



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102471773 A

(43) 申请公布日 2012.05.23

(21) 申请号 201080035375.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.08.02

C12N 15/63 (2006.01)

(30) 优先权数据

09010287.2 2009.08.10 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 10

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/EP2010/061195 2010. 08. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02011/018377 EN 2011.02.17

(71) 申请人 龙沙股份公司

地址 瑞士菲斯普

(72) 发明人 M·文泽尔 J·埃尔滕布克纳

C·基茨亚克 M·西曼赫茨伯格

(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 11038

代理人 罗菊华

权利要求书 2 页 说明书 30 页

序列表 2 页 附图 10 页

(54) 发明名称

发酵方法

(57) 摘要

本发明涉及培养宿主细胞的发酵方法,所述细胞包含载体,所述载体包含甘露糖操纵子的诱导型启动子,其中甘露糖操纵子的诱导型启动子控制编码多肽的核酸序列的表达,尤其是,本发明涉及在多肽生产中包含甘露糖操纵子的诱导型启动子的原核生物宿主细胞的高细胞密度发酵。

TTTATCTCA TTGGAATTA TAAAGCAGS GATTATTCCT TCGTTTTTT -35
GTTATAGGGA AAAATGCCCT TATTACCGGA ACCATTGGGA AAAAAGCGA
-10 +1 *Sg* II
TTTAAAGCA CTGATTTCCG TA TACAGTG AGACAAGATC TTATTATCA
*Aba*I
CACTTTCTAG AAATAATTTT CTTAAGAAGS AGATATACAT ATGACACAT
+1 *Pvu* II

1. 培养原核生物宿主细胞的方法,其中将原核生物宿主细胞用表达载体转化,所述表达载体包含可操作地连接到包含编码多肽的核酸序列的转录单元的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的甘露糖操纵子的诱导型启动子,

其中诱导型启动子的诱导物是能诱导启动子的甘露糖或其衍生物,

其中,

在第 1 步骤中,将原核生物宿主细胞在不同于诱导物的第 1 碳源的存在下培养,且

在第 2 步骤中,将原核生物宿主细胞在所述诱导物的存在下培养。

2. 权利要求 1 的方法,其中诱导物的添加在培养达到测定参数之后开始。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中测定参数是选自光密度 (OD) 和碳源浓度的至少一种。

4. 权利要求 3 的方法,其中测定参数是在 600nm 处的光密度。

5. 前述权利要求中任一项的方法,其中方法是补料分批方法。

6. 前述权利要求中任一项的方法,其中经时连续添加全部或部分诱导物。

7. 权利要求 1 ~ 6 中任一项的方法,其中以一份加入至少部分诱导物。

8. 前述权利要求中任一项的方法,其中以经时指数地增加的速度加入至少部分诱导物。

9. 前述权利要求中任一项的方法,其中在诱导物的首次添加之后,在培养达到第 2 测定参数之后,又添加至少一次诱导物。

10. 权利要求 9 的方法,其中第 2 测定参数选自光密度 OD,溶液中的诱导物浓度,产生的多肽浓度或宿主细胞中包含的报告基因的信号强度。

11. 权利要求 1 ~ 10 中任一项的方法,其中启动子选自 manP 启动子和 manR 启动子

12. 权利要求 1 ~ 11 中任一项的方法,其中将第 1 碳源和诱导物的混合物补给发酵培养基,其中第 1 碳源与诱导物的比是 3 : 1 至 1 : 3。

13. 前述权利要求中任一项的方法,其中载体包含调控基因 manR 的完全或部分序列。

14. 前述权利要求中任一项的方法,其中载体包含选自 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 的序列,与它们互补的序列或其变体。

15. 前述权利要求中任一项的方法,其中不同于诱导物的碳源是葡萄糖。

16. 前述权利要求中任一项的方法,其中编码多肽的核酸序列是异源核酸序列。

17. 在原核生物宿主细胞中产生多肽的方法,其包括下列步骤:

构建在原核生物宿主细胞中可表达的载体,所述载体包含可操作地连接到包含编码多肽的核酸序列的转录单元的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的甘露糖操纵子的诱导型启动子,

将原核生物宿主细胞用所述载体转化,以及

通过在权利要求 1 ~ 16 之任一项中所述的培养条件下培养转化的宿主细胞来使所述多肽表达。

18. 权利要求 15 的方法,其还包括下列步骤:自细胞或自细胞培养物回收多肽。

19. 重组体原核生物宿主细胞,其包含表达载体,所述表达载体包含:

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的甘露糖操纵子的甘露糖诱导型启动子、或所述甘露糖操纵子的诱导型启动子的纯化的及分离的核酸序列,

其中所述载体或所述甘露糖操纵子的诱导型启动子的纯化的及分离的核酸序列可操

作地连接到包含编码多肽的核酸序列的转录单元。

20. 权利要求 19 的重组体原核生物宿主细胞，

其中甘露糖操纵子的诱导型启动子是根据权利要求 11 ~ 13 中任一项的一种，或者其中分离的及纯化的核酸是根据权利要求 14 的一种。

21. 重组体原核生物宿主细胞，其中宿主细胞选自硬壁菌门 (Firmicutes)。

22. 权利要求 19 ~ 21 中任一项的重组体原核生物宿主细胞在权利要求 1 ~ 18 中任一项的方法中的用途。

发酵方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及允许改善的细胞生长及原核生物宿主细胞中改善的多肽表达的发酵方法。尤其是,本发明涉及培养包含在甘露糖-诱导型启动子控制下编码多肽的表达载体的原核生物宿主细胞的发酵方法。

【背景技术】

[0002] 培养细胞的发酵方法在用于生物学和药学应用的活性物质的生产中非常重要。尤其是,该发酵方法应适合于以对于实际应用,诸如临床或商业用途足够的量产生期望的物质。

[0003] 已开发各种策略用于通过培养包含编码靶向多肽的可表达的核酸序列的原核生物宿主细胞达到靶向多肽的有效表达。表达效率强烈依赖于控制编码靶向多肽的核酸序列的表达的启动子。

[0004] 尤其是,期望允许产生高拷贝数的靶向多肽的具有高转录速度的启动子。

[0005] 而且,在发酵方法中,期望可控制靶向多肽表达。表达的控制可,例如,通过将编码靶向多肽的核酸序列可操作地连接到仅在适合的诱导物的存在下起始表达的诱导型启动子来达到。

[0006] 启动子是致使编码靶向多肽的核酸序列(结构基因)转录的核酸序列。

[0007] 尤其是,本发明涉及利用新载体的发酵方法,所述载体用于在包含可操作地连接到包含编码多肽的核酸序列的转录单元的甘露糖操纵子的启动子区的宿主中异源表达,然而所述核酸序列的表达被所述甘露糖操纵子的启动子区控制。

[0008] 通过适合的诱导,启动子活化及允许结构基因的转录。诱导可在负或正控制下。

[0009] 在负控制中,阻遏物结合到启动子及防止结构基因的转录。如果适合的诱导物存在,阻遏物被灭活及允许转录。

[0010] 在正诱导中,启动子在结合活化物之后活化,其中活化物结合到启动子由适合的诱导物介导。

[0011] 典型诱导物可为原核生物宿主代谢需要的底物,例如,不同类型的糖。

[0012] 本发明涉及正诱导性系统,其中在适合的底物,即诱导物的存在下,活化物结合到起始可操作地连接到所述启动子的基因的转录的启动子。

[0013] 迄今为止,原核生物宿主系统中的多数异源基因表达系统完全依赖于有限组的细菌启动子。因而,可用作诱导物的底物数也有限。

[0014] 而且,异源表达系统的产率依赖于可利用的转化的原核生物宿主数。由此,需要能生长到高细胞密度,即,允许细胞分裂中不释放载体地快速增殖的原核生物宿主系统。

[0015] 【发明概述】

[0016] 根据本发明,会自以下说明书明了的这些和其他目的已通过培养用新载体转化的原核生物宿主细胞的发酵方法来达到,所述新载体包含可操作地连接到包含对于所述宿主异源的核酸序列的转录单元,然而所述核酸序列的表达被所述甘露糖操纵子的启动子区控

制的甘露糖操纵子的启动子区。

[0017] 根据特定方面,本发明提供培养细菌宿主细胞的方法,所述方法允许细菌宿主细胞生长到高细胞密度。

[0018] 也提供所述新载体在原核生物宿主中核酸序列的调控的表达中的用途;在包含甘露糖操纵子的启动子区的宿主中可表达的分离的及纯化的核酸序列;用所述载体或所述分离的及纯化的核酸序列转化的原核生物宿主;使用所述载体或所述分离的及纯化的核酸序列在宿主中产生多肽的方法;以及在发酵,尤其是在高细胞密度发酵中用所述载体或所述分离的及纯化的核酸序列转化的原核生物宿主的用途。

[0019] 其他目的和优势会对于本领域技术人员通过以下详述,以及参照附图,及随附的权利要求而显而易见。

【附图说明】

[0020] 其显示于

[0021] 【图 1】来自 manP 启动子的转录起始位点的作图中使用的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 的核酸序列,亮显了在腺嘌呤核苷酸的转录起始位点,推导的 -35 和 -10 盒以斜体字显示,manR 的结束和 lys 基因的起始用箭标记,和限制性位点 BglIII, XbaI, AflIII 和 NdeI 加了下划线;

[0022] 【图 2】包含 manR 启动子的启动子区的核酸序列,将在鸟嘌呤核苷酸的转录起始位点亮显,将推导的 -10 和 -35 盒以斜体字表示,通过箭标指示 manR 基因的起始,和 HindIII 限制性位点和推定的 cre 序列加了下划线;

[0023] 【图 3】自枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 获得的核酸序列,其包含如在 pSUN291, pSUN384.1 和 pSUN385.2 中分别含有的 manR 启动子的启动子区,用箭标指示 lacZ 的起始,和限制性位点加了下划线;

[0024] 【图 4】根据本发明的表达载体 pSUN 279.2 的质粒图谱;

[0025] 【图 5】根据本发明的分别含有质粒 pSUN 279.2, pSUN 284.1 和 pSUN 291 的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 的 β -半乳糖苷酶活性;

[0026] 【图 6】自枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 获得的核酸序列,其包含包括 manR 的 C-端的自枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 的 manP 启动子的启动子区, manR 和 manP 之间的基因间区,在这被报告基因 lacZ 取代,转录起始位点, -35 和 -10 盒以粗体显示,通过箭标指示 manR 的末端和 lacZ 的起始,和限制性位点加了下划线;

[0027] 【图 7】含有质粒 pSUN 279.2 以及含有显示于图 6 的不同长度的核酸序列的片段的其他质粒的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 的 β -半乳糖苷酶活性;

[0028] 【图 8】包含具有显示于图 3 的核酸序列的载体 pSUN291, pSUN384.1 和 pSUN345.2 的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 的 β -半乳糖苷酶活性;

[0029] 【图 9】根据本发明的表达载体 pMW 168.1 的质粒图谱;

[0030] 【图 10】枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 中 pMW 168.1 的质粒稳定性测试的结果的图,将含有质粒的细胞的 procental 部分对于代数标绘;

[0031] 【图 11 ~ 14】对数性地显示对于发酵运行 1 ~ 4 的持续时间标绘的干生物质浓度的图,和对于发酵运行 1 ~ 4 的发酵的持续时间标绘的荧光信号 (RFU) 的图;以及

[0032] 【图 15 和 16】对于发酵运行 5 和 6 的发酵的持续时间标绘的荧光信号的图。

[0033] 【发明详述】

[0034] 如本文所用,提供以下定义以便有利于本发明的理解。

[0035] “在宿主中可表达的载体”或“表达载体”是重组或合成产生的,允许宿主细胞中特定核酸序列的转录的一系列特定的多核酸元件的多核酸构建体。一般而言,此载体包括包含可操作地连接到启动子的待转录的特定核酸序列的转录单元。在宿主中可表达的载体可为例如自主或自身-复制质粒,粘粒,噬菌体,病毒或反转录病毒。

[0036] 术语“宿主”,“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文互换使用以指示已导入本发明的一种或更多载体或分离的及纯化的核酸序列的原核生物细胞。需知,该术语不仅指称特定受试者细胞,而且指称该细胞的后代或潜在后代。因为由于突变或环境影响,某些修饰可在后代发生,实际上,该后代可与亲本细胞不同,但仍包括在如本文所用的术语的范围之内。

[0037] 术语“包含”通常以包括的含义使用,其是说允许存在一种或更多其他特征或组分。

[0038] 如本文所用,“启动子”指称控制转录单元的表达的核酸序列。“启动子区”是能在细胞中结合 RNA 聚合酶及起始下游(3'方向)编码序列的转录的调控区。启动子区之内会发现负责 RNA 聚合酶诸如推定的 -35 盒和 Pribnow 盒(-10 盒)的结合的蛋白结合结构域(共有序列)。而且,启动子区可包含转录起始位点及调控蛋白的结合位点。

[0039] “甘露糖操纵子”指称枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的甘露糖操纵子。

[0040] 在甘露糖操纵子中鉴定了 3 种基因(Kunst F.N.et al.,“The complete genome sequence of gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*”,*Nature* 390, p249-256(1997))。

[0041] 第 1 基因,manP,编码属于果糖-通透酶家族的甘露糖特定酶组分(转运子)。第 2 基因,manA,编码甘露糖-6-磷酸异构酶,然而第 3 基因,yjdF 的功能未知。调控基因,manR 位于这 3 种基因的上游及以相同的取向,其编码 ManR,甘露糖操纵子的活化物。

[0042] 甘露糖操纵子,由 3 个基因 manP-manA-yjdF(挨个连接,指称为“manP”)组成,在本身被正调控的 manP 启动子的控制下。

[0043] 另一启动子,manR 启动子,负责 manP-启动子的甘露糖-依赖性诱导必要的 manR 的表达。

[0044] manR 启动子区还包含 manR 基因的分解代谢物调节物蛋白结合位点(分解代谢物响应元件(cre))。

[0045] “Cre 序列”指称位于分解代谢基因的上游(5'方向)的核酸序列。cre 序列结合防止碳分解代谢物阻遏(CCR)中分解代谢基因的表达的分解代谢物控制蛋白(CCP)。

[0046] “甘露糖操纵子的启动子区”意指调控 manP 以及含或不含 cre 序列的 manR 的表达的启动子区。

[0047] “manP 启动子”如本文所指称,包含至少 -35 区,Pribnow 盒,及 ManR 结合位点。

[0048] “manR 启动子”如本文所指称,包含至少推定的 -35 区,Pribnow 盒,ManR 结合位点及,任选地,cre 序列。

[0049] 也指称为“甘露糖”的 D-甘露糖是葡萄糖的 2-差向异构体,且存在于甘露聚糖和

杂甘露聚糖多糖,糖蛋白和多种其他复合糖。

[0050] “CcpA”是指“分解代谢物控制蛋白A”,其为全局调节物蛋白,且可活化或阻遏一些分解代谢操纵子的活化。在甘露糖操纵子的情况中,CcpA通过结合 cre- 序列来起到阻遏作用。

[0051] “增强子”是独立于转录单元的识别,关于转录单元的序列位置,或序列取向而发挥增强转录单元的转录的作用的核酸序列。本发明的载体任选地可包括增强子。

[0052] 如本文所用,“转录单元”指称正常转录为单 RNA 分子的核酸序列。转录单元可含有编码功能性地相关的多肽分子的一个基因(单顺反子)或2个(二顺反子)或更多基因(多顺反子)。

[0053] 核酸序列当与另一核酸序列放入功能关系时是“可操作地连接的”。例如,启动子可操作地连接到编码序列,如果其影响序列的转录;或转录起始区,诸如核糖体结合位点可操作地连接到编码例如多肽的核酸序列,如果其定位为辅助多肽的翻译。连接可通过在方便的限制性位点连接来实现。如果该位点不存在,根据常规实践使用合成寡核苷酸衔接子或接头。

[0054] 如在本发明中指称的“核酸”或“核酸序列”或“分离的及纯化的核酸或核酸序列”可为DNA, RNA 或DNA/RNA 杂交体。在核酸或核酸序列位于载体的情况中,其通常为DNA。DNA在本文可为任何聚脱氧核苷酸序列,包括,例如双链DNA,单链DNA,一条或两条链由2个或更多片段组成的双链DNA,一条或两条链具有未打断的磷酸二酯主链的双链DNA,含有一个或更多单链部分及一个或更多双链部分的DNA,DNA链完全互补的双链DNA,DNA链仅部分互补的双链DNA,环状DNA,共价闭合的DNA,线性DNA,共价交叉-连接的DNA,cDNA,化学-合成的DNA,半-合成DNA,生物合成DNA,天然地-分离的DNA,酶-消化的DNA,剪切的DNA,标记的DNA,诸如放射性标记的DNA和荧光色素-标记的DNA,含有一种或更多非-天然存在的核酸种类的DNA。DNA序列可通过标准化学技术,例如,磷酸三酯方法或经自动化的合成方法和PCR方法合成。纯化的及分离的DNA序列也可通过酶促技术产生。

[0055] RNA在本文可为例如单链RNA,cRNA,双链RNA,一条或两条链由2个或更多片段组成的双链RNA,一条或两条链具有未打断的磷酸二酯主链的双链RNA,含有一个或更多单链部分及一个或更多双链部分的RNA, RNA链完全互补的双链RNA, RNA链仅部分互补的双链RNA,共价交联的RNA,酶-消化的RNA,剪切的RNA,mRNA,化学-合成的RNA,半-合成RNA,生物合成RNA,天然地-分离的RNA,标记的RNA,诸如放射性标记的RNA和荧光色素-标记的RNA,含有一个或更多非-天然存在的核酸种类的RNA。

[0056] “变体”或“序列变体”意指通过保守性核酸取代自参照序列改变的核酸序列,其中一个或更多核酸被具有相同的特征的另一个取代。变体还包括变质的序列,具有缺失和插入的序列,只要该修饰的序列与参照序列呈现相同的功能(功能性地相当体)。

[0057] 如本文所用,术语“多肽”,“肽”,“蛋白”,“多肽”和“肽”互换使用,以指定通过相邻残留物的 α -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列氨基酸残基。

[0058] 术语“分离的及纯化的核酸序列”指称核酸序列会根据本发明所处的状态。核酸序列会无或基本上无与它们天然地关联的物质,诸如见于它们的天然的环境,或制备(当该制备是通过重组技术体外或体内实践的时)它们的环境(例如细胞培养)的其他核酸。

[0059] 术语“转化”,“转化的”或“引导核酸进入宿主细胞”表示细胞外核酸如载体,有或

无伴随物质,进入宿主细胞的任何过程。术语“转化的细胞”或“转化的细胞”是指已导入细胞外核酸而由此带有细胞外核酸的细胞或其后代。可将核酸导入细胞,从而核酸可作为染色体整合体或作为额外染色体元件复制。适当的宿主细胞用例如表达载体的转化可通过熟知的方法诸如微注射,电穿孔,粒子轰击或通过化学方法诸如磷酸钙-介导的转化实现,例如描述于 Maniatis et al.1982, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory or in Ausubel et al.1994, *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons。

[0060] “异源核酸序列”或“对于宿主异源的核酸序列”是指编码例如表达产物诸如对于宿主外源的多肽(“异源表达”或“异源产物”)的核酸序列,即来源于不同于宿主的供体的核酸序列,或编码例如表达产物诸如对于宿主外源的多肽的化学合成的核酸序列,或源于宿主及编码由所述宿主天然地表达的多肽的核酸序列,其中核酸序列被插入载体及在本发明的甘露糖操纵子的启动子区的控制下。

[0061] 在宿主是特定原核生物物种的情况中,异源核酸序列可来源于生物的不同属或科,自不同目或纲,自不同门(部)或自不同域(界)。

[0062] 异源核酸序列可在将其导入宿主细胞之前,通过单核酸或一部分异源核酸序列的突变,插入,缺失或取代来修饰,只要该修饰的序列与参照序列呈现相同的功能(功能性地相当体)。异源核酸序列如本文所指称,还包括来源于生物诸如自真核生物的不同域(界)(真核起源)的序列,诸如例如已用于噬菌体展示库及已根据原核生物宿主的“密码子利用”修饰的单核酸或一部分核酸序列的人抗体。

[0063] “转录起始区”是促进转录起始及包含核糖体结合位点的序列诸如 Shine Dalgarno 序列的信号区。

[0064] 一般,转录起始区位于转录起始位点的下游及可操作地连接到要表达的基因。

[0065] “转录终止区”指称导致 RNA 聚合酶终结转录的序列。转录终止区通常是可避免其他附近基因的不需要的转录或自其他潜在启动子的转录的转录单元的部分,和可增加 mRNA 的稳定性。

[0066] “抗体”指称被抗原刺激之后,由免疫系统的 B 细胞产生的一类血浆蛋白。哺乳动物(即人)抗体是 Ig G, M, A, E 或 D 类的免疫球蛋白。为本发明的目的使用的术语“抗体”包括,但不限于,多克隆抗体,单克隆抗体,抗-特应抗体和存在于自身免疫疾病,诸如糖尿病,多发性硬化和类风湿性关节炎的自体-抗体以及嵌合抗体。

[0067] 一方面,本发明利用在宿主中可表达的载体,所述载体包含可操作地连接到包含可对于该宿主异源的核酸序列的转录单元的甘露糖操纵子的启动子区,然而,所述核酸序列的表达被所述甘露糖操纵子的启动子区控制。

[0068] 本发明的载体优选为自主或自身-复制质粒,粘粒,噬菌体,病毒或反转录病毒。在表达本发明的核酸序列中可采用广泛的宿主/载体组合。

[0069] 有用的表达载体,例如,可由染色体,非-染色体和/或合成核酸序列段组成。

[0070] 适合的载体包括具有特定宿主范围的载体,诸如特异于分别例如枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)和大肠埃希氏菌(*E. coli*)的载体,以及具有广-宿主-范围的载体,诸如对于革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌有用的载体。

[0071] 可使用“低-拷贝”,“中等-拷贝”以及“高-拷贝”质粒。

[0072] 例如,在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中,低拷贝质粒是 pAMbeta1,中等拷贝质粒是 pBS72 衍生物,高拷贝质粒是 pUB110。

[0073] 根据本发明,甘露糖操纵子的启动子区分别包含 manR 启动子区和 manP 启动子区。

[0074] 自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的核酸序列包括 manR 的 C-端,manR 和 manP 之间的基因间区,之后是作为报告基因的溶葡萄球菌酶基因 *lys*,显示于图 1。

[0075] 本发明的核酸序列包含 manP 的启动子区,优选包含图 1 自 bp-80 至 *lys* 的起始密码子的核酸序列 (SEQ ID NO:1) 和更优选图 1 自 bp-80 和包括 bp+1,即在 bp+1 的转录起始位点 A 的上游的核酸序列 (SEQ ID NO:2)。

[0076] 自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的核酸序列包括 manR 的启动子区,在 bp+1 的转录起始位点 G,推定的 cre 序列,bp+1 和 manR 之间的转录起始区,以及 manR 的部分,显示于图 2 和图 3,其中 manR 被 lacZ 取代。

[0077] 本发明的核酸序列包含 manR 的启动子区,优选包含图 3 自 bp-122 至 lacZ 的起始密码子的核酸序列 (SEQ ID NO:3),更优选地,图 3 自 bp-122 及 bp+7 的核酸序列,即包括推定的 cre- 序列, (SEQ ID NO:4),及,尤其是,图 3 自 bp-122 及 bp-1,即在 bp+1 的转录起始位点 G 的上游的核酸序列 (SEQ ID NO:5)。

[0078] 两个启动子区 manP 和 manR 包含 ManR 的结合位点。

[0079] 本发明也包括与 SEQ ID NO:1 ~ 5 之任何和其变体互补的序列。

[0080] 本发明中使用的甘露糖操纵子的启动子区,诸如 manP 启动子区,manR 启动子区(有或无 cre 序列)以及根据序列 SEQ ID NO:1 ~ 5 的启动子区,其序列互补或其变体通常来自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的甘露糖操纵子或自其他原核生物的功能相当体启动子区,尤其是芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 生物。其他原核生物的功能相当体启动子区包括可被甘露糖诱导的启动子区,即在甘露糖存在下相比在甘露糖缺失下具有更高表达活性的启动子区。

[0081] 在许多原核生物,诸如硬壁菌门 (*Firmicutes*) 如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中,甘露糖操纵子涉及 D-甘露糖代谢。

[0082] 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 可使用许多不同糖作为碳源。己糖诸如葡萄糖和 D-甘露糖主要经磷酸烯醇式丙酮酸:碳水化合物磷酸转移酶系统 (PTS) 摄取。在 PTS 中,相应己糖在摄取过程中被同时磷酸化及运输到细胞。特定糖底物的摄取和利用经历碳分解代谢物阻遏 (CCR)。在葡萄糖的存在下,枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的优选的糖底物,阻遏用于其他底物的摄取和利用的基因诸如甘露糖操纵子的转录。

[0083] 本领域已广泛研究及知道枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中葡萄糖依赖性 CCR 的机理 (Stülke J. et al., "Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species", in *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 2000, 第 849 ~ 880 页)。

[0084] 根据本发明的转录单元通常还包含所述转录单元的翻译的起始点(起始密码子)的翻译起始区上游,然而翻译起始区可操作地连接到核酸序列。翻译起始区通常位于与转录单元的翻译的起始点(其可为 ATG, GTG 或 TTG) 直接相邻的上游。

[0085] 翻译起始区可为甘露糖操纵子中 manP 基因或 manR 基因的转录单元的翻译起始区。

[0086] 甘露糖操纵子的 manP 或 manR 基因的翻译起始区可被其他翻译起始区部分或完全

取代。

[0087] 可使用例如,均来自枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 的 *tufA*(延伸因子 Tu) 和 *gsiB*(应激蛋白; Jürgen et al., 1998, Mol. Gen. Genet. 258, 538-545) 的翻译起始区。

[0088] 有转录起始区和相应基因的起始的 *tufA* 和 *gsiB* 的相应核酸序列示于下,将起始密码子以粗体显示,限制性位点加下划线,及将 Shine-Dalgarno- 序列亮显。

[0089] *tufA* :

[0090] 5' -cttaagGAGGATTTTAGA **ATG** GCTAAAGAAAAATTCggatcc-3'

[0091] AfIII SD 起始密码子 BamHI

[0092] *gsiB* :

[0093] 5' -cttaagAATTAAAGGAGGAATTCAAA **ATG** GCAGACAATAACAAAggatcc-3'

[0094] AfIII SD 起始密码子 BamHI

[0095] 通过转录起始区的适合的选择,可增强 mRNA 的稳定性,这是基因表达中的重要特征。mRNA 的稳定性特征在于其特定半衰期。

[0096] 除了转录起始区之外,也可取代翻译起始点,以及,任选地,起始点后的基因的许多密码子,例如约 5 ~ 6 个密码子,例如以上 *tufA* 和 *gsiB* 的核酸序列中分别显示的。

[0097] 翻译起始区可还包含可操作地连接到要表达的核酸序列的编码信号序列的序列。信号序列通常位于与翻译起始点直接相邻的下游。

[0098] 在使用二顺反子或多顺反子转录单元的情况中,可应用可操作地连接到各顺反子的不同或同一信号序列。优选不同信号序列用于该情况。使用的信号序列可为原核生物或真核生物信号序列。通常应用原核生物信号序列。

[0099] 要在本发明的表达载体中采用的编码信号序列的 DNA 序列可商业上获得或化学合成。例如,信号序列可根据固相亚磷酰胺三酯法合成,例如描述于 Beaucage & Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22, 1859-1862 如描述于 Van Devanter et. Al., Nucleic Acids Res. 12 :6159-6168 (1984)。寡核苷酸的纯化可通过天然聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过如描述于 Pearson & Reanier, J. Chrom. 255 :137-149 (1983) 的阴离子-交换 HPLC 进行。

[0100] 通常转录单元还包含转录终止区。

[0101] 优选地,使用强转录终止区来避免被启动子“通读”出转录单元而进入侧接质粒序列,以及自其他质粒启动子进入转录单元。在该转录终止区的存在下观察到 mRNA 的进一步稳定。

[0102] 用于强转录终止区的适合的例具有来自可商购的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 168 的 *tufA* 的 3' - 区的核酸序列 5' -CGAGACCCCTGTGGTCTCG-3'。

[0103] 根据本发明,可使用编码对于宿主外源的表达产物的异源核酸序列。在宿主是原核生物物种诸如枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 或大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的情况下,目的核酸序列可来自另一纲,如 γ - 蛋白杆菌,诸如自例如伯霍尔德杆菌属 (*Burkholderia* sp.), 尤其是自不同门,诸如古细菌,或,最特定自真核生物,诸如哺乳动物,尤其是自人。但是,可根据宿主的“密码子利用”修饰异源核酸序列。本发明的异源序列通常是目的基因。目的基因优选包括异源多肽诸如结构,调控或治疗性蛋白,或结构,调控或治疗性蛋白与其他蛋白 (“Tag”) 诸如绿色荧光蛋白的 N- 或 C- 端融合物或其他融合蛋白。异源核酸序列还可

编码可以 RNA, 诸如例如反义 -RNA 形式使用的转录物。

[0104] 蛋白可作为不溶性聚集物或作为存在于宿主细胞的细胞质或周质空间, 和 / 或存在于细胞外培养基的可溶性蛋白产生。优选地, 蛋白作为存在于宿主细胞的周质空间和 / 或存在于细胞外培养基的可溶性蛋白产生。

[0105] 目的异源蛋白可为人, 哺乳动物或原核生物起源。其他蛋白是抗原, 诸如自微生物病原体的糖蛋白和碳水化合物, 病毒和抗细菌剂二者, 及自肿瘤。其他蛋白是酶如凝乳酶, 蛋白酶, 聚合酶, 脱氢酶, 核酸酶, 葡聚糖酶, 氧化酶, α -淀粉酶, 氧化还原酶, 脂肪酶, 酰胺酶, 腈水合酶, 酯酶或腈水解酶。

[0106] 在本发明中, 信号序列和异源核酸序列在表达载体之内排列的顺序及距离可改变。在优选的实施方式中, 信号序列是 5' (上游) 到编码例如目的多肽的核酸序列。信号序列和编码例如目的多肽的核酸序列可隔 0 ~ 约 1000 个氨基酸。在优选的实施方式中, 信号序列和编码例如目的多肽的核酸序列彼此直接相邻, 即隔 0 个核酸。

[0107] 优选地, 本发明的载体包含根据序列 SEQ ID NO: 1 ~ 5 之任何, 其序列互补及其变体的甘露糖操纵子的启动子区。

[0108] 本发明也包括本发明的载体在本发明的用于原核生物宿主中核酸序列的调控的异源表达的发酵方法中的用途。

[0109] 在再一方面, 本发明提供包含甘露糖操纵子的启动子区的分离的及纯化的核酸序列。优选地, 分离的及纯化的核酸序列包含甘露糖操纵子的 manP 启动子和 / 或 manR 启动子。更优选地, 分离的及纯化的核酸序列包含 SEQ ID NO: 1 ~ 5 之任何。

[0110] 包含甘露糖操纵子的启动子区的分离的及纯化的核酸序列可操作地连接到包含编码多肽的核酸序列的转录单元, 其中编码多肽的核酸序列的表达在甘露糖操纵子的启动子区的控制下。

[0111] 本发明的分离的及纯化的核酸序列可根据标准 PCR 流程和本领域熟知的方法分离。纯化的及分离的 DNA 序列可还包含一个或更多调控序列, 如本领域所知道, 例如增强子, 通常用于由核酸序列编码的产物的表达。

[0112] 为了选择用本发明的载体或分离的及纯化的核酸序列成功地和稳定地转化的宿主细胞, 可将编码可选择的标记物 (例如抗生素抗性) 的基因随目的核酸序列导入宿主细胞。编码可选择的标记物的基因可位于载体或位于分离的及纯化的核酸序列或可任选地以分离的形式共导入, 例如分离的载体。可使用的各种可选择的标记物包括赋予抗生素抗性的那些, 诸如大观霉素, 潮霉素, 氨苄西林和四环素。可根据需要适应抗生素的量, 以便创建选择性条件。通常使用一种可选择的标记物。

[0113] 在载体是穿梭载体的情况中, 可使用对于适合的宿主常见的标记物。例如, 在载体是在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 中可复制的穿梭载体的情况中, 可使用赋予对于大观霉素的抗性的编码粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 的大观霉素-腺苷酸转移酶的抗性标记物基因。

[0114] 可将其他报告基因诸如荧光蛋白随着目的核酸序列导入宿主细胞, 以便测定转化效率。

[0115] 适合的报告基因是, 例如, 编码增强的绿色荧光蛋白 (eGFP) 的那些和编码 β -半乳糖苷酶的 lacZ。两种报告基因可商购及被广泛使用。

[0116] 本发明的另一方面提供用本发明的载体转化的原核生物宿主,其中载体包含甘露糖操纵子的启动子区。优选载体包含 SEQ ID NO:1~5 之任何,其序列互补或其变体。

[0117] 广泛的原核生物宿主细胞有用于用本发明的甘露糖操纵子的甘露糖-诱导型启动子区转化。这些宿主可包括革兰氏阳性细胞株,诸如芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。优选地,宿主细胞是硬壁菌门 (*Firmicutes*),更优选宿主细胞是芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。

[0118] 可使用的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 是例如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*),解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*),地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*),纳豆芽孢杆菌 (*B. natto*),巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 株,等。优选宿主细胞是枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*),诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 168。

[0119] 可使用的大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 是例如可商购的株 TG1, W3110, DH1, XL1-Blue 和 Origami。

[0120] 适合的宿主细胞是可商购的,例如,自保藏中心诸如 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, 德国)。

[0121] 例如,芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 可自芽孢杆菌遗传保藏中心 (*Bacillus Genetic Stock Center*) 获得。

[0122] 宿主细胞可或不代谢甘露糖。可将通常能摄取及代谢甘露糖的宿主细胞如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 修饰为在与甘露糖的摄取和/或代谢相关的一种或更多功能上缺陷。在与甘露糖的摄取和/或代谢相关的一种或更多功能上的缺乏可通过例如抑制或阻断编码蛋白的基因诸如编码甘露糖-6-磷酸-异构酶的 *manA* 基因的表达来达到。此可通过知道的技术诸如转座子支持的诱变或敲除突变来进行。

[0123] 通常,原核生物宿主对应于选择的信号序列,例如在使用芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的信号序列的情况中,宿主细胞通常是芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 的相同的家族的成员,更优选宿主细胞是芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 株。

[0124] 优选,使用具有磷酸烯醇式丙酮酸:碳水化合物磷酸转移酶系统 (PTS) 的宿主。尤其是,具有 PTS 系统的宿主是芽孢杆菌目 (*Bacillales*),尤其是芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的微生物和更优选物种枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或肠杆菌目 (*Enterobacteriales*),优选埃希氏菌属 (*Escherichia*) 的微生物和更优选物种大肠埃希氏菌 (*E. coli*)。

[0125] CCR 的主要原件是分解代谢物控制蛋白 A (CcpA),其能结合 *cre*-序列,诸如 SEQ ID NO:3 和 4 中的推定的 *cre* 序列。在 CcpA 的结合的状态中,阻遏相应基因,在本文中 *manR* 的转录。

[0126] 在葡萄糖的缺失下及在诱导物诸如 D-甘露糖的存在下,无通过 CcpA 的结合的阻遏,以及通过调控蛋白 (*ManR*) 与甘露糖操纵子的启动子区的相应结合位点的结合起始甘露糖操纵子的基因的转录。

[0127] 意外地,本发明人发现,*ManR* 不仅是 *manP* 启动子区的调控蛋白,而且是 *manR* 本身的自调节物。

[0128] 本发明提供培养包含载体的原核生物宿主细胞的发酵方法,所述载体包含可操作地连接到包含编码多肽的核酸序列的转录单元的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的甘

露糖操纵子的甘露糖诱导型启动子,其中在第1步骤中,将原核生物宿主细胞在不同于诱导型启动子的诱导物的第1碳源的存在下培养,且在第2步骤中,将原核生物宿主细胞在上述诱导物的存在下培养。

[0129] 不同于诱导物的碳源一般是宿主细胞的主要碳源,然而诱导物一般是宿主细胞的次要碳源。

[0130] 主要碳源是被宿主细胞优选消耗的及,由此,作为发酵方法中的底物有用。

[0131] 对于许多原核生物宿主细胞而言,葡萄糖是主要碳源,且可在那些原核生物细胞的发酵方法中作为底物适宜地使用。

[0132] 本发明还提供在宿主细胞中产生多肽的方法,其包括下列步骤:

[0133] (a) 构建载体,

[0134] (b) 用所述载体转化原核生物宿主,

[0135] (c) 使所述多肽在适合的条件在细胞培养系统中表达,

[0136] (d) 自细胞培养系统回收所述多肽。

[0137] 使用的载体,以及其构建和原核生物宿主的转化如以上定义,然而载体包含的异源核酸序列编码多肽。

[0138] 作为细胞培养系统,可在培养管,振摇瓶或细菌发酵罐中应用连续或非连续培养诸如分批培养或补料分批培养。

[0139] 本发明的优选发酵方法是补料分批发酵。补料分批过程的特征在于不撤出溶液地底物向培养肉汤的限时补给。补给可为连续或间隔。一般而言,补料分批过程包含分批期,期间细胞起初生长到期望的浓度。在此期间,细胞生长高,且通常无靶向多肽产生,除非添加诱导物。在达到期望的细胞浓度之后,补给底物的补给期开始。一般而言,诱导物在补给期期间添加。

[0140] 对于培养宿主细胞而言,可使用如本领域所知道的常规培养基,诸如复合培养基如“营养酵母肉汤培养基”,Kortz et al. 1995, J. Biotechnol. 39, 59-65 描述的含有甘油的培养基, Kulla et al., 1983, Arch. Microbiol, 135, 1 描述的矿物质盐培养基, Wilms et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 73, 95-103 描述的用于枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 发酵的分批培养基或 Bertram et al, 1951, J. Bacteriol. 62, 293-300 描述的 LB- 培养基。

[0141] 培养基包含适合的碳源,例如糖诸如葡萄糖作为待生长的宿主细胞的底物。作为底物使用的碳源不同于诱导物。

[0142] 可根据适当修饰培养基,例如通过添加进一步成分诸如本领域技术人员通常知道的缓冲剂,盐,维生素,氨基酸,抗生素或其他微量营养素。

[0143] 同样,细胞培养期间可使用不同培养基或培养基的组合。

[0144] 优选地,作为基础培养基使用的培养基应不包括诱导物,以便达到甘露糖启动子区的紧密调节。

[0145] 在本发明的发酵方法中,通过添加适合的诱导物开始表达。甘露糖操纵子的诱导物是甘露糖。此外,可使用能诱导甘露糖操纵子的 *manR* 启动子区或 *manP* 启动子区的甘露糖的衍生物。表达可通过原核生物宿主可利用的诱导物的量来调控。

[0146] 可在培养达到测定参数之后起始诱导物的添加。该测定参数的例是指示培养的细胞浓度或不同于诱导物的底物诸如碳源的浓度的光密度 (OD)。

[0147] 例如,在本方法中,诱导物可在培养达到适当的 OD 之后添加,依赖于特定培养系统。对于分批培养,在振摇瓶中,作为测定参数的典型 OD_{600} 是约 0.3 或更高。

[0148] 在分批期中,根据本发明的补料分批培养的一实施方式,当在培养基中仅主要碳源是可利用时,细胞生长到 20 ~ 300 OD_{600} 之间的细胞密度及,然后,培养随着主要碳源和诱导物的混合物的添加而切换到补给期。在补给期中,主要碳源:诱导物的比可改变,适合的比是 3 : 1 至 1 : 3。通过主要碳源:诱导物的比的改变,可控制表达速度。

[0149] 可依赖于发酵的特定条件选择添加的诱导物的量。

[0150] 可根据特定培养系统选择诱导物的添加模式(诱导方案)。通过添加模式,可进一步调控宿主细胞的生长速率和表达速度。例如,可经适合的时期不连续地或连续添加诱导物。在非连续模式(冲击诱导)中,添加可为仅在诱导点一次,或以适合的间隔两次或甚至几次。适合的模式依赖于培养系统和可由本领域技术人员容易测定。

[0151] 例如,在连续模式中,可以恒定速度或降低/增加速度添加诱导物。

[0152] 连续添加可进一步在培养的选择的时间间隔,例如培养的指数生长期间的选择的时间间隔之内。

[0153] 而且,非连续和连续诱导方案的组合是可能的。

[0154] 如果以 2 个或更多部分添加诱导物,进一步诱导物的添加可在培养达到第 2 测定参数之后起始。第 2 测定参数可为,例如,光密度 OD,表达的多肽的浓度,溶液中的诱导物浓度或报告基因的表达的信号强度。

[0155] 通常,将原核生物宿主的培养的培养基中诱导物的量调至约 10g/l,优选约 5g/l,更优选约 2g/l。

[0156] 补料期间添加的诱导物的量可经补给时期改变。如上所述,主要碳源:诱导物的比的变化允许表达速度,即细胞密度的调节。

[0157] 适当的 pH 范围是,例如,6-8 优选 7-7.5,适当的培养温度在 10 和 40℃之间,优选在 30 和 37℃之间。

[0158] 通常温育细胞,直到蓄积了最大的表达的产物和/或生物物质,优选 1 小时和 20 天之间,更优选 5 小时和 3 天之间。

[0159] 作为生物物质的产率,表达的产物量也依赖于使用的培养系统。

[0160] 在振摇瓶中,用经本发明的载体转化的宿主可产生通常以 0.5g/l 培养基的量表达产物的培养物。使用发酵罐,以分批和/或补料分批模式,可获得以通常大于 0.5g/l 发酵肉汤,优选大于 1g/l,尤其是大于 1.3g/l 的量表达产物的培养物。

[0161] 而且,在使用宿主细胞的本发明的发酵方法中,可得到至少 10 ~ 300 OD_{600} ,尤其是至少 500 OD_{600} ,500 OD_{600} 和更大之间,更优选至少 5000 OD_{600} 和最优选的至少 10000 OD_{600} 的高细胞密度。尤其是,在根据本发明的补料分批方法中,可获得 500 OD_{600} 和大于 10000 OD_{600} 之间的细胞密度。

[0162] 为例证,10 OD_{600} 对应于平均约 0.322g 干质量/l。因而,100 的 OD_{600} 值对应于 32.2g 干质量/g 和 5000 OD_{600} 161g 干质量/l。

[0163] 通过本发明的特定诱导方案,根据需求分别考虑到生物物质,表达产物和诱导物消费,发酵聚焦可以最大化输出改变。

[0164] 例如,与第 1 冲击诱导的组别的诱导方案和以指数速度的诱导物的额外的补给导

致相对于物质浓度的靶向多肽高表达,其使进一步处理,诸如纯化步骤等更有效,及,由此,节省时间及成本。

[0165] 此外,本发明的宿主细胞的发酵允许无载体损失的高复制速度。

[0166] 根据本发明的发酵方法的一实施方式,培养宿主细胞诸如芽孢杆菌属(*Bacillus*),其包含携带可操作地连接到编码靶向多肽的核酸序列的甘露糖操纵子, PmanR 或 PmanP 的启动子的载体。对于芽孢杆菌属(*Bacillus*),优选的底物是葡萄糖。而且,甘露糖操纵子的启动子的诱导物是甘露糖。优选,发酵以补料分批模式进行。更优选地,如上所述,通过仅添加葡萄糖,宿主细胞在分批期期间生长,直到约 20 ~ 30 的 OD₆₀₀ 的细胞密度。随后补给期期间,可添加葡萄糖和诱导物甘露糖的混合物。

[0167] 也如上所述,在混合物中,葡萄糖与甘露糖的比可改变,例如自 3 : 1 至 1 : 3。此外,也可能仅补给甘露糖。

[0168] 优选地,除了甘露糖启动子之外,载体也可包含调控基因 manR 的完全或部分序列。

[0169] 发酵和在宿主细胞中表达之后,表达的产物诸如目的多肽则可自宿主细胞的培养回收。为了获得表达的产物的最大产率,通常在培养末了收获细胞,及诸如通过溶菌酶处理,超声处理或弗压碎器裂解来裂解。由此,多肽通常作为宿主细胞的粗裂解物首次获得。它们可然后通过本领域知道的标准蛋白纯化过程纯化,其可包括差异沉淀,分子筛层析,离子-交换层析,等电聚焦,凝胶电泳,亲和性及免疫亲和性层析。这些熟知的和常规实践的方法描述于,例如 Ausubel et al., supra., and Wu et al. (eds.), Academic Press Inc., N. Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology。例如,重组产生的免疫球蛋白的纯化,它们可用免疫亲和性层析通过含有结合有表达的免疫球蛋白可特异性结合的靶分子的树脂的柱来纯化。

[0170] 本发明也涉及在原核生物宿主中编码例如多肽的核酸的细胞内异源表达的方法和手段。尤其是,本发明涉及载体和该载体用于使用本发明的载体在原核生物宿主中异源多肽的细胞内表达的用途。

[0171] 在细胞内表达中,多肽在细胞质之内表达及不自细胞质运输到非-细胞质位置。多肽会以包含体形式或以可溶性形式在细胞质之内表达。也熟知用于自细胞,尤其是自细胞提取物分离及纯化多肽的方法。

[0172] 本发明的甘露糖启动子有利,它们可通过常见的和非-毒性及由此工业上有用的化合物紧密调控,诱导。

[0173] 而且,本发明的甘露糖启动子以及包含该甘露糖启动子的载体在细胞之内稳定,及甚至在多次细胞复制之后不失。由此,根据本发明转化的宿主细胞可有利地生长至非常高的细胞密度。

[0174] 本领域技术人员会同意,本文所述的本发明对除了那些特别描述的之外的变异和修饰灵敏。需知,本发明在不离开精神或其必要的特征的情况下包括全部该变异和修饰。本发明也包括此说明书中,个别或共同指称或指出的全部步骤,特征,组合物和化合物,及任何和全部组合或任何 2 种或更多所述步骤或特征。本公开因此应被认为是在全部方面例证且是非限制性的,通过随附的权利要求指示的本发明的范围,及相当的含义及范围之内的全部变化旨在包括在本文中。贯穿此说明书引用了各种参考文献,各通过引用整体并入本

文。

[0175] 上述描述将参照下列实施例更完全地明晰。但是,该例仅为实行本发明的方法的例示,及不旨在限制本发明的范围。

【实施例】

[0176] 【1:甘露糖操纵子的 manR 启动子和 manP 启动子的启动子区的分离和鉴定】

[0177] 如果不另外陈述,使用下列材料和方法:

[0178] 【细菌株和生长条件】

[0179] 将大肠埃希氏菌 (*E. coli*) JM109 (Yanisch-Perron C. et al., Gene33, 1985, 103-119) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 3NA (Michel J.F. et al., J. Appl. Bacteriol. 33, 1970, 220-227) 用作用于克隆及表达的主要宿主。使大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 在 LB 液体培养基 (Luria S.E. et al., Virology 12, 1960, 348-390) 和补充了 100 μ g/ml 氨苄西林或大观霉素的 LB 琼脂板中于 37°C 生长。使枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 在 LB 液体培养基和 C 或 S 最小培养基中于 37°C 生长 (Martin-Verstraete I. et al., J. Mol. Biol. 214, 1990, 657-671)。液体培养基和琼脂板分别补充了 100 μ g/ml 大观霉素, 10 μ g/ml 卡那霉素或 5 μ g/ml 红霉素。为诱导甘露糖启动子,以 0.2% (w/v) 的终浓度添加无菌过滤的或高压灭菌的 D-甘露糖。

[0180] 【材料】

[0181] 全部化学品从 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, 德国), Fluka (Buchs, 德国) 或 Merck (Darmstadt, 德国) 得到。合成 DNA 寡核苷酸购自 Eurofins MWG Operon (Ebersberg, 德国)。限制酶和 DNA 修饰酶购自 Roche Applied Science (Mannheim, 德国) 或 New England Biolabs. (Frankfurt am Main, 德国)。PCR 用自 Fermentas (ST. Leon-Rot, 德国) 的高保真度 -DNA 聚合酶在自 Biozym 的 MiniCycler 上运行。

[0182] 【DNA 的制备和转化】

[0183] 用 Qiagen (Hilden, Germany) 或 Roche (Mannheim, 德国) 的 DNA 制备试剂盒如制造商所描述进行自大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 或自琼脂糖凝胶的 DNA-分离。贯穿实施例使用标准分子技术。

[0184] 如 Chung C. T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, 2172-2175 所述将大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 用质粒 DNA 转化。将枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 用质粒 DNA 根据修饰的“巴黎方法”转化 (Harwood C. R. Molecular Biological Methods for Bacillus, 1990, John Wiley & Sons Ltd., England)。

[0185] 【 β -半乳糖苷酶活性测量】

[0186] 将要在 0.9ml Z-缓冲剂中检查的 0.1ml 的细胞于 37°C 用 10 μ l 甲苯处理 30min。用 o-硝基苯基- β -吡喃半乳糖苷于 22°C 根据 Miller 氏方法测定 β -半乳糖苷酶活性 (Miller J. H., 1972, experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor, NY)。

[0187] 【使用的寡核苷酸】

[0188] 【表 1】

[0189]

寡-核苷酸	序列	目的
s4693	5'-AAA AAA ACG CGT GTT TAA ACT GAA TTT CTG CTG AAT ATA CA-3'	自枯草芽胞杆菌 (<i>B. subtilis</i>) PCR 扩增 <i>manR</i>
s4694	5'-AAA AAA TCT AGA AAG TGT GAA TAA TAA GAT CTT G-3'	自枯草芽胞杆菌 (<i>B. subtilis</i>) PCR 扩增 <i>manR</i>
s4802	5'-AAA AAA ACT AGT GTT TAA ACA GGG AAA AAT GCC TTT ATT AC-3'	用于 P_{manP} 扩增的正向引物
s4833	5'-AAA AAA GTT TAA ACC CCT GGC GAA TGG CGA T-3'	自质粒 pDG1730 扩增 <i>spc</i>
s4835	5'-AAA AAA GAA TTC ATT AGA ATG AAT ATT TCC CAA AT-3'	自质粒 pDG1730 扩增 <i>spc</i>
s4956	5'-AAT TGC GTC GAG ACC CCT GTG GGT CTC GTT TTT TGG ATC CGG CGC CCA CGT GGC TAG CC-3'	<i>tufA</i> 终止子的插入
s4957	5'-TTA AGG CTA GCC ACG TGG GCG CCG GAT CCA AAA AAC GAG ACC CAC AGG GGT CTC GAC GC-3'	<i>tufA</i> 终止子的插入
s5006	5'-Cy5-TAG CCT TTT TTA TAG TTG TTC AGC CAC TGT-3'	用于引物延伸的标记的引物
s5007	5'-Cy5-ATC CAC GCC ATA ATG CAT GCC GCC ATT AAT-3'	用于引物延伸的标记的引物
s5097	5'-Cy5-CACTGTACCCTATCTGCGAAA-3'	用于引物延伸的标记的引物
s5098	5'-Cy5-ATTGAGATAATCCTCGATCACTT-3'	用于引物延伸的标记的引物
s5203	5'-GATATCCTGCACCATCGTC-3'	用于启动子研究的用于扩增 P_{manP} 的反向引物
s5208	5'-GGTACCATTCTTGCTGAATA-3'	自 pSUN279.2 扩增 P_{manR} -区
s5209	5'-CTTAAGCCTGTCAGTATCTACTTGAG-3'	自 pSUN279.2 扩增 P_{manR} -区
s5262	5'-AAAAAAGCTAGCGTTTAAACAAAAAGCGATTTTAATGAGCTG-3'	用于扩增 P_{manP} 的正向引物

[0190] 【实验 1 :DNA 片段携带甘露糖操纵子的启动子区的分离和 *manR* 启动子和 *manP* 启动子的转录起始位点的确定】

[0191] 通过使用 Qiagen 的 DNeasy 血 & 组织试剂盒 (Hilden, 德国) 分离枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 的染色体 DNA。

[0192] 从获得的 DNA 通过 PCR 使用引物 s4693/s4694 扩增具有含推定的 *manR* 启动子和 *manR* 和 *manP* 之间的基因间区的完全 *manR* 的约 2.3kb 的 DNA 片段。

[0193] 使用约 2.3kb 的获得的 DNA 片段用于测定 *manR* 启动子和 *manP* 启动子的转录起始位点的引物延伸实验。

[0194] 为分离用于引物延伸的 mRNA, 自大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 载体

pIC20HE (Altenbuchner et al., 1992, Methods Enzymol. 216, 457-466) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 载体 pUB110 (MacKenzie et al., 1986, Plasmid 15, 93-103) 构建穿梭载体。含有 *lys* 基因作为报告基因的载体, 所述基因编码自溶血性葡萄球菌 (*Staphylococcus simulans*) 的成熟形式的溶葡萄球菌酶 (Recsai et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1127-1131)。

[0195] 向此高拷贝 pUB110 衍生物, 在溶葡萄球菌酶基因上游克隆 2.3kbDNA 片段。得到的质粒命名为 pSUN178.4 和导入枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 3NA。

[0196] 使具有质粒 pSUN178.4 的枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 3NA 在有卡那霉素的 LB 培养基中生长。在指数生长期, 将培养用 0.2% 甘露糖诱导。于 37℃ 生长 1 小时之后, 收获诱导的及非-诱导的细胞。用 Qiagen-RNeasy Mini 试剂盒分离总 RNA。

[0197] 使用用 Cy5 在 5' - 端标记的引物 s5006, s5007, s5097 和 s5098。

[0198] 引物 s5006 和 s5007 与相对于溶葡萄球菌酶基因的起始密码子的分别 +21 ~ +50 及 +76 ~ +105 杂交。引物 s5097 和 s5098 与相对于 *manR* 的起始密码子的分别 +81 ~ +101 及 +131 ~ +153 杂交。

[0199] 将相同的引物用于 pSUN178.4 的质粒 DNA 的测序反应, 其作为尺寸标准物。分别使用自 Roche 的 AMV- 反转录酶和 T7-DNA 聚合酶用于反转录和 DNA 测序。反转录产物及测序在变性聚丙烯酰胺测序凝胶 (GE HEALTHCARE) 上分析。使用的全部其他试剂由 Amersham Pharmacia Biotech AutoRead Sequencing 试剂盒提供。

[0200] 通过使用引物 s5006 测定 *manP*- 启动子的转录起始位点。用相同的引物制备质粒 pSUN 178.4 的 DNA 序列反应及在相同的变性凝胶上运行而用于比较。图 1 显示 *manP* 启动子周围的 DNA 序列, 将在 A (腺嘌呤核苷酸) 的转录起始位点亮显。推导的 -10 和 -35 盒以斜体字表示, 通过箭标标记 *manR* 基因的结束和 *lys* 基因的起始, BglIII, XbaI, AflIII 和 NdeI 的限制性位点加下划线。

[0201] 用如以上描述关于 *manP* 启动子进行的 RNA 分离和 DNA 测序来测定 *manR* 启动子的转录起始位点, 除了使用在 *manR* 基因中结合的引物 s5098 之外。

[0202] 在图 2 和 3 中, 显示 *manR* 启动子区的 DNA 序列, 将在 G (鸟嘌呤核苷酸) 的转录起始位点亮显, 推导的 -10 和 -35 盒以斜体字表示, 及将 *lys* 基因和 *manR* 基因的起始分别通过箭标指示。限制性位点和推定的 *cre* 序列加下划线。

[0203] 当如通过引物延伸实验中更强得多的信号观察到的一样用甘露糖诱导细胞时, 自 *manR* 启动子和尤其是自 *manP* 启动子的转录强烈增加。

[0204] 使用的引物显示于以上表 1。

[0205] 【实验 2】

[0206] 根据实验 1 的引物延伸实验将 *manP* 启动子的转录起始位点位于接近 *manR* 和 *manP* 的开始之间的基因间区的 3' - 端。为更精确地测定 *manP* 启动子区, 通过 PCR- 扩增逐步缩短 2.3kb DNA 片段, 将获得的不同长度的序列片段克隆回相同的基础表达载体和表达研究。

[0207] 【(a) 基础表达载体的构建】

[0208] 构建含无启动子 *lacZ* 作为报告基因的表达载体。将表达载体设计为能在枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 及在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 二者中复制的穿梭载体及命名为 pSUN272.1。

[0209] 用自 pLA2 的 NdeI 和 XmaI (Haldimann A. et al, 2001, J. Bacteriol. 183, 6384-6393) 切割报告基因 lacZ, 并且连接到 pJOE5531. 1, 鼠李糖诱导性表达载体 pWA21 的衍生物 (Wegerer et al., 2008, BMC. Biotechnol. 8, 2), 其在 XmaI 位点含有枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) tufA 转录终止子。向此质粒, 在 AflIII/MunI 限制性位点之间插入一对寡核苷酸 s4956/4957, 以便在 lacZ 上游添加相同的 tufA 转录终止子。从而通过终止子避免自质粒启动子“通读”进入 lacZ 以及“通读”出 lacZ 进入侧接质粒序列。用寡核苷酸 s4833/4835 从质粒 pDGI730 (Geurout-Fleury et al., 1996, Gene 180, 57-61) 扩增对于大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 二者的大观霉素抗性基因 spc, 并插入以上获得的质粒。此外, 通过删除 BspHI/HindIII 片段来缩短大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 载体部分。随后, 将含枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) pMTLBS72 (Lagodich et al., 2005, Mol. Biol. (Mosk) 39, 345-348) 的复制区的 EcoRI/SphI 片段连接到质粒。

[0210] 通过用 AflIII 和 NheI 消化和连接将在实验 1 中获得的 2.3kb DNA 片段插入 pSUN272.1 的 lacZ 前, 由此获得表达载体 pSUN279.2, 其质粒图谱显示于图 4。

[0211] 使用的引物显示于以上表 1。

[0212] 【(b) 载体 pSUN279.2 的表达效率的确定】

[0213] 将在以上 (a) 中获得的质粒 pSUN279.2 和 pSUN272.1 导入枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA。后者作为背景对照。使携带一种或其他质粒的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 株在含大观霉素的 LB 培养基中生长, 及在指数生长期, 将 0.2% 甘露糖, 0.2% 甘露糖加 0.2% 葡萄糖或无糖 (未诱导的对照) 加入培养用于诱导。1 小时诱导之后, 通过 Miller 氏测定来测定细胞的 β -半乳糖苷酶活性。结果显示于图 5 和 7。

[0214] 含有 pSUN279.2 的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 的非-诱导的培养已显示相当高地高基础水平的 β -半乳糖苷酶活性。甘露糖的存在导致 β -半乳糖苷酶活性的再 4 倍增加, 然而用甘露糖和葡萄糖的活性减少, 但仍相当地在基础水平以上。结果明显指示, pSUN279.2 中见的启动子活性可来源于 manR 和 manP 之间的区, 自 manR 上游的区或自两者。

[0215] 因此, 通过切割显示于图 4 的 SfoI 和 NruI 之间的 pSUN279.2 的 2.3kb DNA 片段自 pSUN279.2 删除 manR 的上游区以及多数部分的 manR, 以给出质粒 pSUN284.1。

[0216] 得到的 pSUN284.1 的核酸序列显示于图 6。

[0217] 将枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 用此质粒 pSUN284.1 转化, 和如上所述测定表达效率。结果显示于图 5。如可见于图 5, 枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 中此删除 manR 的载体 pSUN284.1 相比枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 中的 pSUN279.2 显示仅基础水平的 β -半乳糖苷酶活性的约一半, 甚至通过甘露糖诱导更强增加, 和再次在葡萄糖的存在下更强减小。这些结果证明, manP 启动子位于 manR 和 manP 之间, 及显示 manR 的染色体拷贝足以在低拷贝质粒上调控全部 manP 启动子拷贝。

[0218] 【manP 启动子区的定位】

[0219] 为定位 manP 的启动子区, 如显示于图 6, 除了 pSUN284.1 的缩短的 DNA 片段之外, 通过在 manP 启动子的转录起始位点上游的不同位置在限制性位点切割及通过限制酶从 2.3kb DNA 片段制备进一步缩短的序列片段。

[0220] 缺失 manP 的转录起始位点上游 bp-81 及 bp-80 产生包含 SEQ IDNO:1 的第 2 缺失序列。

[0221] 进行进一步缺失 manP 的转录起始位点上游 bp-41 及 bp-40 (第 3 缺失序列)。

[0222] 以与以上 (2b) 中的质粒 pSUN284.1 类似方式, 通过将分别用引物 s4802/s5203 和 s5262/s5203 扩增的 PCR 产物经限制酶 EcoRV 和 NheI 插入 pSUN272.1 构建包含第 2 缺失序列, pSUN290, 及第 3 缺失序列, pSUN297.5 的质粒。

[0223] 将质粒插入枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 和如上 (b) 中所述培养。在 1 小时诱导之后, 如以上 (b) 中所述测定细胞的 β -半乳糖苷酶活性。结果显示于图 7。

[0224] 如显示于图 7, 无含 pSUN290 和 pSUN284.1 的株显示关乎通过甘露糖的 lacZ 诱导的显著差异。但是, 在包含有第 3 缺失序列的 pSUN297.5 的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 中, 通过甘露糖的诱导完全消除, 及基础表达水平几乎是 0。自这些结果得出, manP 甘露糖启动子区的 ManR 结合位点位于相对于 manP 的转录起始位点的 bp-80 和 -35 之间。

[0225] 【实验 3: manR 启动子的确定】

[0226] 【(a) cre 序列的鉴定】

[0227] 由于多数 CCR 通过分解代谢物控制蛋白 A (CcpA) 介导, 在全甘露糖操纵子中使用 DNA 比对功能以 Clone Manager 程序进行相应结合位点 (cre 序列) 的搜索。对于比对, 使用了 cre 共有序列 5' -WWTGNAARCGNWWCAWW-3'。

[0228] 如显示于图 2 和 3, 仅在 manR 的启动子区发现一种推定的 cre 序列, 其位于 -10 盒的下游。

[0229] 本发明的 SEQ ID NO:3 包括始于 bp-122 到 lacZ 的起始密码子的区, SEQ ID NO:4 包括显示于图 3 的序列的始于 bp-122 ~ bp+7 的区 (包括), 而本发明的 SEQ ID NO:5 包括显示于图 3 的序列的始于 bp-122 ~ bp-1 的区 (包括)。

[0230] 【(b) manR 启动子的表达效率的评估】

[0231] 为评价 manR 启动子的表达效率, 如上所述构建表达载体如 pSUN284.1, 及命名为 pSUN291。向此, 将包括推定的 manR- 启动子和 manR 的约 600bp 上游的 DNA 片段用引物 s5208/s5209 扩增, 及线性化的质粒 DNA pSUN279.2 作为模板和通过用 KpnI 和 AflIII 消化和连接而在质粒 pSUN272.1 的 lacZ 前插入。

[0232] DNA- 序列显示于图 3。

[0233] 将质粒 pSUN291 导入枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA, 和如实验 (2b) 中所述测量 β -半乳糖苷酶活性。

[0234] 结果显示于图 5。在本文中, 基础表达已相对高及通过添加 0.2% 甘露糖还增加约 3 倍。葡萄糖的添加导致 β -半乳糖苷酶活性的阻遏到几乎基础表达水平。

[0235] 结果指示, manR 启动子不仅仅是弱组成性启动子, 而且涉及甘露糖和 CCR 调节。

[0236] 【(c) manR 启动子区的定位】

[0237] 如在实验 (2c) 中, 为进一步定位 manR DNA- 序列的启动子区, 如显示于图 3, 从如 pSUN291 中含有的 DNA- 序列通过在 manR 启动子的转录起始位点上游的不同位置, 在限制性位点切割及通过限制酶制备不同长度的 DNA- 片段。

[0238] 通过将显示于图 3 的序列切割到转录起始位点 G 的 bp-100 及 bp-99 上游来获得第 1 缺失序列, 通过切割到转录起始位点 G 的 bp-83 及 bp-82 上游来获得第 2 缺失序列。

[0239] 类似于实验 (2c), 将获得的第 1 和第 2 缺失序列导入 pSUN272.1 及将得到的质粒分别命名为 pSUN384.1 和 pSUN385.2。

[0240] 将各质粒插入枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 和如实验 2b 中所示培养。1 小时诱导之后, 如实验 2b 中所示测定细胞的 β -半乳糖苷酶活性。结果显示于图 8。无关乎由 pSUN384.1 相比 pSUN291 的甘露糖的 lacZ 诱导的显著差异。但是, 在包含具有第 2 缺失序列的 pSUN385.2 的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 中, 通过甘露糖的诱导完全消除, 及基础表达水平几乎是 0。自此结果得出, manR 启动子区的 ManR 结合位点位于相对于 manR 的转录起始位点的 bp-99 和 bp-35 之间。

[0241] 【(II) 甘露糖操纵子的启动子区在高细胞密度发酵中的用途】

[0242] 【实验4:转化】

[0243] 测试携带本发明的启动子区的模型宿主的生长和表达能力。如显示于图 6 使用根据如导入质粒 pSUN284.1 的 manP 启动子区的核酸序列,和如用于实验 2c,如下所示构建质粒 pMW168.1 和通过转化导入作为宿主的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA。

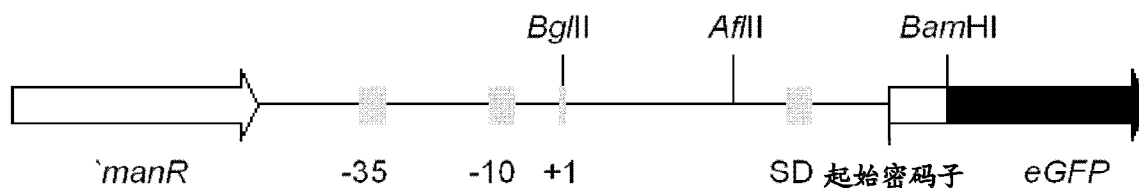
[0244] 【(a) 质粒 pMW168.1 的构建】

[0245] 如实验 (2a) 中所示设计在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 中可复制的穿梭载体, 例外是代替 *lacZ* 将 *eGFP* 用作报告基因。也将 *manP* 的转录起始区用基因 *gsiB* (应激蛋白; Jürgen 等人, 见上) 的转录起始区取代。

[0246] 而且,取代 eGFP 的起始密码子和起始密码子后的 6 个密码子。

[0247] 获得的启动子-及转录起始区的示意结构如下:

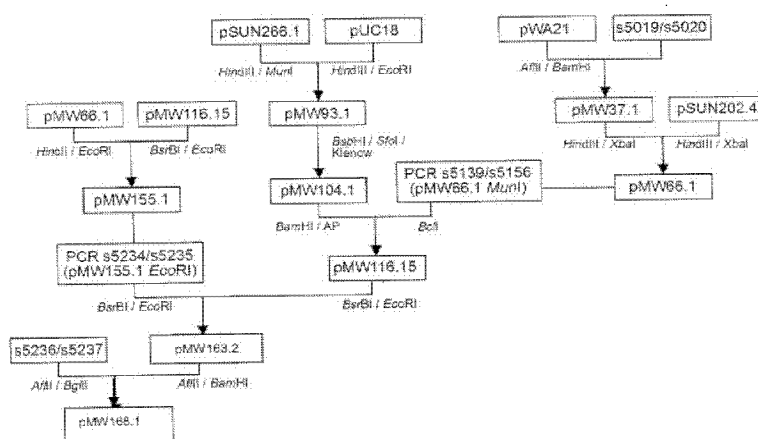
[0248]



[0249] 显示具有关联限制性位点的基因（箭标）和区（盒）的排列。

[0250] 一般而言,如显示于以下流程图获得质粒 pMW168.1:

[0251]



[0252] 在流程图中,使用的载体 -DNA,插入 -DNA 和互补寡核苷酸的名称如盒中显示,关于 PCR 产物、引物和模板 -DNA 如在括弧之内,使用的限制酶在相应位点指示。

[0253] 用大肠埃希氏菌 (E. coli) JM109 进行克隆步骤。

[0254] 使用的质粒是:具有 amp^r-抗性的用于 PCR 产物的 pUC18 阳性选择及克隆载体 (Yanosch-Perron 等人, 见上); 具有 amp^r-抗性的用于大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的 pWA21

表达及克隆载体 (Wegerer 等人, 2008, BMC Biotechnol. 8, 2); 具有 manP 启动子区及 amp 及 kan 抗性的 pSUN202. 4pUB 110 衍生物, 用于大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 的穿梭载体; 及具有 ter- 序列之间的整合位点及 spc 及 amp 抗性的 pSUN266. 1pUC18 衍生物。

[0255] 使用的引物序列如下:

[0256]

名称	序列 5' → 3'	描述
s5019	ttaagCTCTTAAGGAGGATTTTAGAATGGCTAAAGAAAAATTCg	tufA TI-区
s5020	ttaagGAATTTTTCTTTAGCCATTCTAAAATCCTCCTTAAGAGg	tufA TI-区(互补)
s5139	aaaaaatgatcaTTACTTGTACAGCTCGTC	正向引物 <i>PmanP-eGFP</i>
s5156	aaaaaatgatcaccggtCGATTGCCACATTAAAGG	反向引物 <i>PmanP-eGFP</i>
s5234	aaaaaacgCTCGTCTTCCTAAGCATCCT	正向引物 <i>rep</i> (<i>pUB110</i>)
s5235	aaaaaagaatTCGAGATCAGGGAATGAGTTT	反向引物 <i>rep</i> (<i>pUB110</i>)
s5236	ttaagAATTAAAGGAGGAATTCAAAATGGCAGACAATAACAAAg	gsiB TI-区
s5237	gatccTTTGTTATTGTCTGCCATTTTGAATTCCTCCTTTAATTc	gsiB TI-区(互补)

[0257] 使用互补寡核苷酸及经单限制性位点 Bg/II, AfIII 和 BamHI 进行包括起始密码子和起始密码子后的密码子的转录起始区的取代。分别经互补寡核苷酸 s5019 和 s5020, 以载体 pWA21 的 T7 基因 10 的转录起始区的用自枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 的 tufA 的翻译起始区的取代开始载体的构建 (Wegerer 等人, 见上)。在进一步克隆步骤中, 此转录起始区被 gsiB 转录起始区取代。最终质粒 pMW168. 1 含有包括自 pUB110 的 ori⁺ 的 rep 基因。

[0258] pMW168. 1 的质粒图谱显示于图 9。

[0259] 【(b) 结构稳定性和分开的确定】

[0260] 将枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 用载体 pMW168. 1 转化, 和测定在细胞分裂 (分开) 上载体的结构稳定性以及稳定的繁殖。

[0261] 将用 pMW168. 1 转化的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA 在 LB_{spc}- 培养基中预培养, 然后无选择压力地转移到 LB₀- 培养基。

[0262] 于 37°C 进行温育。在指数生长期末了, 将各培养接种于新鲜 LB₀- 培养基。重复此过程直到获得 100 代, 转移到新鲜培养基期间, 根据 Harwood et al., 1990, Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons Ltd. 的修饰的方法, 基于获得的测量的 OD- 值计算。

[0263] 结果显示于图 10。

[0264] 约 15 代之后, 多于 99. 9% 的细胞, 和甚至在 20 代之后, 约 90% 的细胞仍携带载体。仅自约第 25 代, 越来越多的细胞丢失载体。

[0265] 为测定质粒的结构稳定性, 在 15 代之后分自 20 个集落离质粒。通过琼脂糖凝胶电泳将约 0. 5 μg 的各分离的质粒与作为对照的分离自大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的 pMW168. 1 比较。观察到质粒和对照的运行中无差异, 指示未发生结构变异。

[0266] 这些结果显示, 质粒 pMW168. 1 不仅具有高结构稳定性, 而且如发酵中期望具有稳定的分开。

[0267] 【实验 5:发酵】

[0268] 用经包含报告基因 eGFP 的质粒 pMW168.1 转化的枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 3NA, 用不同诱导方案进行 6 次发酵运行, 及通过观察 eGFP 的荧光信号在线监控。

[0269] 作为发酵培养基, 使用 Wilms et al., 2001, *Biotechnol. Bioeng.* 73, 95-103 中公开及如下显示的知道的用于大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的高细胞密度发酵的培养基。

[0270] 【材料和方法】

[0271] 一般而言, 也对于发酵实验而言, 如果不另外陈述, 使用标准分子技术。

[0272] 【光密度】

[0273] 为测定光密度 (OD), 根据制造商的流程在 600nm 处使用 Amersham Bioscience 公司的分光光度计 Ultrospec 1100pro。

[0274] 【干生物质浓度的确定】

[0275] 为确定干生物质浓度 c_x , 使用 Ohaus 公司的湿度计 MB 835Halogen。

[0276] 【荧光的分光光度计测量】

[0277] 通过 TECAN 公司的多功能读取器 GENios, 使用读取器软件 XFluor 4 (版本 V4.11), 用下列测量参数分别分析 eGFP 的表达和荧光:

[0278]

测量参数	取值
感光滤光片	485nm
发射滤光片	535nm
获取 (手动)	60
整合时间	20 μ s
闪光数	3
读取模式	顶部

[0279] 【发酵罐中在线荧光测量】

[0280] 在发酵期间, 使用荧光探针在线监控 eGFP 的表达 (Micropack HPX-2000, Ocean Optics, Inc. 的高功率氙光源; S2000 纤维光学分光计)。

[0281] 测量参数如下: 感光滤光片 485nm, 发射滤光片 535nm, 滤光片 0.6。为记录及存储, 使用 Ocean Optics SpectraSuite 软件。

[0282] 作为相对荧光单元 (RFU) 指示荧光。获得 4.000RFU 不久之前, 将 50ms 的整合时间变为 25ms, 然后变为 10ms。在这些情况中, 测量值分别乘以 2 和 5。

[0283] 【预培养物的培养】

[0284] 将单集落放置到 LB 琼脂板上, 及在 5ml 包括 0.02% (w/v) 酪蛋白氨基酸 (CA) 和抗生素的 Spizizens 最小培养基 (SMM) 中过夜培养。将 1ml 的过夜培养物添加到 20ml 含 0.02% (w/v) CA 和抗生素的 SMM 中, 及于 37°C 在 250ml Erlenmeyer 瓶中温育 5 ~ 6h (预培养物 1)。

[0285] 将 10ml 的预培养物 1 添加到 200ml 包括 5g/l 葡萄糖的分批培养基中, 及于 37℃ 在 1l Erlenmeyer 瓶中温育达 8h (预培养物 2)。为发酵罐的接种, 使用具有 1.2 和 2.2 之间的 OD₆₀₀ 的预培养物 2。

[0286] 【】

[0287] 一般而言, 根据 Wilms et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 73, 95-103 的原理进行发酵。

[0288] 一旦葡萄糖, 碳源, 完全消耗, 将分批模式切换到补料分批模式。

[0289] 通过在补料分批期指数添加补给溶液, 可获得 $\mu = 0.10\text{h}^{-1}$ 的恒定生长速率, 及同时避免被葡萄糖的分解代谢物阻遏, 因为葡萄糖被细胞立即消费。

[0290] 【蛋白分析】

[0291] 通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用由具有以下组成的 3% 浓缩胶和 12% 分离胶组成的聚丙烯酰胺凝胶分析收获的细胞的粗蛋白提取物:

[0292]

组分	浓缩胶 (3%)	分离胶 (12%)
去离子化的 H ₂ O	3.00ml	6.70ml
TRIS 0.5M pH6.8	1.25ml	-
TRIS 1.5M pH8.8	-	5.00ml
SDS 10% (w/v)	0.05ml	0.20ml
丙烯酰胺 30% (w/v)	0.67ml	8.00ml
APS 10% (w/v)	0.05ml	0.10ml
TEMED	0.005ml	0.01ml

[0293] 使用 Biometra 公司的 Twin Mini 凝胶室。

[0294] 为变性, 将 12 μ l 蛋白混合物的粗提取物与 3 μ l 5×SDS- 应用缓冲剂混合, 和在 Eppendorf 公司的 Thermomixer 5438 中于 95℃ 温育 5 分钟。冷却到室温之后, 将样品通过离心分离, 和完全放在凝胶上。

[0295] 在浓缩胶中分离期间, 电流是 10mA 及在溴酚前沿达到浓缩胶之后增至 20mA。使用 1×SDS- 电泳缓冲液和 Roth 公司的长度标准物 **ROTI®-Mark** 用于分离。一旦溴酚前沿完全跑出凝胶, 则结束电泳。为检测不同蛋白条带, 将凝胶于室温与考马斯染色溶液温育 30 分钟, 及随后于室温再用去 - 染色溶液处理 30 分钟。为将余下的蓝色背景移出凝胶, 将凝胶在 7.5% 乙酸中温育几小时。

[0296] 缓冲溶液及染色以及去 - 染色溶液的组成如下:

[0297]

缓冲剂 / 溶液	组分	浓度
考马斯	考马斯 R250	2.0g

染色溶液	考马斯 G250	0.5g
	EtOH	425ml
	MeOH	50ml
	冰醋酸	100ml
	去离子化的 H ₂ O	ad 1.0l
去 - 染色溶液	EtOH	450ml
	冰醋酸	100ml
	去离子化的 H ₂ O	450ml
5× 应用缓冲剂	TRIS/HCl (2M, pH6.8)	6.25ml
	EDTA	0.146g
	SDS (40% (w/v))	6.25ml
	β - 巯基乙醇 (纯)	2.50ml
	甘油 (86% (v/v))	29.00ml
	溴酚蓝	0.05g
	去离子化的 H ₂ O	ad 50ml
10× 电泳缓冲液	TRIS	30g
	甘氨酸	144g
	SDS (20% (w/v))	50ml
	去离子化的 H ₂ O	ad 1.0l

[0298] 注：

[0299] TRIS：三（羟甲基）氨基甲烷

[0300] SDS：十二烷基硫酸钠

[0301] APS：过硫酸铵

[0302] TEMED：N, N, N', N' - 四甲基乙二胺，

[0303] EDTA：乙二胺四乙酸。

[0304] 【基因表达的诱导】

[0305] 为基因表达的诱导,评价了不同模式的诱导物溶液的添加(诱导方案):

[0306] 1. 在给定时间点以单份添加(冲击诱导)

[0307] 2. 经时间间隔,冲击诱导与进一步诱导组合,其中

[0308] ■进一步添加是以恒定速度以逐步增加的量,或

[0309] ■进一步添加是以指数增加的速度,

[0310] 3. 在达到给定细胞密度之后起始诱导物溶液的添加。

[0311] 表2:使用的培养基

[0312]

培养基	组分	浓度
LB ₀ -培养基 (pH7.2)	胰蛋白胨	10.0g
	酵母提取物	5.0g
	NaCl	5.0g
	H ₂ O, 去-离子化的	ad 1.0l
Spizizens Minimalmedium (SMM)	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0g
	KH ₂ PO ₄	6.0g
	K ₂ HPO ₄	14.0g
	Na ₃ 柠檬酸盐	1.0g
	MgSO ₄	0.2g
	D-葡萄糖*	5.0g
	H ₂ O, 去-离子化的	ad 1.0l
用于枯草芽胞杆菌 (B. subtilis) 发酵的批-培养基	(NH ₄) ₂ H-柠檬酸盐	1.00g/l
	Na ₂ SO ₄	2.68g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.50g/l
	NH ₄ Cl	0.50g/l

	K_2HPO_4	14.60g/l
	$NaH_2PO_4 \cdot xH_2O$	4.00g/l
	D-葡萄糖*	25.00g/l
	$MgSO_4(1m)^*$	2.00ml/l
	TES*(如下)	3.00ml/l

[0313] *要独立地高压灭菌

[0314]

微量元素溶液 (TES)	$CaCl_2 \times 2H_2O$	0.50g/l
	$FeCl_3 \times 6H_2O$	16.70g/l
	Na_2-EDTA	20.10g/l
	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0.18g/l
	$MnSO_4 \times H_2O$	0.10g/l
	$CuSO_4 \times 5H_2O$	0.16g/l
	$CoCl_2 \times 6H_2O$	0.18g/l

[0315] 分别用 2M NaOH 和 1M HCl 溶液调整 pH。对于琼脂板,额外地添加 15g/l BD 公司的 Euroagar。

[0316] 将全部培养基于 121℃ 高压灭菌约 30min。

[0317] 【发酵运行 1:冲击诱导】

[0318] 在 30l 反应器 (Bioengineering 的 D598 和 D596) 中进行发酵运行 1。批体积是 8l。依赖于 OD_{600} , 接种 200 ~ 400ml 预培养物 2 来将起始 OD_{600} 调整到 0.1。

[0319] 分批期期间,温度是过夜 30℃,及在 12h 之后,增加到 37℃。通过在全发酵期间添加 24% (v/v) NH_4OH ,将 pH 调至约 7.0。通气速度可调整达 30l/min。在分批期开始时,通气速度是 10l/min。

[0320] 补料培养基 I 和 II 的组成显示如下表 3 所示。

[0321] 表 3:补料培养基 I 和 II 的组成

[0322]

补料培养基 I	
组分	浓度
葡萄糖* H_2O	654.76g/l
$MgSO_4 * 7 H_2O$	25.50g/l
*TES	120.00ml/l
H_2O 去-离子化的 ad 4.2l	

补料培养基 II	
组分	浓度
$(NH_4)_2HPO_4$	396.00g/l
调到 pH7.0	
总体体积 1.0l	
H_2O , 去-离子化的	ad 1.0l

[0323] *微量元素溶液 pH7.0

[0324] 按比例加培养基 I 和 II 至它们的总体积,即 4.2 : 1.0(对应于总体补给 F 的 80.8%培养基 I 和 19.2%培养基 II)。

[0325] 为在补料分批期开始诱导,加入一份 0.2% (w/v) D- 甘露糖溶液。

[0326] 干生物质浓度及监控的荧光信号分别显示于图 11a 和 11b。

[0327] 在图中,将干生物质 c_x 的浓度对于培养持续时间对数性地标绘。分批和补料分批期通过垂直线分离。

[0328] 将在 535nm 处发射波长的监控的荧光信号对于培养期标绘。箭标指示诱导的点。

[0329] 自图 11a 得出,获得 82.75g DM/l 的最大干生物质 (DM) 浓度,其对应于基于 11.71 的反应体积的约 970g DM。

[0330] 在首次添加中,用 16g 消耗总共 71.5g 的诱导物 D- 甘露糖。

[0331] 在全体补料分批期期间,比生长速率 μ 是 0.10h^{-1} 。

[0332] 如显示于图 11b,在首次添加 D- 甘露糖之后,在头 5 小时的补料分批期之内,荧光信号强烈增加到达约 2,200RFU 的最大值。然后,信号连续降低。推定此表达速度的减小是由于诱导物的消费和 / 或由增加的细胞质量的隔离效应。37 小时之后再 0.5% (w/v) 甘露糖溶液的添加导致荧光信号的达 2,100RFU 的新的增加。

[0333] 【发酵运行 2 :用恒定速度的联合诱导】

[0334] 重复如在运行 1 中的相同的过程,除了添加诱导物的模式变化之外。如在运行 1 中,将 0.2% (w/v) D- 甘露糖溶液在补料分批期起点以单份加入。一旦 RFU 达到运行 1 的荧光信号的曲线的转折点,1,500,开始第 2 份的诱导物的添加。

[0335] 第 2 次添加步骤期间,以恒定速度以逐步增加量以 0.39g/min 的平均速度加 20% (w/v) 甘露糖溶液,直到已添加全部第 2 份。

[0336] 结果显示于图 12a 和 12b,显示干生物质浓度和荧光信号曲线,标识与在图 11a 和 11b 中相同。在图 12b 中,通过箭标指示第 1 份的添加点和第 2 份的添加的起始和结束。

[0337] 从图 12a 的结果来看,干生物质的最大浓度是 67.6gDM/l ,对应于基于 11.91 反应体积的约 804g DM。总共 (第 1 和第 2 次添加) 添加 70g D- 甘露糖。

[0338] 生物质的产率相比运行 1 降低 17%。此与补料分批 - 期期间的低比生长速率 $\mu = 0.09\text{h}^{-1}$ 关联,然而分批 - 期期间的比生长速率是 0.43h^{-1} 。

[0339] 自图 12b 的结果来看,在 25 小时之后,荧光信号最大达到约 4,900RFU 和连续降低到约 2,500RFU。

[0340] 相比运行 1,在运行 2 中,表达速度可随着生物质浓度的轻微减小而增大 120%。

[0341] 【发酵运行 3 和 4 :用指数速度的联合诱导】

[0342] 在运行 3 和 4 中使用 3.71 小实验室发酵罐 (Bioengineering 公司的 Kleinlaborfermenter)。批体积 (分批培养基加接种物) 总共是 1.5l。依赖于 OD_{600} ,接种 100 ~ 200ml 的预培养物 2 来将起始 OD_{600} 调整到约 0.1。在分批和补料分批期中温度是 37°C 。在发酵期间,用 24% (v/v) NH_4OH 将 pH 调整到 7.0。在发酵期间通气速度恒定是 $21/\text{min}$ 。通过搅拌器的旋转速度调整氧输入。发酵压力在开始时是 1.3 巴,及然后增加到 1.5 巴,以按需增强氧输入。在完全消费碳源葡萄糖之后,将分批操作切换为补料分批操作。

[0343] 不像运行 2,在运行 3 和 4 中,以指数增加速度补诱导物溶液。而且,将含有葡萄糖

的培养基 I 与含有诱导物的培养基 II 共补给。补料培养基 I 和 II 的组成显示于下表 4：

[0344] 表 4：补料培养基 I 和 II 的组成

[0345]

补料培养基 I		补料培养基 II	
组分	浓度	组分	浓度
D-葡萄糖	200g/l	D-甘露糖	200g/l
TES	40m/l	TES 40ml/l	
MgSO ₄	3.85g/l	MgSO ₄ 3.85g/l	
(NH ₄) HPO ₄	63.36g/l	(NH ₄) ₄ HPO ₄ 63.36g/l	
H ₂ O 去-离子化的 ad 1.0l		H ₂ O, 去-离子化的	ad 0.25l (运行 3) ad 1l (运行 4)

[0346] 将培养基 I 和 II 的全部组分独立地高压灭菌。

[0347] 在两种培养基中,因为组分的溶解度,将 pH- 值用 85% (v/v)H₃PO₄ 调整到 3.3。

[0348] 通过下式计算在时间 t 的总补料 F：

$$[0349] \quad F(t) = \left[\frac{\mu_{\text{set}}}{Y_{x/s}} + m \right] \cdot \frac{C_{x0} \cdot V_0}{C_{s0}} \cdot e^{\mu_{\text{set}} \cdot t}$$

[0350] 其中, m = 维持系数 · (0.04g g⁻¹h⁻¹)

[0351] Y_{x/s} = 相对于底物的生物质的单位产率系数 (对于葡萄糖是 0.5)

[0352] C_{x0} = 在补料分批期起始的生物质浓度

[0353] V₀ = 在补料分批期起始的反应器体积 (= 批体积)

[0354] C_{s0} = 补给溶液中的葡萄糖浓度

[0355] 为计算,推定枯草芽胞杆菌 (B. subtilis) 消耗的 D- 甘露糖与产率系数 Y_{x/s} 葡萄糖相当。

[0356] 在 KLF 中,可独立地供给培养基 I 和 II,且比例比可改变。

[0357] 【(a) 发酵运行 3】

[0358] 生物质浓度及监控的荧光信号显示于图 13a 和 13b,图中的标识与在运行 1 中相同。

[0359] 在补料分批期开始,添加一份 0.2% (w/v) 甘露糖溶液 (总共 16g 甘露糖),及以 50 : 50 的比开始指数补给培养基 I 和 II (间隔 I)。随着斜率减小,含有所述份甘露糖的培养基 II 增加到 60%,和总补料 F (培养基 I 和 II) 到 125%,用于维持基于葡萄糖的生长 (间隔 II)。约 2h 之后,再次监控斜率减小,及所述份培养基 II 增加到 66.6%,同时总补料 F 增加到 150% (间隔 III)。在培养基 II 全体消费之后,以 100% 的总补给用补给培养基 I 持续发酵 (不显示于图 10)。

[0360] 运行 3 的进程和数据总结于下表 5：

[0361] 表 5：

[0362]

间隔 [h]	培养基 I : II [%]	F [%]	μ [h ⁻¹]	RFU	干生物质 [gDM/l]
0-12			0.52	-	
I 12-17	50 : 50	100	0.09	7000	

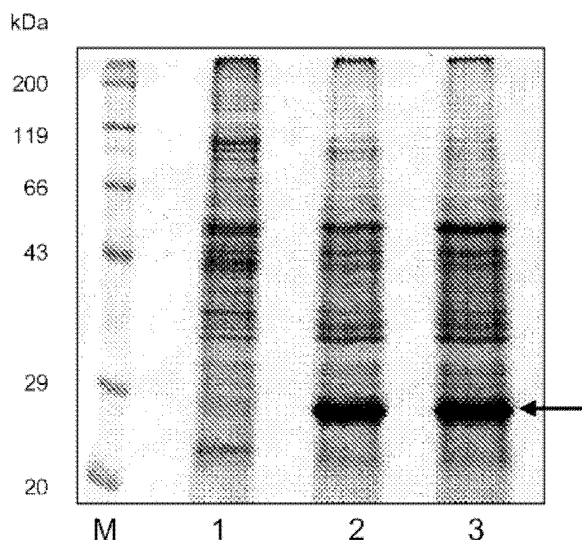
II 17-19	50 : 75	125	0.08	9000	
III 19-22	50 : 100	150	0.09	11000	22

[0363] 添加总共 50g 甘露糖。

[0364] 在各 12h, 20h 和 24h, 取样品用于分析基于总共 $100D_{600}$ 细胞的可溶性蛋白级分的 SDS- 凝胶上的表达。

[0365] 得到的 SDS PAGE 示于下 :

[0366]



[0367] 从左显示 : (M) 长度标准物 (**ROTI[®]-Mark**), (1) 12h 之后, 不诱导的 ; (2) 20h 之后, 8h- 诱导 ; (3) 24 小时之后, 12h 诱导。

[0368] 20h 和 24h 之后, 在约 27kDa 呈现清楚的泳道, 指示 eGFP 的表达 (箭标)。

[0369] 【(b) 发酵运行 4】

[0370] 重复与在运行 3 中相同的过程, 除了培养基 II 的补给体积 (甘露糖) 增加到总共 1.0l 之外。

[0371] 干生物质浓度和荧光信号显示于图 14a 和 12b, 标识与在运行 1 中相同。

[0372] 进程和数据总结于下表 6 :

[0373] 表 6 :

[0374]

间隔 [h]	培养基 I : II [%]	F [%]	μ [h ⁻¹]	RFU	干生物质 [gDM/l]
0-15			0.40		
I 15-22	50 : 50	100		3500	
II 22-38	50 : 75	120		10000-7800	
III 38-39	50 : 100	150		8900	40.4

- [0375] 添加总共 200g 甘露糖。
- [0376] 为补偿观察的氮缺乏,在发酵约 15 小时持续时间之后,以恒定速度额外地补给 (NH₄)₂HP0₄。
- [0377] 在间隔 II 中,达到 10000 的最大 RFU,在间隔 II 的过程之内降低到 7800RFU。
- [0378] 【(a) 发酵运行 5 和 6 :无冲击诱导】

[0379] 在 301 发酵罐中进行两种发酵。

[0380] 在两种运行中,细胞生长直到高细胞密度,在达到高细胞密度之后,将指数增加的葡萄糖补给速度用甘露糖的恒定补给取代。

[0381] 使用的补料培养基 I, II 和 III 显示于下表 7:

[0382] 表 7:

[0383]

补料培养基 I		补料培养基 II		补料培养基 III	
组分	浓度	组分	浓度	组分	浓度
D-葡萄糖*H ₂ O	654.76g/l	(NH ₄) ₂ HPO ₄	396.00g/l	D-甘露糖	400.00g/l
MgSO ₄ *7 H ₂ O	23.50g/l			MgSO ₄ *7H ₂ O	23.50g/l
TES	120.00ml/l			SEL	120.00ml/l
H ₂ O 去-离子化的	ad 4.2l	H ₂ O 去-离子化的	ad 1.0l	H ₂ O 去-离子化的	ad 1.0l
		pH	7.0		

[0384] 【发酵运行 5】

[0385] 以指数增加的速度按比例加培养基 I 和 II 至它们的总体积 4.2 : 1.0。在达到高细胞密度之后,将由培养基 I 和 II 组成的补给用对应于培养基 I 和 II 的最后指数补给速度的体积的恒定体积的由培养基 II 和 III 以 20 : 80 的比例组成的补给取代。

[0386] 荧光信号显示于图 15,标识与在运行 1 中相同。

[0387] 推定,约 17h 发酵持续时间之后图 15 中荧光信号的最小增加是由于培养基 III 的短期渗漏。

[0388] 运行 5 的进程和数据总结于下表 8:

[0389] 表 8:

[0390]

补料分批期 [h]	培养基 [%] I:II:III	RFU _{max}	比生长速率 [h ⁻¹]	干生物质 [g DM/l]	甘露糖总和 [g]
15-35	80.8:19.2:-	-	0.1		
35-39	-: 20:80	2,800		80	150

[0391] 【(b) 发酵运行 6】

[0392] 重复与在运行 5 相同的过程,除了在达到高细胞密度之后,在恒定添加由培养基 II 和 III 组成的补给之前用 0.2(w/v) 甘露糖溶液冲击诱导 (总共 16g 甘露糖) 添加总共 600g 甘露糖之外。

[0393] 荧光信号显示于图 16,标识与在运行 1 中相同。

[0394] 运行 6 的进程和数据总结于下表 9:

[0395] 表 9:

[0396]

补料分批期 [h]	培养基 [%] I:II:III	RFU max	比生长速率 [h ⁻¹]	干生物质 [g DM/l]	甘露糖总 [g]
20-40	80.8:19.2:-	-			-
40	0.2% (w/v) 甘露糖溶液	-			16
42-53	-80:20	14,000		82	600

[0397] 【运行 1 ~ 6 的评估】

[0398] 为在最大荧光时间评估,测定干生物质浓度 c_x , 反应器体积 V_R , 消耗的甘露糖和自诱导起始的持续时间及总结于下表 10 :

[0399] 表 10 :

[0400]

发酵运行	荧光 _{max} RFU	c_x gDMI ⁻¹	VR I	诱导物 gMan	表达的持续时间 h
1	2200	16	8.2	16	5
2	4900	22	8.3	70	8
3	11000	22	1.6	50	10
4	10000	17	1.7	60	13
5	1700	80	12.0	150	5
6	14000	82	14.7	600	12

[0401] 基于显示于表 10 的对于各运行的处理数据,计算以最大荧光 RFU/l 的产率和小时。而且,表达效率作为自基于绝对生物质 (gDM) 和感应器浓度 (gman/L) 的最大荧光计算的相对荧光来表达。

[0402] 结果显示于下表 11 :

[0403] 表 11 :

[0404]

发酵运行	产率 RFU I ⁻¹ h ⁻¹	相对荧光 RFU(gDM) ⁻¹	相对荧光 RFU (人/l) ⁻¹
1	53.7	16.8	1127.5
2	73.8	26.8	581.0
3	687.5	312.5	352.0
4	452.5	346.0	283.3
5	28.3	1.8	136.0
6	79.4	11.6	343.0

[0405] 这些结果明显显示,使用携带甘露糖启动子的质粒的本发明可通过添加诱导物 D- 甘露糖来成功地用于高细胞密度发酵方法和正控制的表达。

[0406] 而且,通过选择诱导方案,分别考虑到生物质,表达产物和诱导物消费,根据需求,发酵灶可以最大化输出改变。

[0407] 考虑到辅助的下游处理诱导物,用根据运行 3 的组合的冲击诱导和指数补给的方案特别有利。

[0408] 在本文中,相对于生物质产生的高表达产物使得进一步处理诸如纯化步骤等更有效及,由此,节省时间和节省成本。

[0001]

序列表

<110> Lonza AG

<120> 发酵方法

<130> 9200-9315

<150> EP09010287.2

<151> 2009-08-10

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 143

<212> DNA

<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 1

tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60

tttcggtata cagttgagac aagatcttat tattcacact ttctagaaat aattttctta 120

agaaggagat atacatatga cac 143

<210> 2

<211> 80

<212> DNA

<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 2

tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60

tttcggtata cagttgagac 80

<210> 3

<211> 195

<212> DNA

<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 3

tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tgcgtttttt 60

ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120

ggtttcttat atagtatact tatactatca atttgctcaa gtagatactg acaggcttaa 180

gaaggagata tacat 195

[0002]

<210> 4
<211> 128
<212> DNA
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 4
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60
ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120
ggtttctt 128

<210> 5
<211> 121
<212> DNA
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 5
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60
ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120
g 121

图 1

图 2

图 3

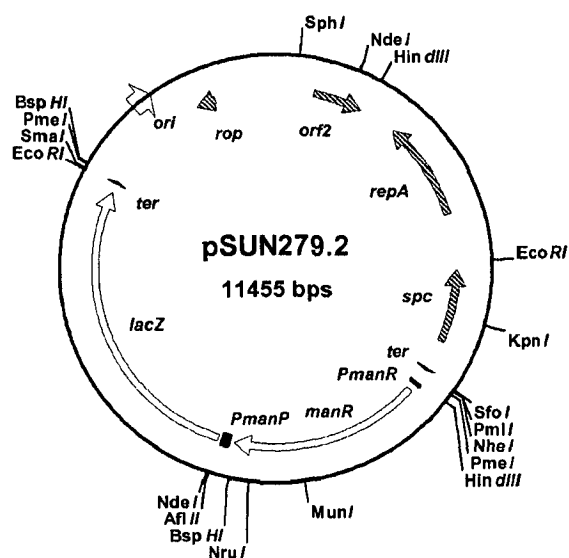


图 4

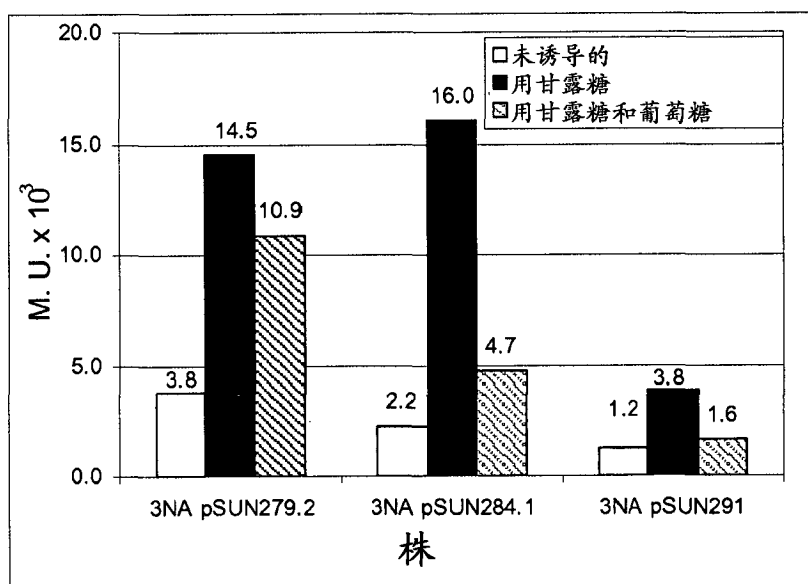


图 5

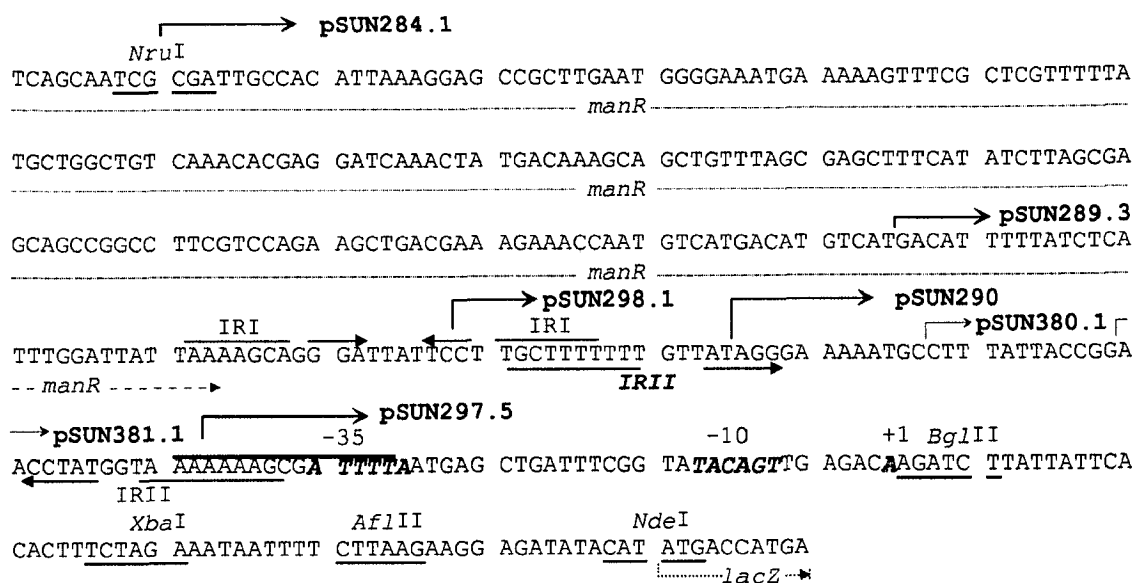


图 6

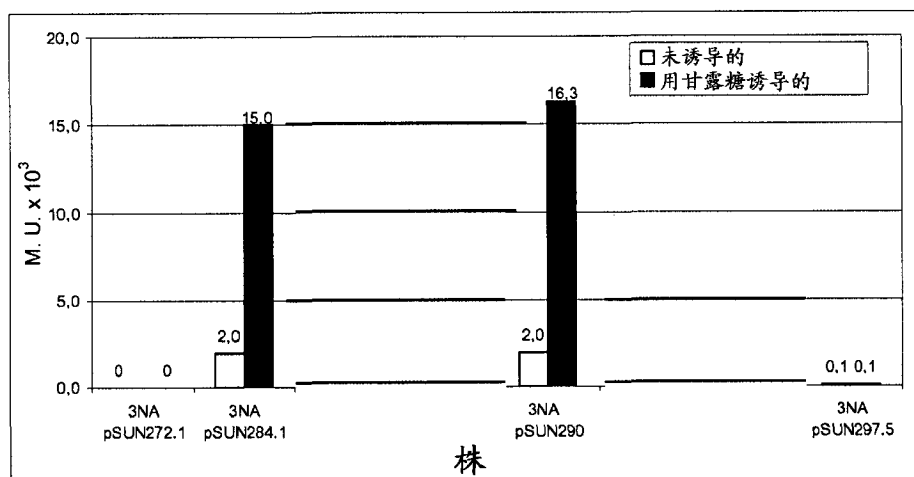


图 7

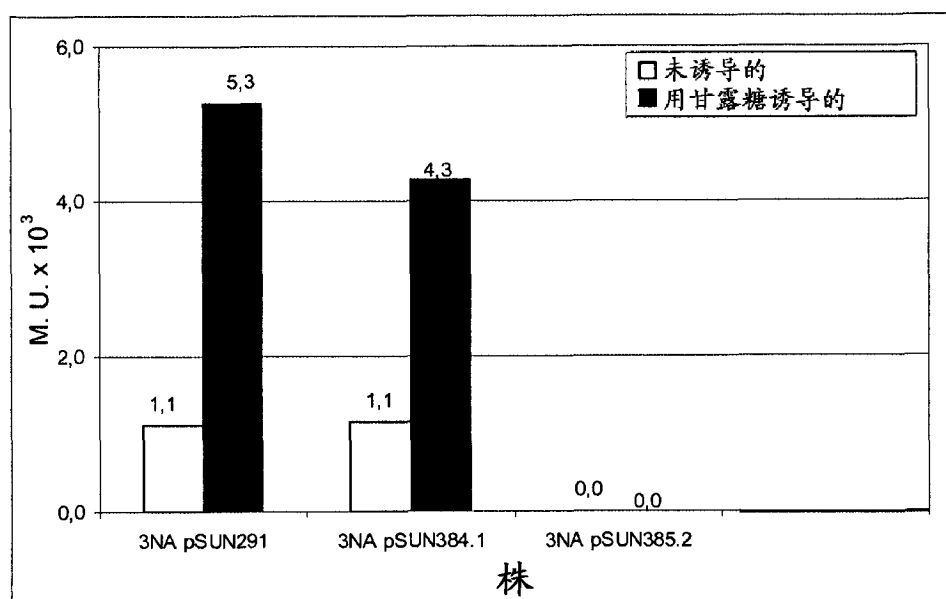
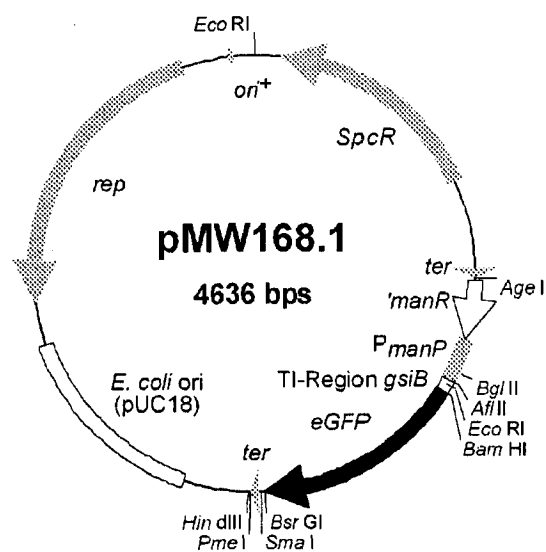
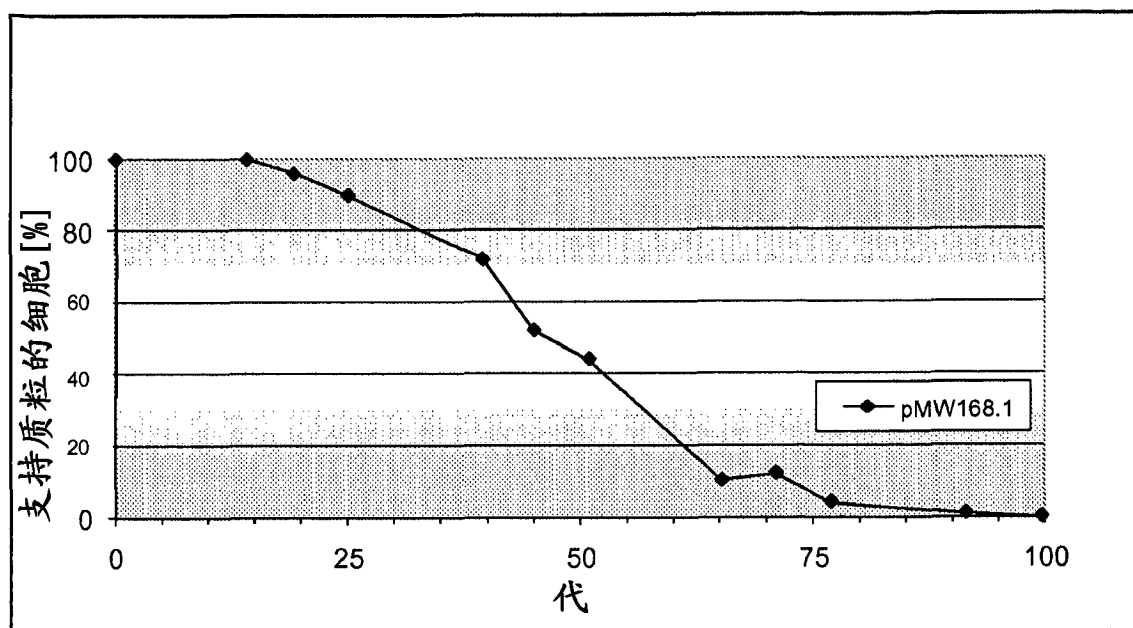


图 8



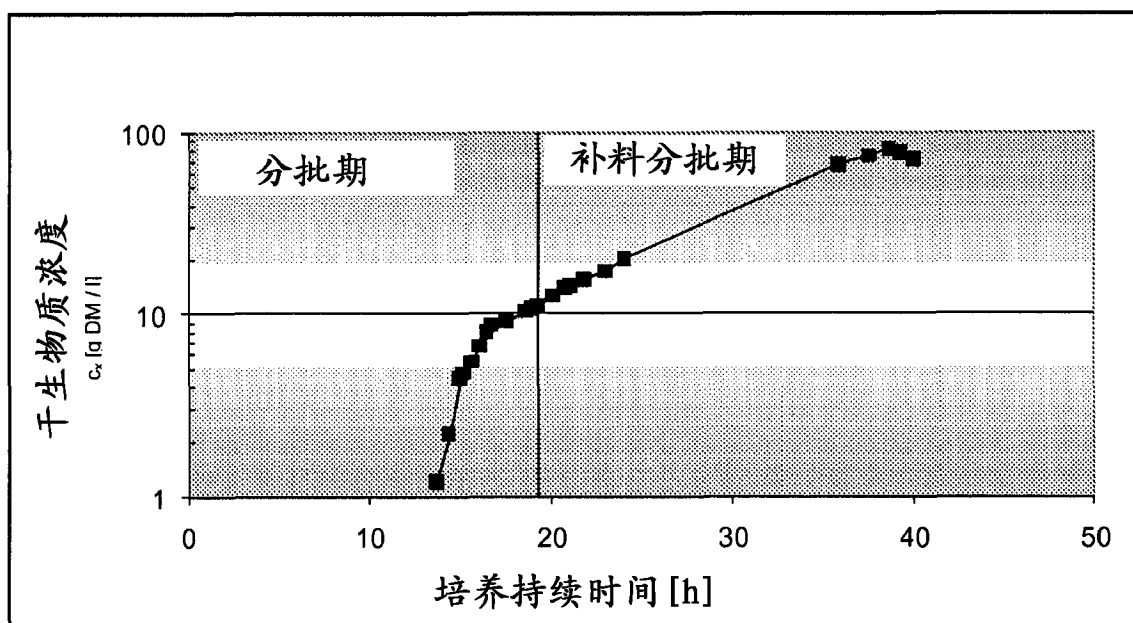
pMW 168.1的质粒图谱

图 9



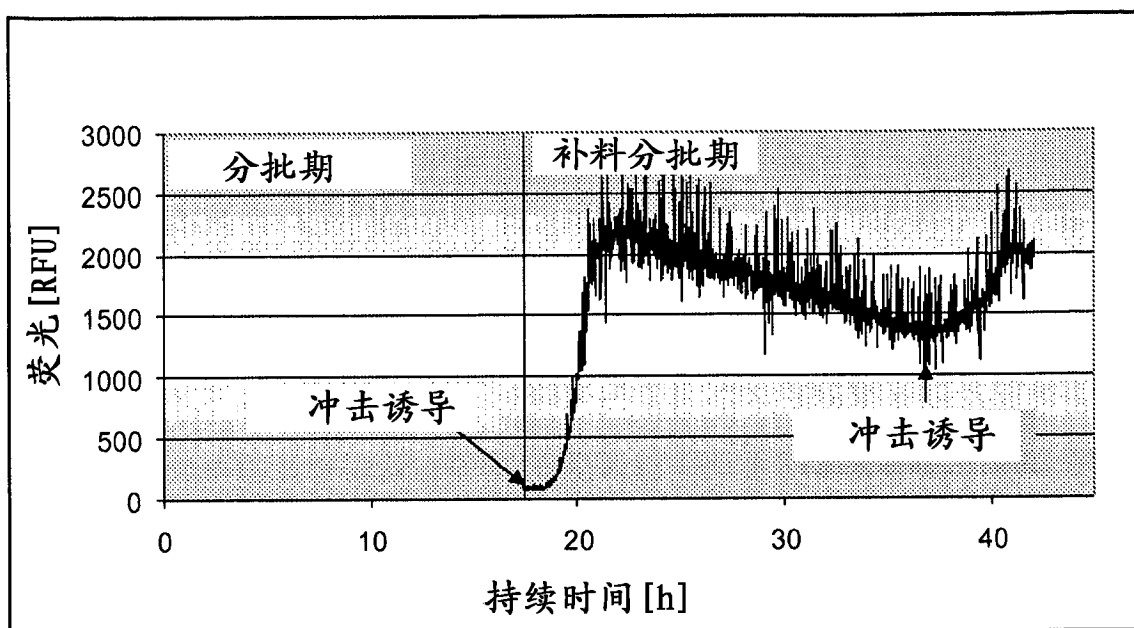
枯草芽孢杆菌3NA中pMW 168.1的质粒稳定性测试

图 10



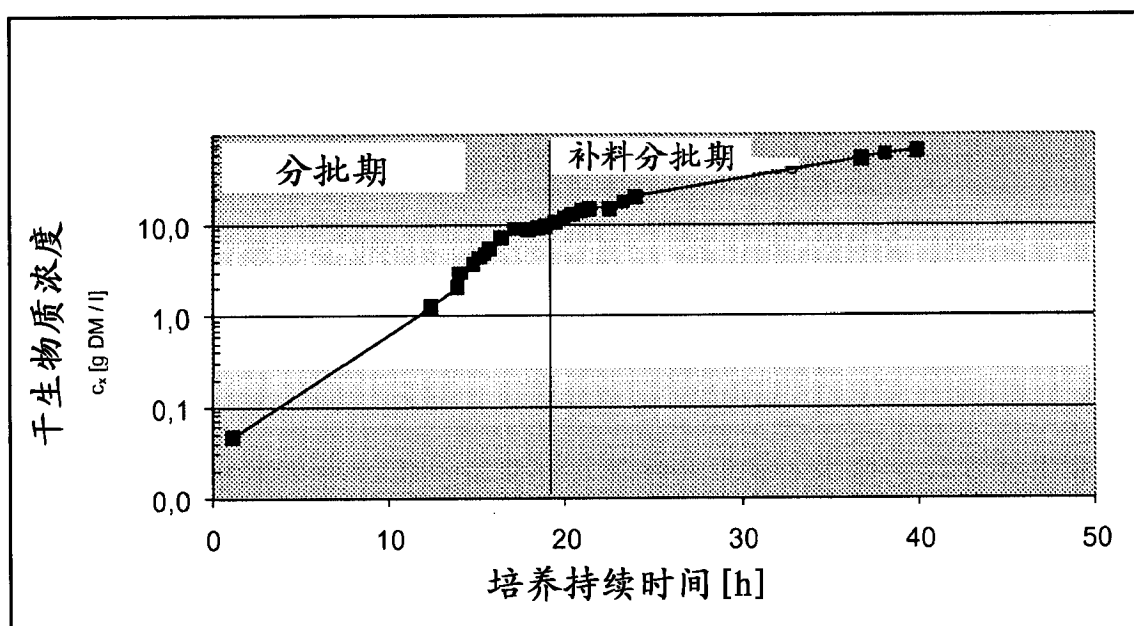
运行1的生长进程

图 11a



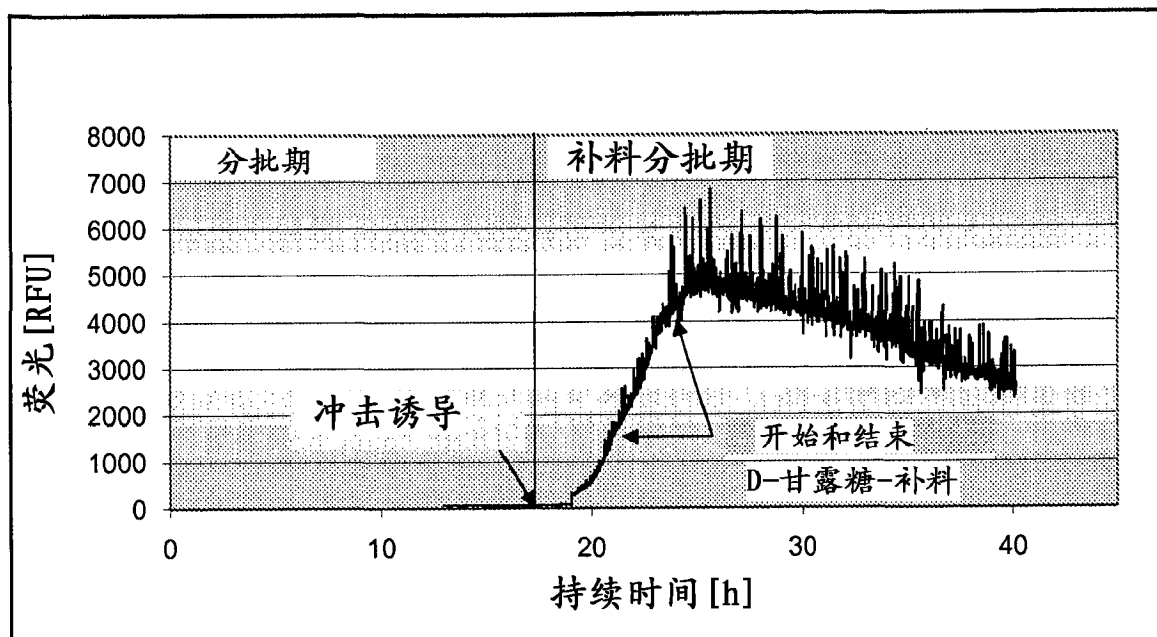
运行1的荧光信号

图 11b



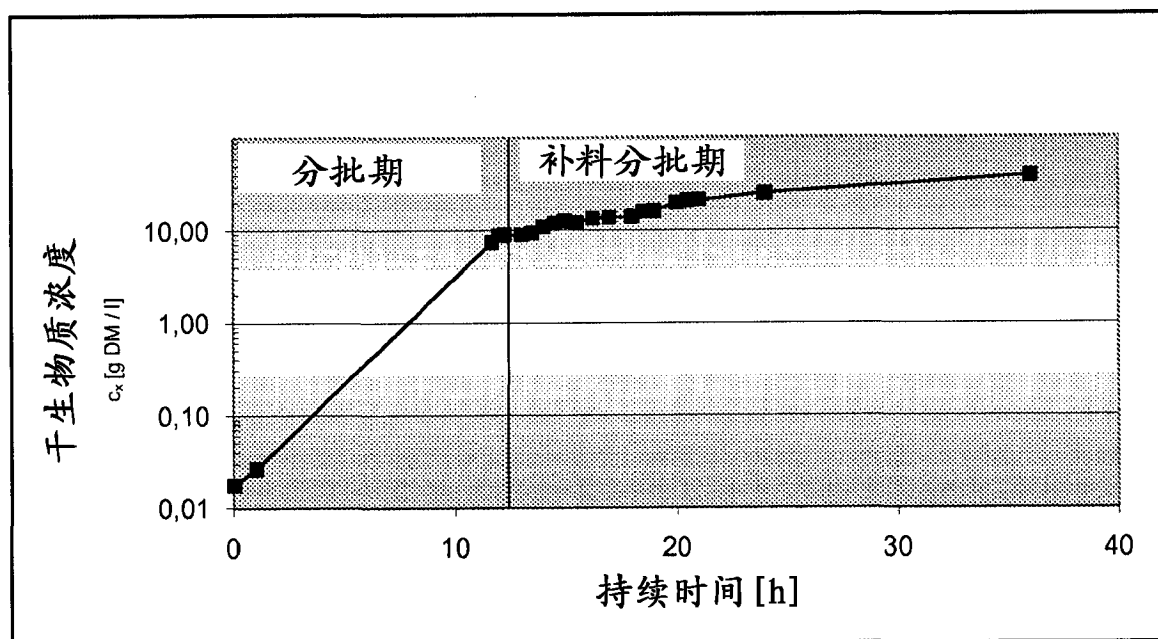
运行2的生长进程

图 12a



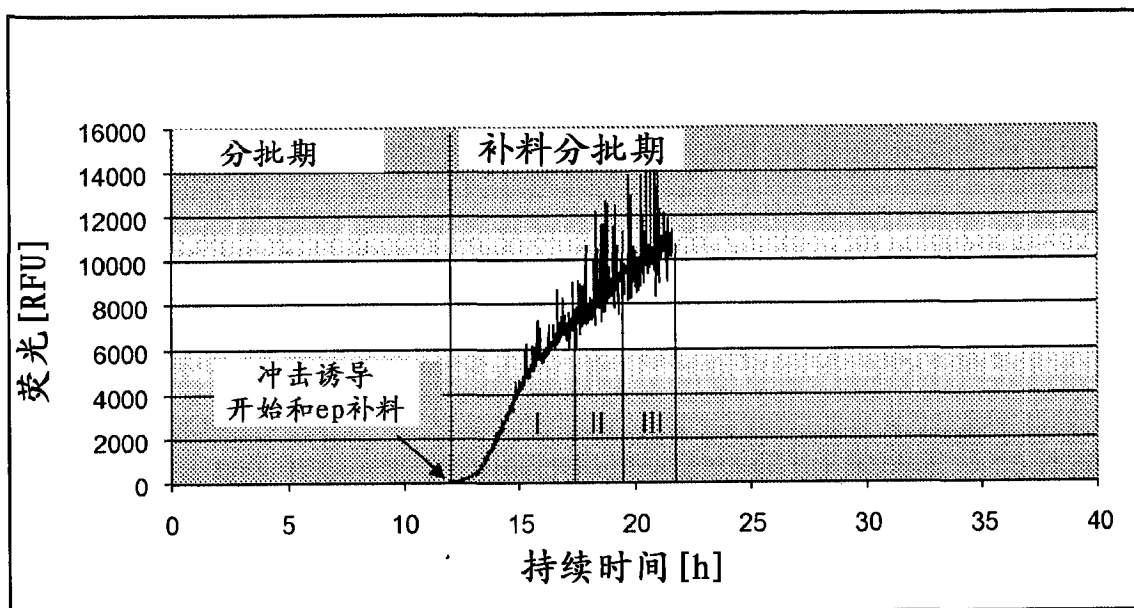
运行2的荧光信号

图 12b



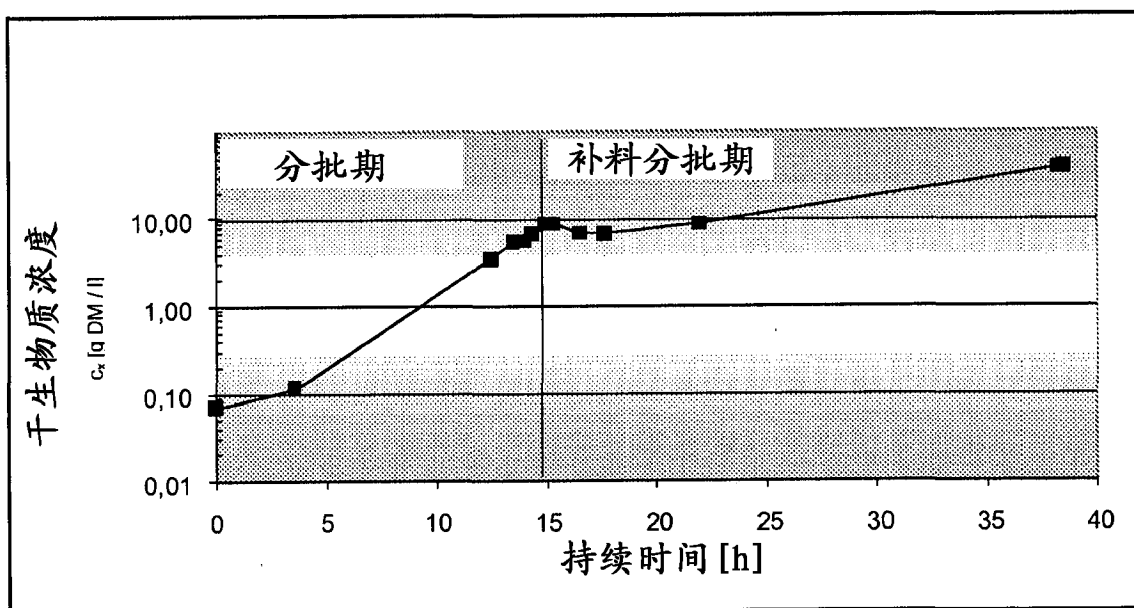
运行3的生长进程

图 13a



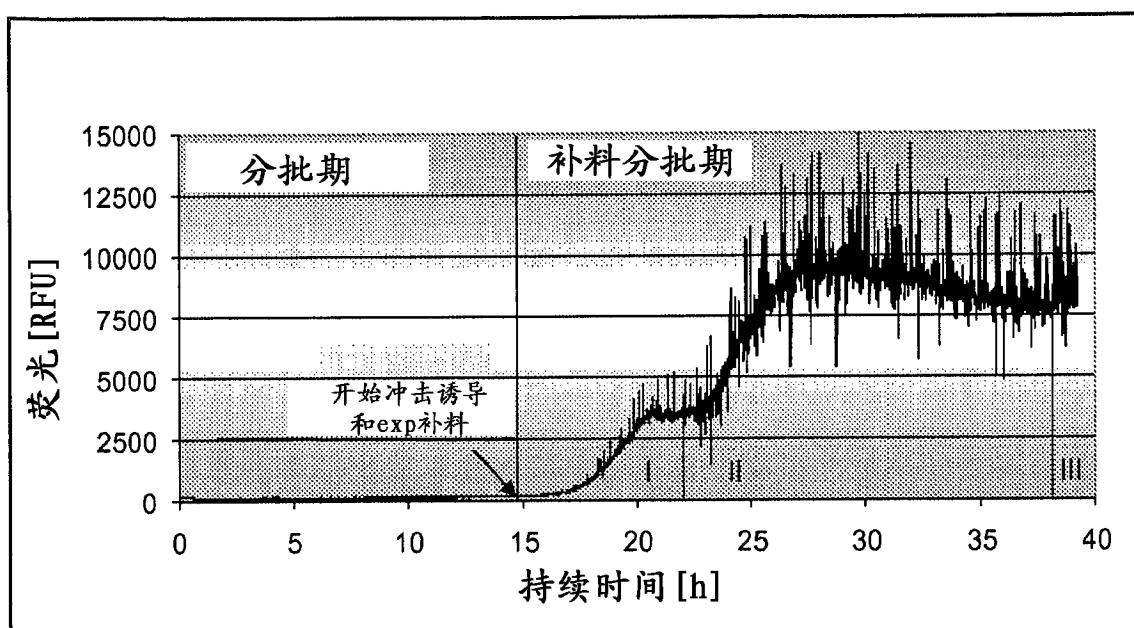
运行3的荧光信号

图 13b



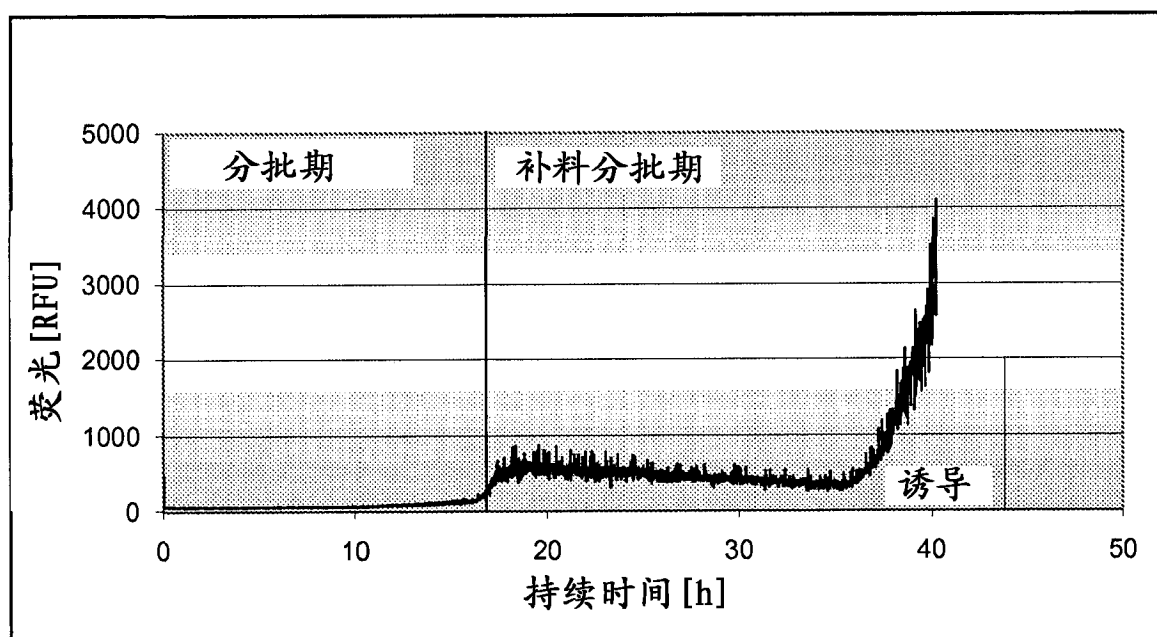
运行4的生长进程

图 14a



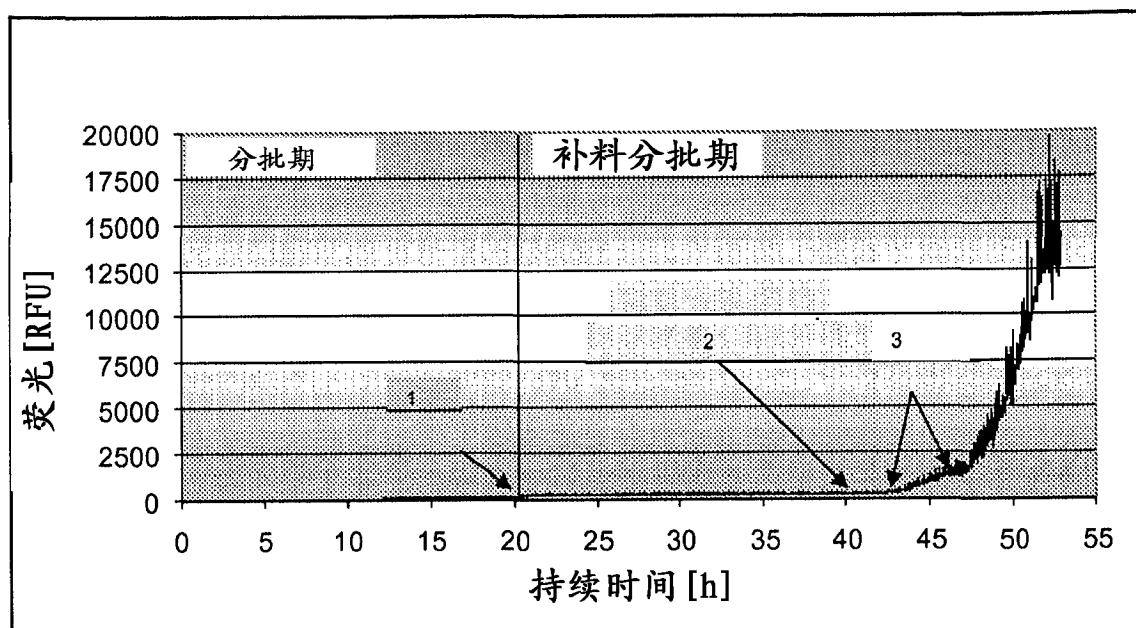
运行4的荧光信号

图 14b



运行5的荧光信号

图 15



- [1: 葡萄糖补料的开始
2: 冲击诱导D-甘露糖以及葡萄糖补料的结束
3: D-甘露糖的恒定补料]

运行6的荧光信号

图 16