

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 11 月 28 日 (28.11.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/239579 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/67* (2006.01)
C07K 14/32 (2006.01) *C12N 9/90* (2006.01)
C12N 9/56 (2006.01) *C12N 9/26* (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01) *C12R 1/125* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/135786

(22) 国际申请日: 2023 年 12 月 1 日 (01.12.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310581833.0 2023年5月23日 (23.05.2023) CN

(71) 申请人: 江南大学 (JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 张康 (ZHANG, Kang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。吴敬 (WU, Jing); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。朱昀颉 (ZHU, Xuyang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。罗慧 (LUO, Hui); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 (HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING EXPRESSION QUANTITY OF RECOMBINANT PROTEIN IN BACILLUS SUBTILIS BY MEANS OF CO-EXPRESSING BACILLUS-DERIVED ENHANCEMENT FACTOR

(54) 发明名称: 一种共表达芽孢杆菌来源增强因子提高重组蛋白在枯草芽孢杆菌中表达量的方法

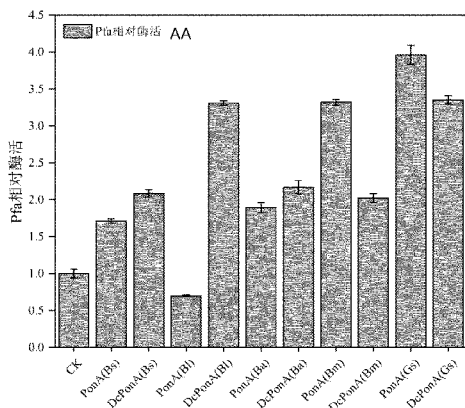


图 2 AA Relative enzymatic activity of Pfa

(57) Abstract: Provided is a method for improving the expression quantity of a recombinant protein in bacillus subtilis by means of co-expressing a bacillus-derived enhancement factor, which belongs to the technical field of enzyme engineering. The gene for coding the recombinant protein is respectively co-expressed with bacillus-derived PonA, a PonA truncate, OppA or SppA, so as to increase the expression quantity of the recombinant protein. The results show that the method can increase the expression quantity of ultra-high temperature amylase, medium temperature amylase, or sucrose isomerase to 3.96 times, 1.49 times, and 2.26 times at the shaking flask level. The expression quantity of the ultra-high temperature amylase can be increased by 26% in high-density fermentation of a 3L bioreactor. The Bacillus subtilis, as an exogenous protein expression host, provides a new developable target, and at the same time provides technical support for the optimization and modification of the enhancement factor.

(57) 摘要: 提供了一种共表达芽孢杆菌来源增强因子提高重组蛋白在枯草芽孢杆菌中表达量的方法, 属于酶程技术领域。将编码重组蛋白基因分别与芽孢杆菌来源的PonA、PonA截短体、OppA或SppA共表达, 以提高重组蛋白的表达量。结果显示, 所述方法可使超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶在摇瓶水平的表达量提高至3.96倍、1.49倍和2.26倍。在3L生物反应器高密度发酵中可将超高温淀粉酶的表达量提高26%。所述枯草芽孢杆菌作为外源蛋白表达宿主提供了新的可开发靶点, 同时为增强因子的优化改造提供了技术支持。

哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区
501, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种共表达芽孢杆菌来源增强因子提高重组蛋白在枯草芽孢杆菌中表达量的方法

技术领域

本发明涉及一种共表达芽孢杆菌来源增强因子提高重组蛋白在枯草芽孢杆菌中表达量的方法，属于酶工程技术领域。

背景技术

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是芽孢杆菌属 (*Bacillus Cohn*) 的一种革兰氏阳性菌株。*B. subtilis* 由于不产毒素和致热致敏蛋白，因此被列为美国 FDA 《GRAS(公认为安全物质)》清单认证菌株，其易于分离培养，可高密度发酵和蛋白分泌能力强的特性，使得枯草芽孢杆菌作为重要的工业菌株，用于生产多种外源重组蛋白和代谢产物，其优秀性状具备较高的鉴定价值。同时，枯草芽孢杆菌具有清晰的遗传背景和成熟的分子生物学基因编辑方法，这有利于对其进行基因改造以强化枯草芽孢杆菌作为重组蛋白生产宿主的表达能力。

进一步提高枯草芽孢杆菌的外源蛋白生产能力是当前研究的重中之重。目前已经采取了许多策略以改造这种模式微生物以获得更高的重组蛋白产量，例如过表达 Sec 途径相关因子，敲除胞内或胞外蛋白酶，增加伴侣蛋白含量等。然而，这些改造靶点的选取极大程度上依赖于现有的对于枯草芽孢杆菌功能基因注释，而蛋白的合成分泌过程并不是由单一途径参与调控。有研究指出，调控生理相关功能的基因在蛋白质表达或代谢物积累过程中发挥重要作用，如 Jennifer Staudacher 通过上调翻译起始因子表达水平将异源蛋白表达水平提高至 3 倍，Xiao-Ran Jiang 通过调控细胞形态控制基因，将 PHB 的产量提高至 1.8 倍。因此，当前对于蛋白质合成分泌相关途径的注释并不完善，这意味着当前的改造策略是相对片面的，从而限制了枯草芽孢杆菌作为表达宿主的进一步开发。

目前针对蛋白质表达过程中其关键作用的因子的鉴定仍不完善，因此急需在现有基础上，开发其他新型能够增强重组蛋白在枯草芽孢杆菌中表达的因子。

发明内容

为解决现有技术中重组蛋白在枯草芽孢杆菌中表达量有限的问题，本发明提供了一种提高枯草芽孢杆菌中重组蛋白表达量的方法，所述方法是在表达重组蛋白的同时过表达芽孢杆菌 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽酶 SppA。

在一种实施方式中，所述的 PonA 是来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、巨大芽孢杆菌

(*Bacillus megaterium*) 或嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 的 A 类青霉素结合蛋白。

在一种实施方式中, 来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 PonA 蛋白为 PonA (Bs), 具有 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.1 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中, 来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 PonA 蛋白为 PonA (Bl), 具有 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.2 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中, 来源于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的 PonA 蛋白为 PonA (Ba), 具有 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.3 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中, 来源于巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的 PonA 蛋白为 PonA (Bm), 具有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.4 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中, 来源于嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 的 PonA 蛋白为 PonA (Gs), 具有 SEQ ID NO.5 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.5 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中, 所述的 PonA 截短体是来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 或嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 的 A 类青霉素结合蛋白截短体。

在一种实施方式中, 来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 PonA 蛋白截短体为 DcPonA (Bs), 具有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.6 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中, 来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 PonA 蛋白截短体为 DcPonA (Bl), 具有 SEQ ID NO.7 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.7 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中, 来源于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的 PonA 蛋白截短体为 DcPonA (Ba), 具有 SEQ ID NO.8 所示的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.8 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸

序列。

在一种实施方式中，来源于巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）的 PonA 蛋白截短体为 DcPonA（Bm），具有 SEQ ID NO.9 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.9 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中，来源于嗜热脂肪芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）的 PonA 蛋白截短体为 DcPonA（Gs），具有 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.10 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中，所述枯草芽孢杆菌来源的 ABC 途径转运蛋白 OppA 具有 SEQ ID NO.21 所示的氨基酸序列；所述枯草芽孢杆菌来源信号肽酶 SppA，具有 SEQ ID NO.22 所示的氨基酸序列。

在一种实施方式中，所述的重组蛋白包括但不限于超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

在一种实施方式中，所述超高温淀粉酶具有 SEQ ID NO.23 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.23 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中，所述中温淀粉酶具有 SEQ ID NO.24 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.24 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中，所述蔗糖异构酶具有 SEQ ID NO.25 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.25 具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

在一种实施方式中，以 pUB110 为表达载体表达超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

在一种实施方式中，以 pAD123 为表达载体表达所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽酶 SppA。

在一种实施方式中，所述方法是在同一宿主中表达重组蛋白和所述 PonA、OppA 以及 SppA。

在一种实施方式中，所述宿主包括但不限于枯草芽孢杆菌 SCK6。

在一种实施方式中，所述的重组蛋白通过组成型启动子 P_{amyQ} 进行表达，所述启动子 P_{amyQ} 。

的核苷酸序列如 SEQ ID NO.31 所示。

在一种实施方式中,所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽肽酶 SppA 通过启动子 P_{glv} 或启动子 P_{HpaII} 进行表达。

在一种实施方式中,所述启动子 P_{HpaII} 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.32 所示。

在一种实施方式中,所述启动子 P_{glv} 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.33 所示。

本发明还提供了外源蛋白表达量提高的枯草芽孢杆菌重组菌,所述枯草芽孢杆菌重组菌在表达外源蛋白的同时分别共表达芽孢杆菌来源的 A 类青霉素结合蛋白 PonA 或 DcPonA、枯草芽孢杆菌来源的 ABC 途径转运蛋白 OppA 或枯草芽孢杆菌来源的信号肽肽酶 SppA。

在一种实施方式中,所述外源蛋白是指相对于表达和分泌该蛋白质的枯草芽孢杆菌而言的外源性(exogenous)的蛋白质。例如,外源蛋白可以是源自微生物的蛋白质、源自植物的蛋白质、源自动物的蛋白质、源自病毒的蛋白质、甚至是氨基酸序列由人工设计而成的蛋白质。特别是,异源蛋白质可以为源自人的蛋白质。异源蛋白质可以是单体蛋白质(monomeric protein)或多聚体蛋白质(multimeric protein)。“多聚体蛋白质”指可以作为包含两个或多个亚基的多聚体而存在的蛋白质。在多聚体中,各亚基可以通过二硫键等共价键实现连接;可以通过氢键和疏水性相互作用等非共价键实现连接,或者可以通过它们的组合实现连接。在多聚体中优选包含一个或多个分子间二硫键。多聚体可以是包含单一种类的亚基的同源多聚体,也可以是包含两种以上种类的亚基的异源多聚体。需要说明的是,在多聚体蛋白质是异源多聚体的情况下,构成多聚体的亚基中的至少一个亚基是异源蛋白质即可。即,所有亚基可以是异源的,或者仅一部分亚基是异源的。异源蛋白质可以是天然的具有分泌性的蛋白质,也可以是天然的不具有分泌性的蛋白质,优选其是天然的具有分泌性的蛋白质。此外,异源蛋白质可以是天然的 Tat 依赖性分泌性蛋白质,也可以是天然的 Sec 依赖性分泌性蛋白质。

在一种实施方式中,以 pUB110 为表达载体表达超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

在一种实施方式中,以 pAD123 为表达载体表达所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽肽酶 SppA。

本发明还提供了构建所述枯草芽孢杆菌重组菌的构建方法,所述方法包括向枯草芽孢杆菌中导入重组蛋白的编码基因,和编码增强因子的基因。

在一种实施方式中,所述编码增强因子的基因包括但不限于 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽肽酶 SppA 的编码基因。

在一种实施方式中,所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA 的编码基因具有 SEQ ID NO.11~SEQ ID NO.15 任一所示的核苷酸序列。

在一种实施方式中,所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体的编码基因具有 SEQ ID NO.16~SEQ ID NO.20 任一所示的核苷酸序列。

在一种实施方式中,所述重组蛋白的编码基因包括但不限于超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶的编码基因。

在一种实施方式中,所述超高温淀粉酶的编码基因具有 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列。

在一种实施方式中,所述中温淀粉酶的编码基因具有 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列。

在一种实施方式中,所述蔗糖异构酶的编码基因具有 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列。

本发明还提供所述枯草芽孢杆菌重组菌在生产超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶中的应用。

在一种实施方式中,所述应用是将所述重组菌在发酵培养基中培养一段时间,收集超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

在一种实施方式中,所述应用是在 30~40℃,或 30~37℃,或 35~40℃,或 37~40℃,或 35~37℃ 发酵。

在一种实施方式中,所述发酵是发酵至少 24 h,或至少 36 h,或至少 42 h,或至少 48 h,或至少 60 h。

在一种实施方式中,所述发酵培养基中包含酵母粉、大豆蛋白胨、柠檬酸铵和金属离子。

在一种实施方式中,所述发酵培养基含有酵母粉 9.0 g/L、大豆蛋白胨 18 g/L、柠檬酸铵 1.0 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 14.66g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 2.68 g/L、 Na_2SO_3 2.0 g/L、 NaH_2PO_4 3.49 g/L、 $MgSO_4$ 0.49 g/L、TES 金属离子液 0.3 % v/v。

在一种实施方式中,所述 TES 金属离子液含有: $CaCl_2$ 0.5 g/L、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.18 g/L、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1 g/L、 $FeCl_3$ 8.35 g/L、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.16 g/L、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.18 g/L、 $Na_2 EDTA$ 10.5 g/L。

在一种实施方式中,所述发酵的过程中还进行了补料。

在一种实施方式中,所述补料是补加含葡萄糖的补料培养基。

在一种实施方式中,所述补料培养基含有葡萄糖、大豆蛋白胨、酵母粉和金属离子。

在一种实施方式中,所述补料培养基含有葡萄糖 250.0 g/L、大豆蛋白胨 66.66 g/L、酵母粉 33.33 g/L、 $MgSO_4$ 0.39 g/L、TES 金属离子液 4.0 % v/v。

本发明还提供所述枯草芽孢杆菌重组菌或所述方法在食品、化工、制糖、饲料等领域生产产品中的应用。

有益效果：

(1) 本发明通过过表达芽孢杆菌来源的增强因子 PonA、OppA 或 SppA，显著提高了重组蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达量，可使超高温淀粉酶酶活提高至野生型的 2.03 倍、1.42 倍和 1.92 倍。

(2) 本发明还筛选了不同来源的增强因子 PonA 蛋白，可使共表达超高温淀粉酶的表达量相比对照菌株提高至 1.71~3.96 倍。

(3) 本发明对不同来源的 PonA 蛋白 FN3 结构域进行了截短，获得的截短体 DcPonA 与超高温淀粉酶共表达可使超高温淀粉酶表达量相比对照菌株提高 2.02~3.35 倍。

附图说明

图 1 为共表达枯草芽孢杆菌来源的 PonA、OppA 或 SppA 的重组菌对于超高温淀粉酶、中温淀粉酶和蔗糖异构酶酶活影响的示意图。

图 2 为共表达芽孢杆菌来源的 PonA 或其基因工程截短体 DcPonA 和超高温淀粉酶重组菌株的摇瓶菌体浓度和酶活示意图。

图 3 为共表达 PonA (Bs) 和超高温淀粉酶重组菌株在 3L 生物反应器中的菌体浓度和酶活曲线图；(a) SCK6/*pfa-ck*，(b) SCK6/*pfa-ponA* (Bs)。

图 4 为共表达 PonA (Bs) 和超高温淀粉酶重组菌株在 3L 生物反应器中发酵样品的 SDS-PAGE 分析电泳图。

图 5 为共表达枯草芽孢杆菌来源的 PonA 或其同类蛋白磷壁酸合酶 LtaS 和超高温淀粉酶重组菌株的摇瓶菌体浓度和酶活示意图。

具体实施方式

(一) 本发明简写与全称，以及中英文对照：

PonA：A 类青霉素结合蛋白；

OppA：ABC 途径转运蛋白；

SppA：信号肽酶；

ponA (Bs)： *Bacillus subtilis* 168 来源的 A 类青霉素结合蛋白；

ponA (Bl)： *Bacillus licheniformis* DSM13 来源的 A 类青霉素结合蛋白；

ponA (Ba)： *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 来源的 A 类青霉素结合蛋白；

ponA (Bm)： *Bacillus megaterium* DSM319 来源的 A 类青霉素结合蛋白；

ponA (Gs)： *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 来源的 A 类青霉素结合蛋白；

DcPonA (Bs) : *Bacillus subtilis* 168 来源的 A 类青霉素结合蛋白截短体;

DcPonA (Bl) : *Bacillus licheniformis* DSM13 来源的 A 类青霉素结合蛋白截短体;

DcPonA (Ba) : *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 来源的 A 类青霉素结合蛋白截短体;

DcPonA (Bm) : *Bacillus megaterium* DSM319 来源的 A 类青霉素结合蛋白截短体;

DcPonA (Gs) : *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 来源的 A 类青霉素结合蛋白截短体;

LB: Luria-Bertani 培养基, 用于枯草芽孢杆菌的培养。

TB: Terrific Broth, 超级肉汤培养基。

(二) 本发明具体实施方式中涉及的检测方法:

(1) 生物量测定:

采用菌浓度 (OD_{600}) 表示。取样后将样品用去离子水稀释适当倍数后, 置于分光光度计中测量 600nm 处吸光值。

(2) 超高温淀粉酶酶活测定:

具体操作见文献 (檀瑞婷, 张康, 吴敬. 嗜热古菌超高温 α -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达 [J]. 基因组学与应用生物学)。酶活测定公式为: $U(U\text{ mL}^{-1})=n \times (6.0539 \times \Delta 540 + 0.3494)$, 其中 U 为酶活力单位, n 为酶液稀释倍数, $\Delta 540$ 为样品在 OD_{540} 下测出的吸光值减去空白组的吸光值。

(3) 中温淀粉酶酶活测定:

具体操作见文献 (Yao D, Zhang K, Zhu X, et al. Enhanced extracellular α -amylase production in *Brevibacillus choshinensis* by optimizing extracellular degradation and folding environment [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2021(1):1.)。酶活测定公式为: $U(U\text{ mL}^{-1})=n \times (6.0539 \times \Delta 540 + 0.3494)$, 其中 U 为酶活力单位, n 为酶液稀释倍数, $\Delta 540$ 为样品在 OD_{540} 下测出的吸光值减去空白组的吸光值。

(4) 蔗糖异构酶酶活测定:

具体操作见文献 (刘军彤, 吴敬, 陈晟. 分散泛菌蔗糖异构酶在大肠杆菌中的表达及发酵优化 [J]. 生物工程学报, 2016, 032(008):1070-1080)。酶活测定公式为: $U(U\text{ mL}^{-1})=n \times (6.0539 \times \Delta 540 + 0.3494)$, 其中 U 为酶活力单位, n 为酶液稀释倍数, $\Delta 540$ 为样品在 OD_{540} 下测出的吸光值减去空白组的吸光值。

(三) 本发明具体实施方式中涉及的培养基:

培养基均使用 ddH₂O 配制，配制完成后 121°C 灭菌 20 min。

LB 液体培养基：酵母粉 5.0g/L、胰蛋白胨 10.0g/L、NaCl 10.0g/L。

TB 液体培养基：酵母粉 24.0g/L、胰蛋白胨 12.0g/L、甘油 5.0g/L、K₂HPO₄·3H₂O 16.43g/L、KH₂PO₄ 2.31g/L。

3L 发酵罐基础培养基：酵母粉 9.0 g/L、大豆蛋白胨 18 g/L、柠檬酸铵 1.0 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 14.66g/L、(NH₄)₂SO₄ 2.68 g/L、Na₂SO₃ 2.0 g/L、NaH₂PO₄ 3.49 g/L、MgSO₄ 0.49 g/L、TES 金属离子液 0.3 % v/v。

3L 发酵罐补料培养基：葡萄糖 250.0 g/L、大豆蛋白胨 66.66 g/L、酵母粉 33.33 g/L、MgSO₄ 0.39 g/L、TES 金属离子液 4.0 % v/v。

TES 金属离子液：CaCl₂ 0.5 g/L、ZnSO₄·7H₂O 0.18 g/L、MnSO₄·H₂O 0.1 g/L、FeCl₃ 8.35 g/L、CuSO₄·5H₂O 0.16 g/L、CoCl₂·6H₂O 0.18 g/L、Na₂ EDTA 10.5 g/L。

实施例 1 表达超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶的重组菌的构建

利用 PCR 方法分别从超高温淀粉酶、中温淀粉酶和蔗糖异构酶表达菌株中扩增得到核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30 所示的基因片段 *pfa*、*amyS* 和 *si*。经过胶回收后通过 *poe*-*pcr* 的方法将其连接至 pUB110 载体，重组蛋白的表达由 SEQ ID NO.31 所示的组成型启动子 *P_{amyQ}* 调控。随后将 *poe*-*pcr* 产物转化枯草芽孢杆菌 SCK6，冰浴 20 min，37°C 水浴 20 min，37°C，200 rpm 复苏 3 h，涂布在含有卡那霉素抗性（40 μg/mL）的 LB 平板上，过夜培养经过筛选验证获得重组菌，重组菌分别命名为 BSP、BSA、BSS。其中，用于获取 *pfa*、*amyS* 及 *si* 基因的重组菌为发明人团队前期构建得到（公开于：檀瑞婷，张康，吴敬. 嗜热古菌超高温 α-淀粉酶在 *B. subtilis* 中的分泌表达[J]. 基因组学与应用生物学；Yao D, Zhang K, Zhu X, et al. Enhanced extracellular α-amylase production in *Brevibacillus choshinensis* by optimizing extracellular degradation and folding environment[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2021(1):1.; 刘军彤,吴敬,陈晟. 分散泛菌蔗糖异构酶在大肠杆菌中的表达及发酵优化[J]. 生物工程学报,2016,032(008):1070-1080)。

实施例 2 增强因子共表达质粒的构建

(1) 重组质粒 pAD123-PonA 的构建

利用 PCR 方法从枯草芽孢杆菌基因组中扩增如 SEQ ID NO.11 所示的 *ponA* 基因片段。经过胶回收后通过一步克隆试剂盒（ClonExpress II One Step Cloning Kit）将其连接至 pAD123 载体，由 SEQ ID NO.33 所示的麦芽糖诱导型启动子 *P_{glv}* 调控表达，随后转化至大肠杆菌 JM109，冰浴 30 min，42°C 水浴 90 s，冰浴 3min，37°C，200 rpm 复苏 1 h 后涂布在含有氨苄青霉素抗性（100 μg/mL）的 LB 平板上，过夜培养。经过筛选验证获得重组质粒。

(2) 重组质粒 pAD123-OppA 的构建

利用 PCR 方法从枯草芽孢杆菌基因组中扩增核苷酸序列如 SEQ ID NO.26 所示 *oppA* 基因片段，其序列，经过胶回收后通过一步克隆试剂盒（ClonExpress II One Step Cloning Kit）将其连接至 pAD123 载体，由 SEQ ID NO.33 所示的麦芽糖诱导型启动子 P_{glv} 调控表达，随后转化至大肠杆菌 JM109，冰浴 30 min，42°C 水浴 90 s，冰浴 3min，37°C，200 rpm 复苏 1 h 后涂布在含有氨苄青霉素抗性（100 $\mu\text{g/mL}$ ）的 LB 平板上，过夜培养。经过筛选验证获得重组质粒。

(3) 重组质粒 pAD123-SppA 的构建

利用 PCR 方法从 *B. subtilis* 168 基因组中扩增 *sppA* 基因片段，其序列如 SEQ ID NO.22 所示，经过胶回收后通过一步克隆试剂盒（ClonExpress II One Step Cloning Kit）将其连接至 pAD123 载体，由 SEQ ID NO.33 所示的麦芽糖诱导型启动子 P_{glv} 调控表达，随后转化至大肠杆菌 JM109，冰浴 30 min，42°C 水浴 90 s，冰浴 3min，37°C，200 rpm 复苏 1 h 后涂布在含有氨苄青霉素抗性（100 $\mu\text{g/mL}$ ）的 LB 平板上，过夜培养。经过筛选验证获得重组质粒。

实施例 3 产超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶的共表达重组菌的构建

将实施例 2 构建正确的重组质粒 pAD123-PonA、pAD123-OppA 和 pAD123-SppA 分别转化至含有实施例 1 构建的重组菌 BSP、BSA、BSS 感受态细胞中。冰浴 20 min，37°C 水浴 20 min，37°C，200 rpm 复苏 3 h，涂布在含有卡那霉素抗性（40 $\mu\text{g/mL}$ ）及氯霉素抗性（10 $\mu\text{g/mL}$ ）的 LB 平板上，过夜培养，获得同时表达重组蛋白和增强因子的重组菌。将验证正确的重组菌以 2% 的接种量接种于 10mL 含有卡那霉素抗性（40 $\mu\text{g/mL}$ ）及氯霉素抗性（10 $\mu\text{g/mL}$ ）的 LB 培养基中，于 37°C，200 rpm 下培养 10h 作为发酵种子液。随后以 5% 的接种量转接至 50mL 含有相同浓度抗生素的 TB 培养基中，同时加入 5g/L 麦芽糖进行诱导表达，先于 37°C 培养 2h 后调节温度至 33°C 直至发酵终点。超高温淀粉酶表达菌株培养至 60h，中温淀粉酶和蔗糖异构酶表达菌株培养至 48h 后取发酵上清适当稀释后测定酶活。

发酵上清中的三种重组蛋白酶活如图 1 所示，当模型酶为超高温淀粉酶时，PonA、OppA 和 SppA 的共表达分别将酶活提高至野生型的 2.03 倍、1.42 倍和 1.92 倍，菌体 OD 没有显著差异。当模型酶为中温淀粉酶时，PonA 和 OppA 的共表达分别将酶活提高至野生型的 1.49 倍和 1.38 倍，且 PonA 和 OppA 过表达菌株发酵过程中的菌体 OD 没有显著差异。当模型酶为蔗糖异构酶时，PonA 和 SppA 的共表达分别将酶活提高至野生型的 1.52 倍和 2.26 倍，PonA 的过表达使菌体 OD 显著降低，而 SppA 的过表达显著提高了菌浓。

实施例 4 表达不同来源 PonA 的重组质粒的构建

利用 PCR 方法分别从 *B. subtilis* 168、*Bacillus licheniformis* DSM13、*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7、*Bacillus megaterium* DSM319 和 *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 的基因组中扩增 ponA (Bs)、ponA (Bl)、ponA (Ba)、ponA (Bm) 和 ponA (Gs) 基因片段，其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15 所示，经过胶回收后通过一步克隆试剂盒 (ClonExpress II One Step Cloning Kit) 将其连接至 pAD123 载体，由麦芽糖诱导型启动子 P_{glv} 调控表达，随后转化至大肠杆菌 JM109，冰浴 30 min，42°C 水浴 90 s，冰浴 3min，37°C，200 rpm 复苏 1 h 后涂布在含有氨苄青霉素抗性 (100 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 平板上，过夜培养。经过筛选验证获得重组质粒。

实施例 5 表达 FN3 结构域截短体 DcPonA 的重组质粒的构建

利用 PCR 方法通过同源重组截短 PonA 的 C 端 FN3 结构域，分别获得核苷酸序列如 SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20 所示的 DcPonA (Bs)、DcPonA (Bl)、DcPonA (Ba)、DcPonA (Bm)、DcPonA (Gs) 片段；按照实施例 4 相同策略将 PCR 产物经过胶回收后通过一步克隆试剂盒 (ClonExpress II One Step Cloning Kit) 连接至 pAD123 载体，再经过 *dpnI* 消化模板后转化至大肠杆菌 JM109，冰浴 30 min，42°C 水浴 90 s，冰浴 3min，37°C，200 rpm 复苏 1 h 后涂布在含有氨苄青霉素抗性 (100 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 平板上，过夜培养。经过筛选验证获得重组质粒。

实施例 6 摇瓶发酵 PonA 或 DcPonA 共表达重组菌合成超高温淀粉酶

将实施例 4、实施例 5 构建正确的重组质粒分别转化至实施例 1 构建的重组菌 BSP 中，冰浴 20 min，37°C 水浴 20 min，37°C，200 rpm 复苏 3 h，涂布在含有卡那霉素抗性 (40 $\mu\text{g/mL}$) 及氯霉素抗性 (10 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 平板上，过夜培养，获得同时表达超高温淀粉酶 Pfa 和 PonA 蛋白的重组菌，或同时表达超高温淀粉酶 Pfa 和 DcPonA 蛋白的重组菌。将验证正确的重组菌以 2% 的接种量接种于 10mL 含有卡那霉素抗性 (40 $\mu\text{g/mL}$) 及氯霉素抗性 (10 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 培养基中，于 37°C，200 rpm 下培养 10h 作为发酵种子液。随后以 5% 的接种量转接至 50mL 含有相同浓度抗生素的 TB 培养基中，同时加入 5g/L 麦芽糖进行诱导表达，先于 37°C 培养 2h 后调节温度至 33°C 培养至 60h。随后取发酵上清适当稀释后按照上述酶活检测方法测定 Pfa 表达量。以不表达 PonA 或 DcPonA，仅向重组菌 BSP 中转化质粒 pAD123 获得的重组菌作为对照菌株。

发酵上清中的 Pfa 酶活如图 2 所示，除 PonA (Bl) 外，表达其他芽孢杆菌来源 PonA 蛋白的重组菌相较对照菌株均表现出了蛋白表达量的显著提高。共表达 PonA (Bs)、PonA (Ba)、PonA (Bm)、PonA (Gs) 的重组菌在发酵 60h 后测得酶活分别为：74.17 U/mL、82.07 U/mL、143.98 U/mL、171.76 U/mL。相比对照菌株分别提高至 1.71 倍、1.89 倍、3.32 倍和 3.96 倍。

共表达 DcPonA 的重组菌相较对照菌株的 Pfa 酶活均表现出显著提升。共表达 DcPonA (Bs)、DcPonA (Bl)、DcPonA (Ba)、DcPonA (Bm)、DcPonA (Gs) 的重组菌在发酵 60h 后测得酶活分别为：90.48 U/mL、143.48 U/mL、94.04 U/mL、87.68 U/mL、145.26 U/mL。相比对照菌株分别提高至 2.09 倍、3.31 倍、2.17 倍、2.02 倍、3.35 倍。

实施例 7 启动子优化

构建组成型表达 PonA 的质粒 pAD123-P_{HpaII}-PonA (Bs)，具体步骤为：利用 PCR 方法从 *B. subtilis* 168 基因组中扩增得到核苷酸序列如 SEQ ID NO.32 所示的启动子 P_{HpaII} 基因片段。经过胶回收后通过一步克隆试剂盒 (ClonExpress II One Step Cloning Kit) 将其连接至实施例 4 构建的携带 PonA (Bs) 的载体 pAD123-PonA (Bs) 上，随后转化至大肠杆菌 JM109，冰浴 30 min，42°C 水浴 90 s，冰浴 3min，37°C，200 rpm 复苏 1 h 后涂布在含有氨苄青霉素抗性 (100 µg/mL) 的 LB 平板上，过夜培养。经过筛选验证获得重组质粒 pAD123-P_{HpaII}-PonA (Bs)。

实施例 8 3L 发酵罐水平发酵合成超高温淀粉酶

将实施例 7 构建正确的重组质粒 pAD123-P_{HpaII}-PonA (Bs) 转化至实施例 1 构建的重组菌 BSP 感受态细胞中，冰浴 20 min，37°C 水浴 20 min，37°C，200 rpm 复苏 3 h，涂布在含有卡那霉素抗性 (40 µg/mL) 及氯霉素抗性 (10 µg/mL) 的 LB 平板上，过夜培养，获得组成型 PonA 过表达的重组菌。将甘油管新鲜保藏的菌株用平板划线法于 37°C 培养 10h，挑取单菌落至含有卡那霉素 (40 µg/mL) 和氯霉素 (10 µg/mL) 的 50mL 装 LB 培养基中，37°C，200rpm 条件下培养 12h，然后以 10% 的转接量转接至 900mL 含有卡那霉素 (40 µg/mL) 和氯霉素 (10 µg/mL) 的发酵培养基中，调节温度为 33°C，用氨水和 20% 磷酸将 pH 控制在 7.0，在发酵 6.5~8 h 出现溶氧反弹时开始补料，控制补料流速使体系中的残糖含量不高于 0.1g/L。定时取样测定菌浓和发酵液中的超高温淀粉酶酶活。对照菌株的总酶活在发酵 90h 时达到 1611.86 U/mL (图 3a)，PonA (Bs) 共表达菌株则于 102h 达到 2041.73 U/mL (图 3b)，相较对照菌株酶活提高至 1.26 倍。两种重组菌的菌浓在高密度发酵周期中基本一致，SDS-PAGE 显示蛋白条带与酶活趋势相符 (图 4)。

对比例 1:

具体实施方式同实施例 5~6，区别在于，替换调节因子，具体为：将 PonA 替换为枯草芽孢杆菌中主要的磷壁酸合酶 LtaS (氨基酸序列如 SEQ ID NO.34 所示，基因序列如 SEQ ID NO.35 所示)，结果显示，LtaS 过表达仅将 Pfa 的酶活提高至 1.52 倍，显著低于 PonA 对 Pfa 表达的提高效果 (2.03 倍)。在同样的发酵条件下，OD₆₀₀ 没有显著变化 (图 5)。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

1、重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，表达外源蛋白和（1）~（4）任一蛋白：

- （1）芽孢杆菌来源的 A 类青霉素结合蛋白 PonA；
- （2）芽孢杆菌来源的 A 类青霉素结合蛋白截短体 DcPonA；
- （3）枯草芽孢杆菌来源的 ABC 途径转运蛋白 OppA；
- （4）枯草芽孢杆菌来源的信号肽酶 SppA；

所述的 PonA 是来源于枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）、解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）、巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）或嗜热脂肪芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）的 A 类青霉素结合蛋白；

所述的 PonA 截短体是来源于枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）、解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）、巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）或嗜热脂肪芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）的 A 类青霉素结合蛋白截短体。

2、根据权利要求 1 所述的重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，所述 PonA 蛋白具有 SEQ ID NO.1~5 任一所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.1~5 所示序列具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

3、根据权利要求 1 所述的重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，所述 PonA 蛋白截短体为具有 SEQ ID NO.6~10 任一所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.6~10 所示序列具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.9% 同一性的氨基酸序列。

4、根据权利要求 1~3 任一所述重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，所述的外源蛋白包括超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

5、根据权利要求 4 所述的重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，以 pUB110 为表达载体表达超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

6、根据权利要求 1~5 任一所述的重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，以 pAD123 为表达载体表达所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽酶 SppA。

7、根据权利要求 1~6 任一所述的重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，所述的外源蛋白通过组成型启动子 P_{amyQ} 进行表达。

8、根据权利要求 1~7 任一所述的重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽酶 SppA 通过启动子 P_{glv} 或启动子 P_{Hpal} 进行表达。

9、根据权利要求 1~8 任一所述的重组枯草芽孢杆菌，其特征在于，宿主包括枯草芽孢杆菌 SCK6。

10、一种提高枯草芽孢杆菌中重组蛋白表达量的方法，其特征在于，所述方法是在表达重组蛋白的同时过表达芽孢杆菌 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽酶 SppA。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述的重组蛋白包括超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，以 pUB110 为表达载体表达超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

13、根据权利要求 10~12 任一所述的方法，其特征在于，以 pAD123 为表达载体表达所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽酶 SppA。

14、构建权利要求 1 所述枯草芽孢杆菌重组菌的方法，其特征在于，所述方法包括向枯草芽孢杆菌中导入编码重组蛋白的基因和编码增强因子的基因；所述编码增强因子的基因包括 A 类青霉素结合蛋白 PonA、A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体、ABC 途径转运蛋白 OppA 或信号肽酶 SppA 的编码基因。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA 的编码基因具有 SEQ ID NO.11~SEQ ID NO.15 任一所示的核苷酸序列。

16、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述 A 类青霉素结合蛋白 PonA 截短体的编码基因具有 SEQ ID NO.16~SEQ ID NO.20 任一所示的核苷酸序列。

17、权利要求 1~9 任一所述重组枯草芽孢杆菌在生产超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶中的应用。

18、根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述应用是将所述重组菌在发酵培养基中培养一段时间，收集超高温淀粉酶、中温淀粉酶或蔗糖异构酶。

19、根据权利要求 17 或 18 所述的方法，其特征在于，在发酵的过程中还进行了补料。

20、权利要求 1~9 任一所述重组枯草芽孢杆菌或权利要求 10~19 任一所述方法在食品、化工、制糖、饲料等领域生产产品中的应用。

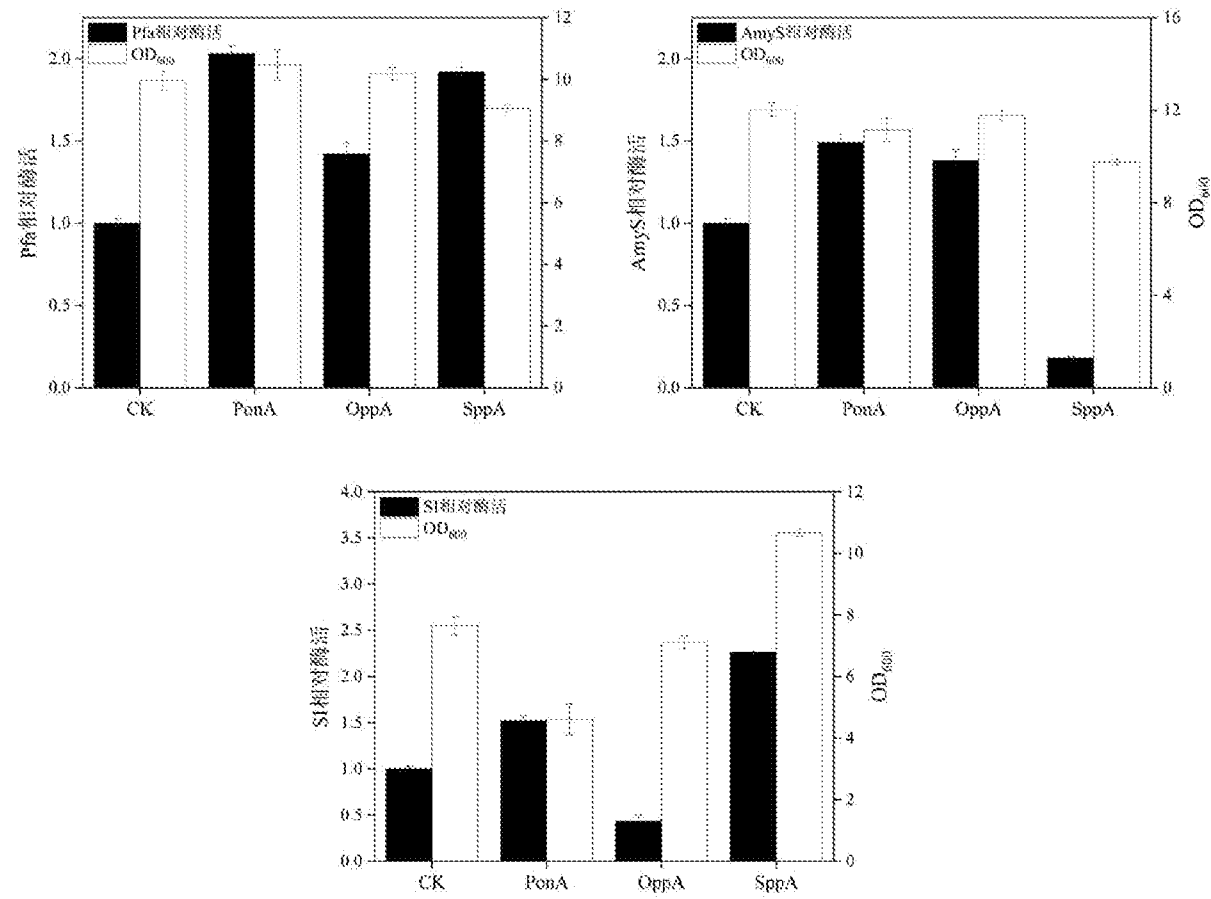


图 1

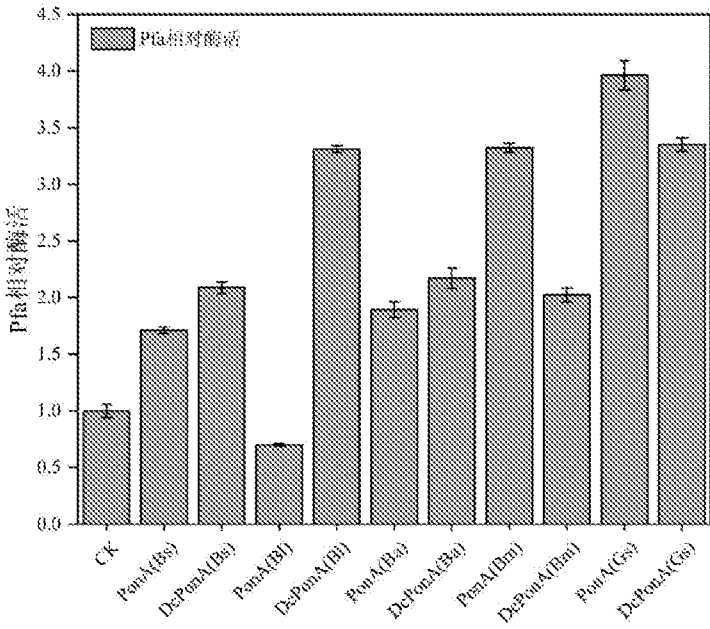


图 2

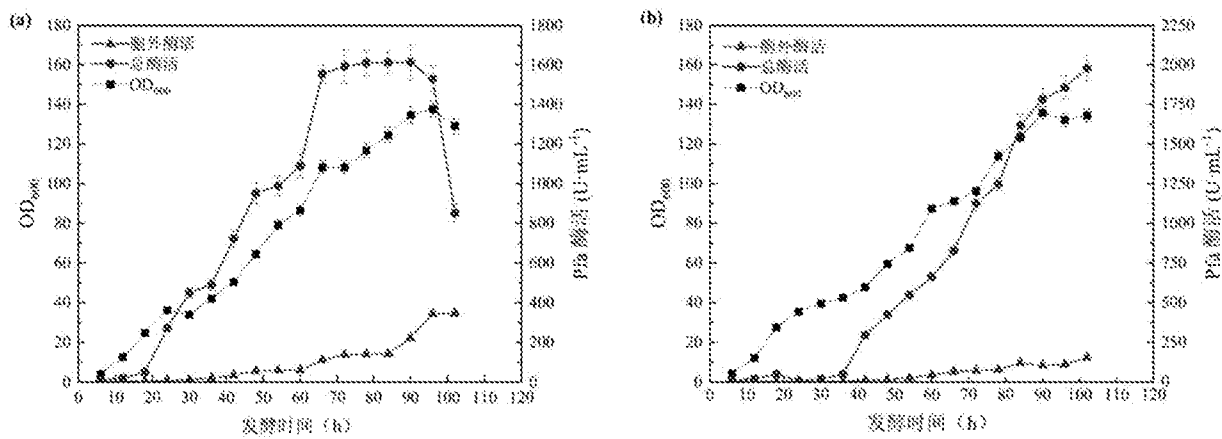


图 3

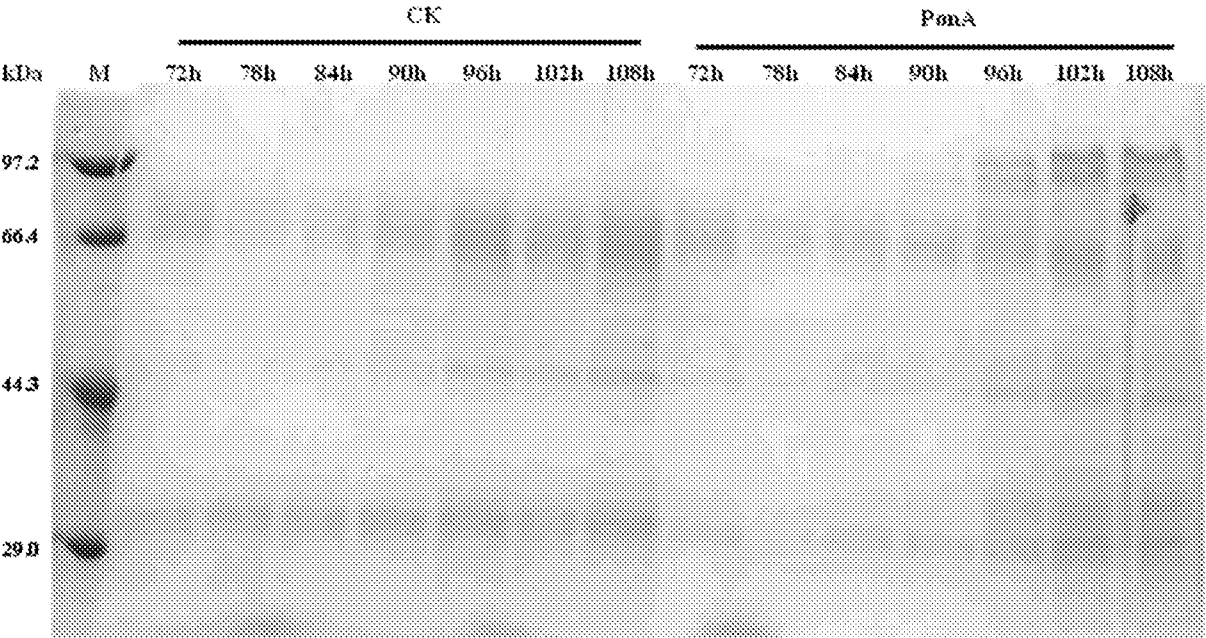


图 4

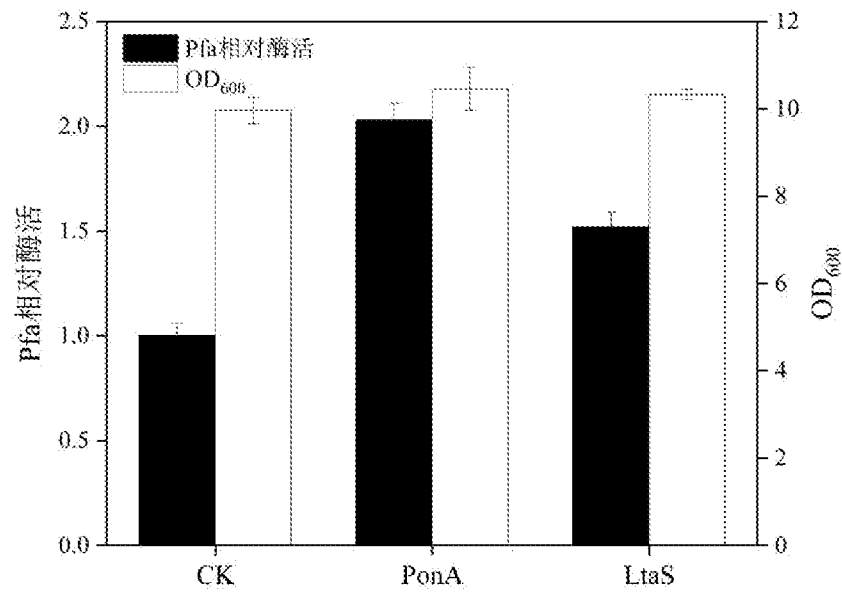


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/135786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C07K 14/32(2006.01)i; C12N 9/56(2006.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; C12N 15/67(2006.01)i;
C12N 9/90(2006.01)i; C12N 9/26(2006.01)i; C12R 1/125(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N C07K C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, Wanfang Data Search System, pubmed, patentics, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, GENBANK, STN: SEQ ID NOs: 1-5 and 11-15, 枯草芽孢杆菌, bacillus subtilis, B. subtilis, PonA, A类青霉素结合蛋白, 外源蛋白, 异源蛋白, 外源基因, foreign protein, exogenous protein, 表达量, 表达水平, 产量, production, yield, expression level, 张康, 吴敬, 朱响, 罗慧, 江南大学

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHU, X.Y. et al. "Overexpression of the Class A Penicillin-binding Protein PonA in Bacillus Improves Recombinant Protein Production" <i>Bioresource Technology</i> , Vol. vol. 383, 20 May 2023 (2023-05-20), 1-9 abstract, page 1, right-hand column, paragraph 1, page 2, left-hand column, paragraph 3, and right-hand column, paragraphs 2-4, page 4, right-hand column, paragraphs 1-3, and page 7, right-hand column, paragraph 2	1 (in part), 4-14 (in part), 17-20 (in part)
Y	ZHU, X.Y. et al. "Overexpression of the Class A Penicillin-binding Protein PonA in Bacillus Improves Recombinant Protein Production" <i>Bioresource Technology</i> , Vol. vol. 383, 20 May 2023 (2023-05-20), 1-9 abstract, page 1, right-hand column, paragraph 1, page 2, left-hand column, paragraph 3, and right-hand column, paragraphs 2-4, page 4, right-hand column, paragraphs 1-3, and page 7, right-hand column, paragraph 2	2, 4-9 (in part), 15, 17-20 (in part)



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 February 2024

Date of mailing of the international search report

18 February 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/135786

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KABISCH, J. et al. "Accession: AGG61627.1" <i>GenBank</i> , 30 January 2014 (2014-01-30), sequences	2, 4-9 (in part), 15, 17-20 (in part)
Y	REY, M.W. et al. "Accession: AAU23893.1" <i>GenBank</i> , 31 January 2014 (2014-01-31), sequences	2, 4-9 (in part), 15, 17-20 (in part)
Y	ZHANG, G. et al. "Accession: AEB23343.1" <i>GenBank</i> , 31 January 2014 (2014-01-31), sequences	2, 4-9 (in part), 15, 17-20 (in part)
Y	EPPINGER, M. et al. "Accession: ADF38244.1" <i>GenBank</i> , 16 January 2015 (2015-01-16), sequences	2, 4-9 (in part), 15, 17-20 (in part)
Y	KAUNIETIS, A. et al. "Accession: KZM53995.1" <i>GenBank</i> , 10 September 2019 (2019-09-10), sequences	2, 4-9 (in part), 15, 17-20 (in part)
PX	CN 116656588 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 29 August 2023 (2023-08-29) claims 1-21	1 (in part), 2, 4-14 (in part), 15, 17-20 (in part)
A	CN 112553134 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 26 March 2021 (2021-03-26) claims 1-10	1 (in part), 2, 4-14 (in part), 15, 17-20 (in part)
A	US 2011117598 A1 (DANISCO US INC.) 19 May 2011 (2011-05-19) claims 1-31	1 (in part), 2, 4-14 (in part), 15, 17-20 (in part)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/135786

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: the technical solutions of claims 1, 4-14 and 17-20 involving a class A penicillin-binding protein PonA, and claims 2 and 15.

Invention 2: the technical solutions of claims 1, 4-14 and 17-20 involving a class A penicillin-binding protein truncation DcPonA, and claims 3 and 16.

Invention 3: the technical solutions of claims 1, 4-14 and 17-20 involving ATP-binding cassette transporter OppA.

Invention 4: the technical solutions of claims 1, 4-14 and 17-20 involving signal peptide peptidase SppA.

The same technical feature among inventions 1-4 is: recombinant *Bacillus subtilis* which expresses foreign proteins, which is common general knowledge in the art. Therefore, inventions 1-4 described above do not have a same or corresponding special technical feature, and thus do not comply with PCT Rule 13.2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **the technical solutions of claims 1, 4-14 and 17-20 involving a class A penicillin-binding protein PonA, and claims 2 and 15.**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/135786

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116656588	A	29 August 2023	None			
CN	112553134	A	26 March 2021	None			
US	2011117598	A1	19 May 2011	KR	20100098652	A	08 September 2010
				DK	2235176	T3	25 September 2017
				US	8512982	B2	20 August 2013
				AU	2008348270	A1	30 July 2009
				JP	2011507528	A	10 March 2011
				JP	5629584	B2	19 November 2014
				WO	2009094084	A1	30 July 2009
				WO	2009094084	A9	24 September 2009
				CA	2709804	A1	30 July 2009
				RU	2010130503	A	27 January 2012
				RU	2515112	C2	10 May 2014
				EP	2235176	A1	06 October 2010
				EP	2235176	B1	21 June 2017

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

发明1：权利要求1,4-14,17-20中涉及A类青霉素结合蛋白PonA的技术方案，权利要求2,15；

发明2：权利要求1,4-14,17-20中涉及A类青霉素结合蛋白截短体DcPonA的技术方案，权利要求3,16；

发明3：权利要求1,4-14,17-20中涉及ABC途径转运蛋白OppA的技术方案；

发明4：权利要求1,4-14,17-20中涉及信号肽酶SppA的技术方案。

发明1-4相同的技术特征为：表达外源蛋白的重组枯草芽孢杆菌，其属于本领域公知常识，因此，上述发明1-4不具备相同或相应的特定技术特征，不符合PCT细则第13条第（2）的要求。

1.

☐

由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2.

☐

由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3.

☐

由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4.

☒

申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1,4-14,17-20中涉及A类青霉素结合蛋白PonA的技术方案，权利要求2,15。

对异议的意见

☐

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐

缴纳附加检索费时未提交异议书。

A. 主题的分类

C12N 1/21(2006.01)i; C07K 14/32(2006.01)i; C12N 9/56(2006.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; C12N 15/67(2006.01)i; C12N 9/90(2006.01)i; C12N 9/26(2006.01)i; C12R 1/125(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N C07K C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, pubmed, patentics, 中国专利生物序列检索系统, GENBANK, STN; SEQ ID NOs:1-5,11-15, 枯草芽孢杆菌, bacillus subtilis, B. subtilis, PonA, A类青霉素结合蛋白, 外源蛋白, 异源蛋白, 外源基因, foreign protein, exogenous protein, 表达量, 表达水平, 产量, production, yield, expression level, 张康, 吴敬, 朱昀颀, 罗慧, 江南大学

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	ZHU, X.Y.等. "Overexpression of the class A penicillin-binding protein PonA in Bacillus improves recombinant protein production" Bioresource Technology, 第383卷, 2023年5月20日 (2023 - 05 - 20), 1-9 摘要, 第1页右栏第1段, 第2页左栏第3段, 右栏第2-4段, 第4页右栏第1-3段, 第7页右栏第2段	1 (部分), 4-14 (部分), 17-20 (部分)
Y	ZHU, X.Y.等. "Overexpression of the class A penicillin-binding protein PonA in Bacillus improves recombinant protein production" Bioresource Technology, 第383卷, 2023年5月20日 (2023 - 05 - 20), 1-9 摘要, 第1页右栏第1段, 第2页左栏第3段, 右栏第2-4段, 第4页右栏第1-3段, 第7页右栏第2段	2, 4-9 (部分), 15, 17-20 (部分)
Y	KABISCH, J.等. "Accession:AGG61627.1" Genbank, 2014年1月30日 (2014 - 01 - 30), 序列	2, 4-9 (部分), 15, 17-20 (部分)

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“p” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年2月5日

国际检索报告邮寄日期

2024年2月18日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

李宁

电话号码 (+86) 010-53961932

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	REY, M.W.等. "Accession:AAU23893.1" Genbank, 2014年1月31日 (2014 - 01 - 31), 序列	2, 4-9 (部分), 15, 17-20 (部分)
Y	ZHANG, G.等. "Accession:AEB23343.1" Genbank, 2014年1月31日 (2014 - 01 - 31), 序列	2, 4-9 (部分), 15, 17-20 (部分)
Y	EPPINGER, M.等. "Accession:ADF38244.1" Genbank, 2015年1月16日 (2015 - 01 - 16), 序列	2, 4-9 (部分), 15, 17-20 (部分)
Y	KAUNIETIS, A.等. "Accession:KZM53995.1" Genbank, 2019年9月10日 (2019 - 09 - 10), 序列	2, 4-9 (部分), 15, 17-20 (部分)
PX	CN 116656588 A (江南大学) 2023年8月29日 (2023 - 08 - 29) 权利要求1-21	1 (部分), 2, 4-14 (部分), 15, 17-20 (部分)
A	CN 112553134 A (江南大学) 2021年3月26日 (2021 - 03 - 26) 权利要求1-10	1 (部分), 2, 4-14 (部分), 15, 17-20 (部分)
A	US 2011117598 A1 (DANISCO US INC.) 2011年5月19日 (2011 - 05 - 19) 权利要求1-31	1 (部分), 2, 4-14 (部分), 15, 17-20 (部分)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/135786

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	116656588	A	2023年8月29日	无			
CN	112553134	A	2021年3月26日	无			
US	2011117598	A1	2011年5月19日	KR	20100098652	A	2010年9月8日
				DK	2235176	T3	2017年9月25日
				US	8512982	B2	2013年8月20日
				AU	2008348270	A1	2009年7月30日
				JP	2011507528	A	2011年3月10日
				JP	5629584	B2	2014年11月19日
				WO	2009094084	A1	2009年7月30日
				WO	2009094084	A9	2009年9月24日
				CA	2709804	A1	2009年7月30日
				RU	2010130503	A	2012年1月27日
				RU	2515112	C2	2014年5月10日
				EP	2235176	A1	2010年10月6日
				EP	2235176	B1	2017年6月21日