺基酸殘基由天冬醯胺 (N) 轉變為天冬胺酸 (D), 或者可以 N76D 表示。劃底線之 "G" 及 "C" 殘基代表與野生型基因序列不同者。CA 使得 +75 位置之白胺酸得以保持, 而改變胺基酸序列以導入為 XbaI 切割酶所確認之 XbaI 位置 (TCTAGA), 同時 GAC 之改變使 +76 之天冬醯胺變為天冬胺酸。

為進行 99, 101, 103 及 104 位置之突變, 可依所需之突變組合而定, 使用不同之寡核甘酸。例如, 可使用 5' GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3' (Seq. ID No.3) 寡核甘酸序列同時於單一枯草桿菌蛋白酶分子中進行下示之改變: S99D; S101R; S103A 及 V104I。同樣地, 可分別使用 5' TCAGGTTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGGATTG 3' (Seq. ID No.4) 及 5' CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3' (Seq. ID No.5) 寡核甘酸序列產生 I107V 及 N123S。相同地, 劃底線之殘基代表與野生型序列不同之處, 其可造成胺基酸序列或切割酶確認序列之改變。

## 實例 3

枯草桿菌蛋白酶變異體之蛋白質水解活性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 30 )

依實例 2 之方法製備表 III 所示之變異體。該等枯草桿菌蛋白酶變異體中每一者之蛋白質水解活性示於表 III 中。動力學參數  $k_{cat}$ ,  $K_M$  及  $k_{cat}/K_M$  係依 P. Bonneau, et al. (1991) J. Am. Chem. Soc., Vol. 113, No. 3, p.

1030 所述方法, 測量合成基質琥珀醯基

-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-對硝基苯胺之水解所得者。

概言之, 係將少量之枯草桿菌蛋白酶變異體母液加至 1 公分含有溶解於 pH 為 8.6 之 0.1 M Tris-HCl 緩衝液中之基質之比色管中, 設定恆溫 25°C。監測反應產物對硝基苯胺於 410 nm 之吸光度, 分光光度記錄反應過程。使用非線性回歸運算式, 依 Michaelis-Menten 方程式運算反應速度及產物濃度, 得動力學參數。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

448230

A7

B7

## 五、發明說明 ( )

表 III

遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶及變異體  
動力學參數  $k_{cat}$ ,  $K_M$  及  $k_{cat}/K_M$

酵素	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ (M)	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}M^{-1}$ )
遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶	170	0.00078	$2.18 \times 10^5$
N76D	219	0.0008	$2.74 \times 10^5$
N76D/S99D	88	0.00061	$1.44 \times 10^5$
N76D/S103A	400	0.0014	$2.86 \times 10^5$
N76D/V104I	459	0.0011	$4.17 \times 10^5$
N76D/I107V	219	0.0011	$1.99 \times 10^5$
N76D/N123S	115	0.0018	$6.40 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R	146	0.00038	$3.84 \times 10^5$
N76D/S99D/S103A	157	0.0012	$1.31 \times 10^5$
N76D/S99D/V104I	247	0.00097	$2.55 \times 10^5$
N76D/S101R/S103A	405	0.00069	$5.90 \times 10^5$
N76D/S101R/V104I	540	0.00049	$1.10 \times 10^6$
N76D/S103A/V104I	832	0.0016	$5.20 \times 10^5$
N76D/V104I/I107V	497	0.00045	$1.10 \times 10^6$
N76D/V104Y/I107V	330	0.00017	$1.90 \times 10^6$
N76D/V104I/N123S	251	0.0026	$9.65 \times 10^4$
N76D/I107V/N123S	147	0.0035	$4.20 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R/S103A	242	0.00074	$3.27 \times 10^5$
N76D/S99D/S101R/V104I	403	0.00072	$5.60 \times 10^5$
N76D/S99D/S103A/V104I	420	0.0016	$2.62 \times 10^5$
N76D/S101R/S103A/V104I	731	0.00065	$1.12 \times 10^6$
N76D/S103A/V104I/N123S	321	0.0026	$1.23 \times 10^5$
N76D/V104I/I107V/N123S	231	0.003	$7.70 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0.00098	$6.37 \times 10^5$
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0.0043	$4.51 \times 10^4$
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0.0023	$1.35 \times 10^5$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

## 五、發明說明 ( 33 )

表 III 所示結果顯示，所有受試之枯草桿菌蛋白酶變異體均保留蛋白質水解活性。此外，詳細分析該數據顯示，多種對應於解澱粉芽孢桿菌位置 76, 99, 101, 103, 104, 107 及 123 之胺基酸殘基取代作用之組合可顯著地改變遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之蛋白質水解活性。

## 實例 4

枯草桿菌蛋白酶變異體之熱安定性

遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶及實例 2 所製之本發明變異體之熱安定性比較示於表 IV 中。將純化之酵素，15 微克 / 毫升在 0.1 M 甘胺酸中之 0.01% Tween-80 (pH 10.0)，含或不含 50 mM CaCl<sub>2</sub>，等分至小試管中，於 10°C 下恆溫培養 5 分鐘，10-60°C 下 1 分鐘，及 60°C 下 20 分鐘。然後將試管置於冰上 10 分鐘。將試管內容物加至含 1.2 mM 溶於 0.1 M pH 為 8.6 之 Tris-HCl 中之合成胜肽基質琥珀醯基 -L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-對硝基苯胺之 1 公分比色管中，設定恆溫 25°C，分析酵素活性。測量初始之線性反應速度，接著監測反應產物對硝基苯胺於 410 nm 吸光度之分光光度，對時間作圖。以加熱前活性百分比表示數據。表 IV 所示結果顯示，在添加 50 mM CaCl<sub>2</sub> 之測試條件下，大多數之變異體 ( 26 個中 24 個 ) 具有與遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶相當之熱安定性。在未添加 50 mM CaCl<sub>2</sub> 之測試條件下，大多數之變異體 ( 26 個中有 19 個 ) 顯著地較遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶穩定。此外，在未添加 50 mM CaCl<sub>2</sub> 之測試條件下，變異體 N76D/S99D, N76D/V104I,

448230

A7  
B7

五、發明說明 ( 33 )

N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I,  
N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V及  
N76D/S101R/S103A/V104I顯著體較N76D單一取代變異體穩  
定。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( )

表 IV

遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶及變異體  
於 pH10, 60°C, +/-50mM CaCl<sub>2</sub> 下之熱安定性

酵素	殘餘起始活性%	
	- CaCl <sub>2</sub>	+ CaCl <sub>2</sub>
遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶	2	
N76D	34	96
N76D/S99D	49	97
N76D/S103A	26	98
N76D/V104I	58	92
N76D/I107V	32	98
N76D/N123S	0	96
N76D/S99D/S101R	30	97
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	100
N76D/S101R/S103A	26	97
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	100
N76D/V104Y/I107V	48	97
N76D/V104I/N123S	0	74
N76D/I107V/N123S	16	98
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	100
N76D/S101R/S103A/V104I	40	98
N76D/S103A/V104I/N123S	1	99
N76D/V104I/I107V/N123S	3	98
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	99
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	95
		100

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

## 五、發明說明 ( 35 )

## 實例 5

以噬菌質體產生之單股 DNA 模版進行寡核苷酸 - 導向突變A. 遲緩芽孢桿菌變異體之構築

突變之方法大致和前文所述實例 2 相同。以噬菌質體法產生單股 DNA 模版。首先構築載體 pBCDAICAT 以構築產生單股 DNA 模版之噬菌質體載體。構築載體之流程圖示於圖 8。首先，將 pC194 質體 (Horinouchi, S. and Weisblum, B., J. Bacteriol., 150:8-15, 1982) 中編碼 CAT 基因之 ClaI 至 ClaI 片段殖入 pUC19 (購自 New England Biolabs, Beverly, MA) 中聚連結子區之 AccI 位置，製成質體 pUCCHL，將編碼 GG36DAI 之 DNA 5' 端之 EcoRI-DraI 0.6 KB 片段殖入 pBSKS 質體 (購自 Stratagene, Inc., San Diego, CA) 之 EcoRI 及 EcoRV 位置，製得 pBC2SK5。以 EcoRI 水解，去除質體 pBC2SK5 中之單一 EcoRI 位置，接著以 T4 DNA 聚合酶充填，並重接合，以製得不含 EcoRI 位置之質體 pBC2SK-5R。將殖入 pBCSK-5R 中之 EcoRI-DraI 片段以 PstI-HindIII 片段之型態分離，殖入 pUCCHL (其為 pUC19 聚接合子一部份) 之 PstI-HindIII 位置，得質體 pUCCHL5R。將編碼 GG36DAI 基因之序列以 EcoRI-BamHI 片段之型態切除，殖入 pUCCHL5R 之 EcoRI-BamHI 位置，得 pUCCAT。然後將 pUCCAT 之大 EcoRI-HindIII 片段殖入 BS2KS+ 之 EcoRI 及 HindIII 位置，得質體 pBCDAICAT。

44823

A7  
B7

### 五、發明說明 ( 36 )

為產生單股DNA，依 Russel, M., Kidd, S. and Kelley, M. R., GENE 45:333-338, 1986所述方法，以噬菌體 R408(購自 Stratagene, San Diego, CA) 感染含 pBCDAICAT之大腸桿菌。一旦獲得單股DNA模版後，依實例 2 所述者進行標準突變法。茲以下文說明特定突變體之構築。

為構築遲緩芽孢桿菌 (GG36)N76D/S103A/V104I/L217H，使用編碼 GG36 N76D/S103A/V104I之 EcoRI-BamHI DNA片段構築 pUCCAT (請參閱圖 8)，得質體 pBCDAICAT。依前述方法製得單股DNA模版後，以具如下序列之突變引子

\* \* \* \* \* x ClaI

5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3'

(Seq. ID No.13 )

製得 L217H。如前述者，劃底線之殘基為改變之核苷酸，而 x ClaI 表示於突變後被去除之現存 ClaI 位置。突變方法如實例 2 所示。於突變後，篩檢質體 DNA 去除之 ClaI 位置，使不含 ClaI 位置之細胞系進行 DNA 定序分析，找出於 217 胺基酸殘基將 L 改變為 H 之 DNA 序列。

#### B. BPN' 變異體之構築及其於枯草桿菌中之表現

依類似方法構築解澱粉芽孢桿菌 (BPN')N76D/Q103A/Y104I/Y217L，但係於兩個連續步驟進行。首先將 N76D 導入 BPN'Y217L 中，得 BPN'N76D/Y217L，進行第二次突變，將 BPN'N76D/Y217L 轉換為 BPN'N76D/Q103A/Y104I/Y217L。為產生用於第一突變之單

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 ( 37 )

股 DNA 模版，使用編碼 BPN'Y217L 枯草桿菌蛋白酶 ( 衍生自 Wells, J., et al., PNAS, 84, 5167, 1087 所述質體 Y217L ) 之 EcoRI-BamHI 片段構築質體 pUCCATFNA ( 請參閱圖 9 ) 。如前述者製得單股 DNA 模版。為製備

BPN'N76D/Y217L，使用具下示序列之寡核苷酸引子

\* \* \* \* \* x XbaI

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3'  
(Seq. ID No.14)

產生 N76D。然後由含 BPN'N76D/Y217L 之質體 pBCFNACAT ( 經 N76D 突變後之 pBCFNACAT 質體 ) 製得單股 DNA，以具下示序列之另一寡核苷酸

\* \* \* \* \* x PvuII

5' GCT GAC GGT TCC GGC GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3'  
(Seq. ID No.15)

進行突變，得 BPN'N76D/Q103A/Y104I/Y217L。所有涉及選殖、單股 DNA 製備、突變及突變體篩檢之步驟均如前述者進行。依 RE 34,606 所述方法，直接將質體 DNA ( 含不同變異體 BPN' 基因之 pBCFNACAT ) 整合至缺蛋白酶之枯草桿菌品系中，進行 BPN' 基因及其變異體之表現。

依實例 2 及 5 之方法製得無數之變異體。測試該等變異體之動力學數據及安定性數據。使用實例 3 所述方法測定動力學參數，如表 V 所示。安定性數據如下文所說明者測試。結果示於表 VI。

熱安定性分析方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 38 )

將酵素施用於經緩衝液平衡之 Sephadex G-25 管柱中，使純化酵素緩衝交換至 0.1 M 甘胺酸 (pH10.0)，0.01% Tween-80 中，以相同緩衝液由管柱溶析該酵素。

將該緩衝交換酵素加至設定於 60°C 恆溫含 0.1 M 甘胺酸、0.01% Tween-80 pH10.0 之試管中，終酵素濃度為 15 微克 / 毫升。

於不同時間由 60°C 恆溫培養取出反應物，立即加至含 1.2 mM 溶於 0.1 M pH 為 8.6 之 Tris-HCl 中之合成胜肽基質琥珀醯基-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-對硝基苯胺之 1 公分比色管中，設定恆溫 25°C，分析酵素活性。測量初始之線性反應速度，接著監測反應產物對硝基苯胺於 410 nm 吸光度之分光光度，對時間作圖。

半衰期為使 50% 酵素不活化所需之時間，以 60°C 恆溫培養下，反應速度對時間之一級作圖測定半衰期。

該數據示於表 VI，係以於相同條件下所測試遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 (GG36) 之半衰期之百分比表示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

## 五、發明說明( )

表 V

酵素	kcat (s <sup>-1</sup> )	KM (mM)	kcat/KM (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶			
N76D/S103G/V104I*	170	0.78	2.20E+05
N76D/S103A/V104F	380	1.4	2.70E+05
N76D/S103A/V104N	730	0.33	2.20E+06
N76D/S103A/V104S	790	2.8	2.80E+05
N76D/S103A/V104T	170	0.83	2.00E+05
N76D/S103A/V104W	370	1.9	2.00E+05
N76D/S103A/V104Y	880	0.31	2.80E+06
K27R/N76D/V104Y/N123S	690	0.5	1.40E+06
N76D/S101G/S103A/V104I*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/S105A*	620	1.3	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/S105D*	550	1.3	4.20E+05
N76D/S103A/V104T/I107A*	440	1.7	2.60E+05
N76D/S103A/V104T/I107L*	120	5.7	2.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126A	310	3.2	9.70E+04
N76D/S103A/V104I/L126F	90	2.2	4.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126I	180	1.9	9.50E+04
N76D/S103A/V104I/L126V	100	2.4	4.20E+04
N76D/S103A/V104I/S128G*	64	3.2	2.00E+04
N76D/S103A/V104I/S128L*	560	1.7	3.30E+05
N76D/S103A/V104I/L135A	430	3.8	1.10E+05
N76D/S103A/V104I/L135F	140	0.76	1.80E+05
N76D/S103A/V104I/L135I	390	0.69	5.70E+05
N76D/S103A/V104I/L135V	110	0.73	1.50E+05
N76D/S103A/V104I/S156E*	140	0.86	1.60E+05
N76D/S103A/V104I/S166D*	170	2.6	6.50E+04
N76D/S103A/V104I/D197E	160	3.5	4.60E+04
N76D/S103A/V104I/N204A*	510	1.4	3.60E+05
N76D/S103A/V104I/N204G*	530	1.1	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/N204C*	580	1.4	4.10E+05
N76/S103A/V104I/P210I*	370	1.3	2.90E+05
N76D/S103A/V104I/L217H*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/M222A	80	0.63	1.30E+05
N76D/S103A/V104I/M222S	70	3.1	2.30E+04
N76D/S103A/V104I/T260P	80	3.1	2.60E+04
N76D/S103A/V104I/S265N	660	1.5	4.40E+05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	590	1.3	4.50E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	220	1.4	1.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	430	1.1	3.90E+05
	400	1.1	3.60E+05

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

頁

## 五、發明說明( )

K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	760	0.98	7.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	410	1.2	3.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3.90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2.1	8.10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6.3	6.40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0.98	4.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0.66	8.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0.79	9.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0.99	6.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0.78	7.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0.89	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0.65	7.10E+05
解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 (BPN')	50	0.14	3.60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

\* 該等變異體係依實例 5 之方法所製備，其餘之變異體為依實例 2 之方法所製備。

表 VI

酵素

熱安定性(天然酵素半衰期之%)

遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶	
N76D	100
N76D/S99D	590
N76D/S103A	840
N76D/V104I	390
N76D/I107V	660
N76D/N123S	710
N76D/S99D/S101R	70
N76D/S99D/S103A	610
N76D/S99D/V104I	590
N76D/S101R/S103A	910
N76D/S101R/V104I	930
N76D/S103A/V104I	500
N76D/S103G/V104I*	460
N76D/S103A/V104F	370

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

## 五、發明說明( )

N76D/S103A/V104N	480
N76D/S103A/V104S	230
N76D/S103A/V104T	230
N76D/S103A/V104W	370
N76D/S103A/V104Y	280
N76D/V104I/I107V	400
N76D/V104Y/I107V	940
N76D/V104I/N123S	820
N76D/I107V/N123S	80
K27R/N76D/V104Y/N123S	150
N76D/S99D/S101R/S103A	100
N76D/S99D/S101R/V104I	570
N76D/S99D/S103A/V104I	1000
N76D/S101G/S103A/V104I*	680
N76D/S101R/S103A/V104I	390
N76D/S103A/V104I/S105A*	470
N76D/S103A/V104I/S105D*	360
N76D/S103A/V104T/I107A*	370
N76D/S103A/V104T/I107L*	270
N76D/S103A/V104I/N123S	230
N76D/V104I/I107V/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126A	220
N76D/S103A/V104I/L126F	270
N76D/S103A/V104I/L126I	950
N76D/S103A/V104I/L126V	410
N76D/S103A/V104I/S128G*	320
N76D/S103A/V104I/S128L*	640
N76D/S103A/V104I/L135A	760
N76D/S103A/V104I/L135F	230
N76D/S103A/V104I/L135I	200
N76D/S103A/V104I/L135V	510
N76D/S103A/V104I/S156E*	500
	120

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

頁

## 五、發明說明( )

N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	60
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	240
解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶(BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

\* 該等變異體係依實例 5 之方法所製備，其餘之變異體為依實例 2 之方法所製備。

## 實例 6

## 洗衣性能試驗

## 五、發明說明 ( 43 )

測量由EMPA 116(棉布上之血液 / 牛奶 / 碳黑)布製方巾(購自Testfabrics, Inc., Middlesex, NJ 07030)移除污漬以評估前述實例所述變異體之洗衣性能。

將六塊切成3 X 4-1/2英寸具鋸齒狀布邊之EMPA 116方巾置於每一視情況含1000毫升水, 15gpg硬度(Ca<sup>++</sup>:Mg<sup>++</sup>=3:1, w/w), 7克清潔劑及酵素之Model 7243S Terg-O-Tometer容器(United States Testing Co., Inc., Hoboken, NJ)中。該清潔劑基底係購自wfk-Testgewebe GmbH(地址為Alderstrasse 43, Postfach 13 07 62, D-47759 Krefeld, Germany)之WFK1清潔劑。

組份	終組合物中之%
沸石 A	25%
硫酸鈉	25%
蘇打灰份	10%
直鏈烷苯磺酸酯	8.8%
醇乙氧化物(7-8 EO)	4.5%
納皂	3%
矽酸鈉	3%

(SiO<sub>2</sub>:Na<sub>2</sub>O=3.3:1)

將下示成份加至該清潔劑基底中：

組份	終組合物中之%
過硼化鈉單水合物	13%

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 ( 44 )

聚合物 (Sokalan CP5)	4%
TAED (Mykon ATC Green)	3%
酵素	0.5%
增艷劑 (Tinopal AMS-GX)	0.2%

過硼酸鈉單水合物係購自提古沙公司 (其地址為 Ridgefield-Park, NJ 07660)。Sokalan CP5係購自 BASF 公司 (其地址為 Parsippany, NJ 07054)。Mykon ATC Green (TAED, 四乙醯基乙二胺) 係購自 Warwick International, Limited (其地址為 Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, England)。Tinopal AMS GX 係購自汽巴嘉基公司 (其地址為 Greensboro, NC 27419)。

於 60°C 下，在含酵素之清潔劑中清洗六塊 EMPA 116 方巾 30 分鐘，接著沖洗兩次，各五分鐘，每一次 1000 毫升之水。以 0.05 至 1 ppm 之酵素終濃度製得標準曲線，一般分析用 0.25 ppm。乾燥方巾，燙平，於美樂達色素儀 (Minolta Chroma Meter) Model CR-200 (美樂達公司, Ramsey, NJ 07446) 之  $L^*a*b^*$  量上測量 L 值，測定方巾之反射度。以遲緩芽孢桿菌 (GG36) 蛋白酶之性能之百分比表示性能，並以提供相同污漬移除性能所需之變異體蛋白質量除遲緩芽孢桿菌 (GG36) 蛋白酶之量  $\times 100$ 。數據示於表 VII。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明( )

表 VII

酵素	洗衣性能
遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶	
N76D	100
N76D/S103A	310
N76D/V104I	230
N76D/I107V	130
N76D/S99D/S101R	160
N76D/S99D/S103A	370
N76D/S101R/S103A	290
N76D/S101R/V104I	130
N76D/S103A/V104I	300
N76D/S103G/V104I	320
N76D/S103A/V104F	160
N76D/S103A/V104N	210
N76D/S103A/V104T	110
N76D/V104I/I107V	170
N76D/S99D/S101R/S103A	210
N76D/S99D/S101R/V104I	220
N76D/S101G/S103A/V104I	140
N76D/S101R/S103A/V104I	170
N76D/S103A/V104I/S105A	150
N76D/S103A/V104T/I107A	170
N76D/S103A/V104T/I107L	120
N76D/S103A/V104I/L126F	110
N76D/S103A/V104I/S128G	110
N76D/S103A/V104I/L135I	280
N76D/S103A/V104I/L135V	160
N76D/S103A/V104I/D197E	160
N76D/S103A/V104I/N204A	170
N76D/S103A/V104I/N204G	160
N76D/S103A/V104I/P210I	150
N76D/S103A/V104I/M222A	470
N76D/S103A/V104I/T260P	100
N76D/S103A/V104I/S265N	280
	190

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

覽

訂

頁

## 五、發明說明(46)

## 實例 7

於液態清潔劑組合物中之蛋白質安定性

依下文所述方法比較遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶及其變異體酵素 N76D/S103A/V104I 於液態清潔劑組合物之不活化作用之蛋白酶安定性。用於此試驗之清潔劑組合物為商業上可購得之由寶鹼公司於美國製造之瓶裝汰漬超濃縮液態洗衣清潔劑。清潔劑組合物之熱處理為使原含有之蛋白酶不活化所需者。其係使清潔劑於 96℃ 下恆溫培養 4.5 小時。然後於室溫下，將 20 克 / 公升酵素之遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶及 N76D/S103A/V104I 變異體之濃縮準備液加至經熱處理之汰漬超濃縮清潔劑中，在清潔劑組合物中之終濃度為 0.3 克 / 公升酵素。然後於 50℃ 恆溫水浴中培養添加蛋白酶之熱處理清潔劑組合物。於 0, 24, 46, 76 及 112 小時之時間間隔時移出培養試管之內容物，加至含 1.2 mM 溶於 0.1 M pH 為 8.6 之 Tris-HCl 中之合成胜肽基質琥珀醯基-Ala-Ala-Pro-Phe-對硝基苯胺之 1 公分比色管中，設定恆溫 25℃，分析酵素活性。測量初始之線性反應速度，接著監測反應產物對硝基苯胺於 410 nm 吸光度之分光光度，對時間作圖。如圖 10 所示者，N76D/S103A/V104I 變異體具有顯著較天然遲緩芽孢桿菌酵素為大之不活化安定性。於前述之測試條件下，該兩種酵素於汰漬超濃縮清潔劑組合物中之估計不活化半衰期為遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 45 小時，而 N76D/S103A/V104I 變異體 125 小時。

4482

A7

B7

### 五、發明說明(47)

本說明書全文係以單字母或三字母密碼界定各種胺基酸。該等密碼為 Dale, J.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Appendix B. 所述者。

雖然已由前文說明本發明之較佳具體實施例，對於習知與本發明有關之技藝者而言明顯地，於瞭解本發明整體之後，可進行各種改變及相當之修飾而不超越所附申請專利範圍界定之本發明範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

44820

A7  
B7

五、發明說明 ( 48 )

序列列示

(I) 基本資料：

(i)申請人：湯瑪斯·普·克拉卡  
理查·爾·伯特  
洛瑞·傑·威爾森

(ii)發明名稱：枯草桿菌蛋白酶之變異體

(iii)序列數目：15

(iv)通訊地址：

(A)收件人：吉安克國際公司  
(B)街名：180金寶路  
(C)城名：三藩市  
(D)州名：加州  
(E)國名：美國  
(F)郵地區號：94080

(v)電腦讀取型式：

(A)磁碟種類：軟碟  
(B)電腦：IBM PC 相容  
(C)操作系統：PC-DOS/MS-DOS  
(D)軟體：PatentIn Release #1.0,  
Version #1.25

(vi)目前申請資料：

(A)申請案號：  
(B)申請日：1994年10月13日  
(C)分類：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

448230

A7  
B7

五、發明說明 ( 49 )

(viii) 代理人資料：

- (A) 姓名 : Horn, Margaret A.
- (B) 註冊號碼 : 33,401
- (C) 參考 / 檔案號碼 : GC235-2

(ix) 通訊資料

- (A) 電話 : (415) 741-7536
- (B) 傳真 : (415) 742-7217

(2) SEQ ID NO:1之資料

(i) 序列特性：

- (A) 長度 : 19 鹼基對
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 股性 : 單股
- (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : DNA(基因體)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:1:

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA

(2) SEQ ID NO:2之資料

(i) 序列特性：

- (A) 長度 : 18 鹼基對
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 股性 : 單股
- (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : DNA(基因體)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:2:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 50 )

GCTGCTCTAG ACAATTTCG

## (2) SEQ ID NO:3之資料

## (i) 序列特性：

- (A) 長度 : 39 鹼基對  
 (B) 種類 : 核酸  
 (C) 股性 : 單股  
 (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : DNA (基因體)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:3:

GTATTAGGGG CGGACGGTTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT

## (2) SEQ ID NO:4之資料

## (i) 序列特性：

- (A) 長度 : 33 鹼基對  
 (B) 種類 : 核酸  
 (C) 股性 : 單股  
 (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : DNA (基因體)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:4:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG

## (2) SEQ ID NO:5之資料

## (i) 序列特性：

- (A) 長度 : 22 鹼基對  
 (B) 種類 : 核酸  
 (C) 股性 : 單股

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

覽

訂

象

五、發明說明 ( 51 )

Ⓓ 拓撲學 : 線形  
(ii) 分子種類 : DNA (基因體)  
(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:5:  
CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG

(2) SEQ ID NO:6之資料

(i) 序列特性 :

Ⓐ 長度 : 1497 鹼基對  
Ⓑ 種類 : 核酸  
Ⓒ 股性 : 單股  
Ⓓ 拓撲學 : 線形  
(ii) 分子種類 : DNA (基因體)  
(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:6:

```
GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG      60
TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA      120
GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC      180
AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA      240
GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGCGGG AAAGTGCAAA      300
AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAT CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT      360
```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(52)

TGAAAAAAGA	CCCGAGCGTC	GCTTACGTTG	AAGAAGATCA	CGTAGCACAT	GCGTACGCGC	420
AGTCCGTGCC	TTACGGCGTA	TCACAAATTA	AAGCCCCTGC	TCTGCACTCT	CAAGGCTACA	480
CTGGATCAA	TGTTAAAGTA	GCGGTTATCG	ACAGCGGTAT	CGATTCTTCT	CATCCTGATT	540
TAAAGGTAGC	AAGCGGAGCC	AGCATGGTTC	CTTCTGAAAC	AAATCCTTTC	CAAGACAACA	600
ACTCTCACGG	AACTCACGTT	GCCGGCACAG	TGCGGGCTCT	TAATAACTCA	ATCGGTGTAT	660
TAGGCGTTGC	GCCAAGCGCA	TCACCTTACG	CTGTAAAAGT	TCTCGGTGCT	GACGGTCCG	720
GCCAATACAG	CTGGATCATT	AACGGAATCG	AGTGGGCGAT	CGCAAACAAT	ATGGACGTTA	780
TTAACATGAG	CCTCGGCGGA	CCTTCTGGTT	CTGCTGCTTT	AAAAGCGGCA	GTTGATAAAG	840
CCGTTGCATC	CGGCGTCGTA	GTCGTTGCGG	CAGCCCGTAA	CGAAGGCACT	TCCGGCAGCT	900
CAAGCACAGT	GGGCTACCCT	GGTAAATACC	CTTCTGTCT	TGCAGTAGGC	GCTGTTGACA	960
GCAGCAACCA	AAGAGCATCT	TTCTCAAGCG	TAGGACCTGA	GCTTGATGTC	ATGGCACCTG	1020
GCGTATCTAT	CCAAAGCACG	CTTCCTGGAA	ACAAATACGG	GCGGTACAAC	GGTACGTCOA	1080
TGGCATCTCC	GCACGTTGCC	GGAGCGGCTG	CTTTGATTCT	TTCTAAGCAC	CCGAACTGGA	1140
CAAACACTCA	AGTCCGCAGC	AGTTTAGAAA	ACACCACTAC	AAAACCTGGT	GATTCTTTGT	1200
ACTATGGAAA	AGGCTGATC	AACGTACAAG	CGGCAGCTCA	GTA AACATA	AAAAACCGGC	1260
CTTGSCCCCG	CCGTTTTTTT	ATTATTTTTT	TTCTCCGCA	TGTTCAATCC	GCTCCATAAT	1320
CGACGGATGG	CTCCCTCTGA	AAATTTTAAC	GAGAAACGGC	GGGTTGACCC	GGCTCAGTCC	1380
CGTAACGGCC	AACTCCTGAA	ACGTCTCAAT	CGCCGCTTCC	CGGTTTCCGG	TCAGCTCAAT	1440
GCCATAACGG	TCGGCGGCGT	TTCCTGATA	CCGGGAGACG	GCATTCGTAA	TCGGATC	1497

(2) SEQ ID NO:7之資料

(i) 序列特性:

- (A) 長度 : 275 胺基酸
- (B) 種類 : 胺基酸
- (C) 股性 : 單股
- (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : 蛋白質

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:7:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

440230

A7  
B7

五、發明說明 ( 53 )

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu  
1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp  
20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala  
35 40 45

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His  
50 55 60

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

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu  
85 90 95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu  
100 105 110

Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly  
115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala  
130 135 140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly  
145 150 155 160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala  
165 170 175

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val  
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr  
195 200 205

Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser  
210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn  
225 230 235 240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys  
245 250 255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala  
260 265 270

Ala Ala Gln  
275

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂  
頁

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

### 五、發明說明 ( 54 )

(2) SEQ ID NO:8之資料

(i) 序列特性：

- (A) 長度 : 275 胺基酸
- (B) 種類 : 胺基酸
- (C) 股性 : 單股
- (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : 蛋白質

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:8:

```

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1          5          10
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
20        25
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
35        40        45
Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His
50        55        60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65        70        75
Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
85        90        95
Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
100       105       110
Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115       120       125
Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
130       135       140

```

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(55)

Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala  
 165 170 175  
 Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala  
 180 185 190  
 Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr  
 195 200 205  
 Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr  
 210 215 220  
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr  
 225 230 235 240  
 Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr  
 245 250 255  
 Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala  
 260 265 270  
 Ala Ala Gln  
 275

## (2) SEQ ID NO:9之資料

## (i) 序列特性：

- (A) 長度 : 274 胺基酸  
 (B) 種類 : 胺基酸  
 (C) 股性 : 單股  
 (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : 蛋白質

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:9

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

訂

訂

## 五、發明說明 ( 56 )

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly  
 50 55 60  
 Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn  
 85 90 95  
 Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp  
 100 105 110  
 Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala  
 115 120 125  
 Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg  
 130 135 140  
 Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val  
 165 170 175  
 Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly  
 180 185 190  
 Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro  
 210 215 220  
 His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu  
 245 250 255  
 Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala  
 260 265 270  
 Ala Gln

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 57 )

(2) SEQ ID NO:10之資料

(i) 序列特性：

(A) 長度 : 269 胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(C) 股性 : 單股

(D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : 蛋白質

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:10:

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60  
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

頁

44823

A7  
B7

五、發明說明 ( 58 )

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser  
145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile  
180 185 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
195 200 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
260 265

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(59)

## (2) SEQ ID NO:11之資料

## (i) 序列特性：

- (A) 長度 : 1140 鹼基對  
 (B) 種類 : 核酸  
 (C) 股性 : 單股  
 (D) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : DNA(基因體)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:11:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCCGA AGCACCCGAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60  
 AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120  
 GAGCAGGAAG CTGTCACTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCCGCATT 180  
 CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240  
 TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300  
 TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGAATTAGC 360  
 CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420  
 GTCCTCGATA CAGGTATTTT CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480  
 GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540  
 ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC 600  
 GCTGTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATGC CCAAGGATTG 660  
 GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720  
 AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780  
 GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840  
 GCAGTCGGAG CTAAGTACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900  
 CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC 960  
 AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020  
 CAAAAGAACC CATCTGGTTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080  
 AGCTTAGGAA GCACGAACTT STATGGAAGC GGAAGTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACCG 1140

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

頁

44820

A7  
B7

### 五、發明說明 ( 60 )

(2) SEQ ID NO:12之資料

(i) 序列特性：

- Ⓐ 長度 : 1140 鹼基對
- Ⓑ 種類 : 核酸
- Ⓒ 股性 : 單股
- Ⓓ 拓撲學 : 線形

(ii) 分子種類 : DNA (基因體)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:12:

```

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATGTGCGCA AGCACC GCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTGCGCCATT 180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTCTC 300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC 360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420
GTCCTCGATA CAGGTATTTT CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540
ATTGCTGCTT TAGACAATC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC 600
GCTGTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTCA GGCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840
GCAGTCGGAG CTA CTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACGTC CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC 960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020
CAAAGAACC CATCTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GSTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(61)

(2) SEQ ID NO:13之資料

(i)序列特性:

- (A)長度 : 30鹼基對
- (B)種類 : 核酸
- (C)股性 : 單股
- (D)拓撲學 : 線形

(ii)分子種類 : DNA(基因體)

(xi)序列說明 : SEQ ID NO:13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT

(2) SEQ ID NO:14之資料

(i)序列特性:

- (A)長度 : 31鹼基對
- (B)種類 : 核酸
- (C)股性 : 單股
- (D)拓撲學 : 線形

(ii)分子種類 : DNA(基因體)

(xi)序列說明 : SEQ ID NO:14:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T

(2) SEQ ID NO:15之資料

(i)序列特性:

- (A)長度 : 33鹼基對
- (B)種類 : 核酸
- (C)股性 : 單股
- (D)拓撲學 : 線形

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

特

訂

448230

A7  
B7

五、發明說明 ( 62 )

(ii) 分子種類 : DNA (基因體)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO:15:

GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

頁

四、中文發明摘要(發明之名稱：

枯草桿菌蛋白酶之變異體 )

本發明揭示新穎之羰基水解酶變異體，其係衍生自天然生成或重組之非人類羰基水解酶之DNA序列。大體而言，該變異體羰基水解酶之製備係經由活體外修飾編碼天然生成或重組之羰基水解酶之前驅體DNA序列，以於前驅體羰基水解酶之胺基酸序列中產生數個胺基酸殘基之取代作用。該等變異體羰基水解酶具有與前驅體水解酶不同之性質，如經改變之蛋白質水解活性、經改變之安定性等。該等經取代之胺基酸殘基對應於解澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)枯草桿菌蛋白酶之位置+76與一或

英文發明摘要(發明之名稱：

"SUBTILISIN VARIANTS" )

Novel carbonyl hydrolase variants derived from the DNA sequences of naturally-occurring or recombinant non-human carbonyl hydrolases are disclosed. The variant carbonyl hydrolases, in general, are obtained by *in vitro* modification of a precursor DNA sequence encoding the naturally-occurring or recombinant carbonyl hydrolase to generate the substitution of a plurality of amino acid residues in the amino acid sequence of a precursor carbonyl hydrolase. Such variant carbonyl hydrolases have properties which are different from those of the precursor hydrolase, such as altered proteolytic activity, altered stability, etc. The substituted amino acid residues correspond to positions +76 in combination with one or more of the following residues +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 and/or +274 in *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

表

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱: )

多個 +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105,  
+109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197,  
+204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260,  
+265及 / 或 +274之殘基之組合。

英文發明摘要 (發明之名稱: )

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

訂  
水

44823

六、申請專利範圍  
公告本

修正  
90. 5. 11  
補充

- 1 一種枯草桿菌蛋白酶變異體，其具有衍生自前驅體枯草桿菌蛋白酶但不見於自然界之胺基酸序列，該序列必要含有複數個在相當於解澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 枯草桿菌蛋白酶之下列位置之胺基酸殘基以不同胺基酸取代：76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/126, 76/103/104/135, 76/103/104/197, 76/103/104/222, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/126/265, 27/76/104/123/274, 27/76/104/109/123/274, 27/76/104/123/218/274, 27/76/104/123, 27/76/104/107/123, 27/76/104/109/123, 27/76/104/109/123/218/274, 27/76/104/123/197, 27/76/104/123/204, 27/76/104/123/206, 27/76/104/123/216, 27/76/104/123/218, 27/76/104/123/260, 27/76/104/123/195/197, 27/76/104/123/195/218, 27/76/104/123/197/218, 27/76/104/123/204/218, 27/76/104/123/206/218, 27/76/104/123/218/260,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 六、申請專利範圍

27/76/104/123/195/197/218, 76/103/104/217,  
76/103/104/156, 76/103/104/166, 76/103/104/105,  
76/101/103/104, 76/103/104/128, 76/103/104/210,  
76/103/104/107, 76/103/104/204, 76/217,  
76/103/104/156/166及 76/103/104/128。

- 2 根據申請專利範圍第 1 項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其中該取代作用之組合係在相當於 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/128, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/197, 76/103/104/105, 76/103/104/135, 76/103/104/126, 76/103/104/107, 76/103/104/210, 76/103/104/126/265及 / 或 76/103/104/222 位置進行者。
- 3 根據申請專利範圍第 2 項之枯草桿菌蛋白酶變異體，係選自 76/99, 76/104, 76/99/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/101/103/104, 76/99/101/103/104及 76/101/104。
- 4 根據申請專利範圍第 2 項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

4482

A8  
B8  
C8  
D8

### 六、申請專利範圍

中該枯草桿菌蛋白酶變異體包含： N76D/S99D；  
 N76D/S101R； N76D/S103A； N76D/V104I； N76D/I107V；  
 N76D/N123S； N76D/S99D/S101R； N76D/S99D/S103A；  
 N76D/S99D/V104I； N76D/S101R/S103A；  
 N76D/S101R/V104I； N76D/S103A/V104I；  
 N76D/V104I/I107V； N76D/V104Y/I107V；  
 N76D/V104I/N123S； N76D/I107V/N123S；  
 N76D/S99D/S101R/S103A； N76D/S99D/S101R/V104I；  
 N76D/S99D/S103A/V104I； N76D/S101R/S103A/V104I；  
 N76D/S103A/V104I/N123S； N76D/V104I/I107V/N123S；  
 N76D/S99D/S101R/S103A/V104I；  
 N76D/S99D/S103A/V104I/N123S；  
 N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S；  
 N76D/S103A/V104I/S128G； N76D/S103A/V104I/T260P；  
 N76D/S103A/V104I/S265N； N76D/S103A/V104I/D197E；  
 N76D/S103A/V104I/S105A； N76D/S103A/V104I/L135I；  
 N76D/S103A/V104I/L126F； N76D/S103A/V104T/L107T；  
 N76D/S103A/V104I/P210I；  
 N76D/S103A/V104I/L126F/S265N及  
 N76D/S103A/V104I/M222A。

5. 根據申請專利範圍第4項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其中該枯草桿菌蛋白酶變異體包含 N76D/S99D，  
 N76D/V104I， N76D/S99D/V104I， N76D/S103A/V104I，  
 N76D/V104I/I107V， N76D/V104Y/I107V，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

專  
訂

## 六、申請專利範圍

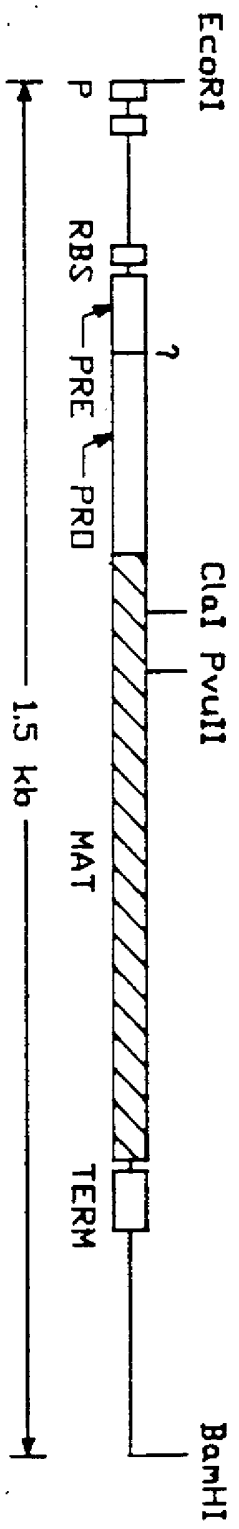
N76D/S101R/S103A/V104I,

N76D/S99D/S101R/S103A/V104I及 N76D/S101R/V104I。

6. 根據申請專利範圍第2項之枯草桿菌蛋白酶變異體，係衍生自芽孢桿菌屬(Bacillus)枯草桿菌蛋白酶。
7. 根據申請專利範圍第6項之枯草桿菌蛋白酶變異體，係衍生自遲緩芽孢桿菌(Bacillus lentus)枯草桿菌蛋白酶。
8. 一種DNA，其可編碼根據申請專利範圍第1項之枯草桿菌蛋白酶變異體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



⑤  
 1 GGTCTACTAAATATTATTCCATACTACTATACAATTAATACACAGAATAATCTGTCTATTGGTTATTCTGCAATGAAAAAAGGAGGATAAAGA GTG  
 RBS -107  
 Met

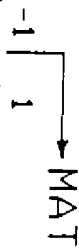
-100  
 Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser  
 99 AGA GGC AAA AAA GTA TGG ATC AGT TTG CTG TTT GCT TTA GCG TTA ATC TTT ACG ATG GCG TTC GGC AGC ACA TCC

-80  
 Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Asn Glv Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Thr Met  
 174 TCT GCC CAG GCG GCA GGG AAA TCA AAC GGG GAA AAG AAA TAT ATT GTC GGG TTT AAA CAG ACA ATG AGC ACG ATG

-50  
 Ser Ala Ala Lys Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala  
 249 AGC GCC GCT AAG AAG AAA GAT GTC ATT TCT GAA AAA GGC GGG AAA GTG CAA AAG CAA TTC AAA TAT GTA GAC GCA

-30  
 Ala Ser Ala Thr Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp  
 324 GCT TCA GTC ACA TTA AAC GAA AAA GCT GTA AAA GAA TTG AAA AAA GAC CCG AGC GTC GCT TAC GTT GAA GAA GAT

圖 1 A



HIS Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln  
 399 CAC GTA GCA CAT GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCT TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA  
 20  
 Gly Tyr Thr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asn Leu Ivs Val  
 474 GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA  
 50  
 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Glv Thr His Val Ala  
 549 GCA AGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC  
 70  
 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lvs  
 624 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA  
 Asp Ala 100  
 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met  
 699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG  
 120  
 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lvs Ala Ala Val Asp Lvs Ala Val Ala  
 774 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA  
 130  
 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Gly Thr Thr 160  
 849 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT

44823

448230

170 Lvs Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Giv Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Giv Pro  
924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

200 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gln Asn Lvs Tyr Giv Ala Tyr Asn Giv  
999 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC AGC CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT

220 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Asl Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lvs His Pro Asn Trp Thr Asn Thr  
1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

250 Gln Gln Val Arg Ser Ser Leu Gln Asn Thr Thr Thr Lvs Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Giv Lvs Giv Leu Ile Asn  
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTG TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC

270 Val Gln Ala Ala Ala Gln DC  
1224 GTA CAA GCG GCA GCT CAG TAA AACATAAAAAACCGGCCCTTGCCCGGGTTTTTATTATTCTTCTCCGCAATGTTCAATCCGCTCC

TERM

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTAACCAGGAACGGGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAACTCTGAACGTTCTCAATCGCCG  
1416 CTTCCTCCGGTTCCGGTCAAGTCAATGCCATAACGGTGGGGGGTTTCTTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC



下列枯草桿菌蛋白酶之比較：

解澱粉芽孢桿菌

枯草桿菌

地衣芽孢桿菌

遲緩芽孢桿菌

01  
 A Q S V P P Y G V S S Q I I K K A P P A L L H S S Q G Y Y T G S N V K V V A V I D S G I D S S H P  
 A Q S V P P Y G I S S Q I I K K A P P A L L H S S Q G Y Y T G S N V K V V A V I D S G I D S S H P  
 A Q S V P P Y G I S S Q I I K K A P P A L L H S S Q G Y Y T G S N V K V V A V I D S G I D S S H P  
 A Q S V P P W G I S S R V V Q A P P A A H H N R G G L T G S S V K V V A V I D S G I D S S H P

41  
 D L K V V A G G G A S S M V V P S S E T N P F Q D D N S S H G T H V A A G T V A A L L N N S I G  
 D L N V V R G G G A S S F V V P S S E T N P F Q D D N S S H G T H V A A G T V A A L L N N S I G  
 D L N V V R G G G A S S F V V P S S E T N P F Q D D N S S H G T H V A A G T V A A L L N N S I G  
 D L N I R R G G G A S S F V V P S S E T N P F Q D D N S S H G T H V A A G T V A A L L N N S I G

81  
 V L G V V A P S A S L Y A V K V L L G A A D G S S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M H D  
 V L G V V A P S A S L Y A V K V L L G A A D G S S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M H D  
 V L G V V A P S A S L Y A V K V L L G A A D G S S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M H D  
 V L G V V A P S A S L Y A V K V L L G A A D G S S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M H D

121  
 V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S S G I V V V A A A A A G N E G T S S G  
 V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S S G I V V V A A A A A G N E G T S S G  
 V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S S G I V V V A A A A A G N E G T S S G  
 V A N L S L G G S P S S A A T L E Q A A V D N S A A S S R G V V V A A A A A G N S S G A G S

448236

161 170 180 190  
 S S S T V G Y P P G K Y P S V I A V G A V D S S S N O R A S F S S V G P P E L D D V M A  
 S T S T V G Y P P A K Y P S T I A V G A V D S S S N O R A S F S S V G P P E L D D V M A  
 S T S T I G Y P P A R Y A N A M A V V G A V D S S S N O R A S F S S V G P P E L D D V M A  
 \* \* \* \* I S S Y P A R Y A N A M A V V G A V D S S S N O R A S F S S V G P P E L D D V M A

201 210 220 230  
 P G V S I Q S T L P P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P P N  
 P G V S I Q S T L P P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P P N  
 P G A G V Y S T Y P P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P P N  
 P G V N V Q S T Y P P G S T Y A S L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P P N

241 250 260 270  
 W T N T Q V R S S L E S N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q  
 W T N A Q V R R S L E S N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q  
 L S A S Q V R R S L E S N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q  
 W S N V Q I R R N H L K N T A T Y L L G S S T N L Y G S G L V N A E A A A T R

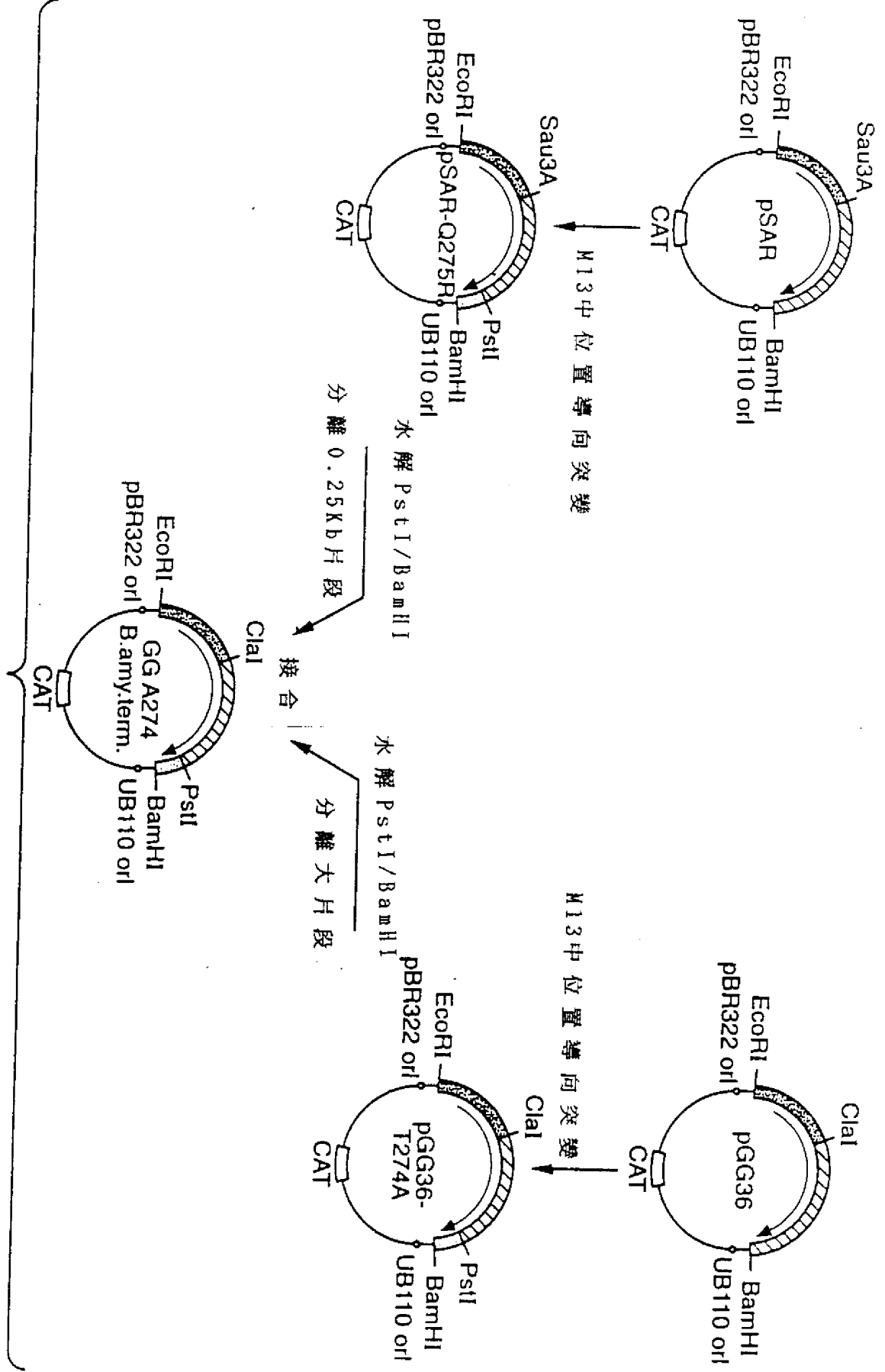


圖 4

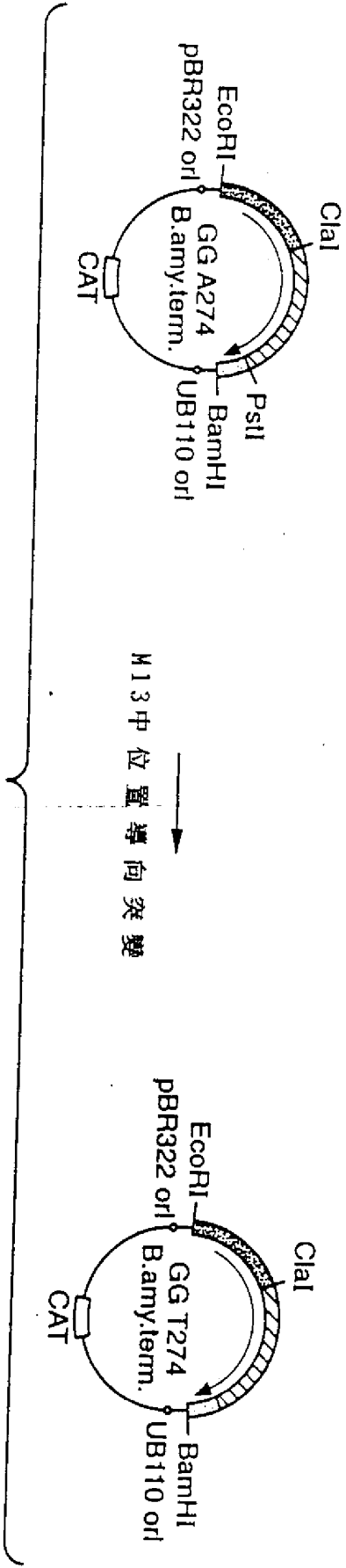


圖 5

448236

10 30 50  
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTCTCGCAAGCACCGCACTACTCATTCTGTTGCTTTT  
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

70 90 110  
AGTTCATCGCATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAGAAAAATATTTAATTGCGCTTAAAT  
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

130 150 170  
GAGCAGGAAGCTGTCTAGTGTGTTGTAGAACCAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCCGCATT  
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

190 210 230  
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCTCTGTT  
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

250 270 290  
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGGCGCTTGAACCTCGATCCAGCGATTCT  
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

310 330 350  
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC  
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

370 390 410  
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATACCCTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAGTTGCT  
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla

430 450 470  
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT  
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

490 510 530  
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCAGCATGTGGCCGGGAGC  
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

550 570 590  
ATTGCTGCTTTAAACAATTCCGATTGGCGTCTTGGCGTAGCCCGAGCCGGAACTATAC  
IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

610 630 650  
GCTGTAAAGTATTAGGGCGAGCGGTTTCAGGTTCCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG  
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu

670 690 710  
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA  
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

730 750 770  
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGGACTTCTAGAGGCGTCTTGTGTAGCG  
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

790 810 830  
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG  
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

850 870 890  
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAACAACAACCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG  
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

圖 6 A

448230

910 930 950  
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACCGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC  
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

970 990 1010  
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTAAA  
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

1030 1050 1070  
CAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG  
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

1090 1110 1130  
AGCTTAGGAAGCAGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC  
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg

4482

10 30 50  
 ATGAAGAAACCCGTTGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT  
 MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

70 90 110  
 AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT  
 SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

130 150 170  
 GACCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTGCGCCATT  
 GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

190 210 230  
 CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCTCTGTT  
 LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

250 270 290  
 TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACCTCGATCCAGCGATTCT  
 LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

310 330 350  
 TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCCGAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC  
 TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

370 390 410  
 CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT  
 ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla

430 450 470  
 GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTTGGTGGCCGCTAGCTTT  
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

490 510 530  
 GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG  
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

550 570 590  
 ATTGCTGCTTTAGACAACCTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCCCGGAGCCGGAACTATAC  
 IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

610 630 650  
 GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG  
 AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

670 690 710  
 GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCCAGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA  
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

730 750 770  
 AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGGACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCG  
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

790 810 830  
 GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCCAACC GAATG  
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

850 870 890  
 GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTTCACAGTATGGCCGAGGG  
 AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

4482

910 930 950  
CTTGACATTGTCCACCAGGTGTAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC  
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

970 990 1010  
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTCCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA  
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

1030 1050 1070  
CAAAGAACCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG  
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThi

1090 1110 1130  
AGCTTAGGAAGCAGCACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACAGC  
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg

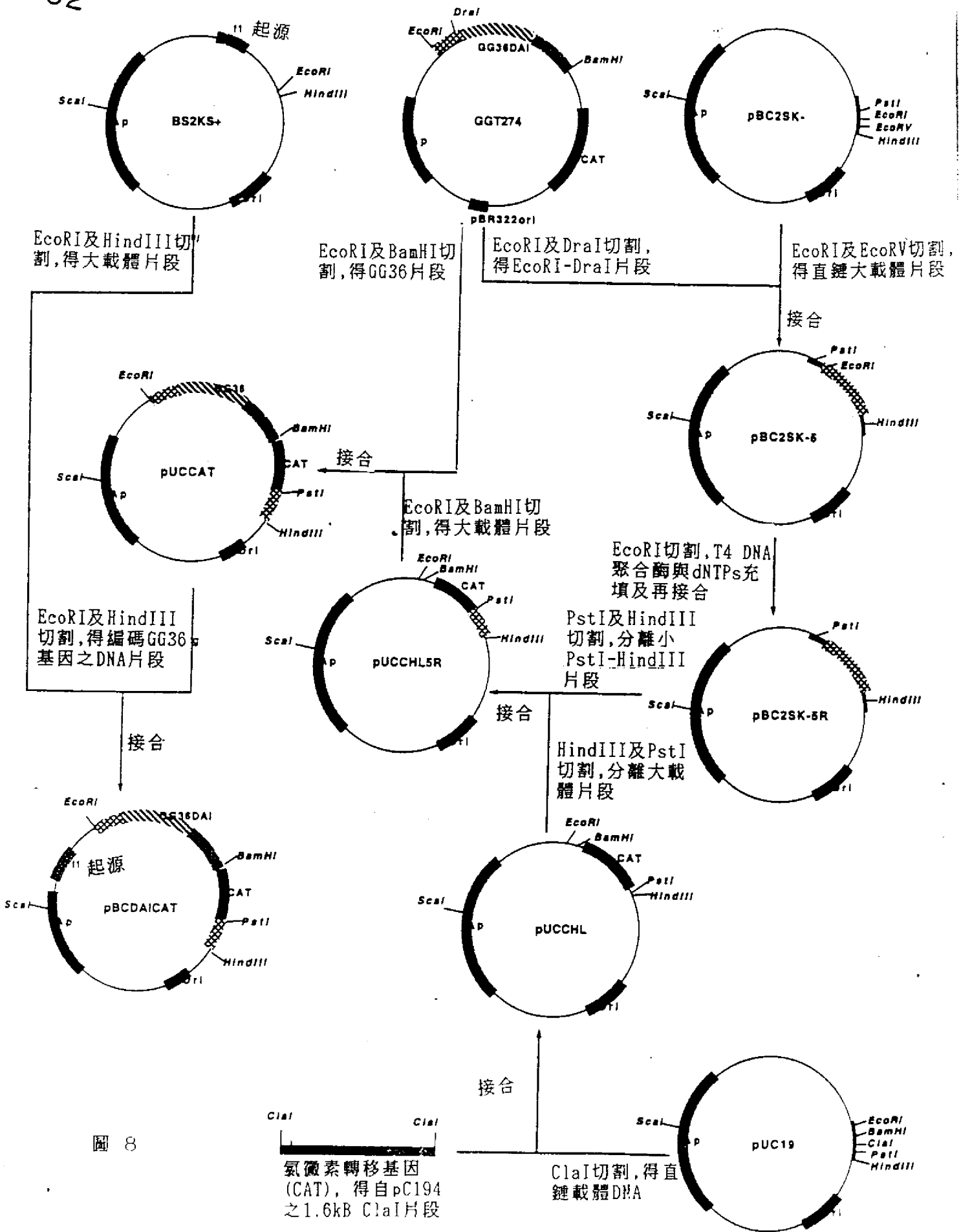


圖 8

氯黴素轉移基因 (CAT), 得自 pC194 之 1.6kb *ClaI* 片段

*ClaI* 切割, 得直鏈載體 DNA

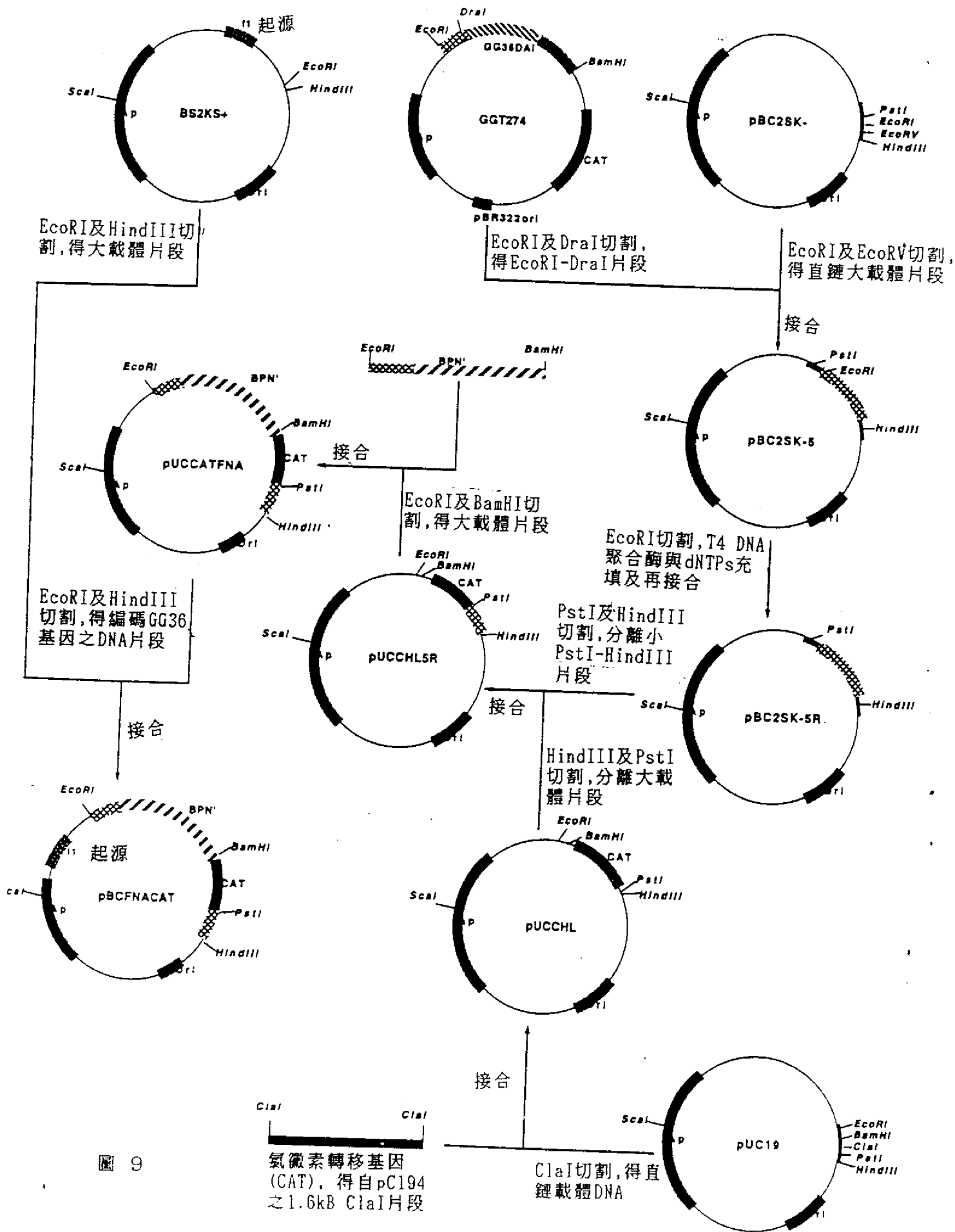


圖 9

AA823  
44823

蛋白酶於液態清潔劑調配物中安定性比較

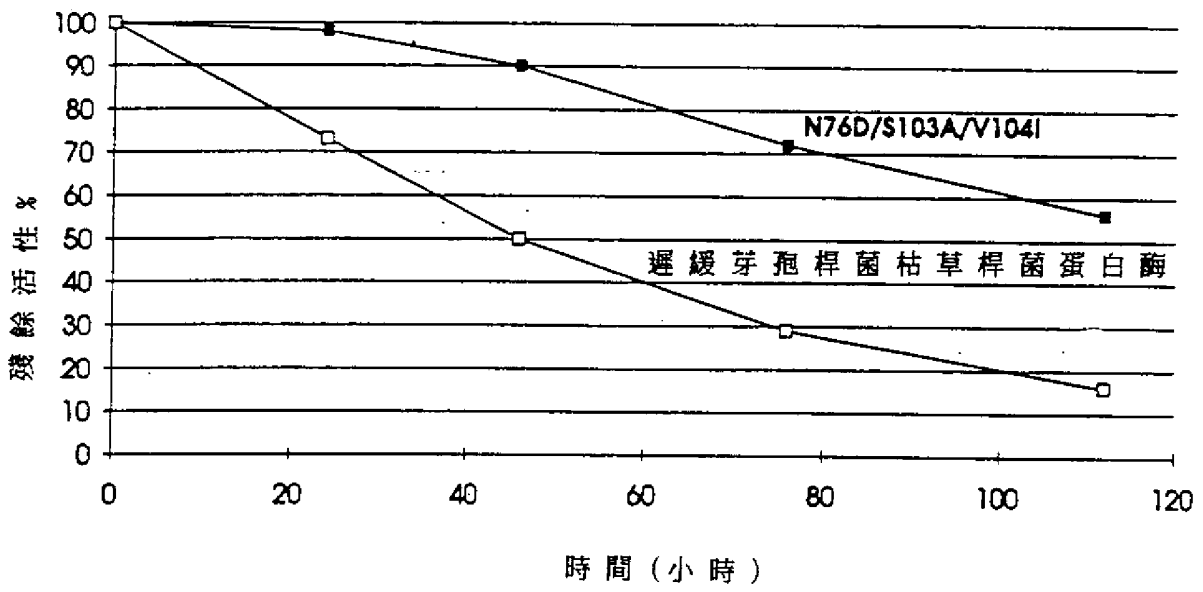


圖 10

## 五、發明說明 ( )

+218	S
+222	A, Q, S, C, I, K
+260	P, A, S, N, G
+265	N, A, G, S
+274	A, S

此外，本發明包括含有該等變異體胺基水解酶 DNA 序列之表現載體，及經該載體轉形可製備該變異體之宿主細胞。本發明亦有關於含本發明胺基水解酶變異體之清潔劑組合物。

圖式概述

- 圖 1 A - C 顯示解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之 DNA 及胺基酸序列，及該基因之部份切割圖譜 (Seq. ID No. 6)。
- 圖 2 顯示解澱粉芽孢桿菌 (BPN') 及遲緩芽孢桿菌 (野生型) 之枯草桿菌蛋白酶間之保留胺基酸殘基。
- 圖 3A 及 B 顯示四種枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列。最上方一行為解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 (有時亦稱為枯草桿菌蛋白酶 BPN') 之胺基酸序列 (Seq. ID No. 7)。第二行為枯草桿菌之枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列 (Seq. ID No. 8)。第三行為地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*) 之枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列 (Seq. ID No. 9)。第四行為遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶 (PCT W089/06276 號中亦稱為枯草桿菌蛋白酶 309) 之胺基酸序列 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( )

Seq. ID No. 10)。\* 符號表示與枯草桿菌蛋白酶 BPN' 相較缺少特定之胺基酸殘基。

圖 4 顯示質體 GGA274 之構築圖。

圖 5 顯示 GGT274 之構築，其為本案所用特定表現質體之中間體。

圖 6A 及 B 顯示遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之 DNA 及胺基酸序列 (Seq. ID No. 11)。該成熟之枯草桿菌蛋白酶蛋白質係由以對應於 Ala 之 GCG 密碼子 (334-336) 為首之密碼子所編碼。

圖 7A 及 B 顯示本發明較佳具體實施例

(N76D/S103A/V104I) 之 DNA 及胺基酸序列 (Seq. ID No. 12)。該圖中之 DNA 序列業經已知方法修飾，而可於 76 位置編碼天冬胺酸、103 位置編碼丙胺酸及 104 位置編碼異白胺酸。該成熟之枯草桿菌蛋白酶變異體蛋白質係由以對應於 Ala 之 GCG 密碼子 (334-336) 為首之密碼子所編碼。

圖 8 顯示載體 pBCDAICAT 之構築圖譜。

圖 9 顯示載體 pUCCATFNA 之構築圖譜。

圖 10 顯示較佳之變異體酵素與野生型酵素於液態清潔劑組合物中之安定性。

發明詳細說明

業經發現，遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶 +76 位置之胺基酸殘基經活體外突變可產生具有較前驅體枯草桿菌蛋白酶改變之安定性 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

44823

六、申請專利範圍  
公告本

修正  
90. 5. 11  
補充

- 1 一種枯草桿菌蛋白酶變異體，其具有衍生自前驅體枯草桿菌蛋白酶但不見於自然界之胺基酸序列，該序列必要含有複數個在相當於解澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 枯草桿菌蛋白酶之下列位置之胺基酸殘基以不同胺基酸取代：76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/126, 76/103/104/135, 76/103/104/197, 76/103/104/222, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/126/265, 27/76/104/123/274, 27/76/104/109/123/274, 27/76/104/123/218/274, 27/76/104/123, 27/76/104/107/123, 27/76/104/109/123, 27/76/104/109/123/218/274, 27/76/104/123/197, 27/76/104/123/204, 27/76/104/123/206, 27/76/104/123/216, 27/76/104/123/218, 27/76/104/123/260, 27/76/104/123/195/197, 27/76/104/123/195/218, 27/76/104/123/197/218, 27/76/104/123/204/218, 27/76/104/123/206/218, 27/76/104/123/218/260,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂