

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 1/21
C12N 15/75 C12P 21/02
C12N 9/42
//(C12N1/21,C12R1 : 107)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97199193.6

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1183246C

[22] 申请日 1997. 10. 28 [21] 申请号 97199193. 6
[30] 优先权
[32] 1996. 10. 28 [33] DK [31] 1192/1996
[32] 1996. 12. 13 [33] DK [31] 1426/1996
[86] 国际申请 PCT/DK1997/000477 1997. 10. 28
[87] 国际公布 WO1998/018905 英 1998. 5. 7
[85] 进入国家阶段日期 1999. 4. 27
[71] 专利权人 诺沃奇梅兹有限公司
地址 丹麦鲍斯韦
[72] 发明人 M • E • 布兰瓦德 M • 舒赖恩
P • L • 乔根森
审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 2 页

[54] 发明名称 利用芽孢杆菌进行纤维素结合结构域(CBD)的细胞外表达

[57] 摘要

转化了包含编码纤维素结合结构域(CBD)之DNA序列的载体的芽孢杆菌宿主,该宿主能表达所述序列,所表达的多肽蛋白质基本上由一个或多个非催化性结构域组成;纤维素结合结构域的分子量为4kD-35kD,并且得自于微生物或植物,优选地来自细菌或真菌;芽孢杆菌宿主例如可以是以下诸种之一:枯草芽孢杆菌,地衣芽孢杆菌,巨大芽孢杆菌,嗜热脂肪芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌;携有编码纤维素结合结构域的DNA序列的芽孢杆菌表达载体;一种在芽孢杆菌宿主细胞中生产纤维素结合结构域多肽的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种芽孢杆菌宿主,其转化了包含编码纤维素结合结构域的 DNA 序列的载体并能表达该序列,所表达的多肽由一个或多个非催化性结构域组成。

2. 根据权利要求 1 的宿主,其能以单一多肽结构域形式表达该纤维素结合结构域。

3. 根据权利要求 1 的宿主,其中所述纤维素结合结构域的分子量为 4kD-35kD。

4. 根据权利要求 3 的宿主,其中所述纤维素结合结构域的分子量不高于 30kD。

5. 根据权利要求 3 的宿主,其中所述纤维素结合结构域的分子量不高于 28kD。

6. 根据权利要求 3 的宿主,其中所述纤维素结合结构域的分子量不高于 25kD。

7. 根据权利要求 1 的宿主,其中所述载体包含编码单一纤维素结合结构域的 DNA 序列。

8. 根据权利要求 1 的宿主,其中所述载体包含编码二聚体或三聚体纤维素结合结构域的 DNA 序列。

9. 根据权利要求 1 的宿主,其中所述纤维素结合结构域可得自微生物或植物。

10. 根据权利要求 9 的宿主,其中所述微生物是选自由以下各属组成的组中的细菌:丁酸弧菌属、纤维单胞菌属、梭菌属、小双孢菌属、小单孢菌属、假单胞菌属、链霉菌属、高温单孢菌属、芽孢杆菌属、*Caldocellum*、欧文氏菌属、粘球菌属、纤维弧菌属、热厌氧杆菌属和栖热袍菌属。

11. 根据权利要求 9 的宿主,其中所述微生物是选自由以下各属组成的组中的真菌:蘑菇属、网柄菌属、镰孢属、腐质霉属、*Neocallimastix*、脉孢菌属、*Limulus*、青霉属、*Phanerochaete* 和木霉属。

12. 根据权利要求 1 的芽孢杆菌宿主，其为嗜中性的、嗜碱性的、嗜温性的或嗜热性的。

13. 根据权利要求 12 的芽孢杆菌宿主，其选自由下列各种组成的组：枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌。

14. 根据权利要求 1 的宿主，其中所述载体整合至未转化宿主的基因组中。

15. 根据权利要求 1 的宿主，其中所述载体以表达质粒形式存在。

16. 根据权利要求 1 的宿主，其中所述载体已在基因组内发生了扩增。

17. 根据权利要求 15 的宿主，其中所述表达质粒为多拷贝质粒。

18. 一种芽孢杆菌表达载体，其携有插入的编码由一个或多个非催化性结构域组成的纤维素结合结构域的 DNA 序列。

19. 根据权利要求 18 的载体，其内表达盒包含源自芽孢杆菌的调控区。

20. 根据权利要求 19 的载体，其中所述芽孢杆菌调控区对该宿主是内源的。

21. 在芽孢杆菌宿主细胞中生产由一个或多个纤维素结合结构域组成的多肽的方法，该方法包括以下步骤：

——在营养培养基中，过量生产纤维素结合结构域的条件下培养芽孢杆菌宿主细胞，所述宿主细胞已转化了包含可操作性地连接在一起的下述元件的表达盒：

a) 转录和翻译起始调控区，

b) 编码纤维素结合结构域多肽的 DNA 序列，

c) 转录和翻译终止调控区，其中所述调控区在该宿主中是有功能的，和

d) 用于选择已转化的宿主细胞的选择性标记基因；和

——回收纤维素结合结构域多肽。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中生产的纤维素结合结构域多肽

的分子量为 4kD-35kD。

23. 一种优化芽孢杆菌宿主中纤维素结合结构域表达的方法，该方法包括以下步骤：

a.在宿主中表达融合了报道分子的纤维素结合结构域，

b.通过测定报道分子的内在性质，监测已发酵宿主的上清中已表达纤维素结合结构域的浓度。

24. 根据权利要求 23 的方法，其中所述报道分子是绿色荧光蛋白，所述内在性质为发射荧光。

25. 生产由与绿色荧光蛋白融合的一个或多个非催化性纤维素结合结构域组成的多肽杂合体的方法，其中所述杂合体是在芽孢杆菌宿主中表达的，即在一定条件下培养已转化的宿主，从而使转化培养物中实质上无未转化细胞；将已转化的培养物接种于营养培养基中，从而使所述杂合体得到过量表达；并且回收该杂合体。

利用芽孢杆菌进行纤维素结合结构域(CBD)的细胞外表达

本发明涉及一种能表达纤维素结合结构域多肽的转化芽孢杆菌宿主，一种芽孢杆菌表达载体，以及在芽孢杆菌宿主细胞内生产纤维素结合结构域的方法。

发明背景

对 CBD 作为一种功能性结构域的研究涉及到以单一结构域分子合成该结构域。最早的纯 CBD 之一是通过自动固相合成法合成的 (Kraulis P. 等(1989))。

已示 CBD 能以功能性的单一结构域形式在大肠杆菌中表达，参见例如：Ong E. 等(1993)，其中公布，采用大肠杆菌进行的表达在细胞外围胞质中每升培养液的 CBD 产量为 33mg。

最近，在大肠杆菌中也成功地表达了真菌 CBD 二体(二聚体)，见 Linder M. 等(1996)。

WO 96/13524 公开了在大肠杆菌中表达经修饰的 CBD 蛋白。然而，CBD 在大肠杆菌内的表达并不是真正的细胞外表达，并且产量也不尽如人意，对于 CBD 的工业水平生产来说该产量有些太低。

US5525195, US5536655, WO 91/17244 和 WO 91/10732 公开了具有可操作地连接了纤维素结合结构域的催化活性结构域的内切葡聚糖酶在芽孢杆菌宿主细胞内的表达。

据此，本发明的目的是提供一种以高产率生产 CBD 的方法，该方法优选采用涉及 CBD 的细胞外生产的常规发酵技术，这样使得 CBD 在工业上的应用更为经济可行。

发明概述

本发明人现已发现可通过在芽孢杆菌宿主中表达而生产纤维素结合结构域 (CBD)。

在本发明之前，在芽孢杆菌中表达 CBD 是非常不如人意的，因为，首先，已知纤维素结合结构域含有二硫桥，其次，纤维素结合结构域对由芽孢杆菌宿主产生的蛋白酶的降解可能比较敏感。

据此，本发明的第一个方面涉及转化了包含编码纤维素结合结构域之 DNA 序列的载体、并且能够表达该 DNA 序列的芽孢杆菌宿主。

在第二方面，本发明涉及一种芽孢杆菌表达载体，所述载体携带有编码纤维素结合结构域的一段插入的 DNA 序列。

另外，在第三方面，本发明涉及在芽孢杆菌宿主细胞内生产纤维素结合结构域多肽的方法，该方法包括以下步骤：

——在营养培养基中，可以过量生产纤维素结合结构域的条件下，培养芽孢杆菌宿主细胞，所述宿主细胞已转化了包含可操作性地连接在一起的以下诸成分的表达盒：

- a) 转录和翻译起始调控区，
 - b) 编码纤维素结合结构域多肽的 DNA 序列
 - c) 转录和翻译终止调控区，其中所述调控区在该宿主中具有功能，和
 - d) 用于选择已转化宿主细胞的选择标记基因；和
- 回收纤维素结合结构域多肽。

发明详述

纤维素结合结构域(CBD)是一种可结合纤维素和几丁质的水不溶性形式(包括晶态形式)或与它们有高亲合力的多肽。

已发现 CBD 是由 2 个或多个不同多肽结构域组成的大蛋白质复合物的整合部分，例如存在于水解酶中，所述水解酶通常包含一个含有用于底物水解的活性位点的催化结构域和一个用于与不溶性基质结合的糖类结合结构域或纤维素结合结构域(CBD)。这样的酶可以包含一个以上的催化结构域和一个、两个或三个 CBD，还可选择性地包含一个或多个将 CBD 与所述催化结构域连接起来的多肽区，后一类型的区域通常被称为“接头”。包含 CBD 的水解酶的例子有：纤维素酶，木聚糖酶，甘露聚糖酶，阿拉伯呋喃糖苷酶，乙酰酯酶和几丁质酶。也已经在藻类中，

例如在红藻 *Porphyra purpurea* 中发现了非水解性多糖结合蛋白形式的 CBD (参见 Peter Tomme 等人 (1996))。但是, 大多数已知的 CBD 来源于纤维素酶和木聚糖酶。

在本发明中, 术语“纤维素结合结构域”与 Tomme 等人 (出处同前) 中的含义相同。其中将 120 种以上的纤维素结合结构域划分为 10 个家族 (I-X), 它们可能在底物结合机理方面具有不同的功能或作用。然而, 在进行本发明的工作中, 已发现了一种迄今为止尚无人知晓的 CBD 家族, 参见下述的实施例 8; 估计在将来还会出现新的家族代表和其它 CBD 家族。

在蛋白质复合物 (通常是水解酶) 中, CBD 位于 N 或 C 末端或位于内部。

CBD 单体通常由约 30 个以上且约 250 个以下的氨基酸残基组成。例如, 归类为家族 I 的 CBD 由 33-37 个氨基酸残基组成, 归类为家族 IIa 的 CBD 由 95-108 个氨基酸残基组成, 归类为家族 VI 的 CBD 由 85-92 个氨基酸残基组成。因此, CBD 单体的分子量通常约 4kD - 40kD, 并且通常低于约 35kD。

CBD 可作为单一结构域多肽使用, 或作为二聚体、三聚体或多聚体使用, 或作为蛋白质杂合体的一部分使用。

嵌合蛋白杂合体

嵌合蛋白杂合体在现有技术中是已知的, 参见例如 WO 90/00609, WO 94/24158 和 WO 95/16782, 其包含源于其他来源的纤维素结合结构域 (CBD), 优选是源于其他微生物来源的纤维素结合结构域 (CBD), 而不是源于其中 CBD 以蛋白质整合部分存在的嵌合蛋白质。通常, 嵌合蛋白杂合体是酶杂合体, 即含有催化结构域和所述结合结构域。

嵌合蛋白质杂合体和酶杂合体可通过转化一种 DNA 构建体至宿主细胞中并培养宿主细胞以表达融合基因而得以制备, 其中所述 DNA 构建体包含编码纤维素结合结构域 (CBD) 的至少一个 DNA 片段, 该 DNA 片段通过或不通过接头而与编码所述蛋白质或酶的 DNA 序列相连接。重组融

合蛋白或酶杂合体可用下式描述:

CBD-MR-X

其中, CBD 是对应于至少是纤维素结合结构域的氨基酸序列的 N-末端或 C-末端区; MR 是中间区(接头), 它可以是一个键、或优选具有 2 至 100 个碳原子、更优选具有 2 至 40 个碳原子的短连接基团, 或者优选是具有约 2-100 个氨基酸、更优选具有 2 至 40 个氨基酸; X 是由编码该蛋白质或酶的 DNA 序列所编码的多肽的 N 末端或 C 末端区。

然而, 也包括具有内部 CBD 的重组融合蛋白或酶杂合体。

编码源自给定生物体的 CBD 的 DNA 序列通常可采用 PCR 技术获得, 并且, 基于现有知识, 也可以从其他生物体找到同源序列。

估计通过克隆纤维素酶、木聚糖酶或其他植物细胞壁降解酶并测量它们对纤维素的结合, 可发现新的 CBD。如果酶活性在以下所述的标准条件下与 Avicel 结合, 那么可推定该基因的一部分编码结合结构域。

获得编码 CBD 的 DNA 片段后, 将该 DNA 基因插入于适合在芽孢杆菌内进行表达的载体中。

例如, 纤维素亲合性可采用在 500ml 缓冲的浆液(缓冲液: 0.1 磷酸钠, pH7.5)中的 10g Avicel 进行测量, 所述浆液用一小勺缓慢搅拌并且在室温下放 30 分钟让其溶胀。然后以 1 份纤维素结合结构域比 150 份 Avicel 的比例加入酶。在冰上进行操作, 这样在 5 至 10 分钟内可达到最佳结合。然后可洗涤 Avicel, 并对其直接进行 SDS-PAGE 以观察已结合的蛋白质(由于使用了 SDS 并进行了热煮, 这样会将已结合的蛋白质释放下来)。另一种方法是将浆液装入柱内并洗涤。用离子化水或高 pH 缓冲液如三乙胺(pH11.2, 1%溶液)洗脱已结合的蛋白质, 经 pH 洗脱下来的蛋白质立即调节到中性。

在大肠杆菌中已表达了一些 CBD。然而, 尚无从芽孢杆菌中表达并分泌 CBD 的报道。大肠杆菌作为异源蛋白质的表达宿主相比于芽孢杆菌来说有一些优点, 主要是由于大肠杆菌有壁膜间隙, 异源表达的基因产物有可能在其中进行正确折叠(综述见例如 Hockney, R. C. (1994))。特别是, 当表达功能性依靠正确排列的双硫桥时, 就需要在外围胞质中

有氧化电位且存在二硫键氧化还原酶(Emmanuel Brun 等, 1995)。欧洲生化杂志, 231, 142-148, 和 Ong 等(1993)中公开了 *Erwinia chrysanthemi* 分泌的内切葡聚糖酶 EGZ 的纤维素结合结构域的过量表达、纯化和鉴定。有二硫键的 CBD 的其它例子有: 荧光假单胞菌纤维素亚种(NCIMB 10462) CelB 的 N-末端 CBD[见 Tomme P.等(出处同前)中的序列对比], 以及粪肥纤维单胞菌(ATCC 484)CenA 的 N 末端 CBD (N. R. Gilkes 等, 1991)。

此外, 大肠杆菌的外围胞质也起着保护异源表达的蛋白质免受上清以及胞浆中存在的蛋白酶的作用。

也已知, 当在枯草芽孢杆菌中表达含有二硫桥的分泌蛋白时, 表达水平显著下降(Van den Berg 等(1993))。

异源表达的另一个问题是已表达蛋白质的蛋白水解降解作用。已知枯草芽孢杆菌表达至少 7 种不同的胞外蛋白酶(A. L. Sonenshein 等编(1993))。

特别是对于 CBD 这样一种高度疏水的蛋白质, 当在枯草芽孢杆菌中表达时, 该蛋白质的运输可能严重受阻, 而若该蛋白质由于其疏水性而锚定于细胞膜上, 将会因其有害效果而甚至引起细胞死亡。

在第一方面, 本发明涉及转化了包含编码 CBD 之 DNA 序列的载体、并且能表达该序列的芽孢杆菌宿主。显而易见, 所表达的多肽基本上由一个或多个非催化性的结构域组成, 即该多肽不包含任何催化活性结构域。

在一个优选实施方案中, 所表达的 CBD 或含 CBD 之多肽的分子量等于或高于约 4kD。优选地, 其分子量等于或低于 35kD, 较优选地约 32kD, 甚至更优选地约 30kD, 进一步优选地不高于约 28kD, 尤其是约 25kD。

可以单一结构域多肽(即包含一个 CBD 的多肽)的形式表达 CBD。或者, 可以二聚体或三聚体甚或多聚体形式(即包含两个、三个甚或三个以上相同 CBD “单元”的多肽或蛋白质形式)表达 CBD。

也可以作为多结构域多肽的一部分而表达 CBD, 这种多肽的非 CBD

部分可以是例如一个、两个、甚或多个没有催化活性的结构域。

可以相信，按照本发明，即通过已转化的芽孢杆菌宿主的途径，几乎可以表达任何一种 CBD。优选地，可表达的 CBD 是可得自微生物或植物的 CBD，更优选是可得自细菌或真菌的 CBD。

来自细菌的 CBD 的实例包括可从下列各属之一的种内得到的 CBD：丁酸弧菌属、纤维单胞菌属、梭菌属、小双孢菌属、小单孢菌属、假单胞菌属、链霉菌属、高温单孢菌属、芽孢杆菌属、*Caldocellum*、欧文氏菌属、粘球菌属、纤维弧菌属、热厌氧杆菌属和栖热袍菌属。

源自真菌的 CBD 的实例包括可从下列各属之一的种内获得的 CBD：蘑菇属、网柄菌属、镰孢属、腐质霉属、*Neocallimastix*，脉孢菌属，*Limulus*，青霉属，*Phanerochaete* 和木霉属。

可得自植物的 CBD 的实例是来自苹果青霉素的 CBD。

本发明的芽孢杆菌宿主是嗜中性的、嗜碱性的、嗜中温的或嗜热的宿主。

本发明中有用的宿主的实例是来自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的宿主。然而，估计其他芽孢杆菌种类也可以用作表达 CBD 的宿主。

如下详述，用包含编码 CBD 之 DNA 序列的载体转化本发明的宿主。优选地，所述载体整合到了宿主的基因组中，更优选地，其在基因组中已得到了扩增。

在本发明的另一优选实施方案中，所述载体为表达质粒，优选地为多拷贝质粒。

在第二方面，本发明涉及带有插入的编码 CBD 之 DNA 序列的一种芽孢杆菌表达载体。优选地，该载体的表达盒包含来自芽孢杆菌的调控区，更优选地，这类调控区是该宿主的内源区域。

在第三方面，本发明涉及生产 CBD 多肽的方法，该方法包括以下步骤：

——在营养培养基中，过量表达纤维素结合结构域的条件下，培养芽孢杆菌宿主细胞，所述细胞已用包含以下可操作性地连接在一起的诸成分

- a) 转录和翻译起始调控区,
 - b) 编码纤维素结合结构域的 DNA 序列,
 - c) 转录和翻译终止调控区, 其中该调控区在宿主中是有功能的, 和
 - d) 用于选择已转化的宿主的选择标记基因; 并且
- 回收纤维素结合结构域多肽。

在第四方面, 本发明涉及优化 CBD 在芽孢杆菌宿主中的表达的一种方法, 该方法包括在宿主中表达与报道分子融合的 CBD 的诸步骤; 以及通过测量报道分子的内在性质而监测发酵宿主的上清中已表达的 CBD 的浓度。

在一个优选的实施方案中, 所述报道分子是绿色荧光蛋白, 其内在性质是发射荧光。

在第五与第六方面, 本发明涉及一种基本上由与绿色荧光蛋白融合的一个或多个纤维素结合结构域组成的多肽杂合体, 以及通过在芽孢杆菌宿主中表达而生产这种杂合体的方法, 所述方法包括在一定条件下培养已转化的宿主, 从而使已转化的培养物基本上无未转化的细胞; 在营养培养基中培养已转化的培养物以使所述杂合体过量产生; 以及回收该杂合体。

CBD 的表达

重组表达载体

包含编码本发明 CBD 的 DNA 构建体的重组载体可以是可方便用于重组 DNA 操作的任何载体, 载体的选择常常取决于其将被导入的宿主细胞。导入载体的宿主细胞通常是指已转化的宿主细胞。这样的转化表示采用例如原生质体、天然的感受态细胞、转染、接合、电穿孔或任何相当的方法将 DNA 导入宿主细胞。因此, 载体可以是自主复制型载体, 即作为染色体外实体存在的载体, 其复制独立于染色体的复制, 例如质粒。或者, 载体可以是这样一种载体, 当将其导入宿主细胞时, 能部分或全部整合到宿主细胞基因组中并随其整合入的染色体一起复制。

载体优选地是一种表达载体, 其内编码本发明 CBD 的 DNA 序列可

操作地与该 DNA 转录所需的附加区段相连接。通常，表达载体是从质粒或病毒 DNA 衍生而来的，或者同时含有二者的元件。术语“可操作地连接”是指所述区段的排列方式使得它们能够协调地发挥作用而达到预期目的，例如由启动子起始转录并穿过编码 CBD 的 DNA 序列进行下去。

该启动子可以是在选定的宿主细胞中有转录活性的任何 DNA 序列，其可以衍生自编码宿主细胞的同源或异源蛋白质的基因。

可用于细菌宿主细胞的合适的启动子的实例包括嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽原淀粉酶基因的启动子，地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的启动子，解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的启动子，枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的启动子，或短小芽孢杆菌木糖苷酶基因的启动子，或者 λ 噬菌体 P_R 或 P_L 启动子，或者大肠杆菌 lac, trp 或 tac 启动子。或者，可以设计整合载体，使得仅在其正确整合至宿主细胞基因组中(如旁侧启动子的下游)，方可有效地表达编码 CBD 的 DNA。

必要时，编码本发明 CBD 的 DNA 序列也可以可操作性地连接一种合适的终止子。

本发明的重组载体还可包含可使所述载体在选用的宿主细胞中复制的 DNA 序列。

载体还可以包含一种选择性标记，例如，其产物可弥补宿主细胞内一个缺陷的基因，或者，编码对诸如卡那霉素、氯霉素、红霉素、四环素、链霉素等抗生素的抗性或对重金属或除草剂的抗性的基因。

为了将本发明的 CBD 引入宿主细胞的分泌途径，可以在重组载体中提供一种分泌信号序列(也已知为前导序列、前原序列或前序列)。该分泌信号序列是以正确的阅读框架与编码所述 CBD 的 DNA 序列连接在一起的。分泌信号序列通常位于编码 CBD 的 DNA 序列的 5' 端。该分泌信号序列可以是通常与 CBD 有关的分泌信号序列，也可以来自编码另一种分泌蛋白质的基因。

本领域熟知用来分别连接编码本发明 CBD 的 DNA 序列、启动子和任选的终止子和/或分泌信号序列或用来通过合适的 PCR 扩增方案组装这些序列，并将它们插入含有复制或整合所需信息的合适载体中的方法

(参见例如 Sambrook 等, 出处同前)

绿色荧光蛋白 (GFP) 已广泛用作监控基因表达的报道分子, 细胞系的示踪物以及蛋白质的融合标记 (Cramer 等 (1996); Cubitt 等 (1995); 国际专利申请 PCT/DK96/00051)。

GFP 可与 CBD 融合而产生具有纤维素结合性质以及发荧光性质的融合蛋白。可利用这一融合蛋白的表达来监控 CBD 在芽孢杆菌各种中的表达情况, 因此可用于优化给定 CBD 的表达水平。

实施例

材料与方法

菌株:

Bacillus agaradherens NCIMB No. 40482 包含实施例 8 中的编码内切葡聚糖酶的 DNA 序列。

大肠杆菌: SJ2 (Diderichsen, B. 等 (1990)) 利用 Bio-Rad Gene Pulser™, 按照生产商的推荐方法制备电感受态细胞和进行转化。

枯草芽孢杆菌 PL2306: 该菌株为枯草芽孢杆菌 DN1885 (Diderichsen, B. 等 (1990)) 在已知的枯草芽孢杆菌纤维素酶基因的转录单位中发生破坏而产生的纤维素酶阴性细胞。此外, 该菌株的 *aprE* 和 *nprE* 基因 (*aprE*: Stahl 和 Ferrari (1984); *nprE*: Yang 等 (1984)) 也已被破坏。这种破坏基本上按照 Sonenshein 等编 (1993), P618 中所述进行。

枯草芽孢杆菌 PL2304. 该菌株为枯草芽孢杆菌 DN1885 (Diderichsen B., 出处同前) 在已知的枯草芽孢杆菌纤维素酶基因的转录单位中发生破坏而产生的纤维素酶阴性细胞。这一破坏基本上按照 A. L. Sonenshein (编) (出处同前) 中所述进行。

质粒:

pMB100, 它是 pDN1528 (S. Jørgensen 等 (1991)) 的衍生物。该质粒基本上与 pDN1528 相同, 只是为了进行克隆, 前者在 *amyL* 基因的终止密码子和终止子之间导入了一个 *SacI* 位点。

pDN1981 (P. L. Jørgensen 等 (1990))

溶液/培养基

TY 和 LB 琼脂(如 Ausubel, F.M. 等(1995)所述)

SB: 在无菌水中混合 32g 蛋白胨, 20g 酵母提取物, 5g NaCl 和 5ml 1N NaOH 至终体积为 1 升。该溶液在 121℃ 下, 高压蒸气灭菌 20 分钟。

10% Avicel: 将 100g Avicel (FLUKA, 瑞士)与无菌水混合至终体积为 1 升。此 10% Avicel 在 121℃ 下高压蒸气灭菌 20 分钟。

Congo 红(SIGMA, 美国)贮存液: 1%于离子化水中。

缓冲液: 0.1M 磷酸钾, pH7.5。

普通分子生物学方法:

利用分子生物学标准方法(Sambrook 等(1989), 分子克隆实验室手册, 冷泉港实验室, 冷泉港, NY; Ausubel F.M. 等, 1995; Harwood 和 Cutting, 1990)进行 DNA 操作和转化。

按照供应商的详细说明使用 DNA 操作中的酶。

实施例 1-3

基因组 DNA 的分离

在 TY 中, 于 30℃, 250rpm 下培养粪肥纤维单胞菌 24 小时, 通过离心收获细胞。

60℃ 下, 在国家工业和海洋细菌保藏有限公司(苏格兰)推荐的特殊培养基中厌氧地培养粪堆梭菌 NCIMB 11754。通过离心收获细胞。

30℃ 下, 在 TY 琼脂板上培养荧光假单胞菌纤维素亚种 NCIMB10462 24 小时。刮下细胞用于分离基因组 DNA。

按照 Pitcher 等(1989)中描述的方法分离上述提及的任一种的基因组 DNA。

鉴定糖基水解酶中存在的纤维素结合结构域

根据其氨基酸序列, 将纤维素结合结构域划分为 10 个家族, 见

Tommel 等(出处同前)。基于该综述文章的公开内容,选择三种潜在不同的 CBD 序列作为旨在研究枯草芽孢杆菌中表达情况的模型:

从家族 II a 中选出粪肥纤维单胞菌(ATCC 484)纤维素酶 CenA (GenBank 和 SWISS-PROT Accession No. M15823)的 CBD 和荧光假单胞菌(NCIMB 10462)CelB (GenBank 和 SWISS-PROT Accession No. X52615)的 CBD。

从家族 VI 中选出粪堆梭菌(NCIMB 11754) XynA (GenBank 和 SWISS-PROT Accession No. 13325)的 CBD 二聚体。

所得到的 SWISS-PROT 数据中描述了推定的纤维素结合结构域的位置,利用该信息来特异性地设计 PCR 引物以用于从这三种不同的细菌中得到编码 CBD 的 DNA 片段。

同时,设计 PCR 引物使其添加上相应于 amyL 之信号序列的氨基酸的额外密码子,该序列用于引导 CBD 至枯草芽孢杆菌细胞的外部。

粪肥纤维单胞菌(ATCC 484)纤维素酶 CenA 的 CBD 的体外扩增

在包含每种 dNTP 各 200 μ M, 1.5% DMSO(SIGMA, 美国), 2.5 单位的 AmpliTaq 聚合酶(Perkin-Elmer, Cetus 美国)和各 100pmol 的下述引物:

CELFIM01U,

5'- CTG CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT GCT CCC GGC
TGC CGC GTC GAC TAC -3'

CELFIM01D,

5'-CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAC ACG GTG CCC GTG CAG
GTG GTG -3'

划线处为 PstI 和 SacI 限制性位点

的 PCR 缓冲液(10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% (w/v)明胶)中对大约 100-200ng 基因组 DNA 进行 PCR 扩增。

在 DNA 热循环仪(Landgraf, 德国)进行 PCR 反应。先在 94℃ 下保温 5 分钟,接着按下述循环方案进行 PCR 30 个循环: 94℃ 变性 1 分钟,

65℃退火 1 分钟以及 72℃延伸 1 分钟。通过在 1.5%琼脂糖凝胶 (Nasieve, FMC) 上进行电泳, 并以 ReadyLoad 100bp DNA 梯度 (GibcoBRL, Denmark) 作为分子量标记, 对 10 μl 的扩增产物等分试样进行分析。

荧光假单胞菌 (NCIMB 10462) CelB 的 CBD 的体外扩增

在添加了每种 dNTP 各 200 μM、2.6 单位 HiFidelity™ Expand 酶混合物和各 300pmol 的下述引物:

PSUPPER,

5'-CGT CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT GCA GCA GTG
TGT GAA TAT CCG G -3'

PSLOWER,

5'-CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAT TGT CCA CCG CAA ATC
GCC -3'

划线处为 PstI 和 SacI 限制性位点

的 HiFidelity™ PCR 缓冲液 (Boehringer Mannheim, 德国) 中对大约 100-200ng 基因组 DNA 进行 PCR 扩增。

在 DNA 热循环仪 (Landgraf, 德国) 中进行 PCR 反应。首先是 94℃ 下 2 分钟, 60℃ 下 30 秒和 72℃ 下 45 秒温育一个循环, 接着按照下述循环方案进行 PCR 10 个循环: 94℃ 变性 30 秒, 60℃ 退火 30 秒和 72℃ 延伸 45 秒, 再按下述方案进行 20 个循环: 94℃ 下 30 秒, 60℃ 下 30 秒和 72℃ 下 45 秒 (在此延伸步骤中每一循环均增加 20 秒)。通过在 1.5% 的琼脂糖凝胶 (Nusieve, FMC) 上电泳, 以 ReadyLoad 100bp DNA 梯度 (GibcoBRL, Denmark) 作为分子量标记, 对 10 μl 扩增产物等分试样进行分析。

粪堆梭菌 (NCIMB 11754) XynA 的 CBD 二聚体的体外扩增

在补充了每种 dNTP 各 200 μM、2.6 单位的 HiFidelity™ Expand 酶混合物和各 300pmol 的下述引物:

CLOST03U,

5'- CTG CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT CCA ACT CCT
GCC CCA TCT CAA AGC -3'

CLOST03D2,

5'- CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAC CAG TCA ACA TTA ACA
GGA CCT GAG-3'

划线处为 PstI 和 SacI 限制性位点

的 HiFidelity™ PCR 缓冲液 (Boehringer Mannheim, 德国) 中对大约 100-200ng 基因组 DNA 进行 PCR 扩增。

在 DNA 热循环仪 (Landgraf, 德国) 中进行 PCR 反应。首先是 94℃ 下 2 分钟, 60℃ 30 秒和 72℃ 下 45 秒进行一次温育, 接着按下列循环方案进行 10 个 PCR 循环: 94℃ 变性 30 秒, 60℃ 退火 30 秒和 72℃ 延伸 45 秒, 再按以下循环方案进行 20 个循环: 94℃ 下变性 30 秒, 60℃ 下 30 秒, 72℃ 下 45 秒 (在此延伸步骤中每个循环均增加 20 秒)。通过在 1.5% 的琼脂糖凝胶 (NuSieve, FMC) 上电泳, 并以 ReadyLoad 100bp DNA 梯度 (GibcoBRL, Denmark) 作为分子量标记, 对 10 μl 扩增产物等分试样进行分析。

通过聚合酶链反应 (PCR) 进行克隆:

PCR 片段的亚克隆

用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, USA), 按照生产商说明纯化上述产生的 PCR 产物 40 μl 等分试样。用 50 μl 10mM Tris-HCl, pH8.5 洗脱已纯化的 DNA。用 SacI 和 PstI 消化 25 μl 已纯化的 PCR 片段, 在 1.5% 低熔点琼脂糖 (SeaPlaque GTG, FMC) 凝胶上电泳, 从胶上切下相关的片段, 并用 QIA quick 凝胶抽提试剂盒 (Qiagen, 美国) 按照生产商说明进行纯化。然后将已分离的 DNA 片段连接到经 PstI、SacI 消化的 pMB100 上, 用该连接混合物转化枯草芽孢杆菌 PL2306。

阳性克隆的鉴别和鉴定

细胞铺于含有氯霉素($6\mu\text{g/ml}$), 0.4%葡萄糖和 10mM 磷酸氢钾的 LB 琼脂平板上, 并在 37°C 下培养过夜。第二天, 将菌落再划线到新鲜的 LBPG 氯霉素琼脂板上, 并在 37°C 下培养过夜。一天后将每一克隆的单菌落转移到含氯霉素($6\mu\text{g/ml}$)的液体 LB 培养基中, 于 37°C 以 250rpm 振荡培养过夜。

用 QIAgen 质粒纯化小试剂盒(Qiagen, 美国), 按照生产商说明, 从液体培养物中提取质粒, 与说明书不同的是, 在于 37°C 裂解细胞 15 分钟前, 在重悬缓冲液中补充了 1mg/ml 的鸡蛋白溶菌酶(SIGMA, 美国)。用 PstI 和 SacI 消化 $5\mu\text{l}$ 质粒样品。消化产物经 1.5%琼脂糖凝胶(NuSieve, FMC)电泳进行检测。出现一个大小与 PCR 扩增产物相同的 DNA 片段表明为阳性克隆。选出三个克隆, 它们分别代表上述提及的来自三种不同细菌的 CBD: MB144 (表达粪肥纤维单胞菌 CenA-CBD)、MB203(表达粪堆梭菌 XynA 二聚体 CBD)和 MB207(表达荧光纤维单胞菌纤维素亚种 CelB-CBD)。

已克隆 DNA 片段的核苷酸测序

使用以上用过的同样引物和 Taq 双脱氧末端循环测序试剂盒(Perkin Elmer, USA), 采用 Applied Biosystems 373A 自动测序仪, 按照生产商说明, 对经 Qiagen 纯化的质粒 DNA 进行测序。

克隆 CBD 的表达、分泌和功能分析

克隆 MB144(表达粪肥纤维单胞菌 CenA-CBD), MB203(表达粪堆梭菌 XynA 二聚体 CBD)和 MB207(表达荧光假单胞菌纤维素亚种 CelB-CBD)均在 SB 培养基中于 37°C , 250rpm 培养 20 小时。将 1ml 无细胞的上清液与 $200\mu\text{l}$ 10% Avicel 混合。将该混合物置于 0°C 1 小时。在 CBD 和 Avicel 结合后, 将有 CBD 的 Avicel 于 5000g 离心 5 分钟。将沉淀物重悬浮于 $100\mu\text{l}$ SDS-PAGE 缓冲液中, 在 95°C 煮 5 分钟, 以 5000g 离心 5 分钟, 再取 $25\mu\text{l}$ 上样到 18% Laemmli Tris-甘氨酸, SDS-PAGE NOVEX 凝胶(Novex, 美国)上。按照生产商推荐的方法在 Xcell™ 微槽

(NOVEX, 美国)中电泳, 按照生产商所述进行凝胶的所有后续操作, 包括用考马斯染色、脱色和干燥。

出现预期大小的蛋白质条带(MB144 蛋白质条带大约是 12kDa, MB203 蛋白质条带约是 35kDa, MB207 蛋白质条带约是 12kDa)表明在枯草芽孢杆菌中表达了有功能性的 CBD。

实施例 4

由粪堆梭菌克隆的 CBD 二聚体的表达和纯化

用分离自 MB203 的质粒转化另一种枯草芽孢杆菌 TOC46, 这样获得了一种表达 CBD 二聚体的新克隆 MB206。用这株菌作为 CBD 二聚体的表达宿主, 在含有 SB 培养基 (氯霉素 $6\mu\text{g/ml}$) 的摇瓶中于 37°C 并以 250rpm 振荡培养该克隆 20 小时。

在冰浴上冷却 1400ml 的培养液上清。用 Whatman 玻璃过滤器 F 过滤, 再通过 0.45 微米的 Millipore HVLP 型滤器过滤除菌。

在室温下, 将 50g Avicel 悬浮在 0.1M 磷酸钠缓冲液; 30 分钟。去除上清并将 Avicel 悬浮液冷却至 4°C 。将清亮上清液在 4°C 混合 30 分钟。

使 Avicel 静置 10 分钟, 然后除去上清。将 Avicel 蛋白质复合物装入柱中并用 0.1M 磷酸钠缓冲液洗涤, 接着用含有 0.5M 氯化钠的缓冲液洗。最后, 用去离子水洗脱 CBD。

含有 CBD 的洗脱液总体积为 78ml。加入固体氯化钠至终浓度为 0.5M 后, 在有拦截 8kD 分子的 R81P 膜的 Amicon 槽中浓缩 CBD。

已浓缩的 CBD 溶液(30ml)在 280nm 的吸收值为 1.2。MB206 的克分子消光系数为 42000, 对应于蛋白质浓度为 0.82, 这样可得出高度纯化的双 CBD 的总量为 25mg。根据 SDS-PAGE, 起始材料每毫升有 0.1mg 的 29kD 蛋白质。最终的纯化产物在 SDS-PAGE 上仅显示一条带。

实施例 5

在枯草芽孢杆菌中克隆和表达的二聚化真菌 CBD 的鉴定

通过融合由 *Humicola insolens* EGII 的 DNA 序列编码的 CBD 与由源于 *Humicola insolens* 的所述 43kDa 的 DNA 序列所编码的 CBD 而构建出一种真菌起源的 CBD 二聚体。

利用特异于 CBD 区的引物, 从携有 EG II (又称为 CMC3) (Dalbøge 和 Heldt Hansen, 1994) 的 cDNA 的质粒中 PCR 扩增出编码 *Humicola insolens* EG II CBD 和接头的 DNA 序列, 此外, 将反义引物设计成使所得 PCR 片段具有与编码前一 CBD 的 DNA 片段相同的突出, 所述 CBD 由详述于 EP-B-0531372 和 US5457046 中的 *H. insolens* 之 43kDa 内切葡聚糖酶基因所编码。从 EP-B-0531372 中所述的 *Humicola insolens* 的基因组 DNA 中 PCR 扩增编码此 CBD 的 DNA。

用下述引物:

#22857

5'- CTG CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT CAG GGC GGT
GCA TGG CAG CAG-3'

#20622

5'- CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAC AGG CAC TGA TGG TAC
CAG TC-3'

通过 SOE-PCR (Higuchi 等(1988)) 将所述两片段组合起来。

将此 PCR 片段作为 PstI-SacI 片段连接至 pMB100 中, 用连接混合物转化枯草芽孢杆菌 PL2306。

主要编码 CBD 二聚体的克隆 DNA 可在序列 CBD-EG II -CZ (327bp):

GCAAATCTTA ATCAGGGCGG TGCATGGCAG CAGTGTGGTG GCGTTGGCTT
CTCGGGCTCT ACGTCCTGTG TGTCCGGTTA CACGTGCGTG TACTTGAACG ACTGGTA-
CAG CCAATGCCAG CCGCAGCCGA CGACGTTACG GACAACAACA ACGCCAGGGG
CAACATCGAC AACAAGGTCA GCCCCGGCTG CCACTTCAAC CACTCCGGCC
GGCTGCACTG CTGAGAGGTG GGCTCAGTGC GCGGCAATG GCTGGAGCGG CTGCAC-
CACC TCGGTCGCTG GCAGCACTTG CACGAAGATT
AATGACTGGT ACCATCAGTG CCTGTAG

和相应的氨基酸序列(108 个氨基酸残基):

ANLNQGGAWQ QCGGVGFSGS TSCVSGYTCV YLNDWYSQCQ PQPTTLRTTT

TPGATSTTRS APAATSTTPA GCTAERWAQC GGNGWSGCTT CVAGSTCTKI NDWYHQCL
中找到。

如上所述进行 CBD 的表达、分泌和功能性分析。

实施例 6:

构建 GFP-CBD 融合体以用于优化 CBD 的表达

在含有每种 dNTP 各 200 μ M, 1.5% DMSO (SIGMA, USA), 2.5 单位的 AmpliTaq 聚合酶(Perkin-Elmer, Cetus, 美国)和各 100pmol 下述引物:

C-融合体 1:

5'-GTC AGT GAA TTC GCA TGC GTC CTT CTT TGT GCT TG-3'

C-融合体 2:

5'-CTC ATA AAG CTT ACG GTG CCC GTG CAG GTG GTG-3'

下划线处为 EcoR I 和 HindIII 限制性位点

的 PCR 缓冲液(10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01%(w/v)明胶)中, PCR 扩增按上述方法分离的 100ng 质粒 DNA pMB144。

在 DNA 热循环仪(Landgraf, 德国)中进行 PCR 反应。首先在 94℃ 温育 5 分钟, 接着按下述循环方案进行三十个循环的 PCR: 94℃ 变性 1 分钟, 60℃ 退火 1 分钟和 72℃ 延伸 1 分钟。通过在 0.7%的琼脂糖凝胶(NuSieve, FMC)中电泳, 并以 Readload 100bp DNA 梯度(GibcoBRL, Denmark)作为分子量标记, 对 10 μ l 扩增产物等分试样进行分析。

对该片段进行纯化、EcoR I 和 HindIII 消化以及凝胶纯化, 并连接至载体 pBR322 (Bolivar 等(1977), 基因, 2, 95-113)中。

用连接混合物转化 SJ2 电感受态大肠杆菌。

阳性克隆的鉴定和表征

将转化细胞平铺于含有氨苄青霉素(200 μ g/ml)的 LB 琼脂平板上并在 37℃ 下培养过夜。一天后将菌落重新划线至新鲜的 LB-氨苄青霉素琼脂平板上, 在 37℃ 下培养过夜。第二天将每个克隆的单菌落转移

至含有氨苄青霉素($200\text{ }\mu\text{g/ml}$)的 LB 液体培养基中,在 37°C 下以 250rpm 振荡培养过夜。

用 QIAgen 质粒纯化小型试剂盒(Qiagen, 美国),按照生产商说明从液体培养物中提取质粒。用 HindIII 和 EcoRI 消化 $5\text{ }\mu\text{l}$ 质粒样品。通过在 0.7% 琼脂糖凝胶(NuSieve, FMC)上凝胶电泳而检测消化产物。

从按照国际专利申请 PCT/DK96/00051 中所述构建的突变体 F64L-S65T-GFP 的 DNA 构建物中克隆获得 GFP 的衍生物。

将编码此 F64L-S65T-GFP 的 DNA 片断作为 BamHI-HindIII 片断,与已克隆至 pBR322 中的 CBD 编码 DNA 读框一致地克隆。基本上按上述方法进行连接、转化和阳性克隆的鉴定。

将此融合构建物以 EcoRI-BamHI 片段形成从大肠杆菌载体中转换至 pUB110 载体(Gryczan 等(1978))中。转化枯草芽孢杆菌 PL2306,通过其发光能力以及可结合 Avicel 的 F64L-S65T-GFP CBD 融合多肽的存在来鉴定阳性克隆。

用于激发本研究中 F64L-S65T-GFP 的光波长为 488nm ,其激活 F64L-S65T-GFP,从而发出 $510\text{--}530\text{nm}$ 的光。

通过荧光分光术测量上清中的荧光,并与同 Avicel 共温育后的上清的荧光进行比较。此外,通过使融合蛋白结合至 Avicel,去除多余的上清,并将 Avicel 移至比色杯中用于在荧光分光光度计中检测荧光,即可以肉眼观察到带有 CBD 的发光分子。

通过制备结合于或未结合于 Avicel 的融合蛋白的系列稀释度,可以确定表达水平,这样就可以鉴定出以相对较高水平表达 CBD 的芽孢杆菌克隆。

实施例 7

用 CMC-CongoRed 筛选

可通过 CBD 表达水平的分析筛选出能表达 CBD 的重组芽孢杆菌克隆。

为了找到表达给定 CBD 的最佳芽孢杆菌菌株,在合适培养基(例如

上述的 TY) 中, 适当的生长条件下培养目的克隆 24 小时。将诸克隆的上清转移至挖有孔洞的琼脂糖-CMC-CongoRed 平板上, 使具有 CBD 的上清与 CMC 在 37℃ 下结合 5 小时。当用 2%NaCl 溶液洗 15 分钟时, 即可看到作为一个清晰区域的 CBD 活性。

平板分析可按以下方法进行。

用于 CBD 平板分析的凝胶的制备: 用 96%乙醇润湿 CMC (CMC: 羧甲基纤维素, 7LF, 来自 Hercules) 和琼脂糖 (Litex HSA/HSB) 而制备 0.5%CMC 和 0.7%琼脂糖。加入 0.1M 磷酸钾 pH7.5 缓冲液, 加热混合物至 100℃ 直至完全溶解。将溶液冷却至 60℃。加入 Congo Red 贮存液至终浓度 5%, 倒平板, 每个直径 9cm 的 Petri 平皿中倒入 15ml。

用打孔器制作装样品的孔。

实施例 8

定义一种新 CBD 家族的新 CBD 的鉴定

通过在 SB 培养基中, 于 37℃ 下, 250rpm 振摇培养克隆 20 小时, 从而表达下述的克隆于枯草芽孢杆菌中的碱性纤维素酶。由于其具有与 Avicel 特异性结合的能力, 显示所表达的纤维素酶含有 CBD。

当继续培养 20 小时时, 该纤维素酶发生蛋白水解性切割, 在 SDS-PAGE 上可看到两条特异的蛋白质条带, 其中一条相当于纤维素酶催化部分, 其分子量 (MW) 为大约 35kD, 另一条相当于预计的接头和 CBD, 分子量约 8kD。

已发现该 CBD 位于该纤维素酶的 C-末端部分, 并且该 CBD 与以前描述的任何 CBD 家族都不相符 (Tomme 等, 1995, 第 142—161 页)。据此, 这个 CBD 是一个新家族的首位成员。

从 *Bacillus agaradherens* 克隆碱性纤维素酶并在枯草芽孢杆菌中表达碱性内切葡聚糖酶

通过 PCR 克隆编码 *Bacillus agaradherens* (保藏号 NCIMB 40482) 碱性纤维素酶的核苷酸序列, 以用于插入到表达质粒 pDN1981 中。

基本上如上述对 500ng 基因组 DNA 进行 PCR, 其中使用含 Nde I 和 Kpn I 限制位点的下述两个引物:

引物 5: (#20887)

5'-GTA GGC TCA GTC ATA TGT TAC ACA TTG AAA GGG GAG GAG AAT CAT
GAA AAA GAT AAC TAC TAT TTT TGT CG-3'

引物 6: (#21318)

5'-GTA CCT CGC GGG TAC CAA GCG GCC GCT TAA TTG AGT GGT TCC CAC
GGA CCG-3'

所述 Nde I 和 Kpn I 位点用于将编码内切葡聚糖酶的 DNA 序列导入 pDN1981 中以便进行表达。

在 PCR 后, 用 QIAquick PCR 柱试剂盒 (Qiagen, 美国) 按照生产商说明纯化 PCR 片断。将纯化的 DNA 在 50 μ l 10mM Tris-HCl pH8.5 中洗脱。经 Nde I 和 Kpn I 消化, 进行纯化, 再连接至已消化的 pDN1981 中。用连接混合物转化枯草芽孢杆菌 PL2304。制备感受态细胞并按照 Yasbin 等 (1975) 所述进行转化。

枯草芽孢杆菌转化体的分离和检测

将已转化细胞平铺于含有 10mg/ml 卡那霉素, 0.4%葡萄糖, 10mM KH_2PO_4 和 0.1% AZCL HE 纤维素 (Megazyme, 澳大利亚) 的 LB 琼脂平板上, 在 37℃ 下培养 18 小时。周围有蓝晕的克隆被鉴定为内切葡聚糖酶阳性克隆。

将每一阳性转化体接种在 10ml 含有 10mg/ml 卡那霉素的 TY 培养基中。经 37℃、250rpm 培养一天后, 取出 50ml 上清。通过将 50ml 上清加到在含有 0.1% AZCL HE-纤维素的 LB 琼脂平板上所挖的孔中而鉴定内切葡聚糖酶活性。

在 37℃ 下培养 16 小时后, 周围有蓝晕的孔表示枯草芽孢杆菌中有内切葡聚糖酶的表达。

实施例 9

选择 CBD 的方法

制备磷酸溶胀的纤维素(PASC)

用水湿润 5g Avicel, 加入到 150ml 冰冷的 85%磷酸中, 在冰浴中轻微地搅拌 1 小时。然后边搅拌边加入 500ml 冷丙酮。用玻璃过滤漏斗过滤已溶胀的 Avicel (PASC), 并用 100ml 冰冷的丙酮洗 3 次, 随后用 500ml 水洗两次。然后将 PASC 悬浮在 500ml 水中, 并用 Ultra Thorax 匀浆器混合均匀。将 PASC 冷藏。

CBD 与磷酸溶胀的纤维素(PASC)的结合—CBD 的选择

将 Eppendorf 管中溶解于 50mM 磷酸钠 pH7 的 400ml 10mg/ml PASC(按照上述制备, 并经 50mM 磷酸钠 pH 清洗)与稀释于 50mM 磷酸钠, pH7 中的 400ml 纤维素结合结构域(Cel5A CBD 或 MB206 双 CBD)混合。改变 CBD 的浓度, 例如, 从 0mM 至约 8mM 的 Cel5A CBD。设计一个没有 PASC 的对照组。将样品在室温下温育 1 小时, 然后在 14000g 离心 4 分钟。将 500 μ l 上清稀释成 2ml 水。在 Perkin-Elmer LS50 分光光度计(激发光为 280nm, 发射光为 340nm)中, 通过色氨酸荧光光度术测定上清中存在的 CBD(游离 CBD)量, 其中使用不加入 PASC 的样品的荧光密度作为参照(标准曲线)。然后可按照:

总 CBD(未加 PASC)-游离 CBD

计算出已结合的 CBD 量。这样, 将每克 PASC 结合 CBD 的量作为溶液中游离 CBD(以 mM 表示)的函数作图, 即可得到结合等温线见图 1 和图 2。数据可用简单的 Langmuir 结合模式(Bothwell 等, (1995)进行调整: $E(\text{结合}) = (A_{\text{最大值}} \times E(\text{游离}) / (K_d + E(\text{游离})))$, 其中 $E(\text{结合})$ 是以 mmol/gPASC 表示的已结合的 CBD 量, $E(\text{游离})$ 是以 mM 表示的游离 CBD 量, $A_{\text{最大值}}$ 是可与 PASC 结合的 CBD 的最大量, K_d 是平衡 $E(\text{结合}) \ll E(\text{游离})$ 的平衡常数。这样, K_d (解离常数)越低, 结合就越强。将数据用 GraphPad Prism 中的算法调整成该模式, 即可获得这些常数。Cel5A CBD 和 MB206 双 CBD 的解离常数分别是 0.42 和 0.76mM (参见图 1 和图 2)。

本发明 CBD 的解离常数低于 1mM, 更优选为低于 0.1mM, 最优选为

低于 $10\mu\text{M}$.

参考文献

- Bothwell, M. K. 和 Walker, L. P (1995) 生物资源技术 53: 21-Kraulis P., G.M. Clore, M. Nilges, T.A. Jones, G. Pettersson, J. Knowles 和 A. M. Gronenborn, 1989, *Trichoderma reesei* 纤维二糖水解酶 I 的 C-末端结构域的三维结构的确定。运用核磁共振的杂交体距离几何动力学刺激的退火进行的研究。” 生物化学 28: 7241-7257.
- Ong E., N.R. Gilkes, R.C. Miller 和 D.G. Kilburn, 1993, “粪肥纤维单胞菌的一种外切葡聚糖酶的纤维素结合结构域——在大肠杆菌内生产和该多肽的特征。” 生物技术和生物工程, 42: 401-409.
- Linder M., I. Salovuori, L. Ruohonen 和 T. T. Teeri, 1996. “双纤维素结合结构域的特征——与晶状纤维素的协同性高亲和力结合”, 生物化学杂志, 271: 21268-21272
- Peter Tomme 等。 “纤维素结合结构域分类和性质”, 在不溶性碳水化合物的酶促降解” 一书中, John N. Saddler 和 Michael H. Penner(编), ACS 论文集, No 618, 1996.
- Hockney, R. C. (1994) TIBTECH, Vol. 12. p.456-463. Emmanuel Brun 等(1995), 欧洲生物化学杂志, 231, 142-148
- N. R. Gilkes 等(1991) 欧洲生物化学杂志, 202: 367-377.
- Bertus van den Berg 等(1993) 将双硫键引入枯草芽孢杆菌中性蛋白酶中。蛋白质工程, Vol. 6, no.5, p.521-527.
- A. L. Sonenshein, J. A. Hoch 和 Richard Losick (编)(1993) 枯草芽孢杆菌和其他革兰氏阳性细菌, 美国微生物世界, 第 939 页和第 618 页
- Andreas Cramer 等(1996) 利用 DNA 重排, 通过分子进化改进绿色荧光蛋白。自然生物技术, Vol. 14, 315-319
- Andrew B. Cubitt 等(1995) 了解、改进并利用荧光蛋白, TIBS, Vol20, p448-455.
- Diderichsen B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sj

φ holm, C. (1990) 克隆编码-乙酰乳酸羧酶(其为短芽孢杆菌的外切酶)的 aldB. 细菌学杂志, 172, 4315-4321.

Stahl, M. L. 和 E. Ferrari (1984) 用体外生成的缺失突变代替枯草芽孢杆菌的芽孢杆菌蛋白酶结构基因. 细菌学杂志, 158: 411-418

Yang, M. Y. 等 (1984) 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶基因的克隆以及所克隆基因在产生的体外生成的缺失突变中的用途. 细菌学杂志, 160: 16-21

S. Jφ rgensen 等 (1991) 细菌学杂志, Vol. 173, No., 559-567

P. L. Jφ rgensen, C. K. Hansen, G. B. Poulsen 和 B. Diderichsen (1990) 体内遗传工程, 作为质粒构建工具的同源重组, 基因, 96, p37-41.

Ausubel, F. M. 等 (编) “分子生物学通用方法”, John Wiley 和 Sons, 1995

Sambrook 等 (1989) 分子克隆: 实验室手册, 冷泉港实验室, 冷泉港, NY.

Harwood, C. R. 和 Cutting, S. M. (编) “芽孢杆菌的分子生物学方法”. John Wiley 和 Sons, 1990

Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J. (1989) 用硫氰酸胍快速提取细菌基因组 DNA. 应用微生物学报, 8, 151-156

Devereux 等。

Dalbφ ge, H. 和 H. P. Heldt Hansen. 1994, 高效表达克隆真菌酶基因的方法. 分子和普通遗传学, 243: 253-260

Higuchi 等 (1988) NAR 16: 7351-7367

Gryczan, T. J. 等 (1978) 细菌学杂志, 134, p. 318-319.

Tomme P., R. A. Warren, R. C. Miller, Jr. D. G. Kilburn 和 N. R. Gilkes 1995. 纤维素结合结构域: 分类和性质. Saddler J. N. 和 M. H. Penner (编) 不溶性碳水化合物酶促降解. 华盛顿特区, 美国化学协会, 第 142-161 页

Yasbin, R. E., Wilson, G. A. 和 Young, F. E. (1975)、枯草芽孢杆菌

溶源性菌株中的转化和转染：在感受态细胞中选择性地诱导原噬菌体的证据。细菌学杂志，121： 296-304

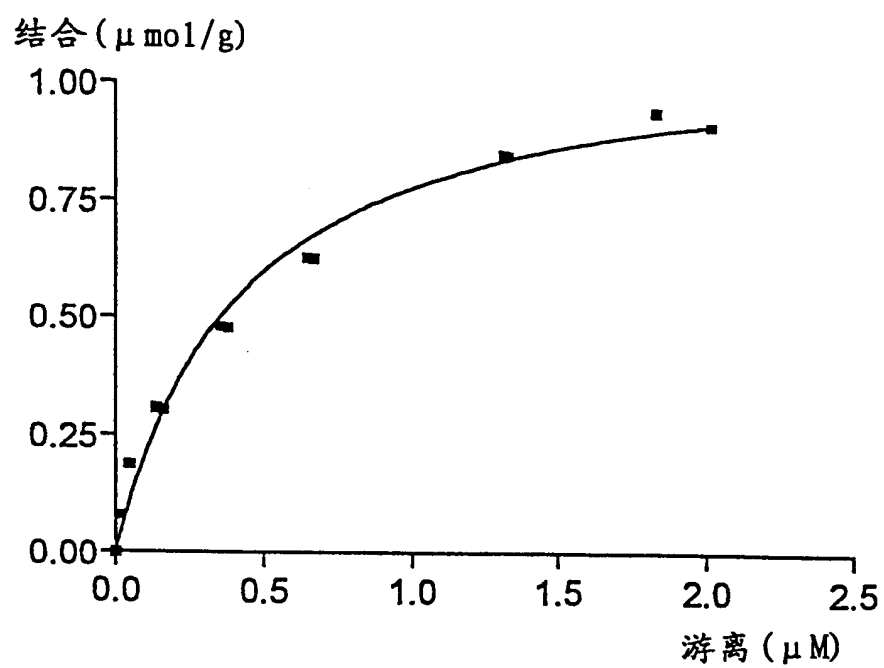


图1

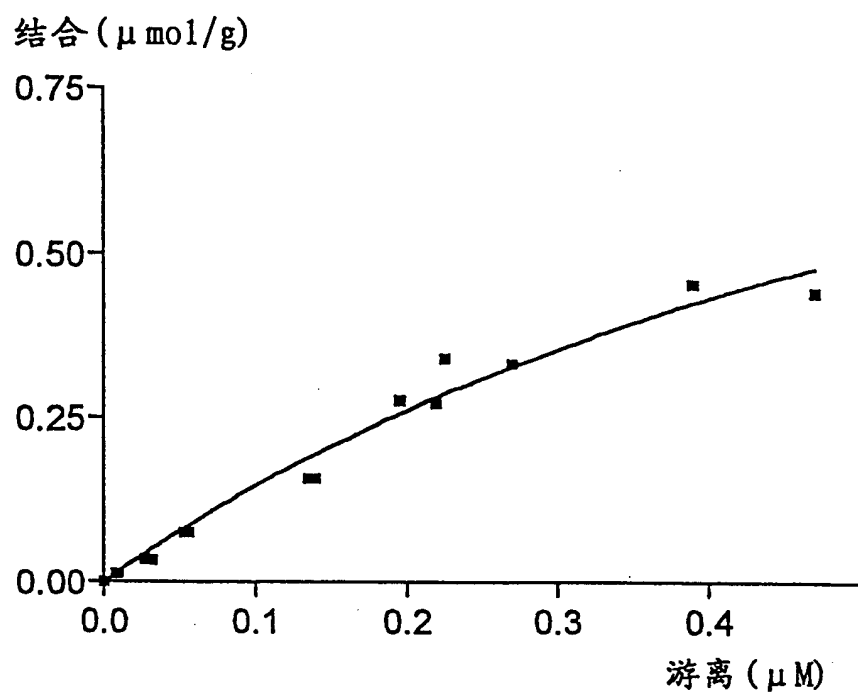


图2