

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/70 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580037778.9

[43] 公开日 2007 年 10 月 10 日

[11] 公开号 CN 101052722A

[22] 申请日 2005.9.8

[21] 申请号 200580037778.9

[30] 优先权

[32] 2004.9.17 [33] EP [31] 04022201.0

[86] 国际申请 PCT/EP2005/054450 2005.9.8

[87] 国际公布 WO2006/029985 英 2006.3.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.30

[71] 申请人 贝林格尔·英格海姆奥地利有限公司

地址 奥地利维也纳

[72] 发明人 莱因加德·格拉贝尔

艾琳·普法芬泽勒

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

权利要求书 3 页 说明书 36 页 序列表 19 页
附图 11 页

[54] 发明名称

用于无抗生素 ColE1 质粒增殖的宿主 - 载体系统

[57] 摘要

宿主 - 载体系统, 利用 ColE1 - 型质粒的基于 RNA - 拷贝数控制机制用于调节标志物基因的表达, 容许进行质粒的无抗生素筛选并且可以用于产生质粒 DNA 和重组蛋白。

1. 一种非天然存在的细菌细胞，包含
 - i)编码表达可被调节的蛋白的 DNA 序列，并且所述的 DNA 序列可操作地连接至下述序列，
 - ii)DNA 序列，编码模拟 RNA II 序列或者其部分的 RNA 序列，所述的 RNA 序列互补于可从带有 ColE1 复制起点的质粒转录的 RNA I 序列。
2. 权利要求 1 的细菌细胞，包含整合到其基因组中的所述的 DNA 序列 i)和 ii)。
3. 权利要求 1 或 2 的细菌细胞，其中所述的 DNA 序列 i)对所述的细胞而言是外源的 DNA 序列。
4. 权利要求 3 的细菌细胞，其中所述的外源的 DNA 序列 i)编码对所述的细胞而言是致死的或者有毒的蛋白。
5. 权利要求 4 的细菌细胞，其中所述的外源的 DNA 序列 i)在可诱导的启动子控制下。
6. 权利要求 4 的细菌细胞，其中所述的外源的 DNA 序列 i)编码蛋白，所述的蛋白本身对于所述的细胞是致死的或者有毒的或者通过产生有毒的物质。
7. 权利要求 4 的细菌细胞，其中所述的外源的 DNA 序列 i)编码对所述的细菌细胞致死的或者有毒的阻抑蛋白，通过阻抑对所述的细胞的生长必需的基因的转录。
8. 权利要求 7 的细菌细胞，其被改造成使所述的必需基因可操作地连接到启动子，该启动子包含被所述的阻抑蛋白识别并且特异地结合的 DNA 序列。
9. 权利要求 8 的细菌细胞，其中连接至所述的必需基因的所述的启动子是可诱导的。
10. 权利要求 9 的细菌细胞，其中所述的可诱导的启动子是可诱导的，独立于权利要求 5 的可诱导的启动子。
11. 权利要求 1 的细菌细胞，其中所述的 DNA 序列 ii)插入到所述的 DNA 序列 i)的核糖体结合位点以及起始密码子之间。

12. 权利要求 1 的细菌细胞, 其中连接所述的 DNA 序列 i) 以及所述的 DNA 序列 ii) 以使其编码融合蛋白。

13. 权利要求 1 的细菌细胞, 其中所述的 DNA 序列 i) 以及所述的 DNA 序列 ii) 翻译地偶联。

14. 权利要求 1~13 中任一项的细菌细胞, 其具有复制带有 ColE1 复制起点的质粒的能力。

15. 权利要求 14 的细菌细胞, 其为大肠杆菌细胞。

16. 宿主-载体系统, 包括

a) 带有 ColE1 复制起点的质粒;

b) 其中所述的质粒 a) 能够被复制的细菌宿主细胞, 包含

i) 编码表达可被调节的蛋白的 DNA 序列, 并且所述的 DNA 序列可操作地连接至下述序列,

ii) DNA 序列, 编码模拟 RNA II 序列或者其部分的 RNA 序列, 所述的 RNA 序列互补于可从质粒 a) 转录的 RNA I 序列;

其中在 ii) 中定义的所述的 RNA 序列, 在不存在质粒 a) 的情形下, 容许所述的蛋白的表达以及

其中, 当所述的质粒 a) 存在于所述的宿主细胞中的时候, 从质粒转录的 RNA I 分子与在 ii) 中定义的所述的 RNA 序列杂交, 从而所述的蛋白的表达被抑制。

17. 权利要求 16 的宿主-载体系统, 其中所述的细菌宿主细胞 b) 是在权利要求 2~13 以及 15 中任一项定义的细菌细胞。

18. 权利要求 16 或者 17 的宿主-载体系统, 其中所述的外源的 DNA 序列 i) 编码对所述的细菌细胞而言致死的或者有毒的蛋白, 并且其中在 ii) 中定义的所述的 RNA 序列在缺失质粒 a) 的情形下, 容许所述的致死的或者有毒的蛋白的表达以使所述的宿主细胞的生长被全部或者部分地抑制, 并且其中, 当所述的质粒 a) 存在于所述的宿主细胞中, 从质粒转录的 RNA I 分子与在 ii) 中定义的所述的 RNA 序列杂交, 从而所述的致死的或者有毒的蛋白的表达被抑制从而带有质粒的细胞的完全或者部分生长抑制被取消。

19. 权利要求 16 的宿主-载体系统, 其中所述的质粒 a) 另外地包含感兴趣的基因。

20. 一种产生质粒 DNA 的方法, 包括下述步骤

i) 利用具有 ColE1 复制起点并且包含感兴趣基因的质粒的转化权利要求 4 的细菌宿主细胞群, 所述的感兴趣的基因在所述的细菌宿主细胞中不从所述的质粒表达,

ii) 将所述的细菌宿主细胞群在所述的致死的或者有毒的蛋白在细胞中可以表达的条件下生长, 从而所述的蛋白的表达全部地或者部分地抑制无质粒-细胞的生长, 从而携带质粒的细胞的生长超过无质粒的细胞,

iii) 富集携带质粒细胞, 并且

iv) 分离并纯化质粒 DNA。

21. 一种制备感兴趣的蛋白的方法, 包括下述步骤

i) 利用具有 ColE1 复制起点并且包含编码感兴趣蛋白的 DNA 序列的质粒转化权利要求 4 的细菌宿主细胞群, 所述的 DNA 序列在原核启动子的控制下能使所述的蛋白在所述的细菌宿主细胞中表达;

ii) 将所述的细菌宿主细胞群在所述的致死的或者有毒的蛋白在细胞中可以表达的条件下生长, 从而所述的蛋白的表达全部地或者部分地抑制无质粒-细胞的生长, 从而携带质粒的细胞的生长超过无质粒的细胞,

iii) 富集感兴趣的蛋白, 并且

iv) 分离并且纯化该蛋白。

用于无抗生素 ColE1 质粒增殖的宿主-载体系统

本发明涉及质粒增殖领域，尤其是质粒 DNA 以及重组蛋白的产生。

利用质粒 DNA 作为基因转移工具已经广泛用于基因治疗领域。

在基因治疗应用中，将携带治疗性兴趣基因的质粒导入到患者中，靶细胞中该基因的短暂表达导致期望的治疗效果。

携带感兴趣的治疗基因的重组质粒可以通过培养细菌得到。为了筛选细菌转化株并且为了保证质粒在细菌宿主细胞中的保持，通常地，将抗生素抗性基因包括在质粒骨架中。质粒的筛选通过将细胞在包含各自抗生素的培养基中生长而实现，其中只有携带质粒的细胞能够生长。

利用抗生素抗性基因进行筛选质粒以用于基因治疗具有以下缺点：

由于在基因治疗中，完整的质粒被递送，抗生素抗性基因导入到治疗对象中。尽管这些基因被原核启动子所启动并且因此在哺乳动物细胞以及组织中没有活性，存在将递送的基因整合到细胞基因组中的可能性并且因此可能，如果在哺乳动物启动子附近，可能被转录并且表达。

携带抗生素抗性基因的质粒第二个缺点是可能被带有残留的抗生素最终的产物污染。考虑到可能的免疫致敏性，这是一个问题，尤其是利用 β -内酰胺抗生素的情形下。

为了避免这些风险，在禁止将抗生素抗性基因用于制备治疗性质粒方面以及开发代替性的筛选方法方面已经进行了不懈的努力。

在尝试实现无抗生素筛选方面，已经使用了能够补偿宿主营养缺陷型的质粒。但是，该方法以及所有相关方法的主要的缺点在于需要在质粒插入另外的基因(例如 Hägg 等，2004)。

另外一种方法是称为“阻抑蛋白滴定”的思想(Wiliams 等，1998)。根据该思想，包含 *kan* 基因(卡那霉素抗性基因)修饰的大肠杆菌宿主株在 *lac* 操纵子/启动子控制下。在缺失诱导剂(IPTG 或者异乳糖)的情形下，该株不能在包含卡那霉素的培养基中生长。用包含 *lac* 操纵子的高拷贝数目的质粒转化导致 *kan* 表达，通过从操纵子滴定 *lacI*。在加入卡那霉素之后，只有包含

高质粒拷贝数的细胞能够生存。该思想的主要缺点再次地在于使用抗生素不可缺少。

本发明的目的在于提供一种不用抗生素的新颖的质粒筛选体系。

为了解决本发明的问题，已经开发了通过使用带有 ColE1 复制起点的质粒的复制机制(在下文中，带有 ColE1 复制起点的质粒称为“ColE1-型质粒”)。

大量天然存在的质粒以及许多最常用的克隆工具是 ColE1-型质粒。这些质粒复制其 DNA，利用涉及合成两种 RNA 分子的常规的机制，这些分子一方面相互作用并且另一方面与模板质粒 DNA 相互作用(Helinski, 1996; Kues 和 Stahl, 1989)。

代表性的 ColE1-型质粒是天然存在的 ColE1 质粒 pMB1、p15A、pJHCMW1，以及常用的以及商业提供的克隆工具如 pBR322 以及相关的载体，pUC 质粒、pET 质粒以及 pBluescript 载体(例如 Bhagwat 和 Person, 1981; Balbas 等, 1988; Bolivar, 1979; Vieira 和 Messing, 1982)。

对于所有这些质粒，复制的 ColE1 启动以及复制的调节已经进行了广泛的描述(例如: Tomizawa, 1981, 1984, 1986, 1989, 1990; Chan 等, 1985; Eguchi 等, 1991a; Cesareni 等, 1991)。ColE1 区包含针对参与复制的调节的两种 RNAs 的两种启动子。从 ColE1-型质粒的复制起始自预引物 RNA II(复制起点上游 555 bp)的转录,通过宿主的 RNA 聚合酶。在延伸的过程中，RNA II 折叠成特定的发夹结构，并且约 550 个核苷酸的聚合之后，开始与模板 DNA 形成杂合体。随后，RNA II 预引物被 RNaseH 裂解以形成具有游离的 3' OH 末端的活性引物，其可以被 DNA 聚合酶 I 接近(Lin-Chao 和 Cohen, 1991; Merlin 和 Polisky, 1995)。

在 ColE1-型起始链的相对侧，RNA I，108 个核苷酸的反义 RNA，互补于 RNA II 的 5'端，也被转录。RNA I 的转录起始自复制起点上游的 445 bp 处，直至约 RNA II 转录开始的地方。在 RNA/DNA 杂合体形成之前通过结合至延伸的 RNA II 分子，RNA I 抑制引物的形成以及由此的复制。

两种 RNAs 之间的相互作用是一个逐步过程，其中 RNA I 和 RNA II 形成数种茎环结构。它们初始通过它们互补环之间的碱基配对以形成所谓的“相吻复合物”而相互作用。随后，RNA I 沿着 RNA II 杂交，并且形成稳定

的双链体。相吻复合物的形成对复制的抑制至关重要。由于其是限速步骤，其已经进行了深入的研究(Gregorian 和 Crothers, 1995)。

除了 RNA I/RNA II 相互作用, ColE1 的 rom/rop 的转录也促进质粒拷贝数目的控制, 通过增加在 RNA II 和 RNA I 之间的复合物形成速率。为了增加拷贝数目, 在一些 pBR322 衍生物中, 编码 rom/rop 的基因已经被删除, 例如在 pUC19 上。

本发明第一方面涉及一种非天然存在的细菌细胞, 包含,

i) 编码表达可被调节的蛋白的 DNA 序列, 并且所述的 DNA 序列可操作地连接至下述序列,

ii) DNA 序列, 编码模拟 RNA II 序列或者其部分的 RNA 序列, 所述的 RNA 序列互补于可从带有 ColE1 复制起点的质粒转录的 RNA I 序列。

在其他的方面, 本发明涉及一种宿主-载体系统, 包括带有 ColE1 复制起点的质粒以及其中所述的质粒能够被复制的细菌宿主细胞, 其中所述的宿主-载体系统包括

a) 带有 ColE1 复制起点的质粒;

b) 细菌宿主细胞, 其中所述的质粒能够被复制, 包含

i) 编码表达可被调节的蛋白的 DNA 序列, 并且所述的 DNA 序列可操作地连接至下述序列,

ii) DNA 序列, 编码模拟 RNA II 序列或者其部分的 RNA 序列, 所述的 RNA 序列互补于可从质粒 a) 转录的 RNA I 序列;

其中在 ii) 中定义的所述的 RNA 序列, 在不存在质粒 a) 的情形下, 容许所述的蛋白的表达以及

其中, 当所述的质粒 a) 存在于所述的宿主细胞 b) 中的时候, 从质粒转录的 RNA I 分子与在 ii) 中定义的所述的 RNA 序列杂交, 从而所述的蛋白的表达被抑制。

在优选的实施方案中, DNA 序列 i) 为外源的 DNA 序列。

在优选的实施方案中, 被所述的外源的 DNA i) 编码的蛋白对宿主细胞而言是有毒的或者致死的。

在进一步的方面, 本发明涉及宿主-载体系统, 包括带有 ColE1 复制起点的质粒以及其中所述的质粒能够被复制的细菌宿主细胞, 其中所述的宿主-载体系统包括

a)带有 ColE1 复制起点的质粒;

b)非天然存在的细菌宿主细胞包含, 整合到其基因组中的,

i)编码蛋白的外源的 DNA 序列, 所述的蛋白对所述的宿主细胞是致死的或者有毒的, 所述的 DNA 可操作地连接至下述序列,

ii)DNA 序列, 编码模拟 RNA II 序列或者其部分的 RNA 序列, 所述的 RNA 序列互补于可从质粒 a)转录的 RNA I 序列;

并且其中在所述的 ii)中定义的 RNA 序列在缺失质粒 a)的情形下, 容许所述的致死的或者有毒的蛋白的表达以使所述的宿主细胞的生长被全部或者部分地抑制,

并且其中, 当所述的质粒 a)存在于所述的宿主细胞中, 从质粒转录的 RNA I 分子与在 ii)中定义的所述的 RNA 序列杂交, 从而所述的致死的或者有毒的蛋白的表达被抑制, 从而带有质粒细胞的完全或者部分的生长抑制被取消。

本发明利用基于 ColE1-型质粒的 RNA-拷贝数目的控制机制, 用于调节存在于细菌宿主细胞中的一种或者多种基因的表达, 优选地插入在细菌基因组中, 并且充当筛选标志物。

在下文中, i)的 DNA 序列(或者从如此的 DNA 转录的 RNA 分别地)称为“标志物基因”(或者“标志物 RNA”, 分别地)。

如上所述, 在本发明的实施方案中, 标志物基因编码本身是致死的或者有毒的蛋白。在该实施方案中, 在本发明的上下文中, 术语“标志物基因”也包含其表达产生有毒作用的基因, 所述的有毒作用不是直接地由于表达产物, 而是基于其他的机制, 例如一旦表达标志物基因就产生有毒的物质。简单而言, 在下文中, 被标志物基因编码的蛋白称为“标志物蛋白”; 在标志物蛋白是致死的或者有毒的蛋白的情形下, 其称为“有毒的蛋白”。

在优选的实施方案中, 标志物蛋白本身不是致死的或者有毒的或者由于一旦其表达产生有毒的作用, 而是通过阻抑对所述的细菌细胞的生长必需的基因的转录。这些标志物蛋白, 或者其编码 DNA, 分别地称为“阻抑蛋白”或者“阻抑蛋白基因”, 并且对所述的细菌细胞的生长必需的基因称为“必需基因”。

在下文中, 模拟 RNA II 序列的 RNA 序列, 或者其部分, 称为“RNA II-样序列”。

在本发明的上下文中，"可操作地连接"指 DNA 序列 i) 以及 DNA 序列 ii) 以如下的方式相互放置以使被所述的 DNA 序列 i) 编码的标志物蛋白的表达被所述的 RNA 序列 ii) (RNA II-样序列) 调节。

本发明的原理，即，RNA I-介导的标志物基因下-调或者沉默，显示在图 1 中：

RNA II-样序列以及 Shine Dalgarno 序列存在于宿主的转录物上。从质粒转录的 RNA I 序列充当所述的 RNA II-样序列的反义 RNA 并且因此抑制标志物 mRNA 的翻译。

在标志物基因表达的诱导之后，在标志物基因编码有毒的蛋白的情形下，宿主只有在质粒存在的情形下才能够生存，因为质粒提供了 RNA I 序列，其与 RNA II-样序列互补并因此与标志物基因转录物杂交，从而防止有毒的蛋白的翻译。如上描述，系统的调节基于质粒的 RNA I 以及与其互补的确定长度的 RNA II-样序列之间的 RNA-RNA 相互作用，RNA II-样序列位于标志物基因序列(通常位于宿主的 mRNA 中)核糖体结合位点的上游或者下游。

RNA II-样序列的长度以及相对于核糖体结合位点以及相对于标志物基因的起始密码子的距离以及位置必须保证无质粒的宿主能够翻译 mRNA；意味着必须小心地确保 RNA II-样序列不干扰核糖体结合以及翻译。

同样地，插入的 RNA II-样序列必须进行适当的设计以及放置以使其保证互补序列之间的足够的 RNA-RNA 相互作用，从而当存在质粒的时候，从其转录的 RNA I 结合至宿主 mRNA，结合程度足以抑制标志物基因的翻译。标志物基因的抑制达到一定的程度以使提供优势生长，与无质粒从而也不存在 RNA I 的细胞相比。

因此，细菌宿主进行改造以使：在不存在 ColE1-型质粒的情形下，标志物 mRNA 翻译成标志物蛋白，并且在存在 ColE1-型质粒的情形下，蛋白的翻译被全部地或者部分地抑制。在所述的 mRNA 编码部分或者全部地抑制细胞生长的有毒的蛋白地情形下，包含该质粒地宿主将在毒性物质存在下生存或者生长超过无质粒的宿主。

对于本发明的目的，有毒的蛋白在其部分地或者全部地抑制细胞的生长的角度而言是有毒的，抑制至少至如下的程度：以使没有标志物基因的细胞具有相对优势的生长率。如果存在两个细胞群，一方面为具有标志物

基因的群并且，另外一方面，没有或者带有受抑制的标志物基因的群，以等摩尔的分布，没有或者带有受抑制的标志物基因的细胞群在少于 10 代以内将增加至占群的 99%。

在本发明的实施方案中，标志物基因的表达被另外的机制调节，例如通过诱导。由于在标志物基因编码有毒的蛋白的情形下，标志物基因在细胞增殖期间需要关闭，可诱导的启动子有利地用于转录控制，其只有在加入诱导剂的情形下才促进 mRNA 转录。实例为产生 T7-聚合酶的宿主中的 T7 启动子，因为是 T7-聚合酶在 IPTG 的控制下，或者乳糖-可诱导的 Lac-启动子或者阿拉伯糖-可诱导的启动子。

或者，所述的标志物基因编码本身不是有毒的蛋白，但是通过非直接机制的发挥作用，例如酶，其在加入底物之后，将底物修饰为有毒的物质。实例为源自 *Bacillus subtilis* 的 *SacB*。*sacB* 编码称为果聚糖蔗糖酶的蛋白。该蛋白将蔗糖转化为果聚糖，一种对细菌有毒的物质。

ColE1-型质粒的 RNA I 序列代表了贡献该系统的优势的必要的特征。它提供了携带质粒宿主的筛选标准，无需借助于质粒上的其他的筛选标志物，例如抗生素抗性基因。因此，本发明提供了一种用于 ColE1-型质粒的无抗生素筛选的革新系统。

在本发明的实施方案中，下述成分是有用的：

1. 宿主细胞

由于其复制依赖于宿主细胞器，ColE1-型质粒是具有窄宿主范围的质粒。复制局限于大肠杆菌以及相关的细菌如 *Salmonella* 以及 *Klebsiella* (Kues 和 Stahl, 1989)。因此，宿主唯一必须的性质在于其具有复制 ColE1 质粒的能力。合适的宿主为广泛使用的大肠杆菌株 K12 或者 B 株或者相关的商业提供的株，例如 JM108、TG1、DH5alpha、Nova Blue、XL1 Blue、HMS174 或者 LI21(评述参见 Casali, 2003)。

优选的宿主细胞的遗传特征是突变，可以改善质粒稳定性以及完整重组蛋白的质量或者回收。期望的遗传特性的实例为 *recA*(缺失同源重组)、*endA*(缺失核酸内切酶 I 活性，其改善质粒微制备的质量)或者 *ompT*(缺失外膜蛋白酶)，*hsdR*(废除一些序列的限制性但是甲基化除外)，*hsdS*(废除一些序列的限制性以及甲基化)。

在本发明的实验中，使用宿主株 HMS174(DE3)(Novagen)，其包含 DE3

噬菌体，带有在其基因组中的 IPTG 可诱导的 T7 聚合酶(Studier 和 Moffatt,1986)。合适宿主的另外一个实例为 HMS174(DE)pLysS，其另外地包含 pACYC184 质粒(Cm^R)，其带有可以降低非诱导状态下的 T7-启动子转录活性的 T7-溶菌酶的基因。

特别地，在致死的标志物蛋白的情形下，期望在没有诱导下避免其表达。

2. 用于改造宿主细胞的构建体

适合用于改造宿主细胞的构建体的原理显示在图 2 中：

所有的成分-两个同源区臂[H]，启动子+操纵子[P+O]，RNA I 标志物序列(RNA II-样序列)，具有转录终止子以及 Kan 盒(卡那霉素抗性盒包含 FRT，+/-FLP 重组酶识别标志物序列；或者，可以使用其他的常规筛选标志物)的标志物基因[基因](在实施例中，GFP 用于初始的实验中)，克隆到合适的载体的多克隆位点，例如 pBluescript KS+。用于基因组插入的线性片段利用限制酶切或者利用 PCR 扩增。

卡那霉素抗性盒能够利用例如从 pUC4K 载体(Invitrogen)得到。其可以通过两个不同的位点克隆到片段中，即标志物基因之前或者之后。为了避免在有意地开启之前非有意的标志物基因的成熟转录，该基因优选地插入在染色体基因的反向方向。

优选地，标志物构建体整合到细菌基因组中。这可以利用常规的方法实现，例如通过利用包含与染色体上中性位点同源的侧面序列的线性片段，例如与 attTN7-位点同源(Rogers 等, 1986; Waddel 和 Craig, 1988; Craig, 1989)或者与 recA 位点同源。片段转化到宿主中，例如包含质粒 pKD46 的大肠杆菌株 MG1655 或者 HMS174(Datsenko 盒 Wanner; 2000)。该质粒携带 λ Red 功能(γ , β , exo)，可以促进体内重组。或者，可以使用 DY378(Yu 等, 2000)，携带缺失的 λ 原噬菌体的大肠杆菌 K12 株。在 MG1655 或者 DY378 的情形下，包括表达片段的染色体位点能够导入到 HMS174(DE3)基因组中，通过利用 P1 噬菌体的转导。阳性克隆筛选抗生素抗性，例如在利用针对卡那霉素或者氯霉素的 Kan 盒的情形。抗性基因可以随后利用 FLP 重组酶功能去除，基于酵母 2 小质粒的位点特异性重组系统、FLP 重组酶及其重组靶位点 FRTs(Datsenko 和 Wanner, 2000)。

或者为了将构建体整合到宿主基因组中，其可以存在于噬菌体或者不同于 ColE1-型质粒的质粒上，并且从其不影响标志物基因(以及感兴趣的基因)的表达的角度讲其与本发明的系统相容。可以用于本发明实验的合适的质粒或者噬菌体的实例为 pACYC184(其为 miniplasmid p15A 的衍生物；参见 Chang 和 Cohen, 1978)，R1-miniplasmid(Diaz 和 Staudenbauer, 1982)，基于 F1 的质粒或者丝状噬菌体(Lin, 1984)或者质粒 pMMB67EH (Fürste 等, 1986)。

更具体地，合适的构建体的元件能够定义如下：

2.1. 同源臂

在本发明的初始实验中已经发现，在构建体的每一侧的 30bp 同源区对由 λ Red 系统介导的重组而言是足够的(Yu, 2000)。但是，由于利用更长的同源区得到更好的结果，臂优选地为 50–400bp。在实施例 1 中，使用 250 以及 350bp 同源区臂。

2.2. 启动子

如果外源的标志物基因产物本身对细胞有毒的或者致死的或者如果其为阻抑蛋白，其表达必须进行调节。启动子区域必须包含合适的操纵子序列(例如 Lac 操纵子)以控制基因的表达。

根据本发明的一些实施方案，使用 T7 启动子，tac 或者，trc 启动子，lac 或者 lacUV5 启动子，p_{BAD} 启动子(Guzman 等, 1995)，trp 启动子(被色氨酸抑制)，P_i 启动子(以及 c_i 阻抑蛋白)或者 gal 启动子。

当使用 lac 操纵子的时候，加入 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷，一种人造的 Lac 操纵子诱导剂)或者乳糖用来活化标志物基因。当使用可诱导的系统的时候，在不诱导的时候细菌能够生存，但是一旦加入诱导剂就死亡。

为了实现有毒的基因表达的紧密调节，优选地使用紧密调节的启动子如阿拉伯糖-可诱导的 P_{BAD} 启动子(Guzman 等, 1995)，尤其在标志物蛋白本身对细胞有毒的情形下。

另外一种控制标志物基因表达的方式是使用组成性启动子结合无-毒的基因(例如报告基因)或者只有在一定的条件下才有毒的基因，例如 *Bacillus subtilis* sacB 基因。当蔗糖存在的时候，SacB 才对大肠杆菌有毒的。

选择启动子以与下列因素相协调：标志物基因产物的作用以及需要的 RNAI 的下调或者沉默作用的效率。例如，对于包含无毒的或者较小毒性的标志物基因的构建体，需要更强的启动子。

2.3. RNA II-样序列

由于 RNAI 必须充当部分的或者完全的抑制剂，与 RNAI(10-555 nt)互补的 RNA II-样序列必须位于标志物基因的上游，以及位于所述的 RNA II-样序列上游、下游或者中的核糖体结合位点(Shine-Dalgarno 序列)。Shine-Dalgarno 序列(SD)指位于原核 mRNA 分子的翻译起始位点的上游的短的核苷酸片段，并且充当结合核糖体 RNA 并且因此将核糖体带到 mRNA 上的启动密码子处。当位于 RNA II-样序列的上游的时候，SD 序列，优选地由 7 个核苷酸组成(GAAGGAG)应该位于标志物基因 ATG 起始密码子上游约 4 至 15bp，例如 7bp 处。在核糖体结合位点位于与标志物基因互补的 RNAI 序列中的时候，该序列插入的方式应该使只有茎区域改变，环结构以及优选地整个二级结构应该保持不变以使反义 RNA 与 RNAI 相互作用并形成相吻复合物。

在 RNA II-样序列之前提供起始密码子的实施方案中，构建体得到融合的产物，包括标志物序列以及 RNA II-样序列。

在另外一个实施方案中，RNA II-样序列插入到核糖体结合位点以及起始密码子之间；该方法限于翻译容许的可能的最大缺口，例如 15 至 20bp (如果核糖体结合位点和起始密码子之间的距离增加，翻译效率下降)。

或者直接融合 RNA II-样序列以及标志物基因，RNA II-样序列可以翻译地偶联标志物基因。为了实现这种目标，例如，可以使用如此的构建体：起始自起始的 ATG，接着是 RNA II-样序列，进一步地为核糖体结合位点，代表在终止以及起始密码子之间重叠的序列，例如 TGATG，以及标志物序列。在这种情形下，只有当 RNA II-样序列已经翻译并且与标志物基因相分离的时候，标志物基因才翻译。这种设计的优点在于与标志物基因的蛋白融合不是必须的。该方法提供了分开的翻译的选择，这对一些标志物蛋白可能是有利的，例如在一些阻抑蛋白如 Tet 阻抑蛋白的情形下。

由于甚至是单个的 RNA I/RNA II 茎环形成相吻复合物(Eguchi 1991b; Gregorian, 1995)，必须确保至少形成单一环。在任何情形下，必须满足两个

必要条件,即,一方面,标志物 mRNA 的翻译而不管插入的环结构,以及另外一方面,在 RNA II-样序列的插入的环结构以及质粒上的互补的 RNA I 之间有效的 RNA-RNA 反义反应。

在 RNA I 以及包含 RNA II-样序列的标志物 mRNA 之间的相互作用具有抑制结合核糖体的目的,从而废止翻译。所述的 mRNA 在可诱导的启动子(例如 lac, 阿拉伯糖或者 T7 启动子)控制之下,并且在诱导(例如利用 IPTG、乳糖、阿拉伯糖)之后,所述的标志物基因的表达下调,只要从质粒复制起点产生足够的 RNA I。优选地,标志物基因编码致死的蛋白或者有毒的蛋白,以抑制细胞生长至少至一定的程度(如上定义);在这种情形下,表达导致细胞死亡或者下降的细胞生长(无质粒细胞),而下调提供了细胞-生长(携带质粒细胞)。

或者对于编码致死的或者有毒的蛋白的标志物基因,标志物基因可以编码任何蛋白,无论出于任何目的其表达在细菌细胞生长期间被调节。特别地,标志物基因可以为报告基因,如下描述(2.4.)。

在本发明的系统中, RNA I, 其通常地负责质粒复制的下调,充当“基因-沉默剂”,尽管复制的抑制下降了。因此,利用本发明的系统导致质粒复制的增加,这对细菌宿主细胞的生存是有利的。

2.4. 标志物基因

RNA I-介导的标志物基因的下调,其为本发明的关键特征,可以适用于出于任何目的表达需要调节的任何基因。

根据第一方面, RNA I-介导的下调可以用于对宿主是有条件地致死的标志物基因(例如评述参见 Davison,2002)。

本身有毒的并且适于用于本发明的标志物基因的实例是编码限制性核酸酶的基因(例如 CviAII, 源自 Chlorella 病毒 PBCV-1 的限制性核酸内切酶; Zhang 等, 1992), EcoRI (Torres 等, 2000), 编码与蛋白相互作用的毒素的基因, 例如链亲和素或者 Stv13 (截短的易溶的链亲和素变体), 如由 Szafransky 等, 1997; Kaplan 等, 1999; Sano 等, 1995 等描述, 其通过剥夺细胞生长必须的蛋白生物素而发挥作用); 编码破坏膜的蛋白的基因(Φ X174 的 E 基因蛋白 (Ronchel 等, 1998; Haidinger 等, 2002), *gef* (Jensen 等, 1993; Klemm 等, 1995), *relF* (Knudsen 等, 1995); 编码其他细菌毒素的基

因,例如源自诱捕 DNA 促旋酶的 F-质粒编码强效的细胞杀死蛋白的 *ccdb* 基因(Bernard 和 Couturier, 1992)或者源自 *Bacillus Subtilis* 的 *sacB* (Gay 等, 1983); 或者编码对细菌宿主有毒的真核毒素的基因(例如 FUS; Crozat 等, 1993)。当使用有毒的基因的时候,必须的是其表达能够被可诱导的启动子调节。没有诱导剂的时候,该启动子必须没有活性,但是一旦诱导提供表达,足以抑制细胞生长。

其他的对细菌有毒的并且可以用于本发明的基因实例由 Rawlings, 1999 中给出。

在一些实施方案中,标志物基因选自编码限制性核酸酶、链亲和素的基因或者具有间接有毒的作用的基因,例如如上描述的 *SacB*。

在优选的实施方案中,有毒的标志物蛋白本身不是致死的或者有毒的或者一旦其表达存在有毒的作用,而是通过阻抑对所述的细菌细胞生长必须的基因的转录而发挥作用的阻抑蛋白。

在本发明的该实施方案中,在质粒存在下的 RNA I-介导的下调影响阻抑蛋白。这意味着存在 RNA I 及其与阻抑蛋白 mRNA(RNA II-样序列)的相互作用导致抑制阻抑蛋白并且因此活化或者上调必需基因,作用在于细胞的生长只有在存在复制的质粒条件下才发生。在该实施方案中,必需基因的启动子通过提供结合的 DNA 序列(“操纵子”)而修饰,优选地天然的启动子被完全的、可诱导的启动子(包含操纵子序列)所替换,以使表达的阻抑蛋白蛋白,例如 Tet 阻抑蛋白,能够结合至操纵子,从而抑制必需基因的转录并且调节其表达,例如 *murA*(通过 Tet 阻抑蛋白的表达)。

操纵子为结合其特异性阻抑蛋白或者增强子的 DNA 序列,从而邻近的基因的转录被调节,例如位于 *lac* 启动子中的 *lac* 操纵子,具有序列 TGGAATTGTGAGCGGATAACAATT (SEQ ID NO: 53; Gilbert 和 Maxam, 1973)或者其衍生物(Bahl 等, 1977)。不应该存在于野生-型的宿主中的阻抑蛋白基因,改造到基因组中,该基因组在可诱导的启动子的控制下,例如 T7, *lac* 或者 *tac* 启动子。在正常的生长条件下,阻抑蛋白不表达。诱导之后,通过例如 IPTG,阻抑蛋白表达,结合到必需基因的启动子区中的人工导入的操纵子或者人工插入的启动子并且因此抑制各个必需基因的表达。只要在宿主中存在复制的 *ColE1* 质粒,就产生能够结合阻抑蛋白 mRNA 的 RNA I,从而阻抑蛋白 mRNA 被相应地改变。通过这种 RNA-RNA 相互作用,

阻抑蛋白的翻译被抑制(类似地对任何其他的有毒的标志物蛋白)。从而,产生必需基因产物并且细胞保持活力并且生长。

本质上,在该实施方案中,细菌宿主包括,除了 RNA II-样序列以外,在可诱导的启动子(其已经被改造到基因组中以修饰或者,优选地全部地替代必需基因的天然存在的启动子)控制下的其必需基因之一(作为天然存在于细菌基因组中)。控制必需基因的启动子区域还包含被所述的阻抑蛋白识别以及特异性地结合的 DNA 序列(操纵子)。该阻抑蛋白基因,其已经改造到细菌染色体中,也在不同于控制必需基因的启动子的可诱导的启动子的控制之下,因此这两种启动子是独立地可诱导的。

必须的细菌基因在文献中是公知的,例如 Gerdes 等, 2002 以及 2003, 以及 PEC (Profiling the *E. Coli*. Chromosome)数据库(<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.jsp>), 例如 Isoleucyl-tRNA 合酶(ileS), 细胞分裂蛋白如 ftsQ、ftsA、ftsZ、DNA 聚合酶 III α 亚基(dnaE)、murA、map、rps A (30s 核糖体蛋白 S1)、rps B (30s 核糖体蛋白 S2)、lyt B(全局调节子)等。

阻抑蛋白是结合至操纵子位于操纵子中的启动子的蛋白,从而下调位于所述的操纵子中的基因的转录。适合用于本发明的阻抑蛋白的实例为四环素阻抑蛋白(tet)蛋白 TetR, 其调节革兰(氏)阴性的细菌中的四环素抗性决定簇家族的转录,并结合至四环素(Beck, 等, 1982; Postle 等, 1984), 色氨酸阻抑蛋白(trp), 其结合至 trp 操纵子的操纵子, trp 操纵子包含色氨酸生物合成基因(Yanofski 等, 1987)。

可诱导的启动子的实例为启动子,其中在加入物质之后开始转录,因此能够被环境因素调节,例如 lac 启动子,其可通过 IPTG 诱导 (Jacob 和 Monod, 1961), 阿拉伯糖-启动子(pBAD)、可被阿拉伯糖诱导(Guzman 等, 1995), 以及铜-可诱导的启动子(Rouch 和 Brown, 1997)。

在本发明的实验中,选择 tet-阻抑蛋白(tetR)作为阻抑蛋白基因,充当“有毒的”标志物基因,一旦加入诱导剂 IPTG 就关闭必须的细菌基因。

为了执行阻抑蛋白基因方法,涉及了两种类型的盒并在本发明的实验中(实施例 4)插入到细菌染色体中。第一种构建体包括用来替换(或者修饰)基因组上特定的必需基因的启动子的盒。第二种类型的盒用作测试构建体,使用 GFP 作为必需基因的替代物以提供思想的证据。使用 GFP 测试构建体

的实验目的在于评价级联调节系统、启动子强度以及因此对系统中所有相互作用成分的调节。

因此,在另一个实施方案中,标志物基因是报告基因,例如编码 GFP(绿色荧光蛋白)、hSOD(人超氧化物歧化酶)、CAT(氯霉素乙酰转移酶)或者萤光素酶。

当需要有关宿主细胞中存在或者缺失 ColE1-型质粒或者质粒拷贝数的信息的时候报告基因可用于培养过程。当发酵过程需要对质粒拷贝数的控制进行优化的时候,这些信息特别有用。

报告基因也可以充当有毒的标志物基因的替代物,并且可以因此可以用于实验,该实验的目的在于提供构建体的如下功能:用于基因调节或者沉默以及确定其对有毒的标志物基因的作用。

为了评价设计用来改造细菌宿主以使有毒的标志物基因的表达能够被 ColE1-型质粒调节的构建体的功能,报告基因,绿色荧光蛋白“(GFP)用作本发明初始实验中的模型。由于其自发荧光(Tsien, 1998),被认为在初始实验中, GFP 适合用来分别地代替标志物基因,或者必需基因。

在一些本发明的实施方案中,标志物基因可以为内源性的宿主基因,其可以为任何意欲调节的感兴趣的基因。在这种情形下改造宿主细胞以使编码 RNA II-样序列的序列与相关的宿主基因可操作地连接,如 2.3 中所述。

3. ColE1-型质粒

在本发明中,所有的 ColE1-型质粒及其天然的 RNA I/RNA II 对,以及修饰的 RNA I 和/或 RNA II 序列,例如在 WO02/29067 中描述的那些,可以使用。

如上所述,代表性的可用的 ColE1-型质粒为天然存在的 ColE1 质粒 pMB1、p15A、pJHCMW1,以及常用的以及商业提供的克隆工具如 pBR322 以及相关的载体, pUC 质粒, pET 质粒以及 pBluescript 载体。

在质粒序列中不需要包括抗生素抗性基因。作为必须的元件,质粒基本上只包含 ColE1 复制起点以及携带感兴趣基因的基因表达盒。

质粒上的感兴趣的基因及其启动子取决于应用的类型;本发明不以任何方式限制于感兴趣的基因,例如治疗性基因。对于基因治疗应用,基因可以与真核启动子可操作地连接,例如 CMV 启动子。

本发明的应用:

本发明能够广泛地用于现代发酵中,包括用于质粒 DNA 制备以及用于制备重组蛋白二者。

已经描述了可以用于本发明的发酵 pDNA 的数种方法。质粒 DNA 制备的方法在施加到细胞上的控制水平以及影响发酵的多种因素方面不同:

对于实验室水平的 pDNA 制备,在摇瓶种培养携带质粒细胞是最简单的方法(O'Kennedy 等, 2003; Reinikainen 等, 1988; O'Kennedy 等, 2000; US 6,255,099)。

为了得到更高数量的质粒,细胞能够在称为“批发酵”的受控发酵桶中进行培养,其中在起始的时候提供所有的营养成分并且其中在培养的过程中不加入营养成分。这种类型的培养可以利用包含所谓的“复合物成分”的培养基作为碳以及氮源进行,如例如由 O'Kennedy 等, 2003, 以及 Lahijani 等, 1996, 以及在 WO 96/40905, US 5,487,986 核 WO 02/064752 中记载。或者,合成的培养基可以用于 pDNA 产生,例如特定用于 pDNA 产生的确定的培养基(Wang 等, 2001; WO 02/064752)。

本发明也可以用于大肠杆菌的补料分批发酵,其中一或者多种营养成分通过补料提供给培养物,通常地通过利用反馈控制算法通过补料营养成分以将过程参数控制在确定的设定点。在发酵过程中,反馈控制因此直接与细胞活性相关。可以用于发酵的反馈控制的控制参数包括 pH 值,在线测定的细胞密度或者溶解的氧张力(DOT)。通过补料速率用于将溶解的氧张力控制在确定的设定点的反馈算法记载在 WO99/61633 中。

另外,更复杂的算法利用 DOT 以及 pH 值二者作为用于反馈培养方法的控制参数(US 5,955,323; Chen 等, 1997)。

另外一种补料模式基于按照指数函数的补料培养基提供。补料速率基于期望的特定的生长速率 μ 进行控制。WO96/40905 以及 O'Kennedy 等, 2003 描述了用于质粒 DNA 制备的指数补料分批方法。Lahijani 等, 1996, 描述了联合指数补料以及温度可控制的质粒复制增加。

或者,本发明可以用于制备质粒 DNA 的方法,其中大肠杆菌细胞首先在预先培养基中生长并且随后在主培养物中发酵,主培养为补料分批方法包括分批阶段以及补料阶段。分批阶段的培养基以及在补料阶段加入的培

培养基是化学确定的，并且补料阶段的培养基包含生长-限制性底物并且补料加入的速率符合预定的指数函数，从而将特定的生长速率控制在预定值。

当标志物基因在可诱导的启动子的控制下的时候，在开始的时候和/或脉冲的方式可以将诱导剂加入到批中(在批以及在补料分批培养二者中)。在补料阶段，诱导剂可以脉冲的方式或者连续地加入。

在发酵过程结束的时候，将细胞富集并分离质粒 DNA 并且根据本领域公知的方法进行纯化，例如利用基于阴离子交换的以及凝胶渗透层析的方法，如在 US5,981,735 中记载，或者通过利用两个层析步骤，即，阴离子交换层析作为第一步骤并且反相层析作为第二步骤，如在 US6,197,553 中所描述。制备质粒 DNA 的另一个合适的方法记载在 WO03/051483 中，其利用两个不同的层析步骤，结合 monolithic 支持。

除了将本发明用于质粒制备以外，例如用于制备用于基因治疗应用的质粒，也可以用于重组蛋白制备。

关于重组蛋白制备，原则上，可以使用已经被证明可以用于表达大肠杆菌中感兴趣基因的任何方法，尤其是源自 ColE1 型质粒(参见评述，例如 Jonasson 等，2002; Balbas, 2001)。蛋白可以在细胞内(全部地或者部分地可溶或者作为包涵体)或者通过分泌(到细胞培养基或者壁膜间隙)的方式得到，从批发酵或者，优选地补料分批培养，利用复合的、合成的或者半合成的培养基。

在质粒 DNA 制备中，通常用于基因治疗的质粒 DNA，感兴趣的基因不在细菌宿主细胞中表达。考虑到其在哺乳动物优选地人中的应用，其中其必须最终地表达，感兴趣的基因通常与真核启动子可操作地连接。与此对应的是，对于在大肠杆菌中的重组蛋白的制备，感兴趣的基因的将在原核启动子的控制在宿主细胞中表达。

对于重组蛋白的制备，两种启动子，即控制标志物基因的启动子以及感兴趣基因的启动子，可以相同或者不同，只要不发生扰乱其中任何一种表达的干扰。

有利地，由于其活性在时间点以及转录水平上相互独立，启动子是不同地被调节。优选地，控制标志物基因地启动子在发酵过程开始的时候具有活性并且产生适度量的 mRNA，同时感兴趣基因的启动子是相当强的并且在发酵过程中的选择的时间点激活。如果对感兴趣的基因以及标志物基

因二者都使用可诱导的启动子，通常选择以使利用不同的诱导剂开启它们。或者，标志物基因可以在可诱导的控制之下并且感兴趣的基因在组成性启动子的控制之下，或者反之亦然。这对下述两种方法都适用：其中标志物基因构建体整合到细菌宿主基因组中，以及其中标志物基因构建体包含在质粒或者噬菌体中，如上描述。

关于启动子在发酵各阶段的诱导，针对质粒 DNA 制备的上述原理也适用。

本发明的巨大优势在于所有复制的质粒无抗生素抗性基因并且因此，除了用于基因治疗应用以外，适合用于其中缺失抗生素抗性基因是需要的或者期望的所有应用，例如用于产生将用于人体以及动物食物制备的重组酵母株或者用于产生重组植物。

附图简述：

图 1: RNA I-介导的标志物基因下调或者沉默的原理

图 2: 用于改造宿主细胞的构建体

图 3: 利用体内转录的构建体杂交实验的结果

图 4: 包含标志物基因和 RNA II-样序列的构建体

图 5: 存在 pBR322 的条件下的基因下调作用

图 6: 多种质粒的基因下调作用

图 7: 在发酵期间标志物基因的表达/抑制

图 8: 基于包括必需基因启动子替换的必需基因的构建体的原理

图 9: 用于阻抑作为必需基因替代物的 GFP 的测试构建体。

图 10: 利用插入到 HMS174(DE3)基因组中的测试构建体的摇瓶实验结果

在实施例 1 和 2 中，使用在表 1 中显示的寡核苷酸：

表 1:

SEQ ID NO	引物	长度	序列
1	T7 rbs@st-环 2+1	159 mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAACAAAAAA ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCCTCTAGTT CAGCTACCAACTGAAGGAGAGAATACATATGGCTA AAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTC TTGTTGAATTAGATGGT 3'
2	T7-atg-环 2-sbulge	161 mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCCTCTAGAAA TAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATAT GCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTGTTCCGATGGCT AAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATT CTTGTTGAATTAGATGGT 3'
3	T7Prom-sRNA I_ColEI-back	45mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGACAGTATTTGG TATCTGCGC 3'
4	asRNA I_ColEI- for	20mer	5' AACAAAAAAACCACCGCTAC 3'
5	T7Prom-RNA IIse_ColEI-back	45mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGCAAACAAAAA AACCACCGC 3'
6	RNA IIse_ColEI-for	20mer	5' ACAGTATTTGGTATCTGCGC 3'
7	oligo-T7prom-pl1a-back	23mer	5'GAAATTAATACGACTCACTATAG 3'
8	oligo-GFP-for	23mer	5'ACCATCTAATTCAACAAGAATTG 3'

SEQ ID NO: 1 和 2 的寡核苷酸包含与 T7 启动子和核糖体结合位点互补的 RNA-I 序列, 以及 GFP cDNA 的第一个 60 个核苷酸, 并且利用 SEQ ID NO: 7 和 8 的寡核苷酸进行扩增并且用于 T7 聚合酶介导的体外转录(参见实施例 1)。SEQ ID NO: 1 的寡核苷酸包含 RNA I 的环 1 和环 2 (相当于图 4 中的 III), SEQ ID NO: 2 的寡核苷酸包含 RNA I 的环 2 (相当于图 4 中的 II)。

SEQ ID NO: 3 和 4 的寡核苷酸用来从 ColE1 质粒扩增 RNA I (110 bp) 并掺入 T7 启动子用于体外转录。SEQ ID NO: 5 和 6 的寡核苷酸用来从 ColE1 质粒扩增 RNA II_{180nt} 并且掺入 T7 启动子用于体外转录。SEQ ID NO: 7 和 8 也用来产生用作阴性对照的 DNA(相当于图 4 中的 I), 利用 pet11aGFP 作为模板。阴性对照是带有 T7 启动子和核糖体结合位点的绿色荧光蛋白 mRNA。

实施例 1

利用体内转录的构建体的杂交实验

为了选择与 RNA I 互补的序列(RNA II-样序列)在 mRNA 分子中期望的长度以及位置, 从而通过杂交抑制其翻译, 进行体外反义实验。RNA I 与不同的合成的 RNAs 以及与 RNA II 的 RNA 杂交体进行凝胶移位分析。

为了这种目的, 包含 RNA II-样序列的人工设计的 GFP 构建体在体外转录并且与体外转录的 RNA I 进行孵育。在非变性 RNA-聚丙烯酰胺凝胶上检测杂交。

合成的 RNAs(RNA I 以及在其 5'端带有 RNA II 发夹结构的合成的构建体)通过体外转录(Ampliscribe, T7-Flash Transcription Kit; Epicentre)得到(图 2)。各自从 pBR322 ori 以及得自 Metabion 的寡核苷酸(寡核苷酸 SEQ ID NO: 1 和 2)得到的 110 bp 的 RNA I 和 RNA II 利用 PCR 扩增并且充当线性 DNA 模板用于体外转录。

为了证实 RNA I 和 RNA II-靶相互作用, 进行凝胶移位实验。由于它们看起来被阻滞了, 环-环复合物清楚地呈现。

在杂交之前, 将 RNAs 分开地加热。凝胶为 75 mm 厚的 5% (w/v)聚丙烯酰胺 (60: 1) 并且在用冰水冷却的小蛋白凝胶仪(Pharmacia)上运行。运行缓冲液为包含 5 mM MgCl₂ 的 1x Tris-borate (89 mM Tris (pH 8.3), 89 mM 硼酸)。条带用溴化乙锭染色并且利用 UV 透照灯观察。

当在转录物的开始部分带有及不带有 RNA II 序列的包括 RBS 和起始密码子的 60 nt 的 GFP mRNA 与 RNA I 孵育的时候, 得到显示在图 3 中的结果。

图 3 的凝胶 1 显示阳性(RNA II 108 nt, 相应于完整的 RNA I 序列以及阴性对照。如果在两种 RNAs 之间发生反应, (标记的) RNA I 条带显示更弱, 因为其被阻滞。

凝胶 1:

- 1 阴性对照 RNA
- 2 RNA I + 阴性对照 RNA
- 3 RNA II_{108nt}
- 4 RNA I + RNA II_{108nt} (孵育前加热(在 90°C 3 分钟))
- 5 RNA I + RNA II_{108nt}
- 6 RNA I (孵育前加热(在 90°C 3 分钟))
- 7 RNA I

在图 3 中的凝胶 2 上, 道 8、9 和 10, 只显示了 RNA I 带。当与带有一个 RNA II 环的转录物孵育的时候, 看见非常弱的反应, 而带有两个环的转录物给出强反应。

凝胶 2:

- 8 RNA I
- 9 RNA I (+RNA II 环 2)
- 10 RNA I (+RNA II 环 1 和 2)

环 2 GFP(道 9)显示了些微变弱的 RNA I 条带(与阴性对照相比), 而环 1+2GFP 道 10)显示了显著降低的 RNA I 带, 显示形成了相吻复合物。该数据表明 RNA-RNA 相互作用在只存在一个环的时候是有效的。

将在凝胶上显示形成相吻复合物-甚至弱的复合物的环构建体克隆到 pMMB67EH 和 pBluescriptII KS+中并且测试 GFP 表达。由于 RNA I 与包含两个发夹环的标志物相互作用更强, 该构建体被认为是对体内实验合适的候选物。

实施例 2

测试基因表达以及基因沉默的体内测定

在进行测试的构建体中,一个或者两个 RNA II 茎环克隆到表达载体中。转录物的二级结构以及适当的折叠通过计算机程序 RNAfold (Gene Quest, Vienna RNA folding procedure; 参见 Zuker, 1999)所证实。对于该实验,带有非-ColE1 起源的表达载体,例如 pMMB67EH (Fürste 等, 1986)被认为可以用来解决质粒中的 RNA I-靶相互作用并且判断 GFP 表达是否被邻近核糖体结合位点存在的其他的序列所阻碍。这被认为是很重要的,核糖体上或者核糖体附近的其他的序列以及二级结构通常引起下降或者甚至全部地抑制基因表达(Malmgren, 1996; Ringquist, 1993)。

基于利用非变性 RNA 凝胶(参见实施例 1)得到的结果,构建了 GFP 与 RNA II-样序列的两种融合体(图 4)。两种不同的 RNA II-样序列插入到 GFP 编码序列的上游,在 T7 启动子和 lac 操纵子的控制之下。

Gfp 基因从 pGFPmut3.1 利用引物 NheI-GFP-back 以及 BamHI-GFP-for 扩增得到(引物序列参见表 2)。T7/lacO 启动子-带有以及不带 RNA II 环/RBS 组合-基于引物 (HindIII-T7GFP-back) 以及用于扩增 gfp 的 BamHI-GFP-for 进行全合成,或者利用寡核苷酸进行合成(T7a13-oligo 和 T7L12ras -oligo),并且融合到通过 NheI 限制性位点处理的扩增的 gfp。利用 BamHI 和 HindIII 限制性处理将整个的片段克隆到 pMMB67EH (引物以及寡核苷酸参见表 2)。

表 2: 选择的构建体

SEQ ID NO:	引物/Oligo	序列
9	NheI-GFP-back	5' GAT GAT GCT AGC AAA GGA GAA GAA C 3'
10	BamHI-GFP-for	5' GAT GAT GGA TCC TTA TTT GTA TAG TTC 3'
11	T7a13-oligo	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC CTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAC ATA TGG GTA ACT GGC TTC AGC AGA GCG CAG ATA CCA TG 3'
12	Nhe-ATG-环 3-for	5' ATC ATC GCT AGC CAT GGT ATC TGC GCT CTG CTG 3'
13	T7L12ras -oligo	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC CAA CAA AAA AAC CAC CGC TAC CAG CGG TGG TTT GTT TGC CTC TAG TTC AGC TAC CAA CTG AAG GAG AGA ATA CAT ATG 3'
14	Nhe-ras12 for	5' ATC ATC GCT AGC CAT ATG TAT TCT CTC CTT C 3'
15	HindIII-T7GFP-back	5' GAT GAT AAG CTT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC CTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACA TAT GGC TAG CAA AGG AGA AG 3'
16	HindIII-T7-back	5'GAT GAT AAG CTT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
17	XhoI-T7term-for	5' GAT GAT CTC GAG CAA AAA ACC CCT CAA GAC C 3'
18	EcoRI-T7term-for	5' AGT AGT GAA TTC CAA AAA ACC CCT CAA GAC C 3'

构建体克隆到 pMMB67EH 载体以证实 GFP 表达, 尽管邻近核糖体结合位点存在其他的序列。二种构建体都产生 GFP, 但是表达显著低于不带发夹环的构建体。将两种构建体克隆到包含 Tn7 同源区以及卡那霉素抗性基因的载体 pBluescript 中, 起用于筛选具有将整个盒整合到染色体中能力

的宿主。如前所述，将 GFP 盒插入到细菌染色体上。

图 4: 显示克隆到 pMMB67EH 并且还插入到 HMS174(DE3)基因组中的构建体。盒分别为 I) HMS174(DE3)T7GFP = IS5, II) HMS174(DE3)T7al3GFP = IS11 以及 III) HMS174(DE3)T7l12rasGFP = IS13

由于当克隆到 pMMB67EH 中的时候，T7aL3GFP 和 T7l12rasGFP 显示 GFP 表达，这些表达盒-以及作为阴性对照的 T7GFP -插入到细菌染色体中用于检测其充当反义 RNA I 靶的能力。利用 BamHI 和 HindIII 限制性位点，将构建体克隆到载体 pBluescript KSII+ 中。Tn7 同源区从大肠杆菌 HMS174(DE3)菌落扩增得到，利用引物 NotI-Tn7/1-back 和 EcoRI-Tn7-for 针对同源区 1，以及引物 XhoI-Tn7/2-back 和 KpnI-Tn7-for 针对同源区 2 (引物序列参见表 3)。对于卡那霉素抗性盒，其用于筛选具有整合到染色体中的完整的盒的宿主，选取源自 pUC4K 的 EcoRI 片段。T7 终止子从表达载体 pET11a 扩增得到，利用引物 XhoI-T7term-for 以及 EcoRI-T7 term-for (表 2)。完整的质粒利用 NotI 和 KpnI 消化(对于盒)并且利用 Alw44I 用于消化质粒骨架。凝胶纯化的线性盒插入到携带 MG1655 的 Red Helper 质粒 pKD46 的细菌染色体上。携带插入片段的染色体部分转染到 HMS174(DE3)，利用 P1 转导。

表达盒的正确插入利用 PCR 证实(外引物(表 3)和内引物)。

表 3: 针对株 IS 5、IS 11 和 IS 13 的 Tn7 位点的引物

SEQ ID NO:	引物	序列
19	NotI-Tn7/1-back	5' GAT GAT GCG GCC GC G TTG CGA CGG TGG TAC G 3'
20	EcoRI-Tn7/1-for	5' GAT GAT GAA TTC TAT GTT TTT AAT CAA ACA TCC TG 3'
21	XhoI-Tn7/2-back	5' GAT GAT CTC GAG GCA TCC ATT TAT TAC TCA ACC 3'
22	KpnI-Tn7/2-for	5' GAT GAT GGT ACC TGA AGA AGT TCG CGC GCG 3'
23	TN7/1 extern	5' ACC GGC GCA GGG AAG G 3'
24	TN7/2 extern	5' TGG CGC TAA TTG ATG CCG 3'

由于选择了染色体插入位点 attTn7(deBoy 和 Craig, 2000)，后者位于

glmS 的转录终止子之中的基因 *glmS* 和 *phoS* 之间的非编码区。利用特定的 Tn7 引物, 只有该转录终止子被盒替换。(Yu 及其合作者证实 40 bp 的同源区足以将线性片段整合到染色体中(Yu 等, 2000))。由于随着同源区长度增加, 得到更好的结果, 其在一侧延长到 300 bp 并且在另外一侧延长到 240 bp。由于 HMS174(DE3)似乎不适于利用 Red Helper 质粒进行线性 DNA 的直接整合, MG1655 用于初始整合并且通过 P1 转导将重组染色体部分转染到 HMS174(DE3) 中。得到的株 HMS174(DE3)T7al3GFP = IS5, HMS174(DE3)T7GFP = IS11 和 HMS174(DE3)T7l12rasGFP = IS13 包含在 T7 启动子控制下的 GFP, 分别地带有或者不带有 RNA II 环结构。表达盒的正确插入利用 PCR 证实。得到的株指定为 I) IS5、II) IS11 和 III) IS13 并且在摇瓶实验中测试 GFP 表达以及 RNA I-介导的基因沉默效应。对于摇瓶实验, 过夜的培养物以 1: 100 稀释并且生长直至 OD₆₀₀ ~0.5。然后加入 IPTG 进行诱导。利用微量滴定板读数器 SPECTRAMax GeminiXS 以及软件, SOFTmax Pro (Molecular devices)测定荧光, 激发波长为 488 nm, 并且发射波长为 530 nm, 截止滤光片 515 nm。

当 pBR322 存在的时候, 有以及没有 IPTG 诱导下的 GFP 检测显示清楚的基因沉默作用(图 5)。IS13 显示更低的 GFP 表达, IS11 对 GFP 表达的抑制非常小, 而 IS11 显示更高的 GFP 表达以及显著的基因沉默作用, 提供证据表明我们的思想的确可行。

当在 *GFP*-基因的上游不存在 RNA II-样序列(IS5)的时候, 没有检测到基因沉默(图 6)。

IS5 利用不同的质粒转化, 包括 pET11a、pET3d、pMMB67EH 和 pBR322, 以检测在质粒以及基因组基因表达之间的非期望的相互作用(图 6)。已经发现只有当 GFP mRNA 包含 RNA II-样序列并且使用在基因组上不包含与盒同源的序列的 ColE1 质粒, 例如 T7 启动子或者 lac 操纵子, 才能够观察到确定的基因沉默效应。当使用通常用于基因治疗中的 pBR322 相关的质粒的时候, 在宿主和质粒之间没有扰乱反义反应的干扰。

图 5 显示了带有以及不带有 pBR322 的株 IS11 和 IS13 的比较。Rfu/OD 为相对于光密度的荧光单位。在诱导 1.5 小时后观察到 GFP 荧光的增加。

图 6 显示了利用包含 IS5 的多种质粒的摇瓶实验的结果。pBR322 以及相关的质粒(如用于基因治疗应用)显示在宿主和质粒之间无干扰。

实施例 3

在发酵期间的标志物基因的表达/抑制

在补料-分批发酵过程中分析存在以及不存在质粒 pBR322 的大肠杆菌株 IS11 和 IS5。表 4 总结了四批补料分批发酵的实验设计。各株在存在或者不存在 pBR322 下生长。

表 4: 补料分批发酵

实验	宿主株	pBR322
AS1	IS 11	-
AS2	IS 11	+
AS3	IS 5	-
AS4	IS 5	+

所有的四种培养都对在线的信号方面显示出来非常类似的趋势，如 CO₂、O₂、基本消耗或者产量，并且总 BDM 进程的变化也在非常小的范围之内，小于计算平均值±10%，如图 7a 和 7b 中所示。图 7a 显示了细菌干重 (BDM) 以及有或者无 pBR322 条件下的 IS11 的 GFP 表达。尽管对两种发酵而言总 BDM 相同，当 pBR322 存在的时候，GFP 浓度显著下降(50%)。GFP 测量的曲线进程强烈地表明 GFP 翻译被质粒的存在因此其复制所抑制，并且证实 RNA I 以及修饰的 GFP 的 mRNA 相互作用从而妨碍翻译的预期(图 7a)。为了排除 pBR322 对重组蛋白表达自身具有作用，利用 IS5 进行进一步的补料分批实验，再次存在或者不存在质粒增殖。如图 7b 中所示，在 GFP 表达或者细胞生长方面没有差异：无论 pBR322 在宿主中是否存在，不能检测到对 GFP 转录或者翻译的影响。在这些实验中，总体的 GFP 表达远高于使用株 IS11 的情形，这是由于天然 mRNA 的有效翻译。尽管蛋白表达被 IS11 中邻近核糖体结合位点的稳定的 RNA 环结构的存在而降低，当存在 pBR322 的时候，表达被抑制。因此，通过使用 GFP 作为有毒的标志物的替代物可以证实 ColE1 的复制调节系统可以用来抑制标志物基因的表达。

实施例 4

利用阻抑蛋白用于调节必需基因的表达

a)必需基因构建体的产生

测试的第一个必需基因为 *map*(Li 等, 2004, 该基因为蛋氨酸氨基肽酶, 其位于大肠杆菌染色体的 *min 4* 处, 距离 *rpsB-ts*f 操纵子 357 个碱基对以及距离 T44-RNA 基因 201bp。这两种基因分开转录并且启动子不相互重叠。这是很重要的一点, 因为必需基因的启动子被完全去除并且利用被对选择的阻抑蛋白特异的可诱导的启动子替换。Chang 等, 1989 记载了有条件地致死突变株, 其具有被 *lac* 启动子控制的 *map* 基因。利用 *map* 盒, 67bp 的染色体部分被包含 *map* 启动子替换(Chang 等, 1989)。为了解决从基因组的可能的转录物, 源自 *rrnB* 操纵子的两个强转录终止子 T1 和 T2(Brosius 等, 1981)加入到整合盒中。

测试的第二种基因为 *murA* (Brown 等, 1995), 其已经描述为必需的大肠杆菌基因。基因 *murA* 编码用于细菌细胞壁生物合成第一步骤的酶 UDP-N-乙酰基葡(萄)糖胺 enolpyruvyl 转移酶, 位于大肠杆菌染色体 69.3 min 处, 在其文章中, Herring 和 Blattner 比较了数种条件的致死琥珀突变体的死亡曲线(Herring and Blattner, 2004), 其中也包括那些 *map* 和 *murA* 突变体。但是所有的突变 *murA* 具有最强的杀菌作用, 在非许可的(non-permissive)培养基中显示最好以及最快的杀死速率。

图 8 显示基于包括必需基因启动子替换的必需基因的构建体原理。

用于基因组整合的构建体再次克隆到载体 pBluescript KSII+中。必需基因同源区, 每种 ~300 bp, 扩增自 MG1655 菌落, 利用引物对 SacI-map1-for/NotI-map1-back 以及 XhoI-map2-back / KpnI-map2-for 针对 *map* 同源区, 以及引物对 SacI-murA1-for/NotI-murA1-back 以及 XhoI-murA2-back/KpnI-murA2-for 针对 *murA* 同源区(引物序列参见表 5)。包含乳糖启动子和操纵子的片段(plac)从 pBluescriptKSII+扩增, 利用引物 BamHI-placO-back 和 NotI-placO-for。氯霉素乙酰转移酶(*cat*)的基因从 pLys (pACYC184) 扩增得到, 利用引物 HindIII-SalI-Cat-back 和 XhoI-Cat-for。*rrnBT12* 终止子从 pBAD 扩增得到, 利用引物 BamHI-T12-for 和 HindIII-T12-back。装配的载体 pBSKmap<plac-T12-Cat> 以及 pBSKmurA<plac-T12-Cat>利用 SacI 和 KpnI 消化, 并且将线性化的盒插入到 MG1655 基因组中, 如前所述。盒的正确整合利用 PCR 结合外引物(*map1* extern, *map2* extern, *murA1* extern, *murA2* extern; 表 5)以及内引物证实。

针对必需的以及测试基因构建体的引物显示在表 5 中。

表 5:

SEQ ID NO:	引物	序列
25	Not-map1-back	5' ATG ATG ATG GCG GCC GCA CCG ACG CTG ATG GAC AGA ATT AAT GG 3'
26	SacI-map1-for	5' GCT GCT GAG CTC CCA TCT TTG ATT ACG GTG AC 3'
27	XhoI- map2-back	5' ATG ATG CTC GAG CGC CAA ACG TGC CAC TG 3'
28	KpnI- map2-for	5' GCT GCT GGT ACC GAA GTG AAC ACC AGC CTT G 3'
29	map2 extern	5' TTC GGG TTC CAG TAA CGG G 3'
30	map1extern	5' TTT CGA GGT ATC GCC GTG G 3'
31	SacI-murA1- for	5' GCT GCT GAG CTC CAA AGC GCG CTA CCA GCG 3'
32	NotI-murA1-back	5' ATG ATG ATG GCG GCC GCT TAA CTG AGA ACA AAC TAA ATG G 3'
33	XhoI- murA2- back	5' ATG ATG CTC GAG GCT CAA AAG CCG TTC AGT TTG 3'
34	KpnI- murA2- for	5' GCT GCT GGT ACC TGC CAG CGC AAC TTT GCT C 3'
35	murA1 extern	5' GTA CAA CCG CCA GGT AGT G 3'
36	murA2 extern	5' GTC TGA TTT ATC AGC GAG GC 3'
37	HindIII-Sall-Cat-back ck	5' GCT GCT AAG CTT GTC GAC AGC CAC TGG AGC ACC TC 3'
38	XhoI-Cat-for	5' ATG ATG CTC GAG ACG GGG AGA GCC TGA GC 3'
39	BamHI-T12-for	5' ATG ATG GGA TCC AAA AGG CCA TCC GTC AGG 3'
40	HindIII-T12-back	5' GTC GTC AAG CTT ATA AAA CGA AAG GCT CAG TC 3'
41	BamHI-placO-back	5' GCT GCT GGA TCC GCG CCC AAT ACG CAA ACC 3'
42	NotI-placO-for	5' ATG ATG ATG GCG GCC GCT GTG AAA TTG TTA TCC GCT C 3'

如果同源区引物选择正确,只有在 IPTG 存在的条件下能够预期基因组整合后的菌落。在引物 NotI-map/murA-for 上没有提供核糖体结合位点

(RBS), 由于并不准备利用盒替换天然的 RBS 以尽可能地将基因的表达模式保持在正常的情形下。因此目标在于替换必需基因之前的任何启动子但是保持天然的 RBS 完整。

在转化之后, 无论是 *map* 还是 *murA* 突变体在 LB-CM 板上都没有生长, 但是它们在 LB-CM 板以及包含 0,1 mmol IPTG/L 的液体培养基上生长良好, 表明引物的选择是正确的并且 *plac* 以及终止子正确地发挥了作用。但是, 在进一步的培养中, *map* 突变体在板以及不含 IPTG 的液体培养基上显示了轻微的生长。由于 *murA* 突变体在非许可的培养基上不显示任何生长, *murA* 构建体选择作为筛选系统的基础。

b) 用于阻抑作为必需基因替代物的 GFP 测试构建体的产生

以 pBluescriptKSII+ 作为例证的构建体的原理显示在图 9 中。

质粒 pBSKTn7<pLtetOgfp-T7aL3tetR-Cat> 以数个连续的克隆步骤从作为起始载体的 pBSKTn7<T7aL3GFP> 以及包含单个片段的中间质粒构建得到 (引物序列参见表 5 和 6)。Tn7 同源区 1 从细菌模板扩增, 利用引物 SacI-Tn7/1-back 和 EcoRI-Tn7/1-for, Tn7 同源区 2 利用引物 XhoI-Tn7/2-back 和 KpnI-Tn7/2-for 进行扩增, *rrnBT12* 终止子利用引物 EcoRI-T12-back 和 HindIII-Sall-T12 for 进行扩增, 并且 *cat* 基因利用引物 HindIII-Sall-Cat-back 和 XhoI-Cat-for 进行扩增 (表 5)。四环素阻抑蛋白基因 (*tetR*) 从包含 Tn10 的四环素抗性株 IS1 (HMS174(DE3) *ilv500::Tn10*) 利用引物 NheI-tetR-back 和 BamHI-tetR-for 进行扩增。tet-可诱导的 pLtetO 启动子利用引物 (HindIII-PLtetO-NotI-RBS-GFP back) 以及用于扩增 *gfp* 的引物 EcoRI-GFP-进行全合成。对于基因组整合, 装配的载体 pBSKTn7<pLtetOgfp-T7aL3tetR-Cat> 再次利用 SacI 和 NotI 消化以释放需要的表达盒。

表 6: 用于测试构建体的另外的引物:

SEQ ID NO:	引物	序列
43	EcoRI-T12-back	5' GCT GCT GAA TTC ATA AAA CGA AAG GCT CAG TC 3'
44	HindIII-Sall-T12 for	5' GCT GCT AAG CTT GTC GAC AAA AGG CCA TCC GTC AGG 3'
45	EcoRI-Tn7/1-for	5' GAT GAT GAA TTC TAT GTT TTT AAT CAA ACA TCC TG 3'
46	SacI-Tn7/1-back:	5' GAT GAT GAG CTC GTT GCG ACG GTG GTA CG 3'
47	XhoI-Tn7/2-back	5' GAT GAT CTC GAG GCA TCC ATT TAT TAC TCA ACC 3'
48	KpnI-Tn7/2-for	5' GAT GAT GGT ACC TGA AGA AGT TCG CGC GCG 3'
49	NheI-tetR-back	5' GCT GCT GCT AGC ATG ATG TCT AGA TTA GAT AAA AG 3'
50	BamHI-tetR-for	5' GCT GCT GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG 3'
51	EcoRI GFP for	5' GTC GTC GAA TTC TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC 3'
52	HindIII-PLtetO-NotI -RBS-GFP back	5' GCT GCT AAG CTT TCC CTA TCA GTG ATA GAG ATT GAC ATC CCT ATC AGT GAT AGA GAT ACT GAG CAC ATC GCG GCC GCT TTA AGA AGG AGA TAT ACA TAT GCG TAA AGG AGA AGA AC 3'

c)利用插入到 HMS174(DE3)(=K12)基因组中测试构建体的摇瓶实验

带有以及不带有 pBR322 的 HMS174(DE3)Tn7: pLtetOgfpT7aL3tetRCat (HMS-GTC)过夜培养物以 1: 100 稀释在半合成的培养基中, 并且分成带有以及不带诱导剂 IPTG 的两个平行的摇瓶培养。在 37°C 振荡下将培养物生长。当摇瓶达到 OD_{600nm} 大于 0.7 的时候, 开始取样进行 gfp-ELISA。

进行带有 HMS-GTC 的摇瓶实验以测试合成的启动子 pLtetO 是否工作以及在其 N-端带有小的融合肽(环 3)的 tetR 在操纵子-结合中是否仍然有效。

诱导的培养基包含 0.1 mmol IPTG, 并且在 OD 0.5 的时候增加至 0.5 mmol IPTG。高量的 IPTG 是诱导瓶中生长抑制的原因(图 10)。IPTG 加入关闭了 *gfp* 基因的转录, 表明反应级联发挥作用良好。在诱导瓶中的低-以及不变的-基础 GFP 水平明显地由源自不带 IPTG 的过夜培养物中的残留的

GFP 引起。

HMS-GTC 摇瓶结果与同样的宿主以及包含 MG1655-GTC 的质粒 pBR322 的摇瓶实验进行比较。MG1655 缺少 DE3 前噬菌体以及由此的 T7-聚合酶并且因此充当阴性对照。

pBR322 的存在总是显示增加的 GFP 表达。在表 7 中，计算在摇瓶中的 ng GFP/OD 的平均比率(质粒/无质粒)，并且比较了包含染色体拷贝的盒以及不同诱导策略的两种宿主。

表 7:

宿主	诱导	平均比率[ng GFP/OD] (+质粒/-质粒)	结论
MG1655-GTC	无诱导	1.43	-
HMS-GTC	在培养开始的时候诱导	1.44	无效果
	在 OD= 0.5 的时候诱导	2.69	质粒效果
	无诱导	2.29	质粒效果

当包含 HMS-GTC 的质粒在培养开始的时候诱导的时候，与没有质粒的摇瓶相比，测量到轻微的增加(系数 1.44)的 GFP 表达。但是，这种轻微的增加(系数 1.43)在 MG1655-GTC 中也测量到，显示这种 GFP 累积可能是由质粒引起而不是通过 RNA I-反义反应引起。

当达到 0.5 的 OD_{600nm} 加入 IPTG 的时候，得到完全不同的结果。尽管基础的 GFP 水平更高，当 pBR322 存在于细胞中的时候，GFP 表达中有明确的上升，这里 RNA I 以及其与 RNA II 环 3 的反义反应是诱导剂 IPTG 的拮抗剂。但是，IPTG 是强烈的诱导剂并且 RNA I-环 3 反义反应相对较弱。

在没有诱导下，在 HMS-GTC pBR322 中也观察到多于 2 倍增加(系数 2.29)的 GFP(表 7)。这可以通过 T7 系统的泄漏进行解释(Studier 和 Mofatt, 1986) 并且也是反义反应的间接证据。由于 T7-聚合酶的基础水平，少量的 TetR 存在于细胞中。并且由于 TetR 是强烈的以及有效的阻抑蛋白分子，这种小量也足以抑制 GFP 表达至系数 2.29。当源自 pBR322 的 RNA I 存在的时候，其能够“处理”少数的 tetR mRNA 分子并且 GFP 水平上升。

参考文献

Balbas, P., Soberon, X., Bolivar, F. and Rodriguez, R.L.: The plasmid, pBR322. *Biotechnol* 10, 5-41 (1988)

Balbas, P., (2001). Understanding the Art of Producing Protein and Nonprotein Molecules in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* Nov;19(3):251-67.

Bahl, C. P., Wu, R., Stawinsky, J., Narang, S. A. (1977) Minimal length of the lactose operator sequence for the specific recognition by the lactose repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 966-970.

Beck, C. F., Mutzel, R. Barbe', J., Müller, W. A. (1982) A multifunctional gene (tetR) controls Tn10-encoded tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* 150, 633-642.

Bernard, P., Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA topoisomerase II complexes. *J Mol Biol.*, Aug 5, 226:3 735-45

Bhagwat, A.S. and Person, S.: Structure and properties of the region of homology between plasmids pMB1 and ColE1. *Mol Gen Genet* 182, 505-507 (1981)

Bolivar, F.: Molecular cloning vectors derived from the CoLE1 type plasmid pMB1. *Life Sci* 25, 807-817 (1979)

Brosius J, Ullrich A, Raker MA, Gray A, Dull TJ, Gutell RR, Noller HF(1981): Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the rrnB ribosomal RNA operon of *E. coli*. *Plasmid.* Jul;6(1):112-8.

Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh C.T., Kolter, R. (1995): MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 177, No. 14, 4194-4197.

Casali, N., (2003), *Escherichia coli* host strains. *Methods Mol. Biol.* 253, 27-48.

Cesare ni, G., Helmer-Citterich, M., Castagnoli, L. (1991). Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* Jul 7:7, 230-5

Chan, P.T., Ohmori, H., Tomizawa, J., Lebowitz, J. (1985). Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA. *J Biol Chem*, 1985, Jul 25, 260:15, 8925-35

Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal J. Bacteriol.* Vol. 134, 1141-1156, (1978)

Chang SY, McGary EC, Chang S. (1989). Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. *J Bacteriol.* Jul;171(7):4071-2

Chen, W., Graham, C., and Ciccarello, R.B. (1997). Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 43-48.

Craig, N.L: Transposon TN7. In Berg, D.E and Howe, M.H. (Eds.), *Mobile DNA*. American Society of Microbiology, Washington DC, (1989), 211-225.

Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N., Ron, D. (1993). Fusion of CHOP to a novel RNA binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363, 640-644

Datsenko, K., and Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*. June 6, Vol. 97, No. 12, 6640-6645.

Davison, J. (2002). Towards safer vectors for the field release of recombinant bacteria. *Environ. Biosafety Res.* 1:9-18.

DeBoy RT and Craig NL. (2000), Target site selection by Tn7: attTn7 transcription and target activity. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(11):3310-3.

Diaz, R. and Staudenbauer, W. L.: Origin and direction of mini-R1 plasmid DNA replication in cell extracts of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* (1982) June; 150(3): 1077-1084

Eguchi, Y., Itoh, T., Tomizawa, J. (1991a). Antisense RNA. *Annu Rev Biochem* 60:631-52.

Eguchi, Y., and Tomizawa, J. (1991b). Complexes formed by complementary RNA stem loops: Their formations, structures and interaction with ColE1 Rep protein. *J Mol Biol* 220:831-842.

Fürste, J., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., Lanka, E. (1986). Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene*, 48:119-131.

Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J. A. (1983). Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, Mar;153(3):1424-31.

Gerdes S.Y., Scholle M.D., D'Souza M., Bernal A., Baev M.V., Farrell M., Kurnasov O.V., Daugherty M.D., Mseeh F., Polanuyer B.M., Campbell J.W., Anantha S., Shatalin K.Y., Chowdhury S.A.K., Fonstein M.Y., Osterman A.L. (2002). From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: Examples in cofactor biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, Aug. 2002, Vol. 184, No. 16, pp 4555-4572.

Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Balazsi G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS, Bhattacharya A, Kapatral V, D'Souza M, Baev MV, Grechkin Y, Mseeh F, Fonstein MY, Overbeek R, Barabasi AL, Oltvai ZN, Osterman AL. (2003) Experimental determination and system level analysis of essential genes in Escherichia coli MG1655. J Bacteriol. 185, 5673-84.

Gilbert, W. and Maxam, A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3581-3584.

Gregorian, R., and Crothers, D. (1995). Determinants of RNA Hairpin Loop-Loop Complex Stability. *J Mol Biol* 248:968-984.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M., Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD Promoter. *Journal of Bacteriology*. Vol. 177, 14: 4121-4130.

Hägg, P., Wa de Pohl, J., Abdulkarim, F., Isaksson, L. (2004) A host/plasmid system that is not dependent on antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology* 111, 17-30.

Haidinger, W., Szostak, M.P., Jechlinger, W., Lubitz, W. Online monitoring of *Escherichia coli* ghost production. *Appl. Environ. Microbiol.* Jan 2002, 468-474.

Helinski, Toukdarian, A. and Novick, R.: Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Ed: Neidhardt F., American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2295-2324 (1996)

Herring, C.D., Blattner, F.R. (2004). Conditional lethal amber mutations in essential *Escherichia coli* genes. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, No. 9, 2673-2681.

Jacob, F., Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3, 318-356.

Jensen, L.B., Ramos, J.L., Kaneva, Z., Molin, S. (1993). A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Appl Environ Microbiol.*, Nov 59:11, 3713-7

Jonasson, P., et al., (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 91-105

Kaplan, D.L., Mello, C., Sano, T., Cantor, C., Smith, C. (1999). Streptavidin-based containment systems for genetically engineered microorganisms. *Biomol Eng* 1999, Dec 31 16:1-4 135-40.

Klemm, P., Jensen, L.B., Molin, S. (1995). A stochastic killing system for biological containment of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* Feb 61:2, 481-6.

Knudsen, S., Saadbye, P., Hansen, L.H., Collier, A., Jacobsen, B.L., Schlundt, J., Karlstrom, O.H. (1995). Development and testing of improved suicide functions for biological containment of bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, Mar 61:3 985-91.

Kues, U. and Stahl, U. (1989): Replication of plasmids in gram negative bacteria. *Microbiol Rev* 53, 491-516

Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, N.A., and Marquet, M. (1996). High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum. Gene Ther.* 7, 1971-1980.

Li JY, Chen LL, Cui YM, Luo QL, Gu M, Nan FJ, Ye QZ. Characterization of full length and truncated type I human methionine aminopeptidases expressed from *Escherichia coli*. (2004) *Biochemistry* 43, 7892-8.

Lin, E.C.C., *Bacteria, Plasmids, and Phages: An Introduction to Molecular Biology.* (1984). Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 11-18.

Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1991). The rate of processing and degradation of antisense RNA I regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell.* Jun 28, 65:7 1233-42.

Malmgren, C., Engdahl, H., Romby, B., Wagner, G. (1996). An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a

translation initiation signal blocks ribosome binding: The case of plasmid R1. RNA 1: 1022-1032.

Merlin, S., and Polisky, B. (1995). Assessment of quantitative models for plasmid ColE1 copy number control. J Mol Biol., Apr 28, 248:2, 211-9

O'Kennedy, R.D., Baldwin, C., and Keshavarz-Moore, E., (2000). Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. J. Biotechnol. 76, 175-183.

O'Kennedy et al., (2003). Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. Biotechnol Appl. Biochem. 34, 83-90.

Postle, K., Nguyen, T. T., Bertrand, K. P. (1984) Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. Nucleic Acids Res. 12, 4849-4863.

Rawlings, D.E. (1999) Proteic toxin-antitoxin, bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the pas system of pTF-FC2. FEMS Microbiology Letters, 176, 269-277.

Reinikainen, P., Korpela, K., Nissinen, V., Olkku, J., Söderlund, H., and Markkanen, P. (1988). *Escherichia coli* plasmid production in Fermenter. Biotech. Bioeng. 33, 386-393.

Ringquist, S., MacDonald, M., Gibson, T., Gold, L. (1993). Nature of the ribosomal mRNA track: Analysis of ribosome-binding sites containing different sequences and secondary structures. Biochemistry. 32:10254-10262.

Rogers, M., Ekaterinaki, N., Nimmo, E., Sherratt, D., Analysis of Tn7 transposition. Mol Gen Genet (1986), Dec 205:3 550-6

Ronchel, M.C., Molina, L., Witte, A., Lubitz, W., Molin, S., Ramos, J.I., Ramos, C. (1998), Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing genes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4904-4911.

Rouch, D. A., Brown N. L. (1997) Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant pco. Microbiology 143, 1191-1202.

Sano, T., Pandori, M., Chen, X., Smith, C., Cantor, C. (1995). Recombinant core streptavidins. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 270, 47: 28204-28209.

Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.*, May 5, 189:1 113-30.

Szafranski, P., Mello, C.M., Sano, T., Smith, C.L., Kaplan, D.L., Cantor, C.R. (1997). A new approach for containment of microorganisms: dual control of streptavidin expression by antisense RNA and the T7 transcription system. *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb 18, 94:4 1059-63.

Tomizawa, J. and Itoh, T. (1981). Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6096-6100

Tomizawa, J. (1984). Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell* 38, 861-870

Tomizawa, J. (1986). Control of Plasmid Replication: Binding of RNA I to RNA II and Inhibition of Primer Formation. *Cell*. 47:89-97.

Tomizawa, J. (1989). Control of ColE1 Plasmid Replication: Intermediates in the binding of RNA I and RNA II. *J Mol Biol* 212:683-694.

Tomizawa J. (1990). Control of ColE1 plasmid replication. Interaction of Rom protein with an unstable complex formed by RNA I and RNA II. *J Mol Biol*. Apr 20; 212(4):695-708

Torres, B., Jaenecke, S., Timmis, K.N., Garcia, J.L., Diaz, E. (2000). A gene containment strategy based on a restriction-modification system. *Environ Microbiol.*, Oct 2:5, 555-63.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.*, 67:509-44

Vieira, J. and Messing, J.: The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268 (1982)

Waddell, C.S., and Craig, N.L. (1988), Tn7 transposition: two transposition pathways directed by five Tn7-encoded genes. *Genes Dev*, Feb 2:2, 137-49

Wang, et al. (2001). Medium design for Plasmid DNA based on stoichiometric model. *Proc. Biochem*. 36, 1085-1093.

Williams, S., Cranenburgh, R., Weiss, A. Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Research*, (1998), Vol 26, No. 9; 2120-2124

Yanofski, C., Crawford, I. P. (1987) The tryptophan operon. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E., editors: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington DC, American Society for Microbiology, pp1453-1472.

Yu, D., Ellis, H., Lee, C., Jenkins, N., Copeland, N., Court, D. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. PNAS. May 23, Vol. 98, No. 11, 5978-5983.

Zhang, Y., Nelson, M., Nietfeldt, J., Burbank, D.E., Van Etten, J.L. (1992). Characterization of Chlorella virus PBCV-1 CviAII restriction and modification system. Nucleic Acids Research, Vol. 20, 20: 5351-5356.

Zuker, M., Mathews, D., Turner, D. (1999), Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.

序列表

<110> 贝林格尔·英格海姆奥地利有限公司(Boehringer Ingelheim Austria GmbH)
<120> 用于无抗生素 ColE1 质粒增殖的宿主-载体系统
<130> 12-0233-PCT
<160> 53
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 159
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 1
gaaattaata cgactcacta tagggaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt 60
tgcctctagt tcagctacca actgaaggag agaatacata tggctaaagg agaagaactt 120
ttcactggag ttgtcccaat tcttgttgaa ttagatggt 159

<210> 2
<211> 161
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 2

gaaattaata cgactcacta tagggcctct agaaataatt ttgtttaact ttaagaagga	60
gatatacata tgcggatcaa gagctaccaa ctcttggtcc gatggctaaa ggagaagaac	120
ttttcactgg agttgtccca attcttggtg aattagatgg t	161

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 3

gaaattaata cgactcacta tagggacagt atttggtatc tgcgc	45
---	----

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 4

aacaaaaaaaa ccaccgctac	20
------------------------	----

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 5

gaaattaata cgactcacta taggggcaaa caaaaaaacc accgc

45

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 6

acagtatttg gtatctgcgc

20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 7

gaaattaata cgactcacta tag

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	8	
	accatctaatt tcaacaagaa ttg	23
<210>	9	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	9	
	gatgatgcta gcaaaggaga agaac	25
<210>	10	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	10	
	gatgatggat ccttattttgt atagttc	27
<210>	11	
<211>	122	

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 11
taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt 60
tggtttaactt taagaaggag atacatatgg gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 120
tg 122

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12
atcatcgcta gccatgggtat ctgcgctctg ctg 33

<210> 13

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13
taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttccccaaca aaaaaaccac 60
cgctaccagc ggtgggtttgt ttgcctctag ttcagctacc aactgaagga gagaatacat 120
atg 123

<210>	14	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	14	
atcatcgcta gccatatgta ttctctcctt c		31

<210>	15	
<211>	119	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	15	
gatgataagc ttttaatacga ctcaactatag gggaattgtg agcggataac aattcccctc		60
tagaaataat tttgtttaac tttaagaagg agatatacat atggctagca aaggagaag		119

<210>	16	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	

<400> 16
gatgataagc tttaatacga ctcactatag gg 32

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 17
gatgatctcg agcaaaaaac ccctcaagac c 31

<210> 18
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 18
agtagtgaat tccaaaaaac ccctcaagac c 31

<210> 19
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223>	引物	
<400>	19	
	gatgatgcgg ccgcgttgcg acggtggtac g	31
<210>	20	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	20	
	gatgatgaat tctatgtttt taatcaaaca tcctg	35
<210>	21	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	21	
	gatgatctcg aggcattccat ttattactca acc	33
<210>	22	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>

<223> 引物

<400> 22

gatgatggta cctgaagaag ttcgcgcgcg

30

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 23

accggcgcag ggaagg

16

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 24

tggcgctaatt gatgccg

18

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 25

atgatgatgg cgccgcacc gacgctgatg gacagaatta atgg

44

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 26

gctgctgagc tcccatcttt gattacggtg ac

32

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 27

atgatgctcg agcgccaaac gtgccactg

29

<210> 28

<211> 31

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	28	
	gctgctggta ccgaagtgaa caccagcctt g	31
<210>	29	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	29	
	ttcgggttcc agtaacggg	19
<210>	30	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	30	
	tttcgaggta tcgccgtgg	19
<210>	31	

<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	31	
	gctgctgagc tccaaagcgc gctaccagcg	30
<210>	32	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	32	
	atgatgatgg cggccgctta actgagaaca aactaaatgg	40
<210>	33	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	33	
	atgatgctcg aggctcaaaa gccgttcagt ttg	33

<210>	34	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	34	
gctgctggta cctgccagcg caactttgct c		31
<210>	35	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	35	
gtacaaccgc caggtagtg		19
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	36	
gtctgattta tcagcgaggc		20

<210>	37	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	37	
	gctgctaagc ttgtcgacag ccactggagc acctc	35
<210>	38	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	38	
	atgatgctcg agacggggag agcctgagc	29
<210>	39	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	

<400>	39	
atgatgggat	ccaaaaggcc	atccgtcagg
		30
<210>	40	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	40	
gtcgtcaagc	ttataaaacg	aaaggctcag
tc		32
<210>	41	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	41	
gctgctggat	ccgcgcccaa	tacgcaaacc
		30
<210>	42	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	引物	
<400>	42	
	atgatgatgg cggccgctgt gaaattgtta tccgctc	37
<210>	43	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	43	
	gctgctgaat tcataaaacg aaaggctcag tc	32
<210>	44	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	44	
	gctgctaagc ttgtcgacaa aaggccatcc gtcagg	36
<210>	45	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>

<223> 引物

<400> 45
gatgatgaat tctatgtttt taatcaaaca tcctg 35

<210> 46

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 46
gatgatgagc tcgttgcgac ggtggtacg 29

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 47
gatgatctcg aggcattccat ttattactca acc 33

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 48
gatgatggta cctgaagaag ttcgcgcgcg 30

<210> 49

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 49
gctgctgcta gcatgatgtc tagattagat aaaag 35

<210> 50

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 50
gctgctggat ccttaagacc cactttcaca tttaag 36

<210> 51

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 51

gtcgtcgaat tcttatttgt atagttcatc catgc

35

<210> 52

<211> 116

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 52

gctgctaagc tttccctatc agtgatagag attgacatcc ctatcagtga tagagatact
gagcacatcg cggccgcttt aagaaggaga tatacatatg cgtaaaggag aagaac

60

116

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

<220>

<223> Lac 操纵子

<400> 53

tggaattgtg agcggataac aatt

24

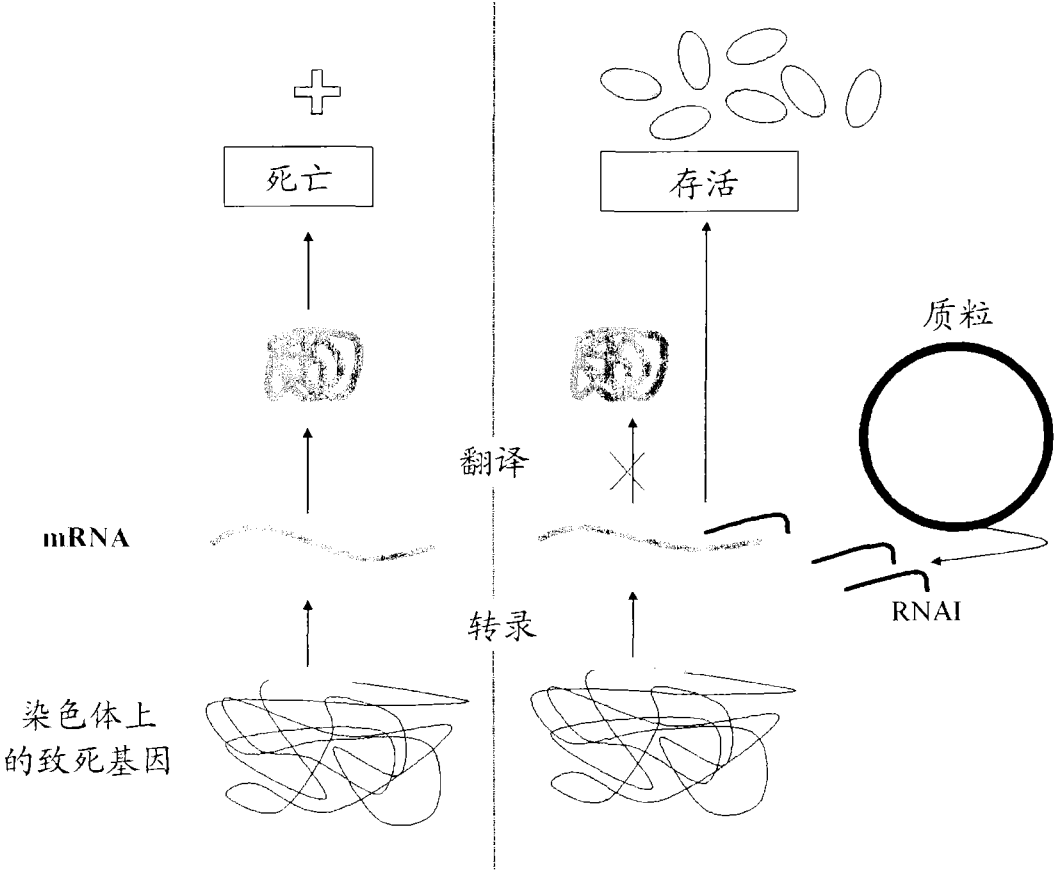


图 1

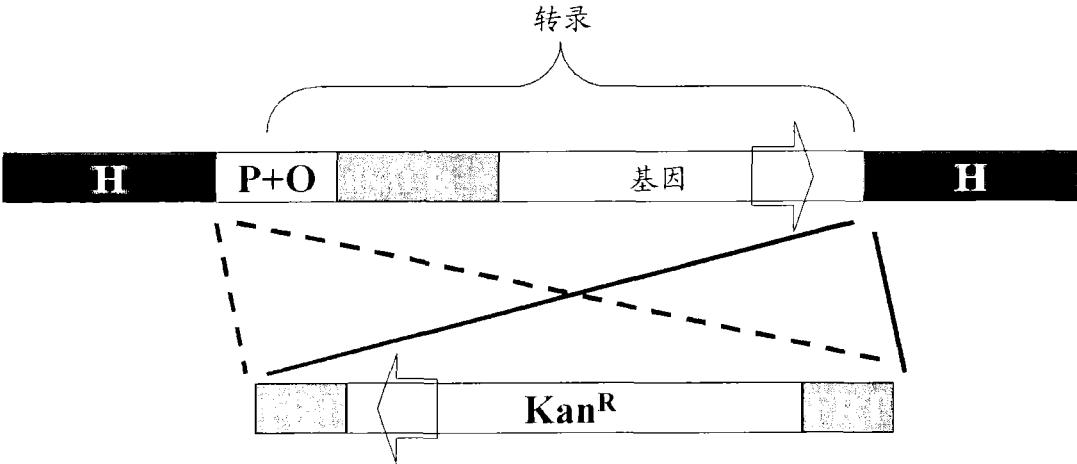


图 2

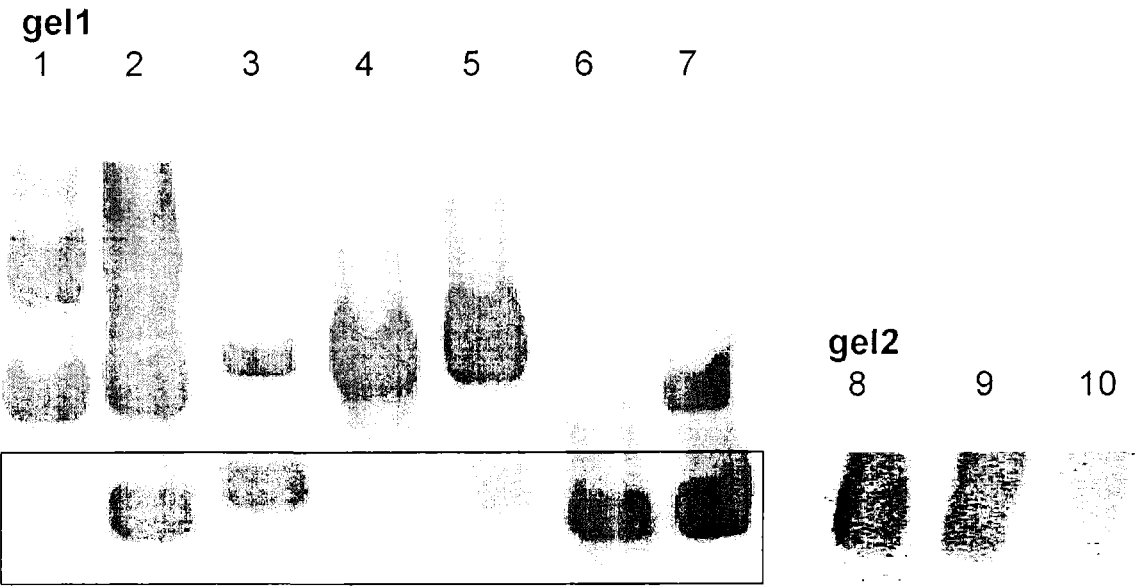


图 3

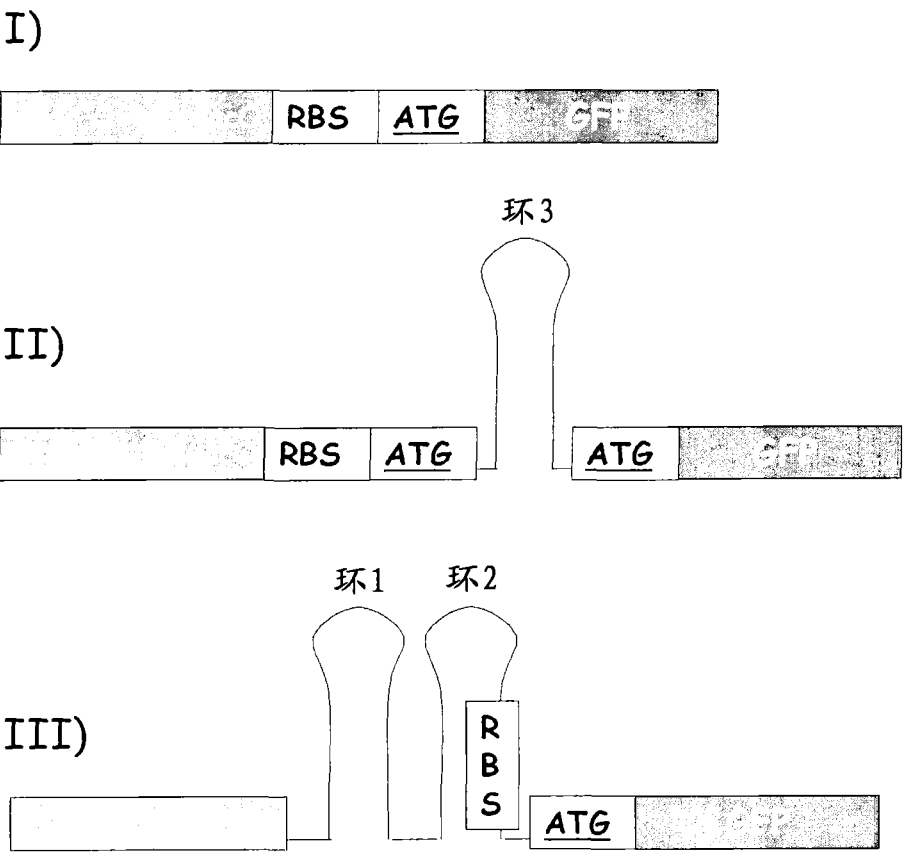


图 4

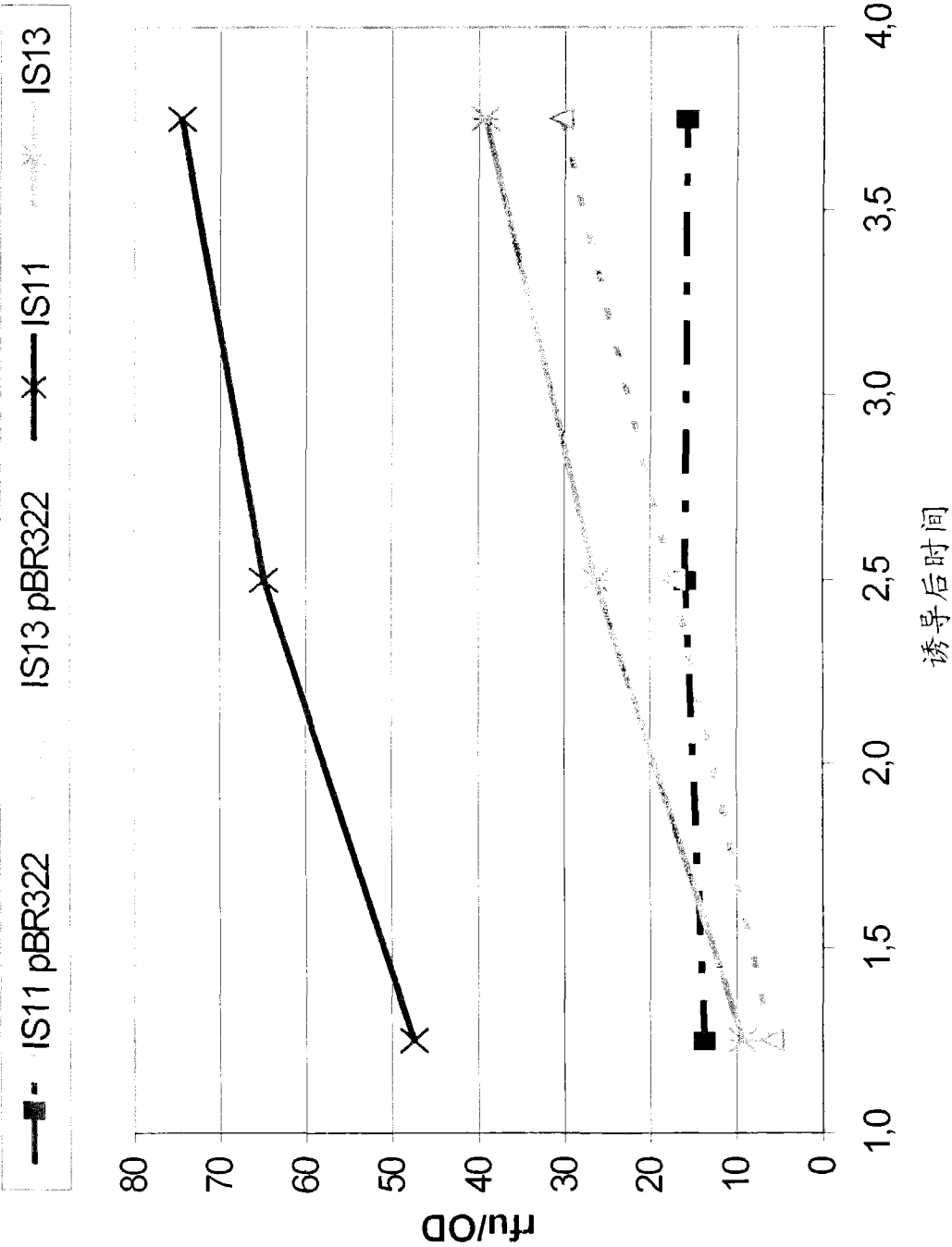


图 5

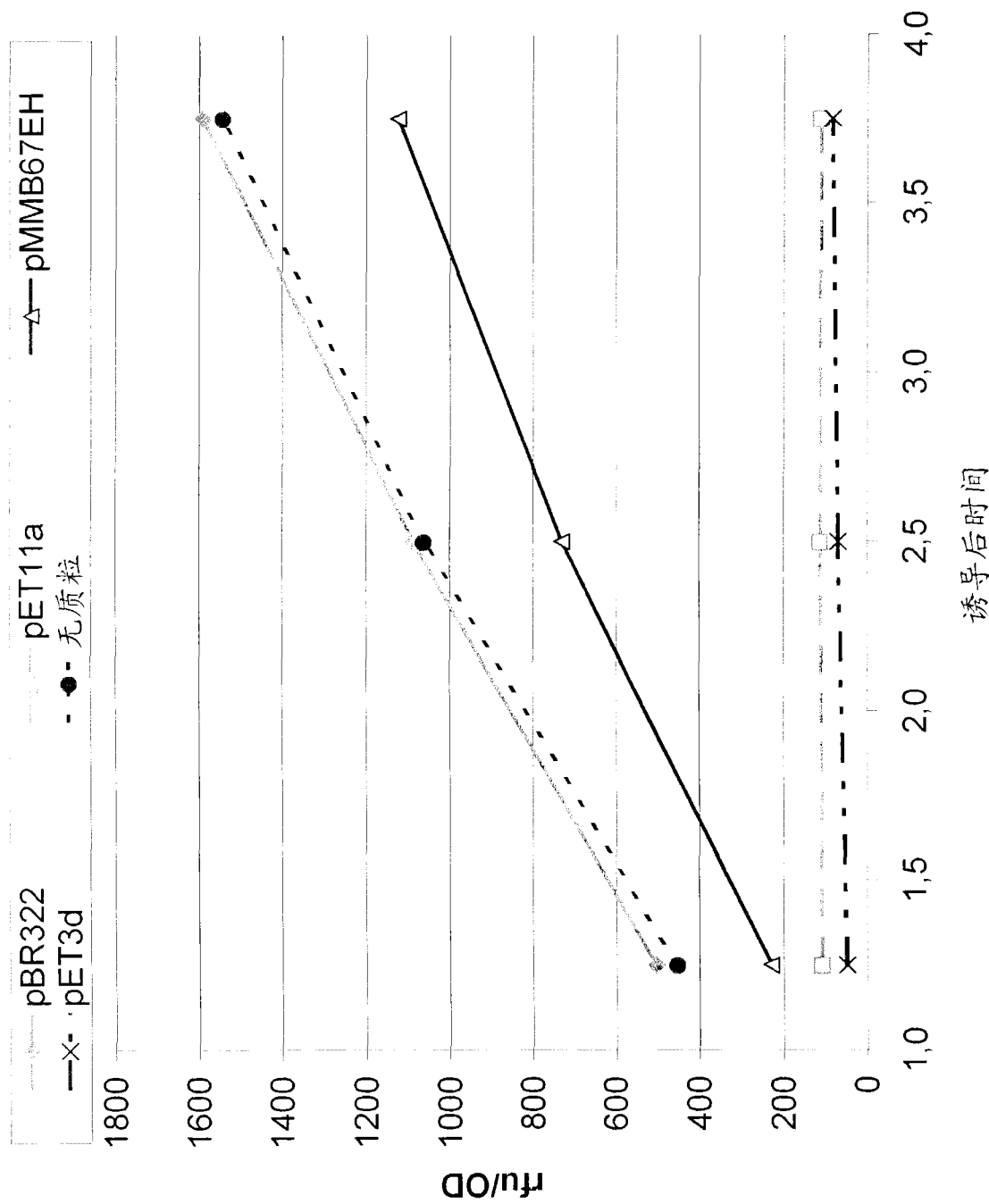


图 6

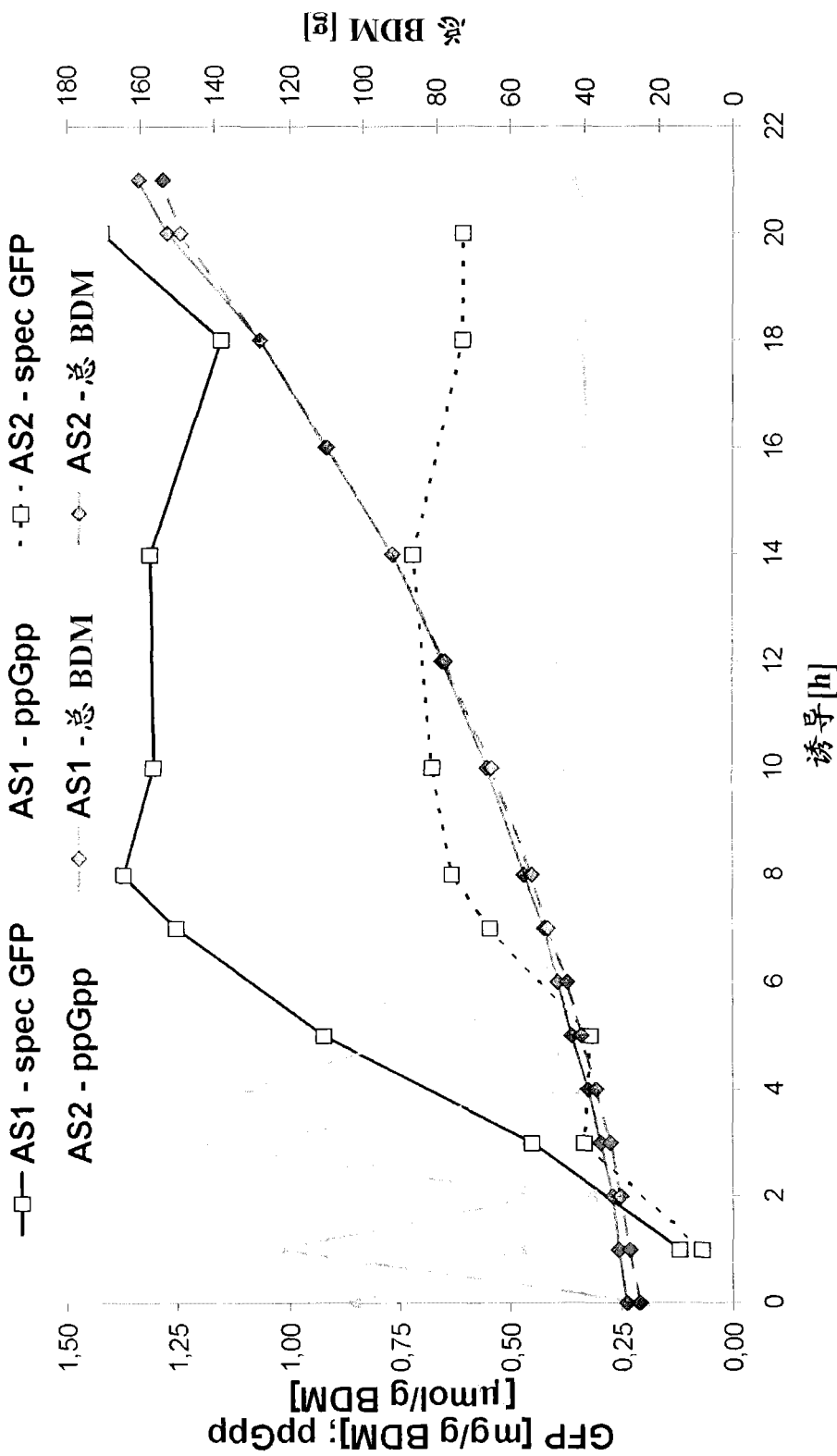


图 7a

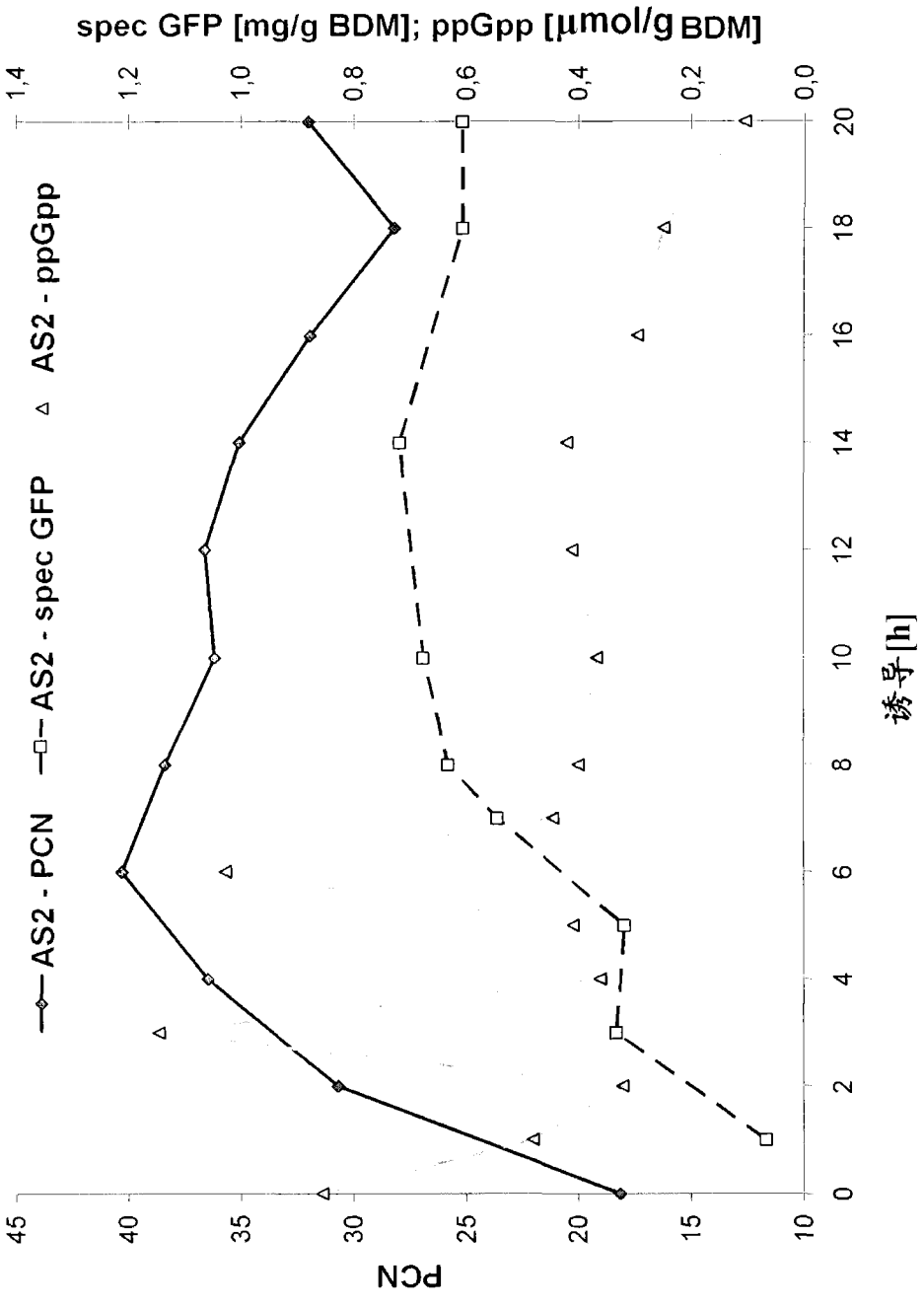


图 7b

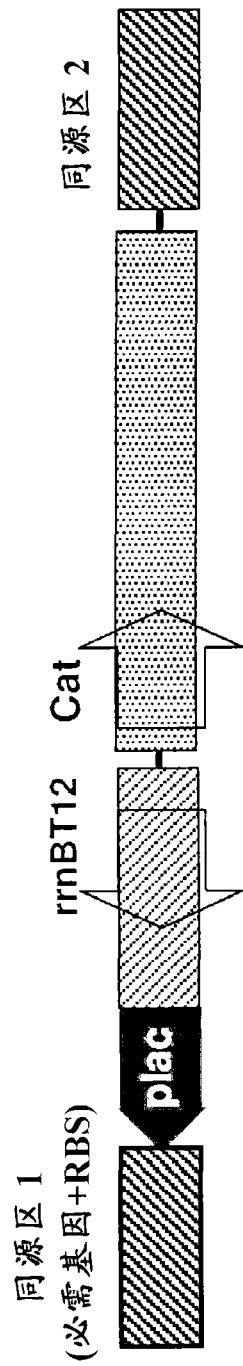


图 8

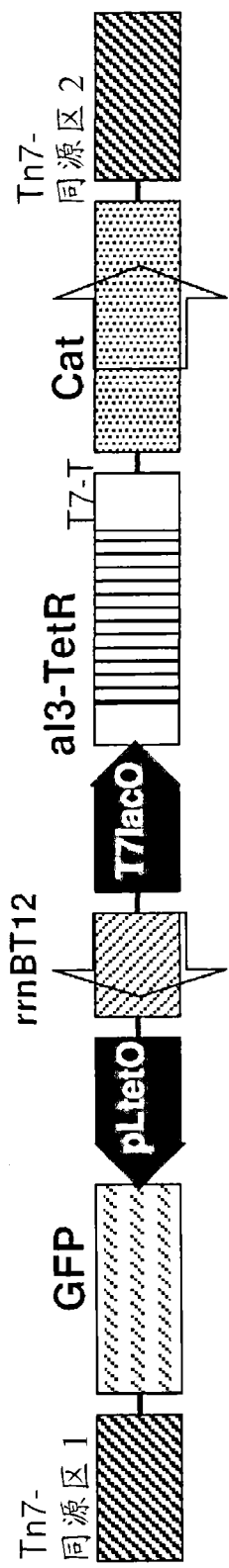


图 9

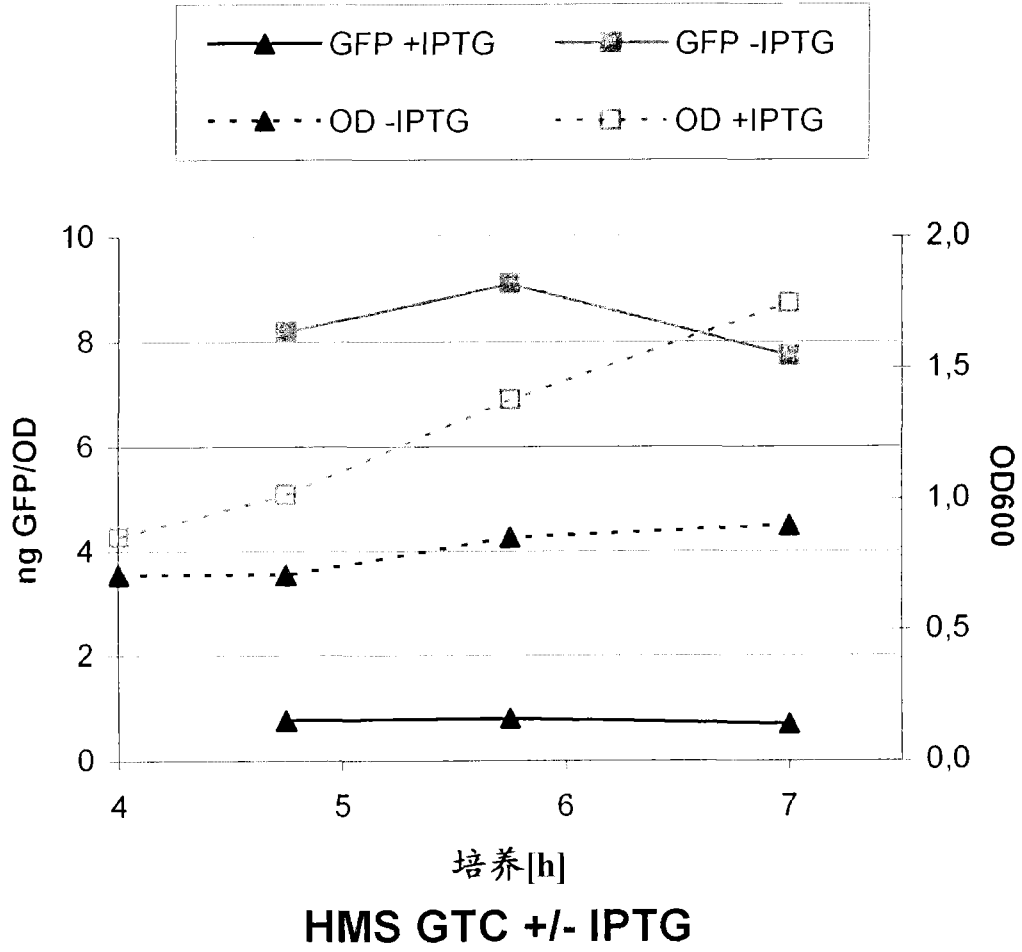


图 10